

Rol ecosistémico de *Malacobelemnon daytoni* (Octocorallia, Pennatulacea, Kophobelemnidae) en comunidades bentónicas de Caleta Potter, Isla 25 de Mayo, Antártida



Bióloga Natalia Servetto

Director: Sahade Ricardo

Ecología Marina



*Doctorado en Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Exactas Físicas y
Naturales*

Córdoba- Argentina 2014

Tesis doctoral en Ciencias Biológicas

**Rol ecosistémico de *Malacobelemnion daytoni*
(Octocorallia, Pennatulacea, Kophobelemnidae) en
comunidades bentónicas de Caleta Potter, Isla 25 de
Mayo, Antártida**

Bióloga Natalia Servetto

Director: Sahade Ricardo

*Doctorado en Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales*

Córdoba-Argentina 2014

Dr. Fabián H. Acuña

Dr. Mariano Sironi

Dr. Ricardo Sahade

Lugar y Fecha:

Calificación:

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

*A quienes con su amor y apoyo hicieron esto posible:
mi papa, mi mama y mi hno.*

Agradecimientos

En primer lugar a mi director Ricardo, por su guía, compañía, su inmensa paciencia y por ofrecerme ingresar a Ecología Marina, lo que me permitió no solo realizar el presente trabajo, sino además llenarme de nuevas experiencias y amigos.

A quienes formaron parte del día a día, quienes no solo son excelentes compañeros de trabajo, sino además amigos y colaboradores indispensables de la presente tesis: Marquitos, Sole A, Carli, Pao, Anakins, Clarita, Sole T, Tami; a quien a pesar de los km sigue siendo Ecología Marina: Nadia; y un especial agradecimiento a Cris, Lu, Mily y Gas, por todas esas horas de paciencia, apoyo y compañía durante cada una de las campañas Antárticas.

A Vero Fuentes, Ale Olariaga, Sergio Rossi y Nuria Viladrich por las posibilidades y las ayudas brindadas en España. Y a todas aquellas personitas que hicieron mi estadía hermosa lejos de casa, por permitirme trabajar junto a ellos, de quienes aprendí mucho.

A Cova por sus aportes desinteresados y a Irene Schloss por los datos ambientales.

Al Consejo Nacional de Investigación Científicas y Tecnológicas (CONICET) y a la Fundación Carolina por otorgarme las becas que me permitieron llevar a cabo este trabajo.

Un especial agradecimiento a Mariano Sironi y Fabián Acuña por aceptar ser parte de la comisión asesora de la presente tesis, y junto a Silvana Halac por sus aportes y sugerencias.

A los buzos, en especial a los invernantes de base Carlini de las campañas de invierno 2009 y 2010: Dani, pancho, cazador, pelu, Fede y Gustavo y a los biólogos invernantes: Alejandro Ajo y Ariel Moretti por la recolección de muestras durante sus invernadas.

A Marcelo Mammana, Willy Mercuri y Eduardo Obis por las fotografías de plumas.

A todos aquellos amigos que me dio Antártida, por su compañía, apoyo y las largas horas de mate: Virgi, Juancho, Dolo, Mono, Luis, Rosana, Lau, Nico, Agu, Edu, y muchos más.

Por último a quienes de manera indirecta, aunque no por eso de menor importancia, formaron parte de este proceso:

Mi familia por estar siempre cerquita y ayudarme a levantar en cada tropezón, en especial a mi papa, mi mama y mi hermano.

A mi compañero Facu, quien me enseñó que los momentos más hermosos son los más simples, le agradezco, entre muchas otras cosas, por su amor, su compañía y su inmensa paciencia.

A mis amigos de toda la carrera que han recorrido un largo camino a mi lado. Y a mis amigas de toda la vida: flaca, Costi, Ceci, Lari, Lore, Vane y Mariana.

Publicaciones derivadas de esta tesis

1. Torre L, Servetto N, Eöry M, Momo F, Tatian M, Abele D, Sahade R (2012) Metabolic response of Antarctic benthic species to increasing sediment concentrations: an experimental approach in the frame of WAP Glacier Retreat. *Polar Biology*. DOI 10.1007/s00300-012-1208-1.
2. Servetto N, Torre L, Sahade R (2013) Reproductive biology of the Antarctic “Sea pen” *Malacobelemnion daytoni* (Octocorallia, Pennatulacea, Kophobelemnidae). *Polar Researc.* vol 32.
3. Servetto N, Sahade R. Reproductive seasonality of the Antarctic sea pen *Malacobelemnion daytoni*. *Polar Biology*. *Enviado*.

Índice temático

Comisión asesora y evaluadora	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Publicaciones derivadas de esta tesis	iv
Índice temático	v
Índice de tablas y figuras	1
Abreviaturas	3
Resumen	4
Summary	5
<i>CAPITULO I</i>	6
INTRODUCCIÓN GENERAL	6
Antártida	7
<i>Bentos Antártico</i>	8
<i>Área de estudio</i>	9
<i>Variables ambientales de Caleta Potter</i>	10
<i>Malacobelemnnon daytoni</i>	13
Objetivo General	17
Objetivos Específicos	17
Hipótesis	17
<i>Estructura de la tesis</i>	18
<i>CAPITULO I</i>	19
ECOLOGÍA REPRODUCTIVA	19
Sección A	20
Introducción	20
Objetivos específicos	21
Materiales y Métodos	22
<i>Ciclo Reproductivo</i>	22
<i>Análisis histológico</i>	22
<i>Análisis estadístico</i>	24
Resultados	25
<i>Características Generales</i>	25
<i>Gametogénesis</i>	25
<i>Espermatogénesis</i>	26

<i>Distribución de células reproductivas</i>	27
<i>Fecundidad</i>	30
Discusión	31
<i>Características generales</i>	31
<i>Gametogenesis y tamaño de los oocitos</i>	31
<i>Distribución de células reproductivas</i>	33
<i>Fecundidad</i>	33
Sección B	36
Introducción	36
Objetivos específicos.....	37
Materiales y métodos	38
<i>Fecundidad</i>	39
<i>Análisis estadísticos</i>	39
Resultados.....	40
<i>Estacionalidad y liberación de gametos</i>	40
<i>Variación inter-anual</i>	44
<i>Patrón de maduración inter-sexo</i>	45
<i>Sincronización entre colonias</i>	47
Discusión	48
<i>Estacionalidad y liberación de gametos</i>	48
<i>Variación inter-anual</i>	50
<i>Patrón de maduración inter-sexo</i>	50
<i>Comparación con otros pennatulaceos</i>	51
CAPITULO III	53
ECOLOGÍA TROFICA Y VARIACIÓN BIOQUÍMICAS TEMPORAL	53
Introducción	54
<i>Bioquímica</i>	54
<i>Ácidos Grasos</i>	55
<i>Isótopos estables</i>	57
Objetivos específicos.....	58
Materiales y Métodos	59
<i>Bioquímica</i>	59
<i>Ácidos grasos</i>	59
<i>Isótopos estables</i>	61

<i>Análisis estadísticos</i>	62
Resultados	63
<i>Bioquímica</i>	64
<i>Ácidos Grasos</i>	67
<i>Isótopos estables</i>	69
Discusión	72
<i>Bioquímica</i>	72
<i>Ácidos Grasos</i>	74
<i>Isótopos estables</i>	76
CAPITULO IV	78
EFFECTO DEL SEDIMENTO EN <i>MALACOBELMNON DAYTONI</i>	78
Introducción	79
Objetivos específicos	81
Materiales y Métodos	82
<i>Diseño experimental</i>	82
<i>Toma y análisis de los datos</i>	83
<i>Análisis estadístico</i>	84
Resultados	85
Discusión	89
CAPITULO V	92
CONCLUSIONES GENERALES	92
Referencias bibliográficas	98
Apéndices	113

Índice de tablas y figuras

Figura I 1: Área de estudio.

Figura I 2: Variables ambientales (material particulado en suspensión y Clorofila-a) en Caleta Potter (años 2009-2010).

Figura I 3: Morfología externa de *Malacobelemnion daytoni*.

Figura I 4: Diagrama del incremento en el % de cobertura de *Malacobelemnion daytoni* de 1994 a 2009 a 15, 20, 25 y 30 m de profundidad.

Figura II 1: Imágenes de *Malacobelemnion daytoni* pre y post fijación para histología.

Figura II 2: Fotografías de microscopía óptica a través del canal longitudinal.

Figura II 3: Proporción de los diferentes estadios de los oocitos y de la media del tamaño de los quistes espermáticos en cada uno de los sectores estudiado (base, medio y ápice).

Figura II 4: Morfología externa de la parte superior del raquis, donde se observan autozoides juveniles y maduros en el ápice.

Figura II 5: Relación entre la zona fértil (mm) y la longitud de la colonia (mm) y relación entre la longitud (mm) y el índice de fecundidad (número de oocitos maduros.mm⁻²).

Figura II 6: Frecuencia relativa del diámetro de oocitos en 2009 y 2010.

Tabla II 1: Comparación de las características reproductivas de pennatulaceos de diferentes latitudes.

Tabla II 2: número de colonias de machos y hembras estudiadas por mes en 2009 y 2010.

Figura II 7: Número de oocitos de cada estadio desde enero 2009 hasta diciembre 2010.

Figura II 8: Frecuencia relativa del tamaño de oocitos colectados entre enero 2009 y diciembre 2010.

Figura II 9: Número de oocitos maduros > 200 µm entre enero 2009 y diciembre 2010.

Tabla II 3: ANOVA comparación de número de oocitos maduros (> 200 µm) entre enero 2009 y diciembre 2010.

Figura II 10: Medias mensuales del tamaño de los oocitos (feret; µm) en 2009 y 2010.

Tabla II 4: Comparación de diferentes variables de los dos años estudiados (2009-2010).

Figura II 11: Media del diámetro de los oocitos, de los tamaños de los quistes espermáticos (µm) y de las variables ambientales MPS y Clorofila-a (mg.m⁻³) por mes desde enero 2009 hasta diciembre 2010.

Figura II 12: Frecuencia en el tamaño de los oocitos de colonias individuales colectadas en marzo 2009 y mayo 2009 y 2010.

Figura III 1: Esquema de un ácido graso saturado y uno insaturado con la explicación de la nomenclatura utilizada

Figura III 2: Ejemplo de un cromatograma obtenido a partir de una extracción de AG.

Tabla III 1: Ácidos grasos más usados como indicadores de redes tróficas.

Tabla III 2: Proporciones más utilizadas como indicadores de relaciones en redes tróficas.

Figura III 3: Variación del % de Mo a lo largo de los meses muestreados y variación en la media de los tamaños de las varillas.

Tabla III 3: Análisis de Kruskal-Wallis de los %Mo y la longitud de las colonias en las diferentes estaciones.

Figura III 4: Concentración de lípidos, proteínas y carbohidratos ($\mu\text{g}\cdot\text{mgMo}^{-1}$) durante los meses de abril a diciembre de 2009 y enero, febrero 2010.

Figura III 5: Concentración de lípidos, proteínas y carbohidratos ($\mu\text{g}\cdot\text{mgMo}^{-1}$) por estación desde abril 2009 hasta febrero 2010.

Tabla III 4: ANOVA de lípidos, proteínas y carbohidratos en las diferentes estaciones.

Tabla III 5: Proporciones (%) de los diferentes Ácidos Grasos detectados en *Malacobelemnon daytoni* de verano, primavera, otoño e invierno en Caleta Potter.

Tabla III 6: Proporciones de AGs más usadas como indicadores de redes tróficas encontradas en *Malacobelemnon daytoni*.

Figura III 6: Composición en los valores de isótopos estables en *Malacobelemnon daytoni* en las diferentes estaciones en comparación con trabajos previos.

Tabla III 7: ANOVA para los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en las diferentes estaciones.

Figura III 7: Valores de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ expresados en % en copépodos; Krill; gorgonias; plumas; estrellas y ofiuros, en diferentes puntos de península Antártica.

Figura III 8: Esquema conceptual mostrando las principales relaciones tróficas de Caleta Potter.

Figura IV 1: Mapa del área de estudio en donde se detalla los puntos de descarga debido al deshielo del Glaciar Fourcade más importantes; el arroyo *Potter* (P) y el arroyo *Matias* (M).

Figura IV 2: A Fotografía en acuario de las peceras con sus respectivos cámaras experimentales y de referencia.

Figura IV 3: Consumo de oxígeno de *Malacobelemnon daytoni* a concentraciones crecientes de sedimento.

Tabla IV 1: ANOVA de la concentración de oxígeno medida en las cámaras experimentales con las cámaras control.

Figura IV 4: Comparación del consumo de oxígeno entre las cámaras experimentales y las cámaras controles.

Figura IV 5: Efecto de elevadas cantidades de sedimento en *Malacobelemnon daytoni*.

Tabla IV 2: Resumen de parámetros C_{Crit} (mg L^{-1}), O_{max} , E_{Inv} (gdm J^{-1}), para la estimación cualitativa de la sensibilidad relativa de sedimentos en diferentes especies.

AG: ácidos grasos
AGI: ácidos grasos insaturados
AGMI: ácidos graso monoinsaturados
AGPI: ácidos grasos poliinsaturados
AGS: ácidos grasos saturados
ANOVA: análisis de la varianza
CH: carbohidratos (hidratos de carbono)
CL: cluster
col: colonia
est: estación
FC: células foliculares
FD: diámetro de los oocitos (feret)
IFE: índice de fecundidad efectiva
IFP: índice de fecundidad potencial
Lip: lípidos
mad: maduros
MIPS: material inorgánico particulado en suspensión
Mo: materia orgánica
MOP: material orgánico particulado
MPS: material particulado en suspensión.
MS: longitud a la que se alcanza la madurez sexual
ooc: oocitos
PS_{inicial}: peso seco inicial
PS_{ceniza}: peso seco en cenizas
pol: pólipo
Prot: proteínas
qs: quistes espermáticos
sd: sin dato
sd: desvío estándar

Resumen

El ecosistema bentónico de Caleta Potter (Isla 25 de Mayo, Antártida) mostró en los últimos años un aumento llamativo en la abundancia y rango de distribución del cnidario *Malacobelemnion daytoni* (Octocorallia, Pennatulacea, Kophobelemnidae) junto con la retracción de especies de ascidias. En paralelo a estos cambios en las comunidades bentónicas, se registró un incremento de sedimento en la columna de agua como consecuencia del retroceso del Glaciar Fourcade debido al aumento de las temperaturas atmosféricas en la región. Este es el primer caso registrado donde pennatulaceos son dominantes, más aún, esta especie no ha sido reportada en ningún otro ecosistema antártico. El presente trabajo tiene como objetivo analizar la biología del cnidario mediante los estudios de reproducción, alimentación y tolerancia al sedimento, para inferir acerca del potencial de supervivencia de esta especie frente al cambio ambiental que se viene registrando en este ecosistema. Se realizaron experimentos de tolerancia al sedimento en la base Argentina Carlini, donde además se tomaron muestras durante dos años consecutivos (2009-2010) para los estudios de reproducción y alimentación.

Se observó que *Malacobelemnion daytoni* es una especie gonocórica, de fecundación externa y larvas lecitotróficas. La madurez reproductiva en esta especie se alcanza rápidamente (1, 5 cm de longitud) y la oogénesis se caracteriza por el mantenimiento de oocitos en diferentes estadios durante todo el año, de los cuales una pequeña proporción finaliza la maduración y son liberados de manera sincronizada a través de los autozoides. Se sugiere que la reproducción es estacional con más de un desove al año, asociados a los pulsos de energía generados a partir de los detritos puestos a disposición en los eventos de resuspensión. Con respecto a la estrategia alimentaria se observó coincidencia entre los dos marcadores tróficos utilizados (Ácidos Grasos e isótopos estables de C y N) señalando a esta especie como omnívora/opportunista. Estos resultados, junto con los análisis de hidratos de carbono, proteínas y lípidos refuerzan la hipótesis de que los eventos de resuspensión son una fuente importante de energía que hacen que la estacionalidad, en cuanto a los periodos de agotamiento de alimento en otoño e invierno, no sea tan marcada. Por último, se observó que la especie no se ve afectada frente a concentraciones de sedimento, aún muy por encima de las registradas actualmente en la caleta. Estos resultados en comparación con los realizados en otras especies de Caleta Potter (ascidias y el bivalvo *Laternula elliptica*) sugieren que la sedimentación puede estar jugando un papel importante en los cambios observados en las comunidades bentónicas, favoreciendo a *Malacobelemnion daytoni* de manera indirecta al actuar fuertemente sobre otras especies, principalmente en ascidias. Esto conjuntamente con el éxito reproductivo (madurez temprana y más de un desove anual), y la amplia variedad de fuentes de alimento en su dieta, dan los primeros resultados que ayudan a comprender el llamativo éxito ecológico de esta especie en Caleta Potter.

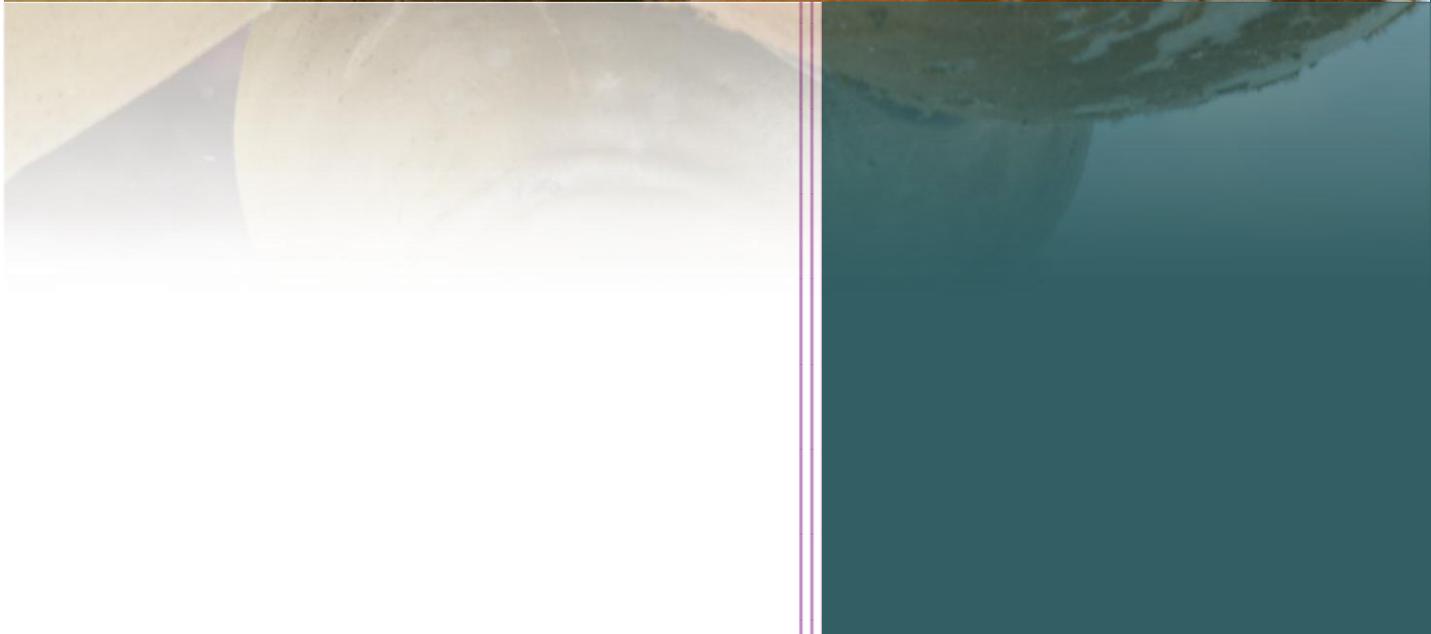
Summary

In recent years, the benthic ecosystem of Potter Cove (Isla 25 de Mayo, Antarctica) showed a striking increase in the abundance and distribution range of the cnidarian *Malacobelemnodaytoni* (Octocorallia, Pennatulacea, Kophobelemnidae), concomitant with the retraction of some ascidians. At the same time, an augmented input of sediment load was recorded in the water column as a result of the retreat of Fourcade glacier due to increased atmospheric temperatures in the region. This is the first recorded case where pennatulids are dominant in an Antarctic community and the first report of the species in Antarctic waters. This work aims to analyze the biology of *M. daytoni* with emphasis in reproduction and feeding strategies together with physiological tolerance to sediments, thus to infer the potential advantages of the species under the environmental change that has been recorded in this ecosystem. Sediment tolerance experiments were performed on the Carlini Station, Argentina, where further samples were taken for two consecutive years (2009-2010) for reproduction and feeding studies.

M. daytoni has lecithotrophic larvae and experience external fertilization. Mature oocytes were observed from colonies 15 mm in length, suggesting that sexual maturity could be reached rapidly. Oogenesis was characterized by the maintenance of oocytes at different stages throughout the year, a small proportion of which matured and was released synchronously through autozooids. This species exhibited a seasonal pattern with two spawning events per year, probably associated with resuspension events and other energy sources than those provided by local pelagic primary production. Regarding the food strategy, similar results were observed between the two trophic markers used (Fatty Acids and stable isotopes of C and N) indicating that this species could be omnivorous / opportunistic. These results, together with the analysis of carbohydrates, proteins and lipids support the hypothesis that resuspension events are an important source of energy, reducing the seasonality of food depletion periods in autumn and winter. Finally, it was observed that this species was not affected by different sediment concentrations, still well above the currently registered in the creek. Comparing these results with those obtained with other species of Potter Cove (ascidians and the bivalve *Laternula elliptica*) I suggest that sedimentation may be playing a role in the observed changes in benthic communities, favoring *M. daytoni* indirectly by acting strongly on other species, primarily in ascidians. This along with reproductive strategy (early maturation and more than one spawning per year) and the wide variety of food sources in their diet, provide the first approach that helps to understand the striking success of this species in Potter Cove.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL



El continente austral aparece bajo una nueva forma en un mapa del mundo trazado en 1531 y reproducido nuevamente siete años después. Si bien estos mapas fueron basados en conjeturas, estas representaciones fueron de gran ayuda a la ciencia, ya que pensando en ellos muchos exploradores partieron a los mares del sur (Mastro 2002).

Durante el Siglo XIX, una buena parte de las exploraciones de los parajes de la Antártida fue obra de balleneros y cazadores de focas, estos hombres fueron los primeros en pisar continente Antártico, atraídos por los inmensos pinnípedos y cetáceos. Otras expediciones tuvieron una finalidad esencialmente científica, como la del capitán americano Wilkes (1838-1842), el francés Jules Dumont d'Urville (1840) y el inglés James Ross quien le dio nombre a las islas Cerro Nevado y Seymour (en ésta última es donde se encuentra actualmente la base Argentina Marambio) en 1842, entre otros.

Fue recién a comienzos del Siglo XX cuando se lanzaron los exploradores a la conquista del polo sur. El primero que estuvo cerca de conquistarlo fue el inglés Ernest Shackleton en 1908-1909, pero quien logró el objetivo fue el noruego Roald Amundsen en 1911, seguido meses después por el británico Robert Scott, cuyo final fue trágico a pocos kilómetros del depósito de víveres. Si bien Shackleton estuvo a escasos 190 km del polo sur, su nombre es recordado por una de las más fascinantes historias Antárticas, habiendo quedado atrapado en las gélidas aguas durante dos años a bordo del *Endurance*, logrando salvar a su tripulación pero no así su barco. Finalmente muere años más tarde en una nueva expedición cuando intentaba circunnavegar la Antártida.

Como consecuencia de estas expediciones al continente antártico sobrevino una época de expediciones científicas sistemáticas, una de las más importantes fue la del *USS Discovery* (1925-1937) con importantes aportes al conocimiento de los mares australes. Sin embargo, recién los trabajos del año Geofísico Internacional (1957) supusieron un aporte sustancial al trabajo científico sistematizado, con el advenimiento de proyectos destinados únicamente a la ciencia. En 1952 se firma el Tratado Antártico, el cual entra en vigencia en 1961, suspendiendo todas las reivindicaciones territoriales sobre el continente y destinándolo únicamente a la investigación científica.

Actualmente, la Península Antártica, con una tasa de calentamiento superficial del aire de $3,7 \pm 1,6^\circ\text{C}$ por siglo, pertenece a las regiones de más rápido calentamiento de la Tierra, siendo de $2,5^\circ\text{C}$ desde 1950 (Cook et al. 2005; Turner et al. 2005; 2007). Si bien hasta el momento la temperatura del agua no sufrió incremento significativo (Schloss et al. 2012), este calentamiento

ha tenido profundas consecuencias para la capa de hielo de la Península Antártica ya que la mayoría de los glaciares han retrocedido durante los últimos 50 años, cuyo retroceso se encuentra en aumento (Dierssen et al. 2002; Cook et al. 2005; Rückamp et al. 2011). Por otro lado, se observa además una disminución en la formación de hielo marino en el invierno (Barnes y Souster 2011; Stammerjohn et al. 2012), la cual se encuentra asociada, según dichos autores, de manera directa con una marcada mortandad en el bentos Antártico, ya que la duración de estos hielos esta inversamente correlacionada con el incremento en el impacto de los hielos (iceberg) (Barnes y Souster 2011).

En la última década numerosos autores señalan el incremento en la frecuencia del impacto de hielo y a la disminución en la formación de hielo invernal como los efectos más importantes para el bentos somero (Gutt 2001; Gutt y Starmans 2001; Smale et al. 2008a; 2008b; 2008c; Barnes y Souster 2011; Gutt et al. 2013), sin embargo, otro de los factores asociados con el retroceso de los glaciares que afecta al bentos somero y del que pocos estudios se han realizado, es el aumento en la carga de sedimentos (material particulado inorgánico) en la columna de agua (Torre et al. 2012).

Bentos Antártico

Los ecosistemas bentónicos someros en Antártida se caracterizan por poseer una alta riqueza y diversidad de especies, más de 4100 especies bentónicas se han registrado en el Océano Austral, entre las que dominan principalmente poliquetos, gasterópodos y anfípodos. La comparación con las regiones tropicales y templadas sugieren que decápodos, bivalvos y peces teleósteos están escasamente representados en la fauna marina bentónica en Antártida, mientras que picnogónidos, equinodermos y muchos grupos de suspensívoros son ricos y diversos. Las preguntas evolutivas sobre el origen, la diversificación o la extinción de la fauna marina del Océano Austral no tienen una única respuesta, la historia evolutiva de cada grupo parece reflejar una respuesta diferente a los cambios tectónicos, climáticos y oceanográficos a los que han sido objeto a través de la historia (Clarke y Johnston 2003).

En los sistemas someros, las comunidades se encuentran modeladas principalmente por disturbios físicos, si bien, como ya se mencionó, uno de los más relevantes es el impacto del hielo, se encuentra además la acción de las olas, mareas, vientos, etc. Mientras que a mayores profundidades adquieren mayor relevancia factores estructurantes como la competencia y la predación (Dayton et al. 1974; Sahade et al. 1998; Nonato et al. 2000; Gutt y Piepenburg 2003).

A su vez, otro de los factores que influyen en el bentos somero es la producción de materia orgánica en el océano Austral, la cual no solo está confinada a los primeros metros en los que la luz llega, sino además a los meses de primavera y verano que es cuando se producen los principales picos de producción primaria como consecuencia del incremento de la intensidad luminosa, que pasa de durar casi 24 horas en primavera a ser prácticamente nula durante el invierno (Gili et al. 2006). Estos picos de producción primaria (*'bloom'*) que se ven interrumpidos cuando disminuye el ingreso de energía lumínica (Arrigo et al. 2002; Arrigo y van Dijken 2003), limitando de esta manera el flujo vertical de materia orgánica hacia el bentos, plantean el interrogante de cómo los suspensívoros bentónicos hacen frente a este flujo estacional en el invierno Austral. Algunos autores plantean que sólo es compatible con una reducción de la actividad de los organismos bentónicos durante el invierno austral, ciclos reproductivos bianuales, lentas tasas de crecimiento etc., aunque trabajos más recientes consideran posibles fuentes alternativas de alimento no tan estacionales, como podrían ser los detritos (Isla et al. 2006; 2011; Norkko et al. 2007; Mincks et al. 2008).

Área de estudio

Caleta Potter (62° 14' S, 58° 38' O), es un pequeño fiordo tributario del sistema de Bahía Guardia Nacional (Bahía Maxwell), ubicado en el extremo suroeste de la isla 25 de Mayo (King George), archipiélago de las Shetland del Sur; al noroeste de la península antártica (Fig. I 1).

Dicha Caleta tiene una extensión total de 6,5 km² dividido en una zona externa (3,5 km²) y una interna (3 km²), las cuales se encuentran separadas por una elevación transversal del fondo, aproximadamente a 30 m de profundidad (Fig. I 1). La zona interna alcanza hasta 50 m con sustrato fangoso/arenoso sobre la costa sur en donde se encuentra la estación Argentina Carlini (ex Jubany) y el laboratorio Argentino-Alemán Dallmann que posee la infraestructura necesaria para llevar adelante los trabajos propuestos mientras que las costa este y norte se encuentra rodeada por el glaciar Fourcade y sus pendientes son más pronunciadas que en la costa sur.

Dicho glaciar se ha retraído significativamente en los últimos años, siendo el volumen perdido desde el año 2000 al 2008 de aproximadamente 0,615 Km³ (Braun y Gossmann 2002; Rückamp et al. 2011). Esto conlleva a un incremento en el aporte de agua dulce con una elevada cantidad de sedimentos (material particulado en suspensión, MPS), lo que genera una capa superficial más oscura en los primeros 5 m de la columna de agua, principalmente en épocas estivales (Schloss et al. 2012).

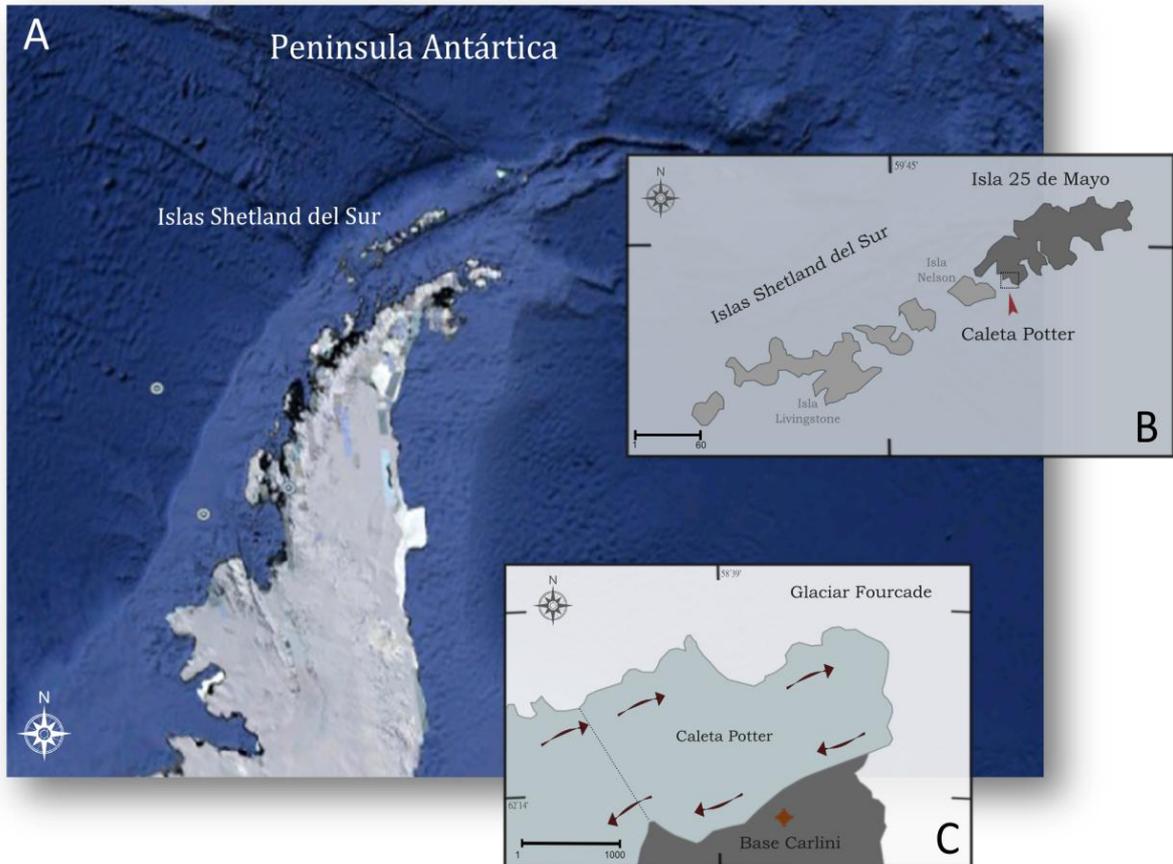


Figura I 1: Mapa del área de estudio. A Localización de las Islas Shetland del Sur en Península Antártica. B Localización de Caleta Potter. C Detalle de B, donde se observa Caleta Potter señalizando Base Carlini y con línea de puntos el límite entre el sector interno y externo. Con flechas se señala el sentido de circulación interna.

Variables ambientales de Caleta Potter

En Caleta Potter los valores del material particulado en suspensión (MPS) han aumentado de manera significativa en la zona interna en las últimas décadas, evidenciados principalmente en los meses de verano y en menor medida en invierno (Schloss et al. 2012) debido al retroceso del glaciar Fourcade. Sumado a este incremento de sedimento en la columna de agua, se ha registrado una ligera disminución en la salinidad, si bien esta no es significativa a lo largo del tiempo (desde 1991 al 2009), si lo fue entre las capas superficiales y las más profundas de la columna de agua (33, 74% en superficie y 34, 04% a mayor profundidad). Por otro lado la temperatura del agua no incremento de manera significativa en las últimas décadas, con solo leves oscilaciones similares tanto en el sector interno como externo de la caleta (Schloss et al. 2012).

La concentración de clorofila-a ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$), a lo largo del mismo periodo de estudio, mostró una marcada estacionalidad, los valores más altos se observaron en el mes de febrero, aunque es importante remarcar que los picos de producción primaria duran de pocos días a como máximo una semana (Schloss et al. 2012).

A pesar de que en Caleta Potter el promedio de días por año en los que se observó hielo marino es relativamente constante año a año (233 ± 38), un registro fotográfico reciente documentó el invierno austral en Caleta Potter de 2010, libre de hielo (conjunto de datos PANGAEA; <http://doi.pangaea.de/10.1594/PANGAEA.730506>) (Schloss et al. 2012). Esto tendría efectos concomitantes en la dinámica del ecosistema pelágico en especial los ciclos de dominancia entre krill y salpas cuyos potenciales efectos a mayores niveles tróficos aún se desconocen (Atkinson et al. 2004; Smetacek y Nicol 2005).

En los años de interés de la presente tesis (2009 y 2010¹) si bien los valores de material particulado en suspensión aumentaron en verano, se observaron además, otros picos a lo largo de ambos años, tanto en superficie como a mayor profundidad².

Con respecto a los porcentajes de materia orgánica en suspensión (%Mo), si bien solo se cuenta con los datos del 2009, los valores fueron variados a lo largo de ese año, los picos máximos se observaron en mayo, agosto y octubre dependiendo de la profundidad y los valores mínimos se registraron en enero y julio (Fig. I 2).

La concentración de clorofila-a en el año 2009 tuvo un pico entre los meses de febrero-marzo aunque este no fue significativo, en contraposición con lo que se observó en el 2010, con dos picos, el primero significativo en enero-febrero y el segundo menos notorio en invierno de 2010 (agosto) (ANOVA; $F = 5,84$; $p < 0,001$) (Fig. I 2).

¹ Los datos de 2009 y 2010 de MPS, Clorofila-a y % Mo fueron tomados de Schloss et al. 2012.

² Se considera en `superficie` al promedio de los valores de 0, 5 y 10 m, y `profundidad` los valores de 20 y 30 m.

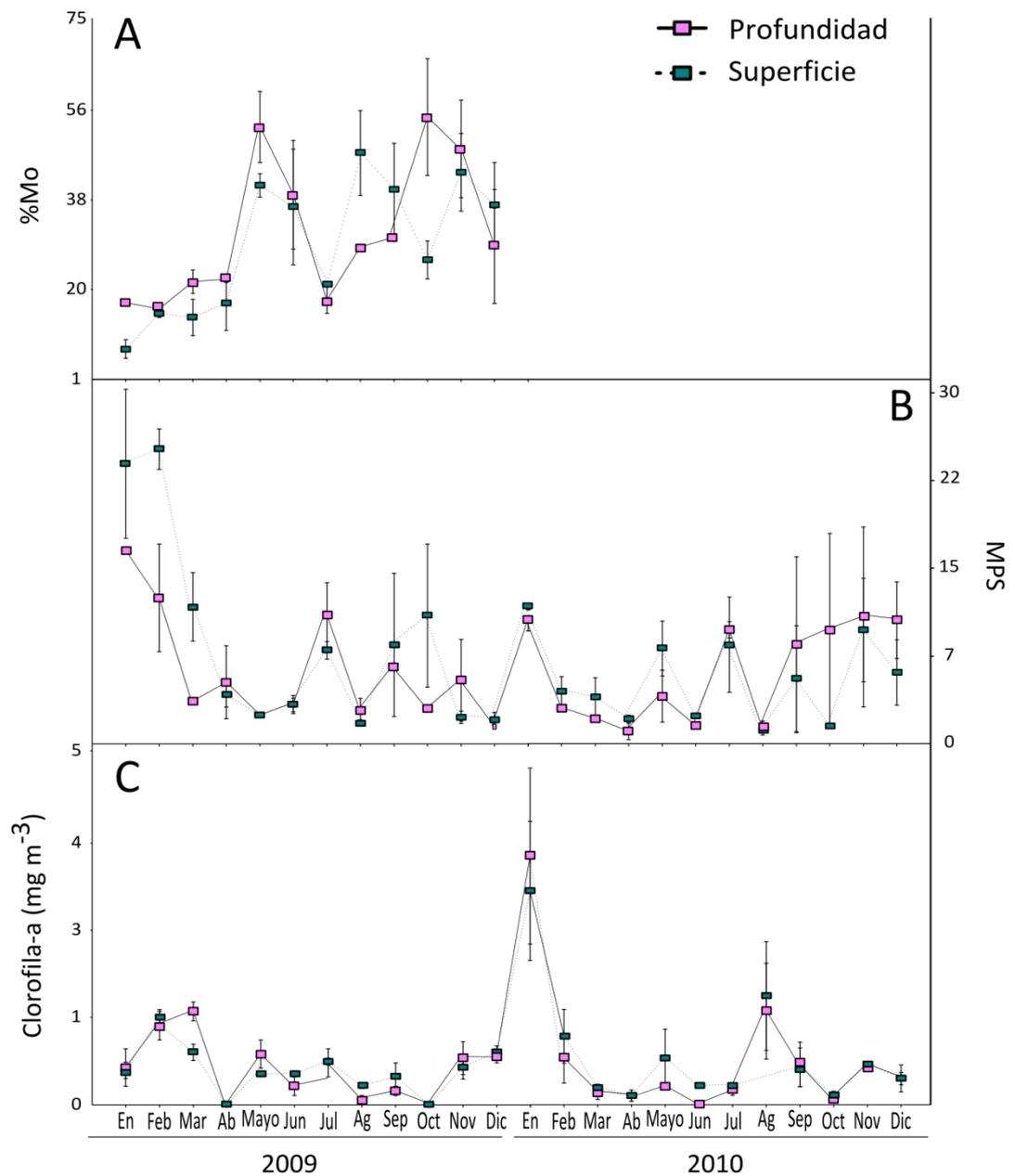


Figura I 2: Medidas mensuales tanto de superficie (0, 5 y 10 m) como de profundidad (20 y 30 m) desde enero 2009 hasta diciembre 2010. A % Mo B MPS C Clorofila-a. Las barras verticales indican error estándar. Datos tomados de Schloss et al. (2012).

Malacobelemnon daytoni

Los pennatuláceos ('plumas de mar') son antozoos (octocorales) coloniales completamente adaptados a suelos blandos, morfológicamente diversos, con una distribución geográfica en los mares de todo el mundo, desde los polos hasta los trópicos y aguas ecuatoriales, además habitan desde zonas someras hasta grandes profundidades (a más de 6100 m de profundidad) (Williams 2011). Una de las especies más antiguas descritas pertenece al género *Virgularia* aproximadamente en 1766, mientras que, actualmente ya se han descrito para el orden aproximadamente 200 especies.

Las plumas de mar se caracterizan por poseer un pólipos simple axial (oozoide) del que parten los autozoides hacia el ápice, encargados principalmente de la alimentación y la reproducción, mientras que en la base del pólipo primordial se encuentran los sifonozoides los cuales introducen agua en la cavidad gastrovascular que ayuda a mantener la orientación vertical de la colonia junto con la varilla axial de carbonato de calcio (Edwards y Moore 2008; González et al. 2009) (Fig. 13).

A pesar de ser los pennatuláceos muy abundantes en los mares de todo el mundo, poco es lo que se conoce a cerca de su biología y aún menos en *Malacobelemnon daytoni*. El primer registro en esta especie fue realizado en 1998 por Sahade et al. (1998) y su clasificación morfológica fue realizada años después por López González et al. (2009).

En paralelo a los cambios mencionados anteriormente observados en Caleta Potter con respecto al incremento del MPS en la columna de agua, se registró un marcado cambio en la estructura de las comunidades bentónicas que se produjo en un corto periodo de tiempo. Dicho cambio se caracteriza por la extensión en la distribución y el incremento poblacional del pennatuláceo *Malacobelemnon daytoni* y en menor medida del bivalvo *Laternula elliptica* (Sahade et al. *en preparación*).

El marcado incremento de este pennatuláceo, tanto en abundancia como en sus rangos de distribución, resultan sorprendentes ya que, a pesar de ser los octocorales un grupo importante en las comunidades antárticas, este es el primer caso registrado donde los pennatuláceos son dominantes, más aún, esta especie no ha sido reportada en ningún otro ecosistema antártico y el género ha sido reportado sólo en la plataforma de Australia (López González com. pers.). Asimismo es sorprendente su dominancia en ese rango de profundidades (hasta 30 m) ya que es una zona fuertemente afectada por el impacto del hielo. En algunos casos se explica debido a la

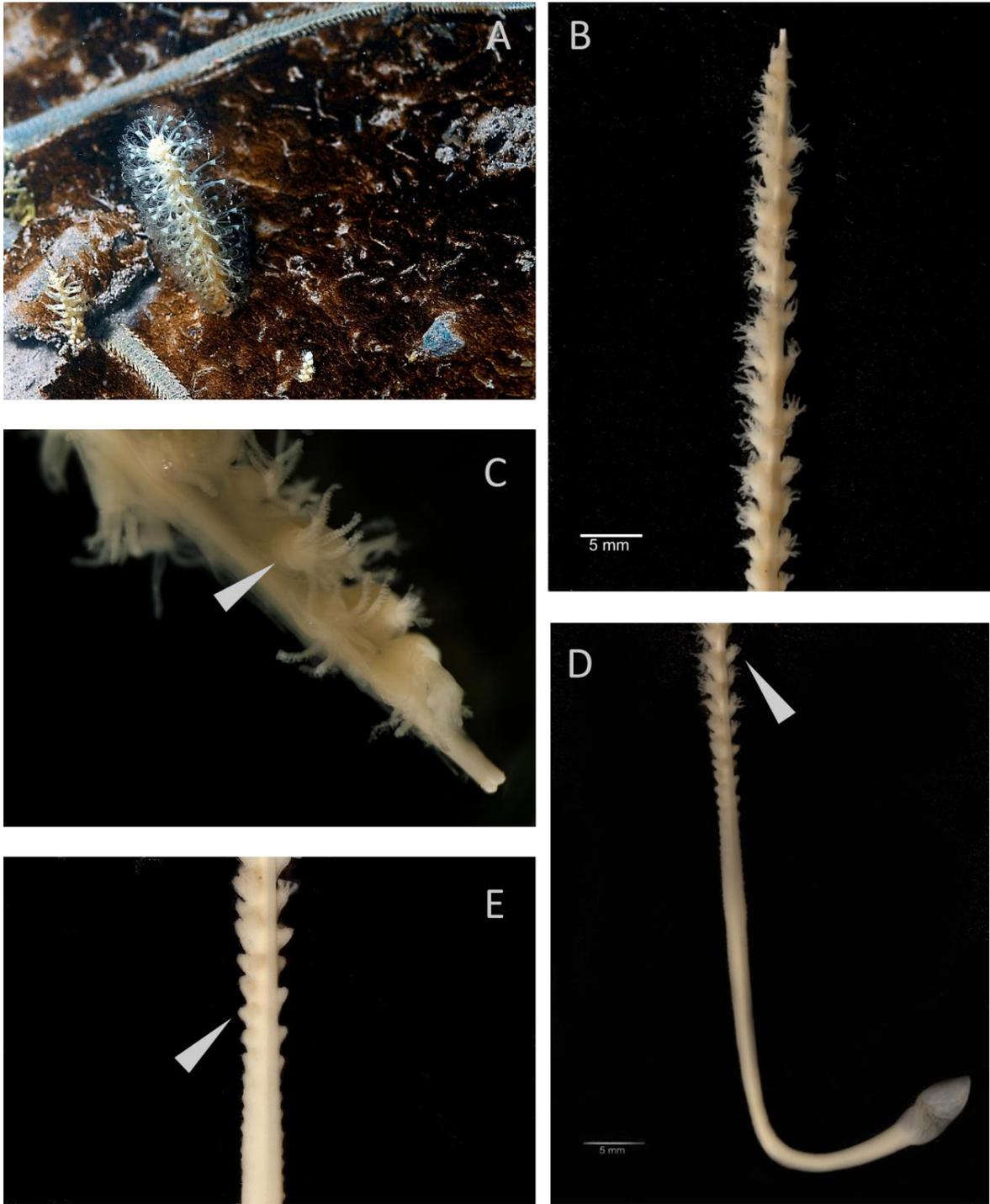


Figura 13: A Morfología externa de *Malacobelemnon daytoni* enterrada en el sedimento en Caleta Potter. B Ápice de la colonia. C Detalle del ápice mostrando los autozooides (*flecha*). D Pedúnculo y zona media mostrando los primeros autozooides (*flecha*). E Detalle de la zona media detallando los sifonozoides (*flecha*). Fotos: Marcelo Mammana (A); Eduardo Obis (B, C, D y E).

capacidad de algunos organismos de enterrarse en el sedimento, como el caso del bivalvo *Laternula elliptica*, pero esto resulta actualmente muy discutido, por lo que *Malacobelemnon daytoni* debería contar con una estrategia diferente como puede ser, una alta tasa de renovación de la población y una alta tasa de crecimiento. Estas estrategias si bien les permitirían colonizar exitosamente estas áreas de alto disturbio son llamativas, ya que, en general los organismos antárticos se caracterizan por lo contrario, bajas tasas de crecimiento y renovación poblacional (Clarke 1996; Pörtner 2002).

Este incremento se observó principalmente a 20 y 25 m de profundidad, en donde la especie estaba casi ausente en 1994 (Fig. I 4A). Conjuntamente con estos cambios se observó la retracción en la distribución de otras especies de ascidias, principalmente *Molgula pedunculata*, la cual, si bien fue una de las más abundantes en 1994 (a partir de los 20 m) su % de cobertura fue muy escaso en dicho rango de profundidad en 2009 (Sahade et al. 1998; Zamboni 2010; Sahade et al. en preparación).

Estos cambios fueron además sorprendentes por la velocidad y magnitud, los cuales, como ya se mencionó, podrían estar ligados al cambio climático experimentado en Caleta Potter, principalmente con los aumentos significativos de material particulado en suspensión registrados en los últimos años.

En este contexto resulta sumamente interesante abordar el estudio de *Malacobelemnon daytoni* desde diferentes perspectivas con el fin de incrementar el conocimiento básico de la especie y analizarla en el contexto del ecosistema de Caleta Potter en donde desde hace ya varios años se está trabajando con la estructura y dinámica de sus comunidades bentónicas y con la ecología de las especies dominantes como ascidias, bivalvos y lapas.

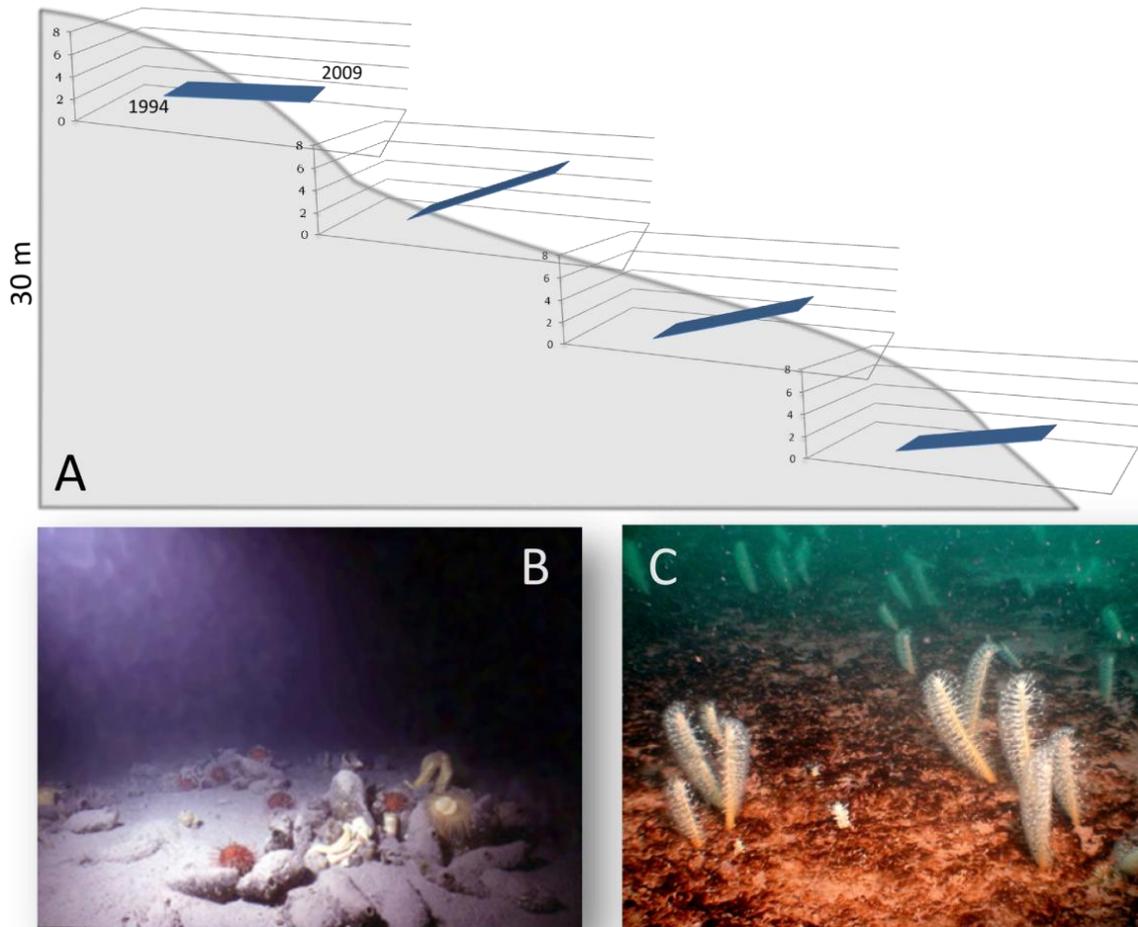


Figura 14: A Diagrama del incremento en el % de cobertura de *Malacobelemnion daytoni* de 1994 a 2009 a 15, 20, 25 y 30 m de profundidad. Datos Sahade et al. *en preparación*. B y C Fotografía de la misma área de estudio. 1994 (B) y 2009 (C). Foto: Ricardo Sahade (B); Guillermo Mercuri (C).

Objetivo General

Analizar la biología del cnidario *Malacobelemnion daytoni* (Octocorallia, Pennatulacea, Kophobelemnidae) en la comunidad bentónica de Caleta Potter, Isla 25 de Mayo, Antártida, e inferir acerca del potencial de supervivencia de esta especie ante el cambio ambiental que se registra en este ecosistema.

Objetivos Específicos

1. Estudiar la biología reproductiva de *Malacobelemnion daytoni* analizando la estacionalidad, la energética y la estrategia exhibida por la especie.
2. Analizar la posición trófica de *Malacobelemnion daytoni* en el ecosistema y su estrategia alimentaria.
3. Analizar la sensibilidad de la especie a la carga de sedimentos (material inorgánico particulado) en la columna de agua.

Hipótesis

El aumento de abundancia y distribución de la especie *Malacobelemnion daytoni* se encuentra favorecido por los cambios ambientales y estructurales que se observan en Caleta Potter.

Estructura de la tesis

Cada capítulo presenta una introducción al tema, los objetivos particulares de cada capítulo y metodología empleada. Cada uno de ellos contiene además los resultados más relevantes y una discusión específica.

Se comienza con la ecología reproductiva de *Malacobelemn non daytoni* (*Capítulo II*). Este capítulo se divide en dos secciones. Sección A centrado en aspectos básicos de la biología reproductiva de la especie y la Sección B en la estacionalidad a lo largo de dos años de muestreo y la relación de esta con patrones ambientales.

En el *capítulo III* se estudia la posición trófica de la especie. Se analiza el contenido bioquímico (lípidos-proteínas y carbohidratos) de manera mensual durante un año. Además se realizan estudios de biomarcadores como estudios de Ácidos Grasos e Isótopos estables de manera estacional.

En el *Capítulo IV* se estudia la sensibilidad de la especie a la carga de sedimentos en la columna de agua en comparación con las especies más relevantes de Caleta Potter como ascidias y bivalvos.

Finalmente las conclusiones más relevantes, integrando los resultados de los capítulos anteriores, se encuentran en el *capítulo V*.

La obtención de estos resultados desde diferentes perspectivas permitirá aumentar el conocimiento de esta especie, muy importante en el ecosistema en estudio, pero de la que muy poco se sabe hasta el momento. Asimismo el programa científico en el que se inserta la presente tesis busca aportar a la comprensión acerca de la capacidad de respuesta de ecosistemas costeros antárticos ante los cambios que se vienen registrando, en este sentido el conocimiento de la ecología de las especies más importantes resulta de suma necesidad.

Esta tesis fue financiada mediante una Beca Doctoral del CONICET, por aportes del Instituto Antártico Argentino (IAA) y con una beca de la Fundación Carolina la cual permitió completar los análisis en el Instituto de Ciencias de Mar (Barcelona-España).

CAPITULO I

ECOLOGÍA REPRODUCTIVA



Sección A

Introducción

La información sobre la biología reproductiva de las especies es esencial para comprender la dinámica de la población y las posibles respuestas a perturbaciones. Por ejemplo, Baillon et al. (2013) destacan en su reciente trabajo la importancia de ganar conocimiento sobre la biología reproductiva del pennatulaceo *Anthoptilum grandiflorum* con el fin de desarrollar gestión de hábitats adecuados y planes de conservación de esta especie, ya que esta sirve de hábitat de crianza del pez gallineta, muy utilizado de manera comercial (*Sebastes spp.*)

En los invertebrados marinos, la posible existencia de un patrón latitudinal, que iría de una fecundación externa y larvas planctotróficas a una fecundación interna, larvas lecitotróficas e incubación con el aumento de la latitud, es un aspecto conocido como 'Regla de Thorson' (Mileikovsky 1971). Si bien dicha 'regla' fue revisada varias veces encontrándose numerosas excepciones (Pearse et al. 1991; Arntz y Gili 2001) esta se ve reflejada en algunas especies de escleractinios y octocorales (Coma et al. 1995; Waller et al. 2008). Además de eso, en octocorales colonias de gran tamaño están relacionadas con la liberación de gametos y colonias de pequeño tamaño con la incubación. Esta relación puede ser directa o indirecta, como respuesta a factores físicos ambientales. Además, la incubación podría facilitar el hermafroditismo como se ha observado en varias especies incluyendo octocorales (Strathmann et al. 1984; McFadden et al. 2001).

A pesar de que existe cierta información sobre las características reproductivas de suspensívoros antárticos como equinodermos, braquiópodos, briozoos, ascidias y bivalvos entre otros (Pearse et al. 1991; Gutt et al. 1992; Poulin y Féral 1996; Barnes y Clarke 1998; Meidlinger et al. 1998, Sahade et al. 2004; Strathmann et al. 2006; Kang et al. 2009; Rodríguez et al. 2013) pocos trabajos se realizaron en escleractinios (Waller et al. 2008) y octocorales (Brito et al. 1997; Orejas et al. 2002; 2007), los cuales son miembros importantes de los ecosistemas bentónicos en todo el mundo.

En el orden Pennatulacea, algunas características como la gametogénesis, patrones temporales y sincronización han sido estudiados a lo largo de todo el mundo (Chia y Crawford 1973; Rice et al. 1992; Eckelbarger et al. 1998; Soong 2005; Edwards y Moore 2008; 2009; Pires et al. 2009; Baillon et al. 2013). En todos ellos los gametos son liberados y fertilizados externamente y, probablemente, con larvas lecitotróficas. Estas observaciones sugieren que estas pueden ser características fijadas filogenéticamente en el orden. Por otro lado, numerosas especies de grupos

emparentados (por ejemplo; escleractinios o alcionarios) mostraron una plasticidad elevada en las estrategias exhibidas: especies gonocóricas, hermafroditas, tanto de fecundación externa como interna, etc. (Dahan y Benayahu 1997a; 1997b; McFadden et al. 2001; Orejas et al. 2002; 2007).

La información sobre la biología reproductiva de *Malacobelemnon daytoni* en esta instancia nos resulta sumamente importante ya que nada es lo que se conoce a cerca de las estrategias reproductivas de esta especie, siendo esta la más abundante en un área tan perturbada como es Caleta Potter. En oposición, diversos trabajos se han realizado en otras especies de pennatuláceos de diferentes latitudes (Chia y Crawford 1973; Rice et al. 1992; Tyler et al. 1995; Eckelbarger et al. 1998; Soong 2005; Edwards y Moore 2008; 2009; Pires et al. 2009; Lopes et al. 2012; Baillon et al. 2013) lo que nos permitirá, por un lado analizar si se ve reflejada la 'Regla de Thorson' en el orden, como a su vez probar si tanto el gonocorismo, como la liberación de gametos, podrían ser caracteres fijos filogenéticamente.

Objetivos específicos

1. Conocer aspectos básicos de la reproducción en *Malacobelemnon daytoni*.
2. Verificar si el gonocorismo y la liberación de gametos son características fijadas al grupo.
3. Evaluar si la biología reproductiva de la especie podría ayudar a explicar el éxito ecológico de la especie en la comunidad bentónica de Caleta Potter.

Ciclo Reproductivo

Se colectaron muestras de *Malacobelemnion daytoni* mensualmente mediante buceo autónomo durante el período de enero 2009 hasta diciembre de 2010, fueron recolectadas un total de 223 colonias. Las muestras se tomaron entre 15 y 22 m de profundidad y transportadas a la superficie en cajas de recolección. Se midió la longitud total de cada una de las colonias y se las conservó en formalina al 4% para los posteriores estudios histológicos. Cada una de las colonias se lavó con agua, se descalcificó en HNO₃ diluido, y se incorporó a parafina. A partir de entonces, el material se seccionó longitudinalmente y fue teñido con Hematoxilina-Eosina para los análisis histológicos. Los cortes se examinaron bajo un microscopio estereoscópico al cual se le fijó una cámara fotográfica Nikon.

Análisis histológico

Cada colonia se dividió en tres secciones, según adaptaciones de Soong (2005): *base*, comprende el pedúnculo y sifonozoides, *medio*, formado por autozoides jóvenes, y el extremo apical de la colonia, *ápice*, constituido por autozoides maduros.

Todos los oocitos seccionadas a nivel nucléolo (Goffredo et al 2002; Sahade et al. 2004; Pires et al. 2009) de las tres secciones (Soong 2005; Pires et al. 2009; Baillon et al. 2013) fueron medidos (feret diámetro) (Walton 1948).

Se utilizó el programa de análisis y procesamiento de imágenes Fiji-win32. Se trabajó sobre fotografías panorámicas de cada sector como la que se observa en la Fig. II 1 obtenidas mediante el programa Adobe Photoshop CS2.



Figura II 1: A Fotografía de una colonia completa previo a la fijación. B Fotografía panorámica del sector medio de una colonia femenina del mes de noviembre. *R*: raquis; *P*: pedúnculo.

La gametogénesis se clasificó de acuerdo tanto a características morfológicas como al tamaño de los oocitos. Se dividió en tres estadios utilizando la terminología presentada por Pires et al. (2009): *estadio I*, el crecimiento inicial de los oocitos, en donde se observaron agrupados, cada uno cubiertos por una capa folicular de células escamosas ($< 70 \mu\text{m}$ de diámetro); *estadio II*, el inicio de la vitelogénesis (70 a $130 \mu\text{m}$) y *estadio III*, oocitos maduros $> 130 \mu\text{m}$, cubiertos por una capa folicular columnar.

La fecundidad de *Malacobelemnion daytoni* se estimó mediante un índice de fecundidad adaptado de Soong (2005), se calculó como el número de oocitos maduros. mm^{-1} en cada colonia.

Si bien a los quistes espermáticos no fue posible clasificarlos con precisión en diferentes estadios de desarrollo mediante las características morfológicas, ya que los cortes estaban en

malas condiciones, se realizaron mediciones del tamaño de cada uno de los quistes y se consideró a los quistes de mayor tamaño como maduros (Pires et al. 2009), lo cual fue corroborado con los cortes histológicos de mayor definición en algunas colonias de *Malacobelemn non daytoni*.

Análisis estadístico

La homogeneidad de varianzas se examinó mediante la Prueba de Levene's, y la prueba de normalidad se llevó a cabo mediante Shapiro-Wilks. Para determinar si había diferencias entre los tamaños (longitud de axis) entre machos y hembras se utilizó una *prueba T* y para determinar si la proporción de sexos se desvió de la esperada 1:1 se usó una prueba de *chi-cuadrado* (Zar 1984).

Un análisis de regresión lineal se realizó tanto para estudiar la relación entre el índice de fecundidad y la longitud total de las colonias (mm) como para la longitud de la colonia (mm) con la longitud de la región fértil (mm).

Se realizó además, un análisis de la varianza (ANOVA) y un *test a posteriori* (Tukey) para probar si había diferencias en el estadio de los oocitos y en los tamaños de los quistes espermáticos entre los tres sectores estudiados de cada colonia.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando Infostat 2012, los datos son presentados en todos los casos como media \pm desvío estándar.

Características Generales

Las colonias de *Malacobelemnion daytoni* están formadas por un raquis el cual representa el 76% del total de la colonia. Los pólipos de menor tamaño que se observaron hacia la parte basal del raquis son los sifonozoides, es en este sector donde se observaron las primeras células reproductivas. El pedúnculo, el cual es aproximadamente el 24% de la longitud total de colonias, fue invariablemente infértil.

Si bien mediante los cortes se observaron hembras y machos (especie gonocórica) las diferencias externas entre ambos sexos, en estadios reproductivos, no fueron evidentes. Las diferencias de tamaños (longitud de axis) entre ambos sexos no fueron significativas (hembras: 51, 77 ± 15, 42; machos: 47, 30 ± 16, 82) (n = 40; T = 0, 77; p > 0, 3857). La prueba *chi-cuadrado* indicó una proporción de sexos 1:1 (n = 284; $\chi^2 = 0, 1573$; p > 0, 05).

En ninguna de las colonias analizadas se encontraron larvas.

Gametogénesis

Los oocitos observados en el *estadio I* correspondieron a células esféricas, con un núcleo prominente central con un nucléolo único. En dicho estadio los oocitos se observaron agrupados en racimos (cluster) rodeados por células foliculares cúbicas o escamosas. El oocito más pequeño encontrado en *estadio I* fue de 13 µm de diámetro y el más grande de 64 µm (47, 61 ± 11, 19 µm). Dichos oocitos derivan de la gastrodermis, principalmente en la base de la colonia, donde se encuentran los primeros sifonozoides y en el centro de la colonia. En el *estadio II* ya se observan vesículas de lípidos, es decir que comienza la vitelogénesis y el núcleo se observó hacia la periferia de las células. El rango de tamaño de los oocitos encontrados en *estadio II* fue de 64 a 114 µm (87, 47 ± 14, 24 µm). En el *estadio III* el tamaño de los oocitos fue > 114 µm (169, 65 ± 50, 93 µm), siendo 347 µm el mayor tamaño de oocito encontrado y corresponde a una colonia de 83 mm de longitud. Las células foliculares se observaron durante todas las fases de la oogénesis, aumentando su espesor de acuerdo con el crecimiento de los oocitos. En los primeros estadios estas células fueron escamosas en contacto directo con la membrana de los oocitos, mientras que, en el *estadio III* las células foliculares fueron columnares y no se encontraron en contacto directo con la membrana de los oocitos (Fig. II 2).

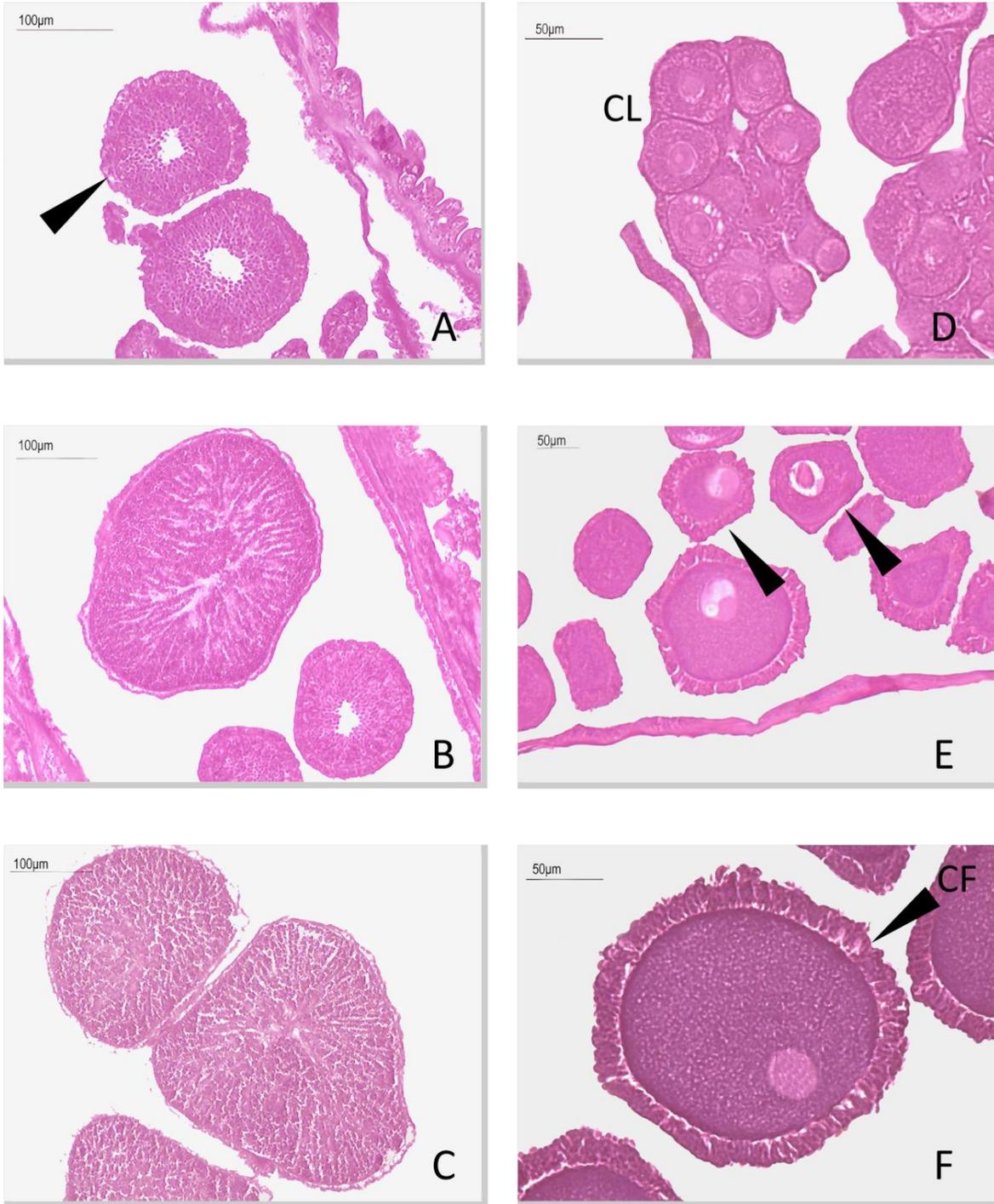


Figura II 2: Microscopía óptica a través del canal longitudinal. A Quistes espermáticos en crecimiento (*flecha*). B Quistes en diferentes estadios de madurez. C Quistes espermáticos maduros (*flecha*) D Oocitos en *estadio I* agrupados en cluster (CL). E Oocitos en *estadio II* (*flecha*). F Oocito maduro en el que se muestran las células foliculares (FC).

Espermatogénesis

Si bien no fue posible clasificar con precisión a los quistes espermáticos en diferentes estadios, ya que muchos de ellos se encontraban fuertemente teñidos perdiendo definición, se observaron diferencias estructurales a medida que aumentaron en tamaño.

En los quistes espermáticos en crecimiento se observaron espermaticitos y en el lumen, que permaneció vacío, se pudo observar en algunos casos pequeñas colas espermáticas (Fig. II 2). Mientras que, en los quistes maduros, los cuales alcanzan dimensiones de hasta 700-800 μm , el lumen vacío disminuye, y los quistes se encuentran completos de espermatozoides (Fig. II 2).

Distribución de células reproductivas

El análisis de varianza indicó que hubo una diferencia significativa en la distribución de los estadios de los oocitos a lo largo de la colonia (Fig. II 3). Los de menor tamaño (*estadio I*), se encontraron en su mayoría en el canal longitudinal en la parte base y media de la colonia (ANOVA; $n = 5341$; $F = 9, 29$, $p < 0, 0001$). Por otro lado, la mayoría de los oocitos maduros (*estadio III*) se encontraron en la sección superior de la colonia (ápice) (ANOVA; $n = 5341$; $F = 53, 79$; $p < 0, 0001$), algunos de ellos en los autozoides (Fig. II 3 y 4). Finalmente oocitos en crecimiento (*estadio II*) se contaron principalmente en el medio de la colonia (ANOVA; $n = 5341$; $F = 21, 9$; $p < 0, 0001$) (Fig. II 3).

Se encontró además una diferencia significativa en la ubicación de los quistes espermáticos a lo largo de la colonia. La mayor parte de los quistes de menor tamaño se encontraron en la base de la misma. En la parte media se encontraron principalmente quistes de tamaño medio y en el ápice los quistes de mayor tamaño (ANOVA; $n = 2702$ quistes; $F = 50, 15$; $p < 0, 0001$) (Fig. II 3).

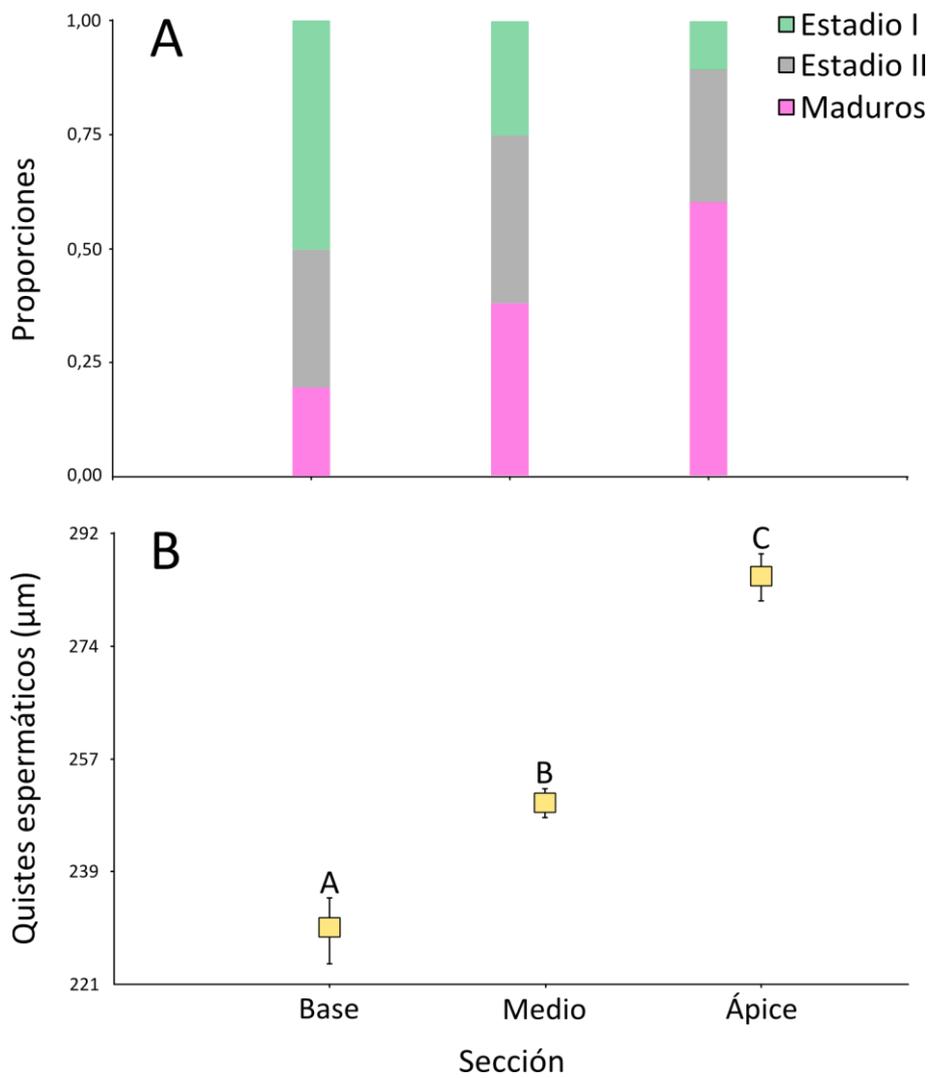


Figura II 3: A Proporción de los diferentes estadios de los oocitos en cada uno de las secciones estudiadas, base, medio y ápice. B Media del tamaño de los quistes espermáticos en los diferentes secciones; base, medio y ápice. Las barras verticales indican error estándar.

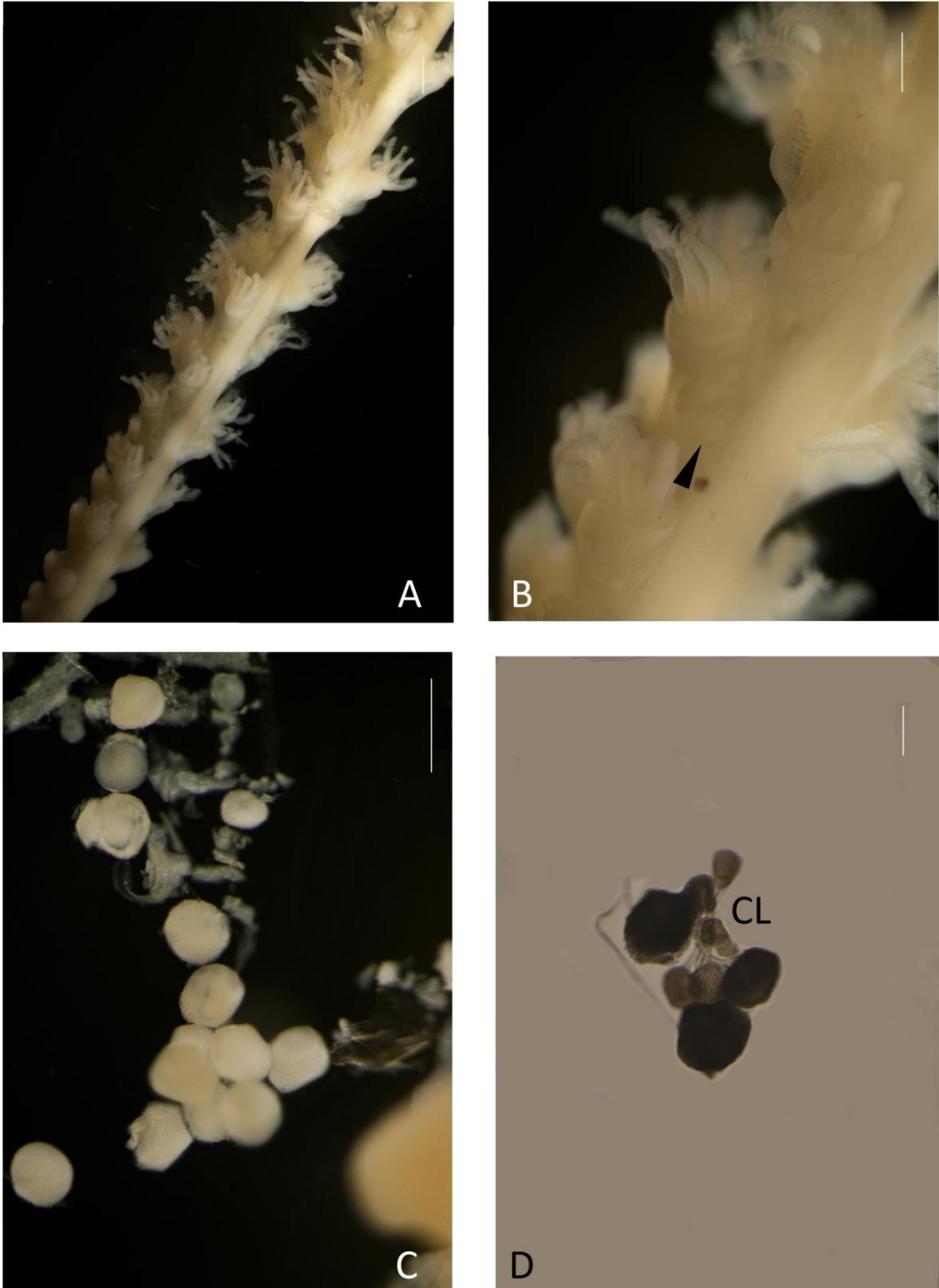


Figura II 4: A Morfología externa de la parte superior del raquis, donde se observan autozoides juveniles y maduros hacia el ápice. B Detalle de A, mostrando las gametas en los autozoides (*flecha*). C y D Oocitos en diversos estadios mostrando las agrupaciones en cluster (CL). Escala: 1 mm en A; 0,5 mm en C y B y 0,2 mm en D.

Fecundidad

Con respecto a la longitud de la colonia se observó una relación significativa con la longitud de la zona fértil ($R^2 = 0,77$; $p < 0,001$) (Fig. II 5A). Por otro lado no se observó una relación entre el índice de fecundidad y la longitud de las colonias (mm) ($R^2 = 0,02$; $p = 0,1647$) (Fig. II 5B). El número de oocitos registrado por colonia varió de 22 oocitos en una colonia de aproximadamente 15 mm, hasta 745 oocitos (hasta 99 maduros) en colonias de aproximadamente 110 mm de longitud.

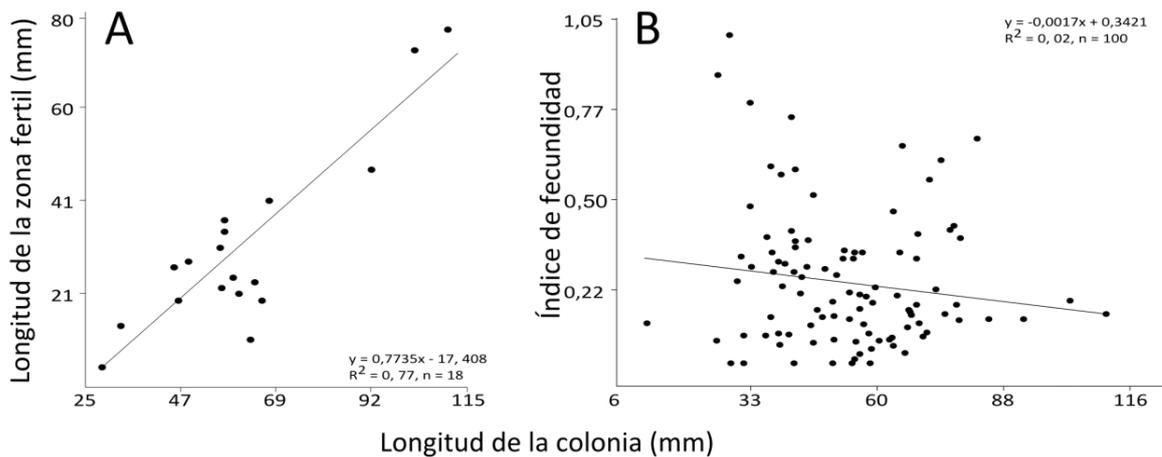


Figura II 5: A Relación entre la zona fértil (mm) y la longitud de la colonia (mm) ($n = 18$). B Relación entre la longitud (mm) y el índice de fecundidad (número de oocitos maduros. mm^{-2}) ($n = 100$).

Una alta frecuencia de oocitos pequeños (estadio I y II) y una baja frecuencia de oocitos maduros se observaron en todas las colonias analizadas (Fig. II 6).

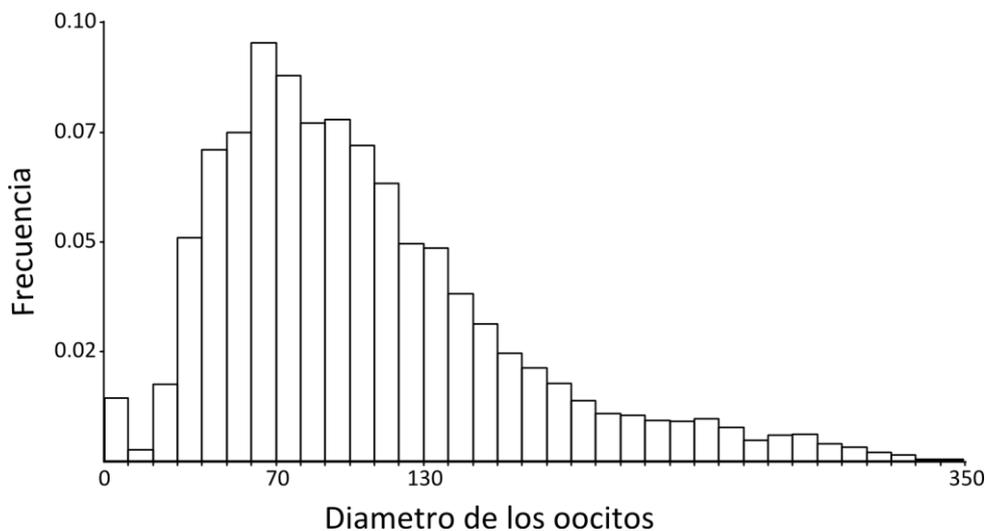


Figura II 6: Frecuencia relativa del diámetro de oocitos.

Características generales

Malacobelemnion daytoni es una especie gonocórica, sin embargo no fue posible diferenciar los machos de las hembras a simple vista, sólo se las pudo diferenciar mediante microscopía.

La prueba *chi-cuadrado* indicó que no hay diferencia significativa de 1:1 en la proporción de sexos de *Malacobelemnion daytoni*. Dicha relación representa la asignación óptima de los recursos prevista en una población con apareamiento al azar (Williams 1975; Leigh et al. 1985), la cual se observó también en otras especies de pennatuláceos como *Funiculina quadrangularis*, *Pennatula phosphorea*, *Kophobelemnion stelliferum*, *Anthoptilum murrayi* y *Anthoptilum grandiflorum* (Edwards y Moore 2008; 2009; Rice et al. 1992; Pires et al. 2009; Baillon et al. 2013).

Los tamaños de los oocitos y la ausencia de larvas en las colonias a lo largo del presente estudio, sugieren que esta especie tiene fecundación externa y sus larvas son lecitotróficas, lo que se observó además en otros pennatuláceos como *Anthoptilum murrayi*, *Pennatula aculeata*, *Pennatula phosphorea*, *Funiculina quadrangularis*, *Virgularia juncea* y *Anthoptilum grandiflorum* (Eckelbarger et al. 1998; Soong 2005; Edwards y Moore 2008; 2009; Pires et al. 2009; Baillon et al. 2013).

La ausencia de gametos, ya sea femeninos como masculinos, en el pedúnculo (24% de la longitud total de la colonia) señala que esta región es invariablemente estéril, lo cual se correlaciona con otras especies del mismo grupo (Eckelbarger et al. 1998; Soong 2005). Resulta llamativo que en *Malacobelemnion daytoni* los gametos estuvieron presentes a lo largo de todo el raquis (76% de la longitud total de colonias), a diferencia de lo que se observó en otros pennatuláceos, como *Virgularia juncea*, en la cual se ha registrado que las células reproductivas se encuentran principalmente en el sector medio del raquis (Soong 2005). Por otro lado, no se observó hasta la fecha, indicios de reproducción asexual por fragmentación en ninguna especie de pennatuláceos.

Gametogenesis y tamaño de los oocitos

El tamaño de oocitos maduros observados en *Malacobelemnion daytoni* varió de 114 a 347 μm . Este rango de tamaño, junto con la cantidad de vesículas de lípidos en los oocitos y la

ausencia de larvas en las colonias a lo largo del estudio, sugiere que esta especie, como ya se mencionó, tiene larvas lecitotróficas y sus gametos son liberados a la columna de agua para su fertilización externa. Esta misma estrategia se observó en otras especies de octocorales Antárticos (Cordes et al. 2001; Orejas et al. 2002) como también en otras especies de pennatuláceos; *Anthoptilum murrayi*, *Pennatula aculeate*, *Pennatula phosphorea*, *Funiculina quadrangularis* y *Virgularia juncea*, entre otras (Eckelbarger et al. 1998; Soong 2005; Edwards y Moore 2008; 2009; Pires et al. 2009; Lopes et al. 2012; Baillon et al. 2013).

Estas características (el gonocorismo, la fecundación externa y la presencia de larvas lecitotróficas), podrían ser caracteres fijados al grupo, ya que hasta la fecha no hay evidencia de hermafroditismo, algún tipo de incubación, ni se han registrado especies con larvas planctotróficas en pennatuláceos (Tabla II 1). Sin embargo, otros grupos de corales como escleractinios y alcionarios muestran una gran variabilidad en las estrategias reproductivas, incluso a niveles de género (Waller et al. 2008; Mercier et al. 2011; Mercier y Hamel 2011).

Malacobelemnion daytoni representa un buen candidato para poner a prueba la posibilidad de incubación/hermafroditismo en plumas de mar. En primer lugar, en términos de la hipótesis de relación inversa entre incubación y tamaño de los individuos, y el hecho de que si incuban podría facilitar el desarrollo de hermafroditismo (Strathmann y Strathmann 1982; Strathmann et al. 1984). *Malacobelemnion daytoni* es una de las especies más pequeñas reportadas, con un tamaño máximo del adulto de aproximadamente 11 cm, mientras que otra especie puede superar los 70 cm de longitud de la colonia (Soong 2005). Por otro lado, la 'Regla de Thorson' (Pearse et al. 1991), aunque cuestionada por diversos autores, plantea la tendencia latitudinal de incubación (Pearse 1994; Gallardo y Penchaszade 2001). Esta regla parece cumplirse en diversas especies, entre ellas, por ejemplo, es aplicable para el género escleractinio *Flabellum*. Las tres especies antárticas, *Flabellum thouarsii*, *Flabellum curvatum* y *Flabellum impensum* son incubadoras, mientras que, *Flabellum alabastrum* y *Flabellum angulare*, especies de aguas templadas (Atlántico nororiental) se reproducen mediante la liberación de gametos a la columna de agua (Waller et al. 2008). Sin embargo, ni especies incubadoras ni hermafroditismo se ha observado hasta la fecha en especies del orden Pennatulacea, en el presente trabajo se incluye una especie antártica, abarcando de esta manera el máximo rango latitudinal, por lo que se sugiere que estas características podrían estar fijadas filogenéticamente en el grupo (Servetto et al. 2013).

Distribución de células reproductivas

Malacobelemnion daytoni se caracteriza por la producción de células reproductivas, tanto masculinas como femeninas, a lo largo de todo el raquis. Contrario a lo que ocurre en otras especies de pennatulaceos, donde la región fértil (zona con células reproductivas) se centra en el medio de la colonia y los oocitos se comienzan a desarrollar a lo largo del borde de los mesenterios, cerca de la base de la cavidad gástrica de los autozoides, y tanto oocitos como quistes espermáticos se encuentran en la mayoría de los casos dentro de dichos pólipos (Soong 2005; Edwards y Moore 2008; 2009; Pires et al. 2009). En *Malacobelemnion daytoni*, las células reproductivas son generadas por la gastrodermis a lo largo del canal longitudinal, donde se encuentra la mayor cantidad de ellas. En los autozoides del sector superior del raquis solo se observaron células reproductivas maduras. Esto sugiere que tanto oocitos como quistes migrarían a lo largo del canal longitudinal y son puestos en libertad por los autozoides en el extremo apical de la colonia (Fig. II 3). Esta hipótesis está apoyada a su vez por la diferencia significativa en la presencia de oocitos maduros registrados en los tres sectores de las colonias: el extremo apical de la colonia contiene significativamente más oocitos maduros que en las partes media y basal; oocitos en *estadio I* principalmente encontrados en los sectores basal y medio y oocitos en *estadio II* en una mayor proporción en el sector medio de las colonias; y por la diferencia significativa en la presencia de quistes espermáticos registrados en los tres sectores de las colonias (Fig. II 2). Esto indica que algunas características reproductivas de pennatulaceos estarían fijadas al orden, pero en otras podemos encontrar mayor plasticidad, como el origen de las células reproductivas y su liberación.

Fecundidad

A diferencia de lo que se observó en otros grupos de pennatulaceos, en *Malacobelemnion daytoni* no se encontró gran número de oocitos maduros por colonia (hasta 99 oocitos maduros.colonia⁻¹), en contraste, *Ptilosarcus guerneyi* es capaz de producir más de 200.000 oocitos en una temporada (Chia y Crawford 1973), mientras que *Pennatula phosphorea* hasta 53.534 oocitos (Edwards y Moore 2008). Por otro lado, resulta llamativa la presencia de oocitos maduros en colonias muy pequeñas en *Malacobelemnion daytoni* (a partir de 1,5 cm de largo de la colonia se observaron oocitos maduros), en contraste, por ejemplo, con *Pennatula phosphorea*, en la cual si bien se observaron gametos en colonias a partir de 4,9 cm de longitud, oocitos maduros fueron hallados recién en colonias de un largo de 8,8 cm, de manera similar se describió

para *Virgularia juncea*, la cual inicia el desarrollo de células reproductivas cuando alcanza un tamaño de 5 cm de longitud (Soong 2005) (Tabla II 1).

El hecho de encontrar oocitos maduros en colonias muy pequeñas, junto con la ausencia de relación directa entre el tamaño de la colonia (longitud) y el índice de fecundidad (número de oocitos maduros.mm⁻¹), sugieren que la madurez sexual es rápidamente alcanzada en *Malacobelemnion daytoni*, al contrario de lo que ocurre en la gran mayoría de los invertebrados bentónicos antárticos, en los cuales, las tasas de actividades relacionadas con la reproducción, el desarrollo y el crecimiento son muy lentos (Pearse et al. 1991). Por ejemplo, Orejas et al. (2002) sugieren que el ciclo reproductivo en *Ainigmaptilon antarcticum* puede durar por lo menos 18 meses. De manera similar se observó en otros octocorales (Orejas et al. 2007), moluscos (Seager 1979) y en la gran mayoría de los invertebrados bentónicos antárticos en los que la oogénesis lleva más de un año para completarse (Grange et al. 2011). Esta madurez temprana podría ayudar a explicar el éxito ecológico de *Malacobelemnion daytoni* en áreas con un elevado impacto del hielo como es Caleta Potter.

Tabla II 1: Características reproductivas de pennatuláceos de diferentes latitudes.

Fuente	Especie	Ubicación	Patron sexual	Oocitos maduros (FD., μm)	Desove	Nº de gametas	Tamaño máx. de la colonia (MS)(mm)	Profundidad (m)
Chia y Crawford (1973)	<i>Ptilosarcus guernei</i>	Alki Point, Seattle, USA (47° 34' N)	Gonocorica	500-600	Fin de marzo	200000 est ⁻¹	-	Submareal
Rice et al. (1992)	<i>Kophobelemnion stelliferum</i>	Porcupine Seabigh, SO Ireland (50° 01' N)	Gonocorica	800	Continuo	-	250	1150
Tyler et al. (1995)	<i>Umbellula lindahli</i>	Porcupine Seabigh, SO Ireland (50° 01' N)	Gonocorica	800	-	-	-	650 - 3850
Eckelbarger et al. (1998)	<i>Pennatula aculeata</i>	Golfo de Maine, USA (43° 25' N; 68° 47' W)	Gonocorica	880	Continuo	-	70	113 - 231
Tremblay et al. (2004)	<i>Renilla koellikeri</i>	S California, USA	Gonocorica		Mayo-Julio	-		Submareal
Soong (2005)	<i>Virgularia juncea</i>	Bahía Chitou, Taiwan (23° 38' N)	Gonocorica	200-300	Julio-Septiembre	Hasta 87000 ooc.col ⁻¹	700 (50)	0,5 - 1
Edwards y Moore (2008)	<i>Pennatula phosphorea</i>	Isla Lismore, Scotland (56°, 32' N)	Gonocorica	> 500	Julio- Agosto	Hasta 53534 ooc. col ⁻¹	120 (88)	18 - 19
Edwards y Moore (2009)	<i>Funiculina quarangularis</i>	Isla Lismore, Scotland (56°, 32' N)	Gonocorica	> 800	Octubre-Enero	500 - 2000 cm ⁻²	-	18, 9 - 24, 3
Pires et al. (2009)	<i>Anthoptilum murrayi</i>	SO Atlantic, Brazil (13° to 22° S)	Gonocorica	1200	Continuo	Hasta 27019 qs.col ⁻¹ Hasta 35918 ooc.col ⁻¹	580 (hembras) 640 (machos)	1300 - 1799
Lopes et al. (2012)	<i>Veretillum cynomorium</i>	Estuario Sado, Portugal	Gonocorica	967	Julio	Hasta 40 ooc.pol ⁻¹	-	13 - 91
Baillon et al. 2013	<i>Anthoptilum grandiflorum</i>	Atlántico noroccidental	Gonocorica	1100	Abril Julio*	6-31 ooc mad. pol ⁻¹ 18-70 qs mad. pol ⁻¹	(240)	>1000
Presente tesis	<i>Malacobelemnion daytoni</i>	Caleta Potter, Isla 25 de Mayo, Antártida (62°14' S)	Gonocorica	350	Verano	Hasta 745 ooc.col ⁻¹	110 (15)	10 - 30

MS: Longitud en la que se alcanza la madurez sexual; FD: diámetro de los oocitos (feret); ooc: oocitos; qs: quistes espermáticos; col: colonia; est. estación; pol: pólipo; mad: maduros * Dependiendo del sitio de muestreo

Sección B

Introducción

En Antártida, las comunidades bentónicas, están sujetas a diversas variables ambientales específicas, tales como: bajas y estables temperaturas; oscuridad o luz continua durante varios meses y a los pulsos de producción primaria estacionales (Pearce et al. 1991). Esta estacionalidad puede tener un efecto diferencial en las especies, dependiendo cuan dependientes sean éstas de dicho pulso. La biología, especialmente la reproducción y el crecimiento, de los consumidores primarios en Antártida, pueden estar acoplados a los periodos de producción primaria (Ahn et al. 2003; Kang et al. 2009), mientras que los grupos en los niveles más altos de la cadena alimenticia como: carnívoros, detritívoros, carroñeros, etc. pueden estar menos ligados a los periodos de producción estacional (Clarke 1996; Stanwell-Smith y Clarke 1998). Varios trabajos más actuales sugieren que la estrategia alimentaria tiene particular importancia en las características de los patrones reproductivos de los invertebrados marinos en la Antártida, ya que, son las especies con dietas oportunistas las que se encuentran desacopladas a las fluctuaciones de producción primaria, manifestando, por lo general, poca variación interanual (Chiantore et al. 2002; Grange et al. 2004; 2007; 2011). Un enfoque diferente para explicar los patrones mencionados en los ciclos reproductivos se basa en los modos de desarrollo y las necesidades energéticas de las larvas. Pearce et al. (1991) sugiere que los invertebrados con larvas planctotróficas tienen sus ciclos reproductivos principalmente asociados a los pulsos de producción primaria, mientras que en los organismos con larvas lecitotróficas esta asociación es menor.

En octocorales la gran variedad registrada hasta la fecha en cuanto a los patrones de reproducción, hace hincapié en la ausencia de cualquier tendencia latitudinal y batimétrica universal. Según Hellström et al. (2010) los datos aportados en el estudio de la especie *Sarcophyton elegans* se ajustan con los modos reproductivos observados en gorgonias, que tienden a mostrar que en aguas templadas, por lo general, la gametogénesis es continua, mientras que en latitudes tropicales, más a menudo, presentan periodos de desove estacionales cortos con fertilización externa (Kruger et al. 1998). Por otro lado, trabajos realizados en Antártida, en los que se ha observado una marcada estacionalidad, han demostrado que las estrategias coincidentes entre gorgonias de diferentes latitudes, están principalmente relacionadas con similitudes morfológicas más que con variables ambientales (Orejas et al. 2002; 2007).

El presente trabajo es la primera aproximación a estudiar el ciclo reproductivo en un pennatulaceo Antártico. En este grupo, como se discutió en la sección anterior, si bien podría haber características fijas al grupo, hay otras muy variadas en cuanto a los ciclos reproductivos (Tabla II 1).

Objetivos específicos

1. Estudiar la estacionalidad reproductiva de *Malacobelemnion daytoni*.
2. Observar el patrón de maduración en machos y hembras.
3. Evaluar si la estacionalidad reproductiva de la especie podría ayudar a explicar el éxito ecológico de la especie en la comunidad de Caleta Potter.

Materiales y métodos

La metodología empleada fue la misma ya descrita en la sección I del presente capítulo.

En la tabla II 2 se detalla el número de colonias muestreadas en cada mes con el correspondiente número de gametos analizados.

Tanto la espermatogénesis como la gametogénesis se consideraron de igual manera que en la sección ya mencionada, a su vez, se incluyeron en el presente análisis los oocitos maduros > 200 μm .

Tabla II 2: no. de colonias de machos y hembras estudiadas por mes en 2009 y 2010.

Mes	Nº colonias femeninas examinadas	Nº oocitos medidos	Nº colonias masculinas examinadas	Nº quistes medidos
2009				
Enero	6	440	3	78
Febrero	5	302	6	440
Marzo	10	712	10	850
Abril	4	146	2	192
Mayo	5	233	5	781
Junio	4	308	4	117
Julio	5	209	4	169
Agosto	5	334	Sd.	Sd.
Septiembre	3	93	5	101
Octubre	1	Sd.	2	199
Noviembre	5	211	3	169
Diciembre	11	442	6	424
Total	64	3430	50	3520
2010				
Enero	5	135	4	259
Febrero	2	59	7	572
Abril	2	168	3	427
Mayo	7	417	3	412
Julio	6	280	4	114
Agosto	4	265	3	125
Noviembre	4	103	1	67
Diciembre	6	469	2	108
Total	35	1896	27	2084

Sd: Sin dato.

Fecundidad

Para este cálculo se utilizó terminología adaptada de Mercier y Hamel (2011), utilizada en pennatulaceos por Baillon et al. (2013).

Se consideró el índice de fecundidad potencial (IFP), calculado como:

$$IFP = \frac{N^{\circ} \text{ oocitos totales}}{\text{Tamaño de las colonias}}$$

Y el índice de fecundidad, adaptado de Soong (2005), calculado al igual que en la sección anterior, pero aquí se denomina índice de fecundidad efectiva (IFE) para diferenciarlo del anterior. Calculado como:

$$IFE = \frac{N^{\circ} \text{ oocitos maduros}}{\text{Tamaño de las colonias}}$$

En ambos casos expresado como número de oocitos. mm^{-1} en cada colonia.

La fecundidad es calculada para hacer las comparaciones inter-anales (2009-2010) de manera estandarizada.

El IFE junto con la media del tamaño de los oocitos es lo que se consideró como *esfuerzo reproductivo* de cada año.

Análisis estadísticos

La prueba de normalidad se realizó mediante Shapiro-Wilks, y la homogeneidad de varianzas utilizando la prueba de Levene's. Cuando no se cumplieron los supuestos de ANOVA los datos se transformaron; por ejemplo, para comparar las diferencias entre los oocitos maduros (sólo aquellos con un diámetro $> 200 \mu\text{m}$), los datos fueron Log^2 transformados y posterior a la transformación se realizó un ANOVA con una prueba *a posteriori* de Bonferroni.

Cuando no se cumplieron los supuestos, incluso posterior a la transformación, se realizó la prueba de Mann-Whitney para la comparación entre los años 2009 y 2010.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando Infostat 2012, los datos son presentados en todos los casos como media \pm desvío estándar.

Un total de 223 colonias de *Malacobelemnion daytoni* fueron muestreadas entre 2009–2010, pero no todas fueron analizadas ya que muchos cortes histológicos no se encontraban en buenas condiciones para ser medidos (Tabla II 2). Por otro lado no en todas las colonias muestreadas se observaron células reproductivas, se encontraron cuatro colonias en febrero, una en abril y junio, dos en octubre y tres en noviembre 2009 sin oocitos o quistes espermáticos. Los tamaños de estas colonias fueron muy variados, lo que descarta el hecho de que aún no hayan alcanzado la madurez reproductiva. No fue posible precisar la razón de esta ausencia.

Sin embargo en todas las colonias examinadas con células reproductivas presentes, se encontraron oocitos en los tres estadios (I, II y III), pero no en todas ellas oocitos maduros > 200 μm .

Estacionalidad y liberación de gametos

La proporción de los tres estadios varió a lo largo de todo el periodo estudiado (Fig. II 7). En 2009 el menor número de oocitos maduros fue en febrero (9, 80 ± 7 , 90) y el más alto en marzo (37, 10 ± 5 , 59). Contrariamente a lo que se observó en los estadios I y II, en los que el número de oocitos fue mayor en febrero y junio (28, 80 ± 5 , 72 y 28, $75 \pm 7,52$, respectivamente, para el estado I y 27, 00 ± 6 , 44 y 32, 00 ± 7 , 20 para el estado II). En 2010 se encontró el mayor número de oocitos maduros en mayo y diciembre (22, 00 ± 5 , 02 y 22, 50 ± 5 , 42, respectivamente), aunque proporcionalmente en enero y febrero se observaron los mayores valores debido a que en estos meses se encontraron muy pocos oocitos en estado I y II (3, 80 ± 4 , 16 y 7, 80 ± 6 , 95, respectivamente en enero, y 6, 00 ± 7 , 29 y 10, 5 ± 10 , 98 respectivamente en febrero) (Fig. II 7).

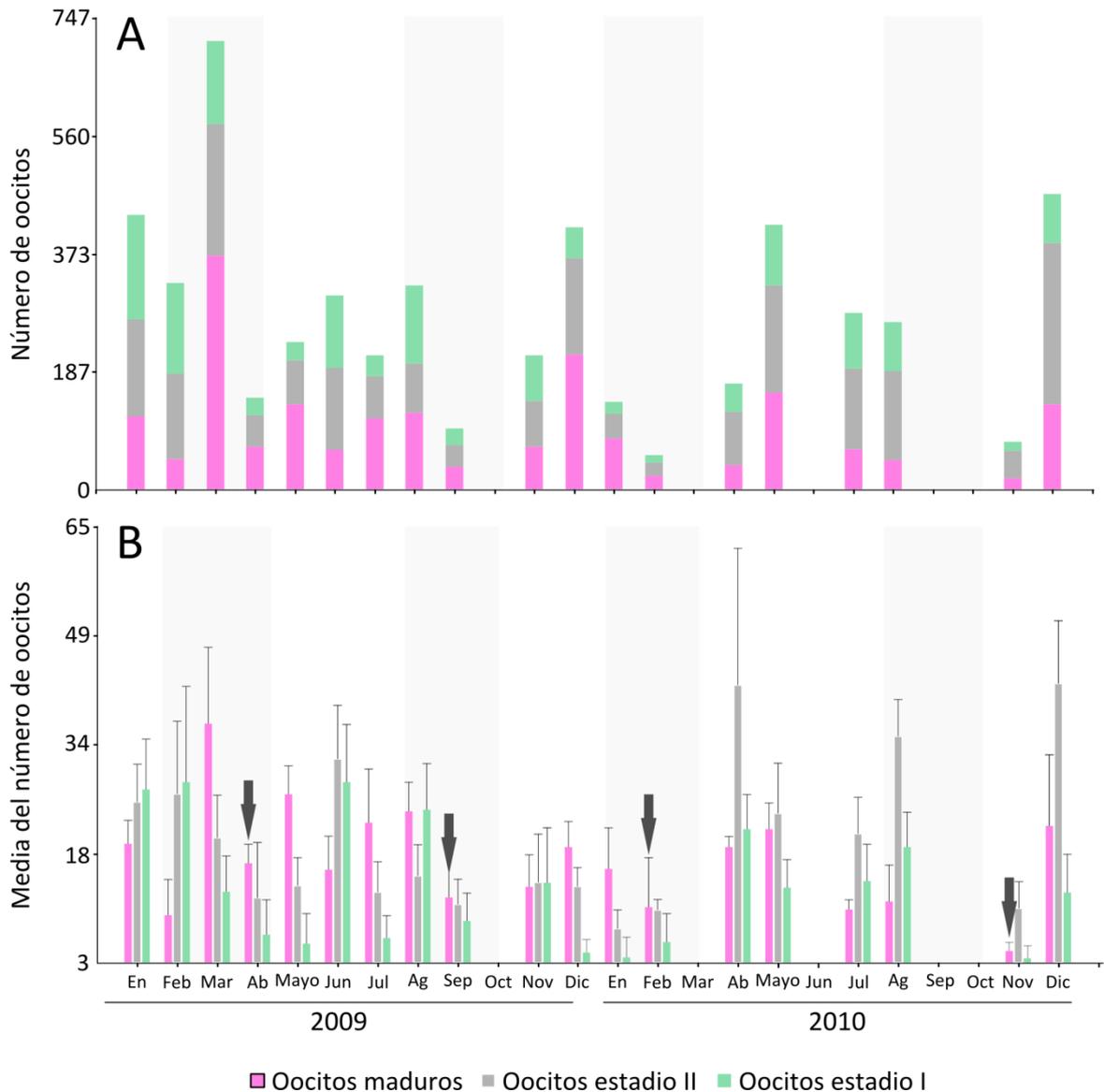


Figura II 7: Número de oocitos (A) y media del número de oocitos (B) de cada estadio desde enero 2009 hasta diciembre 2010. Las barras verticales indican error estándar.

En febrero, junio, agosto, septiembre de 2009 y agosto, noviembre y diciembre de 2010 se encontraron significativamente menos oocitos maduros $> 200 \mu\text{m}$, que en marzo de 2009, donde el número de oocitos maduros fue mayor (ANOVA; $F = 3, 33; p < 0, 01$). Este tamaño de oocitos maduros nunca fue registrado en febrero, junio, agosto, septiembre de 2009 y agosto de 2010 (Fig. II 8 y 9; Tabla II 3). En la Fig. 8 se observa además que la especie no presenta una distribución bimodal notoria en cuanto a la frecuencia del tamaño de los oocitos.

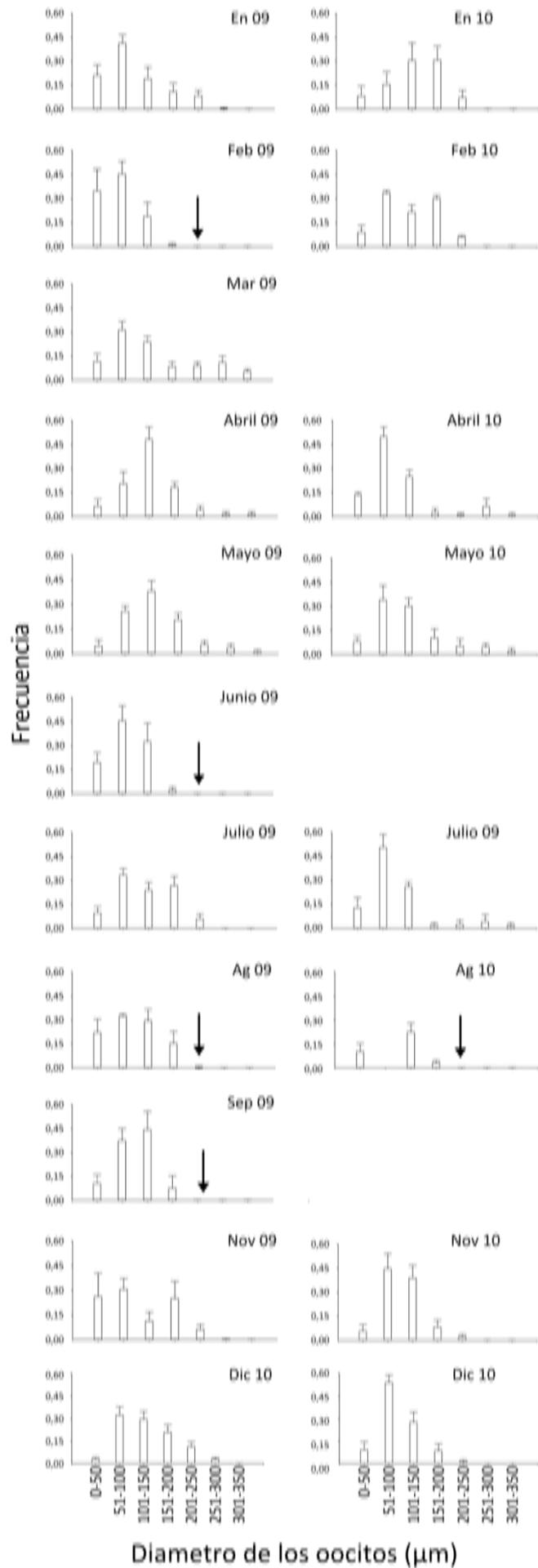


Figura II 8: Frecuencia relativa del tamaño de oocitos colectados entre enero 2009 y diciembre 2010. Flechas indican ausencia de oocitos maduros > 200 μm . Las barras verticales indican error estándar.

En la Fig. II 9 se observa un desove claro en marzo de 2009 (evidenciado por una significativa reducción en la media del número de oocitos maduros > 200 μm de 21, 33 \pm 6, 03 en marzo a 0 en junio). Los resultados representados en dicho grafico, junto con lo observado en la Fig. II 7, sugieren un segundo desove menos llamativo probablemente en los meses de primavera.

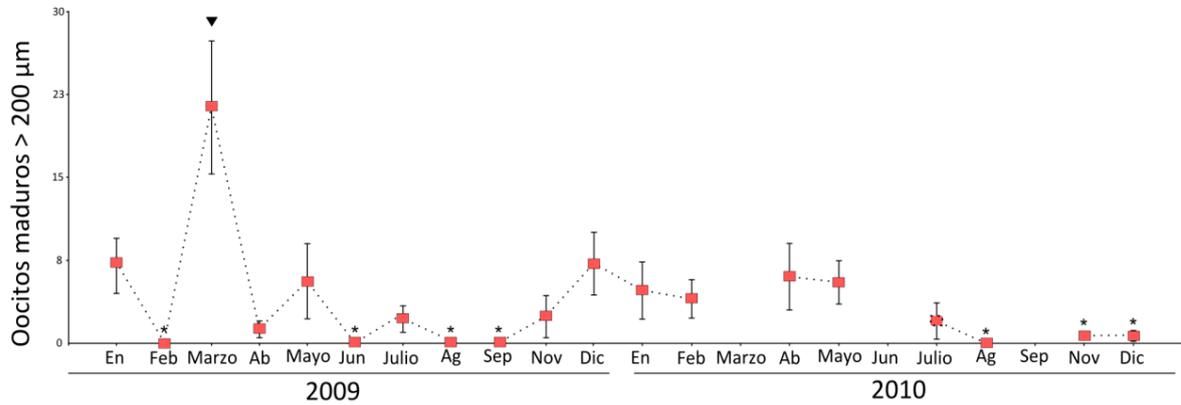


Figura II 9: Número de oocitos maduros > 200 μm entre enero 2009 y diciembre 2010. *Diferencia significativa ($p < 0, 05$) en los meses con menor número de oocitos maduros > 200 μm . Flecha: Diferencia significativa ($p < 0, 05$) de los meses con mayor número de oocitos maduros > 200 μm . Las barras verticales indican error estándar.

Tabla II 3: *Malacobelemnon daytoni*. A ANOVA comparación de número de oocitos maduros (> 200 μm) (Log^2 transformada) entre enero 2009 y diciembre 2010. B La prueba *a posteriori* Bonferroni fue utilizada para identificar los meses diferentes en la ANOVA.

A	gl	SC	CM	F	p
Mes	18	115, 70	6, 43	3, 33	0, 0001
Error	78	150, 67	1, 93		
Total	96	266, 37			

Prueba de Bonferroni		Grupo	
B		a	ab
2009			
	Febrero		Enero
	Junio		Abril
	Agosto		Mayo
	Septiembre		Julio
			Noviembre
			Diciembre
2010			
	Agosto		Enero
	Noviembre		Febrero
	Diciembre		Abril
			Mayo
			Julio

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0, 05$).

Variación inter-anual

El patrón de las variaciones en el tamaño medio mensual de los oocitos fue muy similar en los años estudiados, aunque con marcadas diferencias en los tamaños máximos alcanzados, que fueron mayores en el año 2009. (Fig. II 10).

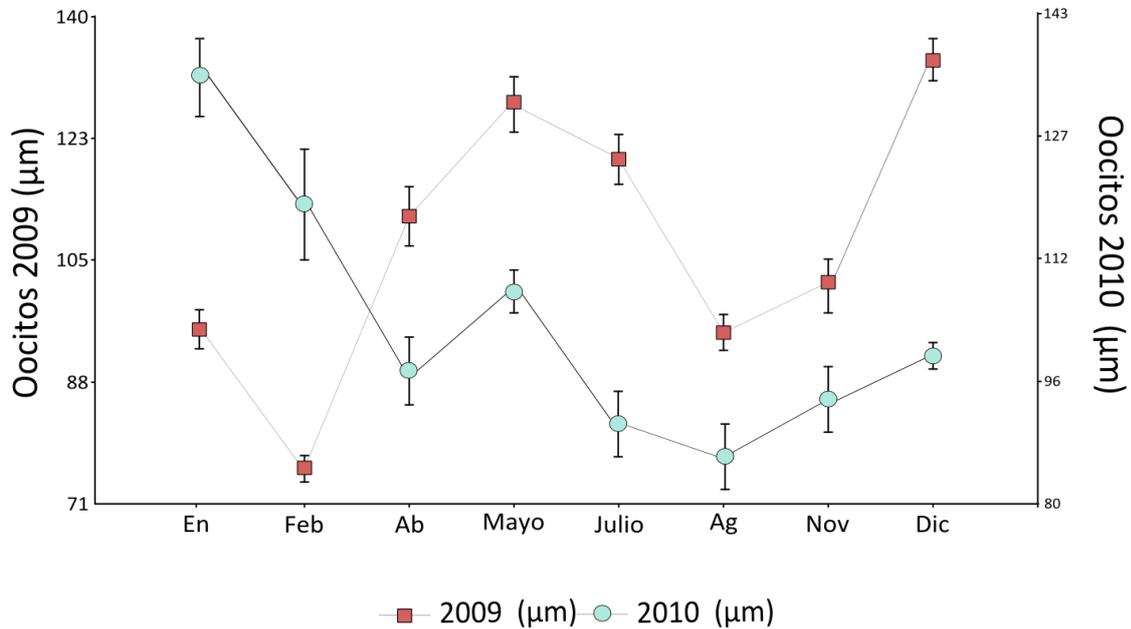


Figura II 10: Medias mensuales del tamaño de los oocitos (feret; μm) en 2009 y 2010.

El índice de fecundidad efectivo (IFE) y la media del tamaño los oocitos de cada uno de los años, fueron las únicas variables con diferencias significativas entre ambos años (Tabla II 4). En dicha tabla se detallan diversas variables comparadas entre los dos años de estudio.

Tabla II 4: A Comparación inter-anual de diferentes variables y B comparación del IFE estacionalmente de los dos años estudiados (2009-2010). La prueba Mann-Whitney fue utilizada.

A	Media \pm SD 2009	Media \pm SD 2010	W	P
Diámetro de los oocitos (μm)	113, 15 \pm 1, 07	100, 48 \pm 1, 38	4772010, 50	0, 0001 (S)
IFP	4, 08 \pm 2, 03	3, 98 \pm 2, 22	1764	0, 7934
IFE	0, 40 \pm 0, 2	0, 25 \pm 0, 15	1397	0, 003 (S)
Tamaño de los quistes (μm)	272, 36 \pm 116, 2	270 \pm 105, 0	5763368	0, 6218
Clorofila-a ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$)	0, 48 \pm 0, 47	0, 89 \pm 1, 55	5569	0, 5417
MPS ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$)	7, 46 \pm 8, 13	6, 25 \pm 5, 57	2260	0, 5574

B	IFE			
Primavera	0, 37 \pm 0, 19	0, 23 \pm 0, 15	87	0, 065
Verano	0, 41 \pm 0, 23	0, 36 \pm 0, 24	102	0, 958
Otoño	0, 45 \pm 0, 17	0, 27 \pm 0, 06	79	0, 101
Invierno	0, 36 \pm 0, 27	0, 17 \pm 0, 06	87	0, 065

\pm Desvío estándar; IFP: índice de fecundidad potencial; IFE: índice de fecundidad efectiva; W estadístico; S significancia ($p < 0, 05$).

Patrón de maduración inter-sexo

El patrón observado en cuanto al tamaño de los oocitos y de los quistes espermáticos, fue semejante a lo largo de los meses estudiados, con excepción de los meses de febrero 2009 y abril 2010 en los cuales se observó una disminución del tamaño de los oocitos mientras que el tamaño de los quistes espermáticos aumentó (Fig. II 11). En dicho grafico se observan además las fluctuaciones de clorofila-a y material particulado en suspensión (MPS) (Schloss et al. 2012) durante los mismos meses de estudio, en donde llaman la atención los picos de MPS en otoño e invierno además de los esperados en verano.

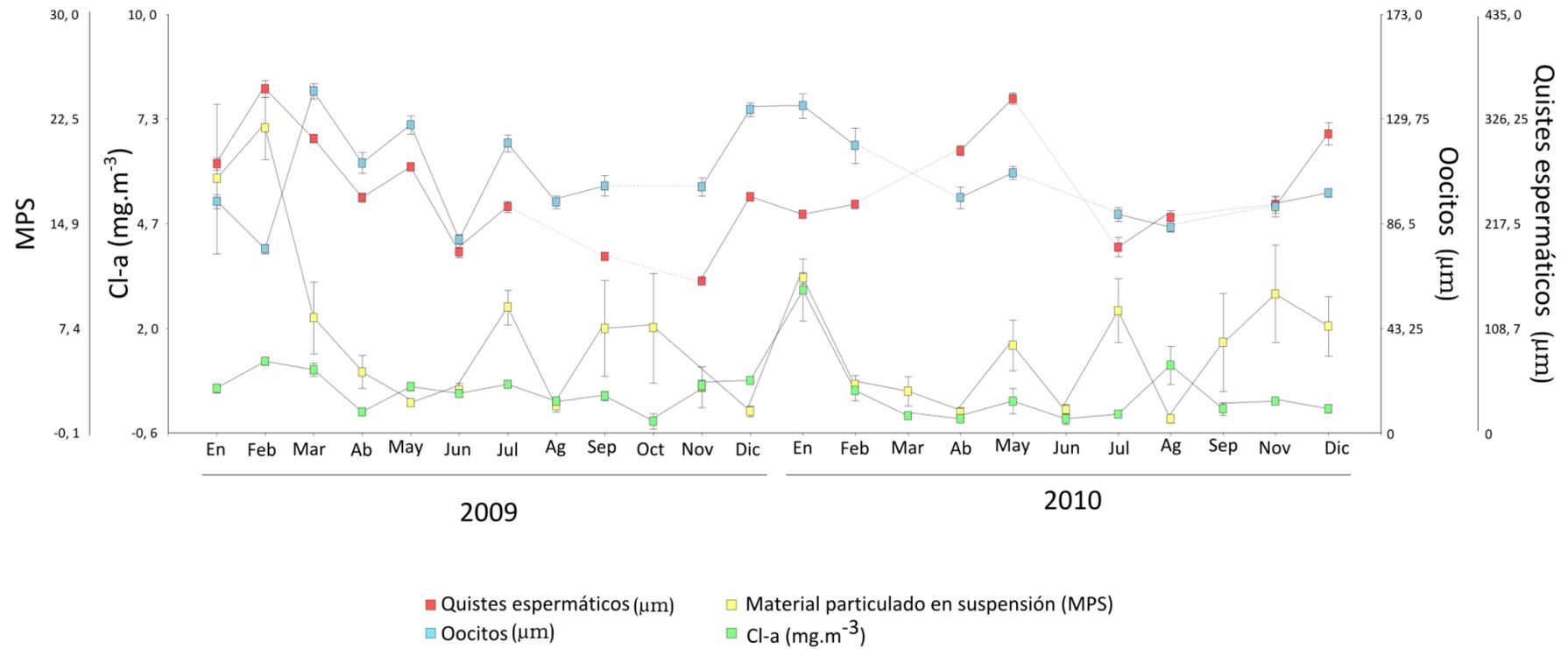


Figura II 11: Media del diámetro de los oocitos (feret; μm), de los tamaños de los quistes espermáticos (μm) y de las variables ambientales MPS y Clorofila-a (mg.m⁻³) (Schloss et al. 2012) por mes desde enero 2009 hasta diciembre 2010. Las barras verticales indican error estándar.

Sincronización entre colonias

En varias colonias de *Malacobelemnon daytoni* de marzo 2009 la distribución de frecuencia de los tamaños de oocitos fue bimodal (colonias 1, 4, 6 y 7). Distribuciones similares se encontraron en las colonias 1 y 2 de mayo 2009 y en las colonias 1, 2 y 3 de mayo 2010 (Fig. II 12). Se observó una primera clase de oocitos < 200 μm y una segunda en la que los oocitos se encontraban en su mayoría en la última etapa de desarrollo (> 200 μm). Mientras que, en varias colonias de marzo 2009 (2, 3, 5 y 9) y mayo de 2009 – 2010 (4 y 5 de cada mes) se exhibió una distribución sesgada hacia la derecha, como si se hubiera producido el desove. Además, hubo una ligera presencia de un tercer pico, de alrededor de 200 μm en algunos individuos (Fig. II 12).

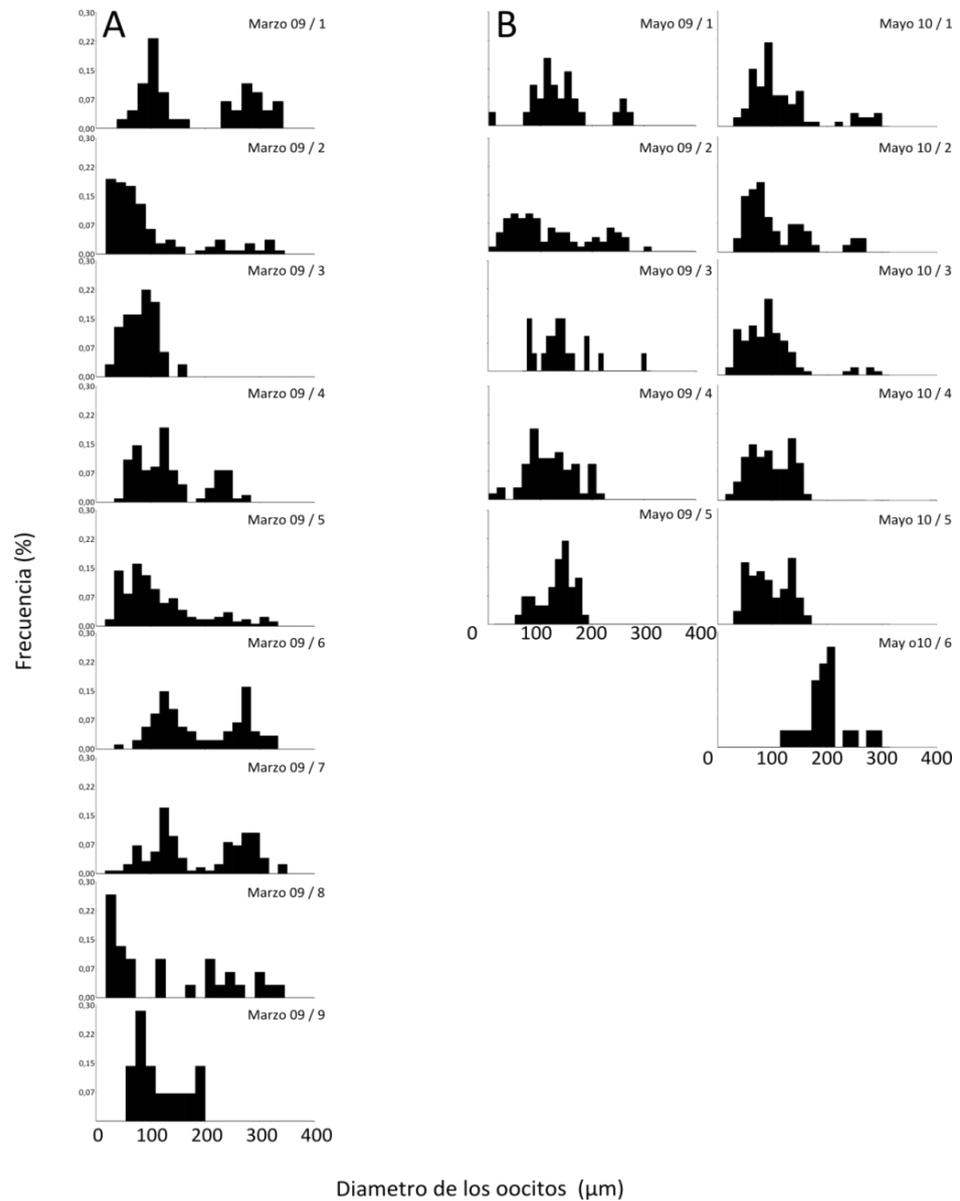


Figura II 12: Frecuencia en el tamaño de los oocitos de colonias individuales colectadas en: A marzo 2009 y B mayo 2009 y 2010. (Mes, año / número de colonia).

En el presente trabajo se ha estudiado la estacionalidad reproductiva a lo largo de dos años en *Malacobelemnion daytoni* permitiendo además tener una comparación interanual en Caleta Potter siendo la primera evaluación de dicho patrón en pennatuláceos polares.

Estacionalidad y liberación de gametos

Varios autores sugieren que los factores ambientales influyen significativamente en la gametogénesis y en los periodos de desove en varios invertebrados marinos, incluyendo los corales. En zonas tropicales y templadas, la actividad reproductiva en octocorales se ha correlacionado con la temperatura, los ciclos lunares y la disponibilidad de recursos (Gori et al. 2007; Hwang y Song 2007; Ribes et al. 2007), mientras que en Antártida se ha asociado a los pulsos de producción primaria (Orejas et al. 2007). Las estrategias reproductivas encontradas en este grupo han sido muy variadas, desde especies con fecundación externa a incubadoras, gonocorismo y hemafroditismo, con ciclos estacionales y continuos, etc. (Orejas et al. 2002; 2007; Gori et al. 2007; Mercier y Hamel 2011). En el orden Pennatulacea las estrategias en cuanto a la gametogénesis, periodos de desove y ciclos reproductivos (estacionales o continuos) se ha observado también que son muy variadas (Tabla II 1) (Rice et al. 1992; Eckelbarger et al. 1998; Edwards y Moore 2008; 2009; Pires et al. 2009; Lopes et al. 2012; Baillon et al. 2013).

En *Malacobelemnion daytoni* se observó la presencia de oocitos en los tres estadios durante todos los meses estudiados con una marcada estacionalidad en los oocitos maduros > 200 μm . Esto sugiere, como se observó en otros pennatuláceos, la mantención de un elevado pool de oocitos hasta determinado tamaño, y, frente a determinadas señales, completan la maduración necesaria y desovan de manera sincronizada (Edwards y Moore 2008; 2009). El presente trabajo sugiere que estos desoves podrían ocurrir más de una vez al año (con uno bien marcado a finales de verano) probablemente más asociado al material particulado en suspensión (MPS) que a las fluctuaciones de producción primaria (clorofila-a) (Fig. II 11). Este MPS observado en los meses de otoño e invierno se debe, principalmente, a eventos de resuspensión del fondo y no al material sedimentado por el derretimiento del glaciar (el cual ocurre principalmente en verano y está compuesto por material inorgánico casi en su totalidad). Al ocurrir estos eventos de resuspensión se ponen a disposición de los organismos bentónicos el material orgánico (detritos y microfitobentos) que allí se encuentra.

Un reciente trabajo realizado por Isla et al. (2011) registró elevadas concentraciones de lípidos y proteínas en el sedimento a comienzos del otoño, lo que representa altos valores nutritivos en este periodo para organismos bentónicos. Esto sugiere que la estacionalidad en la disponibilidad de alimento para organismos bentónicos que se alimentan de partículas < 200 µm no sería tan dependiente de los pulsos de producción primaria. Además, un reciente trabajo realizado por Elias-Piera et al. (2013) plantea que numerosas especies de gorgonias se alimentan de material sedimentado y en resuspensión, lo que refuerza la hipótesis de que algunos suspensívoros bentónicos afrontan el invierno Antártico gracias al consumo del fitodetrito como así también del microfitobentos (diatomeas bentónicas).

Por otro lado, en trabajos realizados en especies carroñeras (estrellas) se ha asociado el impacto del hielo con el asentamiento de larvas de dichos asteroideos lo que se debería al material muerto y detritos ocasionado y puesto a disposición de estos asteroideos por efecto del hielo (Bowden 2005; Smale et al. 2007). Los carroñeros explotan recursos puestos a disposición por la perturbación de hielo, principalmente presas muertas, lo que aumenta así, los niveles de los alimentos y el beneficio del asentamiento larval de especies carroñeras.

La oogenesis en *Malacobelemnion daytoni* se sugiere que es menor a 12 meses (Servetto et al. 2013), debido a que no se observó una distribución bimodal notoria en la frecuencia relativa del tamaño de oocitos (Fig. II 8). La hipótesis de una oogenesis menor a 12 meses en *Malacobelemnion daytoni* se ve reforzada por un lado por Fadlallah y Pearse (1982), quienes sugieren que para la producción de grandes oocitos en corales es necesario una prolongada gametogénesis, y por otro lado por Benayahu y Loya (1986) quienes sugieren que especies con una extensa gametogénesis se caracterizan por una elevada fecundidad, lo cual, como se discutió en la sección anterior, no es un patrón característico en la especie de interés (Tabla II 1). Esto es sorprendente ya que la oogénesis en especies polares es, por lo general, superior a 12 meses, por ejemplo la estrella de mar Antártica *Odontaster validus*, la ofiura *Ophionotus victoriae* y la gorgonia *Anigmaptillion antarticum* tienen periodos de gametogénesis de 18 a 24 meses, en estos casos se observan dos cohortes de oocitos bien marcadas de manera simultánea (Orejas et al. 2002; Grange et al. 2007; 2011). Una estrategia diferente en organismos Antárticos es el almacenamiento de energía en algún órgano específico durante el periodo de disponibilidad de alimentos. Este es el caso de algunos asteroideos como *Odontaster validus*, que almacena energía en el apéndice pilórico que puede ser asignado, posteriormente, a la reproducción (Pearse 1965; Grange et al. 2007) pero que no se observa en *Malacobelemnion daytoni*.

Variación inter-anual

Se observó muy poca variación en cuanto al patrón mensual de variación en los tamaños de los oocitos en los dos años estudiados (2009 – 2010) aunque el tamaño registrado fue consistentemente mayor en 2009 (Fig. II 10), lo que sugiere que el momento en el que ocurre el desove no sería tan diferente de un año al siguiente. Esto podría estar asociado a una dieta omnívora/opportunista de la especie desacoplada de los pulsos de producción primaria (capítulo III). Chiantore et al. (2002) describen la ecología reproductiva en la Bahía Terra Nova de dos omnívoros/opportunistas, la estrella *Odontaster validus* y el erizo *Sterechinus neumayeri* durante dos veranos consecutivos y comparan el grado de variación inter-anual observado en estos con el de un suspensívoro, la vieira *Adamussium colbecki*. En este último se encontraron marcadas diferencias inter-anales entre los años estudiados, mientras que no se observaron dichas diferencias ni en la estrella de mar ni en el erizo. Estos patrones fueron atribuidos a la conducta de alimentación oportunista de ambos equinodermos, desacoplados de los pulsos de producción primaria. De manera similar se observó por Grange et al. (2011), en donde se muestra la ausencia de variación inter-anual en las observaciones de varios años en el ciclo reproductivo del nemertino Antártico *Parborlasia corrugatus* a diferencia de lo observado en especies en niveles tróficos inferiores. Estas observaciones ponen de relieve la potencial importancia del nivel trófico en las historias de vida en invertebrados polares.

En cuanto al esfuerzo reproductivo, representado por el tamaño de los oocitos y el índice de fecundidad efectivo (IFE), fue mayor en el 2009, lo que nos sugiere que la disponibilidad energética no fue la misma en cada uno de los años estudiados. En el mismo año (2009) se observó además, una mayor concentración de MPS y una menor concentración de clorofila-a aunque las diferencias no fueron significativas. Esto refuerza la hipótesis de que la estrategia reproductiva de *Malacobelemnion daytoni*, estaría más asociada a los eventos de resuspensión y a fuentes de energía diferentes a las aportadas por la producción primaria pelágica local (Tabla II 3).

Patrón de maduración inter-sexo

En los invertebrados marinos sésiles de fecundación externa la sincronización entre machos y hembras es un factor clave para garantizar el éxito reproductivo, lo cual no parece ser un problema en organismos móviles. Langton et al. (1990) sugirieron que los organismos sésiles y dioicos requieren de una elevada densidad poblacional y una marcada sincronización entre los sexos para asegurar la fertilización, aunque esto varía ampliamente entre los diferentes grupos.

Por lo contrario, puede ser no tan importante en especies de fecundación interna ya que los gametos femeninos son retenidos en el interior hasta que se produce la fertilización.

En el presente estudio se ha observado no solo sincronización en la liberación de las células reproductivas en machos y hembras lo cual es esperable ya que la dilución gamética sería un serio problema para el mantenimiento de la población, sino además que ambos sexos muestran un patrón similar en cuanto al uso de energía disponible para la especie. Esto se ve reflejado en la Fig. II 11, en donde ambas células reproductivas aumentan su tamaño de manera sincrónica con aumentos en el MPS. Esta estrategia le permitiría a la especie, aunque no siempre este aumento finalice en desove, aprovechar el material detrítico depositado en el fondo, y proveer de energía a las células reproductivas a lo largo de todo el año, reduciendo así la marcada estacionalidad energética descrita para el bentos Antártico (Gili et al. 2006). La sincronización entre machos y hembras ha sido ampliamente reportada en los invertebrados marinos en Antártida, incluyendo varias poblaciones cercanas a Bahía Margarita y otras especies con ubicación circumantártica; estos incluyen *Ophionotus victoriae*, *Parborlasia corrugatus*, *Odontaster validus* y *Adamussium colbecki* (Pearse et al. 1991; Tyler et al. 2003; Grange et al. 2004; 2007; 2011).

Comparación con otros pennatulaceos

El diámetro mayor encontrado en oocitos maduros de *Malacobelemnion daytoni* (350 μm) fue muy inferior en comparación con otros pennatulaceos en los que los oocitos alcanzan tamaños mucho mayores: 500 μm en *Pennatula phosphorea*, 600 μm en *Ptilosarcus guerneyi*; 800 μm en *Kophobelemnion stelliferum*, *Pennatula aculeata* y *Funiculina quadrangularis* y hasta 1100 μm en *Anthoptilum grandiflorum* (Rice et al. 1992; Eckelbarger et al. 1998; Edwards y Moore 2008; 2009; Baillon et al. 2013). En todos ellos la duración de la oogénesis es superior a 12 meses, lo que refuerza la hipótesis, como se mencionó anteriormente, de una gametogénesis menor a un año. Esto podría facilitar el hecho de que *Malacobelemnion daytoni* alcanza la madurez sexual a 15 mm de longitud de la colonia (Servetto et al. 2013), mientras que el tamaño mínimo de madurez en otros pennatulaceos es mucho mayor (Tabla II 1). Esta estrategia de alcanzar la madurez sexual tan rápidamente, podría favorecer el éxito de *Malacobelemnion daytoni* en Caleta Potter, ya que en muchos invertebrados marinos, incluyendo corales, la reproducción se retrasa hasta que se alcanza un cierto tamaño (Beiring y Lasker 2000), probablemente, indicativo de un cambio en la asignación de los recursos energéticos del crecimiento a la reproducción.

Como ya se mencionó en el presente estudio se propone que la oogénesis en *Malacobelemnion daytoni* se caracteriza por el mantenimiento de oocitos en los tres estadios

durante todo el año, de los cuales una pequeña proporción finaliza la maduración y son liberados de manera sincronizada. Esto coincide con lo que se observó en especies de pennatuláceos que habitan aguas poco profundas como: *Funiculina quadrangularis* (18, 9 a 24, 3 m de profundidad), *Pennatula phosphorea* (18, 2 a 19, 9 m) y *Veretillum cynomorium* (13 a 91 m) (Edwards y Moore 2008; 2009; Lopes et al. 2012). Con respecto a las señales de la liberación de gametos Edwards y Moore (2008) sugieren que el desove en *Pennatula phosphorea* se da en verano debido a un aumento en la temperatura y en la disponibilidad de alimento, mientras que un trabajo realizado posteriormente por los mismos autores, observaron que el desove en el pennatuláceo *Funiculina quadrangularis* ocurre en invierno, sin estar del todo claras las señales de que esto depende (Edwards y Moore 2009). Por el contrario, numerosos autores observaron ciclos continuos en varias especies de pennatuláceos de aguas profundas, asociados a la gran estabilidad de estos ambientes, sugiriendo sin que sean conocidas señales específicas que determinen el desove (Rice et al. 1992; Eckelbarger et al. 1998; Pires et al. 2009). A excepción de lo que encontraron Baillon et al. (2013) en el pennatuláceo de aguas profundas *Anthoptilum grandiflorum*, con un desove estacional que coincidió con la máxima deposición de detritos posteriores a las floraciones de fitoplancton.

En el presente trabajo se sugiere que no hay un único evento de desove anual en *Malacobelemnion daytoni*, los que podrían estar asociados a los pulsos de energía generados a partir de los detritos puestos a disposición en los eventos de resuspensión, los que se ha observado ocurren más de una vez al año (Fig. II 11). Esta estrategia, además de la temprana madurez de esta especie discutida en el capítulo anterior, ayuda a comprender desde la estrategia reproductiva, el éxito que esta especie tiene en Caleta Potter.

CAPITULO III

ECOLOGÍA TROFICA Y VARIACIÓN
BIOQUÍMICAS TEMPORAL



Los estudios de ecología trófica extendidos en el tiempo son difíciles de realizar, especialmente en zonas polares donde los muestreos se ven limitados en los meses de primavera y verano. Uno de los pocos estudios realizados en organismos bentónicos Antárticos a largo plazo, es el trabajo de Barnes y Clarke (1995); estos autores analizaron los periodos de alimentación de las cuatro especies más representativas en Isla Signy (holoturias, poliquetos, hidrozoos y briozoos) durante dos años consecutivos. Estos autores observaron una actividad estacional de la eficiencia en la alimentación en dichos suspensívoros. Esta eficiencia varía frente a determinadas señales (dependiendo de cada taxón) como pueden ser el cambio en el fotoperiodo o las corrientes generadas por el hielo.

En cnidarios de aguas polares pocos son los estudios centrados en las estrategias alimentarias (Antártida: Gili et al. 2006; Orejas et al. 2001; 2003; Ártico: Orejas et al. 2013). La mayoría de estos se basan en los análisis de contenidos intestinales (Antártida: Orejas et al. 2001; Ártico: Orejas et al. 2013) y en estudios de tasas de alimentación en condiciones experimentales controladas, en todos los casos considerando solo los meses de verano (Orejas et al. 2001; 2003), pero nada se conoce sobre la capacidad de los cnidarios bentónicos antárticos para hacer frente a las limitaciones de alimentación en las temporadas de otoño e invierno. Por otro lado, con respecto a las fuentes de alimentación, trabajos más recientes como los de Isla et al. (2006; 2011) sugieren que la variación en la composición de materia orgánica en el sedimento no es estacional, con una elevada calidad nutritiva durante todo el año (principalmente en otoño), sobre todo en la fracción disponible para organismos suspensívoros.

Bioquímica

A pesar de las obvias diferencias en las estrategias de vida y en la apariencia macroscópica, los organismos presentan una gran similitud a nivel molecular. Las estructuras y las actividades de todas las células se basan en un grupo común de moléculas entre las que se incluyen los nucleótidos, lípidos, carbohidratos (sacáridos) y proteínas.

Las *proteínas*, formadas por cadenas de aminoácidos, se presentan en una gran variedad de formas y funciones. Los *carbohidratos*, si bien también presentan una gran variedad de funciones, se encargan principalmente de proveerle energía al organismo. Los *lípidos*, cuarto grupo principal de las moléculas presentes en todas las células, son una categoría general de sustancias similares únicamente por ser en gran medida hidrófobas y solo escasamente solubles en agua. En general,

llevan a cabo tres funciones biológicas: bajo la forma de bicapas lipídicas son componentes esenciales de las membranas biológicas, están involucrados en varios acontecimientos de señalización intracelular e intercelular, sin embargo, la función principal de los lípidos se basa en su alta y eficiente capacidad de almacenar energía. Los depósitos de lípidos pueden ser utilizados, principalmente en los ambientes polares, durante el invierno y/o proveer reservas de energía durante la reproducción. Dicho almacenamiento, desempeña un papel crucial en el ciclo de vida de muchos taxa, por ejemplo del mesozooplankton en los mares polares. Estos lípidos se caracterizan por un contenido muy alto de energía (39 en comparación con el 17-18 KJ.g⁻¹ para las proteínas e hidratos de carbono), haciendo de estos grupos una fuente rica de alimento para los niveles tróficos superiores (Lee et al. 2006).

El balance bioquímico de lípidos, proteínas y carbohidratos es uno de los mejores enfoques utilizados para demostrar periodos de abundancia o ausencia de alimento, ya que muchos organismos, comúnmente, usan la energía almacenada en periodos de escasez. Esto sugiere que el balance bioquímico podría ser una buena herramienta para investigar sobre la relación que existe entre las fluctuaciones en la disponibilidad de alimento y el ingreso de energía en los organismos bentónicos (Ben-David-Zaslow et al. 1999; McClintock et al. 2004; Rossi et al. 2006; Rossi y Tsounis 2007).

Diversos trabajos sugieren que la variación en la composición bioquímica en los tejidos de los organismos podría estar asociada a las fluctuaciones registradas en la columna de agua (Rossi et al. 2003; 2006; Rossi y Gili 2005). A pesar de ser dichas fluctuaciones más marcadas en zonas polares que en zonas templadas y tropicales este es uno de los primeros registros en el estudio del balance bioquímico en un suspensívoro Antártico a lo largo de todo un año. Estudios similares se han llevado a cabo principalmente en los octocorales de zonas templadas como *Paramuricea clavata*; *Corallium rubrum* y *Eunicella singularis* (mar Mediterraneo) (Rossi et al. 2006; Rossi y Tsounis 2007) en las que se ha relacionado a su vez dicho balance con las estrategias reproductivas (Gori et al. 2007).

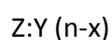
Ácidos Grasos

Los Ácidos Grasos (AG) son los principales constituyentes de los lípidos en los organismos (Dalsgaard et al. 2003). Los corales obtienen sus AG a través de biosíntesis endógena o a través de su alimentación heterótrofa, pudiéndose mantener casi sin alteraciones o pudiendo sufrir modificaciones identificables. De esta manera proveen información acerca de las interacciones tróficas que ocurren, a través del análisis de los AG incorporados con la dieta. Por otra parte los

AG sintetizados por los propios organismos son muy utilizados como una herramienta complementaria en el estudio taxonómico de corales (Imbs et al. 2007a; 2009; Imbs y Dautova 2008).

La mayoría de los estudios centrados en la composición de AG de corales se han realizado en hexacorales (Al-Moghrabi et al. 1995; Al-Lihaibiet al. 1998; Yamashiro et al. 1999; Imbs et al. 2007a; 2013; Treignier et al. 2008), siendo escasos los estudios realizados en corales blandos principalmente en gorgonias (Carballeira et al. 1996; 1997; 2002; Imbs et al. 2007b; 2009; 2010) y muy pocos en pennatulaceos (Pernet et al 2002; Baptista et al. 2012). El presente es el primer estudio de la composición de AG realizado de manera estacional en un pennatulaceo Antártico.

Todos los AG presentan una cadena hidrocarbonada de longitud variable y un grupo carboxilo terminal. Dependiendo de si tiene enlaces simples o dobles se los clasifica como ácidos grasos saturados (AGS) o insaturados (AGI) respectivamente (Christie 1973). Los AG serán nombrados usando la anotación breve IUPAC-IUB (Commission on Biochemical Nomenclature, 1967, 1977):



Donde:

Z: número de átomos de carbono.

Y: número de dobles enlaces.

n-x: define la posición del primer doble enlace (Fig. III 1)

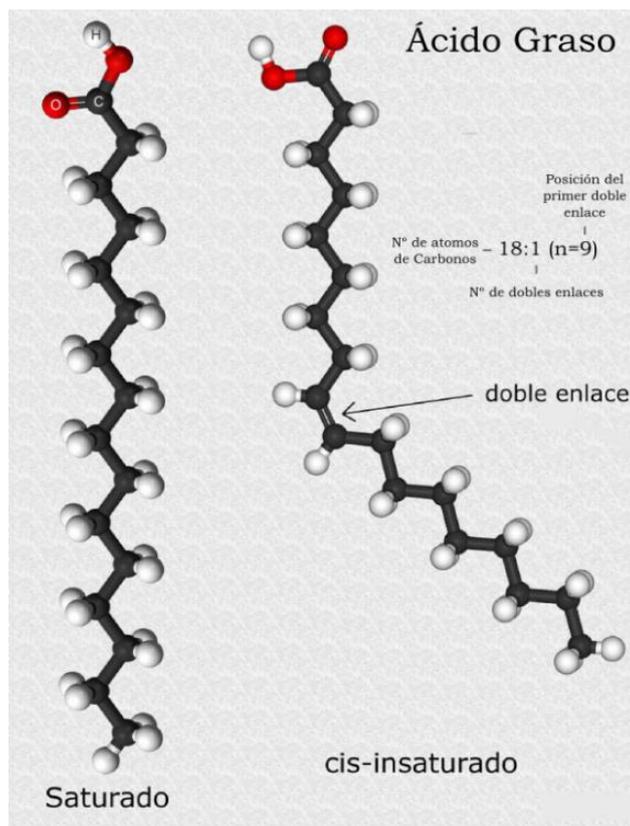


Figura III 1: Esquema de un ácido graso saturado y uno insaturado con la explicación de la nomenclatura utilizada.

Isótopos estables

Si bien el estudio de AG como biomarcadores está siendo intensivamente incorporado en estudios ecológicos debido a la confiabilidad de sus datos, su uso en conjunto con otros marcadores no lipídicos tales como los isótopos estables amplía, en gran medida, su capacidad biomarcadora y, por ende, la validez de los resultados obtenidos, ya que esta composición isotópica se encuentra muy relacionada con su dieta.

Al completarse el procesamiento metabólico de la materia orgánica ingerida se produce el fraccionamiento isotópico de ^{13}C : ^{12}C y ^{15}N : ^{14}N . De esta manera el $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ representan la distancia entre un organismo y el correspondiente origen de la cadena trófica (Jacob et al. 2005). Si bien depende del tejido que haya sido muestreado, en los consumidores marinos, se considera la existencia de un enriquecimiento de entre aproximadamente 0,5 y 1‰ en el isótopo ^{13}C y de un 3 ó 4‰ en el ^{15}N entre niveles tróficos (deNiro y Epstein 1978; Minagawa y Wada 1984; Peterson y Fry 1987; Michener y Schell 1994; Kaehler et al. 2000).

Los análisis de la composición de isótopos estables es adecuado para acercarse a dilucidar el nivel trófico de un organismo ya que, ofrece información precisa sobre las características del

alimento asimilado (Iken et al. 2001; Jacob et al. 2005; Carlier et al. 2007; Mintenbeck et al. 2008; Mincks et al. 2008). Esta información puede complementarse no solo con los análisis de AG sino también con el análisis del equilibrio bioquímico (los niveles de proteína-carbohidrato-lípidos). La combinación de dichos métodos nos permite entender cómo diferentes organismos invierten su energía en función al alimento disponible de cada estación y sus estrategias reproductivas (Rossi et al. 2006, Gori et al. 2007; 2012; Rossi y Tsounis 2007).

Los estudios de las relaciones tróficas mediante el empleo de técnicas de isótopos estables ha sido utilizado en numerosos trabajos de diferentes grupos (Hirons et al. 2001; Iken et al. 2001; Polunin et al. 2001; Schmidt et al. 2004; Jacob et a. 2005). Sin embargo, pocos son los estudios que se han llevado a cabo en comunidades bentónicas Antárticas (Dunton 2001; Nyseen et al. 2002; Mincks et al. 2008) y aún en menor número en octocorales (Elias-Piera et at. 2013).

Objetivos específicos

1. Analizar las variaciones estacionales en el balance bioquímico (lípidos, proteínas y carbohidratos) de *Malacobelemnion daytoni*, que podrían estar relacionadas con variaciones ambientales.
2. Identificar y cuantificar temporalmente los principales Ácidos Grasos presentes en *Malacobelemnion daytoni*.
3. Validar los resultados obtenidos por medio de los ácidos grasos con el análisis de los isótopos estables de C y N y compararlo con otros organismos.

Materiales y Métodos

Todos los análisis que se describen a continuación fueron desarrollados en el Instituto de Ciencias del Mar, Barcelona.

Bioquímica

Para la determinación del contenido de materia orgánica (Mo) las muestras se secaron en estufa a 60° C hasta obtener un peso constante ($PS_{inicial}$) (unas 24 hs), luego se pesaron y muflaron a 500° C durante 4 horas para obtener el peso de cenizas (PS_{ceniza}). El contenido de Mo se expresa como:

$$\% Mo = \frac{PS_{inicial} - PS_{ceniza}}{PS_{inicial}} \times 100$$

A todas las colonias se les midió previamente la longitud total de la varilla mediante un calibre (mm).

Las muestras para las determinaciones de lípidos, proteínas y carbohidratos se obtuvieron mediante buceo autónomo, 10 colonias por mes desde abril a diciembre del año 2009 y los meses de enero, febrero de 2010. Inmediatamente posterior a la extracción, las muestras se congelaron a -80°C hasta su análisis. Los resultados son presentados como μg de lípidos, proteínas y carbohidratos por mg Mo. Todos los análisis se llevaron a cabo por espectrofotometría (método colorimétrico).

Previo a los análisis las muestras se liofilizaron. Para proteínas se separó aproximadamente 5-15 mg de tejido por colonia, y se cuantificaron usando el método de Lowry et al. (1951) usando albumina como estándar. Para carbohidratos se obtuvieron de 5-15 mg de peso seco y se usó el método de Dubois et al. (1956), con glucosa como estándar. Para lípidos se usaron de 5-10 mg de tejido seco y se cuantificaron con el método de Barnes y Blastock (1973), con colesterol como estándar.

Ácidos grasos

Para la medición de AG las muestras son las mismas que las utilizadas en el estudio de la

bioquímica. Este estudio se realizó en los meses de febrero, mayo, agosto y noviembre de 2009 (n=6). Los análisis se llevaron a cabo mediante un cromatógrafo ThermoGC equipado con una columna AgilentDB-5 (longitud de 30 m, 0,25 mm de diámetro interior y espesor de fase de 0,25 μm). Se utilizó helio como gas portador a un flujo constante de 33 $\text{cm}^3\text{min}^{-1}$. Para la fracción de AG la temperatura se programó para aumentar de 50°C a 320°C a 10°C min^{-1} , y se mantuvo a 320°C durante 17 minutos. El inyector y el detector de temperaturas se mantuvieron constantes a lo largo del análisis a 300°C y 320°C, respectivamente. Los esteres metílicos de AG (FAME) se identificaron mediante la comparación de sus tiempos de retención con los de un patrón externo (Supelco® MixC4-C24). La reproducibilidad del procedimiento se evaluó mediante la inyección del blanco y el estándar interno a diferentes concentraciones. En la Fig. III 2 se observan los picos (áreas), de una muestra, los cuales, una vez realizadas las integraciones correspondientes, permiten determinar la concentración de cada AG en dicha muestra.

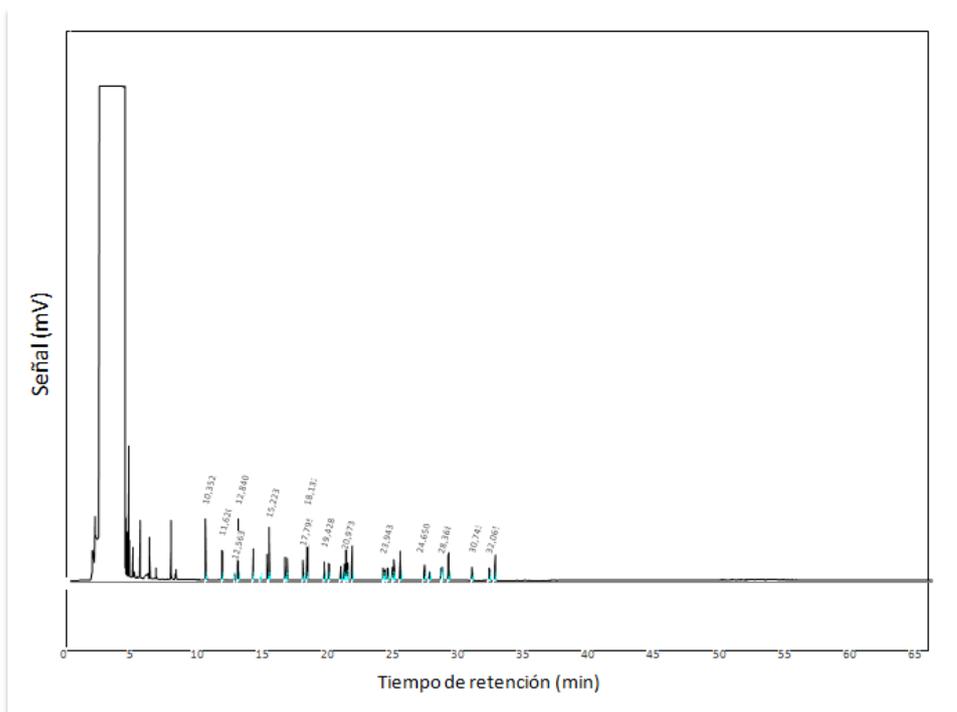


Figura III 2: Ejemplo de un cromatograma obtenido a partir de una extracción de AG.

En las tablas III 1 se detallan los AGs más abundante y las proporciones más utilizadas para su análisis y en la tabla III 2 algunas de las proporciones más utilizadas como indicadores en las relaciones de redes tróficas.

Tabla III 1: Ácidos grasos más usados como indicadores de redes tróficas (Fuentes 2006).

Ácido Graso	Indicador de:
C15:0	Actividad bacteriana
C17:0	Actividad bacteriana
C16:1 (n-7)	Indicador de diatomeas
C18:1 (n-9)	Es el AG más importante en los animales marinos, indicador de carnivoría
C18:1 (n-7)	Indicador de diatomeas en la dieta de consumidores (Falk-Petersen et al. 1990; 1999)
C20:1 (n-9)	Dieta carnívora y predatora Presencia de copépodos presentes en la dieta (Kattner y Hagen 1995)
C22:1 (n-9)	Presencia de zooplancton en la dieta (Dalsgaard et al. 2003)
C18:2 (n-6)	Zooplancton
C20:3	Microalgas
C20:4 (n-6)	Macroalgas y sus detritos
C20:5 (n-3)	Diatomeas
C22:2 (n-6)	Dinoflagelados (Graeve et al. 1994)
C22:6 (n-3)	Presencia de dinoflagelados en la dieta
C15:1	Actividad bacteriana
C17:1	Actividad bacteriana

Isótopos estables

Los análisis de isótopos estables se realizaron durante los meses de abril a diciembre de 2009 y enero-febrero de 2010 (n=6), sobre el mismo material liofilizado que el utilizado para el estudio de AG.

Se pesaron 1 - 1, 5 mg de tejido, se colocaron en microcapsulas de Zinc y se procesaron en un espectrómetro de masas (Thermo/Finnigan Delta plus, GeoBio Center). Para la cuantificación de los mismos se utilizaron estándares internacionales ($\delta^{13}\text{C}$ CPDB, $\delta^{15}\text{N}$ NNair). Las tasas entre los distintos isótopos del carbono y nitrógeno son dadas como la notación delta tradicional ($\delta^{13}\text{C}$; $\delta^{15}\text{N}$). Los valores de δC y δN se expresan en % y fueron calculados a partir de las diferencias entre las muestras y los estándares según la siguiente ecuación:

$$\delta^{13}\text{C} \text{ o } \delta^{15}\text{N} (\%) = [(R_{\text{muestra}} / R_{\text{estandar}}) - 1] * 100$$

$$R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C} \text{ o } {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N} \text{ respectivamente}$$

Tabla III 2: Proporciones más utilizadas como indicadores de relaciones en redes tróficas (Fuentes 2006).

16:1 (n-7)/16:0	Indica predominancia de dinoflagelados (valores bajos) o diatomeas (valores altos) en la dieta (Stübing y Hagen 2003)
18:1 (n-7) / 18:1 (n9)	Se utiliza para distinguir carnívoros de herbívoros (Falk-Peterson et al. 2000).
22:6 (n-3) / 20:5 (n-3)	Valores > 1 preponderancia de dinoflagelados en la dieta. Valores < 1 preponderancia de diatomeas (Stübing y Hagen 2003).

Análisis estadísticos

La prueba de normalidad se realizó mediante Shapiro-Wilks, y la homogeneidad de varianzas utilizando la prueba de Levene's. Se realizó un análisis de varianza ANOVA, cuando los supuestos de dicho análisis se cumplieron se utilizó el *test a posteriori* Tukey (para la comparación entre lípidos, proteínas y carbohidratos en las diferentes estaciones), de lo contrario, cuando los supuestos no se cumplieron, incluso posterior a una transformación, se utilizó un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis con una posterior prueba de rangos múltiples descritos por Conover (1999). Se aclara con mayor detalle en cada análisis. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando Infostat 2012.

Resultados

La diferencia en la longitud de la colonia, tanto entre cada uno de los meses, como entre las diferentes estaciones no fue significativa (Kruskal-Wallis; $H = 13, 24$; $p = 0, 1519$). Se observó una diferencia significativa en el % de Mo observado, tanto entre cada uno de los meses (Kruskal-Wallis; $H = 103,49$; $p < 0,0001$) como entre estaciones (Tabla III 3), sin una correlación entre el largo de las colonias y el % Mo (Pearson; $p = 0, 9234$).

El porcentaje más alto que se encontró del %Mo fue en el mes de enero ($84, 22 \pm 1, 93$) y junio ($83, 00 \pm 2, 08$), mientras que el más bajo en julio ($61, 37 \pm 11, 50$) y septiembre ($74, 03 \pm 10, 16$) de 2009, en estos dos últimos meses se observó una gran variación entre colonias en comparación con el resto de los meses (Fig. III 3).

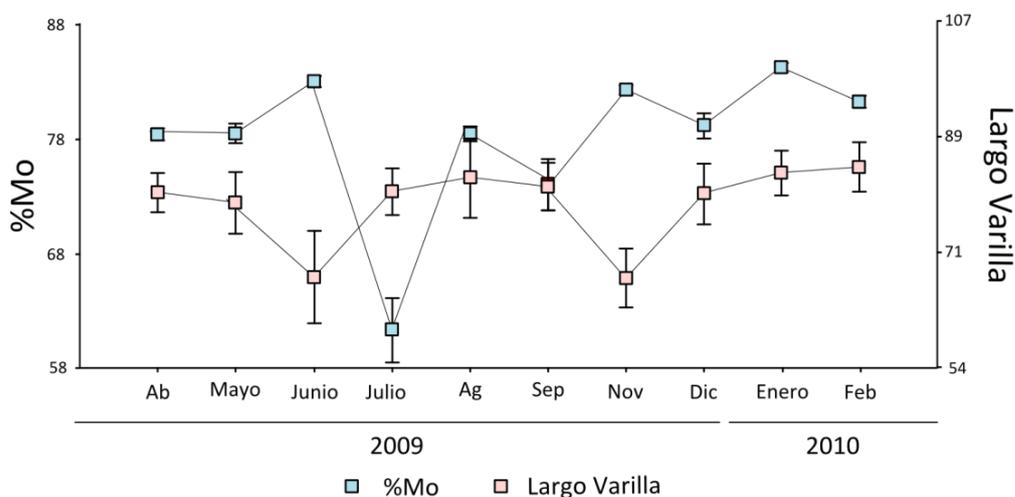


Figura III 3: Variación del % de Mo a lo largo de los meses muestreados y variación en la media de los tamaños de las varillas. Las barras verticales indican error estándar.

Tabla III 3: Análisis de Kruskal-Wallis de los %Mo y la longitud de las colonias en las diferentes estaciones con una posterior prueba de rangos múltiples de Conover.

		%Mo			Tamaño		
		Media ± SD	H	p	Media ± SD	H	p
Invierno	a	70, 57 ± 11, 74	60, 99	< 0, 0001	84, 16 ± 15, 98	7, 67	0, 053
Otoño	b	79, 92 ± 3, 22			73, 60 ± 21, 88		
Primavera	b	80, 83 ± 3, 89			76, 09 ± 20, 69		
Verano	c	82, 73 ± 2, 59			81, 66 ± 16, 48		

± Desvío estándar; H estadístico; Letras diferentes indica diferencias significancia ($p < 0, 05$).

Bioquímica

En la Fig. III 4 se observa una marcada estacionalidad, en el contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos.

La concentración máxima de lípidos se registró en el mes de julio de 2009 ($164, 34 \pm 8, 50 \mu\text{gLíp.mgMo}^{-1}$). Por otra parte dichos valores fueron mínimos en los meses de enero y febrero 2010 ($102, 28 \pm 10, 86$; $100, 21 \pm 24, 50 \mu\text{gLíp.mgMo}^{-1}$ respectivamente) (Fig. III 4).

Con respecto a los valores observados de carbohidratos los más bajos fueron en enero 2010 ($104, 09 \pm 20, 05 \mu\text{gCH.mgMo}^{-1}$), y en noviembre de 2009 ($104, 59 \pm 15, 54 \mu\text{gCH.mgMo}^{-1}$), mientras que la concentración máxima se observó, al igual que en los lípidos, en julio de 2009 ($168, 81 \pm 38, 90 \mu\text{gCH.mgMo}^{-1}$).

Por último, la concentración de proteínas fue máxima en julio de 2009 ($772, 70 \pm 152, 26 \mu\text{gProt.mgMo}^{-1}$) aunque con una gran variación entre colonias dentro de dicho mes, mientras que la concentración mínima se registró en junio de 2009 ($508, 69 \pm 49, 87 \mu\text{gProt.mgMo}^{-1}$) (Fig.III 4).

En la Fig. III 5 y la Tabla III 4 podemos observar que tanto la concentración de lípidos, proteínas y carbohidratos fueron estacionales en los meses estudiados. Se observó que la concentración de lípidos y carbohidratos se comportaron de manera similar, con elevadas concentraciones en invierno y primavera, mientras que la concentración de proteínas fue máxima en invierno y verano, sin diferencias significativas entre ambas estaciones (Tabla III 4).

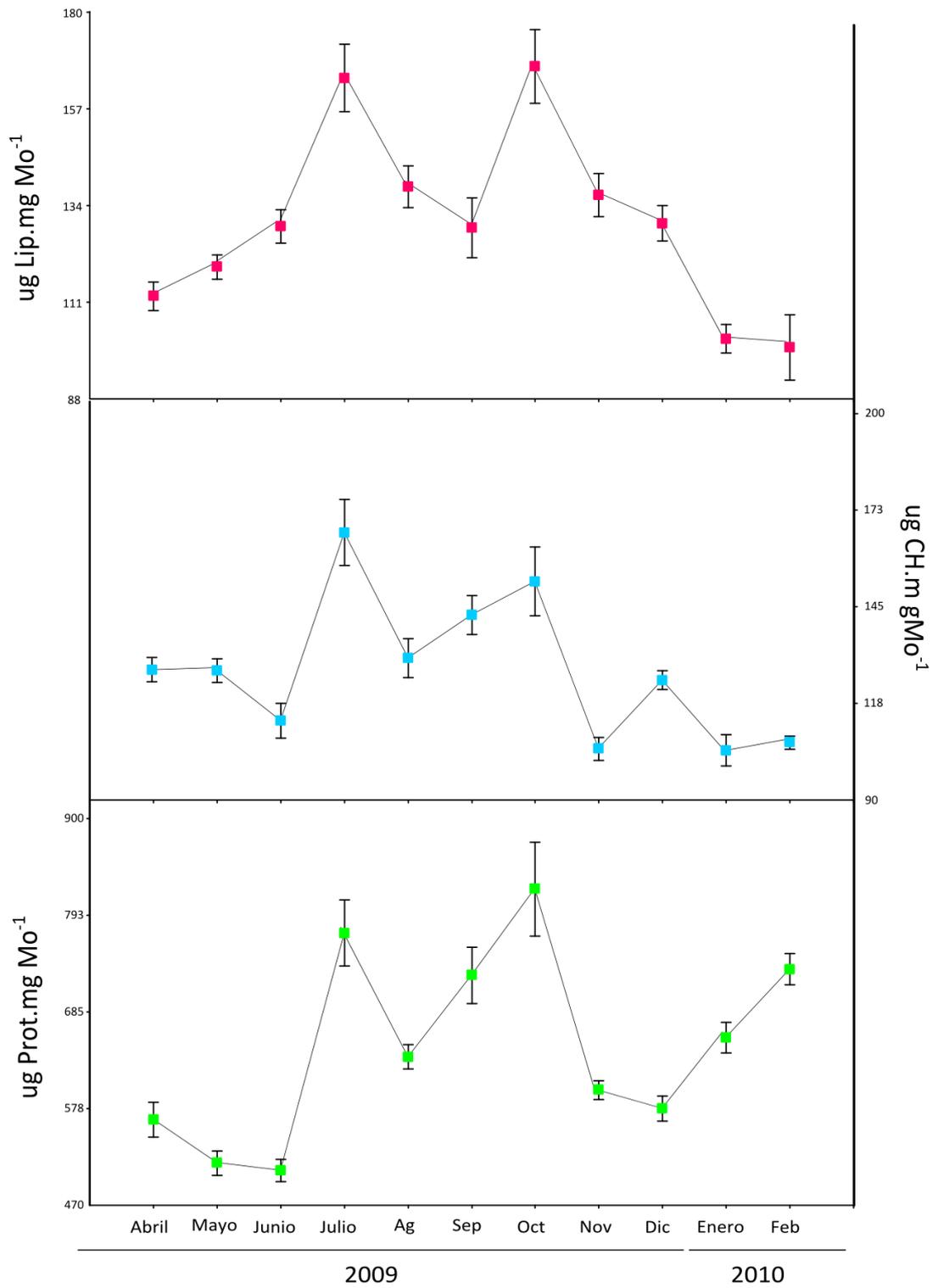


Figura III 4: Concentración de lípidos, proteínas y carbohidratos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}\cdot\text{Mo}^{-1}$) durante los meses de abril a diciembre de 2009 y enero, febrero 2010 (lípidos: $n = 10$; proteínas y carbohidratos: $n = 20$). Las barras verticales indican error estándar.

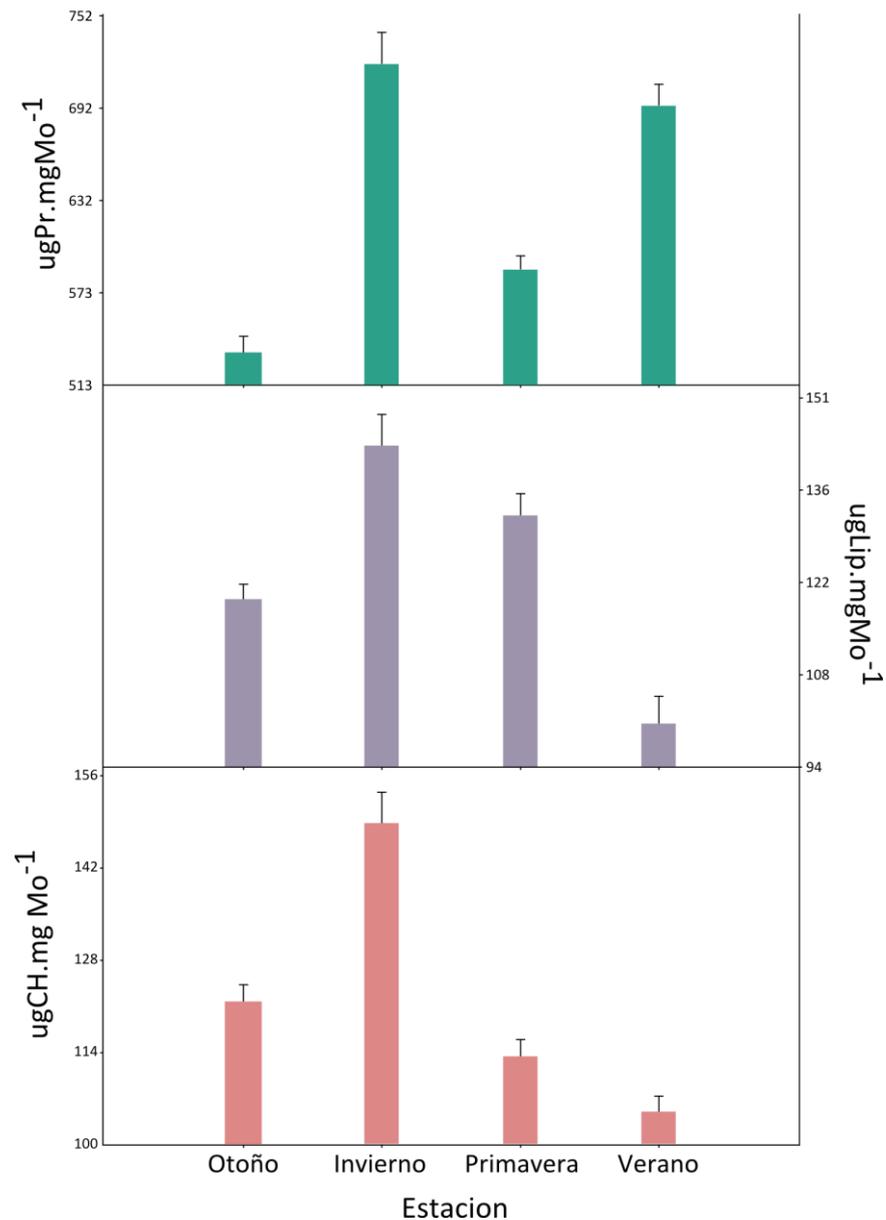


Figura III 5: Concentración de lípidos, proteínas y carbohidratos ($\mu\text{g}\cdot\text{mgMo}^{-1}$) por estación desde abril 2009 hasta febrero 2010. Las barras verticales indican error estándar.

Tabla III 4: Análisis de varianza (ANOVA) de lípidos, proteínas y carbohidratos en las diferentes estaciones. Test *a posteriori* Tukey fue utilizado para identificar las estaciones diferentes en la ANOVA.

Proteínas		Carbohidratos		Lípidos	
F	<i>p</i>	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>
39,89	<0,0001	33,19	<0,0001	22,07	<0,0001
Verano	a	Invierno	a	Invierno	a
Invierno	a	Otoño	b	Primavera	a b
Primavera	b	Primavera	b c	Otoño	b
Otoño	c	Verano	c	Verano	c

F estadístico; Letras diferentes indica diferencias significancia ($p < 0, 05$).

Ácidos Grasos

La abundancia de Ácidos Grasos (AG) 18:1 (n-9) indica una dieta carnívora, la cual si bien mantuvo leves variaciones a lo largo de las estaciones manifestó un incremento en otoño y una disminución en primavera. De manera similar el Ácido Graso monoinsaturado (AGMI) 20:1 (n-9), otro de los AG más abundantes, indica que predomina la predación de copépodos en la dieta de *Malacobelemnion daytoni* (Graeve et al. 2001; Fuentes 2006) principalmente en verano. En contraste a lo que se encontró en el Ácido Graso monoinsaturado (AGPI) más abundante 20:4 (n-6), el cual evidenció variaciones muy marcadas a lo largo del estudio, con proporciones muy bajas en verano y un aumento muy pronunciado en primavera e invierno. El siguiente AGPI más abundante fue el 20:3 sin grandes cambios en cada una de las estaciones, indica la incorporación en la dieta de microalgas, el cual es confirmado por los valores de los AG 16:1 (n-7) y 22:6 (n-3) indicadores de diatomeas y dinoflagelados respectivamente.

Los índices de proporciones sugieren una dieta preferentemente carnívora, evidenciada por los bajos valores en el índice 18:1 (n-7)/18:1 (n9) (principalmente en verano y otoño) (Tabla III 6). A su vez el índice 16:1 (n-7)/16:0 indica que entre diatomeas y dinoflagelados, la dieta es más rica con este último. En contraste a lo que se observó con lo obtenido con el índice 22:6 (n-3)/20:5 (n-3) nos indica una predominancia de diatomeas con respecto a dinoflagelados en la dieta de la especie, lo cual resulta llamativo y contradictorio, probablemente el hecho de que el AG 20:5 (n-3) no se determinó casi en ninguna colonia le quitaría peso a este índice para los análisis en *Malacobelemnion daytoni*.

Tabla III 6: Proporciones de AGs más usadas como indicadores de redes tróficas encontradas en *Malacobelemnion daytoni*.

	Verano	Otoño	Invierno	Primavera
16:1 (n-7)/16:0	0,09	0,13	0,10	0,06
18:1 (n-7)/18:1 (n-9)	0,63	0,50	0,75	0,82
22:6 (n-3)/20:5 (n-3)	0,00	1,32	0,00	0,00

Tabla III 5: Proporciones (%) de los diferentes Ácidos Grasos detectados en *Malacobelemnion daytoni* de verano, primavera, otoño e invierno en Caleta Potter.

	Verano	Otoño	Invierno	Primavera
Ácidos Grasos				
Saturados				
C12:0	0,13	0,09	0,08	0,07
C13:0	0,02	0,03	0,01	0,01
C14:0	3,21	2,61	1,78	1,66
C15:0	0,68	0,67	0,58	0,65
C16:0	25,80	20,32	25,26	26,39
C17:0	0,82	0,39	0,64	1,07
C18:0	14,24	12,20	11,21	17,61
C20:0	1,04	0,57	0,57	1,00
C21:0	2,17	3,53	0,68	0,77
C22:0	0,24	0,08	0,16	0,09
C24:0	0,13	0,07	0,05	0,06
<i>Total AGS</i>	48,50	40,57	41,02	49,37
Monosaturados				
C14:1 (n-5)	0,00	0,02	0,13	0,00
C16:1 (n-7)	2,42	2,68	2,77	1,60
C18:1 (n-9)	5,56	7,11	5,62	3,00
C18:1 (n-7)	3,49	3,57	4,23	2,47
C20:1 (n-9)	10,29	4,54	2,80	1,77
C22:1 (n-9)	0,88	0,50	0,52	0,65
C24:1 (n-9)	0,12	0,02	0,11	0,03
<i>Total AGMI</i>	22,76	18,43	16,18	9,52
Poli-insaturados				
C18:2 (n-6)	0,98	1,13	0,71	0,48
C18:3	0,31	0,00	0,00	0,03
C20:2 (n-6)	0,79	0,06	0,85	0,70
C20:3	10,89	18,60	15,14	17,44
C20:4 (n-6)	4,71	13,63	23,23	20,79
C20:5 (n-3)	0,00	3,01	0,00	0,00
C22:2 (n-6)	1,13	0,46	0,73	0,68
C22:6 (n-3)	5,73	3,97	1,97	0,89
<i>Total AGPI</i>	24,54	40,87	42,63	41,01

Isótopos estables

Los valores de isótopos estables de $\delta^{13}\text{C}$ fueron relativamente constantes a lo largo de todo el año, en otoño de -23, 9 a -25, 3; en invierno: -22, 9 a 24, 4; en primavera: -23, 3 a -25, 2 y en verano: -23, 2 hasta -24, 6. De igual manera con los valores de $\delta^{15}\text{N}$, fueron muy similares entre las estaciones (otoño: 5, 80 - 6, 40; invierno: 5, 90 - 6, 80; primavera: 5, 90 - 7, 30 y verano de 6, 10 a 7, 00) (Fig. III 6), a pesar de que se encontraron algunas diferencias significativas (Tabla III 7).

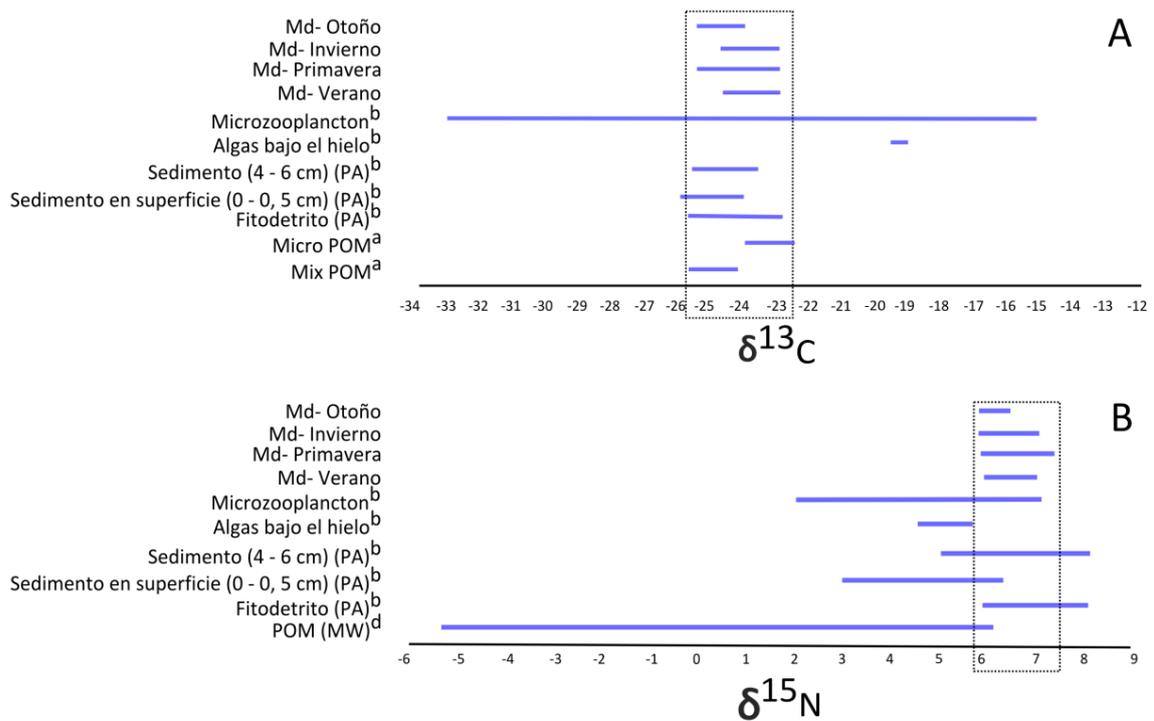


Figura III 6: Composición en los valores de isótopos estables en *Malacobelemnon daytoni* en las diferentes estaciones en comparación con datos de: ^aKaehler et al. 2000; ^bMincks et al. (2008) and ^dRau et al. (1991) observados en diferentes fuentes de alimento. A $\delta^{13}\text{C}$ (‰) y B $\delta^{15}\text{N}$ (‰). Md: *Malacobelemnon daytoni*. POM: material orgánico particulado.

Tabla III 7: ANOVA para los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en las diferentes estaciones. Test *a posteriori* Tukey fue utilizado para identificar diferencias en la ANOVA.

$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^{15}\text{N}$		
	F	p	F	p
	11, 34	< 0, 0001	11, 99	< 0, 0001
Invierno	a		Primavera	a
Verano	a b		Verano	a
Primavera	b c		Invierno	a
Otoño	c		Otoño	b

F estadístico; Letras diferentes indica diferencias significancia ($p < 0, 05$).

En la Fig. III 7 se compararon los valores de $\delta^{13}\text{C}$ (%) y $\delta^{15}\text{N}$ (%) encontrados en el presente trabajo con diferentes grupos taxonómicos estudiados en Península Antártica. En dicha figura podemos observar que *Malacobelemnnon daytoni* se encuentra en un nivel trófico inferior a algunas estrellas y ofiuros, ya que la diferencia entre los valores de algunos equinodermos en comparación con el pennatulaceo es superior al 3%, valores que según la literatura (Kaeher et al. 2000; Schmidt et al. 2003) nos permite ubicarlos en grupos tróficos diferentes. De igual manera se observó entre grupos como el Krill (*Euphasia superba*) y Salpas (*Salpa thompsoni*) ubicando a *Malacobelemnnon daytoni*, en un nivel trófico superior. No así entre este último y gorgonias, si bien varió mucho de acuerdo a la especie, nunca superiores al 3 % como para colocarlos en niveles tróficos diferentes.

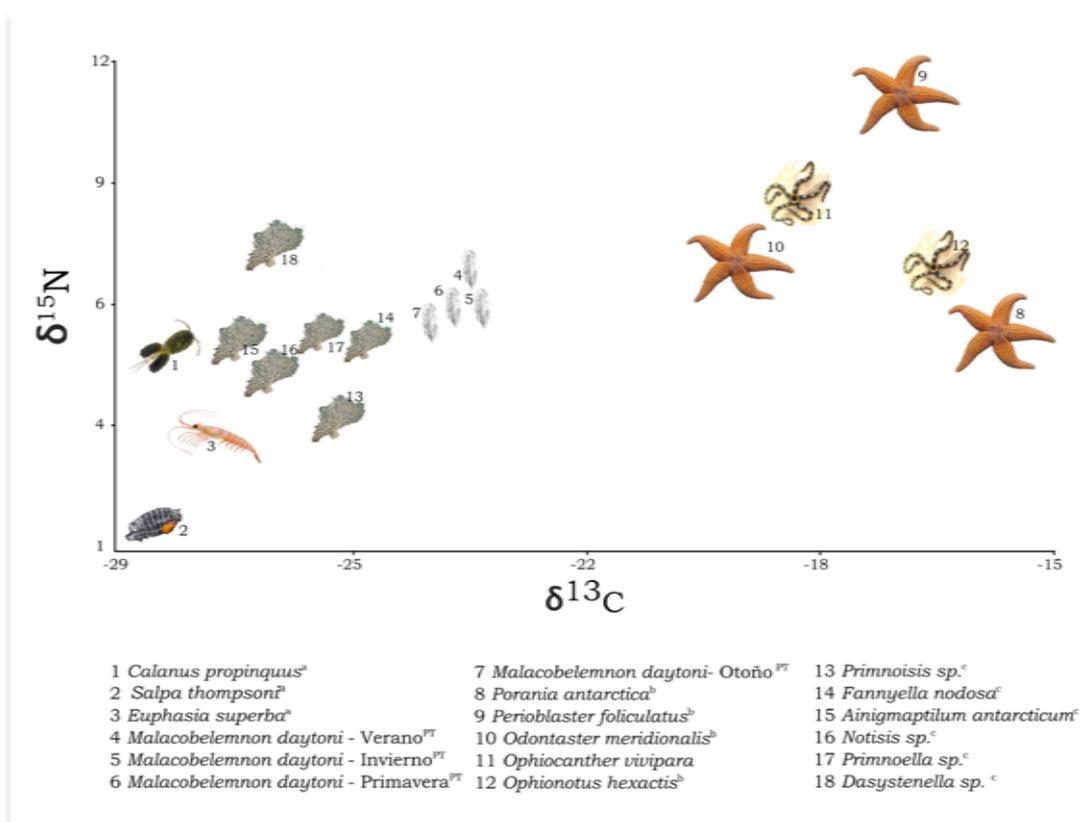


Figura III 7: Valores de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ expresados en % en copépodos; Krill; gorgonias; plumas; estrellas y ofiuros, en diferentes puntos de península Antártica. ^aFuentes 2006; ^bKaeher et al. 2000 y ^cElias-Piera et al. 2013. ^{PT}Presente trabajo. Los dibujos son solo esquemáticos.

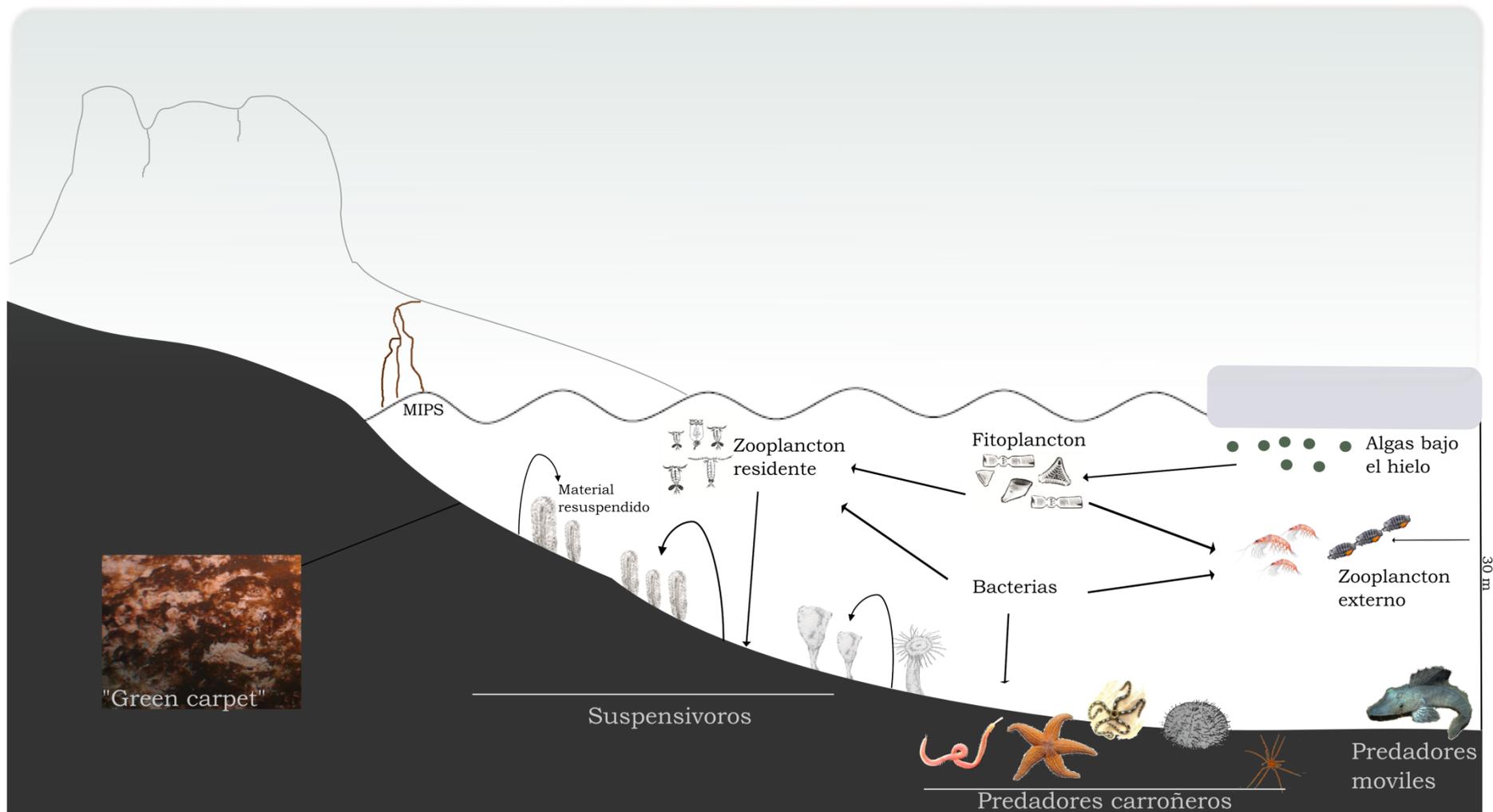


Figura III 8: Esquema conceptual mostrando las principales relaciones tróficas de Caleta Potter. Los dibujos son esquemáticos y no representan abundancias ni distribuciones de cada especie en el gradiente batimétrico, como así tampoco las proporciones de tamaños. 'Green carpet': representa en material detrítico y el microfitobentos (diatomeas bentónicas). MIPS: material particulado inorgánico en suspensión.

Bioquímica

Los lípidos son el principal material de reserva de energía en la mayoría de los organismos, aunque también los carbohidratos cumplen esta función, en algunos taxa. Además hay un balance dinámico entre ambos, ya sea se trate de reservas para ser usadas a largo o corto plazo siendo los lípidos usados en el primer caso y los carbohidratos en el segundo (Harland et al. 1992; Rossi et al. 2006; Rossi y Tsounis 2007). En *Malacobelemnion daytoni* se observó que las concentraciones de lípidos oscilaron de entre 100-164 $\mu\text{gLíp.mgMo}^{-1}$, por debajo de lo que se encontró en especies de octocorales de zonas templadas, como el coral rojo *Corallium rubrum* (mar Mediterraneo) (300–500 $\mu\text{gLíp.mgMo}^{-1}$) (Rossi y Tsounis 2007). Por otro lado, trabajos del mismo autor, registraron valores que oscilaron entre 150–350 $\mu\text{gLíp.mgMo}^{-1}$ en *Paramuricea clavata* y 200–400 $\mu\text{gLíp.mgMo}^{-1}$ en *Leptogorgia sarmentosa* (Rossi 2002; Rossi et al. 2006) y un trabajo realizado en la misma zona de estudio por Gori et al. (2007) en la gorgonia *Eunicella singularis* registró de 180-400 $\mu\text{gLíp.mgMo}^{-1}$. Mientras que los niveles de carbohidratos en *Malacobelemnion daytoni* oscilaron entre 104-168 $\mu\text{gCH.mgMo}^{-1}$, valores muy superiores a los que se observaron en las especies ya mencionadas (*Paramuricea clavata*: 30-90 $\mu\text{gCH.mgMo}^{-1}$ y *Corallium rubrum*: 20-50 $\mu\text{gLíp.mgMo}^{-1}$) (Rossi et al. 2006; Gori et al. 2007).

Posiblemente esta diferencia sea debida a la ausencia de algas simbioses durante todo el periodo muestreado, ya que, diversos estudios han puesto de relieve la importancia de las algas simbióticas en la translocación de los lípidos de las células de algas en el tejido de cnidarios (Patton et al. 1983; Tolosa et al. 2011), encontrando mayores concentraciones de lípidos en poblaciones que habitan zonas fóticas en comparación de poblaciones de zonas más profundas (Gori et al. 2012). En *Malacobelemnion daytoni* esto podría ser indicativo de una restricción de la luz causada por las altas concentraciones de sedimento en Caleta Potter (Schloss et al 2012) o la ausencia de algas simbioses en organismos Antárticos ya que no hay registro de la presencia de estos en organismos bentónicos hasta la fecha. Por otro lado no se descarta la posibilidad de que no sean los lípidos el principal reservorio de reservas y sean los carbohidratos la principal fuente de energía con la que cuenta la especie, aunque para afirmar esta hipótesis además de ser necesarios nuevos estudios, resulta sumamente interesante contar con datos bioquímicos de grupos polares y de otras especies de pennatuláceos para analizar si podría ser un patrón característico de dichas zonas o del grupo.

Rossi et al. (2006) sugiere que los hidratos de carbono han demostrado estar más directamente relacionados con el estrés trófico en antozoos, además de tener una respuesta más rápida al agotamiento de los alimentos, mientras que postula a los lípidos como indicadores de extensos periodos de escasez de alimento. Frente a esta hipótesis podemos observar, según las fluctuaciones de carbohidratos en el periodo estudiado (Fig. III 5), que probablemente la estacionalidad en cuanto a los periodos de agotamiento de alimento en otoño e invierno no sea tan marcada, debido a, como se mencionó en el capítulo anterior, eventos de resuspensión.

Si bien no se encuentran trabajos publicados hasta la fecha en cuanto al balance bioquímico en los sedimentos de Caleta Potter, un trabajo de Isla et al. (2006) en el mar de Weddell, señala la existencia de sedimentos con un alto valor nutricional (elevadas concentraciones de lípidos y carbohidratos) persistentes en el tiempo posterior a los pulsos de producción primaria. También se destacó en dicho trabajo, la alta disponibilidad potencial de estos sedimentos (debido a su granulometría) para las comunidades bentónicas. La acumulación de bancos de alimentos en el sedimento ('food bank'; Mincks et al. 2005) pueden constituir una importante fuente de energía para el ecosistema bentónico Antártico, que actuará como amortiguador frente a la fuerte variabilidad estacional de las aguas superficiales (Smith et al. 2006; Gili et al. 2009). Esto abre nuevas discusiones sobre la posibilidad de que los periodos de escases de alimento en el bentos de Caleta Potter en realidad no sean tan marcados.

En cuanto a la estacionalidad observada en la concentración de lípidos en *Malacobelemnion daytoni* se sugiere que esta se encuentra asociada al patrón reproductivo de dicha especie, ya que como se detalló en el capítulo II la especie tendría un marcado desove a finales del verano, en la misma estación que se observó la menor concentración de lípidos, y un segundo desove aunque menos marcado en primavera. Sin embargo esta asociación se encuentra sesgada ya que en el análisis de lípidos se procesaron hembras y machos juntos, sin conocer las proporciones de cada sexo (no fue posible conservarlos por separado ya que son externamente similares). De manera similar se observó en algunas gorgonias Antárticas, que se reproducen a finales de primavera-verano (Orejas et al. 2002; 2007), trabajos en los cuales se sugiere que el alto nivel de lípidos observado puede ser, no solo una respuesta a los 'crudos' periodos de otoño e invierno, sino también una estrategia para almacenar energía que sera necesaria para los productos sexuales (larvas o huevos). Por otro lado la gorgonia *Ainigmaptilon antarcticum* alcanza elevadas concentraciones de reserva, lo que se lo asocia por un lado con el diámetro alcanzado por los oocitos (> 900 μm) y por otro con el hecho de que esta especie posiblemente cuente con fecundación interna y crianza de las larvas (Orejas et al. 2002).

Los valores de la concentración de proteínas en el presente trabajo (508-772 $\mu\text{gProt.mgMo}^{-1}$) coinciden a lo observado en *Paramuricea clavata* (500-750 $\mu\text{gProt.mgMo}^{-1}$) y *Leptogorgia sarmentosa* (450-700 $\mu\text{gProt.mgMo}^{-1}$) (Rossi 2002; Rossi et al. 2006), mientras que en el coral *Corallium rubrum* se observaron valores muy inferiores (100-230 $\mu\text{gProt.mgMo}^{-1}$) (Rossi y Tsounis 2007). Dicha diferencia se atribuye al hecho de que el esqueleto de este último se encuentra realizado de CaCO_3 (Grillo et al. 1993), mientras las otras dos gorgonias se caracterizan por elevados contenidos proteicos de gorgonina (Rossi y Tsounis 2007). Si bien, la elevada concentración de proteínas en *Malacobelemnion daytoni* no queda del todo claro ya que la estructura de su esqueleto es, al igual que *Corallium rubrum*, de CaCO_3 , su estacionalidad (con dos picos muy marcados en invierno y verano) puede ser una consecuencia del crecimiento estacional de la colonia. Marschal et al. (2004) observaron dos anillos de crecimiento de diferentes densidades en el mismo año en colonias del coral rojo (verano e invierno) observaciones similares se realizaron en *Cladocoraca espitosa* en el mar Mediterráneo (Peirano et al. 1999; 2005). Se ha demostrado que la materia orgánica originada a partir de los pulsos de alimentos estimula la formación de CaCO_3 , mediante la construcción de la matriz primaria en la que la parte inorgánica se precipitara (Houlbrèque et al. 2003), por lo que en *Malacobelemnion daytoni* los picos ya mencionados se pueden deber al aumento de la matriz orgánica que será la base para la calcificación, sin embargo son necesarios posteriores estudios sobre tasas y periodos de crecimiento de la especie para afirmar esta hipótesis.

Por último con respecto a la variación de materia orgánica en relación con el balance bioquímico resulta llamativo que en el mes de julio en el que se observó la mayor concentración tanto de lípidos, de proteínas como de carbohidratos se observó el menor porcentaje de materia orgánica, esto se puede deber a que en el medio se encuentre menos materia orgánica pero de 'mejor calidad'. En algunos meses se puede estar generando proteína o carbohidrato (especialmente esta primera) u otra sustancia orgánica que forma esqueleto, estructura, la cual es muy refractaria, y no se detecta con el método colorimétrico (solo proteínas 'solubles') pero sí con el peso de las cenizas (materia orgánica). Por lo que puede que baje la materia orgánica en peso, pero que sea de 'mejor calidad' (Rossi pers. com.)

Ácidos Grasos

De igual manera que se ha observado en numerosas especies de corales (Svetashev y Vysotskii 1998; Pernet et al. 2002; Imbs et al. 2007c; 2009; Baptista et al. 2012), los principales AGS en *Malacobelemnion daytoni* fueron el 16:00 y 18:00. Estos son conocidos como puntos clave de partida para la biosíntesis de los AGPI esenciales (Carballeira et al. 1996).

En base a los resultados presentes de los AG, podemos considerar una dieta omnívora en *Malacobelemnion daytoni* con leves variaciones a lo largo del año. Tanto el AG 20:1 (n=9) (ácido eicosenoico) como el 18:1 (n-9) (ácido octadenoico) son ambos indicadores de una dieta carnívora y predatora de la especie, específicamente la incorporación del AGMI 20:1 (n-9) se realiza a través de la predación sobre copépodos. Este tipo de predación, según los presentes resultados, ocurre principalmente en verano, que es cuando a su vez, se han observado los principales picos de copépodos en Caleta Potter (Fuentes 2006). Esto se correlaciona con lo que se observó en el índice utilizado para distinguir carnívoros de herbívoros (18:1 (n-7)/ 18:1 (n-9)) (Falk-Petersen et al. 2000). Si bien este índice no varió demasiado a lo largo del año, los valores más cercanos a 0 representaron una tendencia a la carnivoría, como se observó en verano–otoño (0, 63 – 0, 5), aunque, aparentemente las diatomeas no se encuentran ausentes en la dieta de *Malacobelemnion daytoni*, ya que los valores del ácido octadecenoico 18:1 (n-7) se mantuvieron con pocas variaciones a lo largo de las estaciones, con un leve descenso en primavera. De manera similar lo fueron los dinoflagelados, aparentemente con una preferencia por estos en verano por el aumento de los AG 22:6 (Graeve et al. 1994).

Por otro lado los elevados valores de AGPI 20:3 y 20:4, nos indican presencia de micro y macroalgas, respectivamente en la dieta (Fuentes 2006). Si bien se observaron llamativas variaciones del ácido aeicosatetraenoico (20:4 (n-6)), el análisis de estas resulta dificultoso ya que según Pernet et al. (2002), este ácido graso se encuentra asociado con los ciclos gonadales en el pennatulaceo *Renilla koellikeri*, por lo que no se descarta que el marcado descenso de este en verano (7, 71), se encuentre más relacionado con el ciclo reproductivo de *Malacobelemnion daytoni* que con su dieta.

Numerosos autores han comenzado a utilizar los AG en la identificación taxonómica de corales, llegando a familias o incluso al nivel de género (Svetashev y Vysotskii 1998; Imbs et al. 2007b; 2008), en el presente estudio se demuestra que no hay una dominancia constante a lo largo de todo el año de un AG determinado, lo mismo que observó Baptista et al. (2012) en el pennatulaceo *Veretillum cynomorium*, mientras que la mayoría de los estudios anteriormente mencionados carecen del componente estacional en sus conclusiones. En su lugar, Baptista et al. (2012) plantea que son cuatro los AG principales en pennatulaceos: 16:00, 20:4 (n-6), 20:5 (n-3) y 24:6 (n-3), lo cual resulta discutible ya que si bien los dos primeros se observaron abundantes también en el presente trabajo, no así los dos últimos, siendo el tetracosahexaenoico (24:6 (n-3)) un AG ausente tanto para *Malacobelemnion daytoni* como para *Renilla koellikeri* (Pernet et al. 2002).

Isótopos estables

Los resultados generales obtenidos a partir de los análisis de isótopos estables de *Malacobelemnion daytoni* ($\delta^{13}\text{C}$ -25, 2 a -22, 9‰; $\delta^{15}\text{N}$ del 7, 3 a 5, 8‰) indican que esta especie es oportunista y su dieta incluye un amplio espectro (Fig. III 6). Estos resultados concuerdan con estudios previos en octocorales de diferentes regiones (Mediterráneo: Ribes et al. 1999; 2003; Picciano y Ferrier-Pagès 2007; Antártida: Orejas et al. 2003).

El presente trabajo parece confirmar la presencia de material orgánico en el sedimento (Fig. III 8) como fuente potencial de alimento para *Malacobelemnion daytoni* a lo largo de todo el año. Esto se vio reflejado por los valores isotópicos que se encontraron en dicha especie en las diferentes estaciones, similares a los encontrados en fuentes de alimentos observados en trabajos previos en la península Antártica occidental: en donde en los fitodetritos se observaron valores de $\delta^{13}\text{C}$ que fueron desde -25, 46 a -22, 92‰ ($\delta^{15}\text{N}$ 5, 7-7, 9‰), en los sedimentos superficiales (corers de 0-0, 5 cm) de -25, 93 a -24‰ ($\delta^{15}\text{N}$ de 2, 8 a 6, 4‰), mientras que los valores del microzooplancton fueron desde -33 a -15‰ ($\delta^{15}\text{N}$ 3, 2-7, 5‰) (Mincks et al. 2008). En el mar de Weddell, el $\delta^{13}\text{C}$ del material orgánico particulado (POM) alcanzó rangos de -5, 4 a 6, 1‰ (Rau et al. 1991) y Kaehler et al. (2000) (en una zona sub Antártica) observó valores de $\delta^{13}\text{C}$ en el Micro y el Mix de POM (Micro POM - Mix POM) valores que van desde -26 hasta -22, 5‰ (Fig. III 6).

Dicho material sedimentado puede alimentar el sistema mediante resuspensión y transportado horizontalmente a través de las corrientes de marea (Isla et al. 2006) durante el otoño y el invierno. De hecho, Barnes y Clarke (1995) demostraron que algunos suspensívoros bentónicos no experimentaron un período de latencia durante el otoño y el invierno en Antártida, por ejemplo, algunas especies de briozoos estuvieron activos durante el invierno e hidrozoos sólo tuvieron un período de latencia corto en agosto. El elevado valor nutritivo que se encuentra en los sedimentos es, según Isla et al. (2006) debido a las lentas tasas de descomposición de ambientes polares (Cripps y Clarke 1998), llegando al fondo del mar con un elevado valor nutricional.

Con respecto a la estrategia alimentaria exhibida por *Malacobelemnion daytoni* en las diferentes estaciones estudiadas se encontraron diferencias significativas entre ellas, aunque estas diferencias no son lo suficientes como para ubicarlas dentro de niveles tróficos diferentes, y posiblemente tampoco lo suficiente como para concluir que varía la dieta de manera estacional, ya que según la Fig. III 6 la fuente de alimento en cada una de las estaciones es muy similar.

Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ observados en *Malacobelemnion daytoni* fueron superiores a los observados en salpas de Caleta Potter por Fuentes (2006), lo que ubica a esta especie de

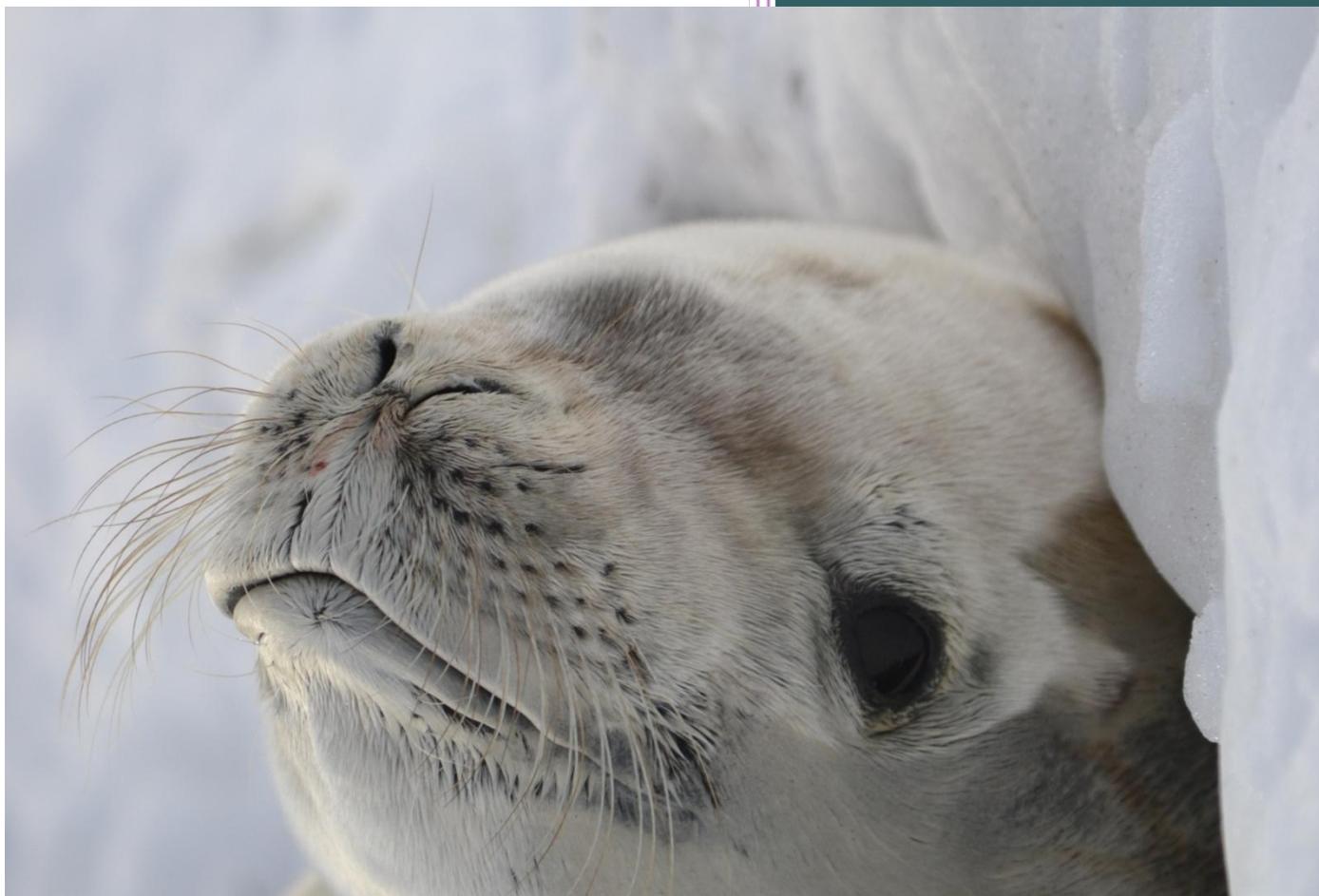
pennatulaceos en un nivel superior en la cadena trófica ya que esta diferencia es superior al 3%, no así lo que se observó entre la especie de interés y diferentes especies de gorgonias estudiadas por Elias-Piera et al. (2013), en donde la diferencia no fue superior al 3% por lo que no es posible afirmar que estos grupos pertenecen a niveles tróficos diferentes.

Por otro lado, si bien es de esperar que ofiuros y estrellas se ubiquen en un nivel trófico superior a pennatulaceos, la comparación de los presentes resultados con el trabajo de Kaehler et al. (2000) nos muestra que no está del todo claro, ya que dependiendo de la especie en particular se observa la diferencia del 3% necesaria para clasificarlos en niveles tróficos diferentes. Por lo que se debería contar con datos de la especies de equinodermos que habitan en Caleta Potter para concluir de manera precisa, pero, posiblemente sus dietas no sean tan disimiles como se espera.

Uno de los resultados relevantes del presente capítulo es la coincidencia entre los dos tipos de marcadores tróficos (AG e isótopos estables), destacando la amplia variedad de fuentes de alimento en la dieta de *Malacobelemnion daytoni*, señalando a esta especie como predadora y oportunista lo cual podría ayudarnos a comprender el éxito que esta tiene en Caleta Potter. Ambos métodos resultan complementarios y de gran importancia en detectar los diferentes niveles en las redes tróficas, ya que los métodos utilizados tradicionalmente, tales como el estudio de contenidos estomacales, resultan dificultosos debido principalmente al estado de conservación en que se encuentra el material digerido, de hecho si bien se realizaron diferentes observaciones en los contenidos de *Malacobelemnion daytoni* no fue posible observar ningún 'ítem' en el interior de sus pólipos. Por otro lado los experimentos de pastoreo también tradicionalmente utilizados, como por ejemplo por Orejas et al. (2003) en octocorales, permiten concluir solo sobre el material ingerido, pero poca información nos da sobre el material asimilado.

CAPITULO IV

*EFECTO DEL SEDIMENTO EN
MALACOBELMNON DAYTONI*



Los ecosistemas bentónicos sometidos a un gradiente de sedimentación como fiordos muestran patrones de diversidad y abundancia de especies asociados a estos. Lo que indica que el incremento de la carga de sedimentos afecta negativamente a numerosos taxa en especial filtradores (Wlodarska-Kowalczyk y Weslawski 2001; Thrush et al. 2004; Akoumianaki et al. 2013).

La Península Antártica y las Islas Shetland del Sur (Rückamp et al. 2011), se han identificado como una de las regiones más afectadas por el cambio climático (Cook et al. 2005; Vaughan 2005; Turner et al. 2005; 2007). Uno de los efectos más estudiados hasta la fecha es, probablemente el impacto del hielo (iceberg) en el bentos Antártico (Gutt 2001; Gutt y Starmans 2001; Smale et al. 2008a; 2008b; 2008c; Gutt et al. 2013). Por otro lado, se ha registrado un notorio incremento en las tasas de deposición de sedimentos en los últimos 60 años en la columna de agua, como consecuencia del derretimiento de sus glaciares (Cook et al. 2005). Estos cambios son preocupantes, ya que el bentos antártico se encuentra dominado principalmente por organismos filtradores sésiles (Orejas et al. 2002; Gili et al. 2006) que serían los más afectados por el aumento de material inorgánico en suspensión (Torre et al. 2012). Sin embargo, no muchos estudios se han realizado considerando a este fenómeno de sedimentación regular como un factor estructurador de los ecosistemas en Antártida (Torre et al. 2012).

Caleta Potter, como ya se mencionó en el capítulo I, se encuentra rodeada por el Glaciar Fourcade excepto en la costa Sur donde, como consecuencia del reciente retroceso del mismo, han quedado amplias zonas libres de hielo completamente descubiertas de vegetación. En este sector son importantes, principalmente en primavera y verano, los arroyos de deshielo, ya que son los responsables de la acumulación de sedimento en la región interna de la caleta. Si bien actualmente se observan numerosos arroyos que descargan directamente sobre la costa sur de la caleta, dos son los más importantes: el arroyo *Matias*, que se origina de una laguna estacional y su contribución sedimentaria es mínima comparada con el aporte del arroyo *Potter* (Fig. IV 1). La desembocadura del *Potter* tiene forma de delta y acarrea todas las partículas procedentes de la erosión del glaciar y de estas áreas nuevas libres de hielo y vegetación. Estos arroyos se generan principalmente de derretimiento de los glaciares, de la nieve acumulada durante el invierno y del drenaje de agua subterránea que fluye a través de los sedimentos morrénicos

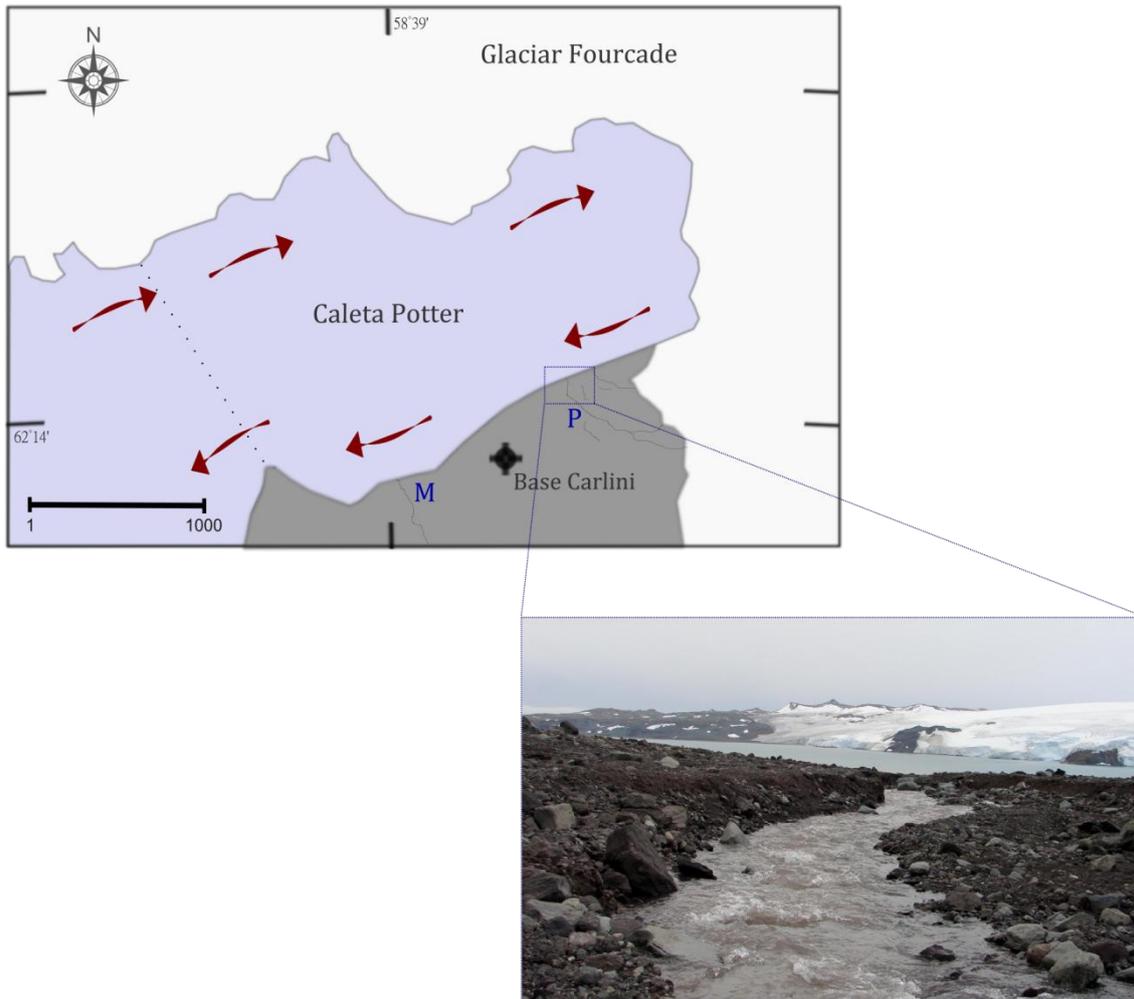


Figura IV 1: Mapa del área de estudio en donde se detalla los puntos de descarga debido al deshielo del Glaciar Fourcade más importantes; el arroyo Potter (P) y el arroyo Matias (M).

Como consecuencia de esto una serie de cambios hidrográficos significativos se vienen observando en Caleta Potter desde 1991, el más llamativo es el aumento del material particulado en suspensión (MPS) (Schloss et al. 2012). Al mismo tiempo se observaron cambios notables en la estructura de las comunidades de macrofauna bentónica, especialmente en organismos filtradores. En una muestreo de 1994 las regiones más superficiales de 15-20 m de profundidad se encontraban colonizadas por un conjunto relativamente uniforme, dominado por el bivalvo *Laternula elliptica* y el pennatulido *Malacobelemnion daytoni*. Por debajo de los 20 metros de profundidad, la ascidia *Molgula pedunculata* era la especie dominante, mientras que a los 30 metros cinco especies de ascidias solitarias: *Molgula pedunculata*, *Cnemidocarpa verrucosa*, *Ascidia challengerii*, *Corella eumyota*, y *Pyura setosa* constituyeron la biomasa más abundante (Sahade et al. 1998). Cuatro años después, en 1998, se observó una drástica reducción en la densidad de *Molgula pedunculata*, principalmente a los 30 metros de $\sim 16\%$ a $< 1\%$ de cobertura.

Al mismo tiempo, *Malacobelemnion daytoni* aumento su densidad de 10 a 85 individuos m⁻² a 20 m y amplió su distribución en profundidad hasta los 30 m (Sahade et al. *en preparación*). La magnitud y la velocidad de los cambios observados sugieren una posible relación con el derretimiento de los glaciares y por consiguiente con los aumentos de MPS en la columna de agua en Caleta Potter.

En este estudio se midió el consumo de oxígeno de *Malacobelemnion daytoni*, expuesta a concentraciones crecientes de sedimentos naturales y se lo comparó con estudios realizados por Torre (2013) en las ascidias solitarias más abundantes: *Molgula pedunculata*, *Cnemidocarpa verrucosa* y *Ascidia challengerii*³ y el bivalvo *Laternula elliptica* (Philipp et al. 2011).

Objetivos específicos

1. Estudiar el consumo de oxígeno en *Malacobelemnion daytoni* frente a concentraciones crecientes de sedimento.
2. Comparar la sensibilidad de la especie con ascidias más abundantes de Caleta Potter frente a las diferentes concentraciones de sedimento.
3. Evaluar si la tolerancia a la carga de sedimento podría ayudar a explicar el creciente éxito ecológico de la especie en la comunidad de Caleta Potter.

³ Datos tomados de la tesis de postgrado de Torre 2013 para realizar las comparaciones (Torre et al. 2012).

Materiales y Métodos

Las colonias de *Malacobelemnon daytoni* se colectaron entre 10 y 15 m de profundidad mediante buceo autónomo durante la campaña Antártica de verano 2008.

Diseño experimental

Luego de la aclimatación, las plumas fueron colocadas de a cuatro en recipientes circulares de 0,7 L cada uno, que funcionaban como cámaras respiratorias individuales. Se trabajó con tres peceras rectangulares (50 L c/u) (Fig. IV 2), en cada una se colocaron cuatro cámaras respiratorias (tres experimentales (n=6) más una cámara de referencia por pecera para corregir el consumo de oxígeno del sistema). En dos de las peceras se agregó sedimento (pecera experimental) mientras que la tercera se utilizó de control (sin sedimento) para considerar el consumo normal de oxígeno en *Malacobelemnon daytoni*.

Por otro lado se tomó una muestra de sedimento superficial a los 20 metros de profundidad de la estación de muestreo, se secó a 70 °C y se lo tamizó a través de un tamiz de 50 micras. Esta fracción resultante de sedimento natural fue elegida debido a que podría mantenerse fácilmente suspendida en agua.

El primer día de experimento se tomó una medición de oxígeno sin sedimento que se consideró como oxígeno basal (O_{bas}). Posteriormente se colocaron diferentes concentraciones de sedimentos desde 5 a 600 mg L⁻¹ (con un nivel de materia orgánica $2,36 \pm 0,07\%$). Luego de 6 horas de exposición en cada una de las concentraciones de sedimento (Torre 2013) las cámaras se sellaron durante 18 horas y se midió al final de ese periodo la concentración de oxígeno en el agua (O_{sed}). Mientras las cámaras de respiración permanecieron cerradas el agua en las peceras se cambió y se aplicó la concentración siguiente de sedimento antes de que las cámaras se volvieran a abrir.

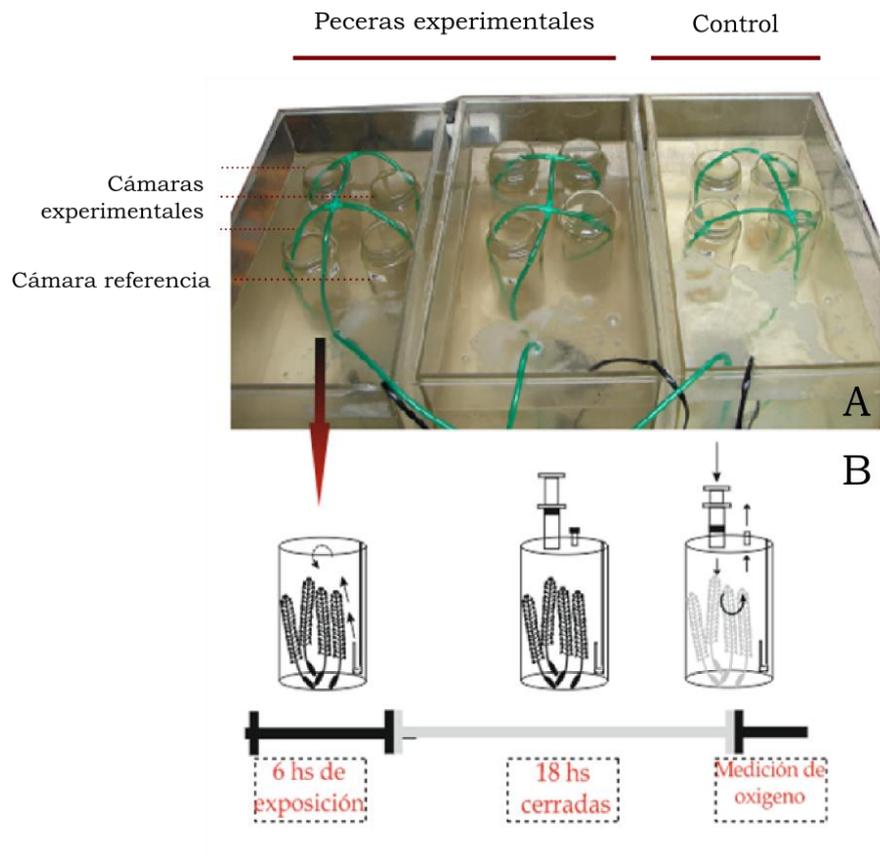


Figura IV 2: A Fotografía en acuario de las peceras con sus respectivos cámaras experimentales y de referencia. B Diagrama del sistema experimental.

Toma y análisis de los datos

La concentración de oxígeno se midió con el método de Winkler espectrofotométrico, optimizado por Labasque et al. (2004) con la corrección de turbidez a 466 nm de (Roland et al. 1999), en un espectrofotómetro Pharmacia Ultrospec 3000. El valor mínimo registrado de oxígeno estuvo siempre por encima del umbral sub-letales de hipoxia de los organismos bentónicos de $2,05 \pm 0,09 \text{ mg L}^{-1}$ (Vaquer et al. 2008).

Al final del experimento, la masa seca se determinó por secado a $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 72 h. Los datos se expresaron en miligramo de oxígeno consumido por gramo de peso seco por día ($\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ psd}^{-1}$).

Este mismo diseño experimental se realizó en la tesis de postgrado de Torre (2013) en tres de las especies de ascidias más representativas de Caleta Potter: *Ascidia challengerii*, *Cnemidocarpa verrucosa* y *Molgula pedunculata* (Torre et al. 2012). Al igual que en dicha tesis, se calculó el coste energético (E_{inv}) durante la exposición de material particulado a partir del consumo de oxígeno

durante los tratamientos para *Malacobelemnon daytoni* como:

$$E_{Inv} = \sum_{i=1}^n (O_{sed_i} - O_{bas}) \cdot C_f$$

Expresado en $J \text{ gdm}^{-1}$

C_f : representa el factor de conversión de mg de O_2 a Jules (J) (Gnaiger 1983) e i : 5, 15, 100, 200, 400 y 600. Teniendo en cuenta que si se disminuye el consumo de oxígeno ($O_{sed} < O_{bas}$), E_{Inv} toma valores negativos.

Se consideró además a la concentración de sedimentos en la cual se midió el mayor consumo de oxígeno (O_{max}), y a la concentración en la cual se observó dicho consumo de oxígeno se denominó como concentración crítica (C_{crit}).

Por último, como actividad complementaria para aumentar el conocimiento a cerca de la tolerancia del sedimento en *Malacobelemnon daytoni*, en la campaña Antártica de verano 2012-2013 se llevó a cabo un experimento en acuario, bajo condiciones controladas, en el cual se colocaron 8 colonias en una pecera con sedimento de sustrato y flujo continuo (sin filtrar) directo de Caleta Potter. Estas colonias se cubrieron completamente con grandes cantidades de sedimento y se sacaron fotos cada seis horas mediante una cámara Nikon 3100 durante 72 hs con el fin de determinar el tiempo de desenterramiento de la especie.

Análisis estadístico

Se utilizó un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis con una posterior prueba de rangos múltiples descritos por Conover (1999) en la comparación en el consumo de oxígeno de *Malacobelemnon daytoni* en las diferentes concentraciones con el consumo basal. Para las comparaciones entre las cámaras experimentales y control se realizó una ANOVA y una prueba *a posteriori* Tukey en cada una de las concentraciones de sedimento.

Resultados

La exposición a concentraciones crecientes de sedimento no tuvo efecto significativo (3, 32; 3, 93; 3, 8; 3, 6; 3, 74; 3, 77; 3, 53; 3, 84 oxígeno consumido con 5; 50; 100; 200; 250; 300; 400; 600 mg.L⁻¹ respectivamente) (Kruskal-Wallis) en el consumo de oxígeno en *Malacobelemnion daytoni* con respecto al metabolismo basal, independientemente de la cantidad de sedimentos (Fig. IV 3).

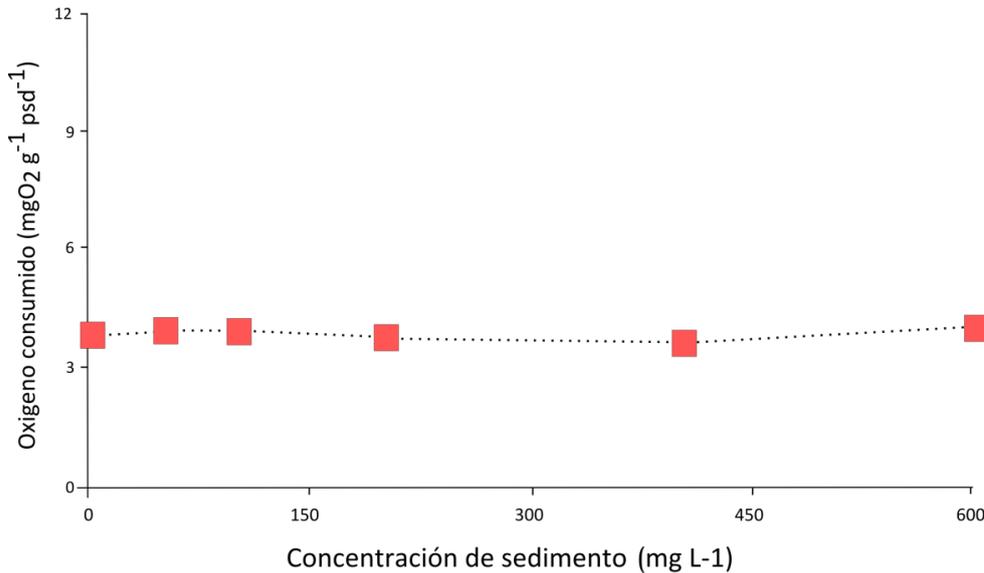


Figura IV 3: Consumo de oxígeno de *Malacobelemnion daytoni* a concentraciones crecientes de sedimento.

No se encontró una diferencia significativa entre el oxígeno medido en las cámaras experimentales en comparación con las cámaras controles (las que no se les aplicó ninguna concentración de sedimento) (Tabla IV 1 y Fig. IV 4).

Tabla IV 1: ANOVA de la concentración de oxígeno medida en las cámaras experimentales con las cámaras control. Se utilizó el test *a posteriori* Tukey.

Concentración	F	p
5	0,01	0,9273
50	0,12	0,7364
100	0,32	0,5812
200	2,12	0,1889
250	1,13	0,3229
300	0,002	0,9567
400	1,09	0,3304
600	3,85	0,0906

F estadístico; p significancia ($p < 0,05$).

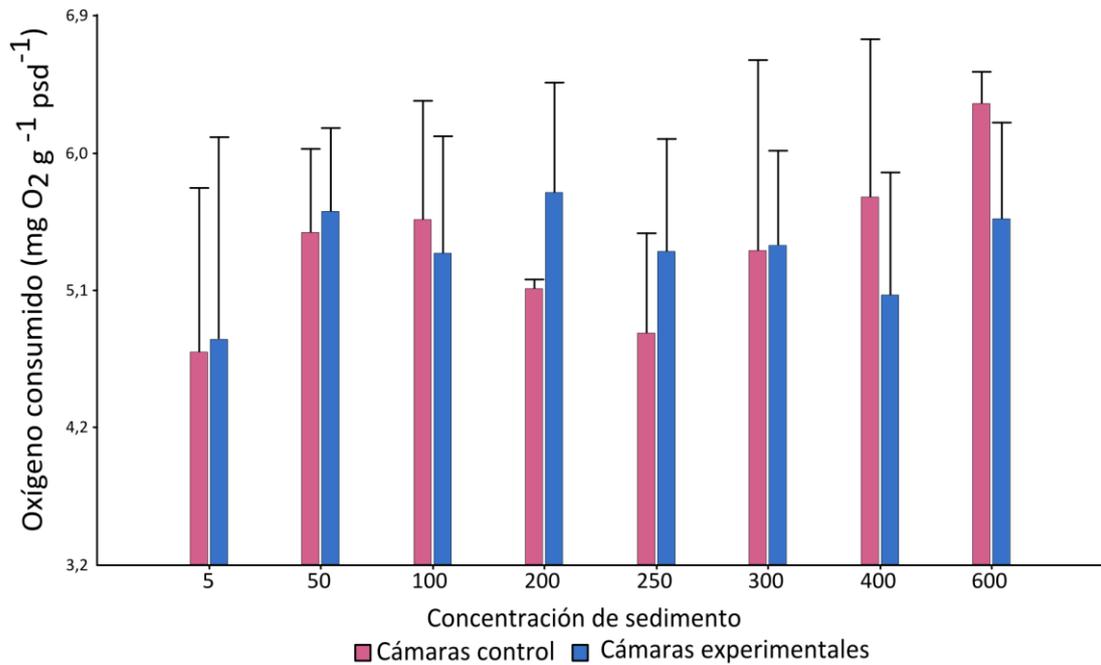


Figura IV 4: Comparación del consumo de oxígeno entre las cámaras experimentales y las cámaras controles. Las barras verticales indican desvío estándar.

Con respecto al efecto de grandes cantidades de sedimento cubriendo a las colonias, se observó que a las 60 hs todas las colonias se encontraron desenterradas y en ninguno de los casos se observó mortandad. Algunas de ellas se registraron con sus pólipos abiertos (Fig. IV 5, Apéndice I). A pesar de que en la figura (IV C) se observan todas las colonias, algunas de ellas en ese rango de tiempo (60 hs) se desenterraron y enterraron nuevamente, de igual manera, algunas abrieron sus pólipos y los volvieron a cerrar, a pesar de que en la figura solo dos se observan con sus pólipos abiertos (Fig. IV C y D).

El tiempo observado en los desenterramientos de cada colonia fue variado pero por lo general en menos de 12 horas (Apéndice I).

En cuanto a la clasificación de la sensibilidad sobre la base de C_{crit} , $O_{máx}$ y E_{inv} se observó que es *Malacobelemnion daytoni* la especie menos afectada mientras que *Molgula pedunculata* es la especie más sensible, seguida por *Cnemidocarpa verrucosa* por último *Ascidia challengerii*⁴ (Tabla IV 2).

⁴ Datos más detallados de ascidias con sus respectivos gráficos se pueden observar en Torre et al. (2012) al final de la presente tesis.

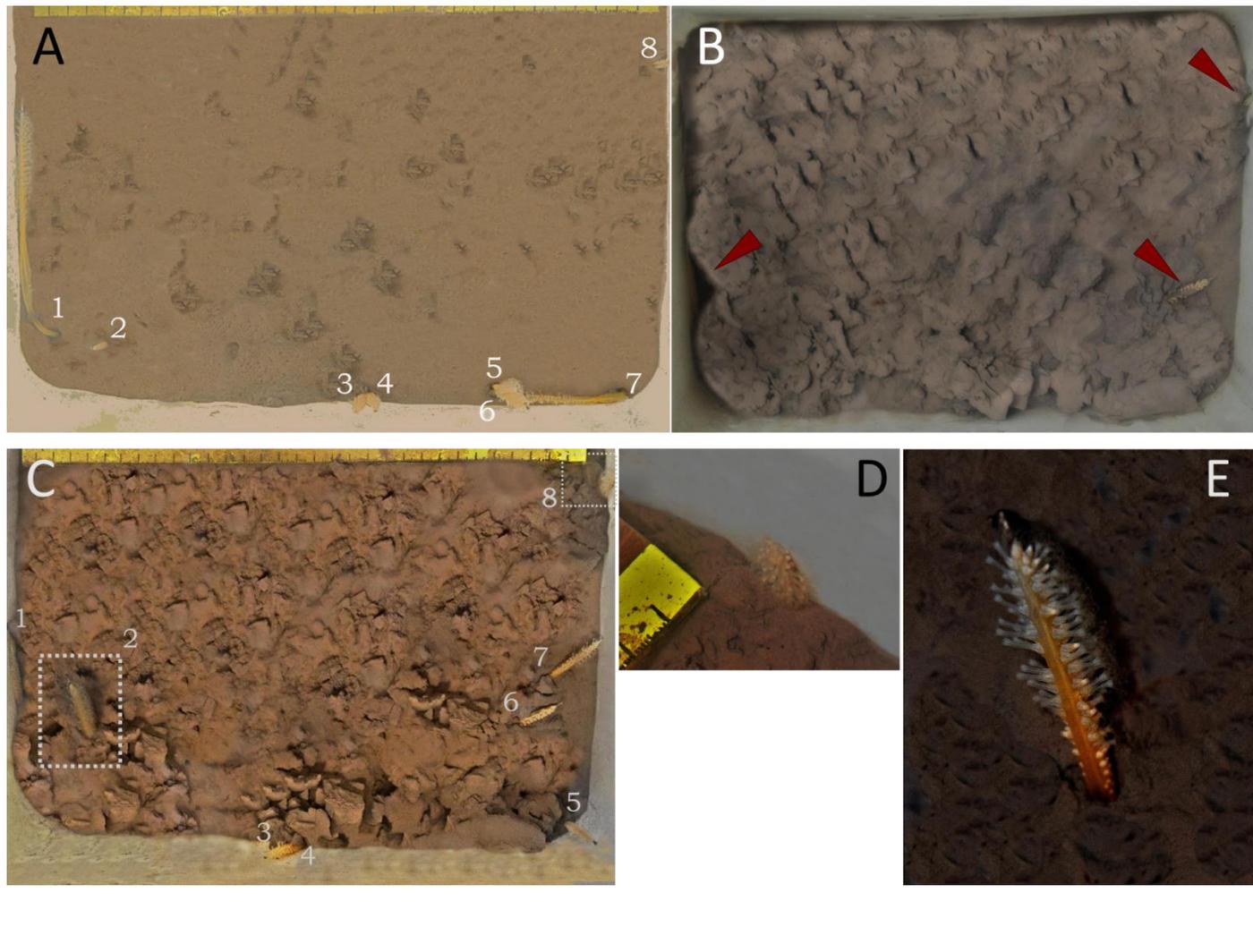


Figura IV 5: Efecto de elevadas cantidades de sedimento en *Malacobelemnion daytoni*. A Colonias aclimatadas, previo a cubrirlas con sedimento. B Post sedimento, en donde se observan algunas que quedaron sin ser cubiertas por sedimento en su totalidad (flecha). C Luego de 60 hs de observación; D y E detalle de C (8 y 2 respectivamente).

Tabla IV 2: Resumen de parámetros C_{crit} (mg L^{-1}), O_{max} , E_{inv} (gdm J^{-1}), para la estimación cualitativa de la sensibilidad relativa de sedimentos.

	C_{crit} (mg l^{-1})	E_{inv} (J gdm^{-1})	Sensibilidad	Fuente
<i>Molgula pedunculata</i>	10-50	$197,74 \pm 139,82$	Alta	Torre et al. 2012
<i>Cnemidocarpa verrucosa</i>	100	$28,93 \pm 102,70$	Media	Torre et al. 2012
<i>Ascidia challengerii</i>	200	$15,05 \pm 13,68$	Baja	Torre et al. 2012
<i>Laternula elliptica</i>	indefinida	–	Muy baja	Philipp et al. 2011
<i>Malacobelemnion daytoni</i>	indefinida	$-110,06 \pm 11,88$	Nula	Presente trabajo

± Desvío estándar;

Los resultados de la presente tesis, en adición a lo observado por Torre (2013) en las ascidias más abundantes de Caleta Potter, y el bivalvo *Laternula elliptica* (Philipp et al. 2011), proporcionan una primera aproximación para explicar los cambios observados en el bentos de Caleta Potter en los últimos años, basada en la respuesta de dichas especies al estrés causado por la carga de sedimentos.

El material inorgánico particulado en Caleta Potter ha registrado un aumento significativo desde 1991 principalmente en los meses de verano, con una marcada estratificación sobre todo en el sector interno de la caleta (Schloss et al. 2012). En el presente trabajo se ha observado que el pennatulaceo *Malacobelemnion daytoni* no se ve afectado frente a concentraciones aún muy por encima de las registradas actualmente en la caleta (de entre 19 a 36 mg.L⁻¹, Philipp et al. 2011). Contrariamente a lo observado en las ascidias más relevantes de Caleta Potter (*Ascidia challengerii*, *Cnemidocarpa verrucosa* y *Molgula pedunculata*), en donde las tres son afectadas, aunque en diferente medida, por las variaciones de sedimento en la columna de agua (Torre et al. 2013). *Molgula pedunculata* parece ser la especie más sensible, ya que reaccionó a las concentraciones más bajas de sedimento (5 a 50 mg L⁻¹). Estos resultados concuerdan con los cambios observados en las comunidades en los últimos 15 años en Caleta Potter, ya que es ésta especie la que disminuyó más dramáticamente en abundancia en los rangos de profundidad más afectados por el sedimento, restringiendo su rango de distribución a los 25 m, profundidad en la cual su % cobertura a su vez también disminuyó (Sahade et al. 1998; Sahade et al. *en preparación*).

De manera similar a lo que se observó en *Malacobelemnion daytoni* se encontró en *Laternula elliptica* (Phillipp et al. 2011), si bien son esperadas las diferencias en los niveles de tolerancia al sedimento entre estos y los grupos de ascidias ya mencionados, en *Laternula elliptica* se observó una disminución de un 20 % del metabolismo a concentraciones de 300 y 700 mg.L⁻¹ en comparación con el metabolismo basal. Esto, según dichos autores, se debe a que frente a determinadas concentraciones de sedimento el bivalvo cierra las valvas, con una consecuente disminución en el consumo de oxígeno, para disminuir, de esta manera, la ingesta de partículas inorgánicas.

Con respecto a *Malacobelemnion daytoni* es poco lo que se conoce en cuanto a la respiración en pennatulaceos, además de que carecen de estructuras especiales para esta función. Hasta la fecha se cuenta con sólo un trabajo realizado en *Pteroides griseum* (Brafield y Chapman 1967). En

este se observó que son el ectodermo y el endodermo los responsables de la respiración, este último encargado de dos tercios de la respiración en las colonias expandidas, generando la irrigación en la cavidad interna (enteron) a partir de movimientos peristálticos. Esto sugiere que el intercambio gaseoso no sería particularmente afectado por grandes cantidades de material inorgánico, como sería de esperar en organismos que cuentan con estructuras especiales que pueden ser afectadas por los sedimentos. En ascidias, por ejemplo, el hecho de aumentar sus tasas de respiración frente a determinada concentración de sedimentos, se debe a que estas especies incrementan su actividad ciliar, la producción de mucus y el squirting (excreción de partículas no digeribles) para hacer frente al aumento del material inorgánico que ocluye el saco branquial, estructura con funciones respiratorias y de alimentación (Torre 2013). Mientras que, la consiguiente disminución en el consumo de oxígeno por encima de una determinada concentración (C_{max}) (Torre et al. 2012) se asocia a una reducción de la actividad de filtración a altas concentraciones de MPS (Petersen 2007) ya que, las obstrucciones de las estructuras respiratorias pueden reducir aún más el consumo de oxígeno, reduciendo por lo tanto el metabolismo aeróbico (Modig y Ólafsson 1998). Esta reacción diferencial de cada una de las ascidias se debe, probablemente, a las características morfológicas de cada especie, siendo las ascidias chatas las que mejor toleran el sedimento en comparación con las pedunculadas (Torre et al. 2012), siendo estas últimas las que más dramáticamente han reducido su abundancia dentro de la zona afectada por los sedimentos (Sahade et al. 1998; Sahade et al. *en preparación*).

De manera similar a lo observado por Torre (2013), los presentes resultados de sensibilidad de todas las especies comparadas sugieren que la sedimentación puede estar jugando un papel importante en el patrón de zonación observado en las comunidades en Caleta Potter. Aparentemente favoreciendo a *Malacobelemnion daytoni* de manera indirecta al actuar tan fuertemente sobre el resto de las especies. Conjuntamente con la disminución de la presión competitiva es probable que el éxito de *Malacobelemnion daytoni* este también relacionado con su estrategia reproductiva, que, como mencioné en capítulos anteriores, exhibiría una maduración muy rápida comparada con otros invertebrados antárticos como así también, un ciclo que podría tener hasta dos períodos de desove anual, lo que no se ha observado en ningún otro organismo antártico. Por otro lado, posiblemente una elevada tasa de crecimiento contribuya también a este aumento poblacional. Por último, el hecho de que esta especie cuente con la capacidad de enterrarse y desenterrarse, permaneciendo a su vez largas horas bajo el sedimento, podría ser una herramienta del grupo frente a determinadas perturbaciones como las causadas por el hielo (Ambroso et al. 2013). Si bien el tiempo de enterramiento de esta especie lleva varias horas en concretarse como se ha observado en los resultados de este capítulo y en datos no

presentados en esta tesis, se ha observado que este comportamiento ocurre en lapsos de segundos en el pennatulaceo *Virgularia mirabilis* aunque las razones de por que lo hacen no están del todo claras, no se descarta que podría ser una estrategia útil al momento de prevenir la predación (Ambroso et al. 2013).

Si bien hasta la fecha no se han realizado estudios en Antártida focalizados en el sedimento como principal factor en los patrones de zonación, si se ha llevado a cabo en el polo norte. Un trabajo realizado por Wlodarska-Kowalczuk y Weslawski (2001) en el Ártico propone al sedimento como un factor que afecta de manera negativa la biodiversidad bentónica. Por otro lado, un trabajo más reciente realizado por los mismos autores describe un patrón de zonación horizontal asociado a la distancia al glaciar. Estos observaron que son las especies móviles de baja biomasa las especies más abundantes próximas al glaciar (Wlodarska-Kowalczuk et al. 2005). Por lo que, se propone en el presente trabajo, que el sedimento estaría jugando un papel importante en la reestructuración de las comunidades bentónicas de Caleta Potter, debido a la diferente respuesta metabólica que encontramos en cada una de las especies comparadas. Acompañado a las descargas de sedimento, el bentos no solo debe hacer frente el aumento de material inorgánico en la columna de agua, sino además, un aumento de turbidez que ocasiona una disminución de la producción primaria. Por otro lado, como ya se mencionó, uno de los impactos más estudiados en el bentos de ambientes polares es el impacto del hielo y a mayores profundidades la competencia (Teixidó et al. 2004), todos estos factores se encuentran interconectados, y la separación de sus efectos sobre las comunidades bentónicas es de difícil comprensión.

En este contexto y ya sea de manera indirecta por el efecto del sedimento sobre otras especies, sumado a las estrategias reproductivas y de crecimiento de *Malacobelemnon daytoni* es esta la especie que se encuentra actualmente favorecida frente a las condiciones registradas en Caleta Potter.

CAPITULO V

CONCLUSIONES GENERALES



Objetivo CAPITULO II

1. Estudiar la biología reproductiva de *Malacobelemnon daytoni* analizando la estacionalidad, la energética y la estrategia exhibida por la especie.

Objetivos específicos

1. Conocer aspectos básicos de la reproducción en *Malacobelemnon daytoni*.
2. Verificar si el gonocorismo y la liberación de gametos son características fijadas al grupo.
3. Evaluar si la biología reproductiva de la especie podría ayudar a explicar el éxito ecológico de la especie en la comunidad bentónica de Caleta Potter.
4. Estudiar la estacionalidad reproductiva de *Malacobelemnon daytoni*.
5. Observar el patrón de maduración en machos y hembras.
6. Evaluar si la estacionalidad reproductiva de la especie podría ayudar a explicar el éxito ecológico de la especie en la comunidad de Caleta Potter.

Conclusiones



La proporción de sexos de *Malacobelemnon daytoni* no cambió significativamente de 1:1 a lo largo de los años estudiados. Dicha relación representa la asignación óptima de los recursos prevista en una población con apareamiento al azar, lo cual se observó también en otras especies de pennatuláceos como *Funiculina quadrangularis*, *Pennatula phosphorea*, *Kophobelemnon stelliferum*, *Anthoptilum murrayi* y *Anthoptilum grandiflorum* (Edwards y Moore 2008; 2009; Rice et al. 1992; Pires et al. 2009; Baillon et al. 2013)



La ausencia de gametos, ya sea femeninos como masculinos, en el pedúnculo (24% de la longitud total de la colonia) señala que esta región es invariablemente estéril. Las células reproductivas son generadas por la gastrodermis a lo largo del canal longitudinal, donde se encuentra la mayor cantidad de ellas. En los autozoides del sector superior del raquis sólo se observaron células reproductivas maduras. Esto sugiere que tanto oocitos como quistes migrarían

a lo largo del canal longitudinal y son puestos en libertad por los autozoides en el extremo apical de la colonia



Malacobelemnon daytoni es una especie gonocórica, de fecundación externa y con larvas lecitotróficas, tal como las especies de pennatuláceos estudiadas hasta la fecha. Por otra parte ni especies incubadoras ni hermafroditismo se ha observado en especies del orden Pennatulacea, por lo que al incluir una especie antártica, abarcando el máximo rango latitudinal, se sugiere que estas características podrían estar fijadas filogenéticamente en el grupo



Resulta llamativa la presencia de oocitos maduros en colonias muy pequeñas (a partir de 1,5 cm de largo de la colonia se observaron oocitos maduros) en comparación con el resto de las especies del mismo grupo. Esta madurez temprana podría ayudar a explicar el éxito ecológico de *Malacobelemnon daytoni* en un área como Caleta Potter



Se observó una marcada estacionalidad en los oocitos maduros $> 200 \mu\text{m}$, lo que sugiere la mantención de un elevado pool de oocitos hasta determinado tamaño, y, frente a determinadas señales, completan la maduración necesaria para ser liberados y desovan de manera sincronizada. El momento de la maduración final y desove de *Malacobelemnon daytoni* se sugiere que ocurre más de una vez al año, uno bien marcado en verano y posiblemente, otro menos notorio en primavera, lo cual también ayuda a explicar el éxito ecológico que la especie tiene en dicha área.



En el presente estudio se ha observado que ambos sexos muestran un patrón similar en cuanto al uso de energía disponible para la especie, en donde ambas células reproductivas aumentan su tamaño de manera sincrónica con aumentos en el MPS. Esta estrategia le permitiría a la especie, aunque no siempre este aumento finalice en desove, aprovechar el material detrítico depositado en el fondo, y proveer de energía a las células reproductivas a lo largo de todo el año, reduciendo así la marcada estacionalidad energética descrita para el bentos Antártico.



Se observó muy poca variación en cuanto al patrón mensual de variación en los tamaños de los oocitos en los dos años estudiados (2009 – 2010) aunque el tamaño registrado fue consistentemente mayor en 2009, lo que sugiere que el momento en el que ocurre el desove no sería tan diferente de un año al siguiente. Esto podría estar asociado a la dieta de la especie. Aunque si lo fue en cuanto al esfuerzo reproductivo (índice de fecundidad efectivo y

tamaño medio de los oocitos), los cuales fueron mayores en el año 2009, posiblemente asociados a una mayor disponibilidad de alimento en ese año.

Ecología trófica

Objetivo CAPITULO III

1. Analizar la posición trófica de *Malacobelemnion daytoni* en el ecosistema y su estrategia alimentaria.

Objetivos específicos

1. Analizar las variaciones estacionales en el balance bioquímico (lípidos, proteínas y carbohidratos) de *Malacobelemnion daytoni*, que podrían estar relacionadas con variaciones ambientales.
2. Identificar y cuantificar temporalmente los principales Ácidos Grasos presentes en *Malacobelemnion daytoni*.
3. Validar los resultados obtenidos por medio de los ácidos grasos con el análisis de los isótopos estables de C y N y compararlo con otros organismos.

Conclusiones



Malacobelemnion daytoni cuenta con bajas concentraciones de lípidos a lo largo de todo el año, mientras que la concentración de carbohidratos fue más elevada. Esto podría estar asociado a que en esta especie no se observaron algas simbiotas, estas últimas importantes en la translocación de los lípidos de las células de algas en el tejido de cnidarios.

Los valores estacionales de lípidos podrían estar ligados a los ciclos reproductivos aunque el hecho de no poder realizar la separación entre machos y hembras hace que este análisis pueda estar sesgado por no conocer la proporción de machos en cada uno de los meses, por lo que para afirmar esta conclusión se requiere de posteriores estudios.

Por otro lado, la estacionalidad observada en la concentración de proteínas podría estar asociada con un crecimiento estacional de la especie, principalmente en los meses de verano e invierno (Fig. III 5).

Según las fluctuaciones de carbohidratos en el periodo estudiado, probablemente indique que la estacionalidad en cuanto a los periodos de agotamiento de alimento en otoño e invierno no sea tan marcada, debido a eventos de resuspensión.



Según los resultados obtenidos mediante la utilización de biomarcadores como Ácidos Grasos e Isótopos estables, indican que esta especie cuenta con una amplia variedad de fuentes de alimento, señalando a esta especie como predadora y con una dieta omnívora/oportunista lo cual podría ayudarnos a comprender el éxito que esta tiene en Caleta Potter. Por otro lado, se observó además que tanto los fitodetritos como las diatomeas bentónicas que habitan el fondo de la caleta, forman parte importante en la dieta de *Malacobelemnion daytoni*, probablemente mediante la resuspensión. No se encontró mucha variación en cuanto a los componentes de la dieta en las diferentes estaciones (Fig. III 6) por lo que se sugiere en el presente trabajo que la estacionalidad en la disponibilidad de alimento en esta especie no es tan marcada



Se encontró una marcada coincidencia entre los dos marcadores tróficos utilizados; AGs e isótopos estables. Ambos métodos resultan complemento y de gran importancia en esta especie, ya que los métodos tradicionales como experimentos de pastoreo y de contenidos estomacales resultaron poco precisos en *Malacobelemnion daytoni*.

Efecto del sedimento

Objetivo CAPITULO IV

1. Analizar la sensibilidad de la especie a la carga de sedimentos (material inorgánico particulado) en la columna de agua.

Objetivos específicos

1. Estudiar el consumo de oxígeno en *Malacobelemnion daytoni* frente a concentraciones crecientes de sedimento.
2. Comparar la sensibilidad de la especie con ascidias más abundantes de Caleta Potter frente a las diferentes concentraciones de sedimento.
3. Evaluar si la tolerancia a la carga de sedimento podría ayudar a explicar el creciente éxito

ecológico de la especie en la comunidad de Caleta Potter.

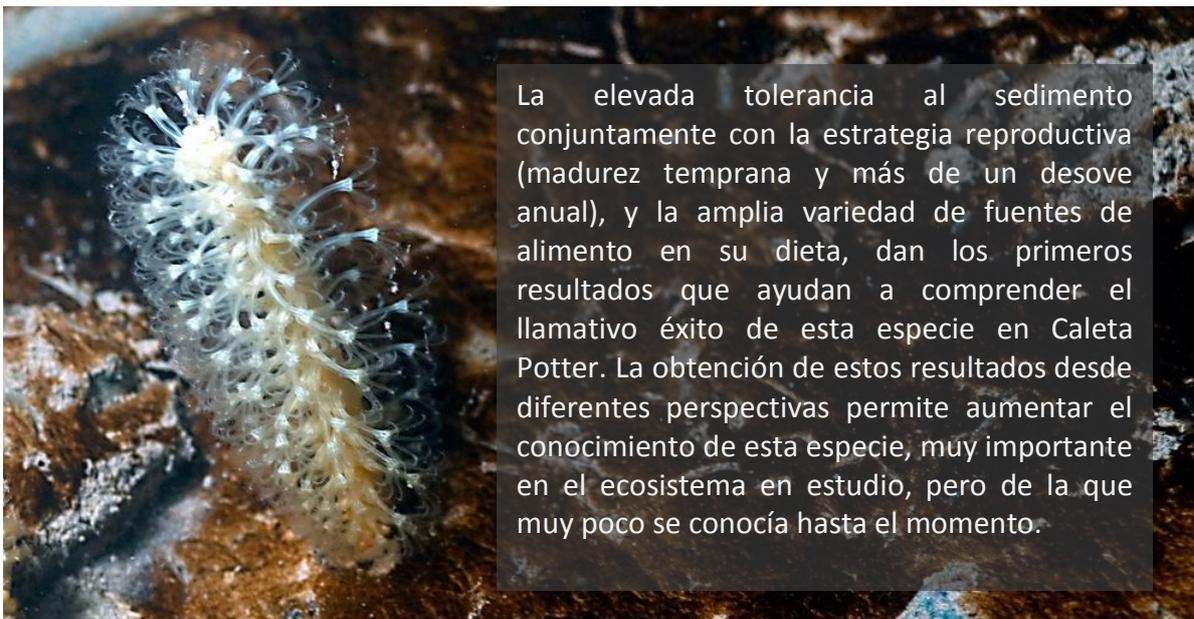
Conclusiones



En el presente trabajo se ha observado que el pennatulaceo *Malacobelemnion daytoni* no se ve afectado, en cuanto al consumo de oxígeno, frente a concentraciones de sedimento aún muy por encima de las registradas actualmente en Caleta Potter, por el contrario, puede permanecer durante varias horas enterrado completamente en el sedimento como así también desenterrarse y reenterrarse en lapsos menores a doce horas, lo cual podría ser una herramienta del grupo para hacer frente a determinadas perturbaciones.



Los presentes resultados de sensibilidad frente a diferentes concentraciones de sedimento en *Malacobelemnion daytoni*, en comparación con el resto de las especies más relevantes de Caleta Potter, sugieren que la sedimentación puede estar jugando un papel importante en los cambios observados en las comunidades en dicha área. Aparentemente favoreciendo al pennatulaceo de manera indirecta al actuar tan fuertemente sobre el resto de las especies.



La elevada tolerancia al sedimento conjuntamente con la estrategia reproductiva (madurez temprana y más de un desove anual), y la amplia variedad de fuentes de alimento en su dieta, dan los primeros resultados que ayudan a comprender el llamativo éxito de esta especie en Caleta Potter. La obtención de estos resultados desde diferentes perspectivas permite aumentar el conocimiento de esta especie, muy importante en el ecosistema en estudio, pero de la que muy poco se conocía hasta el momento.

Referencias bibliográficas

Ahn IY, Surh J, Park YG, Kwon H, Choi KS, Kang SH, Choi HJ, Kim KW, Chung H (2003) Growth and seasonal energetics of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* from King George Island, Antarctica. *Marine Ecology Progress Series* 257: 99-110

Akoumianaki I, Papaspyrou S, Kormas KA, Nicolaidou A (2013) Environmental variation and macrofauna response in a coastal area influenced by land runoff. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 132: 34-44

Al-Lihaibi SS, Al-Sofyani AA, Niaz GR (1998) Chemical composition of corals in Saudi Red sea coast. *Oceanologica acta* 21(3): 495-501

Al-Moghrabi S, Allemand D, Couret JM, Jaubert J (1995) Fatty acids of the scleractinian coral *Galaxea fascicularis*: effect of light and feeding. *Journal of Comparative Physiology B* 165(3): 183-192

Ambroso S, Dominguez-Carrió C, Grinyó J, López-González PJ, Gili JM, Purroy A, Requena S, Madurell T (2013). In situ observations on withdrawal behaviour of the sea pen *Virgularia mirabilis*. *Marine Biodiversity*. DOI 10.1007/s12526-013-0172-5

Arntz WE, Gili JM (2001) A case for tolerance in marine ecology: let us not put the baby with the bathwater. *Scientia Marina* 65: 283–299

Arrigo KR, van Dijken GL (2003) Impact of iceberg C-19 on Ross Sea primary production. *Geophysical Research Letters* 30

Arrigo K, van Dijken GL, Ainley DG, Fahnestock MA, Markus T (2002) Ecological impact of a large Antarctic iceberg. *Geophysical Research Letters* 29

Atkinson A, Siegel V, Pakhomov E, Rothery P (2004) Long-term decline in krill stock and increase in salps within the Southern Ocean. *Nature* 432: 100-103

Baillon S, Hamel JF, Wareham VE, Mercier A (2013) Seasonality in reproduction of the deep-water pennatulacean coral *Anthoptilum grandiflorum*. *Marine Biology* DOI 10.1007/s00227-013-2311-8

Baptista M, Lopes VM, Pimentel MS, Bandarra N, Narciso L, Marques A, Rosa R (2012) Temporal fatty acid dynamics of the octocoral *Veretillum cynomorium*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 161(2): 178-187

Barnes H, Blackstock J (1973) Estimation of lipids in marine animals tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for “total” lipids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 12: 103–118

Barnes DK, y Clarke A (1995) Seasonality of feeding activity in Antarctic suspension feeders. *Polar Biology* 15(5): 335-340

Barnes DKA, Clarke A (1998) Seasonality of polypide recycling and sexual reproduction in some erect Antarctic bryozoans. *Marine Biology* 131: 647–658

Barnes DK, Souster T (2011) Reduced survival of Antarctic benthos linked to climate-induced iceberg scouring. *Nature Climate Change* 1(7): 365–368

Beiring EA, Lasker HR (2000) Egg production by colonies of a gorgonian coral. *Marine Ecology Progress Series* 196: 169–177

Ben-David-Zaslow R, Henning RG, Hofmann DK, Benayahu Y (1999) Reproduction in the Red Sea soft coral *Heteroxenia fuscescens*: seasonality and long term record (1991–1997). *Marine Biology* 133: 553–559

Benayahu Y, Loya Y (1986) Sexual reproduction of a soft coral: synchronous and brief annual spawning of *Sarcophyton glaucum* (Quoy & Gaimard, 1833). *Biological Bulletin* 170: 32–42

Bowden DA (2005) Benthic assemblage development and larval ecology of marine invertebrates at Adelaide Island, Antarctica. PhD thesis, The Open University

Brafield AE, Chapman G (1967) The respiration of *Pteroides griseum* (Bohadsch) a pennatulid coelenterate. *Journal of Experimental Biology* 46(1): 97–104

Braun M, Gossmann H (2002) Glacial changes in the areas of Admiralty Bay and Potter Cove, King George Island, maritime Antarctica. In *Geoecology of Antarctic Ice-Free Coastal Landscapes* (pp. 75–89). Springer Berlin Heidelberg

Brito TAS, Tyler PA, Clarke A (1997) Reproductive biology of the Antarctic octocoral *Thouarella variabilis* Wright and Studer, 1889. In J.C. den Hartog (ed.): *Proceedings of the 6th International Conference on Coelenterate Biology*. Pp. 63–69. Leiden: National Natural History Museum

C

Carballeira NM, Sostre A, Rodríguez AD (1996) Phospholipid fatty acid composition of gorgonians of the genus *Pseudopterogorgia*: Identification of tetracosapolyenoic acids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 113(4): 781–783

Carballeira NM, Anthony S, Rodríguez AD (1997) Phospholipid fatty acid composition of gorgonians of the genus *Eunicea*: Further identification of tetracosapolyenoic acids. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B* 118: 257–260

Carballeira NM, Miranda C, Rodríguez AD (2002) Phospholipid fatty acid composition of *Gorgonia mariae* and *Gorgonia ventalina*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 131(1): 83–87

Carrier A, Riera P, Amouroux JM, Bodiou JY, Grémare A (2007) Benthic trophic network in the Bay of Banyuls-sur-Mer (northwest Mediterranean, France): an assessment based on stable carbon and nitrogen isotopes analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 72(1): 1–15

Chia FS, Crawford BJ (1973) Some observations on gametogenesis, larval development and substratum selection of the sea pen *Ptilosarcus guerneyi*. *Marine Biology* 23: 73–82

Chiantore M, Cattaneo-Vietti R, Elia L, Guidetti M, Antonini M (2002) Reproduction and condition of the scallop *Adamussium colbecki* (Smith 1902), the sea-urchin *Sterechinus neumayeri* (Meissner 1900) and the sea-star *Odontaster validus* (Koehler 1911) at Terra Nova Bay (Ross Sea): different strategies related to inter-annual variations in food availability. *Polar Biology* 25 (4): 251–255

Christie W (1973) Lipid Analysis. *Pergamon Press* Pp 250

Clarke A, Johnston NM (2003) Antarctic marine benthic diversity. *Oceanography and Marine Biology, an Annual Review, Volume 41: An Annual Review* 41: 47-114

Clarke A (1996) Marine benthic populations in Antarctica: patterns and processes. En: Ross RM, Hofmann EE, Quetin LB (Eds) Foundations for ecological research west of the Antarctic peninsula. *Antarctic Research Series* 70:373–388

Conover WJ (1999). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley & Sons, Inc., New York

Coma R, Ribes M, Zabala M, Gili JM (1995) Reproduction and cycle of gonads development in the Mediterranean gorgonian *Paramuricea clavata*. *Marine Ecology Progress Series* 117: 173–183

Cook AJ, Fox AJ, Vaughan DG, Ferrigno JG (2005) Retreating Glacier Fronts on the Antarctic Peninsula over the Past Half-Century. *Science* 308: 541-544

Cordes EE, Nybakken JW, Van Dykhuizen G (2001) Reproduction and growth of *Anthomastus ritteri* (Octocorallia: Alcyonacea) from Monterey Bay, California, USA. *Marine Biology* 138: 491-501

Cripps GC, Clarke A (1998) Seasonal variation in the biochemical composition of the particulate material collected by sediment traps at Signy Island, Antarctica. *Polar Biology* 20: 414–423

D

Dahan M, Benayahu Y (1997a) Reproduction of *Dendronephthya hemprichi* (Cnidaria: Octocorallia): year-round spawning in an azooxanthellate soft coral. *Marine Biology* 129: 573–579

Dahan M, Benayahu Y (1997b) Clonal propagation by the azooxanthellate octocoral *Dendronephthya hemprichi*. *Coral Reefs* 16: 5–12

Dalsgaard J, St John M, Kattner G, Müller-Navarra D, Hagen W (2003) Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Advances in marine biology* 46: 225-340

Dayton PK, Robilliard GA, Paine RT, Dayton LB (1974) Biological accommodation in the benthic community at McMurdo Sound, Antarctica. *Ecological Monographs* 105-128

DeNiro MJ y Epstein S (1978) Influence of the diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42: 495-506

Dierssen HM, Smith RC, Vernet M (2002) Glacial meltwater dynamics in coastal waters west of the Antarctic peninsula. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 1790–5

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350–356

Dunton KH (2001) $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ measurements of Antarctic Peninsula fauna: trophic relationships and assimilation of benthic sea weeds. *American Zoologist* 41: 99–112

E

Eckelbarger KJ, Tyler PA, Langton RW (1998) Gonadal morphology and gametogenesis in the sea pen *Pennatula aculeata* (Anthozoa: Pennatulacea) from the Gulf of Maine. *Marine Biology* 132: 677–690

Edwards DCB, Moore CG (2008) Reproduction in the sea pen *Pennatula phosphorea* (Anthozoa: Pennatulacea) from the west coast of Scotland. *Marine Biology* 155: 303–314

Edwards DCB, Moore CG (2009) Reproduction in the sea pen *Funiculina quadrangularis* (Anthozoa: Pennatulacea). *Estuarine Coastal and Shelf Science* 82: 161–168

Elias-Piera F, Rossi S, Gili JM, Orejas C (2013) Trophic ecology of seven Antarctic gorgonian species. *Marine Ecology Progress Series* 477: 93-106

F

Fadlallah YH, Pearse JS (1982) Sexual reproduction in solitary corals: overlapping oogenic and brooding cycles, and benthic planulas in *Balanophyllia elegans*. *Marine Biology* 71: 223–231

Falk Petersen S, Hopkins CC, Sargent JR (1990) Trophic relationships in the pelagic, Arctic food web. En Barnes M, Gibson RN (Eds.) "Trophic relationships in marine environments". Proceedings of the 24th European Marine Biology Symposium. Oban, Scotland. Pp. 315-333

Falk Petersen SC, Sargent JR, Lonne OJ, Timofeev S (1999) Functional biodiversity of lipids in Antarctic zooplankton: *Calanoides acutus*, *Calanus propinquus*, *Thysanoessa macrura* and *Euphausia crystallorophias*. *Polar Biology* 21: 37-47

Falk Petersen S, Hagen W, Kattner G, Clarke A, Sargent J (2000) Lipids, trophic relationships, and biodiversity in Arctic and Antarctic krill. *Canadian Journal of Fishery and Aquatic Science* 57: 178–191.

Fuentes V (2006) Estudio de la Comunidad Zooplanctónica de Caleta Potter y Bahía Guardia Nacional (Isla 25 de Mayo): su Rol en la Dinámica del Carbono en Zonas Costeras Antárticas. Tesis de doctorado. Universidad de Buenos Aires. Pp 197.

- Gallardo CS, Penchaszadeh PE (2001) Hatching mode and latitude in marine gastropods: revisiting Thorson's paradigm in the Southern Hemisphere. *Marine Biology* 138: 547-552
- Gili JM, Arntz WE, Palanques A, Orejas C, Clarke A, Dayton P, Isla E, Teixidó N, Rossi S, López-González PJ (2006) A unique assemblage of epibenthic sessile suspension feeders with archaic features in the high-Antarctic. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 53(8): 1029-1052
- Gili JM, Orejas C, Isla E, Rossi S, Arntz WE (2009) Seasonality on the high Antarctic benthic shelf communities? En: Turner J, Convey P, Prisco G, Mayewski P, Hodgson D, Fahrbach E, Bindschadler B (Eds.) Antarctic climate change and the environment. ACCE Report, Cambridge University Press, Cambridge, 276–278
- Gnaiger E (1983) Calculation on energetic and biochemical equivalents of respiratory oxygen consumption. In: Gnaiger E, Forstner H (Eds) Polarographic oxygen Sensors. Springer, Berlin, Germany 337–345
- Goffredo S, Arnone S, Zaccanti F (2002) Sexual reproduction in the Mediterranean solitary coral *Balanophyllia europaea* (Scleractinia, Dendrophylliidae). *Marine Ecology Progress Series* 229: 83-94
- Gori A, Linares C, Rossi S, Coma R, Gili JM (2007) Spatial variability in reproductive cycle of the gorgonians *Paramuricea clavata* and *Eunicella singularis* (Anthozoa, Octocorallia) in the Western Mediterranean Sea. *Marine Biology* 151(4): 1571-1584
- Gori A, Viladrich N, Gili JM, Kotta M, Cucio C, Magni L, Bramanti L, Rossi S (2012) Reproductive cycle and trophic ecology in deep versus shallow populations of the Mediterranean gorgonian *Eunicella singularis* (Cap de Creus, northwestern Mediterranean Sea). *Coral reefs* 31(3): 823-837
- Graeve M, Dauby P, Iscalteur Y (2001) Combined lipid, fatty acid and digestive tract content analyses: a penetrating approach to estimate feeding modes of Antarctic amphipods. *Polar Biology* 24: 853-862
- Graeve M, Kattner G, Hagen W (1994) Diet induced changes in the fatty acid composition of Arctic herbivorous copepods: Experimental evidence of trophic markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 182: 97-110
- Grange LJ, Tyler PA, Peck LS (2007) Multi-year observations on the gametogenic ecology of the Antarctic seaster *Odontaster validus*. *Marine Biology* 153: 15-13.
- Grange LJ, Tyler PA, Peck LS, Cornelius N (2004) Long-term interannual cycles of the gametogenic ecology of the Antarctic brittle star *Ophionotus victoriae*. *Marine Ecology Progress Series* 278: 141-155
- Grange LJ, Peck LS, Tyler PA (2011) Reproductive ecology of the circumpolar Antarctic nemertean *Parborlasia corrugatus*: No evidence for inter-annual variation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 404: 98-107
- Grillo MC, Goldberg WM, Allemand D (1993) Skeleton and sclerite formation in the precious red coral *Corallium rubrum*. *Marine Biology* 117:119–128

Gutt J (2001) On the direct impact of ice on marine benthic communities, a review. *Polar Biology* 24: 553-564

Gutt J, Cape M, Dimmler W, Fillinger L, Isla E, Lieb V, Lundälv, C, Pulcher C (2013) Shifts in Antarctic megabenthic structure after ice-shelf disintegration in the Larsen area east of the Antarctic Peninsula. *Polar Biology* 1-12

Gutt J, Gerdes D, Klages M (1992) Seasonality and spatial variability in the reproduction of two Antarctic holothurians (Echinodermata). *Polar Biology* 11: 533-544

Gutt J, Starmans A (2001) Quantification of iceberg impact and benthic recolonization patterns in the Weddell Sea (Antarctica). *Polar Biology* 24: 615-619

Gutt J, Piepenburg D (2003) Scale-dependent impact on diversity of Antarctic benthos caused by grounding of icebergs. *Marine Ecology Progress Series* 253: 77-83

H

Harland AD, Davies PS, Fixter LM (1992) Lipid content of some Caribbean corals in relation to depth and light. *Marine Biology* 113: 357-361

Hellström M, Kavanagh K, Benzie J (2010) Multiple spawning event and sexual reproduction in the octocoral *Sarcophyton elegans* (Cnidaria: Alcyonacea) on Lizard Island, Great Barrier Reef. *Marine Biology* 157: 383-392

Hirons AC, Schell DM, Finney BP (2001) Temporal records of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in North Pacific pinnipeds: inferences regarding environmental change and diet. *Oecologia* 129: 591-601

Houlbrèque F, Tambutté E, Ferrier-Pagès C (2003) Effect of zooplankton availability on the rates of photosynthesis and tissue and skeletal growth in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 296: 145-166

Hwang SJ, Song JI (2007) Reproductive biology and larval development of the temperate soft coral *Dendronephthya gigantea* (Alcyonacea: Nephtheidae). *Marine Biology* 152(2): 273-284

I

Iken K, Brey T, Wand U, Voigt J, Junghans P (2001) Food web structure of the benthic community at the Porcupine Abyssal Plain (NE Atlantic): a stable isotope analysis. *Progress in Oceanography* 50(1): 383-405

Imbs A, Luu H, Pham L (2007a) Intra- and interspecific variability of fatty acid composition of soft corals. *Russian Journal of Marine Biology* 33: 67-70

Imbs AB, Dautova TN (2008) Use of lipids for chemotaxonomy of octocorals (Cnidaria: Alcyonaria). *Russian Journal of Marine Biology* 34: 174-178

Imbs AB, Demidkova DA, Latypov YY, Pham QL (2007b) Application of fatty acids for chemotaxonomy of reef-building corals. *Lipids* 42: 1035-1046

Imbs A, Demidkova D, Dautova T, Latyshev N (2009) Fatty Acid biomarkers of symbionts and unusual inhibition of tetracosapolyenoic acid biosynthesis in corals (Octocorallia). *Lipids* 44: 325–335

Imbs AB, Latyshev NA, Zhukova NV, Dautova TN (2007c) Comparison of fatty acid compositions of azooxanthellate *Dendronephthya* and zooxanthellate soft coral species. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 148: 314–321

Imbs AB, Yakovleva IM, Pham LQ (2010) Distribution of lipids and fatty acids in the zooxanthellae and host of the soft coral *Sinularia* sp. *Fisheries Science*, 76(2): 375-380

Imbs AB (2013) Fatty acids and other lipids of corals: Composition, distribution, and biosynthesis. *Russian Journal of Marine Biology* 39(3): 153-168

Isla E, Gerdes D, Rossi S, Fiorillo I, Sañé E, Gili JM, Arntz WE (2011) Biochemical characteristics of surface sediments on the eastern Weddell Sea continental shelf, Antarctica: is there any evidence of seasonal patterns? *Polar biology* 34(8): 1125-1133

Isla E, Rossi S, Palanques A, Gili JM, Gerdes D, Arntz WE (2006) Biochemical composition of marine sediment from the eastern Weddell Sea (Antarctica): high nutritive value in a high benthic-biomass environment. *Journal of Marine Systems* 60: 255–267

J

Jacob U, Mintenbeck K, Brey T, Knust R, Beyer K (2005) Stable isotope food web studies: a case for standardized sample treatment. *Marine Ecology Progress Series* 287: 251-253

K

Kaehler S, Pakhomov EA, McQuaid CD (2000) Trophic structure of the marine food web at the Prince Edward Islands (Southern Ocean) determined by $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis. *Marine Ecology Progress Series* 208: 13–20

Kang DH, Ahn IY, Choi KS (2009) The annual reproductive pattern of the Antarctic clam *Laternula elliptica* from Marian Cove, King George Island. *Polar Biology* 32: 517–528

Kattner G, Hagen W (1995) Polar herbivorous copepods-different pathways in lipid biosynthesis. *ICES Journal of Marine Science* 52: 329–335

Kruger A, Schleyer MH, Benayahu Y (1998) Reproduction in *Anthelia glauca* (Octocorallia: Xeniidae). I. Gametogenesis and larval brooding. *Marine Biology* 131(3): 423-432.

L

Labasque T, Chaumery C, Aminot A, Keroat G (2004) Spectrophotometric Winkler determination of dissolved oxygen: re-examination of critical factors and reliability. *Marine Chemistry* 88: 53–60

Langton RW, Langton EW, Theroux RB, Uzmann JR (1990) Distribution, behavior and abundance of sea pens, *Pennatulula aculeata*, in the Gulf of Maine. *Marine Biology* 107: 463-469

Lee RF, Hagen W, Kattner G (2006) Lipid storage in marine zooplankton. *Marine Ecology Progress Series* 307: 273-306

Leigh EG, Herre EA, Fischer EA (1985) Sex allocation in animals. *Experientia* 41: 1265–1276

Lopes VM, Baptista M, Pimentel MS, Repolho T, Narciso L, Rosa R (2012) Reproduction in Octocorallia: synchronous spawning and asynchronous oogenesis in the pennatulid *Veretillum cynomorium*. *Marine Biology* 8: 893-900

López González PJ, Gili JM, Fuentes V (2009) A new species of shallow-water sea pen (Octocorallia: Pennatulacea: Kophobelemnidae) from Antarctica. *Polar Biology* 32: 907–914

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265–275

M

Marschal C, Garrabou J, Harmelin JG, Pichon M (2004) A new method for measuring growth and age in the precious red coral *Corallium rubrum* (L.). *Coral reefs* 23(3): 423-432

Mastro J (2002) Antarctica: a year at the bottom of the world. In: Bulfinch Press (Eds.)

McClintock JB, Amsler MO, Amsler CD, Southworth KJ, Petrie C, Baker BJ (2004) Biochemical composition, energy content and chemical antifeedant and antifoulant defenses of the colonial Antarctic ascidian *Distaplia cylindrica*. *Marine Biology* 145(5): 885-894

McFadden CS, Donahue R, Hadland BK, Weston R (2001) A molecular phylogenetic analysis of reproductive trait evolution in the soft coral genus *Alcyonium*. *Evolution* 55: 54–67

Meidlinger K, Tyler PA, Peck LS (1998) Reproductive patterns in the Antarctic brachiopod *Liothyrella uva*. *Marine Biology* 132: 153-162

Mercier A, Hamel JF (2011) Contrasting reproductive strategies in three deep-sea octocorals from eastern Canada: *Primnoa resedaeformis*, *Keratoisis ornata*, and *Anthomastus grandiflorus*. *Coral Reefs* 30: 337–350

Mercier A, Sun Z, Hamel JF (2011) Reproductive periodicity, spawning and development of the deep-sea scleractinian coral *Flabellum angulare*. *Marine biology* 158(2): 371-380

Michener RH, Schell DM (1994) Stable isotope ratios as tracers in marine aquatic food webs. In: Lajtha K., Michener R.H. (Eds.), *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK 138–157

Mileikovsky SA (1971) Types of larval development in marine bottom invertebrates, their distribution and ecological significance: a re-evaluation. *Marine Biology* 10: 193–213

Minagawa M, Wada E (1984) Step wise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48: 1135–1140

Mincks SL, Smith CR, DeMaster DJ (2005). Persistence of labile organic matter and microbial biomass in Antarctic shelf sediments: Evidence of a sediment food bank. *Marine Ecology Progress Series* 300: 3-19

Mincks SL, Smith CR, Jeffreys RM, Sumida PY (2008) Trophic structure on the West Antarctic Peninsula shelf: Detritivory and benthic inertia revealed by $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 55(22): 2502-2514

Mintenbeck K, Brey T, Jacob U, Knust R, Struck U (2008) How to account for the lipid effect on carbon stable-isotope ratio ($\delta^{13}\text{C}$): sample treatment effects and model bias. *Journal of Fish Biology* 72(4): 815-830

Modig H, Ólafsson E (1998) Responses of Baltic benthic invertebrates to hypoxic events. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 229: 133–148

N

Nonato EF, Brito TA, De Paiva PC, Petti MA, Corbisier TN (2000) Benthic megafauna of the nearshore zone of Martel Inlet (King George Island, South Shetland Islands, Antarctica): depth zonation and underwater observations. *Polar Biology* 23(8): 580-588

Norkko A, Thrush SF, Cummings VJ, Gibbs MM, Andrew NL, Norkko J, Schwarz AM (2007) Trophic structure of coastal Antarctic food webs associated with changes in sea ice and food supply. *Ecology* 88(11): 2810-2820

Nyssen F, Brey T, Lepoint G, Bouquegneau JM, DeBroyer C, Dauby P (2002) A stable isotope approach to the eastern Weddell Sea trophic web: focus on benthic amphipods. *Polar Biology* 25: 280–287

O

Orejas C, Gili JM, Arntz W (2003) The role of small planktonic communities in the diet of two Antarctic octocorals (*Primnoisis antarctica* and *Primnoella* sp.). *Marine Ecology Progress Series* 250: 105–116

Orejas C, Gili J, López-González PJ, Arntz W (2001) Feeding strategies and diet composition of four Antarctic cnidarian species. *Polar Biology* 24(8): 620-627

Orejas C, Gili JM, López-González PJ, Hasemann C, Arntz WE (2007) Reproduction patterns of four Antarctic octocorals in the Weddell Sea: an inter-specific, shape and latitudinal comparison. *Marine Biology* 150: 551–563

Orejas C, López-González PJ, Gili JM, Teixidó N, Gutt J, Arntz WE (2002) Distribution and reproductive ecology of the Antarctic octocoral *Ainigmaptilon antarcticum* in the Weddell sea. *Marine Ecology Progress Series* 231: 101-114

Orejas C, Rossi S, Peralba À, García E, Gili JM, Lippert H (2013). Feeding ecology and trophic impact of the hydroid *Obelia dichotoma* in the Kongsfjorden (Spitsbergen, Arctic). *Polar Biology* 36(1): 61-72

- Patton JS, Battey JF, Rigler MW, Porter JW, Black CC, Burris JE (1983) A comparison of the metabolism of bicarbonate ^{14}C and acetate $1\text{-}^{14}\text{C}$ and the variability of species lipid composition in reef corals. *Marine Biology* 75: 121–130
- Pearse JS (1994) Cold water echinoderms break “Thorson’s Rule”. En: Young CM, Eckelbarger KJ (Eds.) Reproduction, larval biology and recruitment in the deep-sea benthos. Pp. 2743. New York: Columbia University Press
- Pearse JS (1965) Reproductive periodicities in several contrasting populations of *Odontaster validus* Koehler, a common Antarctic asteroid. *Antarctic Research* 5: 39–85
- Pearse JS, McClintock JB, Bosch I (1991) Reproduction of Antarctic marine invertebrate: tempos, modes and timing. *American Zoologist* 31: 65-80
- Peirano A, Morri C, Bianchi CN (1999) Skeleton growth and density pattern of the temperate, zooxanthellate scleractinian *Cladocora caespitosa* from the Ligurian Sea (NW Mediterranean). *Marine Ecology Progress Series* 185: 195–201
- Peirano A, Abbate M, Cerrati G, Difesa V, Peroni C, Rodolfo-Metalpa R (2005) Monthly variations in calyx growth, polyp tissue, and density banding of the Mediterranean scleractinian *Cladocora caespitosa* (L.). *Coral Reefs* 24: 404–409
- Pernet VP, Gavino VG, Gavino GG, Anctil MA (2002) Variations of lipid and fatty acid contents during the reproductive cycle of the anthozoan *Renilla koellikeri*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B* 172: 455–465
- Peterson BJ, Fry B (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 293–329
- Petersen JK (2007) Ascidian suspension feeding. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 342: 127–137
- Philipp EER, Husmann G, Abele D (2011) The impact of sediment deposition and iceberg scour on the Antarctic soft shell clam *Laternula elliptica* at King George Island, Antarctica. *Antarctic Science* 23: 127–138
- Picciano M, Ferrier-Pagès C (2007) Ingestion of pico- and nanoplankton in the Mediterranean red coral *Corallium rubrum*. *Marine Biology* 150: 773–782
- Pires DO, Castro CB Silva JC (2009) Reproductive biology of the deep-sea pennatulacean *Anthoptilum murrayi* (Cnidaria, Octocorallia). *Marine Ecology Progress Series* 397: 103-112
- Polunin NVC, Morales-Nin B, Pawsey WE, Cartes JE, Pinnegar JK, Moranta J (2001) Feeding relationships in Mediterranean bathyal assemblages elucidated by stable nitrogen and carbon isotope data. *Marine Ecology Progress Series* 220: 13–23, 2001
- Poulin E, Féral JP (1996) Why are there so many species of brooding Antarctic echinoids? *Evolution* 50: 820–830

Pörtner HO (2002) Climate Variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology* 132: 739-761

R

Rau GH, Sullivan CW, Gordon LI (1991) $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ variations in Weddell Sea particulate organic matter. *Marine Chemistry* 35: 355–369

Ribes M, Coma R, Gili JM (1999) Heterogeneous feeding in benthic suspension feeders: natural diet and grazing rate of the temperate gorgonian *Paramuricea clavata* (Cnidaria: Octocorallia) over a year cycle. *Marine Ecology Progress Series* 183: 125–137

Ribes M, Coma R, Rossi S (2003) Natural feeding of the temperate asymbiotic octocoral-gorgonian *Leptogorgia sarmentosa* (Cnidaria: Octocorallia). *Marine Ecology Progress Series* 254: 141–150

Ribes M, Coma R, Rossi S, Micheli M (2007) Cycle of gonadal development in *Eunicella singularis* (Cnidaria: Octocorallia): trends in sexual reproduction in gorgonians. *Invertebrate Biology* 126: 307–317

Rice AL, Tyler PA, Paterson GJL (1992) The pennatulacean *Khopobelemon stelliferum* (cnidaria: Octocorallia) in the Pocupine Seabight (North-east Atlantic Ocean). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 72: 417-434

Rodríguez E, Orejas C, López González P, Gili JM (2013) Reproduction in the externally brooding sea anemone *Epiactis georgiana* in the Antarctic Peninsula and the Weddell Sea. *Marine Biology* 160: 67-80

Roland F, Caraco NF, Cole JJ, Del Giorgio P (1999) Rapid and precise determination of dissolved oxygen by spectrophotometry: Evaluation of interference from color and turbidity. *Limnology and Oceanography* 44: 1148–1154

Rossi S (2002) Environmental factors affecting the trophic ecology of benthic suspension feeders. PhD Thesis, University of Barcelona

Rossi S y Gili JM (2005) Composition and temporal variation of the near-bottom seston in a Mediterranean coastal area. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 65(3): 385-395

Rossi S, Gili JM, Coma R, Linares C, Gori A, Vert N (2006) Temporal variation in protein, carbohydrate, and lipid concentrations in *Paramuricea clavata* (Anthozoa, Octocorallia): evidence for summer–autumn feeding constraints. *Marine Biology* 149(3): 643-651

Rossi S, Grémare A, Gili JM, Amouroux JM, Jordana E, Vétion G (2003) Biochemical characteristics of settling particulate organic matter at two north-western Mediterranean sites: a seasonal comparison. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 58(3): 423-434

Rossi S, y Tsounis G (2007) Temporal and spatial variation in protein, carbohydrate, and lipid levels in *Corallium rubrum* (Anthozoa, Octocorallia). *Marine Biology* 152(2): 429-439

Rückamp M, Braun M, Suckro S, Blindow N (2011) Observed glacial changes on the King George Island ice cap, Antarctica, in the last decade. *Global and Planetary Change* 79(1): 99-109

S

Sahade R, Tatián M, Kowalke J, Kühne S, Esnal GB (1998) Benthic faunal associations on soft substrates at Potter Cove, King George Island, Antarctica. *Polar Biology* 19(2): 85-91

Sahade R, Tatián M, Esnal G (2004) Reproductive ecology of the ascidian *Cnemidocarpa verrucosa* at Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctica. *Marine Ecology Progress Series* 272: 131–140

Schloss IR, Abele D, Moreau S, Demers S, Bers AV, González O, Ferreyra GA (2012) Response of phytoplankton dynamics to 19- year (1991–2009) climate trends in Potter Cove (Antarctica). *Journal of Marine Systems* 92: 53–66

Schmidt K, Atkinson A, Stübing D, McClelland JW, Montoya JP, Voss M (2003) Trophic relationships among Southern Ocean copepods and krill: some uses and limitations of a stable isotope approach. *Limnology and Oceanography* 48(1): 277-289

Schmidt O, Curry JP, Dyckmans J, Rota E Scrimgeour CM (2004) Dual stable isotope analysis ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of soil invertebrates and their food sources. *Pedobiologia* 48: 171–180

Seager JR (1979) Reproductive biology of the Antarctic opisthobranch *Philine gibba* Strebel. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 41: 51-74

Servetto N, Torre L, Sahade R (2013). Reproductive biology of the Antarctic “sea pen” *Malacobelemnion daytoni* (Octocorallia, Pennatulacea, Kophobelemnidae). *Polar Research* 32

Smale D, Barnes DKA, Fraser KPP (2007) The influence of depth, site exposure and season on the intensity of iceberg scouring innearshore Antarctic waters. *Polar Biol* 30(6):769

Smale DA, Barnes DK, Fraser KP, Peck LS (2008a) Benthic community response to iceberg scouring at an intensely disturbed shallow water site at Adelaide Island, Antarctica. *Marine Ecology Progress Series* 355: 85-94

Smale DA, Barnes DK (2008b) Likely responses of the Antarctic benthos to climate-related changes in physical disturbance during the 21st century, based primarily on evidence from the West Antarctic Peninsula region. *Ecography* 31(3): 289-305

Smale DA, Brown KM, Barnes DK, Fraser KP, Clarke A (2008c) Ice scour disturbance in Antarctic waters. *Science* 321(5887): 371-371

Smetacek V, Nicol S (2005) Polar ocean ecosystems in a changing world. *Nature* 437(7057): 362-368

Smith CR, Mincks S, DeMaster DJ (2006) A synthesis of benthic-pelagic coupling on the Antarctic shelf: food banks, ecosystem inertia and global climate change. *Deep-Sea Research II* 53: 875–894.

Soong K (2005) Reproduction and colony integration of the sea pen *Virgularia juncea*. *Marine Biology* 146: 1103–1109

Stammerjohn S, Massom R, Rind D, Martinson D (2012) Regions of rapid sea ice change: An inter-hemispheric seasonal comparison. *Geophysical Research Letters*, 39(6)

Stanwell-Smith D, Clarke A (1998) Seasonality of reproduction in the cushion star *Odontaster validus* at Signy Island, Antarctica. *Marine Biology* 131: 479–487

Strathmann RR, Lindsay RK, Marsh AG (2006) Embryonic and larval development of a cold adapted Antarctic ascidian. *Polar Biology* 29: 495–501

Strathmann RR, Strathmann MF (1982) The relationship between adult size and brooding in marine invertebrates. *American Naturalist* 119: 91-101

Strathmann RR, Strathmann MF, Emson RH (1984) Does limited brood capacity link adult size, brooding, and simultaneous hermaphroditism? A test with the starfish *Asterina phylactica*. *American Naturalist* 123: 796-818

Stübing D, Hagen W (2003) Fatty acid biomarker ratios—suitable trophic indicators in Antarctic euphausiids? *Polar Biology* 26: 774-782

Svetashev VI, Vysotskii MV (1998) Fatty acids of *Heliopora coerulea* and chemotaxonomic significance of tetracosapolyenoic acids in coelenterates. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B* 119: 73–75

T

Teixidó N, Garrabou J, Gutt J, Arntz W (2004) Recovery in Antarctic benthos after iceberg disturbance: trends in benthic composition, abundance and growth forms. *Marine Ecology Progress Series* 278: 1–16

Thrush SF, Hewitt JE, Cummings VJ, Ellis JI, Hatton C, Lohrer A, Norkko A (2004) Muddy waters: elevating sediment input to coastal and estuarine habitats. *Frontiers in Ecology and the Environment* 2(6): 299–306

Tolosa I, Treignier C, Grover R, Ferrier-Pagès C (2011) Impact of feeding and short-term temperature stress on the content and isotopic signature of fatty acids, sterols, and alcohols in the scleractinian coral *Turbinaria reniformis*. *Coral Reef* 30: 763–774

Torre (2013) Modelación matemática del efecto de la retracción glaciaria sobre comunidades bentónicas Antárticas. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Córdoba

Torre L, Servetto N, Eöry M, Momo F, Tatián M, Abele D, Sahade R (2012) Respiratory responses of three Antarctic ascidians and a sea pen to increased sediment concentrations. *Polar Biology* 35(11): 1743-1748

Treignier C, Grover R, Ferrier-Pagès C, Tolosa I (2008) Effect of light and feeding on the fatty acid and sterol composition of zooxanthellae and host tissue isolated from the scleractinian coral *Turbinaria reniformis*. *Limnology and Oceanography* 53(6): 2702-2710

Turner J, Colwell SR, Marshall GJ, Lachlan-Cope, T. A., Carleton AM., Jones PD, Lagun V, Reid PA, Iagovkina S (2005) Antarctic climate change during the last 50 years. *International Journal of Climatology* 25: 279–294

Turner J, Overland J, Walsh J (2007) An Arctic and Antarctic perspective on recent climate change. *International Journal of Climatology* 27: 277–293

Tyler PA, Bronsdon SK, Young CM, Rice AL (1995) Ecology and gametogenic biology of the genus *Umbellula* (Pennatulacea) in the North Atlantic Ocean. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie* 80: 187-199

Tyler PA, Reeves S, Peck L, Clarke A, Powell D (2003) Seasonal variation in the gametogenic ecology of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Polar Biology* 26(11): 727-733

V

Vaquer-Sunyer R, Duarte CM (2008) Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 15452–15457

W

Waller RG, Tyler PA, Smith CR (2008) Fecundity and embryo development of three Antarctic deep-water scleractinians: *Flabellum thouarsii*, *F. curvatum* and *F. impensum*. *Deep-Sea Research Part II* 55: 2527-2534

Walton WH (1948) Feret's statistical diameter as a measure of particle size. *Nature* 162: 329-330

Williams GC (1975) Sex and evolution. Princeton, NJ: Princeton University Press

Williams GC (2011) The global diversity of sea pens (Cnidaria: Octocorallia: Pennatulacea). *PloS one* 6(7): e22747

Wlodarska-Kowalczyk M, Weslawski J (2001) Impact of climate warming on Arctic benthic biodiversity: a case study of two Arctic glacial bays. *Climate Research* 18: 127–132

Wlodarska-Kowalczyk M, Pearson T, Kendall M (2005) Benthic response to chronic natural physical disturbance by glacial sedimentation in an Arctic fjord. *Marine Ecology Progress Series* 303: 31–41

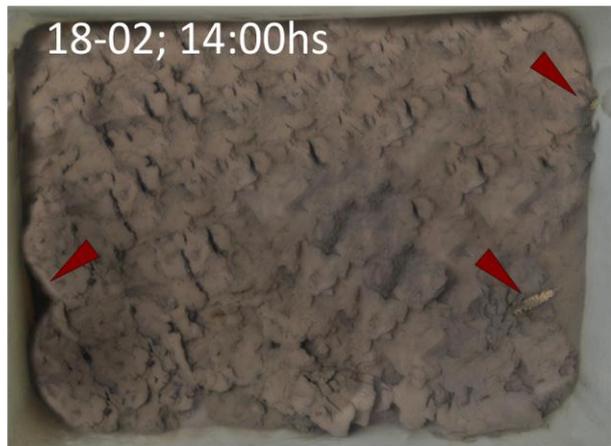
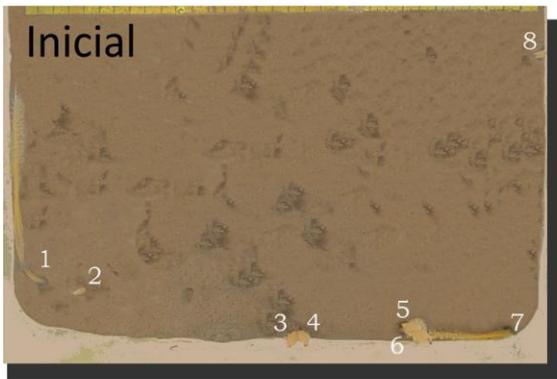
Y

Yamashiro H, Oku H, Higa H, Chinen I, Sakai K (1999) Composition of lipids, fatty acids and sterols in Okinawan corals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 122(4): 397-407

Z

Zamboni N (2010) Comunidades epibentónicas de Caleta Potter, Antártida: estructura, distribución y dinámica espacio-temporal. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Córdoba 57 pp

Apéndices



Apéndice I: Comportamiento de 8 colonias de *Malacobelemnion daytoni* completamente tapadas de sedimento. *Círculos rojos* indican cuando reaparece una colonia y *círculos azules* indican cuando se deja de observar una colonia.

Con respecto a la posición filogenética de *Malacobelemnon daytoni* a continuación se detallan todas las pruebas realizadas hasta la fecha con sus respectivos resultados. A pesar de que hasta el momento no se ha podido realizar, la puesta a punto en cuanto a la extracción de ADN en la especie (posiblemente debido a la forma de conservado de las muestras) y las condiciones específicas de amplificación, se continuara trabajando en la puesta a punto.

Objetivos específicos

1. Extraer ADN total de *Malacobelemnon daytoni*.
2. Poner a punto de las condiciones de amplificación del gen para la subunidad 2 de NADH-deshidrogenasa (ND2).
3. Secuenciar y establecer la posición filogenética de la especie.

Materiales y Métodos

Extracción de ADN total

La extracción de ADN se realizó a partir de 10 individuos de Plumas de mar. Se probaron un total de 6 diferentes técnicas de extracción de ADN total, que difieren en complejidad y en el grado de agresión hacia el ADN. Se detallan a continuación dos de ellas.

Extracción fenólica con Bromuro de hexadecil-trimetil-amonio (CTAB) (Modificada de Levitan y Grosberg 1983):

-Un trozo de tejido (segmento segmento del pedúnculo y de los sifonozoides) se homogeneizó en un tubo tipo Eppendorf estéril utilizando un vástago de vidrio con punta esmerilada y esterilizado a la llama, junto con 300 µl de buffer de extracción (2% CTAB, 1, 4 M de NaCl, 0, 2% 2-mercaptoetanol, 20 mM EDTA y 100 mM Tris pH 8) y proteinasa K (400 µg.ml conc. Final⁻¹). Las muestras se incubaron en baño termostático a 65° por 90 minutos o a 37° toda la noche.

Otro buffer de lisis empleado en esta técnica fue el de Rawson y Hilbish (1995), compuesto por 25 mM EDTA; 1% SDS y 50mM TRIS-CLH pH 8.

-Se agregó ARNasa (200 µg.ml conc. Final⁻¹) y se incubó en estufa a 37° por una hora.

-Extracción fenólica: se agregó un volumen de fenol: cloroformo: alcoholisoamílico (25:24:1) y se mezcló por inversión durante aproximadamente 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 13.000 r.p.m. a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a otro tubo. Este procedimiento se repitió utilizando nuevamente un volumen de fenol:cloroformo: alcoholisoamílico (25:24:1) y una vez más con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1).

-Precipitación del ADN: se agregó 0, 1 volumen de acetato de sodio 3M pH6 y dos volúmenes de etanol 100% frío. Se mezcló por inversión hasta que apareció el precipitado de ADN y se dejó 1 hora mínimo a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 14.000 r.p.m. en centrífuga a 4°C durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó con 1 ml de etanol 70% frío. Se

centrifugó nuevamente a 14.000 r.p.m. por 20 minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento se secó en estufa a 37°C. El ADN se resuspendió con 50 µl de agua destilada estéril.

Extracción salina según el protocolo 1 de extracción salina de Bruford et al. (1992):

-Un trozo de tejido (segmento del pedúnculo y de los sifonozoides) se homogeneizó en un tubo tipo Eppendorf estéril utilizando un vástago de vidrio con punta esmerilada y esterilizado a la llama, junto con 300 µl de TNE 1X (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA), proteinasa K (400 µg/ml conc. Final⁻¹), 30 µl de TRIS-CLH pH8 1M y 80 µl de SDS 10%. Luego de vortear las muestras, se incubaron en baño termostático a 65°C por 90 minutos o a 37°C toda la noche.

-Se agregó ARNasa (200 µg/ml conc. Final⁻¹) y se incubó en estufa a 37°C por una hora.

-Extracción salina: se agregó 200 µl de NaCl 6M y se agitó fuertemente por inversión durante 15 segundos, luego se centrifugó por 15 minutos a 13.000 r.p.m. a temperatura ambiente. Se trasvasó el sobrenadante a otro tubo y se repitió el centrifugado. Este procedimiento se repite hasta obtener un sobrenadante limpio y libre de espuma.

-El paso de precipitación del ADN se realizó igual que en la técnica de extracción fenólica.

En ambos casos, la extracción se realizó en mesa de flujo laminar.

Para determinar la calidad del ADN total obtenido se mezclaron 5 µl de ADN total de cada individuo con 1 µl de "buffer de siembra" (0, 25% azul de bromofenol; 2, 25% xilencianol FF, 40% sacarosa) y se sembraron en un gel de agarosa al 0,8% preparado con buffer TBE 0,5X (45mM Tris, 45 mM ácido bórico, 1mM EDTA) y 0,005 µg.ml⁻¹ de bromuro de etidio.

Para determinar la concentración de ADN obtenida se sembraron en el mismo gel 5 µl del marcador de peso molecular λ Hind III, de concentración conocida. El gel fue sometido a una corriente de 5V/cm durante 40 minutos. Luego fue examinado bajo luz ultravioleta y las concentraciones de las muestras fueron estimadas por comparación visual con el marcador.

Amplificación

Para amplificar el marcador mitocondrial, se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR: "Polymerase Chain Reaction"). Partiendo del protocolo descrito para *Octocorallia* (McFadden et al. 2004) se modificaron las condiciones de PCR para su puesta a punto. Los cebadores utilizados para amplificar el gen codificante de la subunidad 2 de NADH-deshidrogenasa (ND2), fueron 16S647 F (5'-ACACAGCTCGGTTTCTATCTACCA-3'); ND21418 R (5'-ACATCGGGAGCCACATA-3') como cebadores externos y 16S544 F (5'-CGACCTCGATGTTGAGTTGCGG-3') como cebador interno (McFadden et al. 2004). La mezcla de reacción contenía en todos los casos: 2 µl de ADN molde, 2, 5 µl de Buffer 10x (KCl 500mM, pH 9, 0), MgCl₂ 2mM, 0.125mM dNTPs (dATP; dGTP; dTTP; dCTP), BSA1x, 10 pmol cada cebador, 1 U de *Taq* polimerasa (Fermentas, USA), para un volumen final de 25 µl. En cada reacción de amplificación se incluyó un control negativo para verificar la ausencia de ADN contaminante.

El programa de amplificación recomendado por la bibliografía para ND2 incluyó una desnaturalización del ADN inicial a 94°C durante 5 minutos y se continúa con 34 ciclos consistentes en una etapa de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, una etapa de hibridación a 51°C (McFadden et al. 2004) a 58°C (Sánchez et al. 2003) durante 1,5 minutos y una etapa de elongación de la cadena a 72° C durante 1 minuto. Una última etapa de elongación se realizó a 72° C durante 10 minutos.

También se probaron programas con temperaturas de hibridación menores (hasta 45°C) y mayor cantidad de ciclos (hasta 38). Además se probó mejorar la calidad del producto amplificado al introducir rampas de temperatura (0, 3 °/s), evitando la elevada velocidad de transición entre la temperatura de hibridación y la de elongación. De este modo pueden evitarse posibles desprendimientos del primer del ADN molde, lo cual generaría productos de PCR pobres (Grosberg et al. 1996; Benter et al. 1995)

Dichas amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Biometra modelo T-personal.

El éxito de la PCR se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (1% P/V) teñido con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio en buffer TBE 0,5 (Sambrook et al. 1989). Se sembraron 5µl de cada amplificación junto con marcadores de tamaño molecular de 1Kb (Promega) y 100 pb (Fermentas).

Resultados y discusión

Extracción de ADN total

Con el objetivo de mejorar la cantidad y calidad del ADN total, se realizaron diferentes modificaciones en las técnicas de extracción estándar mencionadas anteriormente. Estas incluyeron la incorporación de un prelavado de las muestras en buffer CTAB 2X, por 24 hs y con varios cambios de solución, para eliminar posibles sustancias inhibitoras de PCR (Berntson et al. 2001), y/o la prolongación de la digestión con Proteinasa K a 55°C por más de 24 hs con agitación constante. Los mejores resultados fueron los obtenidos con el buffer de lisis de Rawson y Hilbish (1995) quienes lo utilizaron en *Mytilus edulis* con la extracción fenólica (Apéndice II 1).

A pesar de las numerosas técnicas ensayadas, todas las extracciones dieron como resultado poco ADN o muy degradado. Consideramos que la mala calidad de ADN obtenido podría deberse al tiempo transcurrido entre la obtención de la muestra y su procesamiento (5 años) y/o la forma de almacenamiento de las muestras, ya que si bien fueron conservadas en alcohol 100% y en frío a -20°C, las colonias se conservaron enteras (y no en pequeños fragmentos) lo que retrasa el acceso del conservante al interior del tejido.

Amplificación

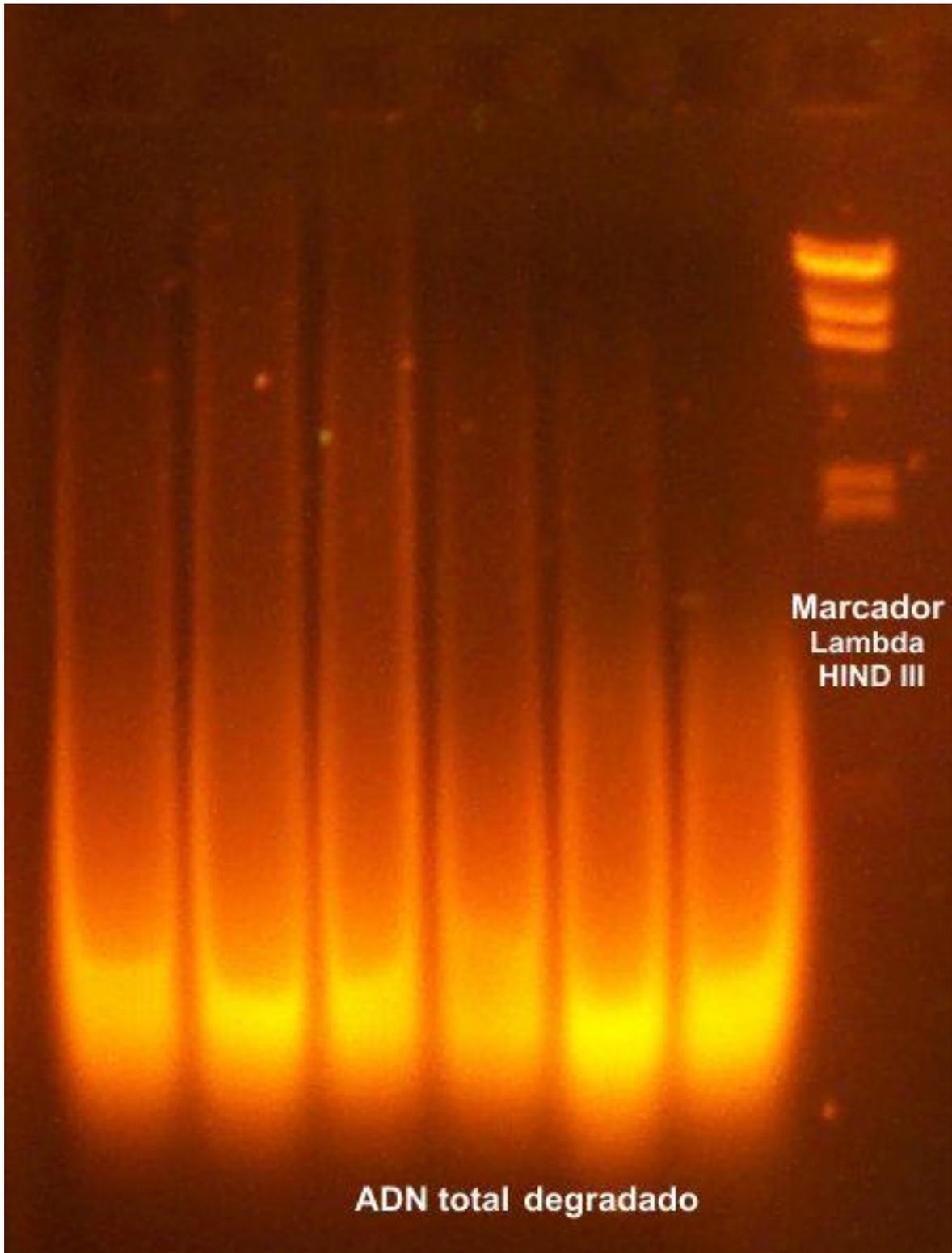
Los ensayos realizados con los primers elegidos dieron resultados negativos.

Se realizaron diversas modificaciones en el programa de ciclado y en la composición de la mezcla de reacción para la PCR. Además, y según lo mencionado por (McFadden et al. 2006) se realizaron reacciones de PCR anidadas, es decir, amplificaciones realizadas con primers forward internos que usan como ADN molde al producto de otra PCR con primers más externos.

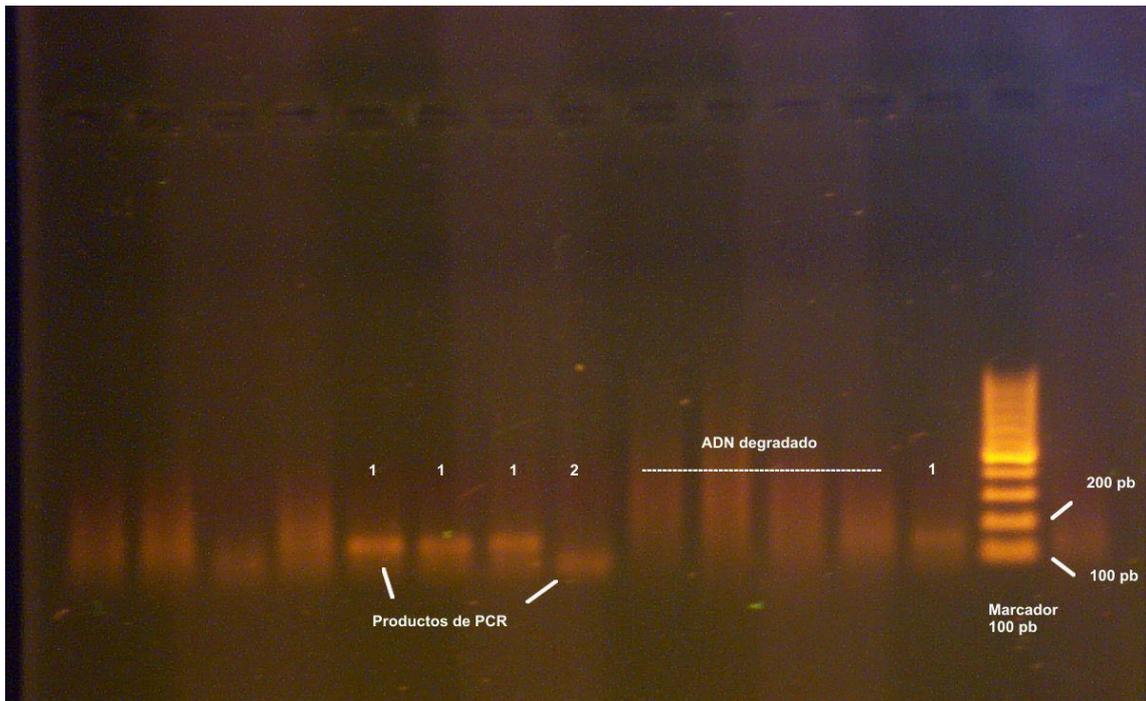
Solamente pudo ser obtenido un fragmento de aproximadamente 200pb (Apéndice II 2). El mismo no fue utilizado para secuenciamiento y posterior análisis, debido a que la longitud del fragmento resultó más corta de lo esperado en base a especies relacionadas, como el fragmento de 550 pb obtenido en Octocorales del Caribe (Sánchez et al. 2003), fragmentos de 539 pb y 474 pb de longitud de varias especies pertenecientes a los tres órdenes de Octocorales (McFadden et al. 2006) y 465 pb para plumas de mar (Dolan et al. en prensa).

En trabajos posteriores, además, un nuevo set de primers ND42599F (5'-GCCATTATGGTAACTATTAC-3') (France y Hoover 2002); Mut-3458R (5'-TSGAGCAAAAGCCACTCC-

3') (Sánchez et al. 2003) y ND42625F (5`-TACGTGGYACAATTGCTG-3`) (Sánchez et al. 2003) será puesto a prueba para amplificar el gen "msh-1", también utilizado para Octocorales, pero no formará parte del presente trabajo de tesis.



Apéndice II 1: Gel de agarosa en el que se observa una extracción de ADN total en *Malacobelemnon daytoni*.



Apéndice II 2: Producto de PCR mostrando diferentes condiciones de amplificación. Las diferencias de calidad de la banda obtenida, responden tanto a las condiciones del ADN molde (calidad inicial) como a los diferentes ensayos realizados (condiciones de amplificación). Se observan resultados de PCR con diferentes concentraciones de nucleótidos, concentraciones de ADN molde y set de cebadores. Los individuos marcados con "1" se realizaron usando cebadores internos; el individuo marcado con "2" se realizó usando cebadores externos. Todas se ciclaron a 48°C.

Referencias bibliográficas

- Benter T, Papadopoulos S, Pape M, Manns M, Poldowa H (1995) Optimization and reproducibility of random amplified polymorphic DNA human. *Analytical Biochemistry* 230: 92-100
- Berntson EA, Bayer F, McArthur AG, France SC (2001) Phylogenetic relationships within the Octocorallia (Cnidaria: Anthozoa) based on nuclear 18S rRNA sequences. *Marine Biology* 138: 235-246
- Bruford ME, Hanotte O, Brookfield JFY, Burke T (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Hoelzel AR, ed. *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press. 336 pp.
- Dolan E, Tyler PA, Yesson C, Royers AD (2013) Phylogeny and systematics of deep-sea sea pens (Anthozoa: Octocorallia: Pennatulacea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, en prensa.
- France SC, Hoover LL (2002) DNA sequences of the mitochondrial COI gene have low levels of divergence among deep-sea octocorals (Cnidaria: Anthozoa). *Hydrobiology* 471: 149-155.
- Grosberg RK, Levitan DL, Cameron BB (1996) Characterization of genetic structure and genealogies using RAPD-PCR markers: a random primer for the novice and nervous. En: *Molecular Zoology: advances, strategies and protocols*. Editado por JD. Ferraris and S. R. Palumbi. Wiley-Liss, Inc. Nueva York
- Levitan DR, Grosberg RK (1993) The analysis of paternity and maternity in the marine hydrozoan *Hydractinia symbiolongicarpus* using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molecular Ecology* 2: 315-326
- McFadden CS, Tullislan D, Hutchinson B, Winner K, Sohm JA (2004) Variation in coding (NADH Dehydrogenase Subunits 2, 3, and 6) and non coding intergenic space regions of the mitochondrial genome in Octocorallia (Cnidaria: Anthozoa). *Marine Biology* 6: 516-526
- McFadden CS, France Scott C, Sánchez JA, Alderslade P (2006) A molecular phylogenetic of the Octocorallia (Cnidaria:Anthozoa) based on mitochondrial protein-coding sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 513-527
- Rawson PD, Hilbish TJ (1995) Evolutionary relationships among the Male and Female Mitochondrial DNA lineages in the *Mytilus edulis* species complex. *Molecular Biology and Evolution* 12 (5): 893-901
- Sánchez JA, McFadden CS, France Scott C, Lasker HR (2003) Molecular phylogenetic analyses of shallow-water Caribbean octocorals. *Marine Biology* 142: 975-987

Publicaciones derivadas de esta tesis