



DESCRIPCION DE CARACTERISTICAS REPRODUCTIVAS E
HISTOLOGIA DEL APARTO REPRODUCTOR DE *Hemioedema spectabilis*
(Ludwig, 1888) Y *Havelockia pegi* (Martínez *et al.*, 2013)
(HOLOTHUROIDEA: DENDROCHIROTIDA) DEL GOLFO SAN MATIAS,
RIO NEGRO, ARGENTINA

CARIGNANO MARIA ANGELICA

DIRECTORA: CYNTHIA TAMARA RUBILAR – PANASIUK

CO-DIRECTORA: MARINA ANDREA KROECK

LICENCIATURA EN BIOLOGIA MARINA
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE
ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS MARINAS

2020

Dedicada a mis ausencias más profundas...

Luis, Angelica y Gustavo

Agradecimientos

La verdad que me cuesta creer haber llegado hasta acá. Un sinfín de cosas vividas, muchas emociones, caer y levantarse un millón de veces, pero siempre pude contar con alguien en cada momento. Es por eso, que no quiero dejar de agradecer a las personas y a las instituciones que de una manera u otra formaron parte de esto.

A Néstor, mi otra mitad, gracias mi vida por la oportunidad, el aguante y por acompañarme siempre en cada locura, ¡y esta fue una de las más grandes, Te amo!!!

A mis hijos, que son mi motor para todo lo que hago, más que una meta o un objetivo de mamá, para ustedes, esto es una enseñanza.... No importa el tiempo, ni el lugar... ¡Siempre se puede!

A mis hermanos, Cabeta y Celeste, mil gracias, por ustedes estoy acá, ustedes no me dejaron bajar los brazos en el momento más difícil de nuestras vidas, gracias por el amor y la unión; si de algo pueden estar orgullosos los viejos, es del maravilloso equipo que formamos, ¡los adoro!

A mi familia, que es mucha.... Gracias, de verdad, han estado para nosotros al pie del cañón, fue difícil, pero ahí estuvieron y están. ¡Quiero dedicar un especial agradecimiento a mis tías Pety, Elsa e Isabel... mil gracias!!!

A los amigos que me dio este viaje, que son unos cuantos, gracias por cada momento compartido, gracias por la palabra de aliento, por el aguante y por los festejos. ¡He aprendido algo de cada uno de ustedes, y los voy a llevar por siempre en mi corazón, gracias!

Al Centro de Investigación Aplicada y Transferencia Tecnológica en Recursos pesqueros “Almirante Storni” (CIMAS) y a su director Lic. Oscar H. Padin, y en especial al Laboratorio de Histología, gracias por la predisposición, el acompañamiento y por las charlas (de temas variables), siempre y en especial a la hora del mate!. Hacer esto no fue fácil, pero agradezco enormemente el apoyo y la guía. Especial agradecimiento a Quique, parte importante de este

maravilloso equipo, y no puedo dejar de agradecer a Víctor, siempre predispuesto a dar una mano!!! Gracias Vitorrrr!!!!

A la Escuela Superior de Ciencias Marinas, y a su director, Tec. Fernando Paul Osovník. Un especial agradecimiento a todo su personal de la ESCiMar, gracias por la formación, el incentivo y por estar ahí cuando fue necesario.

A Tamara, mi directora, gracias por permitirme este crecimiento, gracias por la guía, la paciencia y el tiempo.... muchas gracias!!!

A Marina, mi codirectora, te agradezco enormemente la oportunidad que me brindaste, a este lugar no hubiese llegado sin tu acompañamiento!!! Gracias por tu predisposición y la buena energía de siempre!!! Gracias por esa mano y ese oído siempre atento a mis necesidades, las que sean!!! Siento que más que una codirectora fuiste una gran compañera, de todo corazón... gracias, de verdad mil gracias!!

Resumen

La clase Holothuroidea, se caracteriza por presentar en su mayoría especies dioicas, sin dimorfismo sexual, con fecundación externa y desarrollo indirecto. El objetivo del presente trabajo consiste en describir la histología gonadal y realizar una primera aproximación a los patrones reproductivos de *Hemioedema spectabilis* y *Havelockia pegi* en el Golfo San Matías. Durante los meses de otoño-invierno de 2015 y 2016 se recolectaron 193 individuos de *H. spectabilis* y 131 individuos de *H. pegi*. En el laboratorio, se registró el peso total, peso de la gónada y peso eviscerado. Para el estudio histológico de la gónada se utilizó la técnica de inclusión en parafina, cortes de 7 μm y tinción con hematoxilina y eosina. *Hemioedema spectabilis* presenta sexos separados, proporción sexual distinta de 1:1 y hermafroditismo ocasional. La pared del túbulo gonadal consta de tres capas de tejido y de acuerdo a la citología se pudieron describir cinco etapas de madurez sexual. La distribución de frecuencia de diámetro ovocitario (DFDOv) y el Índice Gonadal (IG) en comparación con la temperatura promedio del agua de mar, muestran un ciclo continuo con diferentes estadios de desarrollo gametogénico y un evento de desove en la época más fría del año. *Havelockia pegi* presenta organismos con sexos separados y un alto porcentaje de organismos hermafroditas, con proporciones de individuos hembras, machos y hermafroditas 4,3:1:3,3 respectivamente. La pared del túbulo gonadal presenta dos capas de tejido y se observaron tres etapas de desarrollo gonadal. De acuerdo con la DFDOv se pudo observar que durante los meses muestreados se produce el desarrollo de la gametogénesis.

Hemioedema spectabilis y *Havelockia pegi* pertenecen al mismo orden (Dendrochirotida) y comparten las características oceanográficas del área de investigación, sin embargo, presentan grandes diferencias en cuanto a la coloración de las gónadas, al patrón observado durante los

meses de otoño-invierno, la composición de la gametogénesis y la morfología de la pared gonadal.

Este estudio representa el primer registro de hermafroditismo en *Havelockia pegi* y el primer reporte de hermafroditismo casual en *Hemioedema spectabilis*.

Palabras calves: Reproducción, Holothuroidea, Hermafroditismo

Abstract

The Holothuroidea class is characterized by presenting mostly dioecious species, without sexual dimorphism, with external fertilization and indirect development. The objective of the present work is to describe the gonadal histology and to make a first approximation to the reproductive patterns of *Hemioedema spectabilis* and *Havelockia pegi* in the San Matías Gulf. During the autumn-winter months of 2015 and 2016, 193 individuals of *H. spectabilis* and 131 individuals of *H. pegi* were collected. In the laboratory, the total weight, gonad weight and gutted weight were recorded. For the histological study of the gonad, the paraffin embedding technique, 7 µm sections, and hematoxylin and eosin staining were used. *Hemioedema spectabilis* has separate sexes, a sex ratio other than 1: 1, and occasional hermaphroditism. The gonadal tubule wall consists of three layers of tissue and according to cytology, five stages of sexual maturity could be described. The oocyte diameter frequency distribution (DFDOv) and the Gonadal Index (IG) compared to the average seawater temperature, show a continuous cycle with different stages of gametogenic development and a spawning event in the coldest time of the year. *Havelockia pegi* presents organisms with separate sexes and a high percentage of hermaphrodite organisms, with ratios of female, male and hermaphrodite individuals 4.3: 1: 3.3 respectively. The gonadal tubule wall has two layers of tissue and three stages of gonadal development were observed. According to the DFDOv, it was observed that the development of gametogenesis occurs during the sampled months.

Hemioedema spectabilis and *Havelockia pegi* belong to the same order (Dendrochirotida) and share the oceanographic characteristics of the research area, however, they present great differences regarding the coloration of the gonads, to the pattern observed during the autumn-winter months, the composition of gametogenesis and morphology of the gonadal wall.

This study represents the first record of hermaphroditism in *Havelockia pegi* and the first report of casual hermaphroditism in *Hemioedema spectabilis*.

Key words: Reproduction, Holothuroidea, Hermaphroditism

Índice

	Página
Resumen	5
Abstrac	7
Introducción	12
Objetivos	17
Materiales y Métodos	18
Resultados	23
<i>Hemioedema spectabilis</i>	23
<i>Havelockia pegi</i>	40
Discusión	52
Conclusiones	56
Bibliografía	58

Índice de Figuras

Figura		Página
1.	Anatomía interna de pepino de mar común	14
2.	Ejemplar de <i>Hemioedema spectabilis</i>	15
3.	Ejemplar de <i>Havelockia pegi</i>	16
4.	Mapa del área de estudio	19
5.	Gráfico de Proporción sexual de <i>Hemioedema spectabilis</i>	23
6.	Anatomía interna de <i>Hemioedema spectabilis</i>	24
7.	Gónada masculina de <i>Hemioedema spectabilis</i>	25
8.	Gónada femenina de <i>Hemioedema spectabilis</i>	25
9.	Túbulo gonadal femenino de <i>Hemioedema spectabilis</i>	26
10.	Ovocito maduro de <i>Hemioedema spectabilis</i>	27
11.	Túbulo indiferenciado de <i>Hemioedema spectabilis</i>	28
12.	Ovogonias en gónada femenina de <i>Hemioedema spectabilis</i>	28
13.	Túbulo gonadal masculino de <i>Hemioedema spectabilis</i> en proliferación	29
14.	Túbulo gonadal femenino de <i>Hemioedema spectabilis</i> en vitelogénesis	30
15.	Túbulo gonadal femenino de <i>Hemioedema spectabilis</i> en vitelogénesis. Detalle de ovocito.	30
16.	Túbulo gonadal masculino de <i>Hemioedema spectabilis</i> en crecimiento	31
17.	Túbulo gonadal femenino de <i>Hemioedema spectabilis</i> en madurez	31
18.	Túbulo gonadal masculino de <i>Hemioedema spectabilis</i> en madurez	32
19.	Gónada de <i>Hemioedema spectabilis</i> en etapa de desove	33
20.	Túbulo gonadal masculino de <i>Hemioedema spectabilis</i> evacuado	33
21.	Gónada Hermafrodita de <i>Hemioedema spectabilis</i>	34

22.	Gónada Hermafrodita de <i>Hemioedema spectabilis</i>	35
23.	Túbulo Hermafrodita de <i>Hemioedema spectabilis</i>	35
24.	Índice gonadal promedio mensual de <i>Hemioedema spectabilis</i>	36
25.	Distribución de frecuencia de diámetro ovocitario de <i>Hemioedema spectabilis</i>	38
26.	Índice gonadal de <i>Hemioedema spectabilis</i> en comparación con la temperatura del agua de mar en el Paraje “El Sótano”	39
27.	Proporción mensual de sexos de <i>Havelockia pegi</i> durante el periodo de muestreo	40
28.	Estructura interna de <i>Havelockia pegi</i>	41
29.	Gónada Hermafrodita de <i>Havelockia pegi</i>	42
30.	Gónada Masculina de <i>Havelockia pegi</i>	42
31.	Gónada femenina de <i>Havelockia pegi</i>	43
32.	Túbulo gonadal masculino de <i>Havelockia pegi</i>	44
33.	Túbulo gonadal femenino de <i>Havelockia pegi</i>	44
34.	Túbulo gonadal femenino de <i>Havelockia pegi</i> . Detalle de ovogonia	45
35.	Gónada masculina de <i>Havelockia pegi</i>	46
36.	Túbulo gonadal masculino de <i>Havelockia pegi</i> en crecimiento	47
37.	Túbulo gonadal femenino de <i>Havelockia pegi</i> en madurez	47
38.	Túbulo gonadal masculino de <i>Havelockia pegi</i> en maduración	48
39.	Túbulo gonadal hermafrodita de <i>Havelockia pegi</i>	49
40.	Gónada hermafrodita de <i>Havelockia pegi</i>	49
41.	Distribución de Frecuencia de diámetro ovocitario para hembras de <i>Havelockia pegi</i>	50
42.	Distribución de Frecuencia de diámetro ovocitario para hermafroditas de <i>Havelockia pegi</i>	51

Introducción

El phylum Echinodermata (*ekhinos*, erizo; *derma*, piel) comprende un grupo de organismos exclusivamente marinos conocidos vulgarmente como estrellas de mar, ofiuras, erizos de mar, pepinos de mar y lirios de mar. Actualmente se conocen alrededor de 7000 especies vivientes que poseen hábitos bentónicos, sobre fondos duros y blandos, distribuyéndose desde ambientes intermareales hasta fondos abisales (Martínez, 2013). Sus características anatómicas los hacen únicos entre los invertebrados. Presentan una simetría radial pentámera secundaria, presencia de un celoma bien desarrollado de origen enterocélico, endoesqueleto formado por osículos calcáreos, y un tejido conectivo mutable que les permite cambiar la consistencia del cuerpo y que está involucrado en procesos como la fisión y autotomía. El sistema vascular acuífero, a menudo denominado sistema ambulacral, representa un sistema de canales hidráulicos internos que se visualizan externamente por la proyección de pies ambulacrales y conecta hacia el exterior a través de una placa porosa denominada madreporito. No presentan órganos excretores y el sistema circulatorio, si está presente, forma un sistema hemal generalmente reducido derivado de cavidades celómicas. En general, los organismos de este phylum son dioicos, con fecundación externa y desarrollo indirecto (Pérez *et al.*, 2014).

Este phylum agrupa cinco clases: Echinoidea, Crinoidea, Ophiuroidea, Asteroidea y Holothuroidea. Esta última reúne organismos comúnmente llamados pepinos de mar y está constituida por unas 1680 especies. La clase Holothuroidea está compuesta por seis ordenes (Aspidochirotida Grube, 1840; Elasipodida Théel, 1882; Dactylochirotida Pawson & Fell, 1965; Molpadiida Haeckel, 1896; Synaptida Cuénot, 1891 y Dendrochirotida Grube, 1840) de los cuales sólo Dendrochirotida, Synaptida y Molpadida han sido reportadas en Argentina

(Martínez, 2013). El Orden Dendrochirotida es el más diverso. Posee 20 especies, agrupadas en los géneros *Cladodactyla*, *Hemioedema*, *Heterocucumis*, *Pseudocnus*, *Pseudrotasfer*, *Trachythyone*, *Pentamera*, *Neopsolidium*, *Psolidium*, *Psolus*, *Thandarum* y *Havelockia*. Le sigue en importancia el orden Synaptida con 5 especies de los géneros *Chiridota*, *Taeniogyrus*, *Trochadota* y *Adapta*, y por último el orden Molpadiida que presenta 3 especies pertenecientes a los géneros *Paracaudina* y *Molpadida*. Para el Golfo San Matías, se han registrado seis especies de holoturoideos, *Chiridota marenzelleri* Perrier 1904, *Pentamera chiloensis* Ludwig 1886, *Chiridota pisanii* Ludwig 1886, *Havelockia pegi* Martínez *et al.*, 2013, *Hemioedema spectabilis* Ludwig 1888 y *Pentactella leonina* Semper 1867 (Zaixso & Lizarralde, 2000; Arribas *et al.*, 2016).

La mayoría de los holoturoideos son dioicos y no presentan dimorfismo sexual, tienen fecundación externa y desarrollo indirecto a través de una larva auricularia (Ruppert & Barnes, 1996; Pérez *et al.*, 2014). Los holoturoideos en general se caracterizan por poseer una sola gónada, situada en el extremo anterior de la cavidad celómica y unida a la pared dorsal del cuerpo. Está formada por uno o dos mechones de numerosos túbulos de diversos tamaños, los que pueden estar o no ramificados. Un gonoducto simple, corre por el mesenterio dorsal hasta el gonoporo, ubicado sobre la línea medio dorsal inmediatamente antes del anillo tentacular. Según la especie de holoturoideo, es posible encontrar de 1 a 50 gonoporos (Fig.1) (Smiley *et al.*, 1991, Ruppert & Barnes, 1996). En algunas especies existe el dimorfismo sexual en la coloración de las gónadas, lo que permite la determinación del sexo luego de la disección del espécimen. En caso de no existir este dimorfismo, solamente a través de cortes histológicos se puede determinar el sexo del organismo (Martínez, 2008).

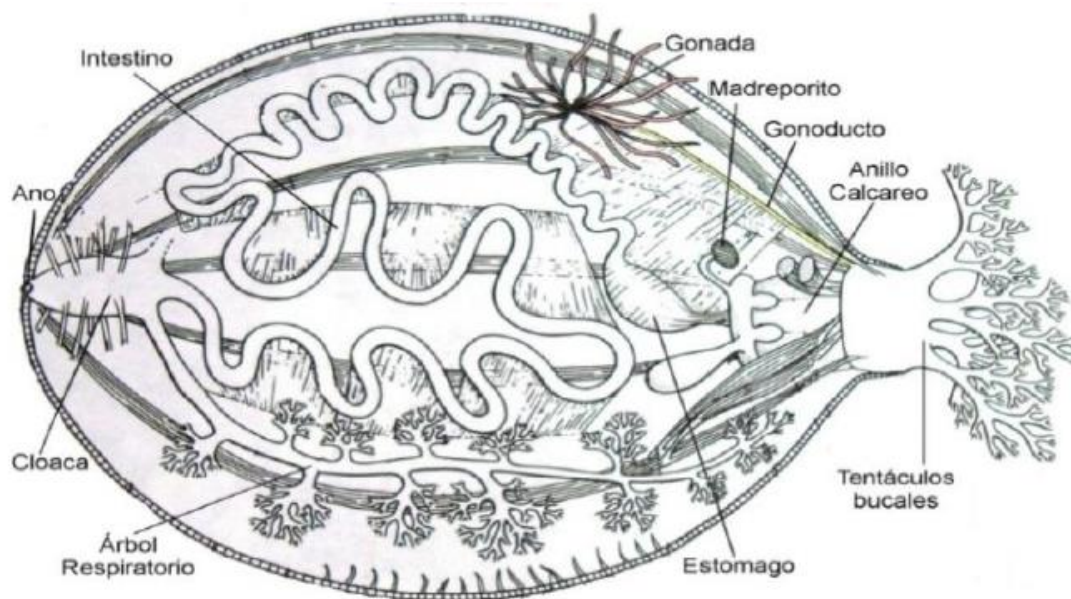


Figura 1: Anatomía interna de un pepino de mar común (tomada y modificada de Rupert & Barnes, 1996)

El hermafroditismo simultáneo es un fenómeno en el que los órganos sexuales masculinos y femeninos se encuentran en un mismo individuo. Ocurre en la mayoría de los *phyla* de invertebrados y es relativamente común en los equinodermos (Herrero-Pérezrul *et al.*, 1998). Sin embargo, no lo es para la clase Holothuroidea: según Smiley *et al.* (1991) de 1680 especies pertenecientes a esta clase, sólo se han reportado 12 especies hermafroditas correspondientes a los órdenes Dendrochirotida, Aspidochirotida y Synaptida.

Una de las variantes del hermafroditismo se llama *hermafroditismo funcional accidental* o “*hermafroditismo casual*”. Este tipo particular de reproducción ocurre cuando en especies gonocóricas o dioicas típicas, ocasionalmente aparecen individuos monoicos o hermafroditas. Dentro de los órdenes de holoturoideos que presentan *hermafroditismo casual* se encuentran dos especies del orden Aspidochirotida, una del orden Molpadida y dos del orden Elasipodida. No han sido reportados casos de *hermafroditismo casual* para el orden Dendrochirotida (Herrero Pérezrul *et al.*, 1998).

El “pepino naranja”, *Hemioedema spectabilis* (Ludwig, 1888) (Holothuroidea: Dendrochirotida) (Fig. 2), fue descrito para el Mar Argentino con una distribución que abarca el litoral argentino, desde 41°S hasta el Estrecho de Magallanes (Hernández, 1981). Esta especie pertenece a la familia Cucumariidae, presenta 10 tentáculos dendríticos iguales y vive con el cuerpo sumergido en fondos limosos o arenosos, de los cuales emerge solamente la corona tentacular, con los tentáculos siempre extendidos (Hernández, 1981). Al momento de realizar este trabajo de Tesis, no existe bibliografía específica sobre la descripción de las gónadas, ni del patrón reproductivo de esta especie.



Figura 2. Ejemplar de *Hemioedema spectabilis*.

El “pepino marrón”, *Havelockia pegi* (Holothuroidea: Dendrochirotida) (Fig. 3) recientemente descrito por Martínez *et al.* (2013), se distribuye desde Mar del Plata (38°15'S-57°15'O), provincia de Buenos Aires, hasta Península Villarino (42°25'S-64°31'O), en el Golfo

San Matías, provincia de Río Negro (Martínez *et al.*, 2013). Esta especie pertenece a la familia Sclerodactylidae, presenta 10 tentáculos, dos reducidos a un cuarto del tamaño de los tentáculos grandes, y habita zonas con arena, conchas rotas y grava. La gónada madura llena gran parte del celoma, se dispone en dos mechones adosados a la mitad del cuerpo, y cada uno presenta numerosas ramas sin dividir. Al igual que para *Hemioedema spectabilis*, no existe bibliografía específica sobre el patrón reproductivo de esta especie ni alguna descripción más detallada de la estructura gonadal.



Figura 3. Ejemplar de *Havelockia pegi*

Hasta el momento no existen reportes científicos sobre aspectos reproductivos de holoturoideos en el Golfo San Matías, Provincia de Río Negro. En este trabajo se presenta una descripción histológica de la gónada y algunos aspectos de la biología reproductiva de *Hemioedema spectabilis* y *Havelockia pegi* en el Golfo San Matías, lo cual constituye una contribución al conocimiento de un grupo poco estudiado, tanto a nivel mundial como a nivel local.

Objetivos

Objetivo general

- El objetivo general de esta tesis es describir la estructura histológica gonadal y obtener una aproximación a los patrones reproductivos de *Hemioedema spectabilis* y *Havelockia pegi* en el Golfo San Matías, Rio Negro, para contribuir al conocimiento de estas dos especies que han sido poco estudiadas tanto a nivel local como mundial.

Objetivos particulares

- Describir la estructura histológica de las gónadas de *H. spectabilis* y *H. pegi*.
- Identificar la condición sexual y determinar las proporciones sexuales de las dos poblaciones de holoturoideos estudiados.
- Describir los estadios de desarrollo gonadal de *Hemioedema spectabilis* y *Havelockia pegi*.
- Obtener una primera aproximación al patrón reproductivo de *H. spectabilis* en el Golfo San Matías.
- Analizar la relación entre el patrón reproductivo de *H. spectabilis* con la temperatura del agua de mar.

Materiales y Métodos

Dentro del marco del “Programa de Monitoreo de Calidad Ambiental en Zonas de Producción”, que realiza el Centro de Investigación Aplicada y Transferencia Tecnológica en Recursos Pesqueros “Almirante Storni” (CIMAS), donde semanalmente se realizan muestreos en el paraje “El Sótano” (40°56’ S, 65°06’W), al NO del Golfo San Matías, Provincia de Río Negro (Fig. 3); durante los años 2015 y 2016, se acoplaron 21 muestreos en busca de ejemplares de *Hemioedema spectabilis* y *Havelockia pegi*. Se organizó la recolección de muestras en tres zonas dentro del paraje, donde los organismos fueron observados, los que se encontraban enterrados y con la corona tentacular fuera del sustrato, de acuerdo a los reportes de pescadores artesanales. A partir del mes de septiembre de 2015 y hasta mayo de 2016, los organismos no fueron encontrados situación que se repitió desde septiembre a diciembre de 2016.

Para el presente estudio se cuenta con 193 individuos pertenecientes a *Hemioedema spectabilis* de los meses de abril, junio, julio y agosto de 2015; y mayo, junio y agosto de 2016; y 131 individuos de *Havelockia pegi* de los meses de mayo y junio de 2015; y mayo, junio y agosto de 2016.

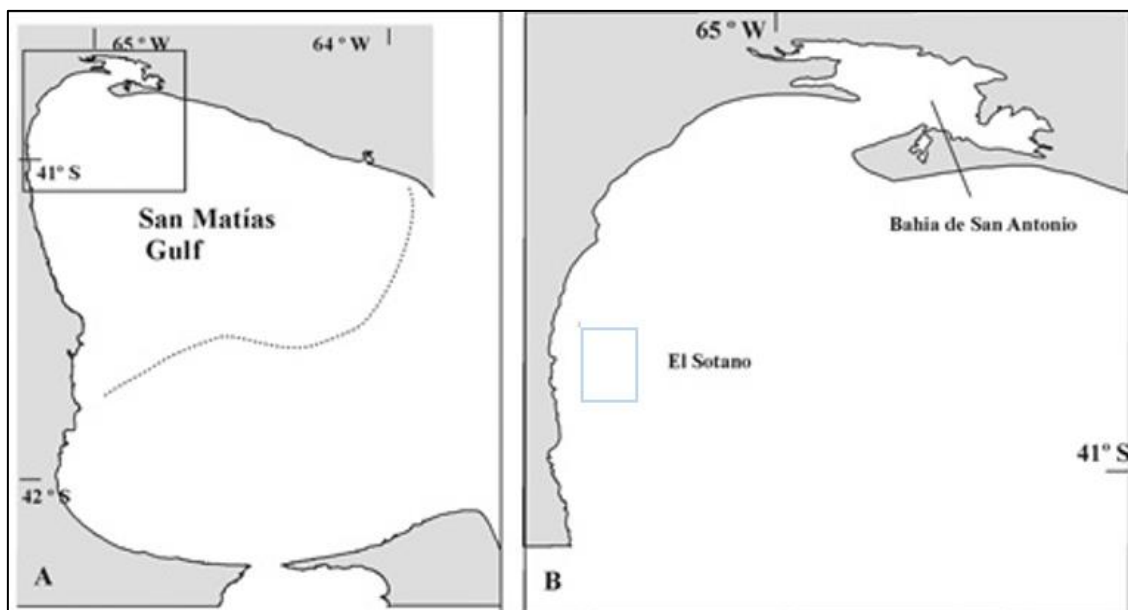


Figura 4. Mapa del área de estudio. **A:** Golfo San Matías. **B:** Zona de estudio

Las muestras fueron colectadas mediante buceo autónomo, a 18 m de profundidad, por el personal del Centro de Investigación Aplicada y Transferencia Tecnológica en Recursos pesqueros “Almirante Storni” (CIMAS). Los organismos colectados se transportaron en recipientes con agua de mar hasta el Laboratorio de Histología del CIMAS, en donde se los dejó reposar en agua de mar limpia, con aireación y temperatura controladas, hasta el momento de procesar las muestras, generalmente dentro de las 24 horas.

Una vez en el laboratorio, los individuos fueron sometidos a temperaturas próximas a la de congelación (Perez-Rufaza y Marcos-Diego, 1985) para poder pesarlos totalmente relajados. Se registró el peso total (Pt), que incluye tegumento, vísceras, gónada y agua intracorporal. Posteriormente se procedió a la disección de cada individuo, haciendo un corte longitudinal a través de la pared del cuerpo del organismo desde el ano hasta la boca; se disectó la gónada y se registró el peso (Pg) y el color de las mismas. Luego se extirparon el resto de las vísceras y se registró el peso eviscerado (Pev) de la pared del cuerpo, utilizando una balanza de precisión de 0,01g (Fajardo-León *et al.*, 1995). Las gónadas de los especímenes se fijaron en solución Davidson por 24 hs y luego se preservaron en alcohol al 70 %. Para el estudio histológico se

usó la técnica de inclusión en parafina y luego se realizaron secciones histológicas de 5 a 7 μm , las cuales se tiñeron con Hematoxilina y Eosina.

Identificación de la condición sexual y determinación de la proporción sexual

Se procedió a determinar el sexo de 319 gónadas que corresponden a organismos de ambas especies, por medio de identificación microscópica de los gametos presentes. Los organismos se clasificaron en machos, hembras, hermafroditas e indeterminado, esta última categoría agrupa a los organismos que no presentaron gónada u organismos que no contenían gametos para su identificación.

Para verificar si la proporción sexual de la población de *H. spectabilis* no difiere de 1:1, se aplicó la prueba de Chi Cuadrado (X^2) de bondad de ajuste (Sokal & Rohlf, 1981) por medio de la comparación de valores observados y esperados de frecuencia de ocurrencia mensual de hembras y machos.

Descripción histológica de la gónada y de estadios de desarrollo gonadal

El ciclo reproductivo y la descripción histológica de las gónadas de ambas especies se determinaron por medio de la caracterización histológica de los estadios de desarrollo gonadal, efectuando la identificación y descripción de los tipos celulares presentes en la gónada y también de los tejidos siguiendo los criterios de Cameron & Fankboner (1985), Smiley (1988), Smiley *et al.* (1991), Hamel *et al.* (1993), Herrero Pérezrul (1994) y Fajardo León *et al.* (1995). Los estadios reproductivos de *Hemioedema spectabilis* se clasificaron en 5 etapas de desarrollo sexual: Indiferenciado, Previtelogénesis, Vitelogénesis, Madurez y Desove para las hembras y en Proliferación, Crecimiento, Madurez y Evacuación para machos. Para los individuos de *Havelockia pegi*, las etapas de desarrollo sexual se clasificaron en Previtelogénesis,

Vitelogénesis y Madurez para las hembras; y en Proliferación, Crecimiento y Madurez para los machos.

Descripción del patrón reproductivo

Los índices gonadales (IG) se calcularon a partir de la fórmula de Giese & Pearse (1974). Este índice está basado en la consideración de que el peso de la gónada y otros órganos relacionados con la reproducción aumenta durante la época reproductiva, que se manifiesta en una relación corporal con el peso del cuerpo, lo cual arroja datos representativos de la condición reproductiva de los individuos. Este índice se calculó según la siguiente fórmula:

$$IG = P(g)/P(ev) * 100$$

Dónde: **Pg** es el peso de la gónada y **P(ev)** es el peso eviscerado de los individuos.

Se eligió el peso eviscerado para realizar el cálculo del Índice Gonadal debido a que el peso del organismo completo puede incluir sedimentos del tracto digestivo como así también agua del sistema respiratorio (Guzmán *et al.*, 2003).

A fin de complementar la información referida al patrón reproductivo, se realizó una descripción cuantitativa, utilizando la distribución de frecuencias del diámetro ovocitario para cada mes de todas las hembras de ambas especies, como así también de todos los organismos hermafroditas de *H. pegi*, durante el periodo de estudio. Para ello se determinó el diámetro de 20 ovocitos por individuo relativamente intactos que mostraron una vesícula germinal bien visible y completa. El diámetro ovocitario se midió utilizando un ocular micrométrico de 10x y un objetivo de 40x. A partir de esta información, cada ovocito se categorizó de acuerdo a los distintos estadios de desarrollo gonadal, y luego se procedió a estimar valores de diámetro ovocitario para cada estadio gametogénico.

La medición de los diámetros tubulares se realizó con un ocular micrométrico de 10x y un objetivo de 10x. De acuerdo con la descripción histológica y la asignación de los estados de maduración se procedió a la medición de los diámetros en 100 túbulos tanto de machos como de hembras en *Hemioedema spectabilis* y en 50 túbulos masculinos de *Havelockia pegi*, realizándose un promedio de aquellos túbulos que correspondían a cada estadio de madurez sexual. No fue posible categorizar los túbulos gonadales de las hembras de *H. pegi* debido a que los mismos contiene ovocitos con diferentes etapas de madurez sexual.

Patrones reproductivos en comparación con temperatura del agua de mar

Para analizar la influencia de la temperatura sobre los IG, se utilizaron los datos de temperatura promedio mensual del fondo en el paraje “El Sótano” en el Golfo San Matías, provenientes del “Programa de Monitoreo de Calidad Ambiental de Zonas de Producción de la Provincia de Rio Negro, CIMAS. Se eligió esta alternativa considerando que el desarrollo de los IG está determinado por la influencia de procesos oceanográficos que ocurren a gran escala de tiempo, mejor ejemplificado por las temperaturas promedio mensuales (Herrero-Pérezrul, 1994).

Resultados

Hemioedema spectabilis

Identificación de la condición sexual y determinación de proporción sexual

A partir de observaciones macro y microscópicas se pudo observar que esta especie presenta sexos separados y no presenta evidencias de dimorfismo sexual externo. De un total de 193 individuos pertenecientes a la especie *Hemioedema spectabilis*, el 59% corresponde a hembras, el 38% a machos, el 3% no pudo ser determinado y un 1% corresponde a organismos hermafroditas. La proporción de sexos difirió de la proporción 1:1 ($X^2=8,99$; $p>0,05$; g.l. 1), por lo tanto, por cada macho hay 1,6 hembras. Las proporciones de individuos hembras, machos, hermafroditas e indeterminados se presentan en la Figura 5.

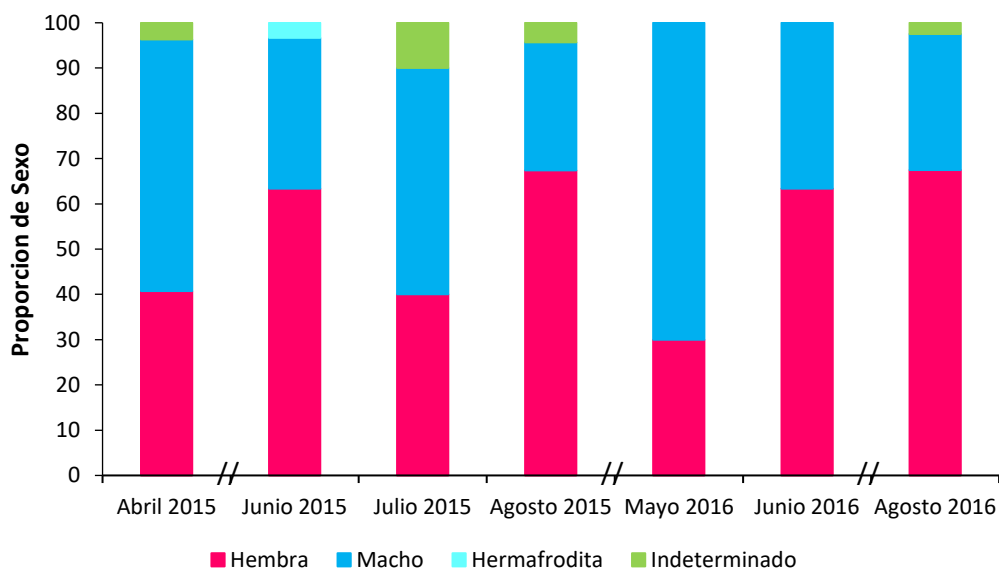


Figura 5. Proporción mensual de sexos de *H. spectabilis*, durante el periodo de muestreo.

Descripción histológica de la gónada

El sistema reproductor consta de una gónada que se ubica en el mesenterio dorsal (Fig. 6) y que consiste en un mechón de túbulos gonadales sin bifurcación unidos a un único gonoducto (Fig. 7). El sistema genital desemboca en una papila genital conspicua entre las bases de los tentáculos dorsales.

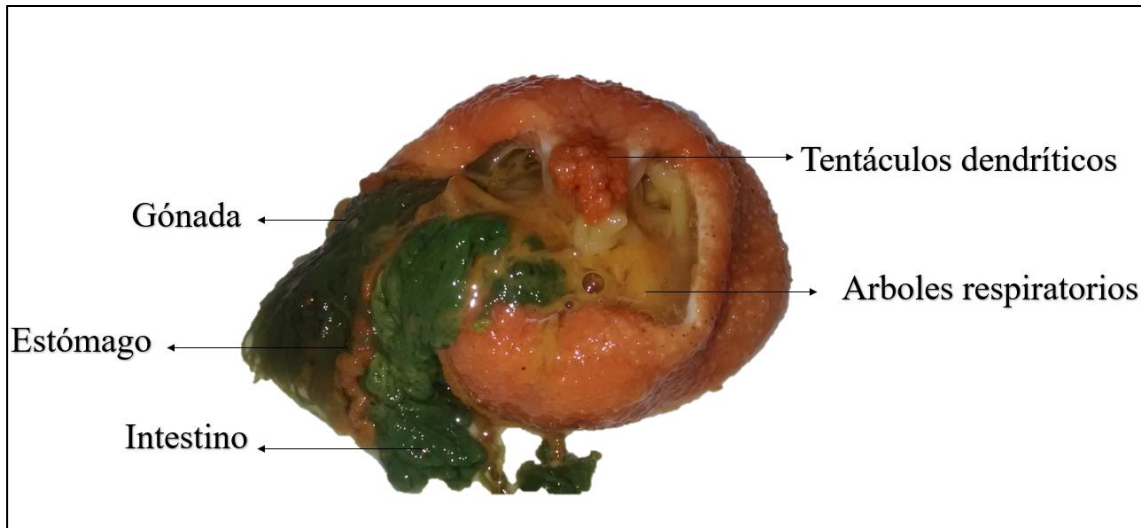


Figura 6. Anatomía interna de *Hemioedema spectabilis*.

El sexo se pudo determinar por medio de observaciones directas del color y consistencia de la gónada, donde las diferencias macroscópicas son marcadas cuando la gónada se encuentra en estado de desarrollo maduro. Cuando comienza el proceso de gametogénesis ya es posible observar diferencias en la coloración de la gónada mientras que, en el único ejemplar que se encuentra en estadio de desarrollo gonadal indeterminado, la coloración de la gónada presento un color amarillo naranja translucido. Las gónadas maduras de los machos de *Hemioedema spectabilis* presentan una coloración amarilla cremosa (Fig. 7), mientras que las gónadas femeninas son de un color verde oscuro (Fig. 8).

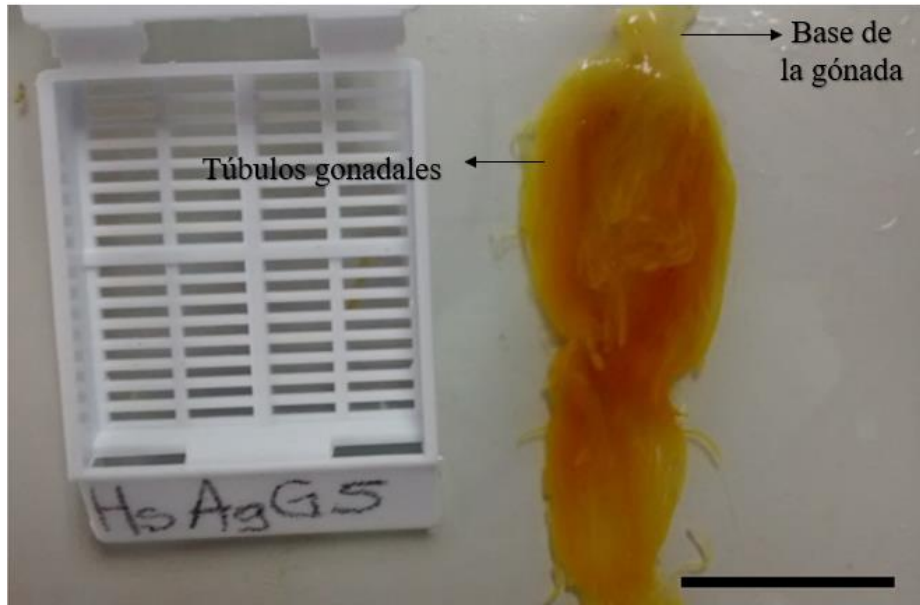


Figura 7. Gónada masculina de *Hemioedema spectabilis*. Bar:27 cm.



Figura 8. Gónada femenina de *Hemioedema spectabilis*. Bar: 27 cm.

Histológicamente, la pared del túbulo gonadal tanto de hembras como de machos de *Hemioedema spectabilis*, está compuesta por tres tejidos: el peritoneo perivisceral (PP), el compartimiento de tejido conectivo (CTC) y el epitelio interno (EI). El peritoneo perivisceral es un epitelio compuesto por células epiteliales columnares, que no presenta cilios. El

compartimento de tejido conectivo está compuesto por el seno hemal genital, que se distingue como espacios o lagunas, y tejido conectivo, en el que es posible observar fibroblastos dentro de la matriz. El epitelio interno o epitelio germinal contiene las células de la línea germinal.

El epitelio interno de los túbulos gonadales femeninos está compuesto por una lámina basal subyacente al compartimento de tejido conectivo, células germinales y células somáticas que no contienen cilios (Fig. 9).

Los ovocitos maduros de *Hemioedema spectabilis* se observan rodeados por un epitelio compuesto de células foliculares que no poseen cilio. Entre las células foliculares y la superficie del ovocito, se encuentra el espacio de gelatina. Este espacio que circunda al ovocito maduro carece de una definición de la función y composición. El citoplasma del ovocito, con una coloración rosado claro, se observa íntegramente formado por gotas de vitelo en su interior. La vesícula germinal alberga los nucléolos, que presentan una coloración basófila (Fig. 10). En ovocitos maduros es posible distinguir la protuberancia, que es la unión del ovocito al folículo (Ver fig. 23).

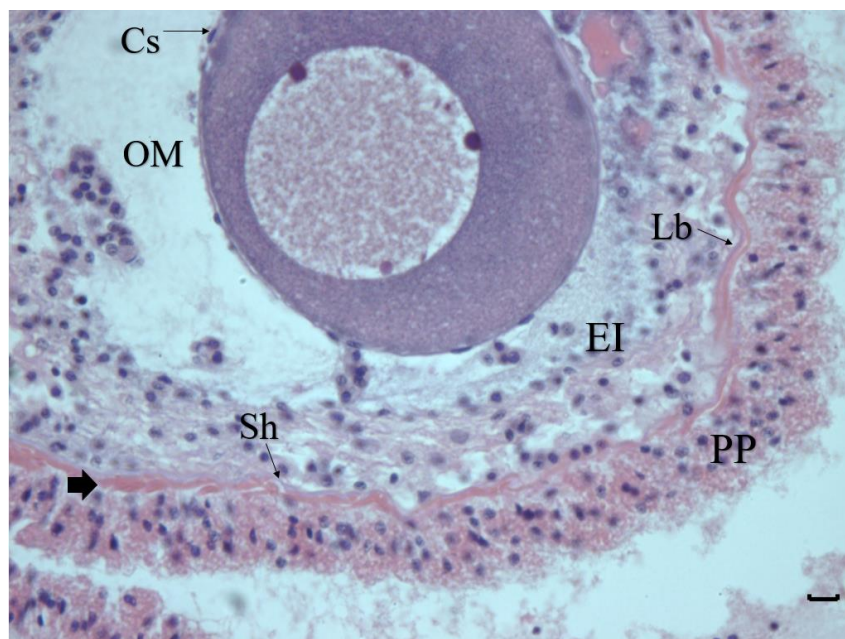


Figura 9: Túbulo gonadal femenino de *Hemioedema spectabilis*. OM: Ovocito maduro; EI: Epitelio interno; Flecha: Compartimento de tejido conectivo; PP: Peritoneo perivisceral; Cs: Células somáticas; Lb: Lamina basal; Sh: Senos hemales. Bar: 10 µm

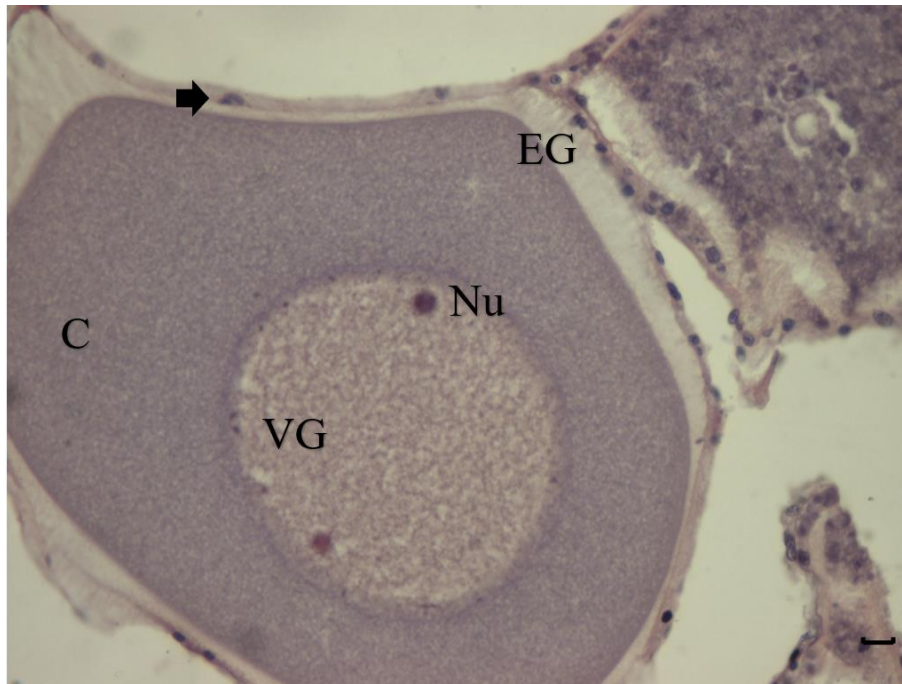


Figura 10: Ovocito maduro de *Hemioedema spectabilis*. Flecha: células foliculares; C: Citoplasma EG: Espacio gelatinoso VG: Vesícula germinal Nu: Nucléolo. Bar: 10 μ m

El epitelio germinal de los túbulos masculinos se caracteriza por la presencia de células de la serie espermática. Las espermatogonias se encuentran en la parte externa del epitelio germinal y las espermátidas se encuentran hacia la luz del túbulo (Ver fig. 13, SE).

Descripción de los estadios de desarrollo gonadal

Indiferenciado: túbulos con pocos pliegues. No se observaron gametas, por lo tanto, el sexo no pudo ser determinado. El diámetro promedio de los túbulos fue de 0,53 mm, con un máximo de 0,63 mm y un mínimo de 0,40 m (SD:0,09) (Fig. 11). Se registró un solo organismo con este estadio en el mes de agosto del año 2016.

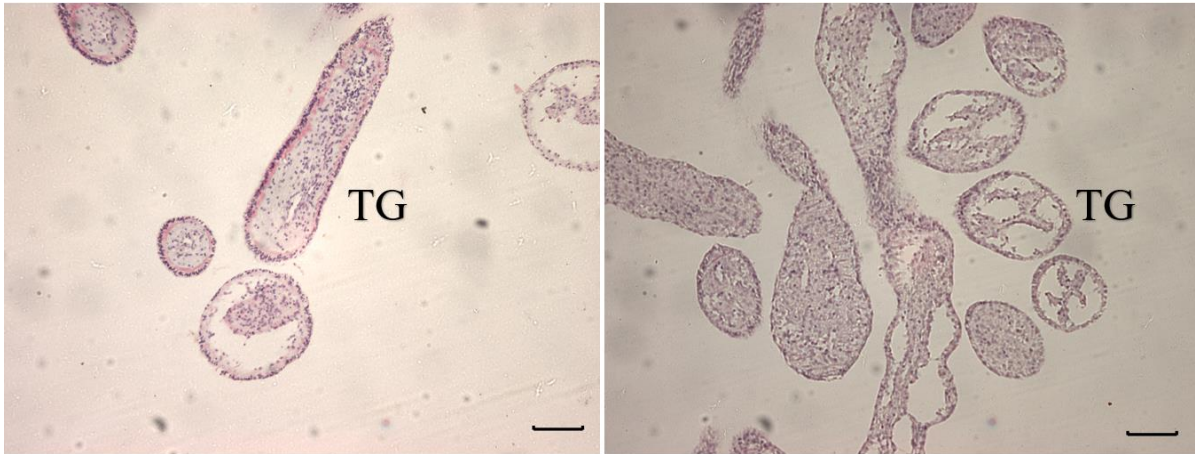


Figura 11. Gónada de *H. spectabilis* con túbulos indiferenciados TG: túbulo gonadal. Bar.: 100 μ m

Previtelogénesis: las ovogonias se observaron unidas a la pared del túbulo, presentaron un citoplasma basófilo, con una vesícula germinal definida y con 8 nucléolos en promedio, en su mayoría de posición periférica. El diámetro de las ovogonias varió entre 37,5 y 125 μ m. Los túbulos midieron en promedio 0,39 mm de diámetro, con un mínimo de 0,21 mm y un máximo de 0,65 mm (SD: 0,096), y no presentaron pliegues (Fig. 12).



Figura 12: Ovogonias en gónada femenina de *Hemioedema spectabilis*. Pt: pared del túbulo; Flecha: nucleolo; Ov: ovogonias. Bar.: 10 μ m

Proliferación: En los túbulos masculinos proliferativos la serie espermática es predominante a lo largo de la pared del túbulo. Las espermatogonias, con apariencia esférica y aspecto grumoso,

se observaron en la parte externa del epitelio germinal. Las espermátidas, de aspecto ovoide con un tinte basófilo más pronunciado, se encontraron hacia la luz del túbulo. Sólo se observaron escasos espermatozoides sobre la línea germinal. Los túbulos midieron en promedio 0,28 mm, con un diámetro mínimo de 0,15 mm y un diámetro máximo de 0,50 mm (SD: 0,085), su pared se observó engrosada y con pliegues hacia la luz (Fig. 13).

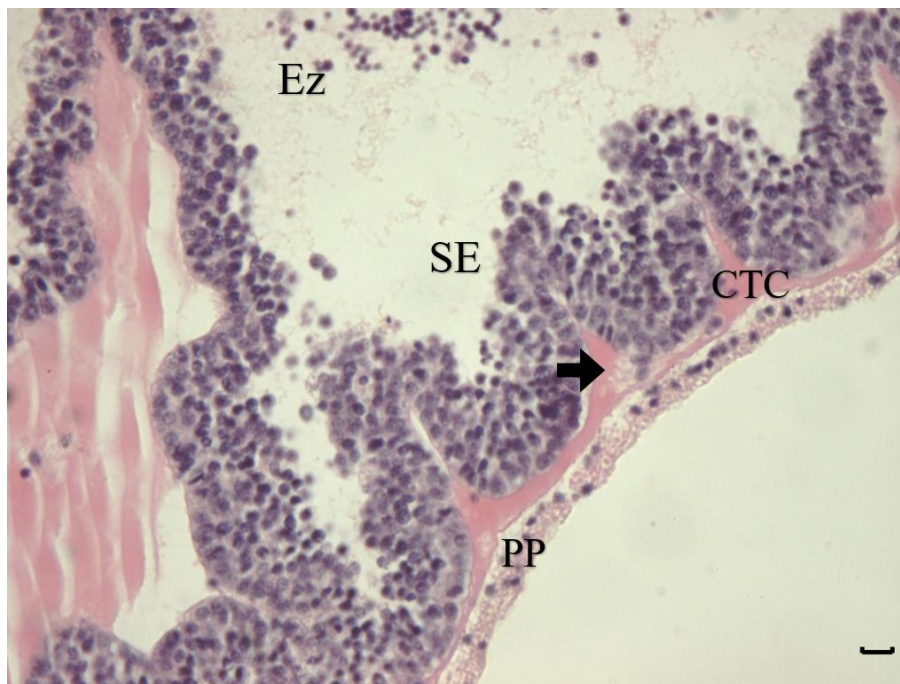


Figura 13: Túbulo gonadal masculino de *Hemioedema spectabilis* en proliferación. PP: Peritoneo Perivisceral; CTC: Compartimiento de tejido conectivo; SE: Serie espermática; Ez: Espermatozoides; Flecha: Seno Hemal Genital. Bar.: 10 μ m

Vitelogénesis: Los túbulos no presentaron pliegues y midieron en promedio 0,64 mm, con un mínimo de 0,23 mm y un máximo de 1,34 mm (SD: 0,277) (Fig. 14). Los ovocitos presentaron un citoplasma eosinófilo, con la vesícula germinal definida y 4 nucléolos en promedio de posición periférica. Los diámetros ovocitarios variaron entre 125 y 250 μ m. En esta etapa de desarrollo comienza a formarse el vitelo en la periferia del citoplasma del ovocito como así también, el espacio gelatinoso que se forma entre las células foliculares y la superficie del ovocito (Fig. 15).

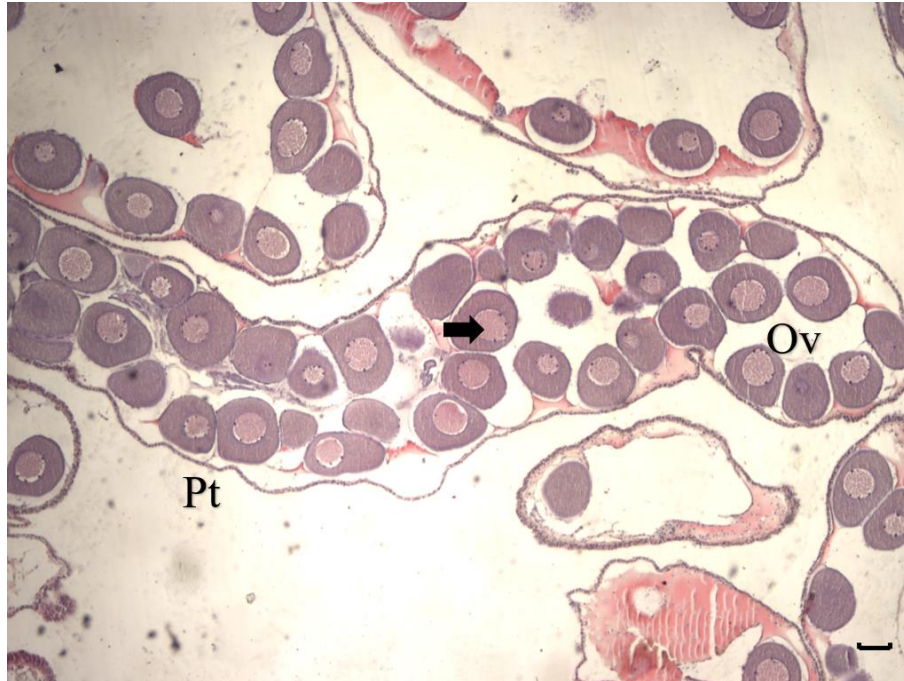


Figura 14: Túbulo gonadal femenino de *Hemioedema spectabilis* en vitelogénesis. Flecha: Vesícula germinal. Ov: Ovocito Pt: Pared del túbulo. Bar.: 100 μ m

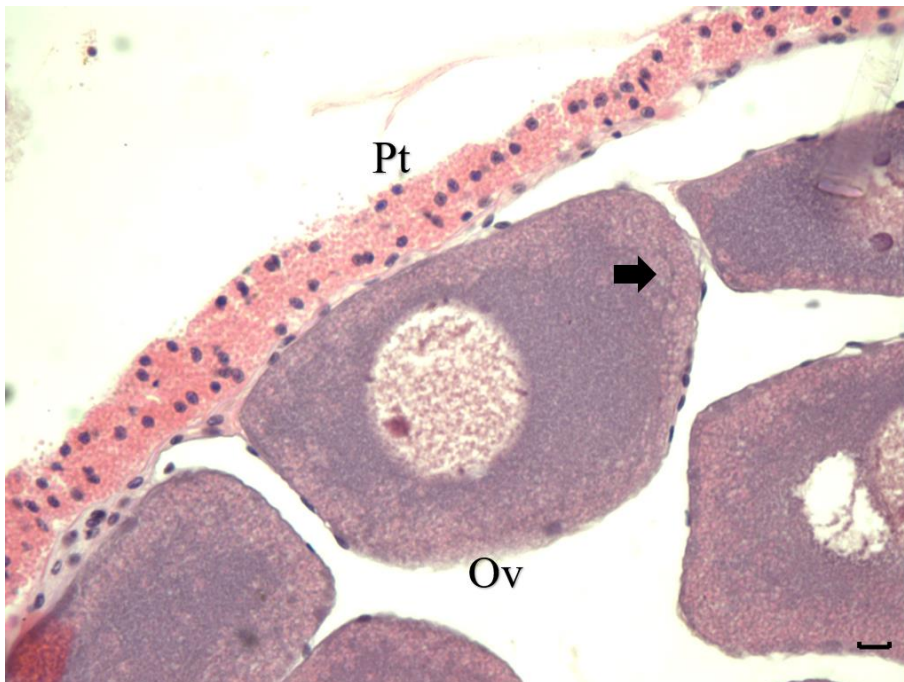


Figura 15: Túbulo gonadal femenino de *Hemioedema spectabilis* en vitelogénesis. Detalle de ovocito. Pt: Pared del túbulo; Ov: Ovocito; Flecha: Formación de gotas de vitelo. Bar.: 10 μ m

Crecimiento: En los túbulos masculinos se observó la pared con pliegues junto a la serie espermática y con algunos espermatozoides hacia luz. El diámetro promedio de los túbulos fue de 0,40 mm, con un diámetro mínimo de 0,25 y un diámetro máximo de 0,55 mm (SD: 0,095) (Fig. 16).

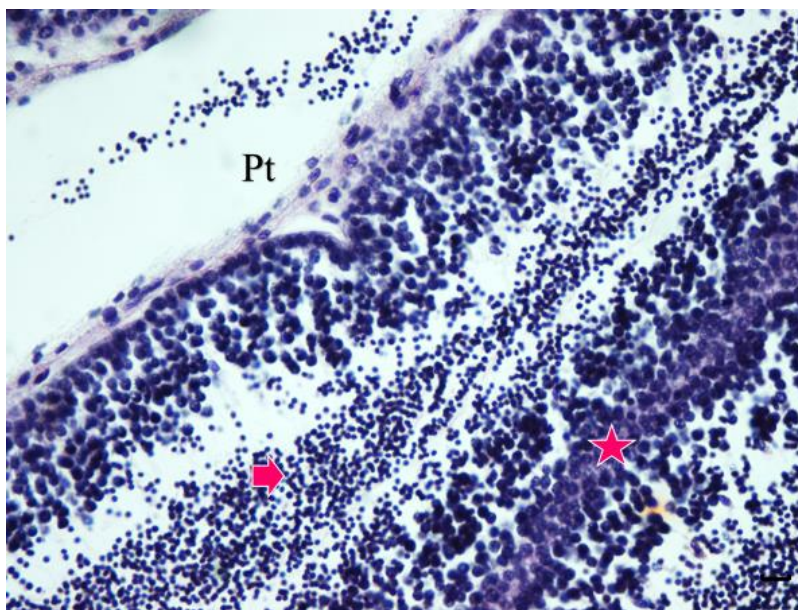


Figura 16: Túbulo gonadal masculino de *Hemioedema spectabilis* en crecimiento. Pt: Pared del túbulo; Flecha: Espermatozoides; Estrella: Serie espermática. Bar.: 10 μ m

Madurez: los ovocitos maduros se observaron con el espacio gelatinoso formado, el vitelo ocupando por completo el citoplasma, evidenciado por un color rosado claro de los ovocitos, y la vesícula germinal con 1 o 2 nucléolos periféricos. El diámetro ovocitario para esta etapa varió entre 250 y 447.5 μ m. El diámetro promedio de los túbulos maduros es de 0,93 mm, con un diámetro mínimo de 0,61 y un diámetro máximo de 1,65 mm (SD: 0,295) (Fig. 17).

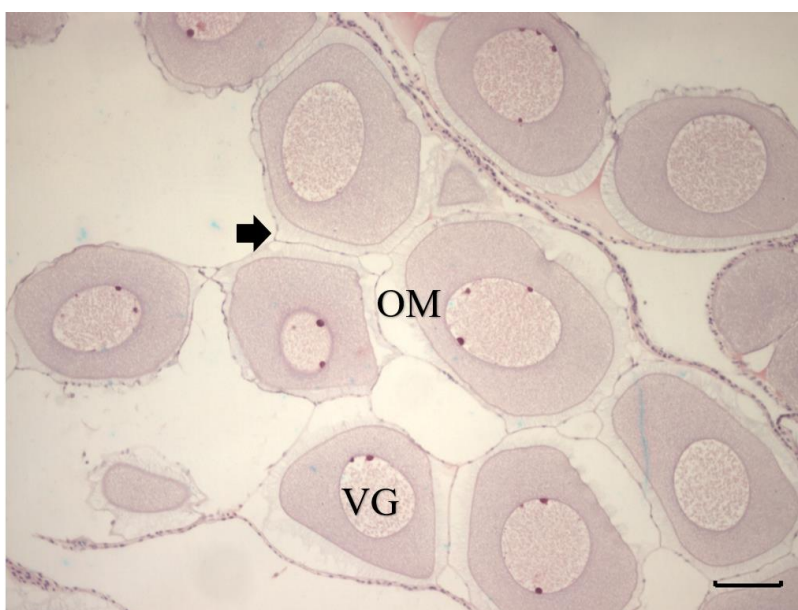


Figura 17: Túbulo gonadal femenino de *Hemioedema spectabilis* en madurez. OM: Ovocito maduro. Flecha: Espacio de gelatina VG: Vesícula germinal. Bar.: 100 μ m

En el caso de los machos, la madurez se vio reflejada por un aumento de espermatozoides fuertemente basófilos dentro del túbulo, ocupando toda la cavidad. La serie espermática se encontró reducida (Fig. 18). El tamaño de los túbulos en promedio fue de 0,62 mm de diámetro, con un mínimo de 0,31 mm y un máximo de 0,99 mm (SD: 0,176).



Figura 18: Túbulo gonadal masculino de *Hemioedema spectabilis* en madurez. Pt: Pared del túbulo; Ez: Espermatozoides. Bar.: 100 μ m.

Desove: en los túbulos desovados se encontraron ovocitos maduros dispersos en el lumen, como así también ovocitos en estado de atresia (gametos inviábiles o no liberados degradados por grupo de fagocitos). Las paredes foliculares han perdido su turgencia (Fig. 19).

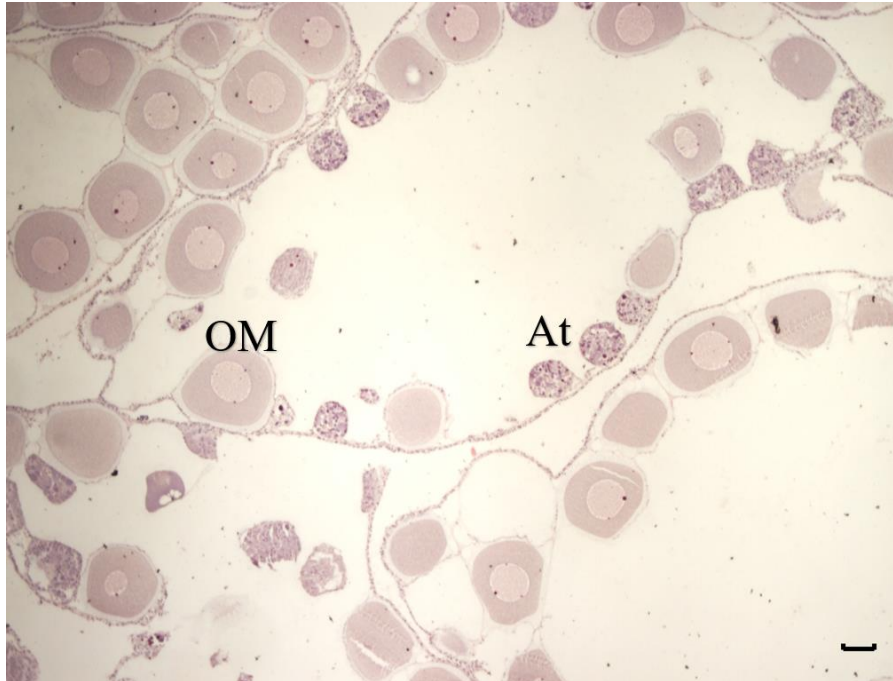


Figura 19: Gónada de *Hemioedema spectabilis* en etapa de desove. OM: ovocito maduro; At: ovocito atrésico. Bar.: 100 μ m

Evacuación: En los túbulos masculinos, las paredes han perdido su turgencia y comenzaron a aparecer pliegues, Sólo se observaron algunos espermatozoides en el centro del túbulo (Fig. 20).

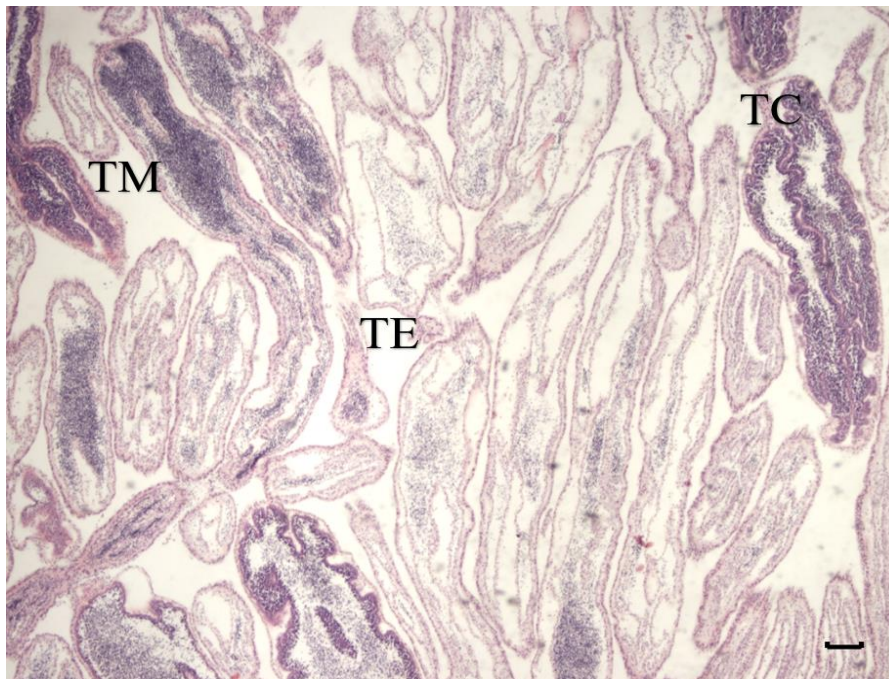


Figura 20: Túbulo gonadal masculino de *Hemioedema spectabilis* evacuado. TE: Túbulos en Evacuación. TM: Túbulos maduros. TC: Túbulos en crecimiento. Bar.: 100 μ m

Hermafrodita: se encontró un solo organismo hermafrodita en el mes de junio del año 2015. Esta gónada presentó mayor proporción de túbulos exclusivamente femeninos, se observaron algunos túbulos exclusivamente masculinos y algunos túbulos con espermatozoides y ovocitos. Los túbulos masculinos se encontraron en el estadio Madurez, mientras que los túbulos femeninos se encontraron en Previtelogénesis y Madurez (Figs. 21, 22, 23).

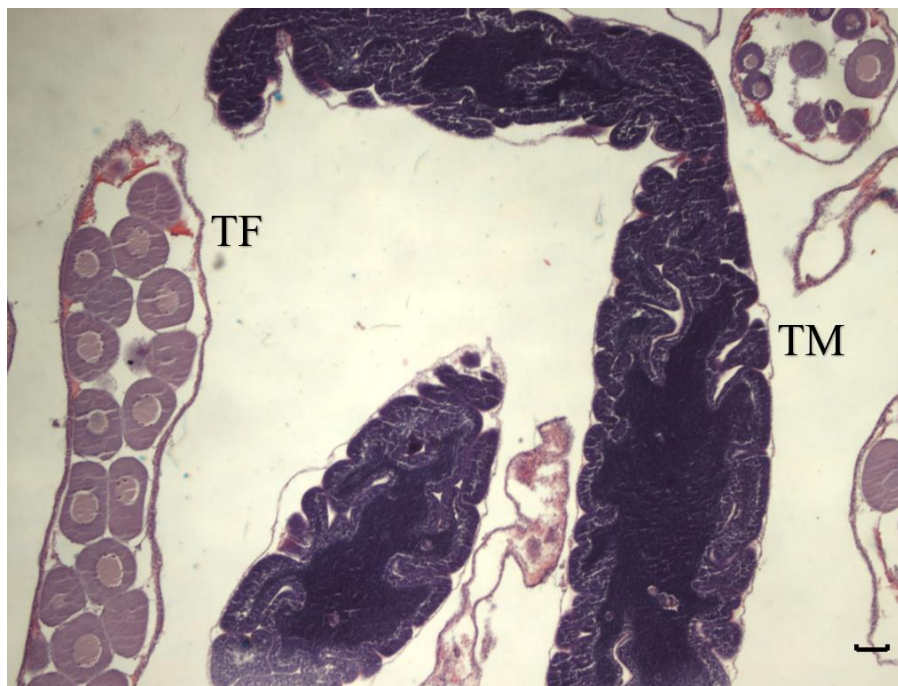


Figura 21: Gónada Hermafrodita de *Hemioedema spectabilis*. TM: Túbulo masculino; TF: Túbulo femenino.
Bar.: 100 μ m

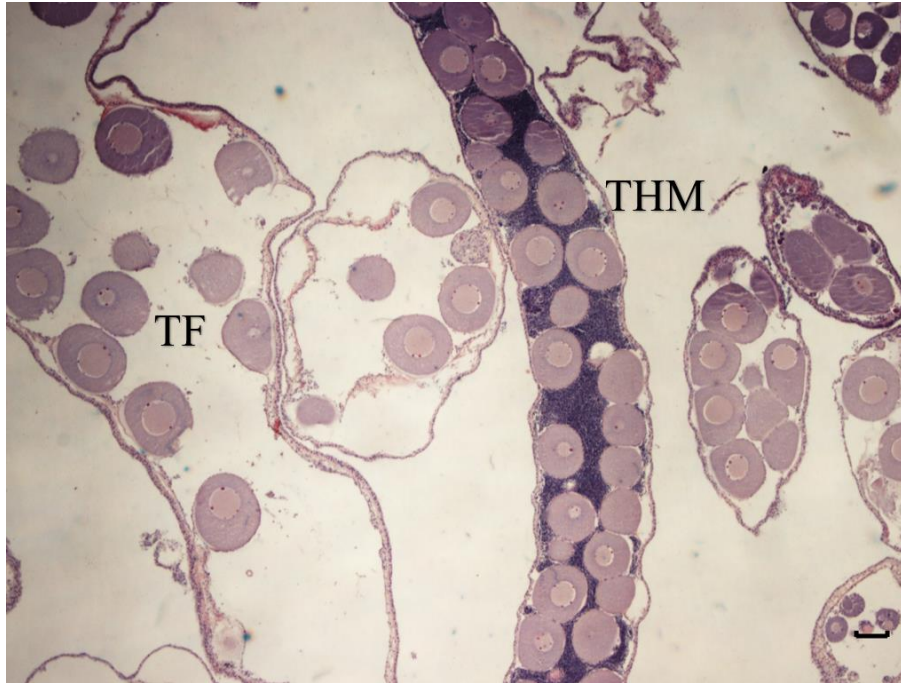


Figura 22: Gónada Hermafrodita de *Hemioedema spectabilis*. TF: Túbulo femenino; THM: Túbulo hermafrodita. Bar.: 100 μ m

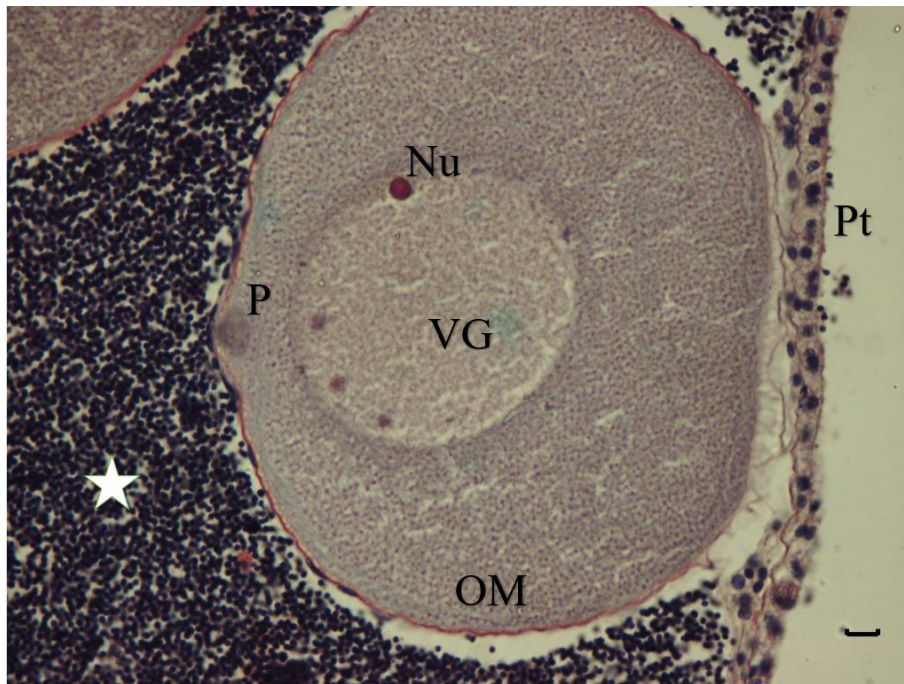


Figura 23: Túbulo gonadal Hermafrodita de *Hemioedema spectabilis*. OM: Ovocito maduro; Estrella: Espermatozoides; Nu: Nucléolo; P: Protuberancia; VG: Vesícula germinal; Pt: Pared del túbulo. Bar.: 10 μ m

Descripción del patrón reproductivo

- Análisis del Índice Gonadal:

El Índice Gonadal (IG) promedio mensual, en el año 2015, para ambos sexos (Fig. 24, A y B) mostró un incremento entre los meses de abril y junio, con valores máximos en este último mes de 33% (SD: 15) para machos y de 26% (SD: 11) para hembras. El incremento observado en el IG se correspondió con la etapa de previtelogénesis y vitelogénesis en las hembras, y de crecimiento en los machos. El pico máximo de junio coincidió con el estadio de madurez para ambos sexos. Posteriormente, durante los meses de julio y agosto, el IG decrece evidenciando los estadios de evacuación de gametas.

En el año 2016, el Índice Gonadal (IG) promedio mensual para los machos mostró la misma progresión temporal que en el año anterior. Mientras que el IG calculado para las hembras presentó su máximo valor (28%; SD: 7) en el mes de mayo (Fig. 24 A y B).

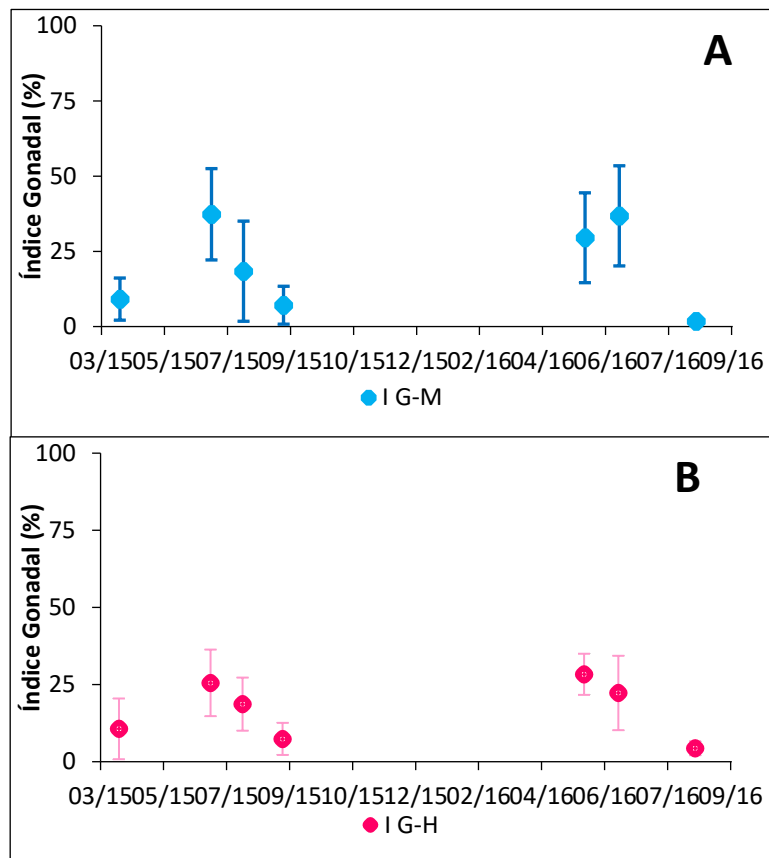


Figura 24: Índice gonadal promedio mensual de *Hemioedema spectabilis*. A: Machos; B: Hembras. IG-M: Valores del índice gonadal de los machos; IG-H: Valores del índice gonadal de las hembras

- Análisis del diámetro ovocitario

A partir del análisis de la Distribución de Frecuencia de Diámetro Ovocitario (DFDO), para los años 2015 y 2016 (Fig. 25), se observó que *Hemioedema spectabilis* posee un ciclo continuo durante los meses de otoño-invierno. En el mes de abril 2015 se observaron principalmente ovocitos pequeños (37,7 – 125 μm) coincidente con una etapa de Previtelogénesis, mientras que en el mes de mayo 2016 la moda se traslada hacia diámetros mayores (200 μm) correspondiente a ovocitos vitelogénicos y maduros. Durante el mes de junio de ambos años fue posible apreciar distribuciones de diámetros ovocitarios que abarcan desde los estadios previtelogenicos hasta los estadios de madurez (37,5 – 447,5 μm). En el mes de julio 2015 se observaron diversas camadas de gametas maduras que desaparecen debido a su evacuación. Por último, durante el mes de agosto de 2015 y 2016 se observaron dos grupos bien definidos, uno correspondiente a ovocitos previtelogenicos (82 μm) y otro representativo de ovocitos maduros (349 μm).

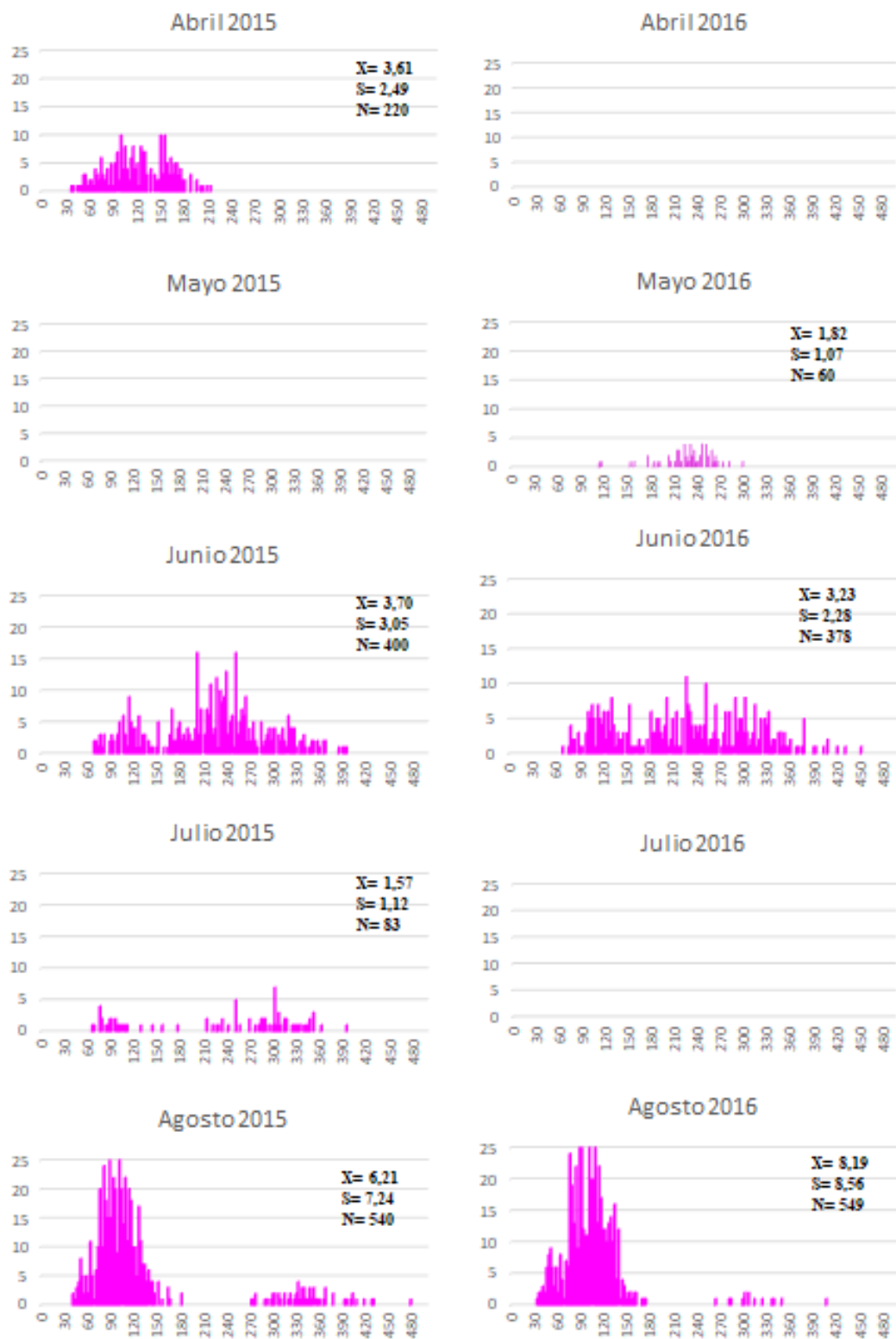


Figura 25: Distribución de frecuencia de diámetro ovocitario de *Hemioedema spectabilis*.

Patrones reproductivos en comparación con temperatura del agua de mar

Al realizar la comparación de los Índices Gonadales con la temperatura de agua de mar del fondo en el Paraje “El Sótano”, se pudo observar en el mes de junio del año 2015, que los índices gonadales, tanto para machos como para hembras, muestran su máximo punto con una temperatura ronda los 11.3°C en promedio. En el mes de julio, al disminuir la temperatura hasta los 7.33°C en promedio, los índices gonadales también disminuyen, y en el mes de agosto, cuando la temperatura del fondo del agua de mar comienza a ascender, en promedio a 10.5°C, el índice gonadal continúa disminuyendo (Fig. 26).

En el año 2016, la comparación de los índices gonadales con la temperatura del agua de mar del fondo en el Paraje “El Sótano” muestra en mayo, con una temperatura promedio de 13°C, que los índices gonadales promedios se ubican en 28,32 para las hembras y en 29,56 para los machos. Con una disminución de la temperatura en junio (11.75°C en promedio) los índices muestran un leve descenso para las hembras, con un índice de 22, 28 y un aumento para los machos con un índice promedio de 36,80. En el mes de agosto, con una temperatura promedio de 11,75°C, los índices gonadales promedios disminuyen (Fig. 26).

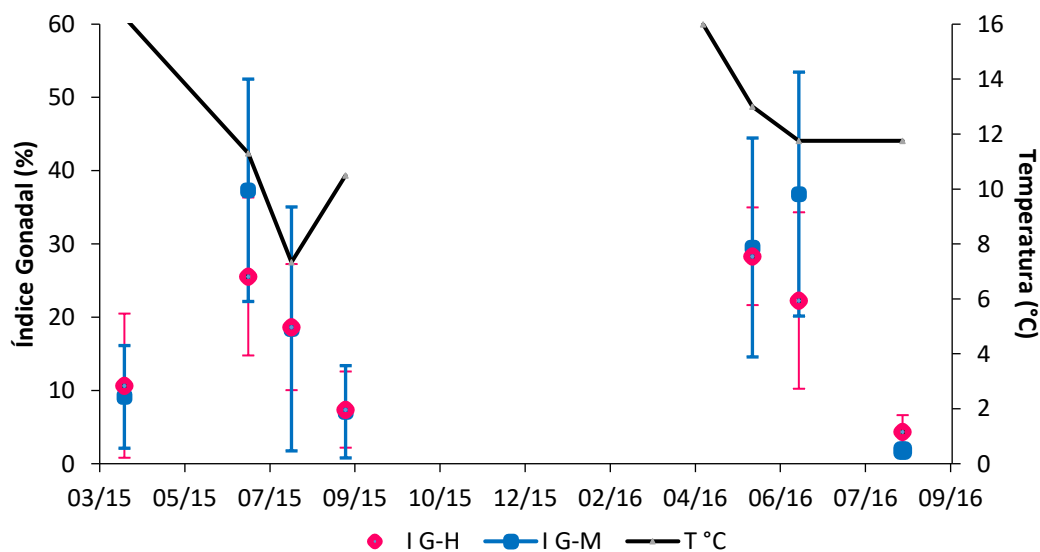


Figura 26: Índice gonadal de *Hemioedema spectabilis* en comparación con la temperatura del agua de mar en el Paraje “El Sótano”. IG-H: índice gonadal de las hembras; IG-M: índice gonadal de los machos; T °C: temperatura.

Havelockia pegi

Identificación de la condición sexual y determinación de proporción sexual

Las observaciones macro y microscópicas permitieron identificar organismos con sexos separados, como así también organismos hermafroditas, y no se encontró evidencia de dimorfismo sexual. De un total de 133 individuos, el 49% corresponde a hembras, el 11% a machos, un 38% son organismos hermafroditas y el 2% corresponde a organismos que no presentaron gónada. Para esta especie no se realizó la prueba de bondad de ajuste, debido a la cantidad de organismos hermafroditas, pero se calcularon las proporciones de individuos hembras, machos y hermafroditas recolectados, las cuales resultaron 4,3:1:3,3 respectivamente. Los porcentajes de cada sexo en mayo y junio de 2015, y mayo, junio y agosto de 2016 se muestran en la Fig. 27.

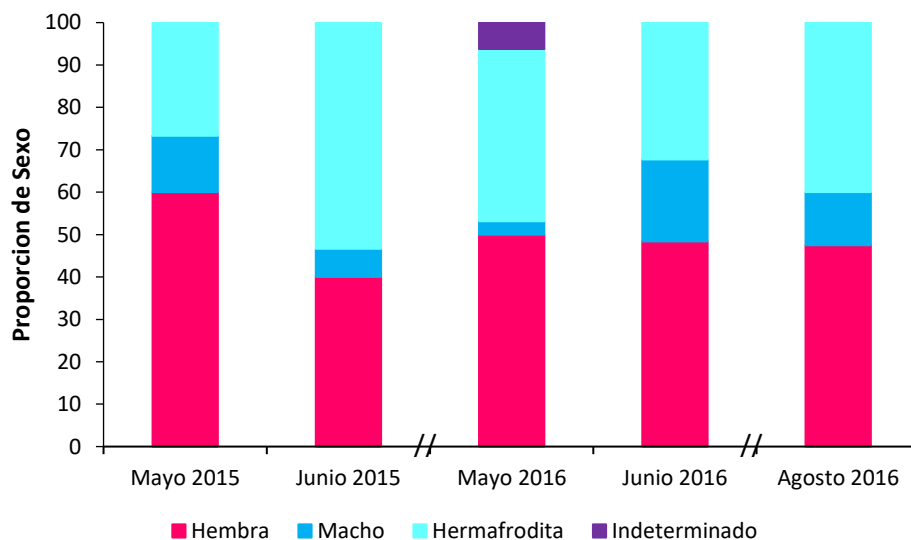


Figura 27. Proporción mensual de sexos de *H. pegi* durante el periodo de muestreo.

Descripción histológica de la gónada

Las gónadas de *Havelockia pegi* se sitúan en la parte media del cuerpo y están estructuradas en dos mechones de túbulos sin bifurcación, unidos por su base (Fig. 28).

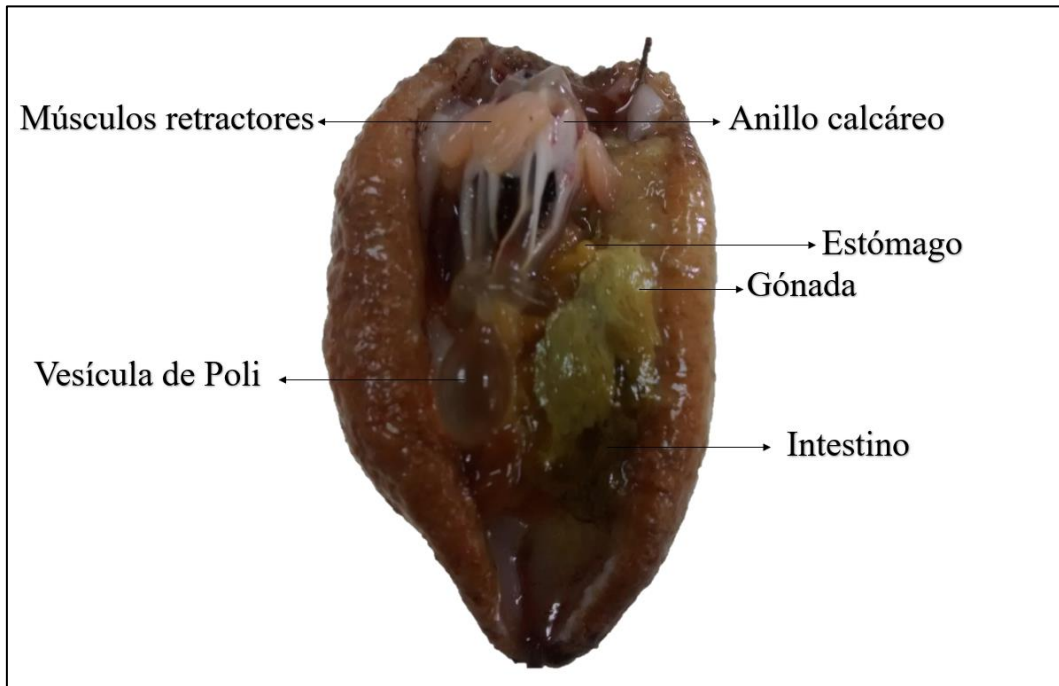


Figura 28. Estructura interna de *Havelockia pegi*

La identificación sexual macroscópica de esta especie mediante la coloración de las gónadas es inexacta, ya que, por lo general, tanto las gónadas masculinas como las gónadas hermafroditas son de color marrón claro, y las gónadas femeninas son de color marrón oscuro (Figs. 29, 30 y 31).



Figura 29: Gónada hermafrodita de *Havelockia pegi*. Bar.: 27 cm.



Figura 30: Gónada masculina de *Havelockia pegi*. Bar.: 27 cm.



Figura 31: Gónada femenina de *Havelockia pegi*. Bar.: 27 cm.

Histológicamente, la pared de los túbulos gonadales de *Havelockia pegi* está compuesta por dos tejidos: el peritoneo perivisceral (PP) y el epitelio interno (EI). El peritoneo perivisceral es un epitelio compuesto por células epiteliales cilíndricas sin cilios.

El epitelio germinal de los túbulos masculinos se compone de la lámina basal y las células de la serie espermática, las que pueden diferenciarse en espermatogonias y espermátidas (Fig. 32).

Durante el periodo de estudio los túbulos gonadales femeninos de esta especie contenían ovocitos en diferentes etapas de desarrollo gametogénico, las que incluye ovocitos previtelogénicos, ovocitos vitelogénicos, ovocitos maduros y ovocitos atrésicos (Fig. 33). El epitelio interno del tubo gonadal está compuesto por una lámina basal y las células de la línea germinal. Los ovocitos maduros de *Havelockia pegi* están rodeados por un epitelio folicular cuyas células no presentan cilios. Entre las células foliculares y la superficie del ovocito, se encuentra el espacio de gelatina. El citoplasma del ovocito, con una coloración rosado claro, se

observa íntegramente formado por gotas de vitelo en su interior. La vesícula germinal alberga los nucléolos, que presentan una coloración basófila (Fig. 33). El diámetro promedio de los túbulos gonadales femeninos de *Havelockia pegi* es de 0.53 mm, con un diámetro mínimo de 0.19 mm y un diámetro máximo de 1.09 mm (SD:0.19).



Figura 32: Túbulo gonadal masculino de *Havelockia pegi*. PP: Peritoneo perivisceral; Flecha: lamina basal; Ed: Espermátidas; Eg: Espermatoгония; Estrella: Espermatozoides. Bar: 10 μ m

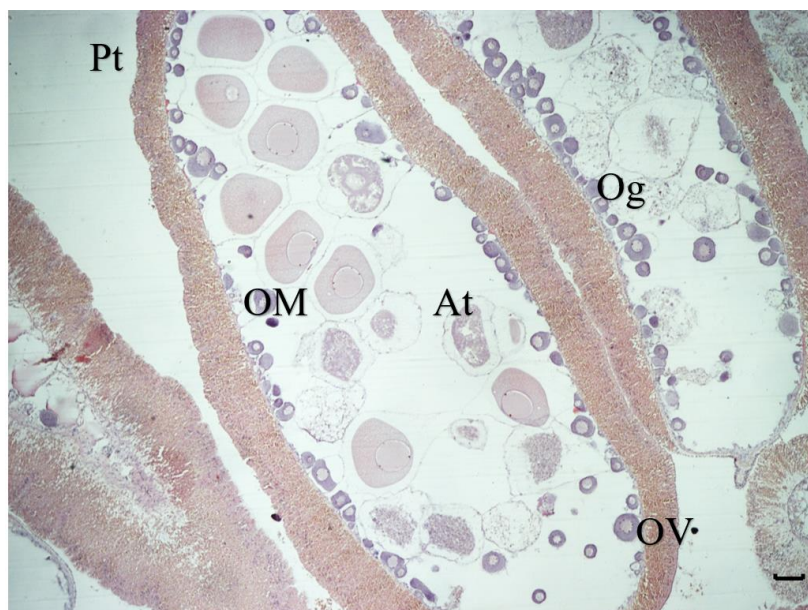


Figura 33: Túbulo gonadal femenino de *Havelockia pegi*. OM: Ovocito maduro; OV: Ovocito vitelogénico; Og: Ovogonia; At: Ovocito atrésico; Pt: Pared del túbulo. Bar: 100 μ m

Descripción de estadios de desarrollo gonadal

El patrón reproductivo observado se puede dividir en las siguientes etapas:

Previtelogénesis: las ovogonias (Og) de este estadio presentan un citoplasma basófilo, una vesícula germinal poco definida sin nucléolos, y se encuentran unidas a la pared del túbulo que no presenta pliegues. El diámetro de las ovogonias varía entre 15 y 55 μm (Fig. 34).

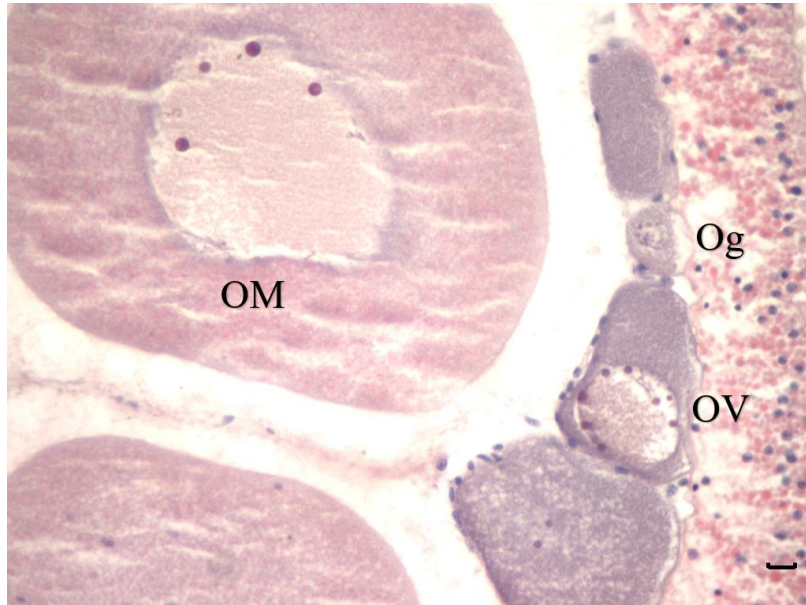


Figura 34. Túbulo gonadal femenino de *Havelockia pegi*. Detalle de ovogonia. Og: Ovogonia; OV: Ovocito vitelogénico; OM: Ovocito maduro. Bar: 10 μm

Proliferación: en esta etapa de desarrollo los túbulos masculinos se caracterizan por presentar sólo la serie espermática, que forma pliegues junto con el epitelio germinal. No hay espermatozoides en la luz del túbulo, aunque fue posible observar alguno de ellos por encima de la serie espermática. Los túbulos gonadales en esta etapa midieron en promedio 0,36 mm de diámetro, con un valor mínimo de 0,16 mm y un máximo de 0,57 mm (SD: 0.095) (Fig. 35).

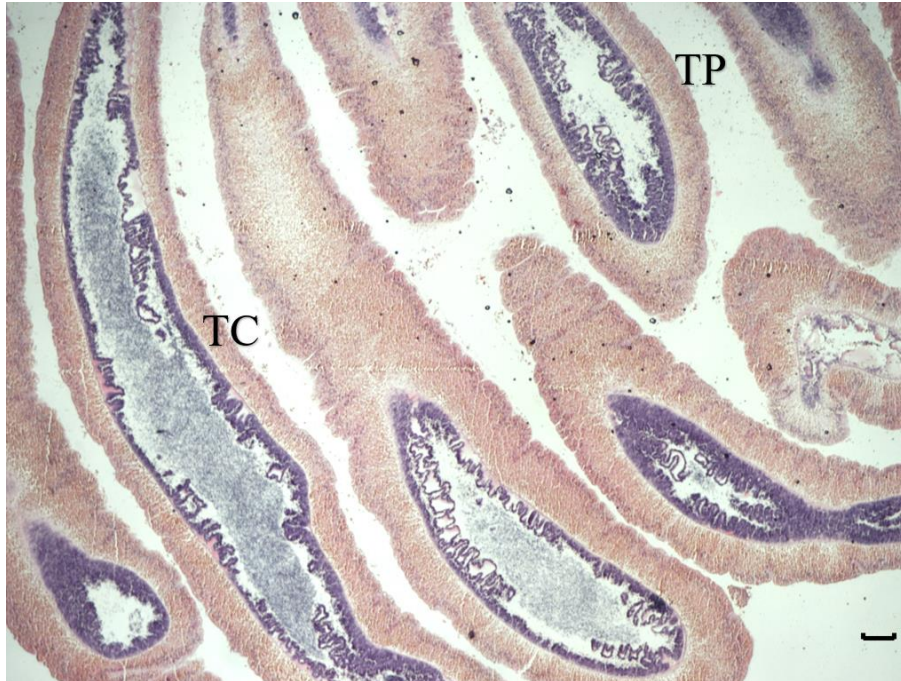


Figura 35: Gónada masculina de *Havelockia pegi*. TP: túbulo en proliferación; TC: túbulo en crecimiento. Bar: 100 μ m

Vitelogénesis: los ovocitos vitelogénicos (Ov) son basófilos con la vesícula germinal definida y nucléolos visibles en posición periférica. El diámetro de los ovocitos en vitelogénesis varía entre 55 y 125 μ m (Ver Fig. 34).

Crecimiento: En túbulos masculinos la producción de gametos es evidente con algunos espermatozoides en el centro y la serie espermática está presente en el epitelio germinal donde los pliegues no son tan evidentes. El diámetro promedio de los túbulos en crecimiento es de 0,39 mm, con un diámetro mínimo de 0,23 mm y un diámetro máximo de 0,70 mm (SD: 0,156) (Fig. 36).

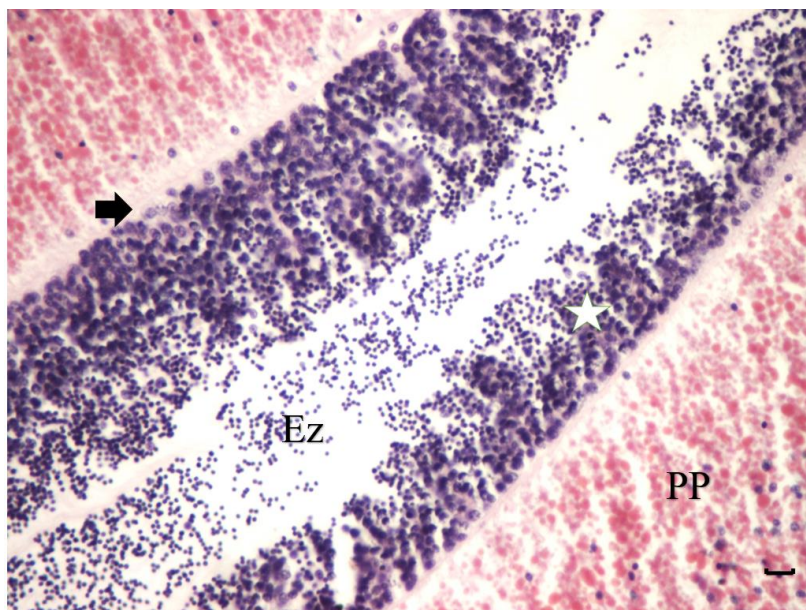


Figura 36: Túbulo gonadal masculino de *Havelockia pegi* en crecimiento. Flecha Lamina basal Ez: Espermatozoides Estrella: Serie espermática PP: Peritoneo perivisceral. Bar: 10 μ m

Madurez (en gónada femenina): los ovocitos maduros (OM) presentan una vesícula germinal bien definida, con dos o tres nucléolos en la periferia. El citoplasma ovocitario se observa completamente ocupado por las gotas de vitelo, lo que les da un color rosado claro a los ovocitos. El espacio gelatinoso se encuentra formado. El diámetro ovocitario para esta etapa varía entre 137,5 y 300 μ m. Se observan ovocitos atrésicos (Fig. 37).

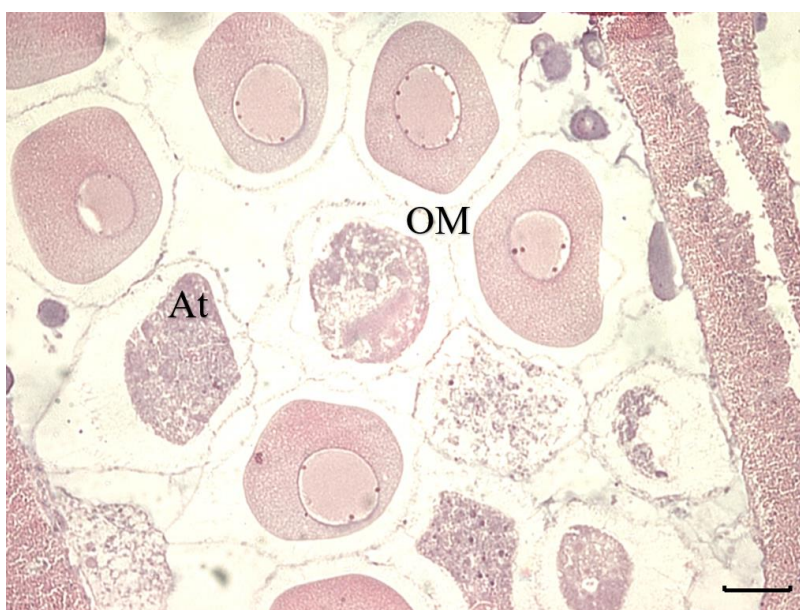


Figura 37: Túbulo gonadal femenino de *Havelockia pegi* en madurez. OM: Ovocito maduro. At: Ovocito atrésico. Bar: 100 μ m

Madurez (en gónada masculina): los túbulos maduros se encuentran repletos de espermatozoides fuertemente basófilos, la serie espermática se encuentra reducida y no se evidencian pliegues. Los túbulos maduros tienen un diámetro promedio de 0,39 mm, con un diámetro mínimo de 0,25 mm y un diámetro máximo de 0,66 mm (SD: 0.099) (Fig. 38).

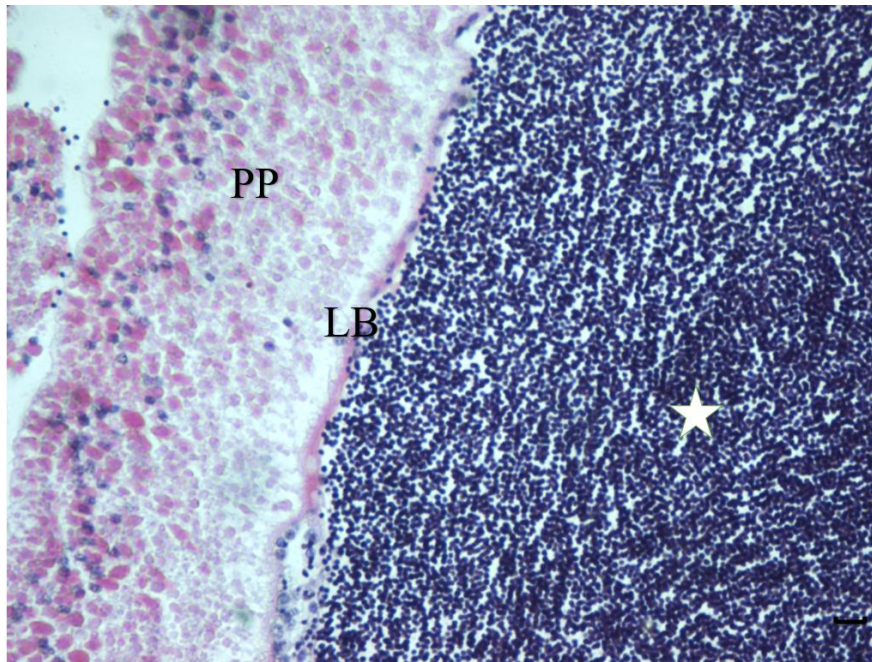


Figura 38: Túbulo gonadal masculino de *Havelockia pegi* en maduración. PP: Peritoneo Perivisceral; LB: Lamina Basal; Estrella: Espermatozoides. Bar 10 μ m

Hermafroditas: De acuerdo a las observaciones microscopias, esta especie tiene organismos que presentan gónadas exclusivamente femeninas, individuos con gónadas exclusivamente masculinas y ejemplares que presentan gónadas masculinas con ovocitos que, para los meses y años de muestreo, la parte masculina se encuentran tanto en Proliferación como en Crecimiento y Madurez, sin embargo, la parte femenina se encuentra en estadio de Previtelogénesis (Figs. 39 y 40). El diámetro promedio de los túbulos hermafroditas es de 0.30 mm, con un diámetro mínimo de 0.13 mm y un diámetro máximo de 0.60mm (SD: 0.11).



Figura 39: Gónada Hermafrodita de *Havelockia pegi*. THM: Túbulo Hermafrodita. Bar: 100 μ m



Figura 40: Gónada Hermafrodita de *Havelockia pegi*. THM: Túbulo Hermafrodita. Bar: 100 μ m

- Análisis del diámetro ovocitario

El análisis de la Distribución de Frecuencia de Diámetros Ovocitarios (DFDO) para las hembras *Havelockia pegi* durante los años 2015 y 2016, permitió observar que durante los

meses de mayo y junio las gónadas poseen ovocitos en estadios previtelogénicos (15 – 55 μm) y vitelogénicos (55 – 125 μm). En el mes de agosto de 2016 se observó un aumento en la frecuencia de ovocitos maduros (137,5 – 300 μm) (Fig. 41).

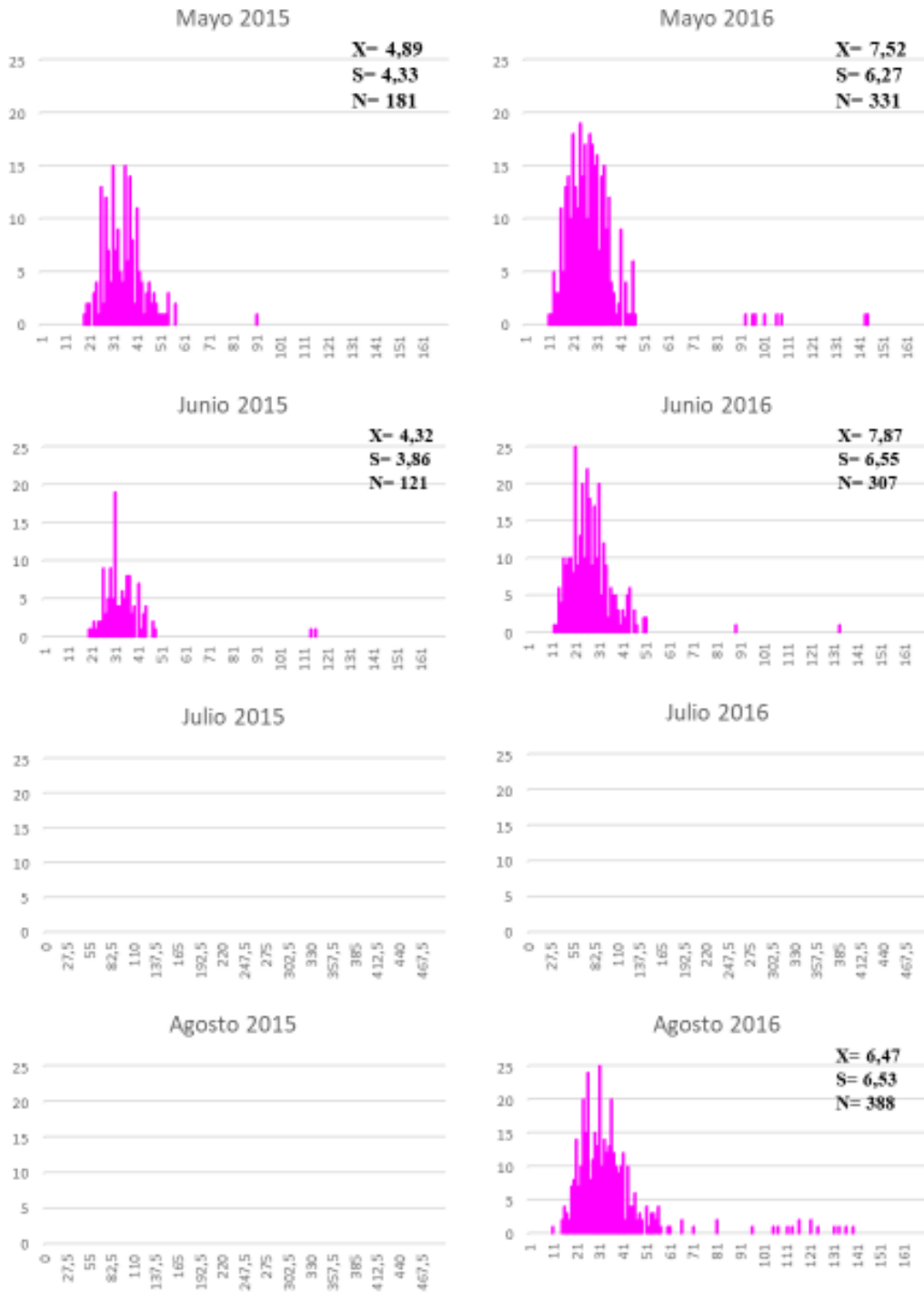


Figura 41: Distribución de frecuencia de diámetro ovocitario para hembras de *Havelockia pegi*.

A partir del análisis de la DFDO para los organismos hermafroditas del *Havelockia pegi* durante los años 2015 y 2016 se pudo determinar que los ovocitos estaban en Previtelogénesis (Fig. 42).

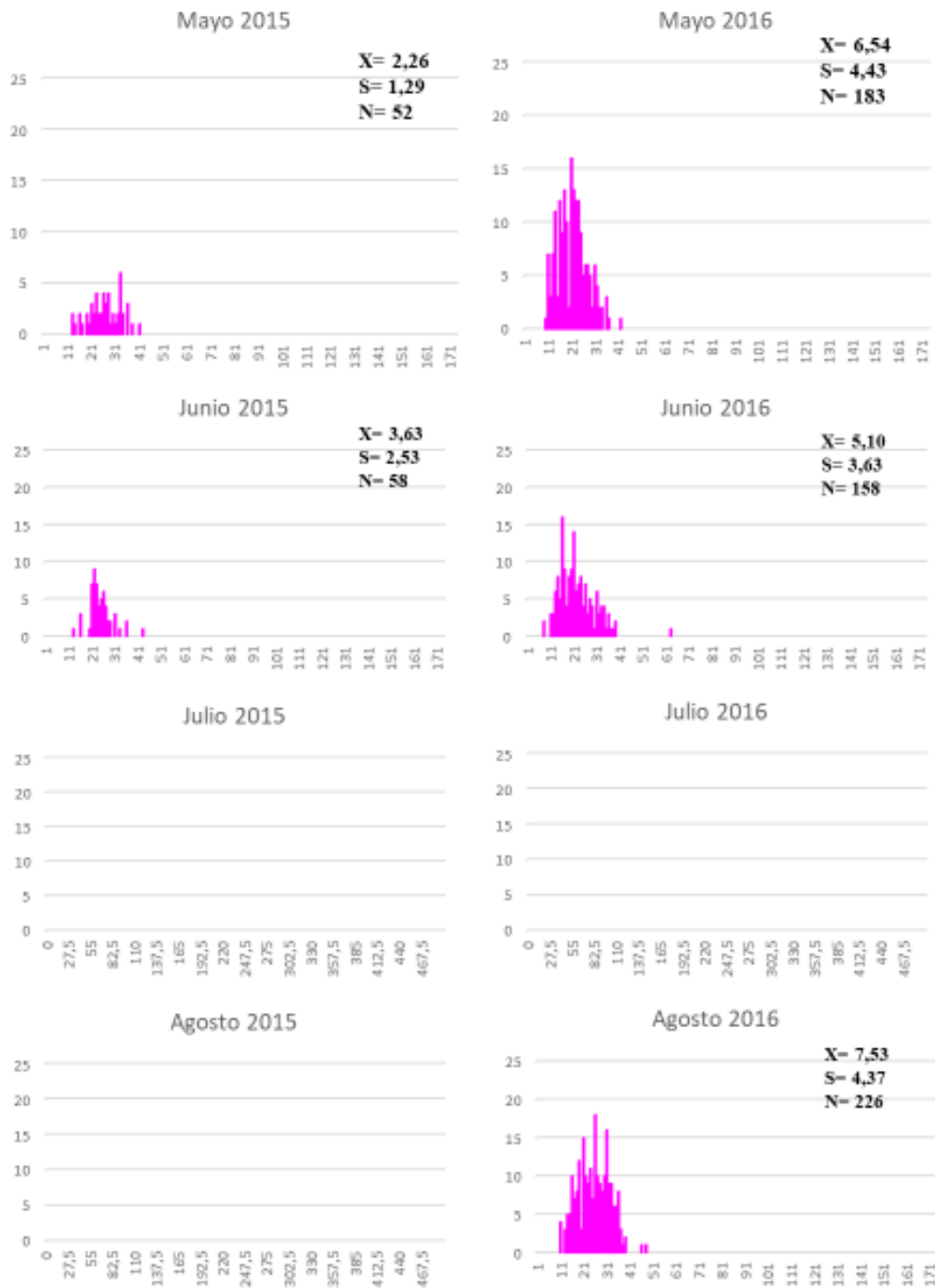


Figura 42: Distribución de frecuencia de diámetro ovocitario para hermafroditas de *Havelockia pegi*.

Discusión

Los Holoturoideos pueden presentar dimorfismo sexual en la coloración de las gónadas maduras, esto ha sido reportado en aspidochirotidos como *Parastichopus californicus* Stimpson 1857 (Cameron y Fankboner, 1985) y *Holothuria fuscogilva* Cherbonnier 1980 (Ramafafia *et al.* 2000), y para los holoturoideos dendrochirotidos como *Neothyone gibbosa* Deichmann 1941 (Herrero Perezrul, 1994), *Cucumaria frondosa* Semper 1868 (Singh *et al.* 2001), *Psolus fabricii* Düben & Koren 1846 (Hamel *et al.* 1993) y *Aslia lefevrei* Barrios 1882 (Costelloe, 1985). Sin embargo, no hay un patrón específico de coloración dentro de los órdenes, por lo que la coloración específica de cada especie puede deberse a la ingestión de fitodetritus que contienen compuestos bioquímicos, como los pigmentos carotenoides, los cuales son vitales para la reproducción y son variables en las distintas regiones oceanográficas (Gutiérrez Méndez, 2011). Los dendrochirotidos estudiados en este trabajo tampoco poseen un patrón específico de coloración. Se pudo observar que las gónadas femeninas maduras de *H. spectabilis* presentan una coloración verde oscuro y las masculinas presentaron una coloración amarillo-cremosa, mientras que en *H. pegi* se observó una coloración marrón claro en las gónadas masculinas y hermafroditas, y marrón oscuro en las gónadas femeninas.

Al comparar los ovocitos de *H. spectabilis* (diámetro máximo 475 μm) y de *H. pegi* (diámetro máximo 357,5 μm) con los de otras especies se pudo observar que dentro del orden Dendrochirotida los diámetros máximos son mayores a los de *Aslia lefevrei* (diámetro máximo 340 μm) (Costelloe 1985) y *Neothyone gibbosa* (diámetro máximo 90 μm) (Herrero Perezrul, 1994), sin embargo, los diámetros máximos de los ovocitos de *Psolus fabricii* pueden alcanzar las 1400 μm (Hamel *et al.*, 1993). Por lo que el tamaño ovocitario dentro de la clase Holothuroidea varía hasta nivel de Género.

De acuerdo a lo reportado por Smiley *et al.* (1991), los órganos reproductores masculinos y femeninos se componen de tres capas, con un compartimiento de tejido conectivo prominente, lo que es coincidente con lo observado en *H. spectabilis*. Sin embargo, también se observó que la pared gonadal de los organismos de *H. pegi* se componen de dos capas, el peritoneo perivisceral y el epitelio interno, lo que fue reportado por Krishnan & Dale (1975) para *Cucumaria frondosa*, quienes identificaron dos capas verdaderas, la externa y la germinal, y una intermedia que se considera como senos hemales.

Los holoturoideos suelen ser dioicos (Smiley *et al.*, 1991; Ruppert y Barnes, 1996; Mercier & Hamel, 2009; Pérez *et al.*, 2014;), sin dimorfismo sexual externo evidente (Martínez, 2013) y con proporciones sexuales comúnmente cercanas a 1:1 (Smiley *et al.*, 1991; Mercier & Hamel, 2009). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis indican que en *Hemioedema spectabilis*, procedente de la población del paraje “El Sótano” (NO del golfo San Matías), la proporción de sexos encontrada es distinta a la esperada. A pesar de que no se aleja de la unidad, si existe una proporción mayor de hembras.

Smiley *et al.* (1991) reportaron 12 especies de holoturoideos que presentan hermafroditismo. Específicamente dentro del orden Dendrochirotida sólo han reportado 5 especies hermafroditas: *Cucumaria crocea* Lesson 1830, *Cucumaria laevigata* Verrill 1876, *Cucumaria lamperti* Ohshima 1915, *Pachytyone rubra* Clark 1901 y *Pseudopsolus macquariensis* Dendy 1897. En el presente estudio se encontró que *Havelockia pegi* presentan un alto porcentaje de organismos hermafroditas siendo este el primer reporte de hermafroditismo para esta especie. Por otra parte, Herrero Pérezrul *et al.* (1998) notificaron el hermafroditismo casual en dos especies del orden Aspidochirotida (*Holothuria atra* Jaeger 1833 e *Isostichopus fuscus* Ludwig 1875), una del orden Molpadida (*Cherbonniera utriculus* Sibuet 1974) y dos del orden Elaspodida (*Peniagone azorica* Marenzeller von 1892 y

Peniagone diaphana Theel 1882). El hallazgo de un individuo hermafrodita en *Hemioedema spectabilis*, perteneciente al Orden Dendrochirotida, constituye el primer registro de hermafroditismo casual en esta especie. *Havelockia pegi* presenta un alto porcentaje de organismos hermafroditas, siendo este el primer reporte de hermafroditismo para esta especie; el cual no puede considerarse como casual. De acuerdo a Lawrence & Herrera (2000), una alta frecuencia de hermafroditismo suele estar correlacionada con un pequeño tamaño corporal y/o hábito de incubación en especies pertenecientes a la familia Synaptidae y está relacionado con su capacidad de alimentación y producción de biomasa. A pesar de que *H. pegi* pertenece a otra familia, esta alta incidencia de hermafroditismo requiere un mayor análisis de la especie para poder entender sus implicancias y razones.

A su vez, se encontraron diferencias en la composición celular de los organismos hermafroditas entre especies. Por su lado *H. spectabilis* presentó túbulos con componentes celulares femeninos y masculinos. Por su lado *H. pegi* presentó gónadas con túbulos exclusivamente femenino y exclusivamente masculinos. A pesar de que no fue posible realizar muestreos anuales para poder entender el ciclo completo de los organismos, como así también, poder entender el mecanismo de desove debido a la dificultad de encontrar a los organismos en los muestreos realizados; es posible inferir una estrategia reproductiva en *H. pegi*, ya que una alta frecuencia de organismos hermafroditas evidencia una estrategia reproductiva inusual.

La mayoría de los equinodermos muestran ciclos estacionales y otros temporales de reproducción que, presumiblemente, resultan de una compleja interacción de señales endógenas y exógenas (Mercier & Hamel 2009). En este grupo, dentro de la clase Holothuroidea, la reproducción puede variar desde un ciclo reproductivo que posee una gametogénesis con una duración de hasta tres años (Ej., *Stichopus californicus* Stimpson 1857), hasta ciclos caracterizados por eventos reproductivos anuales o constantes durante todo el año (Martínez,

2014). Durante el periodo de estudio, *Hemioedema spectabilis* presentó diferentes estadios de desarrollo gametogénico y un evento de evacuación de gametas con bajas temperaturas, como por ejemplo el apodido hermafrodita *Labidoplax buskii* MacIntosh 1866 de Suecia que desova con una temperatura óptima de 9°C. Otros casos similares son los aspidochirotidos *Holothuria nobilis* Selenka 1867, de Nueva Caledonia, y *Holothuria kefersteinii* Selenka 1867, de Panamá, que desovan durante los meses más fríos (Mercier y Hamel, 2009), y el dendrochirotido *Aslia lefrevei* de Irlanda cuyos estadios gametogénicos de madurez gonadal coinciden con las bajas temperaturas (Costelloe, 1985).

Conclusiones

- Este estudio representa el primer registro de hermafroditismo en *Havelockia pegi* y el primer reporte de hermafroditismo casual en *Hemioedema spectabilis*.
- Las gónadas maduras de los ejemplares machos de *Hemioedema spectabilis* presentan una coloración amarillo cremoso, las gónadas maduras son de color verde oscuro y las gónadas indiferenciadas presentan una coloración amarillo naranja translucido. Las gónadas femeninas de *Havelockia pegi* son de color marrón oscuro y las gónadas masculinas y hermafroditas presentan una coloración marrón claro.
- La estructura gonadal de *Hemioedema spectabilis* está compuesta por tres capas de tejido. La capa más externa que se denomina Peritoneo Perivisceral; una capa de tejido intermedia, el Compartimiento de tejido conectivo y la capa más interna, el epitelio interno. La pared gonadal de *Havelockia pegi* está compuesta por dos capas de tejido. El peritoneo perivisceral y el epitelio interno. Dentro de la morfología histológica, se puede evidenciar la capa de gelatina entre el epitelio interno y la superficie ovocitaria.
- *Hemioedema spectabilis* es una especie dioica, sin dimorfismo sexual externo y una proporción sexual de machos y hembras de 1:1,6, mientras que *Havelockia pegi* es una especie hermafrodita, sin dimorfismo sexual externo y una proporción de hembras, machos y hermafroditas de 4,3:1:3,3.
- En el presente trabajo se pudo determinar y caracterizar los estadios de desarrollo gonadal de *Hemioedema spectabilis* en Indiferenciado; Previtelogénesis, Vitelogénesis, Maduración y Desove para hembras; y Proliferación, Crecimiento, Maduración y

Evacuación para machos. Para *Havelockia pegi* se determinaron y caracterizaron los estadios de Previtelogénesis, Vitelogénesis y Madurez para las hembras y Proliferación, Crecimiento y Madurez para los machos.

- El diámetro ovocitario máximo de *Hemioedema spectabilis* fue de 475 μ m, mientras que *Havelockia pegi* posee ovocitos más pequeños, ya que el diámetro máximo ovocitario fue de 357,5 μ m.
- En los meses de otoño-invierno *Hemioedema spectabilis* muestra diferentes estadios de desarrollo gametogénico y un evento de desove en la época más fría del año, lo que permite pensar en una rápida recuperación de la actividad gametogénica luego del desove. *Havelockia pegi*, en los meses de otoño-invierno, comienza con el proceso de gametogénesis.

En nuestro país son escasos los trabajos desarrollados en holoturoideos y la mayoría de las investigaciones describen aspectos morfológicos y ecológicos de individuos colectados en distintas zonas del mar argentino (Martínez, 2008). Tanto *Hemioedema spectabilis* como *Havelockia pegi* son holoturoideos comunes de todo el litoral argentino, pero la falta de información sobre la biología reproductiva de esta clase, dificulta cualquier intento de comparar los datos encontrados con otras poblaciones de la región. En este contexto se plantea la necesidad de ampliar el periodo de estudio, incluyendo los meses que no fueron analizados en el presente trabajo, como así también continuar los estudios sobre la biología reproductiva de los holoturoideos del Golfo San Matías, lo cual ayudarían a comprender las estrategias reproductivas de estos organismos en el mar argentino.

Bibliografía

- Arribas, L. P., Martínez, M. I., Brogger M.I. (2016)** Echinoderms in San Matías Gulf, Southwestern Atlantic Ocean. *Thalassas* 33: 11-18.
- Cameron J. and Fankboner P. (1985)** Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Parastichopus californicus* (Stimpson) (Echinodermata: Holothuroidea). I. Reproductive periodicity and spawning behavior. *Can J. Zool.* 64: 168-175.
- Costelloe J. (1985)** The annual reproductive cycle of the holothurian *Aslia lefevrei* (Dendrochirotida: Echinodermata). *Marine Biology* 88: 155-165.
- Fajardo-León, M., Michel-Guerrero, E., Singh-Cabanillas, J., Vélez-Barajas, J., Massó-Rojas, J. (1995)** Estructura poblacional y ciclo reproductor del pepino de mar (*Isostichopus fuscus*) en Santa Rosalía, B.C.S., México. *Ciencia pesquera* (11): 45-53.
- Giese, C.A. y Pearse, J. S. (1974)** Reproduction of Marine Invertebrates. Academia Press 1. 344 pp.
- Gutierrez Mendez I. (2011)** Biología reproductiva de *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea* Jaeger, 1833 (Echinodermata: Holothuroidea) en Bahía La Entrega, Oaxaca, México. Ph Tesis Universidad del Mar, México. 69pp.
- Guzmán, H.M., Guevara, CA & Hernández IC (2003)** Reproductive cycle of two comercial species of sea cucumber (Echinodermata: Holothuroidea) from Caribbean Panama. *Marine Biology* 142: 217-279
- Hamel, J. F., Himmelman J.H. & Dufresne L. (1993)** Gametogenesis and spaning of the Sea cucumber *Psolus fabricii* (Duben and Koren). *Biol. Bull* 184: 125-143.
- Hernández, D. A. (1981)** Holothuroidea de Puerto Deseado (Santa Cruz, Argentina). *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” e Instituto Nacional de Investigación de las Ciencias Naturales IV* (4): 151-168.
- Herrero Pérezrul, D. (1994)** Estudio comparativo de la reproducción de *Isostichopus fuscus* (Ludwig, 1875) y *Neothyone gibbosa* (Deichmann, 1941) (Echinodermata: Holothuroidea), en la Bahía La Paz, Baja California Sur, México. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional. Tesis de Grado para Maestría en Ciencias Marinas. 100 pp.

- Herrero Pérezrul, MD; Reyes Bonilla H y García Domínguez F (1998)** Casual hermaphroditism in gonochoric *Isostichopus fuscus* (Ludwig, 1875) (Echinodermata: Holothuroidea) of the Southern Gulf of California, México. Bulletin of Marine Science, 63 (3): 611- 615.
- Krishnan S. and Dale T. (1975)** Ultrastructural studies on the testis of *Cucumaria frondosa* (Holothuria: Echinodermata). Norw. J. Zool. 23 1-15.
- Lawrence J. and Herrera J (2000)** Stress and deviant reproduction in Echinoderms. Zoological Studies 39 (3): 151-171.
- Martínez M. I. (2008)** Biología reproductiva de *Psolus patagonicus* Ekman, 1925 (Holothuroidea), asociado a los bancos de vieiras frente a la Provincia de Buenos Aires, en el Mar Argentino. Tesis, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 44 pp.
- Martínez M. I. (2013)** Diversidad de Dendrochirotida en el Mar Argentino (Echinodermata: Holothuroidea); aspectos taxonómicos, filogenéticos, ecológicos y biogeográficos. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 159 pp.
- Martinez, M. I., Thandar, A. S. y Penchaszadeh, P. E. (2013)** A new species of *Havelockia* Pearson, 1903 from the Argentina Sea (Holothuroidea: Dendrochirotida: Sclerodactylidae). Zootaxa 3609(6): 583-588.
- Mercier A. and Hamel (2009)** Control of Reproduction in Echinoderms. Advances in Marine Biology, Volume 55.
- Pérez, A. F., Gil, D.G. y Rubilar, T. (2014)** Echinodermata. En: Calcagno J.A. (ed) Los invertebrados marinos. Vázquez Mazzini Editores, p: 308-311.
- Pérez-Ruzafa, A. y Marcos-Diego, C. (1985)** Técnicas de recolección y estudio en la clase Holothuroidea. I. Generalidades, Sistemática, ecología, biología y comportamiento. Anales de Biología (3): 13-35.
- Ramafafia C., Battaglione S. Bell J. and Byrne M. (2000)** Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Holothuria fuscogilva* in the Solomon Islands. Marine Biology 136: 1045-1056.
- Ruppert E.E. y Barnes R. D. (1996)** Equinodermos. En: McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. 6ta ed. Zoología de los invertebrados, p: 982-983.

- Singh R., MacDonald B., Lawton P. y Thomas M (2001)** The reproductive biology of the dendrochirote sea cucumber *Cucumaria frondosa* (Echinodermata: Holothuroidea) using ne quantitative methods. *Invertebrate Reproduction and Development*, 40:2-3, 125-141.
- Smiley S. (1988)** The Dynamics of Oogenesis and the Annual Ovarian Cycle of *Stichopus californicus* (Echinodermata: Holothuroidea). *Biol. Bull.* 175: 79-93.
- Smiley S., McEuen F.S., Chaffee C. & Krishnan (1991)** Holothuroidea. En A.C Giese et al. (eds.): *Reproduction of Marine Invertebrates*, vol 8, Echinoderms and Lophophorates. Pacific Grove, CA: Boxwood Press, pp 663-750.
- Sokal, R. y Rohlf, F. (1981)** *Biometría: Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. H. Blume (Eds.). San Francisco, USA. 817 pp.
- Zaixso, H.E. y Lizarralde, Z.I. (2000)** Distribución de equinodermos en el Golfo San José y sur del Golfo San Matáis (Chubut, Argentina). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 35(2): 127-145.