



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN BIOLOGÍA

**REPRODUCCIÓN, CICLO DE VIDA, COMPORTAMIENTO Y VARIABILIDAD
DEL CARACOL DULCIACUÍCOLA *ASOLENE PLATAE*
(CAENOGASTROPODA: AMPULLARIIDAE)**

Lic. MARÍA JOSÉ TIECHER

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2015

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Ecología, dependiente del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, bajo la dirección del Dr. Pablo Rafael Martín y con la dirección adjunta de la Dra. Silvana Burela, durante el período comprendido entre el 10 de mayo de 2010 y 30 de marzo de 2015.

Fecha:

Firma:

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

RESUMEN

Asolene platae es un ampulárido que presenta masas de huevos gelatinosas y que se caracteriza por el llamativo bandeado de su conchilla. La distribución natural se restringe actualmente a la Cuenca del Plata, aunque como otras especies de ampuláridos que se han vuelto plagas y promotores de cambios ecosistémicos en humedales naturales, pueden ser translocados por acción antrópica. El objetivo de esta tesis fue estudiar la reproducción, el ciclo de vida y el desarrollo de *A. platae* en condiciones de laboratorio. Además se estudió el efecto de la temperatura del agua sobre el comportamiento de los caracoles y sobre la mortalidad y la talla de los neonatos. También se analizaron las formas de las conchillas a través de la morfogeometría y la relación entre su longitud y peso. Se describió la coloración de la conchilla y las partes blandas y se estudió el mecanismo por el cual se hereda el bandeado. Los resultados aquí obtenidos indican que la cópula en *A. platae* se corresponde con el modelo general descrito para los ampuláridos, en el que el macho monta la conchilla de la hembra y luego introduce la vaina del pene durante períodos relativamente largos, siempre debajo del agua. La oviposición es también acuática y las masas de huevos presentan la particularidad de poseer microcristales de calcio. Las observaciones indican la presencia de dos tipos espermáticos, el euesperma (fértil) y el paraesperma (infértil). Los caracoles, al momento de la eclosión y por varias semanas, carecen de la capacidad de alimentarse de material vegetal senescente y el pulmón está ausente. La mortalidad post-eclosión fue muy alta en esta especie en comparación con los valores prácticamente nulos observados en *Pomacea canaliculata*. El ciclo de vida es largo (cuatrienal) e iteróparo y el crecimiento lento, continuo e indefinido; la fecundidad fue muy variable, con 1448

huevos por hembra en promedio. La temperatura del agua afectó la actividad de los caracoles, siendo el rango óptimo para esta especie de 25 – 30 °C; por otra parte, las temperaturas extremas (15 y 35°C) tuvieron influencia negativa sobre la mortalidad de los caracoles adultos y la talla de los neonatos. No se detectaron diferencias en la forma de la conchilla de machos y hembras a través del estudio morfogeométrico aunque sí se observó alometría estática: aquellos caracoles de menor tamaño mostraron una abertura más estrecha. La detección y descripción del albinismo (individuos carentes de pigmentos oscuros tanto en las partes blandas del cuerpo como en la conchilla) y la determinación del mecanismo de herencia mendeliano simple, permitió determinar la existencia de competencia espermática en esta especie. El lento crecimiento, la tardía madurez, las bajas supervivencia y viabilidad, y el estrecho rango de temperatura óptimas permiten atribuir a esta especie un carácter poco invasivo en relación con otros ampuláridos.

ABSTRACT

The ampularid *Asolene platae* has gelatinous egg masses and is characterized by a striking shell banding. Its natural distribution is nowadays restricted to the Cuenca del Plata but, as other ampularid species that have become pests and promoters of ecosystemic changes in natural wetlands, it may be susceptible of translocation by human action. The aim of this thesis was to study the reproduction, life cycle and development of *A. platae* under laboratory conditions. Furthermore, the effect of water temperature on the behavior of snails, and on mortality and growth of newborn was studied. Shell shape was analyzed through geometric morphometrics, as well as the relationship between weight and the length of the shell. The pigmentation patterns of the shell and soft parts were described and the inheritance mechanism studied. The results obtained indicate that copulation in *A. platae* corresponds to the general pattern described for ampularids, where the male mounts the female's shell and then enters the penis sheath for quite long periods, being always subaquatic. Egg mass laying also occurs underwater and egg masses have distinctive calcite microcrystals. The observations made indicate the presence of two sperm types, the euesperm (fertile) and the paraesperm (infertile). Newborn snails, upon hatching and for several weeks, lack the ability to feed on senescent plant material and have no lung. The post-hatching mortality is very high in this species. The life cycle is four years-long and iteroparous and growth is slow, continuous and indefinite; fertility is highly variable, with 1448 eggs per female on average. Water temperature affects the activity of snails, with the optimum range between 25-30 °C; and also has an influence on mortality of adult snails and on the growth of newborns. No differences were detected in the shape of male and female shells but static

allometry was observed in both sexes: small snails showed a narrower shell aperture than big ones. Albinism (individuals without dark pigments in the soft parts and the shell) is described here for the first time in the genus *Asolene* and a single Mendelian inheritance mechanism was revealed through controlled crosses of wild and albino phenotypes; sperm competition in this species was also proved using this genetic marker. Slow growth, late maturity, low survival and viability, and, the narrow range of optimum temperatures all indicate that *A. platae* is a less invasive species than other ampularids.

AGRADECIMIENTOS

Al Concejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca para finalizar este trabajo.

Al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia por brindarme un lugar de trabajo.

Al Dr. Pablo Martín, mi director, por ayudarme siempre que lo necesité por brindarme su apoyo y conocimiento.

A la Dra Silvana Burela, mi co-directora, por ser quién tuvo la idea de realizar esta tesis y por su ayuda.

A mis compañeros de laboratorio, Lucía, Nico, Emi y Fer por compartir con ellos mucho trabajo y sobre todo momentos de camaradería. Le agradezco especialmente al Dr. Nicolás Tamburi por su ayuda con el uso de programas de computación. A Enzo y Mara porque me acompañaron y contuvieron este último mes de escritura.

A mi familia, por estar siempre, a Miguel por acompañarme y alentarme y a mi mamá por su ayuda incondicional para el cuidado de mis hijos. A mis hermanos por compartir este momento.

A mis amigas, Eliana y Noelia especialmente, a todas simplemente por estar.

A Celina, Bruno y Olivia

**REPRODUCCIÓN, CICLO DE VIDA, COMPORTAMIENTO Y VARIABILIDAD
DEL CARACOL DULCIACUÍCOLA ASOLENE PLATAE
(CAENOGASTROPODA: AMPULLARIIDAE)**

ÍNDICE

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Generalidades de la especie y antecedentes.....	1
1.2. Objetivos.....	7

Capítulo 2. REPRODUCCIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO

2.1. Introducción.....	8
2.2. Materiales y Métodos.....	10
2.2.1. <i>Origen y mantenimiento de los caracoles</i>	10
2.2.2. <i>Comportamiento de cópula y de oviposición</i>	10
2.2.3. <i>Masas de huevos y desarrollo embrionario</i>	11
2.3. Resultados	13
2.3.1. <i>Comportamiento copulatorio</i>	13
2.3.2. <i>Comportamiento de oviposición</i>	14
2.3.3. <i>Estructura de la masa de huevos</i>	18
2.3.4. <i>Desarrollo embrionario</i>	21
2.4. Discusión	25

Capítulo 3. CICLO DE VIDA

3.1. Introducción	33
3.2. Materiales y Métodos	35
3.2.1. <i>Origen y mantenimiento de los caracoles</i>	35
3.2.2. <i>Constitución de las cohortes</i>	35

3.2.3. Registro de la talla y edad	36
3.2.4. Madurez y actividad sexual	36
3.2.5. Supervivencia	38
3.2.6. Proporción sexual terciaria	38
3.3. Resultados	39
3.3.1. Crecimiento	39
3.3.2. Madurez y actividad sexual.....	39
3.3.3. Supervivencia	46
3.3.4. Proporción sexual terciaria.....	48
3.4. Discusión	50

Capítulo 4. BIOLOGÍA TÉRMICA Y COMPORTAMIENTO

4.1. Introducción	58
4.2. Materiales y métodos	60
4.2.1. Origen y mantenimiento de los caracoles.....	60
4.2.2. Actividad de los caracoles a diferentes temperaturas.....	60
4.2.3. Mortalidad y crecimiento de caracoles neonatos y adultos....	63
4.2.4. Umbral térmico y días-grado del desarrollo embrionario.....	63
4.3. Resultados	65
4.3.1. Actividad de los caracoles a diferentes temperaturas.....	65
4.3.2. Mortalidad y crecimiento de caracoles neonatos y adultos....	73
4.3.3. Umbral térmico y días-grado del desarrollo embrionario.....	77
4.4. Discusión	78

Capítulo 5. VARIACIONES MORFOGRAVIMÉTRICAS DE LA CONCHILLA

5.1. Introducción	84
5.2. Materiales y Métodos.....	87

5.2.1. Origen y mantenimiento de los caracoles	87
5.2.2. Análisis morfogeométrico de la conchilla	87
5.2.3. Variación del peso y del largo de las conchillas	90
5.3. Resultados	92
5.3.1. Análisis morfogeométrico de la conchilla	92
5.3.2. Variación del peso y del largo de las conchillas	99
5.4. Discusión	101

Capítulo 6. VARIACIONES EN LA COLORACIÓN DE LA CONCHILLA Y LAS PARTES BLANDAS, SU MECANISMO HEREDITARIO Y SU USO POTENCIAL COMO MARCADOR GENÉTICO

6.1. Introducción	105
6.2. Materiales y Métodos	107
6.2.1. Origen y mantenimiento de los caracoles	107
6.2.2. Pigmentación de la conchilla y de las partes blandas del cuerpo	107
6.2.3. Herencia de la pigmentación de la conchilla y de las partes blandas del cuerpo	108
6.2.4. Modelo de competencia espermática	108
6.3. Resultados	110
6.3.1. Pigmentación de la conchilla y de las partes blandas del cuerpo	110
6.3.2. Mecanismo de herencia de la pigmentación de la conchilla de las partes blandas del cuerpo	117
6.3.3. Modelo de competencia espermática	118
6.4. Discusión	120

Capítulo 7. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN GENERAL.....127

Capítulo 8. BIBLIOGRAFÍA.....136

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. **Generalidades de la especie y antecedentes**

Los caracoles de la familia Ampullariidae son los caracoles de agua dulce de mayor tamaño y poseen la capacidad de alimentarse de plantas vasculares vigorosas, perifiton y material superficial (Cazzaniga y Estebenet, 1984). Además presentan notables peculiaridades eco-fisiológicas (Cowie, 2002), como el desarrollo de una branquia y de un pulmón (por lo que pueden obtener oxígeno tanto del agua como del aire), y algunos géneros presentan masas de huevos aéreas y calcáreas. Algunas especies de esta familia, como por ejemplo *Pomacea canaliculata*, han sido introducidas en el SE asiático para consumo humano y se han vuelto importantes plagas de cultivos acuáticos como el arroz y el taro (Cowie, 2002), también promotores de cambios ecosistémicos en humedales naturales (Carlsson *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2010; Horgan *et al.*, 2014) y vectores de enfermedades parasitarias (Lv *et al.*, 2009). Otros ampuláridos, como los del género *Asolene*, son conocidos como “caracoles cebra” entre los acuaristas y son comercializados como mascotas, con el consiguiente riesgo de liberación y establecimiento en ambientes naturales fuera de su rango nativo (Cowie *et al.*, 2009). El desconocimiento de muchos aspectos de la biología de los ampuláridos impide diseñar planes de control y manejo sustentables (Estebenet y Martín, 2002) y dificulta la implementación de métodos para evitar su dispersión.

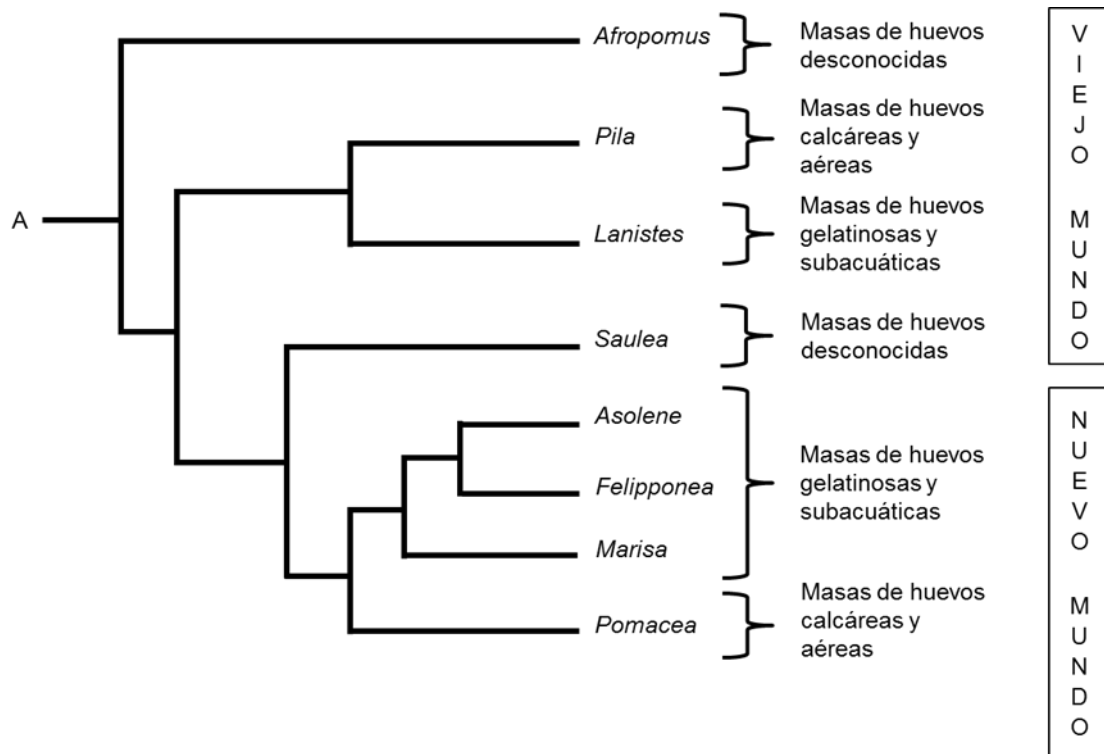
Asolene platae (Maton, 1809) es un ampulárido de tamaño mediano (hasta 35 mm) y con una conchilla llamativamente bandeada, cuya distribución se restringe a la Cuenca del Plata, desde el norte de Bolivia hasta el noreste de la provincia de Buenos Aires, Argentina (Cowie y Thiengo, 2003). Durante el desarrollo de esta tesis se trabajó sobre el supuesto de que los ejemplares que

dieron lugar a las poblaciones de laboratorio pertenecían a la especie *Asolene pulchella* (Anton, 1839); sin embargo las similitudes genéticas, anatómicas y de las conchillas revelaron que *A. pulchella* y *A. platae* son la misma especie (Hayes *et al.*, 2009a; Léon *et al.*, 2014). Recientes estudios de genética molecular han sugerido que *Asolene* podría ser un grupo monofilético (Hayes *et al.*, 2008), y no han cuestionado que sea un género exclusivamente sudamericano.

Los ampuláridos son todos dioicos y ovíparos pero presentan dos tipos de oviposiciones muy distintas (Hayes *et al.*, 2009a): masas de huevos subacuáticas y gelatinosas o calcáreas y aéreas. El tipo de puesta se considera característico de cada género (Michelson, 1961) y aunque estas características son de simple identificación, algunas oviposiciones han sido asignadas erróneamente a especies de otros géneros (Cowie, 2002). Las puestas de *A. platae* pertenecen al primer grupo (Martín, 2002; Hayes *et al.*, 2009a), pero no han sido descritas todavía en forma detallada y sistemática, aunque sí se sabe que los sitios preferidos para la oviposición subacuática son las raíces de plantas flotantes o los troncos de plantas sumergidas (Martín, 2002). Dentro de los ampuláridos que presentan puestas de huevos del tipo subacuático y gelatinoso, los huevos se disponen en grupos formando una monocapa, como es el caso de *Lanistes* (Heiler *et al.*, 2007), o en capas superpuestas como en *Marisa* (Demian y Ibrahim, 1971).

Los ampuláridos se encuentran representados por ocho géneros, cuatro de los cuales se encuentran en África y Asia (Viejo Mundo) y los restantes en América del Sur y Central (Nuevo Mundo). En ambos territorios se encuentran tanto géneros con masas de huevos subacuáticas como géneros con masas de huevos aéreas (Figura 1.1). Recientemente el género *Pomella* fue considerado sinónimo de *Pomacea* (Hayes *et al.*, 2012), ya que una de las características que

diferenciaban estos dos géneros era el tipo de masas de huevos, que erróneamente se había supuesto que eran subacuáticas y gelatinosas en *Pomella*.



Modificado de la hipótesis de Hayes (2009b)

Figura 1.1 Cladograma de Hayes *et al* (2009b) modificado que representa la hipótesis sobre la biogeografía y diversificación de los ampuláridos, basado en el análisis de ADN.

El comportamiento de cópula descrito para *P. canaliculata* representa un modelo general para el resto de los ampuláridos (Burela y Martín, 2009, 2011), aunque poco se sabe sobre este tema en la mayor parte de las especies. Por el contrario, son numerosos los estudios sobre la anatomía reproductiva de los ampuláridos (e.g. Berthold, 1989, 1991; Bieler, 1993; Schulte-Oehlmann *et al.*, 1994; Catalán *et al.*, 2002; Gamarra-Luques *et al.*, 2006).

El desarrollo embrionario es conocido tanto para especies con huevos subacuáticos (e.g. *Marisa cornuarietis*, Demian y Yousiff, 1973) como con huevos

aéreos (e.g. *Pila*, Ranjah, 1942; *Pomacea*, Koch *et al.*, 2009), pero para el género *Asolene* se desconocen hasta sus detalles más gruesos. La presencia de polimorfismo espermático es frecuente en muchos grupos de gasterópodos (Hogdson, 1997) pero entre los ampuláridos solo ha sido descrita en forma detallada en *P. canaliculata* (Andrews, 1964; Winik *et al.*, 2001, 2009).

El ciclo de vida de *A. platae*, investigado en una población natural de un arroyo sobre la costa del Río de la Plata (Martín, 1984), es uno de los pocos aspectos ecológicos estudiados hasta ahora. Sin embargo, los resultados obtenidos en ese estudio son difíciles de interpretar debido al desconocimiento de aspectos básicos de la estrategia vital, como por ejemplo la edad a la madurez, la longevidad, la duración del desarrollo embrionario, etc. El estudio de cohortes en laboratorio ha resultado una herramienta indispensable para interpretar y comprender el ciclo de vida en especies del género *Pomacea* (e.g. Estebenet y Cazzaniga, 1993; Estebenet y Martín, 2002; Tamburi y Martín, 2009a). Además permite inferir el comportamiento de las especies en ambientes naturales dentro del rango natural de su distribución y evaluar la posibilidad de su asentamiento en nuevas áreas (Cowie *et al.*, 2009). Por otra parte, el análisis de estos atributos permitiría evaluar el grado de vulnerabilidad de las especies y poblaciones no invasoras (Martín *et al.*, 2013).

En los ampuláridos el pulmón aéreo es ventilado a través de un sifón, este tipo de respiración aérea ha sido caracterizada como obligatoria en esta familia (Cowie, 2002), aunque en el único caso estudiado se demostró que la necesidad de ventilar el pulmón depende en forma muy importante de la temperatura y la calidad del agua (Seuffert y Martín, 2009, 2010). La temperatura del agua es un factor de gran importancia en la distribución geográfica de las distintas especies

de ampuláridos y en sus patrones de actividad diaria y estacional (Heiler *et al.*, 2009; Seuffert *et al.*, 2010). En *A. platae* se desconocen totalmente los parámetros básicos de la respiración aérea, el efecto de la temperatura sobre el comportamiento y los límites térmicos de su actividad.

En el género *Asolene* el dimorfismo sexual no ha sido estudiado hasta ahora, pero existen varios antecedentes dentro de la familia que permiten presumir que podría identificarse algún carácter sexual secundario útil en la discriminación entre sexos. Se ha reportado dimorfismo sexual tanto en la forma de la conchilla como en el tamaño corporal de *M. cornuarietis* (Demian y Ibrahim, 1972) y *P. canaliculata* (Estebenet *et al.*, 2006). Para esta última especie además se observaron diferencias sexuales en el peso de la conchilla y en la forma del opérculo (Estebenet *et al.*, 2006), y en la coloración del cuerpo de *M. cornuarietis* (Demian y Ibrahim 1972). Estos caracteres sexuales secundarios resultan sumamente útiles para sexar a los individuos en forma no invasiva o a campo y han permitido mejorar en forma considerable el diseño de protocolos experimentales de cría y reproducción controlada (e.g. Martín y Estebenet, 2002; Tamburi y Martín, 2009b; Burela y Martín, 2011).

El dimorfismo sexual de la conchilla ha sido estudiado en los ampuláridos a través del uso de la morfometría clásica (Estebenet, 1998; Demian y Ibrahim 1972) y más recientemente de la morfogeometría (Tamburi y Martín, 2013). Esta última técnica está siendo ampliamente utilizada entre los gasterópodos para estudiar variaciones en la forma de la conchilla (Vogler *et al.*, 2012; Avaca *et al.*, 2013; Gurdebeke y Van Bocxlaer, 2013; Camama *et al.*, 2014); en los ampuláridos en particular esta variación se atribuye en general a una base

genética, sin embargo está fuertemente condicionada por las condiciones ambientales (Estebenet *et al.*, 2006).

Entre los gasterópodos son diversos los mecanismos que están involucrados en la herencia de los pigmentos que le dan la coloración a la conchilla: algunos involucran solo un gen bi- o poli-alélico mientras que otros involucran dos genes con seis alelos (Kozminsky, 2014). En los ampuláridos el polimorfismo del color ha sido descrito para algunas especies como *Pomacea bridgesii*, *P. canaliculata* y *Marisa cornuarietis*, (Perera y Walls, 1996; Dillon, 2003; Yusa, 2004) aunque solo para estas últimas dos se ha estudiado el mecanismo en la herencia de la coloración de la conchilla, que involucra un gen con dos alelos. Yusa (2004) planteó la importancia del uso del albinismo como marcador genético en estudios de paternidad múltiple, ya que permite estudiar de manera sencilla a través del fenotipo de la descendencia la existencia de competencia espermática y puede resultar un aporte clave para entender los mecanismo de selección sexual en los ampuláridos (Burela y Martín, 2011).

En *P. canaliculata* las hembras poseen la capacidad de almacenar esperma y lo mantienen fértil hasta 140 días (Estebenet y Pizani, 1999); por otra parte el esperma de un macho es reemplazado en forma más o menos rápida por el de los machos que copulan con posterioridad (Yusa, 2004). Aunque los detalles del patrón de uso de esperma permanecen poco claros, sería esperable que los machos produjeran grandes cantidades de esperma para maximizar sus probabilidades de resultar padres de al menos parte de la progenie (Birkhead y Møller, 1998). El conocimiento de los mecanismos de selección sexual en los ampuláridos se limita hasta ahora a esta especie (Burela y Martín, 2007, 2009, 2011), por lo que se espera que la información sobre otros géneros pueda servir

para comprender las presiones selectivas sobre la evolución de la anatomía y comportamiento sexual.

Los resultados obtenidos en dos de los capítulos de la presente tesis se encuentran ya publicados (Capítulos 2¹ y 4²); sin embargo a lo largo de la misma no se hará referencia a los trabajos sino a los capítulos. Cabe señalar que el primer trabajo publicado a partir de los resultados del Capítulo 2 de esta tesis fue realizado utilizando el nombre de *A. pulchella*.

¹ Tiecher, M. J., S. Burela y P. R. Martín (2014) Mating behavior, egg laying, and embryonic development in the South American apple snail *Asolene pulchella* (Ampullariidae, Caenogastropoda). *Invertebrate Reproduction and Development*, 58(1): 13–22.

² Tiecher, M. J., M. E. Seuffert y P. R. Martín (2015) Thermal biology of the South American apple snail *Asolene platae* (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Malacologia*, 58: X – XX.

1.2. Objetivos

Como objetivo general este trabajo de tesis pretende describir y comprender distintos aspectos de la historia de vida del caracol dulciacuícola *Asolene platae*, y estudiar la influencia de la temperatura sobre la actividad de esta especie.

En particular se estudiaron varios aspectos relacionados con la reproducción y el desarrollo embrionario (Capítulo 2), continuando con el estudio del modelo de crecimiento de juveniles y adultos así como de otros parámetros del ciclo de vida en condiciones de laboratorio (Capítulo 3). Además se investigó la influencia de cinco temperaturas constantes sobre el comportamiento, crecimiento y mortalidad de los caracoles (Capítulo 4).

Por otro lado, en relación al dimorfismo sexual, se buscaron posibles diferencias en las conchillas a través del uso de la morfogeometría y también del estudio del peso de las mismas en machos y hembras (Capítulo 5). Por último, el hallazgo de caracoles con fenotipos albinos durante el desarrollo del Capítulo 3 permitió estudiar las variaciones del color de la conchilla y de las partes blandas del cuerpo, el mecanismo hereditario involucrado y su posible uso como marcador genético (Capítulo 6). El cumplimiento de estos objetivos permitió elaborar conclusiones generales y analizar las implicancias de los resultados obtenidos, que son presentadas en el Capítulo 7.

2. REPRODUCCIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO

2.1. Introducción

La información disponible acerca de *Asolene platae* (Maton, 1811) fue aportada principalmente por Martín (1980, 1984, 1987, 1988) quien estudió la anatomía y la histología del complejo penial y el ciclo reproductivo de *A. platae*. Las masas de huevos de *A. platae* también fueron descritas por Martín (2002) pero las características del desarrollo embrionario, el comportamiento de cópula y de oviposición son totalmente desconocidos para esta especie. Michelson (1961) subrayó la importancia de las características reproductivas en la taxonomía de los ampuláridos. Recientemente, Hayes *et al.* (2009b) señalaron la importancia de los estudios sobre ecología y de las características comportamentales de los ampuláridos ya que proporcionan conocimientos fundamentales en el proceso evolutivo de diversificación en este grupo.

Los ampuláridos con una estrategia de oviposición aérea (*Pomacea* y *Pila*) han sido los más estudiados; estos depositan sus huevos por encima del nivel del agua y han desarrollado una cubierta calcárea que impide la deshidratación de los mismos y los protege mecánicamente. Entre las especies de ampuláridos con masas de huevos gelatinosas y subacuáticas, *Marisa cornuarietis*, es la más conocida debido a su importancia como modelo para test ecotoxicológicos (Sawasdee y Heinz, 2010) y como agente de biocontrol (Pointier y Jourdane, 2000; Pointier y David, 2004), pero la información sobre las características reproductivas y de desarrollo son escasas para el resto de los géneros con esta

estrategia de oviposición: *Asolene*, *Felipponea*, *Lanistes* y probablemente *Saulea* y *Afropomus* ya que aunque para estos últimos no se han descrito (Berthold, 1991) en la matriz de datos de los cladogramas construidos por Bieler (1993) este les asigna masas de huevos de tipo subacuáticas y gelatinosas.

Uno de los ampuláridos con masas de huevos gelatinosas y subacuáticas, *Marisa cornuarietis* se ha vuelto un invasor común en los ecosistemas naturales, principalmente debido a su uso como un agente de control biológico (Pointier y Jourdane, 2000; Pointier y David, 2004). Varios ampuláridos son frecuentes en el acuarismo comercial (incluyendo a *Asolene* spp.), aumentando la posibilidad de dispersión (Smith, 2006). El conocimiento de la morfología de las masas de huevos y de las características del desarrollo embrionario de las diferentes especies de *Marisa* y *Asolene* podrían ser útiles para la detección y control de invasiones incipientes de estos ampuláridos.

El objetivo general del presente estudio fue investigar la biología reproductiva, incluyendo el comportamiento de cópula, de oviposición y el desarrollo embrionario de *A. platae* en condiciones de laboratorio. En particular se estudió el comportamiento de machos y hembras durante la cópula, así como el tiempo invertido en ella, y se determinó la morfología de los diferentes tipos de células espermáticas. Otros objetivos fueron describir el comportamiento de oviposición, la forma y tamaño de las masas de huevos como la disposición de los huevos en estas y determinar el número de huevos por masa de huevo y la viabilidad de estas. Finalmente, se buscó describir la estructura de los huevos y estudiar el tiempo de desarrollo embrionario como también la variación del tamaño de los huevos y de los embriones.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Origen y mantenimiento de los caracoles

Los caracoles usados en este trabajo fueron obtenidos del Lago Regatas (Parque Tres de Febrero, 34° 34' 24" S, 58° 24' 53" O. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina) y sus descendientes fueron criados en el laboratorio. Fueron mantenidos en acuarios colectivos de 20 L de capacidad con agua de canilla saturada con carbonato de calcio a 25 ± 2 °C, bajo un fotoperíodo de 14/10 horas (luz/oscuridad) y alimentados con lechuga *ad libitum*.

2.2.2. Comportamiento de cópula y de oviposición

El comportamiento de cópula y de oviposición fue observado en ensayos realizados en dos tipos de acuarios colectivos: acuarios de 24 L (20 x 30 x 40 cm) con 10 a 20 caracoles y acuarios de plástico de 3 L (de forma cilíndrica, diámetro: 32 cm, altura: 6 cm) con 14 a 17 caracoles. Los caracoles fueron previamente numerados con marcadores permanentes para su identificación.

Debido a la aparente falta de dimorfismo sexual externo (Capítulo 4), los caracoles fueron sexados por su comportamiento y, cuando fue posible, por la observación directa de los órganos genitales. Los machos fueron reconocidos como tales cuando realizaron la monta sobre el lado derecho de la conchilla de otro caracol (una supuesta hembra) y por la observación de la vaina del pene durante este proceso en algunos casos (Burela y Martín, 2009).

Las hembras fueron reconocidas como tales cuando fueron observadas oviponiendo en un acuario colectivo o cuando las masas de huevos fueron

encontradas en un acuario individual donde una supuesta hembra había sido aislada después de haber sido montada por un macho.

Se realizaron observaciones sobre parejas aisladas de caracoles previamente sexados en acuarios de vidrio de 2,8 L (diámetro: 14 cm; altura: 18 cm). Las cópulas y los eventos de oviposición que fueron observados desde el principio fueron cronometrados con un reloj digital.

Se realizaron observaciones no sistemáticas sobre la morfología y el comportamiento de células espermáticas bajo un microscopio de contraste de fases. Las muestras de fluido espermático fueron obtenidas durante la observación de unas pocas cópulas en las cuales una pequeña cantidad de fluido blanquecino cayó en forma de gota desde la cavidad paleal de la hembra, y de una masa de huevos en la que se observó fluido seminal sobre la superficie. El espermatozoide presente dentro de los huevos también fue observado.

2.2.3. Masas de huevos y desarrollo embrionario

Las masas de huevos frescas depositadas en las paredes de acuarios colectivos o individuales fueron despegadas suavemente y puestas en cajas de Petri individuales de 15 cm de diámetro con agua del mismo acuario. Fueron mantenidas a 25 ± 2 °C de temperatura bajo un fotoperíodo de 14/10 h (luz/oscuridad).

Las masas de huevos, los huevos y los embriones fueron observados bajo microscopio binocular y estereoscópico provistos con cámaras digitales. La estructura cristalina de los elementos refringentes observados en las masas de huevos fueron estudiados usando un microscopio de luz polarizada y directa (Petrographic Olympus B2-UMA) sobre masas de huevos frescas y a través de

difracción de rayos X (Difractómetro Rigaku D-Max III-C, con ánodo de Cu), sobre masas de huevos previamente desecadas con la ayuda de un ventilador eléctrico a temperatura ambiente.

El número de neonatos que emergió cada día en cada masa de huevos se registró para un total de 15 masas de huevos que fueron mínimamente manipulados, hasta cinco días después de pasada la última eclosión. Se contó además el número de huevos que no eclosionaron. Los eclosionados que emergieron de otro grupo de masas de huevos fueron aislados una semana después de la eclosión en acuarios de plástico de 200 ml con agua de canilla y con un trozo de lechuga descongelada para observar su comportamiento.

Un grupo de siete masas de huevos fue usado para registrar el crecimiento de los embriones hasta la eclosión. Cada día fueron tomadas fotos escaladas de cada masa de huevos. Se tomaron diez huevos y diez embriones al azar sobre cada fotografía y se midió el diámetro de los huevos y el eje mayor de los embriones.

2.3. Resultados

2.3.1. Comportamiento copulatorio

Todas las cópulas de *A. platae* observadas en el laboratorio ocurrieron bajo el agua, ya sea durante el día o la noche; sin embargo, en dos ocasiones durante el cambio semanal de agua, un macho montó a otro individuo e introdujo la vaina del pene en su cavidad paleal.

El macho monta la conchilla de la hembra sobre el lado derecho para iniciar la cópula, luego la vaina del pene es protruida e insertada dentro de la cavidad paleal de la hembra (figura 2.1A). Durante la cópula el macho permanece con la cabeza parcialmente retraída y su pie fuertemente adherido a la conchilla de la hembra; la hembra también permanece con la cabeza retraída, y con el pie adherido al sustrato o totalmente retraído dentro de la conchilla excepto la parte terminal. Generalmente ambos permanecen inmóviles (ni reptan, ni se alimentan ni ventilan su pulmón), con sus tentáculos cefálicos fuertemente enrollados.

La duración de la cópula fue altamente variable, desde 20 minutos a 8,17 horas. La duración de las cópulas observadas en acuarios colectivos (n= 38) fue significativamente más corta (test de Mann-Whitney, $P > 0,001$) que aquellas registradas en acuarios individuales (n= 42). Las medias fueron 75,0 y 187,5 minutos respectivamente y la media general (\pm SD) fue 157,45 (\pm 117,05) minutos; la duración del 22,5 % de las cópulas registradas fue menor que una hora.

En los acuarios colectivos fue común la observación de parejas homosexuales: el 30% de los caracoles machos montó e introdujo la vaina del pene en la cavidad paleal de otro macho. Los caracoles montados o pasivos

fueron tanto caracoles ya identificados como machos por su comportamiento masculino previo (probablemente adultos, siete de 13) como caracoles que solo mostraron el comportamiento masculino en ensayos posteriores (probablemente juveniles, seis de 13).

La observación de fluido seminal, liberado accidentalmente durante la cópula o sobre una masa de huevos, mostró dos tipos de células espermáticas claramente diferenciadas (figura 2.1B): el euesperma o esperma verdadero (fértil, con la carga genética completa) y el paraesperma, que es infértil (con ausencia o carga incompleta de ADN). El euesperma es uniflagelado, con una cabeza helicoidal ($4,92 \pm 0,56 \mu\text{m}$), una pieza media recta y rígida ($8,84 \pm 0,59 \mu\text{m}$) y una cola larga y móvil ($31,29 \pm 3,98 \mu\text{m}$, $n= 11$). El otro tipo espermático, el paraesperma, tiene un cuerpo fusiforme y flexible ($16,93 \pm 1,37 \mu\text{m}$) con siete a nueve flagelos ($35,61 \pm 3,07 \mu\text{m}$, $n= 10$). También se observó que a diferencia del euesperma, el paraesperma posee movimientos causados por la propulsión de sus flagelos que provocarían el desplazamiento.

2.3.2. Comportamiento de oviposición

Las masas de huevos fueron depositadas principalmente en las paredes del acuario a profundidades muy variables pero nunca fuera del agua. Las hembras frecuentemente usaron otros sustratos (cables de termostatos o tubos de aireadores), cuando estaban disponibles, para depositar sus masas huevos; sin embargo, nunca usaron las hojas de lechuga provistas como alimento, aun cuando estuvieron por largos períodos junto con la lechuga.

Durante la oviposición el lóbulo nucal derecho de la hembra forma un canal ovipositor abierto a través del cual emergen los paquetes de huevos gelatinosos

(con uno a cuatro huevos por paquete) (figura 2.1 C); la cabeza de la hembra permanece a menudo totalmente retraída, y solo son visibles los tentáculos fuertemente enrollados y la masa bucal; las hembras no reptan, no se alimentan o ventilan su pulmón durante la oviposición. Al principio la hembra ovipone numerosos paquetes de huevos sin mover su pie por lo que comienzan a acumularse y forman un grupo apretado de huevos, pero más tarde la hembra comienza a moverse, usualmente hacia atrás, o rota sobre su pie quedando así los paquetes de huevos depositados más laxamente, aunque siempre en contacto con el grupo original.

Las hembras nunca depositaron masas de huevos sin antes haber copulado por lo menos una vez, aunque fueron capaces de oviponer numerosas masas de huevos sin subsiguientes cópulas. Después de haber sido criadas en acuarios colectivos con machos, ocho de diez hembras aisladas fueron capaces de oviponer 5,2 masas de huevos en promedio (rango: 1 a 15) con una producción total de 266,9 (36 a 597) huevos embrionados en un período de 138 días (73 a 169). Además, tres hembras aisladas después de una única cópula depositaron entre cuatro y nueve masas de huevos durante un período de 34 a 82 días; la cantidad total de huevos embrionados por hembra varió entre 235 y 670. La producción total de huevos fue subestimada en ambos grupos de hembras, ya que algunas de las masas de huevos fueron parcial o totalmente comidas por la madre.

La predación de las masas de huevos por los caracoles presentes en el mismo acuario colectivo fue muy común; con el fin de permitir el desarrollo de los embriones fue necesario protegerlas con barreras de rejilla plástica o aislarlas en cajas de Petri. Las hembras atacaron rápidamente sus propias masas de huevos

aun cuando la lechuga estuvo presente *ad libitum*. Algunas de las masas de huevos depositadas durante la noche por hembras aisladas fueron parcial o completamente comidas por la mañana temprano; en este último caso solo fueron encontrados restos de gelatina y cápsulas de huevos.

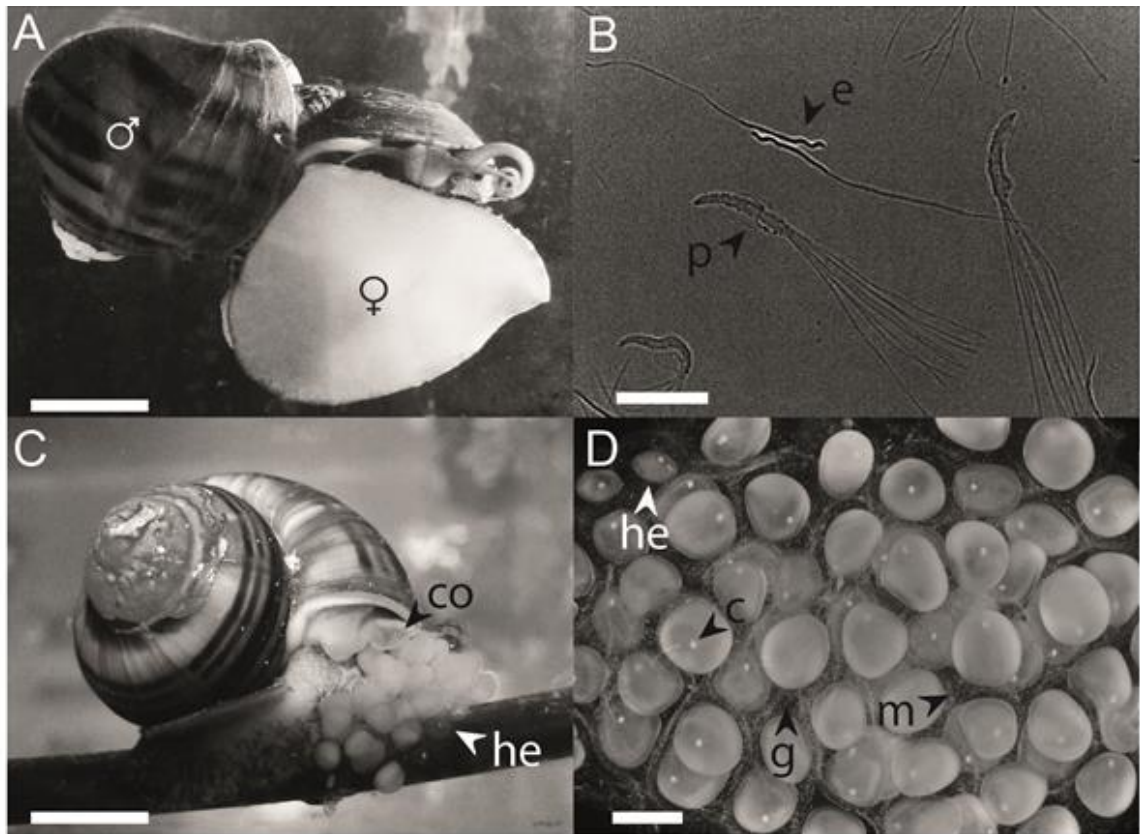


Figura 2.1 Comportamiento reproductivo, masas de huevos y esperma de *Asolene platae*: (A) Pareja en cópula, escala = 1 cm. (B) Células espermáticas, escala = 17 μm . (C) Hembra oviponiendo, escala = 1 cm. (D) Masa de huevos, escala = 2 mm. (E) Esquema de una masa de huevos (vista lateral). (e) euesperma, (p) paraesperma, (co) canal ovipositor, (g) matriz gelatinosa, (c) cigoto, (m) microcristales, (ci) capa interna de la cápsula, (ef) esférulas, (s) sustrato, (he) huevo estéril.

2.3.3. Estructura de la masa de huevos

Las masas de huevos fueron adheridas al sustrato por una secreción pegajosa concentrada en el lugar donde los primeros huevos fueron depositados; estos huevos (tres a cinco) fueron estériles, más pequeños y opacos que lo normal. Las masas de huevos depositadas en las paredes del acuario fueron redondeadas o ligeramente oblongas (largo promedio = $26,03 \pm 4,58$ mm y ancho = $17,87 \pm 3,72$ mm, n = 16) y la superficie opuesta al sustrato fue irregularmente convexa (figura 2.1D, E). Las masas de huevos estuvieron compuestas de numerosos paquetes de huevos y contuvieron un promedio de $98,10 \pm 28,90$ huevos (n = 46). Los paquetes de huevos se superponen irregularmente y se observaron hasta tres capas poco definidas. Los huevos del mismo paquete fueron frecuentemente localizados en diferentes planos en relación al sustrato (figura 2.1D, E). Los paquetes de huevos se mantienen unidos por una gelatina transparente que presenta numerosos elementos refringentes o microcristales. Los microcristales (figura 2.2 A, B) fueron incoloros, generalmente anhedros y a veces euhedros, con exfoliación rombohédrica, extinción simétrica y birrefringencia que va desde gris perla a blanco. Por otro lado, el modelo de difracción de rayos X de las masas de huevos enteras mostró picos distintivos correspondientes a calcita a 29,56 y 39,61 (figura 2.2 C).

Durante los primeros días después de la oviposición, los huevos pertenecientes del mismo paquete pueden ser reconocidos por su cercanía y porque las superficies de contacto permanecen planas (figura 2.2 F). Después de la oviposición la gelatina de la masa de huevos y las paredes de los huevos se hinchan, aparentemente por hidratación, y la forma de los huevos se vuelve esferoidal.

Cada huevo está limitado por la cápsula del huevo que presenta dos delgadas capas; la exterior es pegajosa y se encuentra en contacto con la gelatina que rodea los huevos de cada paquete; la más interna contiene el perivitelo y el embrión (figura 2.2 D, F). El perivitelo es translúcido y amarillento, lo que le da a la masa de huevos el mismo color. La zona periférica del perivitelo es de aspecto finamente estratificado y consistencia gomosa, como se puede apreciar cuando el huevo es cortado o pinchado o cuando el embrión se alimenta del mismo (ver más abajo). El cigoto está localizado en la zona más interna del perivitelo, en una cavidad poco definida, generalmente excéntrica, que contiene un fluido viscoso amarillento y turbio, el cual se vuelve transparente varias horas después de la oviposición. Un delgado reguero compuesto por cientos de células euespermáticas puede ser visto dentro de esta cavidad. Numerosas esférulas de CaCO_3 también pueden ser encontradas tanto en el fluido como en la porción gomosa del perivitelo (figura 2.2 E).

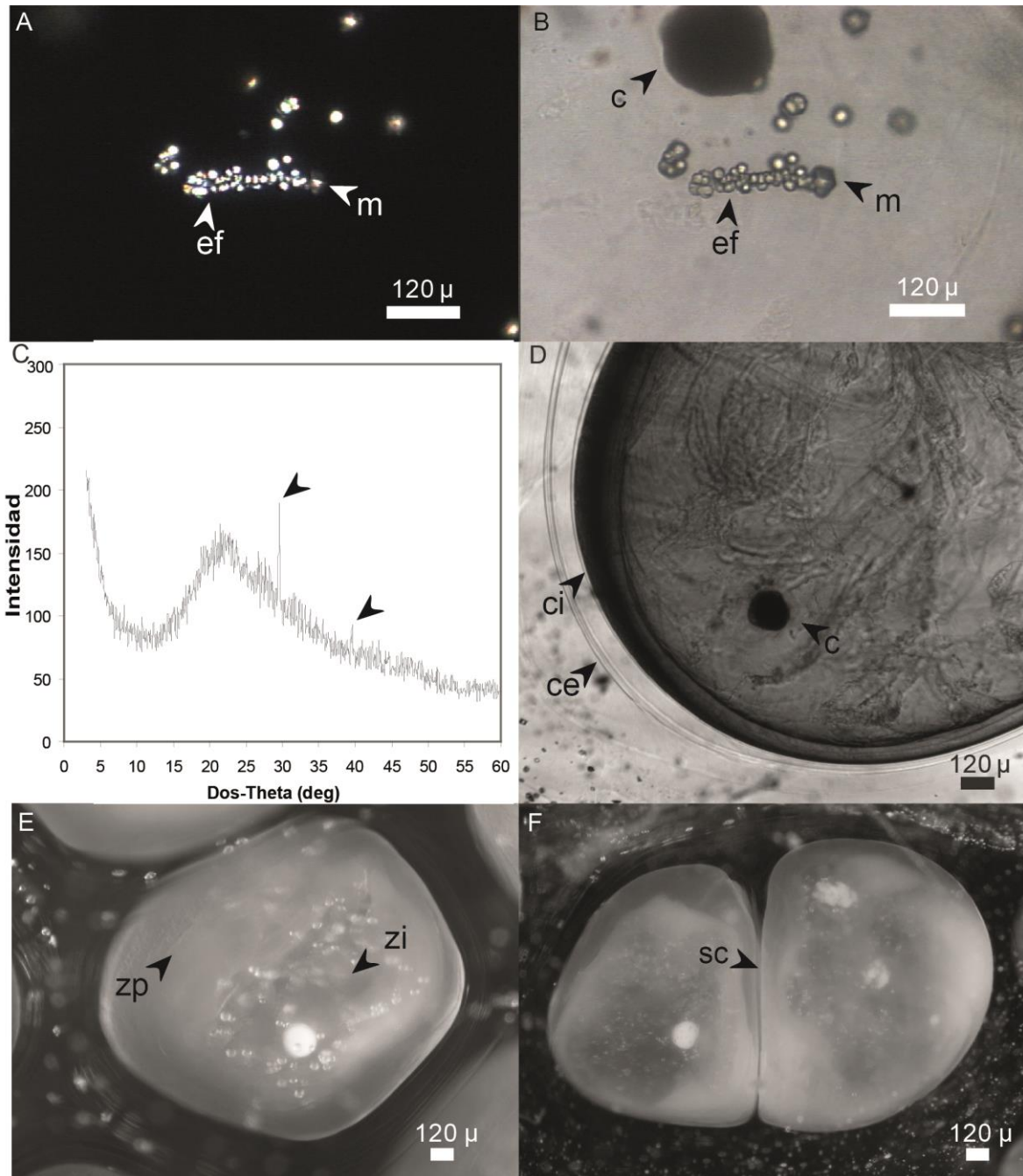


Figura 2.2 Detalle de los huevos de *Asolene platae*: (A) vista parcial de un huevo bajo luz polarizada. (B) La misma sección que en (A) bajo, luz directa. (C) Difractograma de rayos X del polvo de las masas de huevos desecadas; las flechas indican dos picos correspondientes a calcita. (D) Capas de la cápsula del huevo. (E) Huevos depositados recientemente. (F) Paquete con dos huevos; (c) cigoto, (ef) esférulas, (m) microcristales, (ce) capa externa, (ci) capa interna, (zp) zona periférica del perivitelo, (zi) zona interna de perivitelo, (sc) superficie de contacto plana. Escala = 120 μ m.

2.3.4. Desarrollo embrionario

Durante el desarrollo, la cavidad interna del perivitelo incrementa gradualmente su tamaño y la porción gomosa decrece en grosor, aparentemente debido a la actividad de alimentación del embrión. En los primeros estadios del desarrollo el embrión se mueve sobre la superficie interna por acción ciliar pero más tarde comienza a reptar sobre ésta y la masa bucal está en continuo movimiento. Al momento de la eclosión el perivitelo ha sido consumido totalmente por el embrión, el cual reptar y ramonea continuamente sobre la capa interna de la cápsula del huevo. Eventualmente el embrión perfora la capa interna provocando su colapso (figura 2.3); luego reptar y atraviesa las dos capas de la cápsula con su pie y también atraviesa la matriz gelatinosa del paquete de huevos, que ha perdido su turgencia original. Los elementos calcáreos presentes en el interior de los huevos desaparecen poco después de iniciado el desarrollo embrionario pero los que están en la matriz gelatinosa duran hasta más allá del momento de la eclosión.

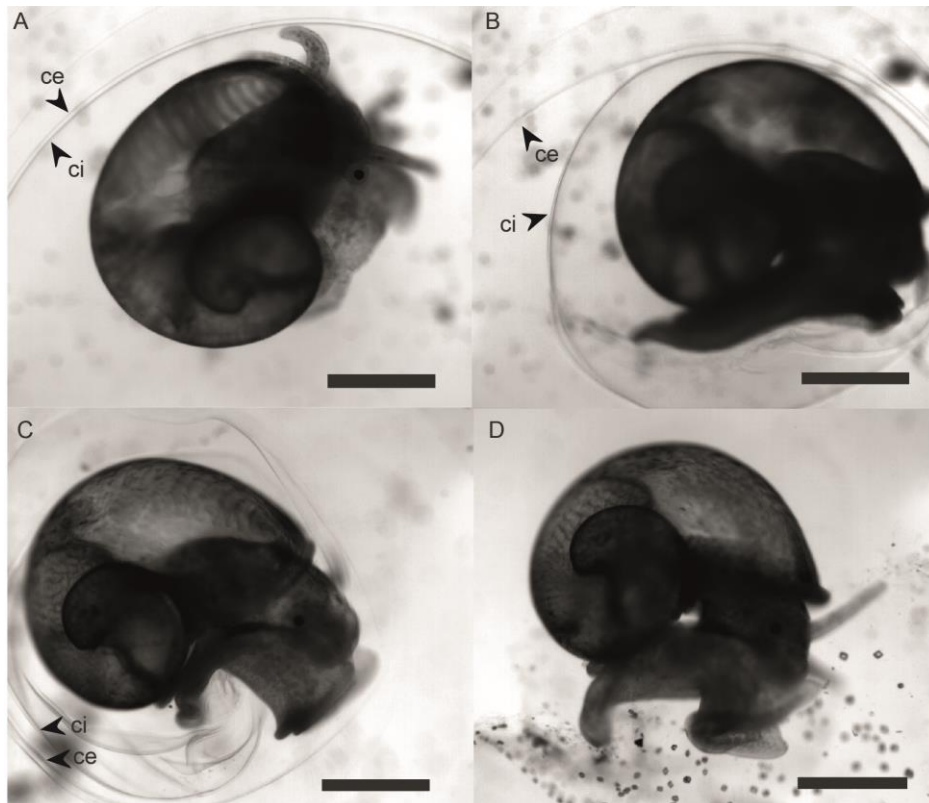


Figura 2.3 Detalles de la eclosión en *Asolene platae*. (A) Embrión completamente desarrollado antes de la eclosión. (B) Embrión al momento de la eclosión. (C) Embrión saliendo a través de la cápsula. (D) Neonato reptando sobre la matriz de gelatina; (ci) capa interna; (ce) capa externa, escala = 0.5 mm.

El tiempo transcurrido hasta la eclosión de los primeros huevos en cada masa de huevos fue $10,80 \pm 2,19$ días (media \pm SD), y el rango fue de ocho a 16 días (figura 2.4 A, $n = 35$). La eclosión dentro de cada masa de huevos fue altamente asincrónica: el tiempo transcurrido entre la primera y la última eclosión varió entre cuatro y 15 días y para el 87 % de las 15 masas de huevos estudiadas fue más largo que seis días. Considerando todos los huevos ($n = 1142$) de las masas de huevos estudiadas, más del 70 % eclosionó dentro de los cinco días desde la primera eclosión en cada masa de huevos (figura 2.4 B). La viabilidad media (porcentaje de huevos eclosionados por masa de huevos) fue de $77,30 \pm 12,00$ ($n = 24$).

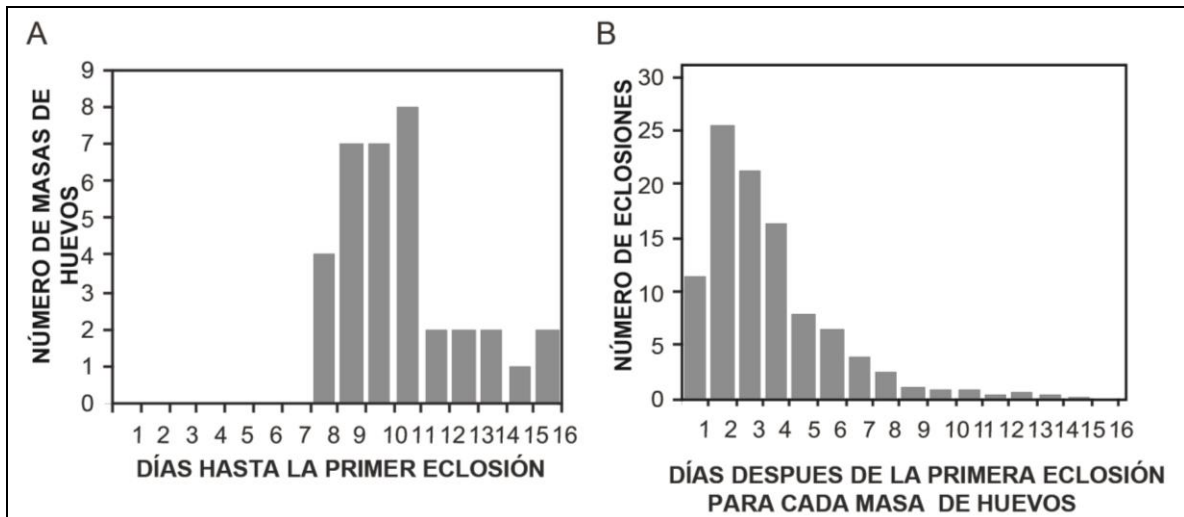


Figura 2.4 Duración del desarrollo embrionario en *Asolene platae*. (A) Tiempo desde la oviposición hasta el primer huevo eclosionado. (B) Número de eclosiones por día, desde el primer hasta el último huevo eclosionado.

Durante el desarrollo se observó un incremento del 37,8 % en el diámetro de los huevos, desde $2,25 \pm 0,28$ mm (media \pm DS) para las masas de huevos recién depositadas hasta $3,16 \pm 0,26$ mm al momento de la eclosión (figura 2.5); por otra parte, el diámetro medio del cigoto fue de $0,16 \pm 0,014$ mm y al momento de la eclosión el largo del embrión fue de $1,40 \pm 0,33$ mm.

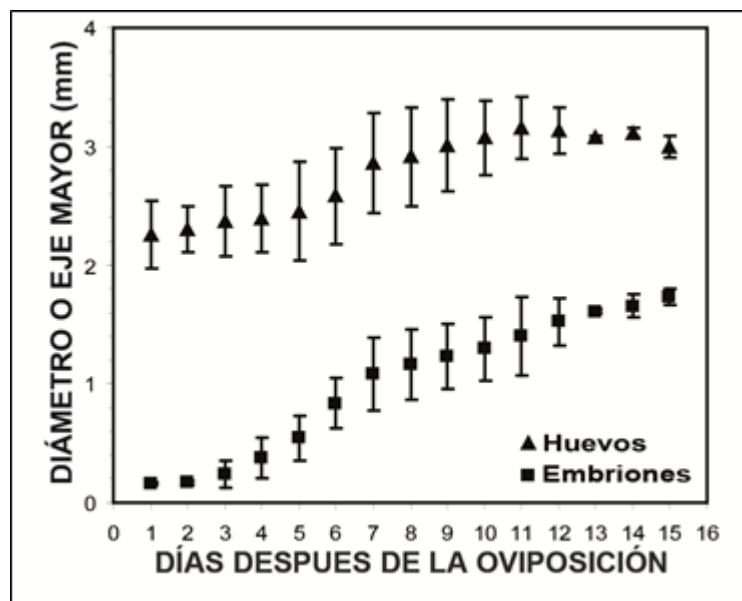


Figura 2.5 Desarrollo embrionario en *Asolene platae*: Diámetro o eje mayor (media \pm SD) de la cápsula de los huevos y embriones durante el desarrollo embrionario.

Los caracoles recientemente salidos del huevo (figura 2.3 A, D) tienen la apariencia de un caracol en miniatura, con tentáculos, ojos, ctenidio, osfradio, pie, opérculo y conchilla, pero la observación cuidadosa del lado derecho de la cavidad del manto mostró la ausencia del pulmón. Bajo condiciones de laboratorio la gelatina de la masa de huevos es el primer alimento tomado por los neonatos; frecuentemente perforan la cápsula de otros huevos provocando la eclosión prematura de algunos embriones durante la salida de la masa de huevos o durante este período inicial. Los neonatos de una semana de nacidos, aislados en frascos de plástico, no comenzaron a comer lechuga descongelada hasta transcurrida otra semana. A la tercera semana de edad, más del 70% de los neonatos ya comían lechuga descongelada, hecho apreciable por la presencia de fecas de color verde oscuro en el intestino. Ocho a diez semanas después de la eclosión se observó en la cavidad paleal a través de la conchilla transparente una burbuja de aire, indicando que el pulmón se había vuelto funcional.

2.4. Discusión

La cópula en *Asolene platae* sigue el modelo general descrito para otros ampuláridos (e.g. Burela y Martín, 2009, 2011): ocurre bajo el agua y con el macho firmemente adherido al lado derecho de la conchilla de la hembra, y ambos permanecen con sus tentáculos cefálicos fuertemente enrollados. Sin embargo, en *A. platae* la hembra no reptaba, ni se alimenta ni ventila su pulmón como ocurre en otros ampuláridos (e.g. Bahl, 1928; Demian y Ibrahim, 1971; Albrecht *et al.*, 1996; Burela y Martín, 2009). En *M. cornuarietis* aparentemente es requisito para la cópula un sustrato firme para la adhesión de pie de la hembra (Demian y Ibrahim, 1971), pero en *A. platae* la hembra a menudo permanece en el fondo durante la cópula con el cefalopie parcialmente retraído.

La duración media de la cópula en *A. platae* fue menor a tres horas (2,66 h), la cual cae en el extremo inferior del rango de la duración de cópula en los ampuláridos (38 minutos a 12,15 h; Burela y Martín, 2011). Como en otros ampuláridos, la duración de las cópulas fue altamente variable, desde los 20 minutos a 8,17 h. La duración fue generalmente menor en parejas formadas en acuarios colectivos en los cuales otros machos y hembras estuvieron presentes, tal vez debido a la interferencia de machos merodeadores que algunas veces fueron observados reptando sobre las parejas en cópula y que podrían ser competidores por la pareja. Tal vez algunas de las cópulas de menor duración fueron solo intentos fallidos que terminaron sin conexión genital, como ocurre en *P. canaliculata* (Burela y Martín, 2011), en la que no se produce transferencia de esperma en cópulas de menos de dos horas. La alta frecuencia de parejas homosexuales en acuarios colectivos indicaría que los machos no son capaces de reconocer las hembras hasta estadios avanzados del proceso de cópula y

probablemente que tampoco sean capaces de reconocer a las hembras receptivas, lo que tal vez explique algunas de las cópulas muy cortas como intentos fallidos.

Las hembras de *A. platae* son capaces de almacenar esperma viable por períodos de más de 169 días durante los cuales depositan más de 15 masas de huevos y más de 597 huevos embrionados. Después de una sola cópula, *P. canaliculata* puede oviponer miles de huevos por un período de más de 140 días (Estebenet y Martín, 2002) y *M. cornuarietis* puede poner numerosas masas de huevos en un lapso de más de un mes (Demian y Ibrahim, 1971); ésta última es comparable con nuestras observaciones en *A. platae*.

El proceso de oviposición y el sitio preferido para esta actividad en *A. platae* son muy similares a los descritos para *M. cornuarietis* por Demian y Ibrahim (1971), quienes sugirieron que las hembras requieren un sustrato sumergido duro cercano a la superficie del agua para la oviposición pero usualmente evitan aquellos que son propensos a la predación o putrefacción (e.g. hojas de lechuga u otras macrófitas palatables).

Nuestras observaciones en *A. platae* indican que el canibalismo de huevos no es accidental, ya que ocurre frecuentemente aun cuando las masas de huevos son depositadas sobre sustratos no comestibles.

En la naturaleza, *Asolene platae* usa las raicillas de plantas sumergidas y troncos flotantes para la oviposición (Martín, 2002). En este estudio nunca encontramos masas de huevos sobre el fondo de los acuarios, lo cual en cuerpos de agua naturales, probablemente ayude a evitar la sedimentación de material en suspensión, que podría impedir el intercambio de oxígeno con el agua y reducir la viabilidad de la masa de huevos.

La estructura de las masas de huevos de *A. platae* es similar a la de *M. cornuarietis* descrita por Demian y Ibrahim (1971), y ambos difieren de las masas gelatinosas de *Lanistes ovum* (Heiler *et al.*, 2007), en las que los huevos no son depositados en una sola capa. La característica distintiva de las masas de huevos de *A. platae* es la presencia de numerosos microcristales de calcita en la matriz gelatinosa que rodea los paquetes de huevos. Las características ópticas (Kerr, 1965) y el análisis de rayos X indican que los elementos refringentes estuvieron constituidos por calcita. Estos microcristales no fueron observados en las masas de huevos de *A. platae* colectadas en el campo por Martín (2002), posiblemente estos elementos se hayan confundido con partículas de arena y limo adheridas a las masas de huevos. Las primeras masas de huevos puestas por hembras capturadas a campo también presentaron estos cristales, por lo tanto no son un artefacto de las condiciones de cría del laboratorio (agua saturada con CaCO₃).

En diversos ampuláridos, el calcio de origen tanto extracapsular como intracapsular, es un recurso para el desarrollo embrionario (Turner y McCabe, 1990). En las masas de huevos acuáticas de *M. cornuarietis* el calcio se obtiene directamente del agua (Bartelt, 1970) pero los microcristales y esférulas presentes dentro de la cápsula de *A. platae* probablemente representen un recurso extra de calcio para la formación de la conchilla del embrión, ya que desaparecen durante su desarrollo. Por otro lado, nuestras observaciones indican que los neonatos permanecen alimentándose sobre las masas de huevos durante las primeras dos semanas, por lo que los microcristales de la matriz gelatinosa podrían jugar la misma función después de la eclosión. Algunos gastrópodos terrestres cubren sus huevos con una capa de fecas para suministrar calcio a los embriones, representando una forma de cuidado parental (Baur, 1994).

Una característica destacable de los huevos de *A. platae* es la consistencia no fluida y gomosa de la zona periférica del perivitelo que rodea la zona interna fluida que contiene el embrión. Esta condición no ha sido mencionada para otros ampuláridos con masa de huevos acuáticos pero es similar a lo descrito para *Pila globosa* por Bahl (1928) y Ranjah (1942). En esta especie, debajo de la cáscara calcárea del huevo hay una “esfera de albumen sólido” que encierra un “núcleo de albumen líquido” que contiene el embrión. Una de las posibles funciones atribuidas a la alta viscosidad del fluido perivitelinico en *P. canaliculata* es la de actuar como barrera ante la invasión de microorganismos (Ituarte *et al.*, 2010). En *P. canaliculata* la viscosidad del perivitelo disminuye conforme transcurre el desarrollo embrionario (Heras *et al.*, 1998) mientras que en *A. platae* y *P. globosa* el embrión se desarrolla en el perivitelo fluido y luego comienza a alimentarse del perivitelo no fluido que constituye la mayor parte de las reservas, que desaparece casi totalmente al momento de la eclosión. Un recurso adicional de nutrientes podrían ser los numerosos espermatozoides localizados dentro de los huevos que están presentes en muchos de los géneros de ampuláridos (Ranjah, 1942; Demian y Ibrahim, 1971; Koch *et al.*, 2009) aunque la principal fuente donante de recursos de energía y nutrientes está constituida por el complejo perivitelino (Heras *et al.*, 1998; Dreón *et al.*, 2006).

En la presente tesis se reporta por primera vez la presencia de paraesperma en el género *Asolene*. En *Pomacea* se han descrito tres tipos de células espermáticas: eupirénicas o euesperma (fértil, con una cabeza en forma de sacacorchos, una pieza media rígida y una larga cola o flagelo), apirénico (sin cromatina, cuerpo fusiforme y multiflagelado) y oligopirénico (con cromatina incompleta, cuerpo con forma de pera y un largo flagelo) (Sachwatkin, 1920;

Andrews, 1965; Gamarra *et al.*, 2006; Winik *et al.*; 2009). Este último ha sido observado solo en *P. canaliculata* pero la morfología de los otros dos tipos de células espermáticas corresponden estrechamente al euesperma y paresperma observado en *A. platae* en este estudio. La diferencia en tamaño del euesperma es mayor entre las dos especies de *Pomacea* (15 μm vs 39 μm) que entre *P. canaliculata* y *A. platae* (39 μm vs 45 μm). El tamaño del paraesperma apirénico es similar para las dos especies de *Pomacea* (22 a 25 μm) y menos de la mitad del largo del de *A. platae* (52 μm). El paraesperma apirénico de las dos especies de *Pomacea* tiene de tres a cinco flagelos, mientras que en *A. platae* muestra de siete a nueve flagelos. La motilidad del paraesperma de *A. platae* es más alta que la del euesperma; Sachwatkin (1920) y Andrews (1964) mencionaron diferencias entre los dos tipos espermáticos que son consistentes con nuestra observaciones. Winik *et al.* (2001) han especulado acerca de una función *carrier* del paraesperma en *P. canaliculata*, en la cual estas células infértiles podrían jugar un papel en el transporte de las células fértiles (ver Capítulos 6 y 7).

Una característica común de las masas de huevos subacuáticas de los ampuláridos es el notable hinchamiento de las cápsulas de los huevos durante el desarrollo (Demian y Ibrahim, 1970; Bartelt, 1970; Heiler *et al.*, 2008). Esto está probablemente relacionado con el marcado incremento de la concentración de Ca^{2+} y Na^{+} en el fluido perivitelino que Bartelt (1970) observó en *M. cornuarietis*, ya que la permeabilidad de las masas de huevos se incrementó solo levemente durante el desarrollo en esta especie. Los huevos recién depositados de *Asolene* y *Marisa* son mucho más pequeños que los depositados por *Lanistes ovum* (2,25 y 2-3 mm vs. 5 mm, respectivamente) pero el incremento en volumen es mayor en los primeros (cuatro y ocho veces vs. 2,74 veces, respectivamente).

Los neonatos de géneros neotropicales *Asolene* y *Marisa* son también bastante más pequeños que los de *Lanistes* (1,4 y 1,3 mm vs. 3,0 mm). Los embriones que están cercanos a la eclosión son mucho más pequeños que las cápsulas de los huevos en todos los casos y pueden reptar sobre la capa interna. La ruptura de la cápsula de huevos no necesita ningún tipo de presión mecánica del embrión, como parece ocurrir en los ampuláridos con huevos de cáscara calcárea (Pizani *et al.*, 2005). Sin embargo Koch *et al.* (2009) sugirieron que en *P. canaliculata* el embrión erosiona la cápsula de los huevos antes de eclosionar. La eclosión en *A. platae* ocurre aparentemente como resultado de la acción radular del embrión combinada con la alta presión del fluido perivitelino.

La duración mínima del desarrollo embrionario en *A. platae* (siete días) fue comparable con la de los otros dos géneros de ampuláridos (7-7,5 días) a temperaturas similares (25-27°C). Sin embargo, la duración media en *A. platae* fue de 10,8 días y algunas masas de huevos comenzaron a eclosionar recién después de 16 días desde la oviposición. Por otra parte, hay un alto grado de asincronía en la eclosión dentro de cada masa de huevo de *A. platae*. Esto podría deberse a la posición de los huevos dentro de cada masa de huevos; probablemente los huevos interiores reciben menos oxígeno y su desarrollo se retrasa, un efecto común en las masas de huevos gelatinosas de gasterópodos acuáticos (e.g. Marois y Croll, 1991; Cohen y Strathmann, 1996). Tal vez la asincronía se incrementó en parte por la remoción de los neonatos de las masas de huevos, ya que probablemente su ramoneo sobre la masa de huevos podría haber incrementado la oxigenación de las partes interna de las masas o provocar la eclosión prematura de los embriones más retrasados. Bartelt (1970) mostró que la aireación del agua acortó la duración del desarrollo desde uno a 2,5 días en

masas de huevos de *M. cornuarietis* pero comentó que el desarrollo es uniforme dentro de una masa de huevos mantenida a una temperatura dada.

Aunque los neonatos de *A. platae* están en apariencia completamente desarrollados, no son totalmente competentes durante las primeras semanas de vida independiente. Solo comenzaron a alimentarse sobre material vegetal senescente a la tercera semana; esto contrasta con el comportamiento de los neonatos de *P. canaliculata* que comienzan a alimentarse sobre lechuga fresca dos o tres días después de la eclosión (observaciones personales) y son capaces de alimentarse sobre ésta incluso si fueron extraídos prematuramente del huevo (Koch *et al.*, 2009). No se observaron evidencias de un pulmón al momento de la eclosión en *A. platae*, mientras que aparece en el quinto día del desarrollo embrionario en *M. cornuarietis* (Demian y Yousif, 1973). La capacidad de respirar aire en *A. platae* (adquirida a las ocho a diez semanas de edad) parece estar mucho más demorada en comparación con la de los neonatos de *P. canaliculata*, que comienzan a respirar aire dentro de las tres horas de eclosionados (Seuffert y Martín, 2009).

Entre los ampuláridos, la cáscara calcárea de los huevos está presente solo en *Pomacea*, *Pomella* y *Pila*, los cuales depositan sus masas de huevos sobre la superficie del agua (Hayes *et al.*, 2009b). El hábito de oviponer por encima de la superficie del agua evolucionó independientemente en los ampuláridos del Nuevo mundo (*Pomacea* y *Pomella*) y el Viejo mundo (*Pila*). Sin embargo estos ampuláridos comparten un rasgo único, ya que la cáscara de los huevos se compone únicamente de vaterita, un polimorfo de carbonato de calcio inestable e infrecuente (Tompa, 1980). La presencia de abundantes y dispersos microcristales de calcita en las masas de huevos de *A. platae* representa una

condición no observada previamente en los Ampullariidae y abre nuevas preguntas acerca de los modelos de evolución de las masas de huevos aéreas en esta familia.

Los resultados obtenidos en este capítulo indican que incluso dentro del grupo de ampuláridos que ponen masas de huevos gelatinosos, los detalles de estructura de las masas de huevos y los procesos de desarrollo (especialmente la presencia de microcristales y la tardía aparición del pulmón), constituyen una rica fuente de características valiosas para estudios comparativos y taxonómicos en el futuro.

3. CICLO DE VIDA

3.1. Introducción

En la familia Ampullariidae se han realizado estudios sobre el ciclo de vida de varias especies, principalmente *Pomacea canaliculata* (Estebenet y Cazzaniga, 1992, 1993; Estebenet y Martín, 2002; Martín y Estebenet 2002), *Pila globosa* (Jahan *et al.*, 2001) y *Marisa cornuarietis* (Aufderheide *et al.*, 2006; Oehlmann *et al.*, 2000; Selck *et al.*, 2006; Forbes *et al.*, 2007). Para *Asolene platae* se conocen solo algunos aspectos ecológicos estudiados sobre una población natural de la costa del Río de la Plata (Martín, 1984). Sin embargo, los resultados obtenidos en ese estudio son difíciles de interpretar debido al desconocimiento de aspectos básicos de la estrategia vital, como por ejemplo, la edad a la madurez, la longevidad, duración del desarrollo embrionario, etc. El estudio de cohortes en laboratorio ha resultado una herramienta indispensable para interpretar y comprender el ciclo de vida en especies del género *Pomacea* (e.g. Estebenet y Cazzaniga, 1993; Estebenet y Martín, 2002; Tamburi y Martín, 2009a).

Una de las especies más emblemáticas de la familia Ampullariidae es *P. canaliculata* ya que se encuentra entre las 100 peores especies invasoras a nivel mundial (Lowe *et al.*, 2000), mientras que *M. cornuarietis* se ha establecido también en nuevas áreas, ampliando su rango natural de distribución al ser utilizada como agente de control biológico. Cowie *et al.* (2009) analizaron el potencial riesgo que representa una especie para dañar ecosistemas naturales, cultivos y la salud humana a partir de doce atributos, siete de los cuales son variables biológicas, como el potencial reproductivo, la estrategia vital (semélpara o iterópara) y el tamaño de los adultos, entre otras. El análisis de estos atributos

en otras especies de Ampullariidae permitirá determinar cuáles de ellos son relevantes en su carácter invasivo y también evaluar el grado de vulnerabilidad de las especies no invasoras (Martín *et al.*, 2013).

El objetivo general de este capítulo es estudiar el ciclo de vida de *A. platae* a través de cohortes criadas en condiciones controladas de laboratorio. En particular se pretende estudiar el modelo de crecimiento para cada sexo así como también la edad y talla en la que los individuos alcanzan la madurez sexual; además, determinar el tipo de ciclo de vida (semélparo o iteróparo) y los parámetros demográficos como la supervivencia, fecundidad y longevidad. Se pretende estimar por último la proporción sexual de las cohortes criadas en el laboratorio.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Origen y mantenimiento de los caracoles

Los caracoles usados para este estudio fueron descendientes de individuos colectados del Lago Regatas (Parque Tres de Febrero, 34° 34' 24" S, 58° 24' 53" O. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina). Estos fueron criados en acuarios comunes de 20 L de capacidad, con agua de canilla saturada con carbonato de calcio, a 25 ± 2 °C de temperatura, bajo un fotoperiodo de 14/10 horas (luz/oscuridad) y alimentados con lechuga *ad libitum*. En los acuarios comunes fueron colocados caracoles de ambos sexos y las masas de huevos depositadas fueron colectadas y aisladas en cajas de Petri de 20 cm de diámetro. Los neonatos provenientes de estas masas de huevos fueron utilizados para la constitución de las cohortes estudiadas en este capítulo.

3.2.2. Constitución de las cohortes

Se constituyeron tres cohortes asincrónicas con caracoles de dos o tres semanas de vida. La cohorte I (C I) fue formada por 108 individuos, provenientes de cuatro masas de huevos, la cohorte II (C II) por 77 individuos provenientes de tres masas y la cohorte III (C III) por 72 individuos provenientes de dos masas.

Los caracoles neonatos fueron criados durante las dos o tres primeras semanas de vida en cajas de Petri de 15 cm de diámetro, con agua de red declorada, junto con la masa de huevos de la cual provenían y se agregaron trocitos de lechuga descongelada como suplemento (Capítulo 2). Luego la cría se realizó en forma individual en acuarios de plástico de 200 ml de capacidad y se utilizó agua de red declorada y saturada con carbonato de calcio.

A partir de aproximadamente la cuarta semana los caracoles fueron alimentados con lechuga fresca *ad libitum* y mantenidos bajo fotoperiodo de 14/10 horas (luz/oscuridad). A partir de la semana 28 (en promedio) de aislados los caracoles fueron criados en acuarios individuales de vidrio de 3 L de capacidad. Una vez por semana, durante toda la vida de los individuos, el agua fue renovada totalmente.

3.2.3. Registro de la talla y edad

La talla de los individuos se registró cada quince días. Para evitar daños a los caracoles durante la manipulación, las mediciones correspondientes al período inicial (desde la eclosión hasta las 30 semanas aproximadamente) se realizaron sobre fotos digitales escaladas de cada individuo, tomadas dentro de su acuario individual y analizadas con el *software* Corel Draw 12. A partir de la semana 30 de nacidos los caracoles se midieron con un calibre de 0,05 mm de precisión, desde el ápex hasta el extremo inferior de la apertura de la concha (Estebenet y Martín, 2003).

3.2.4. Madurez y actividad sexual

Para determinar la talla y edad a la madurez sexual de machos y hembras los individuos de cada cohorte fueron colocados, a partir de los 18 mm de talla, en acuarios colectivos de plástico de 3 L (de forma cilíndrica, diámetro: 32 cm, altura: 6 cm). Catorce a 17 caracoles fueron observados durante 8 horas a intervalos de 10 minutos, un día por semana, hasta confirmar el sexo de los caracoles por su comportamiento de cópula. Además, durante las observaciones iniciales, fueron

colocadas hembras ya maduras provenientes de otro *pool* de cría, ya que la actividad sexual de los machos podría depender de la atractividad de la hembra.

Debido a la aparente ausencia de dimorfismo sexual externo (ver Capítulo 5), el sexo se determinó por la observación del comportamiento copulatorio y, cuando fue posible, de los órganos genitales. Los machos fueron reconocidos por el comportamiento de *mounting* (Burela y Martín, 2009) sobre la conchilla de otro caracol y la eversión de la vaina del pene durante la cópula. Las hembras se reconocieron como tales por la aparición de al menos una masa de huevos en sus acuarios luego de haber sido montadas por un macho. Los individuos que no presentaron comportamiento sexual fueron sexados *postmortem* por disección: aquellos individuos en los que se observó la vaina del pene fueron clasificados como machos, mientras que aquellos caracoles en los que no se observó esta estructura fueron clasificados como hembras. Finalmente, a los caracoles que no mostraron actividad sexual y que estuvieron vivos durante los cuatro años de cría se los clasificó como indiferenciados.

Una vez que los caracoles alcanzaron la madurez se registró semanalmente la actividad sexual de ambos sexos. Para ello fueron armadas parejas al azar, colocando al macho en el recipiente de la hembra. Fueron observados durante ocho horas a intervalos de 10 minutos, y las observaciones se repitieron hasta la muerte de los individuos. Se determinó la proporción de machos que copularon por semana (número de machos que copularon / número de machos vivos para cada semana) y el número de masas de huevos depositadas por cada hembra (número de masas de huevos/ número de hembras vivas por semana), así como también el número de huevos por masa. Sobre la base de esta información se calculó el número de huevos depositados por hembra

en cada semana de vida, y se calculó el número acumulado de huevos depositados por hembra por semana a lo largo de su vida. Durante el segundo año de cría las masas de huevos fueron aisladas en recipientes individuales y se determinó la duración del desarrollo y la viabilidad de cada una de ellas (Capítulo 2).

Durante el segundo año de experimentación se registró, con un *data-logger* Hobo®, la temperatura de la sala de cría a cada hora. En base a estos datos se calcularon las temperaturas medias mínimas, medias medias y medias máximas semanales. Se estudió la variación de la actividad sexual semanal en función de las temperaturas medias semanales calculadas.

3.2.5. Supervivencia

Para determinar la supervivencia de cada cohorte se registró semanalmente la muerte de los individuos. Durante las primeras semanas ésta fue determinada por la ausencia de los latidos cardíacos, ya que la conchilla del caracol era transparente y el corazón era observable bajo la lupa; en los caracoles mayores, de conchilla gruesa y opaca, la muerte se determinó por la ausencia de movimientos musculares y ciliares del pie y por la falta de reacción ante contactos.

3.2.6. Proporción sexual terciaria

Las proporciones sexuales terciarias (número de machos que alcanzaron la madurez/número de caracoles maduros de ambos sexos; Lincoln *et. al.*, 1998) fueron calculadas para cada masa de huevos de las tres cohortes sobre la base del sexado en vida (por actividad reproductiva) y *posmortem* (por disección de

aquellos individuos que no mostraron actividad reproductiva). Las masas de huevos usadas fueron aquellas involucradas en la constitución de las cohortes y se registró para cada individuo la masa de huevos de la que provenía.

3.3. Resultados

3.3.1. Crecimiento

Para cada cohorte se registró el crecimiento a lo largo de la vida de cada individuo, y se obtuvo la talla promedio para cada edad. Se observó que el promedio de las tallas (figura 3.1 A) durante las primeras 20 semanas de vida de los caracoles de la cohorte I (C I) aumentó más rápido que el resto del ciclo de vida (desde 2,5 a 15 mm), entre las semanas 20 y 70 el crecimiento se desaceleró (desde 15 a 25 mm) y a partir de la semana 70 el promedio de las tallas se mantuvo prácticamente constante (26 mm a las 150 semanas). El patrón de crecimiento descrito vale tanto para machos como para hembras, y fue semejante en las tres cohortes estudiadas (figura 3.1 A, B y C).

El promedio de las tallas de las hembras estuvo por encima del de los machos a partir de la semana 40 para la C I y C II y de la semana 34 para la C III. En dos de las cohortes (CI y CII) los intervalos de confianza de la talla media de machos y hembras se superponen a lo largo de toda la vida mientras que para la CIII a partir de la semana 103 los intervalos de confianza en general no se superponen.

3.3.2. Madurez y actividad sexual

Se estudió la actividad sexual (figura 3.1, eje secundario) de hembras y machos de cada cohorte a lo largo de toda la vida de los caracoles. La actividad sexual de la C I comenzó en la semana 43 y 47 en machos y hembras, respectivamente, mientras que en la C II la madurez sexual fue alcanzada en la semana 60 por los machos y en la 69 por las hembras. En la C III la actividad

sexual de los machos se inició en la semana 57 y la de las hembras en la semana 64, aunque un único macho comenzó su actividad sexual en la semana 31.

La actividad sexual de las tres cohortes presentó patrones con picos de mayor actividad e intervalos donde la actividad sexual fue muy baja. Se observaron cuatro picos de actividad sexual (figura 3.1) tanto para machos como hembras de la C I, mientras que en las C II y C III se observaron dos picos bien marcados de actividad sexual y un tercer pico menos evidente. Los picos de actividad sexual coincidieron entre machos y hembras de las tres cohortes.

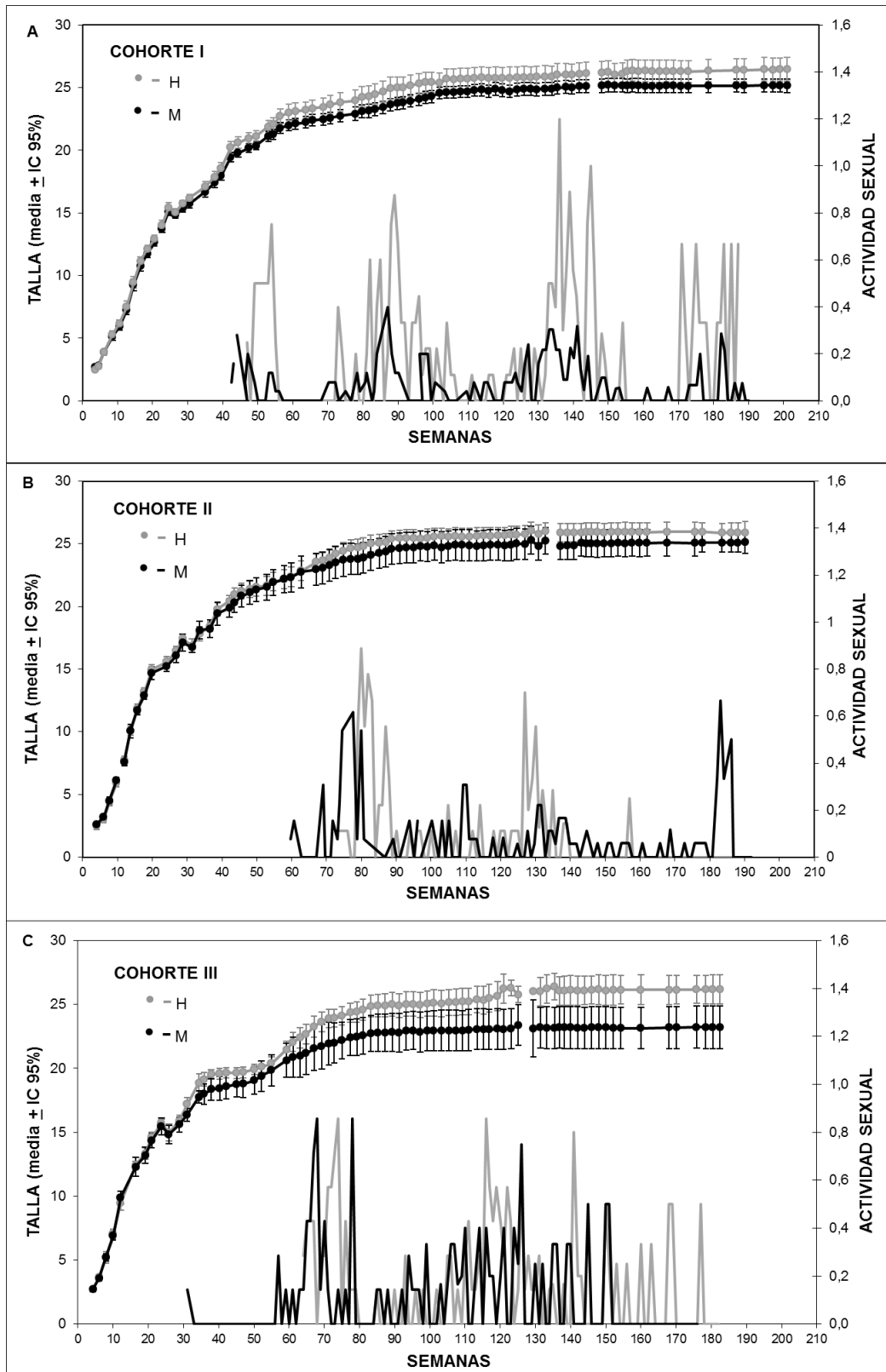


Figura 3.1. Crecimiento y actividad sexual de machos (M) y hembras (H) de cada cohorte (A, B y C). En el eje primario se grafica la talla y en el eje secundario la actividad sexual para cada sexo (proporción de machos que copularon o número de masas de huevos por hembra).

El patrón de actividad sexual observado en las hembras en función de las temperaturas mínima media, media y máxima media semanal (figura 3.2 B, D, F) fue el mismo para las tres cohortes. Aun cuando las temperaturas mínimas medias fueron menores a 22,5, las hembras de las tres cohortes mostraron actividad sexual. A temperaturas mínimas medias mayores a 23°C y medias de 24°C la actividad alcanzó valores que variaron entre 0,2 y 0,8.

En el único evento a 27°C de temperatura máxima no hubo actividad sexual por parte de las hembras. La actividad sexual de machos (figura 3.2 A, C, E) llegó a 0,1 a temperaturas mínimas medias de 21° C, aunque la actividad varió entre 0 y 0,8 en todo el rango de temperaturas alcanzado (desde 20 a 25°C). Las temperaturas máximas medias semanales llegaron a valores de 27 °C, para los que se registró actividad sexual solo en la C III.

En las tres cohortes fueron encontrados individuos en los que el crecimiento se desaceleró a las 19, 28 y 31 semanas de individualizados y quedaron enanizados. Los tres individuos enanizados de la cohorte II murieron durante las semanas previas (54, 59 y 63 semanas) al momento en que maduraron sexualmente los primeros individuos de esa cohorte (60 semanas); en la C III el individuo enanizado murió a las 38 semanas de vida, mucho antes de alcanzar la edad de madurez sexual determinada para esa cohorte (57 semanas).

Las hembras alcanzaron la madurez sexual a tallas de 24,2, 25,2 y 24,3 mm en promedio y los machos lo hicieron a 20,3, 23,3 y 19,9 mm en promedio para cada cohorte (C I, C II y C III respectivamente). Las edades de madurez sexual en promedio para las hembras fueron 92,1; 86,7 y 62,4 semanas y para los machos 46,5; 69,8 y 55,9 semanas para cada cohorte (C I, C II y C III respectivamente).

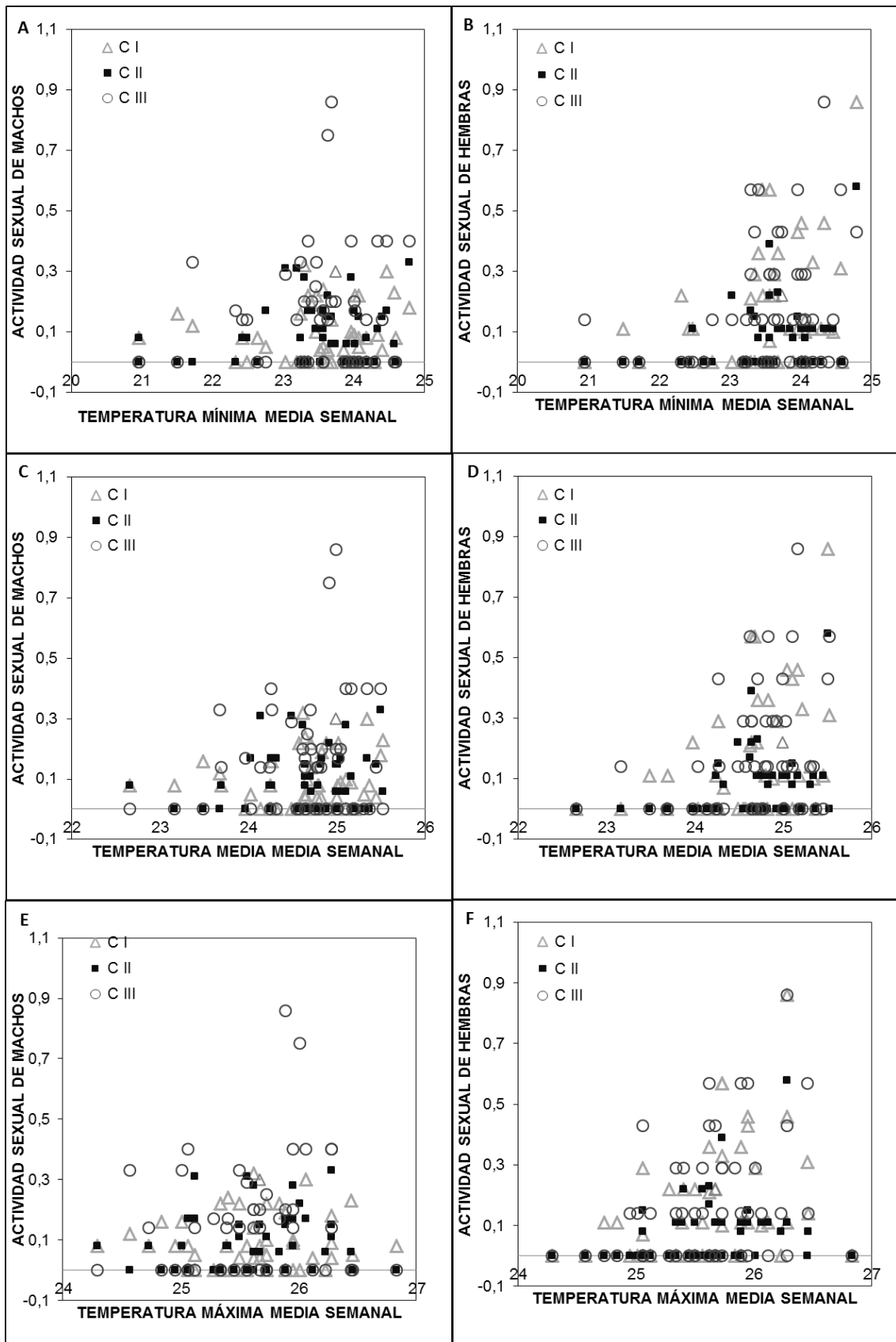


Figura 3.2 Actividad sexual de machos (A, C, E) y hembras (B, D, F) en función de la temperatura (°C) para cada cohorte (C I, C II, C III).

En las tres cohortes se observó que los machos alcanzaron la madurez sexual a tallas (figura 3.3. A) y edades (figura 3.3. B) menores que las hembras. Para determinar la significación de estas diferencias se realizó el test de Levene que permitió determinar que ambos grupos de datos son heterocedásticos ($p= 0,02$ y $p= 0,000$, respectivamente) aun cuando se los transformó logarítmicamente ($p= 0,031$ para la talla y $p= 0,001$ para la edad). Por lo tanto se realizó un test T para varianzas heterogéneas (tabla 3.1) para analizar cada cohorte por separado, a partir del cual se determinó que los machos maduran a tallas y edades significativamente menores que las hembras en las tres cohortes (con excepción de la edad de madurez de machos y hembras de la C III).

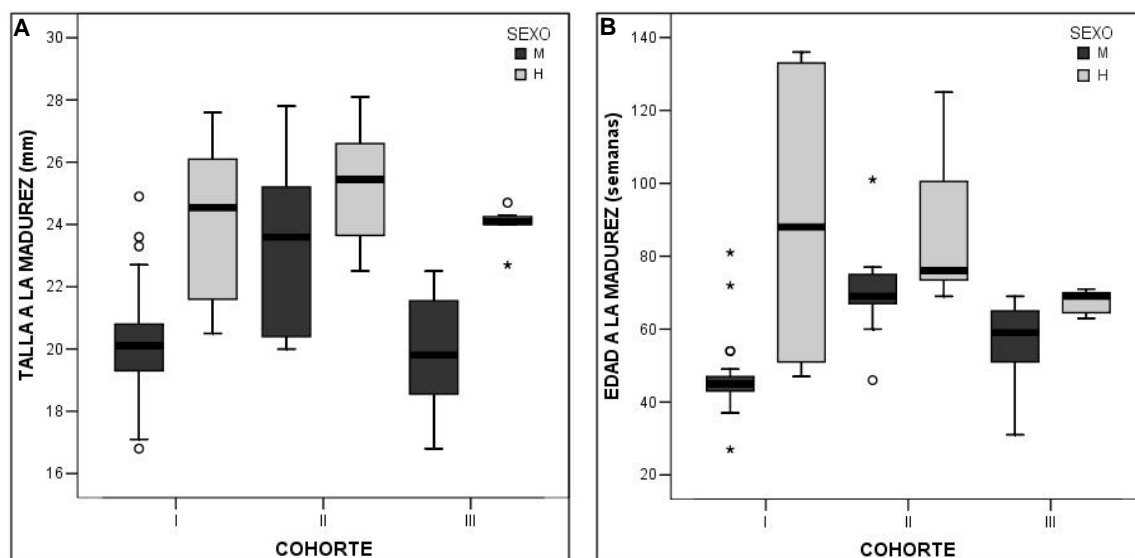


Figura 3.3 Diagrama de cajas de la talla a la madurez (A) y edad a la madurez (B) para machos (M) y hembras (H) de cada cohorte. Caja: rango intercuartílico (IQR), línea horizontal: mediana, barras: valores máximos y mínimos, círculos: valores atípicos (valores que se encuentran por fuera de la caja hasta tres veces el IQR), asteriscos: valores extremos (valores que se encuentran a más de tres veces el IQR).

Tabla 3.1 Prueba de Levene (F) y test T para comparar las variables talla y edad a la madurez entre sexos para cada cohorte, los valores de p menores a 0,05 se indican con * (diferencias estadísticamente significativas).

Cohorte	Variable	F	p	T	<i>g.l.</i>	p
I	Talla a la madurez	4,346	0,044*	-5,027	21,132	0,000*
	Edad a la madurez	29,729	0,000*	-4,718	14,320	0,000*
II	Talla a la madurez	1,042	0,318	-2,244	24	0,034*
	Edad a la madurez	7,484	0,012*	-2,334	16,204	0,033*
III	Talla a la madurez	7,267	0,019*	-4,785	6,970	0,002*
	Edad a la madurez	5,478	0,037*	-2,248	6,750	0,061

La fecundidad (número de huevos acumulados por hembra) aumentó a lo largo del período reproductivo en las tres cohortes, aunque todas presentaron intervalos de inactividad en los que el número de huevos acumulados se mantuvo constante (figura 3.4). El número promedio de huevos acumulado por hembra madura fue de 1635 para la C I, de 961 para la C II y 1748 para la C III para todo el período de cría. El valor de fecundidad alcanzado por la C II fue marcadamente menor al valor de las C I y C III, además de tener el mayor número de individuos indiferenciados sexualmente (16,7%) y de individuos sexados *postmortem* (11,1%) mientras que para la C I el conjunto de individuos indiferenciados y sexados *postmortem* fueron 10,6%, y para la C III este último valor es de 0%.

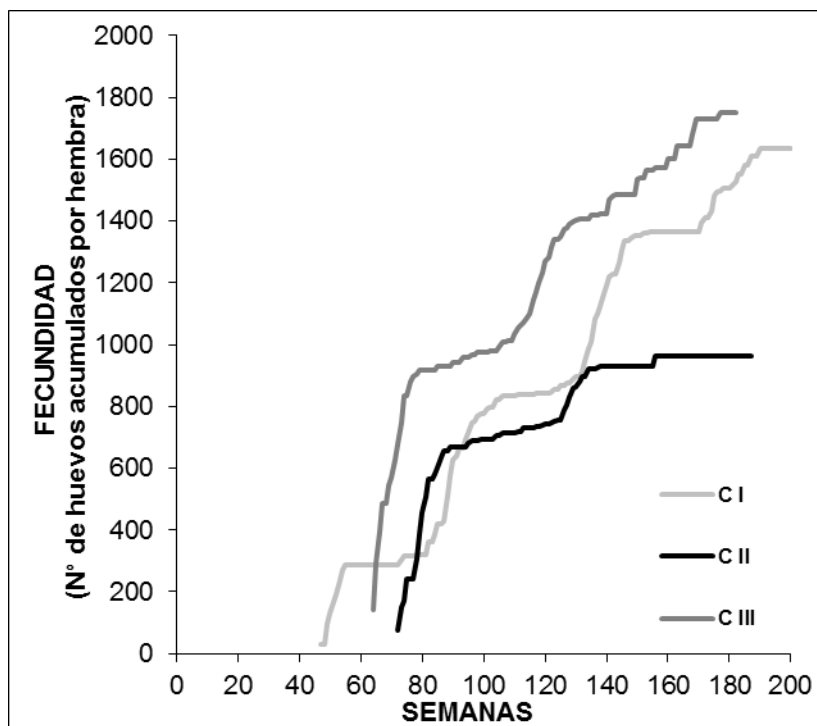


Figura 3.4. Número de huevos acumulados por hembra por semana para cada cohorte (el inicio de la actividad sexual de la C II y C III corresponde a la fecha 1/11/2011 y corresponde al inicio del segundo período de la C I).

3.3.3. Supervivencia

La supervivencia de cada cohorte disminuyó abruptamente durante las primeras 10 semanas de vida llegando a valores de 0,44, 0,46 y 0,25 para la C I, C II y C III, respectivamente. A partir de ese momento la supervivencia se mantuvo prácticamente constante por casi un año y medio y a partir de la semana 100 comenzó a descender continuamente hasta el final del experimento. Los valores de supervivencia alcanzados fueron de 0,07 para la C I, de 0,05 para la C II y de 0,0 (cero) para la C III cuando se decidió terminar el experimento luego de cuatro años de iniciado (semanas 201; 188 y 184 respectivamente).

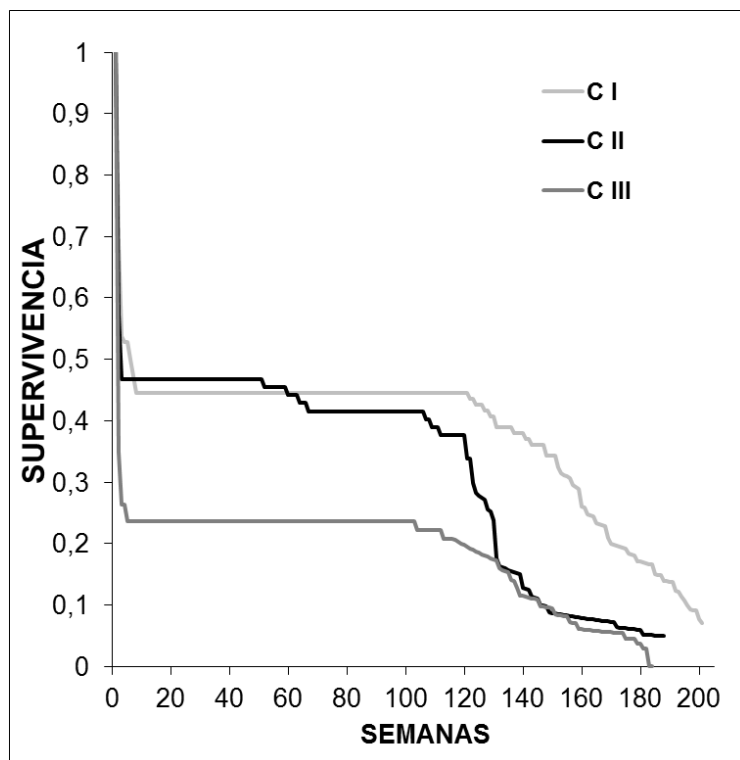


Figura 3.5. Supervivencia (número de individuos vivos en la semana t / número de individuos en la semana inicial) de cada cohorte.

Para el segundo período de descenso de la supervivencia se graficó por separado la curva de machos y hembras y se observó que la supervivencia de las hembras comenzó a descender antes que la de los machos en la C I, mientras que en las otras dos cohortes fue la supervivencia de los machos la que comenzó a descender antes que la de las hembras (figura 3.6).

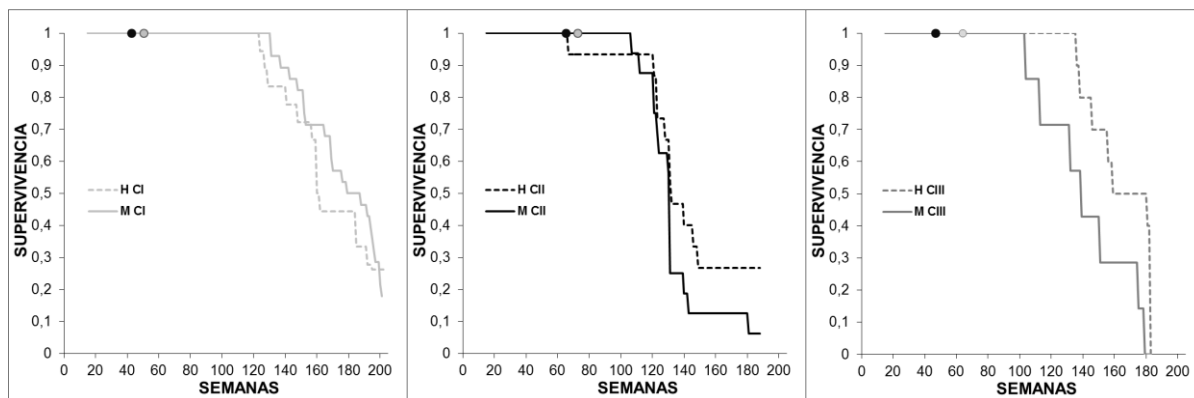


Figura 3.6 Supervivencia (número de individuos vivos en la semana t / número de individuos vivos al comenzar la actividad reproductiva) de machos (M) y hembras (H) para cada cohorte (CI, CII, CIII). Se indica el primer cuartil de la edad de inicio de la actividad reproductiva de las hembras (○) y de los machos (●).

3.3.4. Proporción sexual terciaria

La proporción de machos y hembras de *A. platae* fue estudiada a partir de las diferentes masas de huevos, independientemente de la cohorte a que pertenecían (figura 3.7). El test de independencia entre la proporción sexual y las masas de huevos no resultó significativo (X^2 de Pearson= 9,819; $p= 0,278$). La proporción sexual promedio entre todas las masas de huevos fue de 0,52 machos y no se observó una diferencia significativa con respecto a la igualdad en la proporción sexual ($X^2= 0,383$; $p= 0,536$). Los porcentajes de individuos sexados *postmortem* e indiferenciados fueron calculados en relación a cada cohorte y se observó que en la C I el 11,76% de las hembras fueron sexadas *postmortem* mientras que el 6,38% de los individuos de toda la cohorte quedaron indiferenciados; en la C II el 6,25% de los machos y el 21,43 % de las hembras fueron sexados *postmortem* y 16,67 % del total de los individuos resultaron indiferenciados mientras que en la C III todos los individuos fueron sexados por actividad sexual.

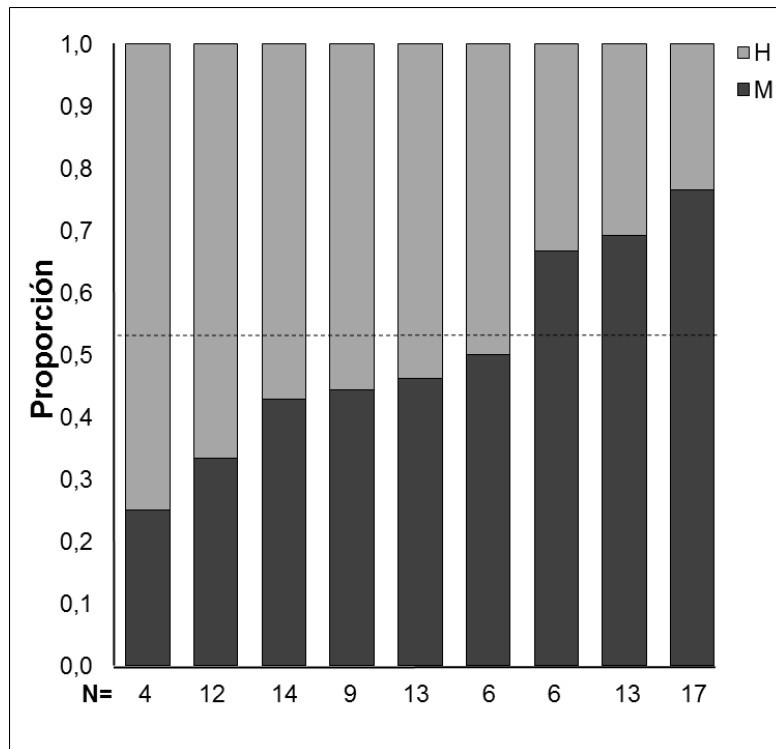


Figura 3.7. Proporción sexual terciaria de cada masa de huevos (H: hembras, M: machos). La línea punteada indica la proporción sexual promedio de todas las masas de huevos.

3.4. Discusión

En *Asolene platae* el mayor crecimiento ocurre durante las primeras 20 semanas de vida, a partir de esta edad se desacelera y una vez alcanzadas las 90 semanas de edad las tallas promedio se mantienen prácticamente constantes. El crecimiento individual disminuye con la edad pero es continuo a lo largo de toda la vida, al igual que en *P. canaliculata* criada bajo condiciones similares; en esta especie la tasa de crecimiento disminuye notablemente una vez alcanzada la madurez sexual (Estebenet y Cazzaniga, 1998). En otros ampuláridos como *Pila globosa* (Jahan *et al.*, 2001) y *Pomacea bridgesii* (Coelho *et al.*, 2012) también se observan las mayores tasas de crecimiento de la talla durante las primeras semanas de vida de los caracoles (17 y 8 semanas respectivamente), y luego descienden abruptamente, independientemente del sexo.

Durante la primera etapa del crecimiento de *A. platae* el promedio de las tallas de machos y de hembras se superpusieron totalmente para cada semana, mientras que a medida que los individuos comenzaron a alcanzar la madurez los promedios de las tallas de las hembras tendieron a ser mayores que las de los machos, de manera similar a lo observado en el crecimiento de los juveniles machos y hembras de *P. canaliculata* (Estebenet y Cazzaniga, 1998; Estebenet y Martín, 2003). Sin embargo, los intervalos de confianza de los promedios de las tallas alcanzadas por los machos y hembras de *A. platae* se superponen prácticamente a lo largo de todo el ciclo de vida (figura 3.1). El modelo de crecimiento de los caracoles adultos de *A. platae* (en el que los machos son más pequeños que las hembras) corresponde con el descrito para otros ampuláridos, como *Marisa cornuarietis* (Demian y Ibrahim, 1972), *Pila sp.* (Keawjam, 1987),

Pomacea urceus (Lum Kong y Kenny, 1989), *P. canaliculata* (Estebenet y Cazzaniga, 1998) y *P. bridgesii* (Coelho *et al.*, 2012).

A partir del análisis de los resultados de tallas y edad de madurez sexual se observó, en *A. platae* un patrón que se repitió en las tres cohortes estudiadas, en el que los machos maduran en general a tallas y edades significativamente menores que las hembras. Las observaciones histológicas realizadas por Martín (1987) en *A. platae* mostraron que las tallas mínimas de los machos al momento de la liberación de las gametas fueron menores a las de las hembras (17 y 18,6 mm respetivamente). En el caso de los machos las tallas mínimas fueron similares a las observadas en el presente estudio, mientras que en el caso de las hembras las tallas mínimas fueron menores (figura 3.3). Esta variación en la edad y talla de madurez entre machos y hembras también fue observada en otros ampuláridos como *P. canaliculata* (Tamburi y Martín 2009a) y *M. cornuarietis* (Demian y Ibrahim, 1972), aunque en esta última especie el estudio corresponde solo a la talla de madurez (23-24 mm para los machos y 24-25 mm para las hembras).

La edad mínima necesaria para que las hembras de *A. platae* inicien la reproducción fue de 11 meses (para la cohorte I mientras que en las otras dos cohortes fue mayor), es decir que es necesario que transcurran por lo menos 11 meses a 25 °C de temperatura ambiente aproximadamente para que los individuos comiencen a madurar sexualmente y por lo tanto a reproducirse. Por lo tanto se puede inferir que en el Lago Regatas (Buenos Aires), de donde provenían los ejemplares, y en ambientes naturales aledaños es necesario que transcurran por lo menos dos años para el comienzo de la actividad reproductiva ya que los caracoles se inactivan por completo desde mayo a agosto (Zelaya,

1999). Los caracoles probablemente no alcanzan las tallas de madurez en su primer verano aun cuando hayan nacido al inicio de la temporada de reclutamiento anterior, debido que en el ambiente natural la temperatura media para el mes de mayo es de 13,4°C, con temperaturas mínimas y máximas de 8,6 y 18,3°C respectivamente (<http://es.climate-data.org/location/1207/>). Estas temperaturas se encuentran por debajo de los 15 y 20°C, para las cuales el crecimiento de los neonatos fue significativamente menor que a 25°C (ver Capítulo 4).

En el caso particular de la cohorte I, el rango de la edad de madurez de las hembras fue mayor que para las otras dos cohortes; posiblemente esta gran variación de los datos se debió a la disminución de la actividad sexual durante los meses invernales, haciendo que las hembras no maduras comenzaran su actividad sexual recién al final de ese invierno, con edades mayores a las que maduraron al inicio del año. Sin embargo, este efecto estacional no se observó sobre el crecimiento de los caracoles; por lo tanto las hembras restantes alcanzaron la madurez en la segunda temporada con tallas similares y edades mayores a las que maduraron la temporada anterior. Es importante mencionar que en otros ampuláridos como *P. canaliculata* la temperatura del agua controla tanto la edad de madurez como la duración del período reproductivo (Estebenet y Cazzaniga, 1992). Por lo tanto, la talla es un parámetro que permitiría determinar el momento de la madurez sexual más acertadamente que la edad.

Es importante mencionar que, aunque las condiciones de cría fueron relativamente constantes, se observó cierta variación de la temperatura del aire de la cámara de cría, dependiente de las condiciones extremas de la temperatura externa, lo que generó cierta estacionalidad en las condiciones de cría.

Posiblemente la temperatura del agua también varió, alcanzando valores fuera del rango óptimo para *A. platae* (Capítulo 4). Sin embargo se observó actividad sexual de machos y hembras en todo el rango de temperaturas mínimas medias semanales alcanzadas. Otro factor controlado artificialmente, a través del uso de lámparas y temporizador, es el fotoperiodo; sin embargo, es importante resaltar que los individuos estuvieron sometidos también al efecto de la luz natural (ventanas de la cámara de cría), por lo que la variación de la intensidad lumínica también pudo haber afectado la actividad sexual de los caracoles. En *M. cornuarietis* el fotoperiodo no afectó la fecundidad aunque sí tuvo efecto sobre el crecimiento en el diámetro de la conchilla a 25°C (Aufderheide *et al.*, 2006). Para *P. canaliculata*, el fotoperiodo tiene efecto escaso o nulo sobre el inicio y detención estacional de la cópula y del comportamiento de oviposición (Albrecht *et al.*, 1999; 2005).

A partir del análisis del crecimiento y supervivencia de los caracoles de ambos sexos de *A. platae*, como también de las curvas de actividad sexual en los que se observó alternancia de períodos de alta actividad seguidos por períodos de baja actividad para ambos sexos, podemos concluir que el ciclo de vida de *A. platae* fue al menos cuatrienal con reproducción continua pero con fluctuaciones en condiciones controladas de laboratorio (25 ± 2 °C). Esta especie no es la excepción entre los ampuláridos, ya que en general presentan ciclos de vida largos, más de tres años para *M. cornuarietis* y *Pila* spp., hasta cuatro en *Pomacea* spp., y más de 10 años en *Lanistes nyassianus* (Hayes *et al.*, 2015). En ambientes naturales el ciclo de *A. platae* sería de duración mayor que cuatrienal e iteróparo, ya que durante el invierno los ejemplares se encuentran enterrados y aparentemente inactivos (Zelaya, 1999), mientras que las masas de huevos

fueron observadas solo durante la primavera y verano (Martín, 1984). Este cambio en el ciclo en relación con el régimen térmico ha sido observado en *P. canaliculata*, que es semélpara y anual a temperaturas constantes de 25°C e iterópara y cuatrienal a temperaturas fluctuantes entre 9-29°C (Estebenet y Cazzaniga 1993; Estebenet y Martín, 2002) y probablemente en poblaciones naturales de zonas templadas (Martín y Estebenet, 2002).

El número medio de huevos acumulados por hembra observado en las tres cohortes (media= 1448, rango= 961-1748) corresponde a los menores valores alcanzados por *P. canaliculata*, ya que el rango para esta especie es de 1316 a 10869 huevos por hembra, con una media de 4500 (Martín y Estebenet, 2002). Además el número promedio de puestas por hembra por semana en *A. platae* fue de 0,263, 0,336 y 0,393 para cada cohorte y el máximo fue de 1,2 mientras que en *P. canaliculata* el promedio fue de 1,4 llegando a valores de 3,7 puestas por hembra por semana (Albrecht *et al.*, 1996). Aunque las fecundidades de *A. platae* fueron probablemente subestimadas por el alto grado de canibalismo observado para esta especie (Capítulo 2), en *M. cornuarietis*, otro de los ampuláridos con masas de huevos gelatinosas, el valor promedio de fecundidad es de 0,24 puestas por hembra por semana (Aufderheide *et al.*, 2006) y 30-180 huevos por hembra por mes (Oehlmann *et al.*, 2000; 2006), valores comparables a los de *A. platae*.

La supervivencia varió entre las cohortes estudiadas de *A. platae*: a las 10 semanas de vida tomó valores que fueron desde los 0,25 a los 0,46. Se mantuvo constante para comenzar a descender continuamente luego de un año y medio. Durante la primera etapa, hasta las 100 semanas de vida, las curvas de supervivencia corresponden al tipo III, mientras que para *P. canaliculata* en

condiciones similares de laboratorio las curvas corresponden al tipo I (Estebenet y Cazzaniga 1992) aumentado la mortalidad al alcanzar la edad reproductiva (Estebenet y Cazzaniga, 1992). En la segunda etapa se observó en dos de las cohortes que la supervivencia de los machos comenzó a descender antes que la de las hembras, de manera similar a lo observado en *P. canaliculata* (Estebenet y Cazzaniga, 1998). La alta mortalidad post-eclosión observada en *A. platae* probablemente se relaciona con la escasa o nula capacidad de los neonatos de alimentarse de material vegetal inmediatamente después de la eclosión (Capítulo 2) y la exclusiva dependencia de la respiración acuática, ya que en *P. canaliculata* el pulmón aparece durante el desarrollo embrionario (Koch *et al.*, 2009) y es funcional al momento de la eclosión (Seuffert y Martín, 2009).

En *A. platae* la proporción de machos de cada masa de huevos fue altamente variable (entre 0,25 y 0,75) aunque la proporción sexual del total de los individuos que conformaron las tres cohortes fue cercana a 1:1. Es importante tener presente que se asume que la alta mortalidad inicial afecta por igual a machos como hembras, y que posiblemente esté relacionada con procesos como la alimentación y respiración que serían independientes del sexo de los individuos para esa edad; además, estudios realizados en *P. canaliculata* muestran que tanto la eclosión como la mortalidad parece no tener efecto sobre la proporción sexual (Yusa y Suzuki, 2003).

A partir de los individuos sexados por actividad sexual o *postmortem*, no se evidenciaron diferencias en cuanto al porcentaje de individuos machos y hembras que alcanzaron o no la madurez. La proporción sexual terciaria cercana a 1:1 concuerda con las observaciones realizadas por Martín (1984) en poblaciones naturales de *A. platae* y con las proporciones observadas en *P. canaliculata* (Yusa

y Suzuki 2003; Yusa 2005, 2007a). Por el contrario, en *M. cornuarietis* la proporción sexual está desbalanceada a favor de las hembras, tanto en poblaciones de laboratorio como de campo (Demian y Ibrahim, 1972). Según Fisher (1930) (*vide* Krebs y Davis, 1985) la proporción sexual evolutivamente más estable es aquella cercana a 1:1, es decir aquella en la que los padres invierten de igual manera en ambos sexos de la descendencia, ya que en general cuando la proporción se desbalancea ocurre un sesgo compensatorio en favor del sexo más raro.

Existen diferentes mecanismos que determinan las proporciones sexuales, y en el caso de *A. platae* se podrían descartar aquellos mecanismos o circunstancias que pueden afectar la proporción sexual aparente (Yusa, 2007a), tales como la identificación errónea del sexo, los sesgos en el muestreo, la edad de madurez diferencial y por último la mortalidad diferencial, en particular la mortalidad diferencial post-eclosión. Dado que la mortalidad no fue diferente entre machos y hembras adultos de *A. platae*, se puede considerar que la gran mortalidad ocurrida durante las primeras semanas de vida de los caracoles afectó indistintamente a ambos sexos. Finalmente, algunos de los mecanismos que determinan la proporción sexual primaria en *P. canaliculata*, como es la determinación oligogénica nuclear del sexo, sin cromosomas sexuales pero con genes de determinación del sexo distribuidos en varios cromosomas somáticos (Yusa, 2007a, b), podrían ser los responsables de la variación observada en las masas de huevos en *A. platae*. Sin embargo, es indispensable realizar estudios más detallados para determinar cuál o cuáles son los mecanismos involucrados en la determinación de la proporción sexual en *A. platae*.

Los resultados obtenidos en *A. platae* indican que esta especie posee atributos poco invasivos en relación con los de *P. canaliculata*, ya que mostró una baja fecundidad y supervivencia además del lento crecimiento y de la madurez tardía, mientras que solo la iteroparidad sería favorable para el asentamiento en nuevas áreas.

4. BIOLOGÍA TÉRMICA Y COMPORTAMIENTO

4.1. Introducción

En los ampuláridos hasta ahora estudiados la temperatura del agua es un factor de gran influencia sobre varios aspectos del ciclo de vida de estos, ya que afecta el desarrollo, las tasas de crecimiento, reproducción y supervivencia así como también los niveles de actividad y la respiración aérea (Freiburg y Hazelwood, 1977, Estebenet y Martín, 2002; Aufderheide et. al., 2006; Selck et. al., 2006; Gettys et al., 2008; Seuffert y Martín 2009; 2010; Seuffert et al., 2010, 2012). Hasta el momento no se han publicado estudios sobre la biología térmica del género *Asolene*.

En *P. canaliculata* se han estudiado parámetros térmicos como son la temperatura umbral inferior, temperatura por debajo de la cual se detiene el desarrollo embrionario, y los días-grados, es decir la cantidad días necesarios para completar el desarrollo embrionario a una cierta temperatura (Seuffert et al., 2012). Estos parámetros son necesarios para determinar la duración del desarrollo embrionario en ambientes con temperaturas fluctuantes, pero han sido estudiados hasta ahora solo para ampuláridos que depositan masas aéreas de huevos calcáreos y no para aquellos géneros como *Asolene* que depositan masas de huevos gelatinosas y subacuáticas (Hayes et al., 2009b).

Asolene platae es un ampulárido cuya distribución abarca el Río de la Plata y el Paraná hasta Bolivia (Cowie y Thiengo, 2003). Es de principal interés dar respuesta a los interrogantes acerca del efecto de la temperatura sobre la biología de esta especie para que, junto con otros parámetros estudiados en otros capítulos de esta tesis (Capítulos 2 y 3), permitan evaluar su potencial invasivo.

Teniendo en cuenta su creciente uso como mascotas de acuario (conocidos como “caracoles cebra”) es altamente probable su translocación a nuevas regiones geográficas (Cowie *et al.*, 2006; Rawlings *et al.*, 2007), tal como ha sucedido con *Pomacea bridgesii* (Coelho *et al.*, 2012).

El objetivo general de este capítulo es estudiar el efecto de la temperatura sobre la actividad, crecimiento y mortalidad de *A. platae* en condiciones de laboratorio para determinar el rango de temperaturas óptimas para esta especie. En particular se pretende establecer el efecto de cinco temperaturas distintas entre 15 y 35 °C sobre las actividades que realizan los caracoles y determinar a estas temperaturas la mortalidad de caracoles adultos y neonatos, como también la talla alcanzada por estos últimos. También se pretende estimar el umbral térmico del desarrollo embrionario y los días-grados necesarios para completar el desarrollo.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Origen y mantenimiento de los caracoles

Los caracoles utilizados en los experimentos provienen de un *pool* de descendientes de individuos originarios del Lago Regatas (Parque Tres de Febrero, 34° 34' 24" S, 58° 24' 53" O. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina). Los caracoles fueron criados en condiciones de laboratorio con agua de red renovada semanalmente, saturada con carbonato de calcio y alimentados con lechuga fresca *ad libitum*. La cría se realizó a 25 ± 2 °C bajo fotoperíodo de 14 /10 hs luz/oscuridad.

4.2.2. Actividad de los caracoles a diferentes temperaturas

Los experimentos se realizaron simultáneamente en cinco acuarios de 10,8 L de capacidad (27 x 20 x 20 cm, alto x ancho x largo); se utilizó agua de red y el fondo de los acuarios se cubrió con arena de río (1 cm de espesor). Los caracoles fueron alimentados con lechuga fresca y con lechuga molida previamente disecada; este material particulado queda flotando por varios días y permite observar la formación del embudo al momento de la alimentación pedal superficial (Saveanu y Martín, 2013).

Las temperaturas de cada acuario (15, 20, 25, 30 y 35 °C) fueron mantenidas con calentadores con termostato regulable de 75 y 100 W de potencia ubicados en el fondo del acuario; la temperatura ambiente fue controlada mediante un sistema de aire acondicionado y no superó la temperatura mínima de los tratamientos (temperatura ambiental máxima = 13°C); todos los tratamientos fueron mantenidos sin aireadores.

En cada acuario a cada temperatura se colocaron tres caracoles (elegidos al azar y descartados una vez realizada cada réplica) cuyo rango de tallas fue de 11,1 – 31,3 mm. Se realizaron cinco réplicas para cada tratamiento y en cada caso los caracoles fueron aclimatados durante 48 horas para cada temperatura. Los caracoles fueron observados a intervalos de cinco minutos durante un período de tres horas, simultáneamente para los cinco tratamientos. Al finalizar la observación se determinó el estado vivo o muerto de cada individuo, en función de la falta de respuesta a estímulos, la falta de movimientos ciliares del pie y, en algunos casos, por el evidente estado de putrefacción.

En cada observación fueron registradas para cada acuario las actividades o posturas en las que cada individuo se encontraba en ese momento; los bombeos respiratorios (Seuffert y Martín, 2009) fueron contabilizados cada vez que el caracol fue encontrado realizando esa actividad. A continuación se mencionan las actividades o posturas registradas durante las observaciones y su correspondiente sigla:

- AD: sumergido y adherido a las paredes del acuario, con la cabeza retraída y tentáculos enrollados.
- ADS: igual a AD pero ubicado en contacto con la superficie del agua.
- PE-D: parcialmente extendido, con parte del pie fuera de la conchilla, ubicado en fondo del acuario.
- R: reptando.
- F: alimentándose de lechuga.
- FF: alimentándose de material vegetal particulado, que se encontraba flotando en la superficie, sin formación de embudo.

- PR-D: parcialmente retraído en el fondo del acuario, con todo el cuerpo dentro de la conchilla pero sin el opérculo fuertemente retraído.
- EN: enterrado en el fondo del acuario.
- B: respirando, con el sifón en contacto con la superficie del agua.
- BR: bombeos respiratorios.
- FE: cuerpo y cabeza fuera de la conchilla con tentáculos estirados, y quieto.
- EB: alimentación pedal superficial, con formación de embudo.

Las actividades y posturas mencionadas anteriormente fueron reagrupadas y redefinidas en otras más generales de la siguiente manera:

- Ventilando (V): B + BR
- Inactivo (I): PE-D + PR-D + EN
- Alimentándose (A): F + FF + EB
- Quietos (Q): AD + AD-S + FE
- Reptando (R): R

El cálculo de porcentaje del tiempo transcurrido para cada actividad se realizó con la siguiente fórmula: $\% = \text{número de observaciones realizadas para esa actividad} / (\text{número de individuos por acuario} * \text{n}^\circ \text{ de observaciones totales})$.

El efecto de la temperatura sobre la actividad de los caracoles fue analizado con un ANOVA simple. La homogeneidad de varianzas fue analizada por el test de Levene; en el caso de rechazo las variables fueron transformadas por la función arcoseno de la raíz cuadrada del valor original y reanalizadas. Si al analizar las variables retransformadas se logró la homocedasticidad, se prosiguió con un ANOVA simple y se realizó un test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

4.2.3. Mortalidad y crecimiento de caracoles neonatos y adultos

El estudio del efecto de la temperatura sobre la mortalidad de caracoles adultos se realizó a cinco temperaturas diferentes: 15, 20, 25, 30 y 35°C. Fueron colocados cinco caracoles (cuyo rango de tallas fue de 14,8 – 31,5 mm) por acuario y se realizaron cinco réplicas por cada temperatura. Cada dos o tres días se determinó el estado (vivo o muerto) de cada individuo, hasta transcurridos 25 días desde el inicio del experimento.

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la mortalidad y el crecimiento de neonatos de hasta una semana de vida estos fueron criados en botellas de plástico de 500 ml con agua de red, las cuales fueron colocadas en acuarios de vidrio de 10,8 L termostatizados a 15, 20, 25, 30 y 35°C de temperatura. Fueron realizadas tres réplicas secuenciales, en cada una de ellas se colocaron 31, 21 y 19 neonatos por cada tratamiento para cada réplica, dependiendo de la disponibilidad de neonatos. Durante los 20 días de duración del ensayo se registró el número de neonatos muertos cada tres días. Al finalizar el experimento se tomó una foto escalada de los caracoles para determinar las tallas alcanzadas por los sobrevivientes (ver Capítulo 3). La comparación de las tallas alcanzadas por los neonatos fueron realizadas con un ANOVA anidado o jerárquico; las tres botellas fueron el factor anidado y la temperatura del agua el factor fijo de mayor nivel.

4.2.4. Umbral térmico de desarrollo embrionario

Las masas de huevos utilizadas para estos experimentos provienen de individuos criados bajo condiciones de laboratorio (Capítulo 2). Las masas de huevos fueron incubadas en recipientes cilíndricos de 7 cm de diámetro y 2 cm de profundidad de agua a temperatura ambiente, naturalmente fluctuante, del laboratorio. Se registró tanto la fecha de oviposición como la de eclosión, observándose diariamente hasta la eclosión del primer huevo y contabilizando el número de huevos eclosionados por día hasta la eclosión del último huevo. Simultáneamente se registraron en forma horaria los datos de temperatura con un *data-logger* Hobo®. La duración del desarrollo embrionario fue calculado como el número de días transcurridos entre el día de la oviposición y el día en que eclosionó el primer huevo de la masa de huevos.

Para determinar el umbral térmico inferior (T_L) para el desarrollo embrionario fueron utilizados tres métodos diferentes pero comparables (Seuffert *et. al.*, 2012): (1) desviación estándar de la media observada del número de días (SD-día) de Arnold (1959), (2) el coeficiente de variación en días (CV-día) de Nuttonson (1958) y (3) el método del coeficiente de regresión (REG) de Hoover (1955). Los diferentes umbrales térmicos fueron estimados utilizando las ecuaciones desarrolladas por Yang *et al* (1995) basadas en estos métodos.

Los días-grados (DD, °C.d) acumulados necesarios para completar el desarrollo embrionario fueron calculados sobre la base de los registros por hora de la temperatura (T_h). Las horas-grados se calculan como la diferencia entre la temperatura registrada por hora y el umbral inferior y fueron sumados para el período de 24 hs: $DD = \sum (T_h - T_L)$

4.3. Resultados

4.3.1. Actividad de los caracoles a diferentes temperaturas

Los caracoles permanecieron aproximadamente la mitad del tiempo quietos, sin desplazarse pero con la cabeza, tentáculos y pie fuera de la conchilla, independientemente de la temperatura a la que se encontraban. A 15 °C de temperatura los caracoles pasaron la otra mitad del tiempo (44 %) inactivos (parcialmente retraídos o enterrados) y solo el 1 % del tiempo realizaron alguna otra actividad. A 20 °C el tiempo que estuvieron inactivos disminuyó al 23 % respecto de los 15 °C y aumentó el tiempo que permanecieron reptando (14 %) y alimentándose (11 %). A partir de los 25 °C el porcentaje del tiempo que permanecieron inactivos fue menor al 10 %. A 25 °C más del 50% del tiempo estuvieron reptando o comiendo. A 30 °C aumentó el tiempo que permanecieron respirando y volvió a disminuir a los 35 °C (figura 4.1). Durante estos experimentos nunca fueron encontrados caracoles en cópula u oviponiendo, como tampoco fueron encontradas masas de huevos.

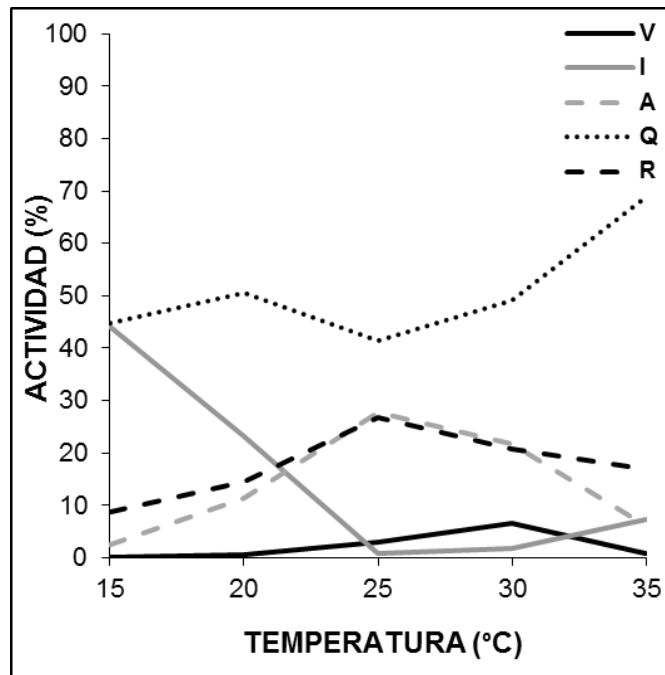


Figura 4.1 Actividad de *A. platae* a diferentes temperaturas constantes. Porcentaje del tiempo que los caracoles permanecieron en diferentes actividades, V: respirando (ventilando el pulmón), I: inactivo, A: alimentándose, Q: quieto, R: reptando.

El ANOVA arrojó diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para las variables respirando (R), inactivo (I) y alimentándose (A), mientras que para las variables quieto (Q) y reptando (R) no se encontraron diferencias significativas (tabla 4.1).

Tabla 4.1 ANOVA simple para las variables de actividad de *A. platae* a diferentes temperaturas constantes. Previamente las variables fueron transformadas por la función arcoseno de la raíz cuadrada; los valores de p menores a 0,05 se indican con * (diferencias estadísticamente significativas).

Variable	gl	F	p
TV	4	3,766	0,019*
TI	4	5,332	0,004*
TA	4	8,138	0,000*
TQ	4	1,303	0,303
TR	4	1,410	0,267

El porcentaje del tiempo que los caracoles permanecieron alimentándose (figura 4.2a) aumentó significativamente desde el 2,3 % a los 15 °C hasta el 28 % a los 25 °C y descendió significativamente hasta el 6 % desde los 25 a los 35 °C. El pico para esta actividad se encuentra a los 25 °C, aunque a 30 °C alcanza valores relativamente altos y para el resto de las temperaturas (15, 20 y 35 °C) no alcanza el 10 % del tiempo. El porcentaje de caracoles que estuvieron quietos durante las observaciones no varió significativamente entre las diferentes temperaturas, aunque se observó una tendencia del porcentaje de caracoles quietos a disminuir desde los 15 a los 25 °C y después de este valor aumentó hasta los 35°C (figura 4.2b).

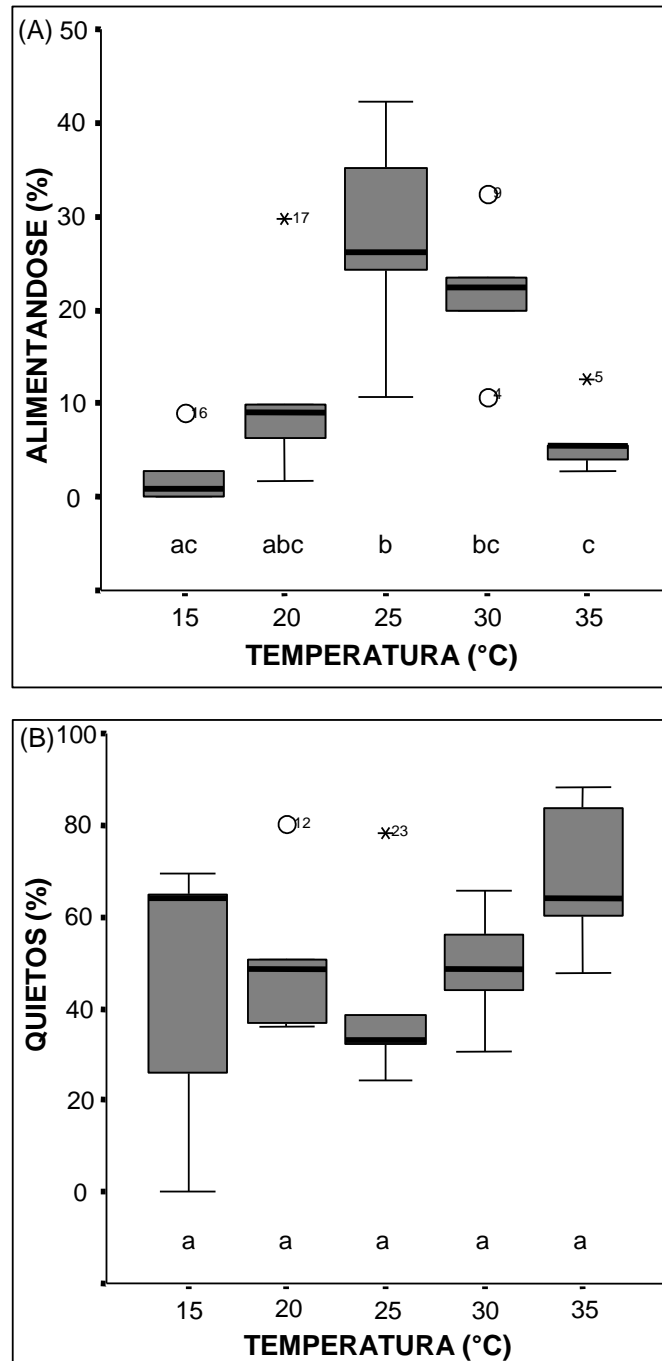


Figura 4.2 Diagrama de cajas del porcentaje del tiempo que los individuos de *A. platae* estuvieron alimentándose (A) y que estuvieron quietos (B) para cada temperatura. Caja: rango intercuartílico (IQR), línea horizontal: mediana, barras: valores máximos y mínimos, círculos: valores atípicos (valores que se encuentran por fuera de la caja hasta tres veces el IQR), asteriscos: valores extremos (valores que se encuentran a más de tres veces el IQR). Las diferentes letras entre tratamientos indican que los porcentajes son significativamente diferentes entre ellos con $p < 0,05$.

El porcentaje del tiempo que los caracoles permanecieron reptando fue mayor a 25 °C que en el resto de las temperatura (15, 20, 30 y 35 °C) aunque no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, probablemente debido a que el porcentaje del tiempo dedicado a esta actividad fue muy variable para cada tratamiento (figura 4.3a). El porcentaje del tiempo que los caracoles permanecieron ventilando el pulmón fue cero (0 %) a 15 °C, pero a partir de esta temperatura aumentó hasta llegar al porcentaje máximo de caracoles ventilando a los 30 °C y descendió a los 35 °C; sin embargo la única diferencia significativa en los porcentajes de ventilación fue entre 15 y 30 °C (figura 4.3b).

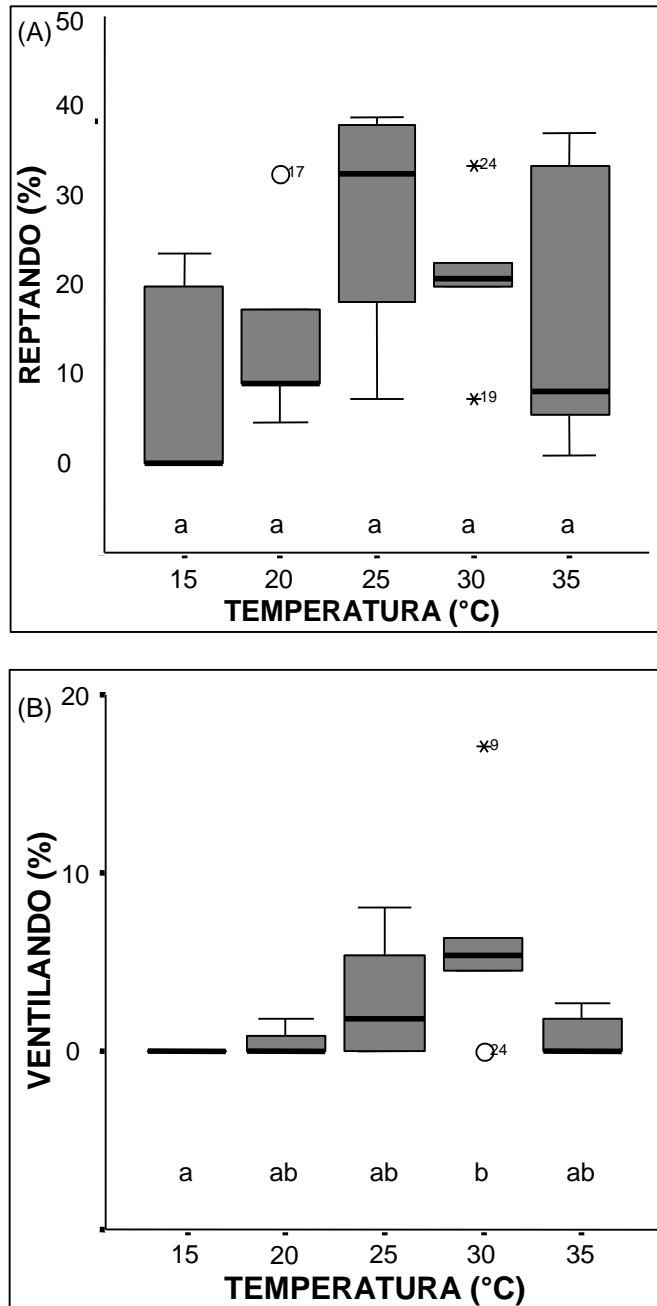


Figura 4.3 Diagrama de cajas del porcentaje del tiempo que los individuos de *A. platae* estuvieron reptando (a) y del tiempo que estuvieron ventilando (b) en función de la temperatura. Caja: rango intercuartílico (IQR), línea horizontal: mediana, barras: valores máximos y mínimos, círculos: valores atípicos (valores que se encuentran por fuera de la caja hasta tres veces el IQR), asteriscos: valores extremos (valores que se encuentran a más de tres veces el IQR). Las diferentes letras entre tratamientos indican que los porcentajes son significativamente diferentes entre ellos con $p < 0,05$.

El porcentaje del tiempo que los caracoles estuvieron inactivos no fue diferente entre los 15 y 20 °C, aunque estos porcentajes fueron mayores y significativamente diferentes que a 25, 30 y 35 °C de temperatura; para estas últimas temperaturas los porcentajes del tiempo que los caracoles estuvieron inactivos fueron muy bajos (figura 4.4).

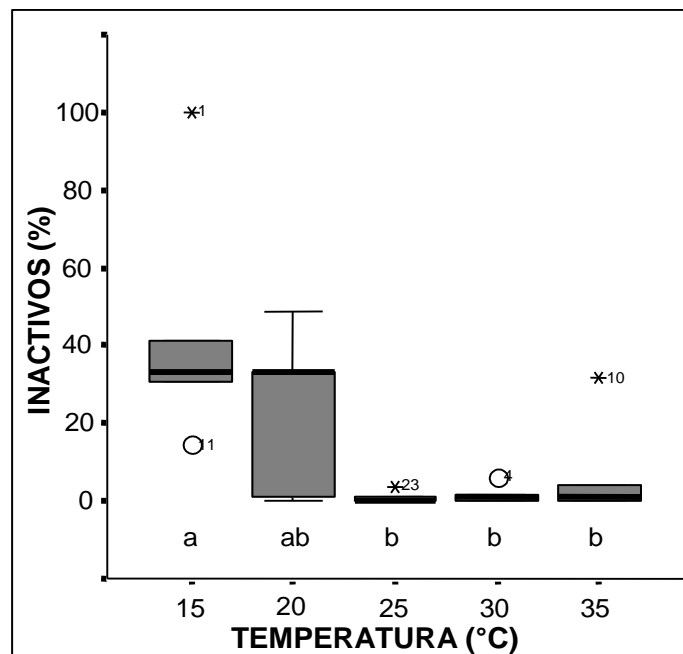


Figura 4.4 Diagrama de cajas del porcentaje del tiempo que los individuos de *A. platae* estuvieron inactivos para cada temperatura. Caja: rango intercuartílico (IQR), línea horizontal: mediana, barras: valores máximos y mínimos, círculos: valores atípicos (valores que se encuentran por fuera de la caja hasta tres veces el IQR), asteriscos: valores extremos (valores que se encuentran a más de tres veces el IQR). Las diferentes letras entre tratamientos indican que los porcentajes son significativamente diferentes entre ellos con $p < 0,05$.

El porcentaje del tiempo que los caracoles permanecieron enterrados está contemplado dentro de la variable Inactivos analizada en los párrafos anteriores; sin embargo, se graficó el tiempo que pasaron enterrados (figura 4.5) separado del resto para una mejor interpretación de este estado. Aunque los resultados del tiempo que los caracoles permanecieron enterrados son muy variables, los mayores valores alcanzados corresponden a temperaturas de 15 y 20 °C mientras que a 25, 30 y 35 °C los valores son nulos o prácticamente cero para cada una de ellas. Los individuos fueron encontrados en este estado, en el que el caracol se ubicaba en una depresión en la arena con la conchilla prácticamente cubierta por arena quedando una pequeña parte de esta descubierta; en un par de ocasiones se los observó realizando movimientos en los que abrían y cerraban el opérculo y que favorecían el enterramiento.

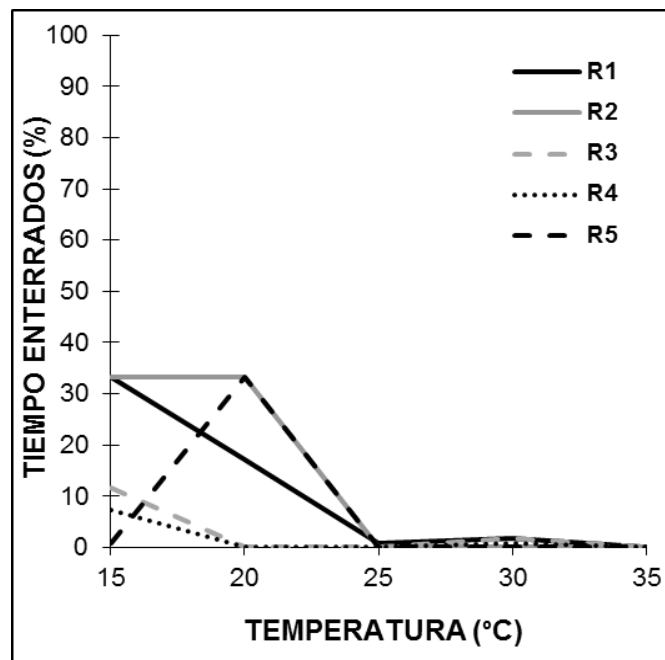


Figura 4.5 Tiempo que los individuos de *A. platae* permanecieron enterrados. Porcentaje del tiempo que los caracoles permanecieron enterrados a diferentes temperaturas constantes para cinco réplicas (R).

La frecuencia de bombeos respiratorios (número de bombeos respiratorios / número de eventos respiratorios) varió entre 3 y 9,4; a 15 y 20 °C de temperatura los caracoles no realizaron bombeos respiratorios (figura 4.6) y a 35 °C en una sola de las réplicas la frecuencia de bombeo fue mayor a cero.

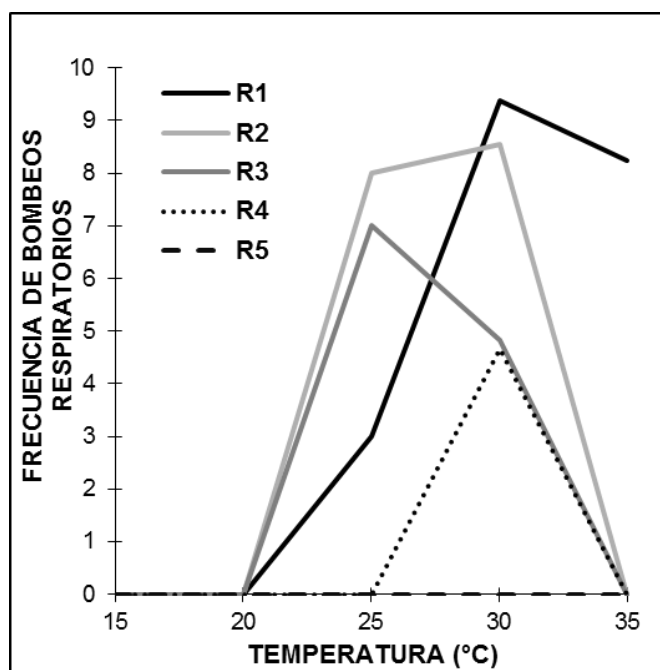


Figura 4.6 Frecuencia de bombeos respiratorios en individuos de *A. platae* a cada temperatura para cada réplica (R_i).

4.3.2. Mortalidad y crecimiento de caracoles neonatos y adultos

La mortalidad alcanzada por los caracoles neonatos luego de transcurridos los 20 días de ensayo aumentó desde 0,1 a 20°C hasta 0,7 aproximadamente a 35 °C de temperatura del agua; a 15 °C se observa un valor de mortalidad mayor que a 20 °C (figura 4.5); sin embargo el ANOVA realizado para este grupo de datos no arrojó diferencias significativas para la comparación de la variable mortalidad a las diferentes temperaturas (tabla 4.2); en la figura 4.7 se observa la gran variación de los valores de mortalidad para todas las temperaturas para los

caracoles neonatos. La mortalidad alcanzada por los caracoles adultos fue mayor (llegando a valores de 0,8) a 35 °C que en el resto de las temperaturas estudiadas; el ANOVA arrojó diferencias significativas para la comparación de la mortalidad de los adultos a diferentes temperaturas y el test de comparaciones múltiples de Bonferroni asigna estas diferencias a la comparación entre la mortalidad a 20 y 30°C y entre 30 y 35°C.

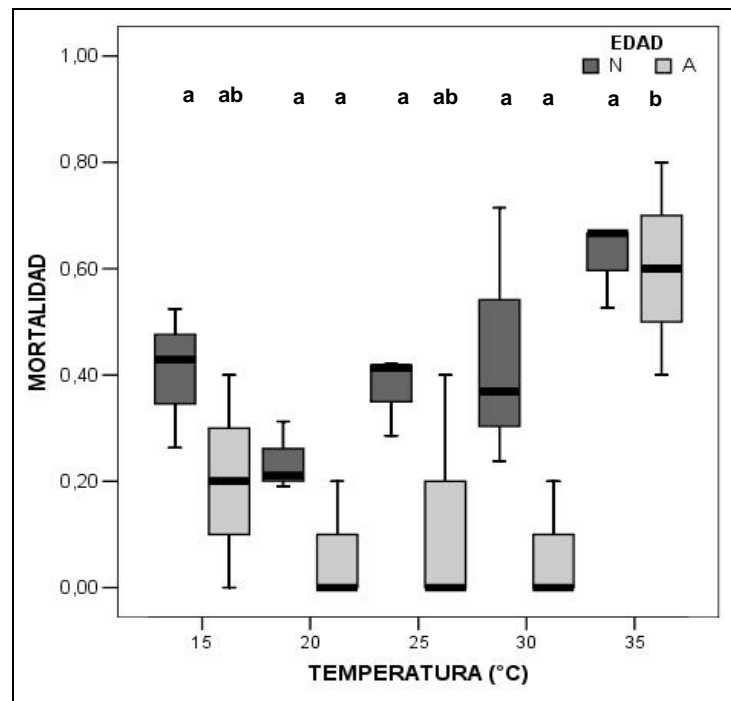


Figura 4.7. Diagrama de cajas para la mortalidad de caracoles neonatos (N) y adultos (A) de *A. platae* para cada temperatura. Caja: rango intercuartílico (IQR), línea horizontal: mediana, barras: valores máximos y mínimos, círculos: valores atípicos (valores que se encuentran por fuera de la caja hasta tres veces el IQR), asteriscos: valores extremos (valores que se encuentran a más de tres veces el IQR). Las diferentes letras entre tratamientos para neonatos y adultos indican que los porcentajes son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$).

Tabla 4.2 ANOVA para la variable mortalidad entre temperaturas para cada estadio (N = neonatos, A = adultos).

Estadio	Fuente	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F	p
N	Entre	0,227	4	0,057	3,006	0,072
	Dentro	0,189	10	0,019		
	Total	0,417	14			
A	Entre	0,597	4	0,149	4,667	0,022*
	Dentro	0,320	10	0,032		
	Total	0,917	14			

La talla alcanzada por los neonatos transcurridos los 20 días de experimentación aumentó con el aumento de la temperatura (figura 4.8). El ANOVA anidado no detectó evidencias de un aporte aditivo de la varianza debido a las réplicas (botellas) pero sí detectó diferencias significativas en las medias de las tallas de los neonatos sometidos a diferentes temperaturas (tabla 4.3). El 29,87 % del componente aditivo de la varianza corresponde al factor principal (temperatura) mientras que el restante 70,13 % corresponde a la varianza de los individuos dentro de cada botella. Se observó un aumento paulatino de la talla entre los 15 y 25°C, mientras que a partir de los 25 y hasta los 35°C de temperatura se mantuvo relativamente constante; el test de Bonferroni detectó diferencias significativas en las comparaciones solo entre el tratamiento de 15°C y las restantes temperaturas.

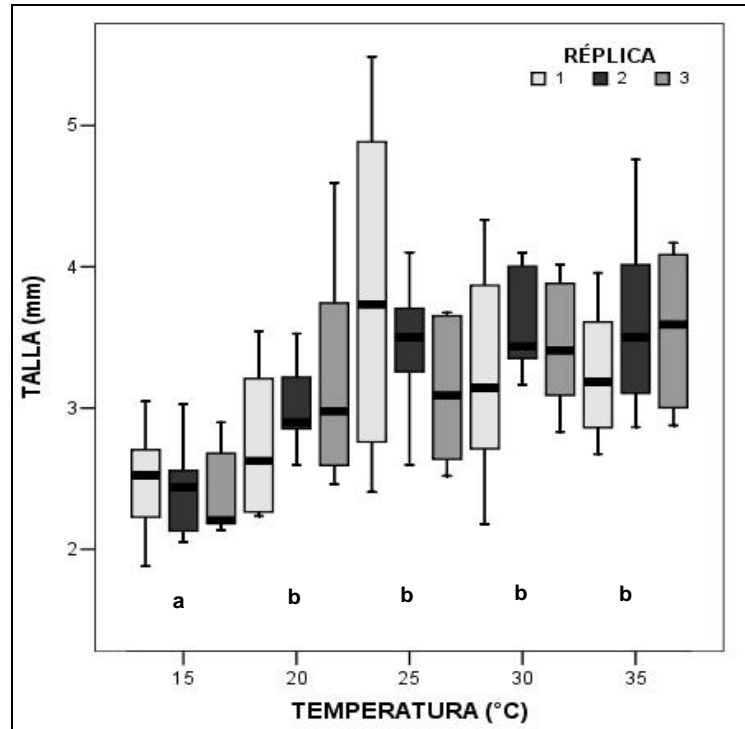


Figura 4.8 Talla alcanzada por los neonatos de *A. platae* transcurridos 20 días de cría a diferentes temperaturas, para cada réplica.

Tabla 4.3 ANOVA anidado para comparar las tallas alcanzadas por neonatos de *A. platae* a las distintas temperaturas. Factor principal: temperaturas del agua (15, 20, 25, 30 y 35°C), factor anidado: botellas (Réplica 1, 2 y 3).

Fuente	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F	p
Factor Principal	30,897	4	7,724	15,056	0,000*
Factor Anidado	5,058	10	0,506	0,985	0,459
Dentro	77,026	150	0,514		
Total	112,981	164			

4.3.3. Umbral térmico y días-grado del desarrollo embrionario

De un total de 84 masas de huevos incubadas a temperatura ambiente del laboratorio fueron utilizadas 77, aquellas cuya viabilidad superó el 10% (100* número de neonatos / número total de huevos de la masa). La duración del desarrollo embrionario varió entre un mínimo de nueve hasta un máximo de 26 días (media \pm SD = 14,57 \pm 3,18 d). Las estimaciones para el umbral térmico inferior del desarrollo embrionario variaron de acuerdo al método entre 15,7 °C (SD-días y CV-días) y 16,6 °C (REG), mientras que las correspondientes estimaciones de los días-grados necesarios para completar el desarrollo embrionario fluctuaron entre 107,6 y 120,7 d°C, en promedio (Tabla 4.4).

Tabla 4.4 Umbral térmico inferior (°C) y días-grados acumulados (DD; °C d) para el desarrollo embrionario de *A. platae*. El umbral térmico fue estimado por tres métodos diferentes: la menor desviación estándar en días (SD-día), el coeficiente de variación en días (CV- día) y el método del coeficiente de regresión (REG).

Método	Umbral térmico	Días-grados
SD-días	16,1	114,9 \pm 23,4
CV- días	15,7	120.7 \pm 24,5
REG	16,6	107.6 \pm 21,9

4.4. Discusión

En *Asolene platae* la temperatura tiene un importante efecto sobre la actividad en general; sin embargo, los caracoles permanecen la mitad del tiempo quietos (sin desplazarse pero con la cabeza, tentáculos y pie fuera de la conchilla), independientemente de la temperatura. A 15 °C la otra mitad del tiempo permanecieron inactivos (parcialmente retraídos, parcialmente extendidos o enterrados) y solo el 1% del tiempo se lo encontró reptando o alimentándose. El máximo nivel de actividad general (alimentándose, reptando y ventilando el pulmón) se observó entre los 25-30 °C y el tiempo que los caracoles permanecieron enterrados fue nulo por encima de los 25 °C. La actividad general decrece cuando la temperatura supera los 30 °C y aumenta el tiempo que los caracoles se encuentran quietos.

Los individuos de *A. platae* a 15°C estuvieron inactivos casi la mitad del tiempo de observación (40 %) mientras que en *P. canaliculata* a esa misma temperatura el tiempo que estuvieron inactivos fue solo del 25 % y aumentó al 98 % a 10 °C (Seuffert *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren fuertemente que los individuos de *A. platae* también permanecerían la mayor parte del tiempo inactivos a 10 °C. Por otra parte los caracoles de *A. platae* permanecen casi la mitad del tiempo quietos, con el pie extendido pero inmóviles, independientemente de la temperatura del agua. Esta especie es de crecimiento lento (Capítulo 3) y mucho menos móvil que *P. canaliculata*, la cual permaneció solo el 26 % del promedio del tiempo quieta entre los 15 y 30 °C de temperatura (Seuffert *et al.*, 2010).

El tiempo que los caracoles estuvieron alimentándose se incrementó significativamente con la temperatura, alcanzó el máximo a 25-30 °C y decreció a 35 °C. Este incremento en la alimentación corresponde con el decrecimiento de la inactividad (enterrado o retraído) por encima de los 20 °C, mientras que en *P. canaliculata* correspondió a una disminución del tiempo de quietud o descanso (Seuffert *et al.*, 2010). La alimentación tuvo el pico máximo a los 25 °C y comenzó a descender con el aumento de la temperatura. En *P. maculata* la alimentación alcanzó el mínimo nivel a 15°C y el máximo a 30 °C (Gettys *et al.*, 2008). En los animales ectotermos el incremento de la alimentación puede ser esencial para satisfacer las demandas energéticas al aumentar el metabolismo. Por otra parte, el descenso de la alimentación a 35°C podría indicar que las temperaturas por encima de los 30°C comienzan a ser sub-óptimas, incluso perjudiciales para *A. platae* en el mediano plazo, ya que el crecimiento disminuyó y la tasas de mortalidad alcanzaron su máximo a 35 °C.

El porcentaje del tiempo que los caracoles de *A. platae* permanecieron reptando (17,5 % en promedio) no fue afectado por la temperatura; los resultados reportados para *P. canaliculata* fueron similares, con un promedio del tiempo reptando del 20,2% independientemente de la temperatura (Seuffert *et al.*, 2010). En *P. canaliculata* los caracoles pueden reptar más rápido con un aumento de la temperatura, por lo que no invertirían tiempo adicional para moverse de un lugar a otro para realizar sus actividades de rutina.

El máximo nivel de ventilación pulmonar alcanzado por *A. platae* fue a 30°C, probablemente este aumento esté relacionado con un incremento en la tasa metabólica (Åkerlund, 1969; Freiburg y Hazelwood, 1977) y con la disminución del oxígeno disuelto en el agua conforme aumenta la temperatura, ya que los

acuarios no fueron aireados. Por otra parte *A. platae* ventiló el pulmón solo a temperaturas entre 25 y 35 °C, mientras que *P. canaliculata* respiró aire entre los 15 y 35 °C independientemente de la aireación del agua (Seuffert y Martín, 2009). Esto indicaría un bajo grado de dependencia de la respiración aérea de *A. platae*, que estaría relacionado con el tardío desarrollo del pulmón (Capítulo 2) y con el pequeño tamaño del sifón en relación con otros ampuláridos (Seuffert y Martín, 2009) y. La variación del número de bombeos por evento de ventilación fue muy amplia entre las réplicas y no mostró relación con la temperatura, de manera similar a lo observado en *P. canaliculata*, para la que no fue detectado un efecto de la temperatura sobre el número de movimientos de bombeo (Seuffert y Martín, 2009).

La tasa de mortalidad en *A. platae* fue mayor para los neonatos que para los adultos a todas las temperaturas estudiadas, a excepción de los 35°C para la que se observaron altos niveles de mortalidad en ambos grupos. El efecto de la temperatura sobre la tasa de mortalidad fue significativo en los adultos mientras que en los neonatos no se detectaron diferencias, a diferencia de lo reportado en *Marisa cornuarietis* y *P. canaliculata* para las que se detectó un efecto positivo de la temperatura sobre la tasa de mortalidad de los neonatos (Selck *et al.*, 2006; Seuffert y Martín, 2013). La influencia de la temperatura sobre la tasa de mortalidad de los neonatos de *A. platae* fue probablemente enmascarada por su alta tasa intrínseca de mortalidad post-eclosión (Capítulo 3), a diferencia de las bajas tasas de mortalidad de neonatos y juveniles de *P. canaliculata* (Estebenet y Cazzaniga, 1992, 1998), aun cuando fueron expuestos a temperaturas extremas (Seuffert y Martín, 2013).

La temperatura afectó significativamente el largo de la conchilla alcanzado por los neonatos después de transcurridos 20 días; las mayores tallas corresponden a 25, 30 y 35°C mientras que a 15°C se encontraron los caracoles más pequeños. Resultados similares fueron registrados para *P. canaliculata*: después de diez semanas los neonatos alcanzaron las tallas máximas entre los 25 y 35 °C, las cuales fueron significativamente mayores a las alcanzadas a 15 y 20 °C (Seuffert y Martín, 2013). Por otra parte, los neonatos de *P. maculata* criados a 15°C no crecieron y a 35°C crecieron significativamente menos que a 20-30°C (Gettys *et al.*, 2008). La tasa de crecimiento de los juveniles de *M. cornuarietis* decreció significativamente con el descenso de la temperatura de 28°C a 22°C (Aufderheide *et al.*, 2006; Selck *et al.*, 2006). Por lo tanto, el rango óptimo de temperatura para el crecimiento no parece ser muy variable entre los ampuláridos sudamericanos y para todos ellos el crecimiento se retrasaría significativamente a temperaturas inferiores a 20°C.

La duración del desarrollo embrionario a temperaturas fluctuantes mostró un amplio rango de variación; sin embargo, la duración media fue similar a la estimada en el Capítulo 2 (10,8 días) bajo condiciones de incubación similares pero a temperatura constante de 25 °C. La temperatura umbral inferior para el desarrollo embrionario de *A. platae* es de 16°C aproximadamente, coincidiendo con los valores de 15,7-16,2°C estimados para *P. canaliculata*. Además los días-grados acumulados estimados para *A. platae* variaron entre 107,5 y 120,5 °C.d, siendo también muy cercanos a los de *P. canaliculata* (120,7-132,2 °C.d; Seuffert *et al.*, 2012). Por otra parte, la duración del desarrollo embrionario para un rango de 25-30°C en *M. cornuarietis* (8-16 días, Demian y Yousif, 1973) es similar a las estimaciones para *A. platae*. Sin embargo la duración en *M. cornuarietis* en el

rango de 15-20°C fue de 20 días, valor menor al predicho por el modelo con temperaturas cercanas al umbral inferior (30 días por debajo de 20°C). Aunque son especies diferentes parece extraño el rápido desarrollo a bajas temperaturas, dado el origen tropical de los caracoles usados para ese estudio (Puerto Rico). Además Demian y Yousif (1973) mencionan las temperaturas extremas registradas pero no el régimen térmico en el que fueron incubados, lo que podría explicar las diferencias. En otro estudio, los huevos de *M. cornuarietis* tardaron en eclosionar ocho días a 28°C y 17 días a 22°C (Aufderheide *et al.*, 2006), datos coincidentes con lo reportado para esta especie en el rango de 25-30 °C y solo dos o tres días más corto que en *A. platae*. El único dato reportado para el desarrollo embrionario de los ampuláridos del Viejo Mundo con masas de huevos gelatinosas indica que *Lanistes ovum* requiere de seis a siete días a 26-28°C para eclosionar (Heiler *et al.*, 2007), es decir más rápido que el desarrollo de *A. platae* y *M. cornuarietis* a temperaturas similares. Posiblemente esta mayor velocidad esté relacionada con el hecho de que los huevos de *L. ovum* son depositados en una sola capa y por lo tanto se reduce la competencia por el oxígeno dentro de las masas de huevos gelatinosas, lo que por lo general retrasa la eclosión (Moran y Woods, 2007; Lardies y Fernández, 2002; Capítulo 2).

Por otro lado, los huevos aéreos y de cáscara calcárea de *P. canaliculata* se desarrollan a todas las temperaturas a una velocidad ligeramente inferior (Seuffert *et al.*, 2012) que los huevos acuáticos y gelatinosos de *A. platae*. Sin embargo, esta diferencia puede no ser significativa si se tiene en cuenta la alta variación de masa inter- e intra-huevo en la duración del desarrollo en *A. platae* (Capítulo 2) y en consecuencia los altos desvíos estándar de las estimaciones de los días-grado.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este capítulo, se puede concluir que el rango óptimo de temperatura para poblaciones de *A. platae* podría encontrarse entre los 25-30°C. Por otra parte, a temperaturas de 20°C y por debajo de esta, el nivel general de actividad decrece y las tasas de crecimiento de los caracoles son mucho menores. *Asolene platae* mostró un amplio rango de temperaturas óptimas para el desarrollo de las actividades de rutina. Las temperaturas de 35 °C y superiores serían perjudiciales para estos caracoles, ya que no solo los niveles de actividad se redujeron por encima de 30 °C, sino que también las tasas de mortalidad fueron mayores. La tolerancia térmica observada es similar a la de *P. canaliculata* en la Cuenca Encadenadas del Oeste (Sudoeste de la provincia de Buenos Aires; Seuffert *et al.*, 2010). Sin embargo, los bajos niveles de actividad a bajas temperaturas y las altas mortalidades a altas temperaturas probablemente explican el rango latitudinal más estrecho en *A. platae* (25 a 35 °S; Castellanos y Fernández, 1976) en comparación con *P. canaliculata* (20 a 38 °S; Hayes *et al.*, 2012).

5. VARIACIONES MORFOGRAVIMÉTRICAS DE LA CONCHILLA

5.1. Introducción

Hasta el momento no se han publicado para *Asolene platae* estudios sobre la variación de la forma y del peso de la conchilla, como tampoco se han encontrado registros para otras especies del género (Estebenet *et al.*, 2006; Hayes *et al.*, 2015). En algunas especies de la familia Ampullariidae como *Pomacea canaliculata* (Cazzaniga, 1990; Estebenet, 1998; Tamburi y Martín 2013), *Pomacea paludosa* (Hanning, 1979) y *Marisa cornuarietis* (Demian y Ibrahim 1972) se ha descrito un marcado dimorfismo sexual externo en la forma de la conchilla; para los otros géneros del Nuevo y Viejo Mundo, incluido *Asolene*, este fenómeno aún no ha sido estudiado.

El patrón de dimorfismo sexual externo de los ampuláridos se caracteriza por un mayor tamaño de la apertura de la conchilla de los machos (Demian y Ibrahim, 1972; Burky, 1974; Hanning, 1979; Cazzaniga, 1990; Estebenet, 1998). El origen de esta variación de la forma de la conchilla fue explicado a través de distintas hipótesis, entre ellas el gran desarrollo del complejo copulatorio alcanzado en los ampuláridos del Nuevo Mundo hasta ahora estudiados, y la gran cantidad de tiempo dedicado a la cópula, ente otras (Estebenet y Martín, 2003; Estebenet *et al.*, 2006).

La capacidad de sexar a los caracoles por la forma de la conchilla es una herramienta muy valiosa para estudios bioecológicos (especialmente a campo) ya que evita tener que sacrificar a los individuos o usar técnicas invasivas. Aunque en *A. platae* no parece haber dimorfismo sexual externo en la forma de la

conchilla, en otros caracoles se lo ha detectado por primera vez a través del uso de la morfometría geométrica (por ejemplo en el género *Viviparus*; Minton y Wang, 2011). La morfometría geométrica es una de las herramientas que actualmente más se utiliza para realizar estudios de las formas biológicas. Esta técnica estudia el cambio en el tamaño y la forma a partir del desplazamiento en el plano o espacio de un conjunto de puntos morfométricos o *landmarks* (Rohlf y Slice 1990). Esta técnica evita la reducción de la forma a una serie de medidas lineales o angulares, manteniendo las relaciones geométricas entre los *landmarks* a través de todo el análisis. En los estudios de morfometría la forma (*form*) de un objeto se descompone en tamaño (*size*) y forma propiamente dicha (*shape*), definida por la información geométrica que permanece una vez eliminados por transformación, los efectos de rotación, traslación y escala (Bookstein 1997; Dryden y Mardia 1998; Rohlf, 1993). Además permite detectar y de ser necesario eliminar la alometría, cuando se produce un cambio en la forma como consecuencia del crecimiento diferencial de alguna parte, en este caso de la conchilla. Los *landmarks* son puntos en un espacio bi- o tridimensional que corresponden a la posición de un rasgo en particular del objeto a estudiar; aquellos denominados de la misma forma se supone que se corresponden a lo largo de toda la muestra de objetos. Los *landmarks* deben ser puntos precisos en el objeto que idealmente tengan un significado filogenético, estructural, funcional o de desarrollo (Lele y Richtsmeier, 2001).

Otra de las características sexualmente dimórficas estudiadas en *P. canaliculata* es la variación del peso de la conchilla con respecto al largo total de la conchilla entre machos y hembras (Estebenet, 1998; Estebenet y Martín, 2003;

Tamburi y Martín, 2012). Las conchillas de los machos son en general más pesadas que las de las hembras.

El objetivo principal de este capítulo fue estudiar las posibles diferencias en la forma de la conchilla de machos y hembras de *A. platae* a través de uso de la morfogeometría. Paralelamente, se investigó la variación de la forma de la conchilla por un posible efecto de alometría estática (diferencias de forma entre adultos de diferentes tamaños) y además se estudió la relación entre el peso y el largo de las conchillas de machos y hembras criados en condiciones controladas.

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1. Origen y mantenimiento de los caracoles

Los caracoles usados para realizar las experiencias fueron aquellos utilizados para el estudio de la demografía de *A. platae* (Capítulo 2). Los individuos fueron criados y mantenidos en acuarios de vidrio de tres litros de capacidad, con agua de red renovada semanalmente saturada con carbonato de calcio y alimentados con lechuga fresca *ad libitum*. Las conchillas utilizadas corresponden a individuos maduros sexualmente, para los que se determinó previamente el sexo por su actividad reproductiva.

5.2.2. Análisis morfogeométrico de la conchilla

Para realizar el análisis de morfometría geométrica se tomaron fotos de conchillas de 40 caracoles vivos y muertos correspondientes a la cohorte I (Capítulo 2), con un rango de tallas de 23,1 a 29,0 mm. Las fotos fueron realizadas sobre papel milimetrado y las conchillas fueron dispuestas con la apertura hacia arriba, fijadas con plastilina, con el eje y el plano de la apertura paralelos a la superficie de apoyo.

Sobre la imagen de cada individuo fue registrado el conjunto de puntos morfométricos (*landmarks*) en forma de coordenadas cartesianas. Existen tres tipos de *landmarks* (Bookstein, 1997; Lele y Richtsmeier 2001; Dryden y Mardia, 1998) los *landmarks* tipo I, son puntos anatómicos cuya homología está respaldada por una fuerte evidencia biológica; los *landmarks* tipo II, o matemáticos, cuya homología entre un individuo y otro está respaldada por una base geométrica y no por evidencia anatómica; y por último los *landmarks* tipo III,

o *semi-landmarks*, son puntos localizados en forma equidistante en el contorno de la figura o entre dos *landmarks* de tipo I o II.

La disposición de los 21 *landmarks* ubicados en las imágenes de las conchillas se observa en la figura 5.1, de los cuales nueve son verdaderos *landmarks* (LM) de tipo I y II y 12 son *semi-landmarks* o pseudo-*landmarks* (SLM). El primer *landmark* (LM 1) corresponde al apex de la conchilla, los LM 2 y LM 20 corresponden a la intersección derecha e izquierda de la sutura de la última vuelta y el LM 5 corresponde a la intersección de la sutura de la última vuelta y la abertura. El LM 8 es el punto más externo sobre el lado derecho de la abertura y el LM 14 es el punto extremo del lado izquierdo de la abertura. El LM 11 es el extremo inferior de la abertura, el LM 17 es el punto extremo del lado izquierdo de la última vuelta y el LM 21 es el ombligo de la conchilla. Dos de los SML (3 y 4) están ubicados en la parte más extrema del lado derecho de la última vuelta, mientras que los SML 6, 7, 9, 10, 12 y 13 representan el contorno de la abertura y por último los SML 15, 16, 18 y 19 representan el lado izquierdo de la última vuelta.

El montaje del archivo de las imágenes se realizó con el programa TPSUtil (Rohlf, 2010) mientras que tanto el escalamiento de las imágenes como la digitalización de los LM se realizaron con el programa TPSDig2 (Rohlf, 2010). Para determinar la posición de los SML se dibujó una curva a lo largo del borde de la conchilla y se ubicaron dos puntos equidistantes entre dos LM, luego fue asignado el status de SML a los puntos elegidos como tales con el programa TPSÚtil. Los LM fueron conectados con una línea continua para representar la forma general de las conchillas.

El programa TPSRelw (Rohlf, 2010) fue utilizado para relajar el desplazamiento de los *landmarks* con el criterio de minimización de la matriz de energía de curvatura (*bending energy matrix*), luego de realizar la Superposición de Procrustes en el que se fija la forma de referencia, se alinean, escalan y rotan las formas obtenidas a partir de cada imagen y se estudia la magnitud y dirección de las diferencias de cada LM entre la forma de referencia y la forma objetivo (*target*). Este programa permite además corregir la ubicación de los LM si fuera necesario y detectar alguna variación que no sea biológica, ya que se espera cierta variación aleatoria de los LM de cada individuo alrededor de la posición de los LM de la forma consenso.

A partir de un análisis de componentes principales de las coordenadas de Procrustes (Rohlf, 1993), fueron calculados y graficados los dos primeros *Relative Warps*, es decir las dos primeras componentes de deformación. Para detectar diferencias en la forma de la conchilla de machos y hembras se realizó en una primera instancia un análisis discriminante (con el *Centroid Size* como una covariable representativa del tamaño para determinar la relación de este con la forma) y posteriormente un análisis de validación cruzada; ambos analizan diferencias entre grupos de objetos respecto a un conjunto de variables medidas sobre los mismos, y que implican la re-utilización o re-muestreo de los datos. El *Centroid Size* matemáticamente es la raíz cuadrada de la suma de las distancias al cuadrado desde un conjunto de *landmarks* al centroide que ellos definen, y es el estimador de tamaño más utilizado en morfometría geométrica, ya que si no existe alometría no se correlaciona con ninguna variable (Bookstein 1997). La alometría fue estudiada a partir del análisis de la independencia de las variables forma y tamaño, sobre las que se realizó un test permutacional en el que las filas

y columnas de las matrices de las distancias se someten a permutaciones aleatorias y se vuelve a calcular el coeficiente para cada permutación. Este conjunto de análisis fue realizado con el programa Morpho J (Versión 1.02e; Klingenberg 2010).

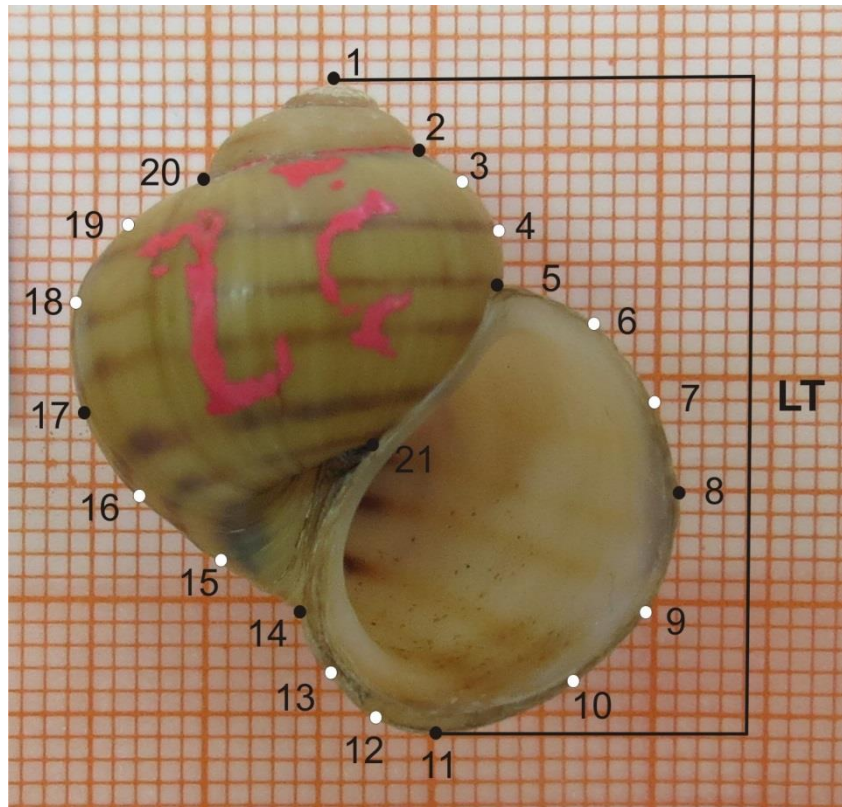


Figura 5.1 Fotografía de una conchilla de *Asolene platae* con la ubicación de los nueve *landmarks* tipo I y II (puntos negros) y de los doce *semi-landmarks* o tipo III (puntos blancos). Se indica también la forma en que se midió el largo total de la conchilla (LT).

5.2.3. Variación del peso y del largo de las conchillas

Para el estudio del peso de las conchillas, fueron usadas aquellas provenientes de los individuos ya muertos (sexados a lo largo del ciclo de vida o por disección *pos-mortem*) de las tres cohortes estudiadas en el Capítulo 3, cuyo rango de tallas fue de 21,7-28,6 mm. Las conchillas fueron pesadas con una balanza digital Ohaus Scout™ Pro de 0,001 g de precisión y se midió su largo

total (LT, desde el apex al extremo basal de la apertura de la conchilla, figura 5.1) con un calibre Mitutoyo de 0,2 mm de precisión. Las variables fueron transformadas logarítmicamente y la igualdad de pendiente y de ordenadas al origen de machos y hembras fueron investigadas mediante ANCOVA.

5.3. Resultados

5.3.1. Análisis morfométrico de la conchilla

En *A. platae* se observa que la variación general de la forma de la conchilla se corresponde con los individuos ubicados en los valores negativos del primer componente de deformación (*Relative Warps*), que muestran aberturas más pequeñas y alargadas que aquellos individuos ubicados sobre los valores positivos de mismo componente (figura 5.2); esta variación fue observada tanto en machos como en hembras. En las grillas de deformación se grafican los individuos extremos con respecto al primer componente y la figura central corresponde al consenso con la dispersión de cada LM. Se observa en el gráfico una clara superposición de los polígonos mínimos convexos obtenidos para cada sexo en el plano de las dos primeras componentes.

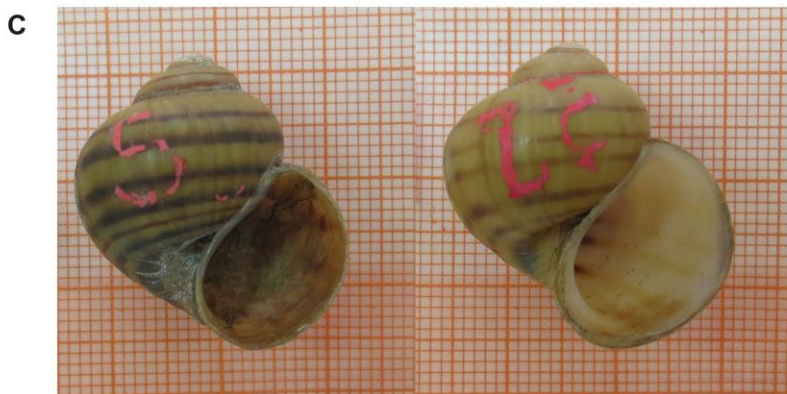
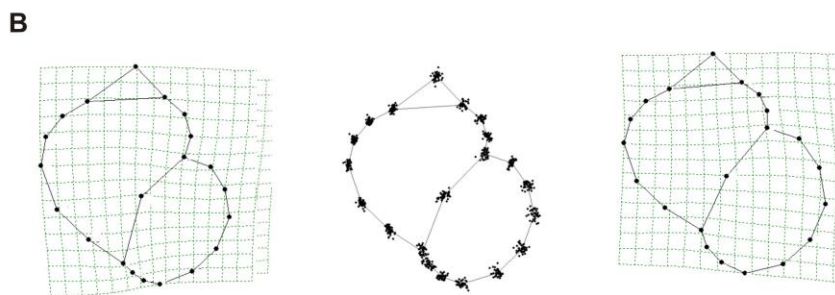
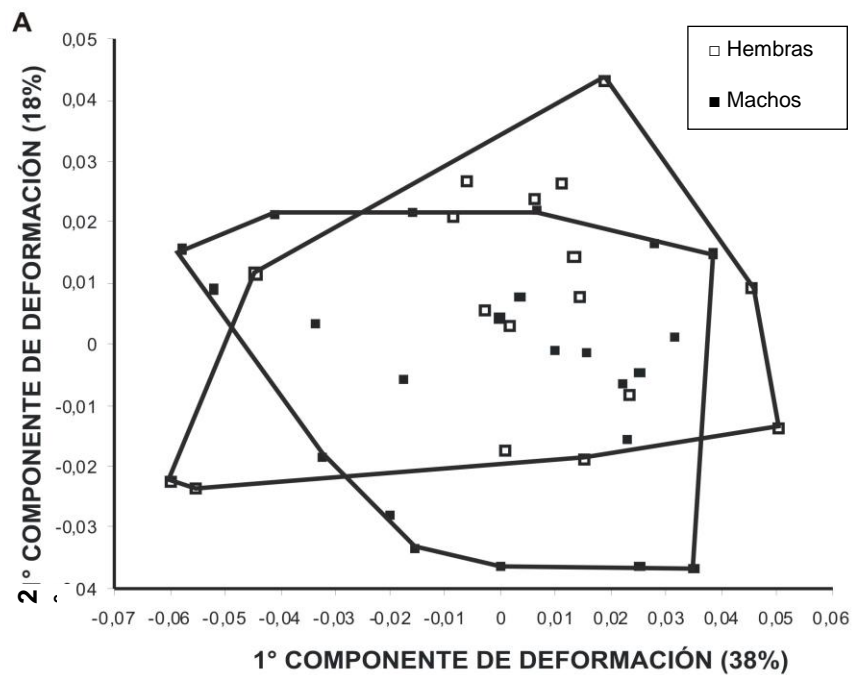


Figura 5.2 Estudio morfogeométrico realizado con 21 LM. (A) Análisis de componentes principales de la variación de la forma de la conchilla en *A. platae*; para cada sexo se grafica el polígono mínimo convexo. (B) Grillas de deformación de los individuos extremos con respecto al primer componente; la figura de la conchilla central corresponde al consenso. (C) Fotos de los individuos extremos del primer componente (ambas fueron hembras).

El análisis discriminante separa en dos grupos definidos a los machos y hembras pero con un nivel no significativo ($p = 0,64$, figura 5.3); el análisis de validación cruzada no encuentra una función que permita separar a machos de hembras a partir de la forma de la conchilla, clasificando erróneamente el 70% de las hembras y el 36 % de los machos. También se realizó un análisis para detectar si existe un efecto alométrico que pudiera enmascarar las diferencias sexuales, en el caso de que existieran. La regresión entre las coordenadas de Procrustes que representan la forma de la conchilla y la variable independiente que corresponde al tamaño (*Centroid Size*) explica solo el 2,27% de la variación (figura 5.4) y el test permutacional arrojó un valor de $p=0,4851$; por lo tanto no hay evidencias suficientes para rechazar la hipótesis de que la variable de forma y el tamaño son independientes, es decir que no se detectó un componente alométrico.

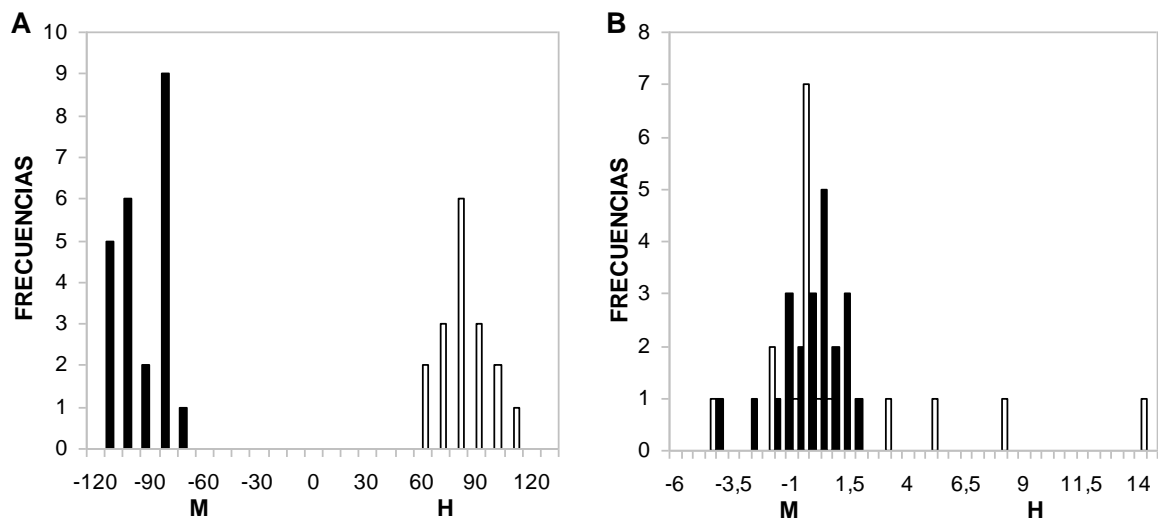


Figura 5.3 (A) Análisis discriminante entre machos (barras negras) y hembras (barras blancas); (B) validación cruzada del dimorfismo sexual con los 21 LM.

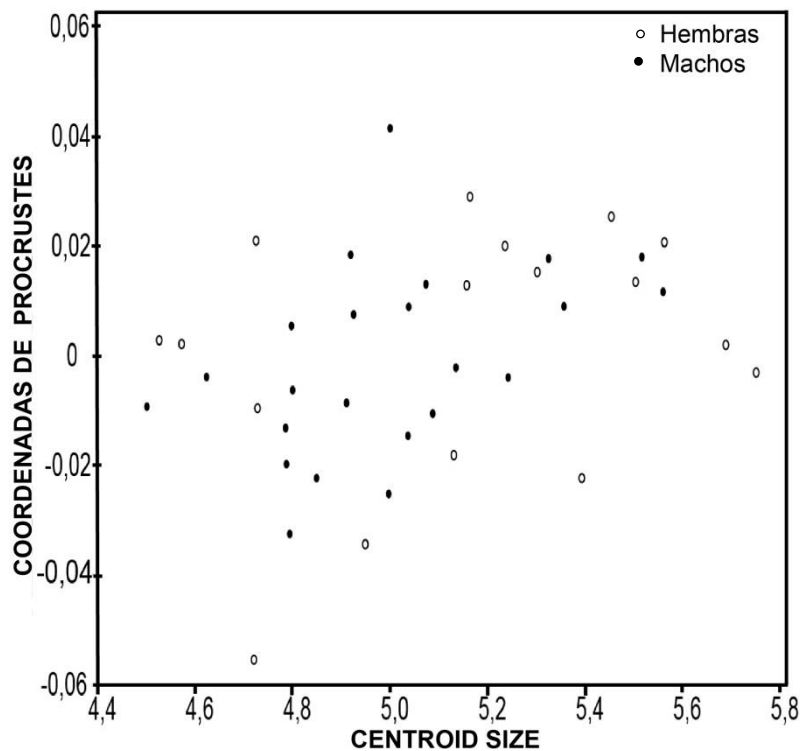


Figura 5.4 Diagrama de dispersión entre las coordenadas de Procrustes (forma) y el *Centroid Size* (tamaño) definidos por 21 LM.

La falta de detección de diferencias entre los sexos como así también de alometría podría deberse al alto número de *landmarks* (21 LM) en relación con el número de individuos (40), por lo que se decidió realizar el mismo análisis solo con los *landmarks* verdaderos (nueve LM). La variación de forma observada en el análisis realizado con nueve LM muestra que aquellos individuos ubicados hacia los valores negativos del primer componente principal presentan aberturas más pequeñas y alargadas que aquellos individuos ubicados hacia los valores positivos, que en general presentan aberturas más redondeadas y relativamente más grandes (figura 5.5); la superposición de los polígonos mínimos convexos de machos y hembras es prácticamente total.

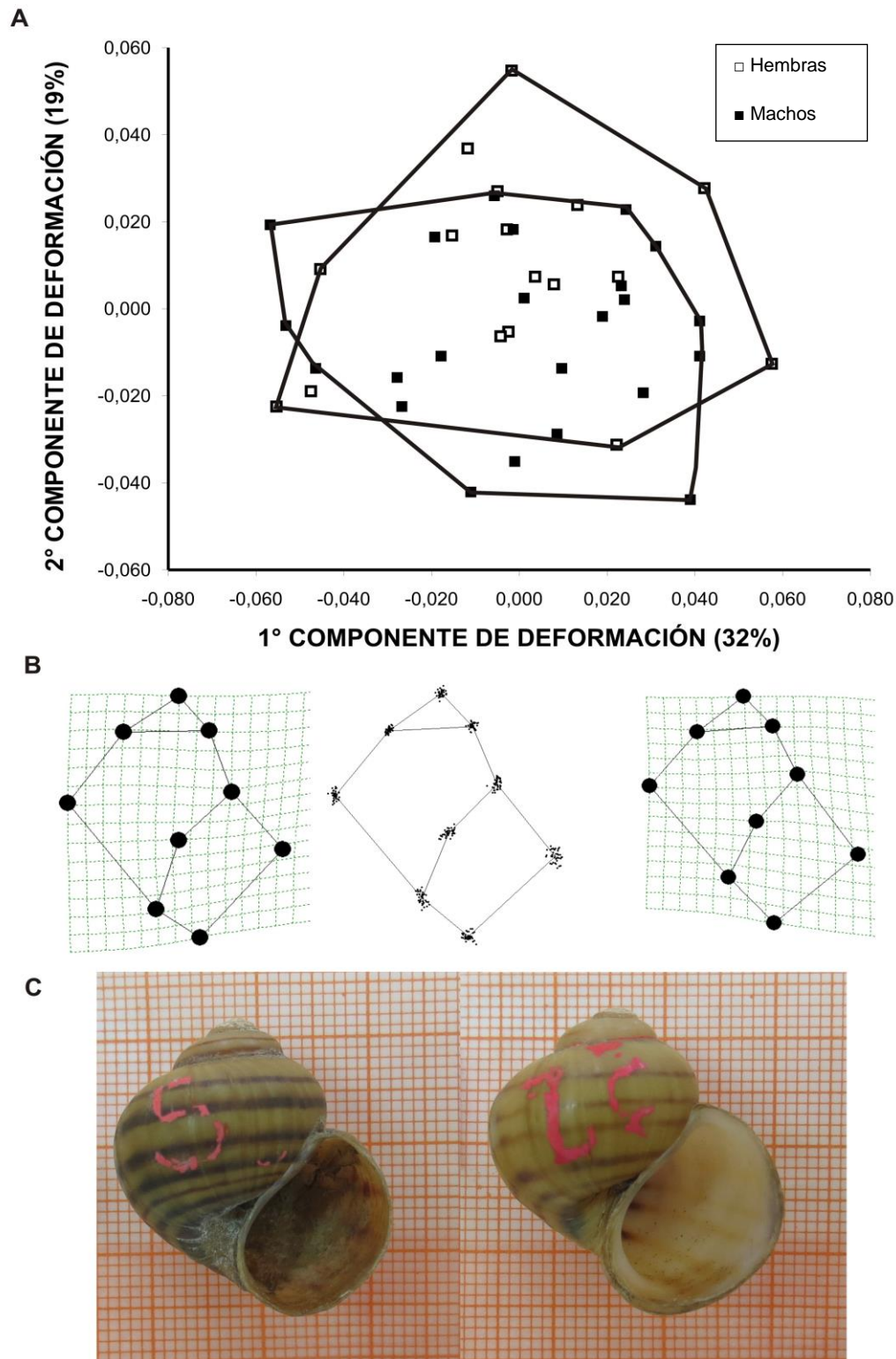


Figura 5.5 Estudio morfogeométrico realizado con nueve LM. (A) Análisis de componentes principales de la variación de la forma de la conchilla en *A. platae*, para cada sexo se grafica el polígono mínimo convexo. (B) Grillas de deformación de los individuos extremos con respecto al primer componente, la figura de la conchilla central corresponde al consenso. (C) Foto de los individuos extremos del primer componente.

El análisis discriminante separa a machos y hembras con un valor $p= 0,024$ (figura 5.6) aunque se observa cierta superposición de los individuos de los dos sexos; en el análisis de validación cruzada la superposición es mucho mayor y el 26% de los machos fueron clasificados como hembras y el 35% de las hembras fueron clasificadas como machos.

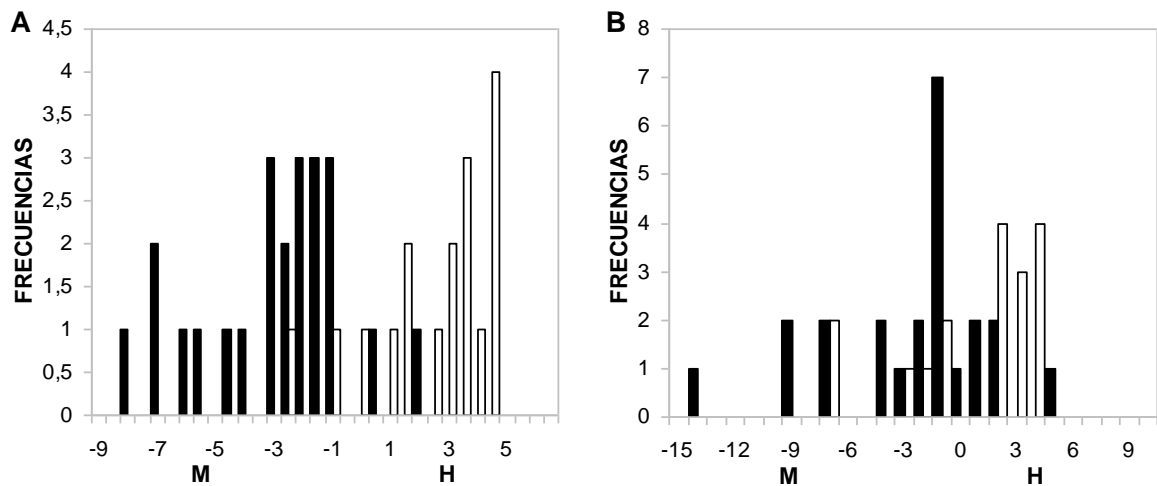


Figura 5.6 (A) Análisis discriminante entre machos (barras negras) y hembras (barras blancas); (B) validación cruzada del dimorfismo sexual con nueve LM.

La regresión entre las coordenadas de Procrustes (variable dependiente) y el *Centroid Size* (variable independiente) explica un 16,95 % de la variación en la forma y el test permutacional detectó un efecto alométrico significativo ($p < 0,0001$), es decir que hay un cambio de forma asociado a un aumento del tamaño de los caracoles, independientemente del sexo (figura 5.7). El efecto alométrico detectado indica que aquellos individuos de mayor tamaño presentan una abertura de mayor tamaño en relación al tamaño general de la conchilla.

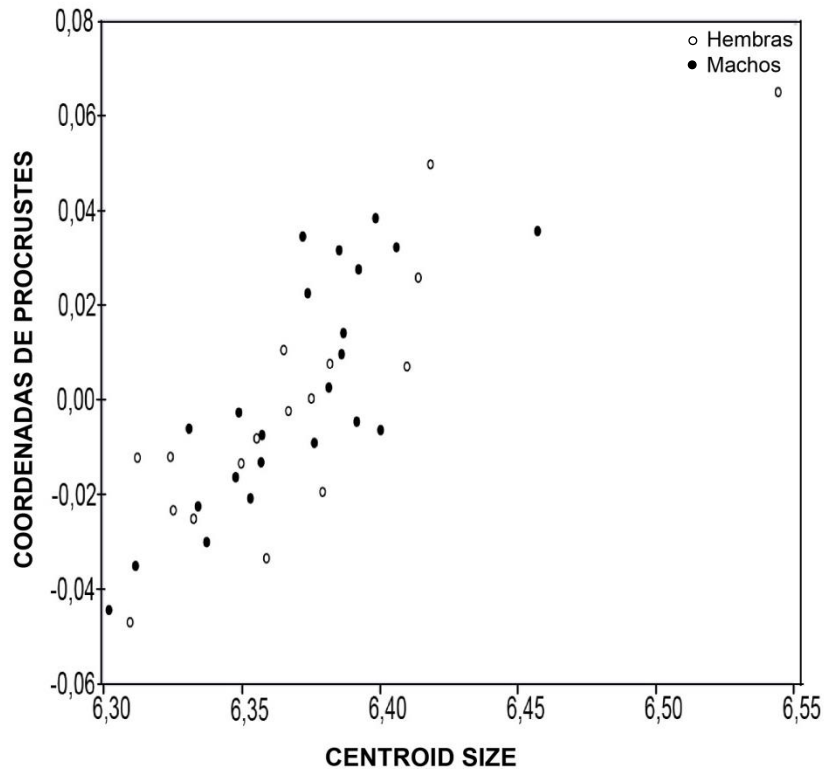


Figura 5.7 Diagrama de dispersión entre las coordenada de Procrustes (forma) y el *Centroid Size* (tamaño).

Para analizar las formas de las conchillas descartando el efecto de la alometría se ajustó la forma por el tamaño a través la regresión de los residuales de la regresión entre forma y tamaño en función del *Centroid Size*, y el test permutacional de nulidad de hipótesis arrojó un 0% de predicción con un $p= 1$. El análisis discriminante de los residuales de la regresión entre forma y tamaño (*Centroid Size*) separa a machos y hembras en dos grupos con un valor $p= 0,0139$, mientras que el análisis de validación cruzada clasifica erróneamente el 30% de los machos y el 29% de las hembras (figura 5.8).

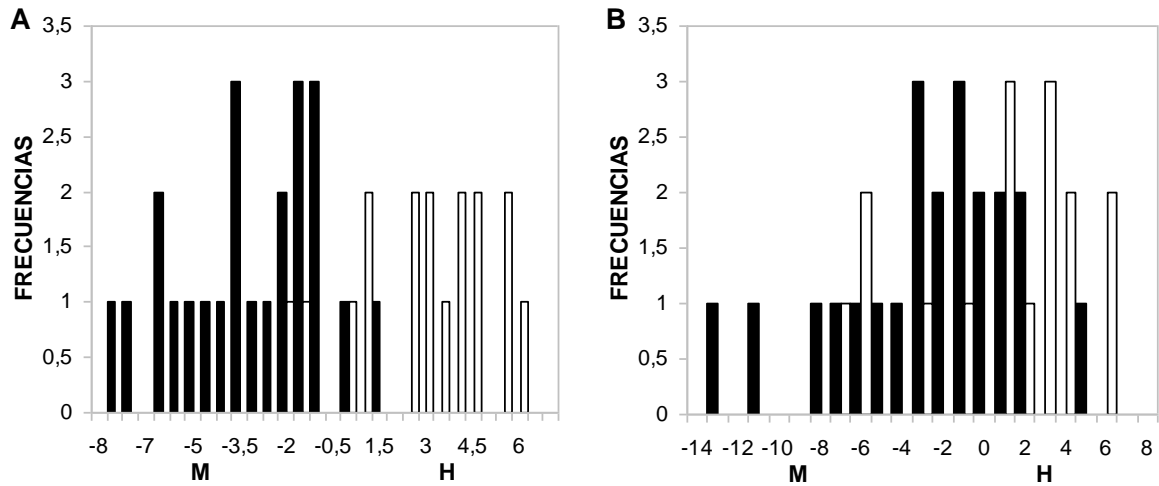


Figura 5.8 (A) Análisis discriminante entre machos (barras negras) y hembras (barras blancas); (B) validación cruzada del dimorfismo sexual con nueve LM sin el efecto alométrico.

5.3.2. Variación del peso y del largo de las conchillas

La pendiente de la recta de la regresión entre el logaritmo del peso y el logaritmo del largo total de la conchilla (Log LT) de los machos de *A. platae* es significativamente mayor que la pendiente de la recta de las hembras (tabla 5.1); por lo tanto los pesos de los machos se incrementan más rápidamente que los de las hembras en relación al largo total (figura 5.9). Se observó también que la dispersión de los datos para las hembras es mayor ($R^2 = 0,361$) que para los machos ($R^2 = 0,824$).

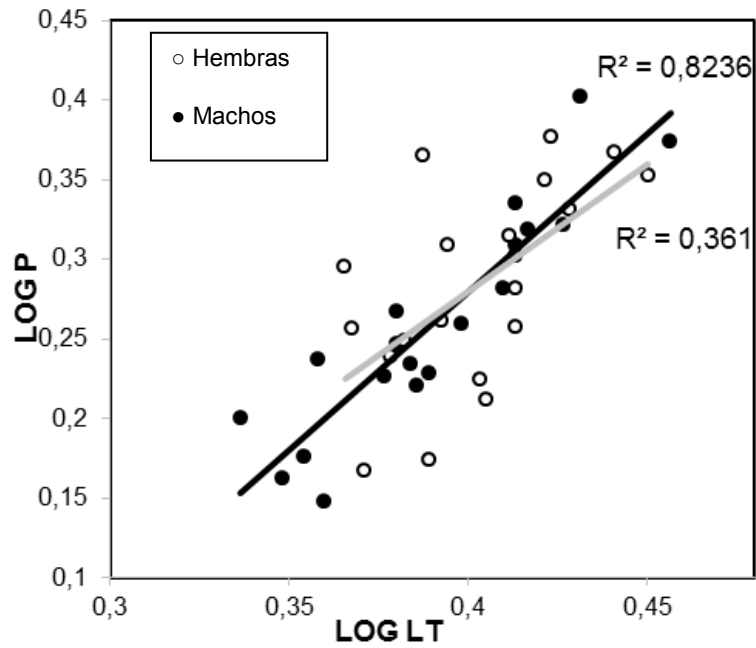


Figura 5.9 Variación del logaritmo del peso (Log P) en función del logaritmo del largo total de la conchilla (Log LT) y líneas de tendencia para machos (línea negra) y para hembras (línea gris) de *Asolene platae*.

Tabla 5.1 Comparación de las pendientes de la rectas de regresión entre el logaritmo del peso y del largo de machos y hembras.

Fuente de variación	SC	g. l.	CM	F	p
Entre pendientes	0,009696663	1	0,009696663	4,20062	0,0477
Residual	0,083102078	36	0,002308391		
Total	0,092798741	37			

5.4. Discusión

A partir del análisis de morfometría geométrica realizado a las conchillas de *A. platae* con los 21 *landmarks* se observó en las grillas de deformación que el mayor porcentaje de variación de la forma ocurre en la abertura: los individuos de uno de los extremos presentaron aperturas más pequeñas y alargadas, mientras que en el otro extremo las aperturas fueron de mayor tamaño y más redondeadas.

El análisis discriminante detectó variaciones intersexuales que no fueron detectadas por el análisis de validación cruzada, por lo que posiblemente esas diferencias sean un artefacto del método en sí mismo y no estén reflejando variaciones reales de la forma de la conchilla. El análisis de validación cruzada construye una fórmula de clasificación dejando fuera del análisis un individuo para luego clasificarlo como macho o hembra a partir de ella, y repite este proceso para cada individuo. Por otra parte, el análisis discriminante clasifica a los individuos a partir de una fórmula construida con todos los individuos que se pretende clasificar. En este último caso, el individuo a clasificar es uno de los que define la fórmula mientras que en el análisis de validación cruzada la fórmula es generada a partir de los otros individuos del mismo sexo, por lo que posee mayor robustez.

Para este mismo grupo de datos con 21 LM, no se encontró variación significativa de la forma de las conchillas en función del tamaño, es decir que no hay evidencias de efecto alométrico. La falta de detección de diferencias intersexuales como también de alometría podría deberse al alto número de *landmarks* (21 LM) en relación con el bajo número de individuos (40). La variación de la forma a partir del análisis de morfometría realizado con nueve LM, mostró la misma variación de la forma que el análisis realizado con 21 LM. No se hallaron

diferencias intersexuales en la forma de la conchilla, aunque si se detectó un efecto alométrico significativo.

Al corregir la variable forma por el tamaño, es decir al eliminar el efecto de la alometría, tampoco se detectaron diferencias intersexuales en la forma de la conchilla, ya que el análisis de validación cruzada clasifica erróneamente el 30% de los individuos de cada sexo. Es decir que la variación de la forma depende en parte a la variación del tamaño, independientemente del sexo. Se observó que los individuos de mayor tamaño presentaron una abertura proporcionalmente más grande y redondeada que la de los individuos de menor tamaño, que poseen una abertura relativamente más pequeña y alargada.

Por lo tanto, y a diferencia de lo reportado en *P. canaliculata* utilizando morfometría geométrica (Tabugo *et al.*, 2010; Tamburi y Martín, 2013), no se detectaron diferencias significativas en la forma de la conchilla entre machos y hembras de *A. platae*. Aunque no existen trabajos sobre dimorfismo sexual usando morfometría geométrica en otros ampuláridos, en *M. cornuarietis* se detectó dimorfismo sexual mediante morfometría clásica (Demian y Ibrahim, 1972), tanto en la forma de la abertura de la conchilla como en el tamaño alcanzado por cada sexo. Esta diferencia sexual en el tamaño de *M. cornuarietis* podría compararse en magnitud con la diferencia alcanzada en *A. platae* (Capítulo 3).

Las diferencias sexuales en la forma de la abertura de la conchilla, tanto en *P. canaliculata* como *M. cornuarietis* (Cazzaniga, 1990; Estebenet, 1998; Demian y Ibrahim, 1972), han sido asociadas con el desarrollo del complejo copulatorio que se ubica en el borde derecho de la cavidad paleal y que modificaría la forma de la curva generatriz de la conchilla durante el crecimiento (Estebenet *et al.*,

2006). Sin embargo, aunque el complejo copulatorio en *A. platae* (Martín, 1984) es comparable al de *P. canaliculata*, en la primera su desarrollo no se vería reflejado en la forma de la abertura de la conchilla. El gasterópodo dulceacuícola *Viviparus subpurpureus* (Say, 1829) presenta un tentáculo cefálico transformado en órgano copulatorio, por lo que no afecta el borde paleal y la curva generatriz de la conchilla, y sin embargo mostró diferencias sexuales en la forma de la misma (Minton y Wang, 2011). Estas evidencias sugieren que la vaina del pene no determinaría la variación intersexual de la forma de la conchilla de los ampuláridos.

Se ha sugerido que las diferencias intersexuales en la forma de la conchilla de *P. canaliculata* podrían ser el resultado de los largos periodos de tiempo que dedican a las actividades de cópula y de oviposición y a las diferentes posiciones que adoptan machos y hembras durante estas actividades (Estebenet y Martín, 2003). En *A. platae* las cópulas son menos prolongadas (Capítulo 2) que las de *P. canaliculata* y a los ejemplares estudiados no se les permitió copular libremente, ya que estuvieron condicionados a la frecuencia de una cópula semanal determinada para el estudio del ciclo de vida (Capítulo 3), lo que podría haber resultado en un menor desarrollo del dimorfismo.

Aunque no se detectaron diferencias en la forma de la conchilla de machos y hembras de *A. platae*, sí se observó cierta variación de la forma de la conchilla de los caracoles, independientemente del sexo. Algunas conchillas mostraron aperturas más pequeñas y una pequeña variación en la globosidad de las conchillas, apreciable por la sutil deformación de la grilla (figura 5.5). Estas diferencias en la forma pueden ser atribuidas en gran parte al cambio detectado para esta especie en la forma de la conchilla con respecto al tamaño de la

conchilla de los caracoles adultos (alometría estática) (figura 5.7). En *P. canaliculata* también se detectó alometría estática de la conchilla a través de la morfometría geométrica (Tamburi y Martín, 2013) pero el efecto alométrico representa un aumento del tamaño de la última vuelta en las hembras y del tamaño de la abertura en los machos, y una disminución de la altura de la espira en ambos sexos. Es importante mencionar que el estudio del efecto alométrico hallado en este trabajo debe ser profundizado ya que el rango de tamaños (largo total) de las conchillas utilizadas fue muy acotado, y posiblemente con una mayor variación de tallas se podrían realizar interpretaciones más realistas de la variación de la forma respecto del tamaño de las conchillas.

Aunque no se halló evidencia de dimorfismo sexual externo en *A. platae* si se encontró que la variación del peso de la conchilla en función del largo total es distinta entre los sexos: la mayor pendiente de la recta de los machos indica que los pesos de sus conchillas crecen relativamente más rápido que los de las hembras. Esta diferencia entre machos y hembras de *A. platae* podría deberse al aporte de carbonato de calcio que hacen las hembras a las masas de huevos en forma de microcristales y a su gran fecundidad (Capítulo 2). En *P. canaliculata* (Cazzaniga, 1990; Estebenet y Martín, 2003; Tamburi y Martín 2012) las diferencias intersexuales en el peso de la conchilla son mucho más evidentes y esta mayor diferencia entre sexos podría deberse a que *P. canaliculata* produce cáscaras de huevos totalmente calcificadas, lo que representa un aporte de carbonato de calcio mucho mayor.

6. VARIACIONES EN LA COLORACIÓN DE LA CONCHILLA Y DE LAS PARTES BLANDAS, SU MECANISMO HEREDITARIO Y SU USO POTENCIAL COMO MARCADOR GENÉTICO

6.1. Introducción

Asolene platae es un caracol escasamente estudiado y poco se sabe acerca de las variaciones de la coloración de las conchillas y de las partes blandas, así como tampoco es conocido el mecanismo de herencia que involucra las diferentes combinaciones de las coloraciones. Solo para algunas especies de la familia Ampullariidae se han descrito más detalladamente las variaciones de la pigmentación y el mecanismo de herencia que determina estas combinaciones (Dillon, 2003; Yusa, 2004).

El modelo general de pigmentación de las conchillas de los ampuláridos corresponde con un color marrón uniforme general de la conchilla con bandas espirales de color marrón oscuro o negro (Estebenet *et al.*, 2006); solo en algunas especies las bandas características están ausentes (Simone, 2004). En *Pomacea canaliculata* (Yusa, 2004) y *Marisa cornuarietis* (Dillon, 2003) se han descrito distintos fenotipos (denominados albinos para la primera y *Golden* para la segunda) que carecen de pigmentos oscuros. El mecanismo de herencia involucrado es de tipo mendeliano simple en donde el albinismo está dado por la condición homocigota recesiva. Además de la base genética de las variaciones en la coloración de las conchillas y de las partes blandas del cuerpo, existe una marcada influencia del ambiente sobre el grado de expresión de estos genes. En esta familia solo se estudió para *P. canaliculata* el efecto de algunas variables ambientales como la temperatura, pH, oxígeno disuelto, salinidad y profundidad

del agua, solo teniendo esta última efecto sobre el número y ancho de las bandas de la conchilla (Galán *et al.*, 2015). En otros moluscos se determinó el efecto de la alimentación, de la temperatura y de la intensidad lumínica sobre la pigmentación de las conchillas y de las partes blandas de los individuos (Mitton, 1977; Cowie y Jones, 1985; Trevelyan y Chang, 1987; Jordaens *et al.*, 2001).

El polimorfismo del color (individuos albinos y pigmentados o salvajes) fue usado por Yusa (2004) como marcador genético para estudiar el modelo de competencia espermática en *P. canaliculata*, mientras que en el resto de los ampuláridos es un tema que aún no ha sido estudiado aunque es de suma importancia para intentar dar respuesta a estos interrogantes para otras especies de la familia y, en este caso particular, para *A. platae*.

El objetivo general de este capítulo es describir las variaciones de la coloración y el mecanismo de herencia que las rige, así como también esclarecer si existe competencia espermática en *A. platae*. Son objetivos particulares de este capítulo describir el modelo general de la coloración de la conchilla de *A. platae*, así como de las partes blandas del cuerpo y caracterizar los dos fenotipos de *A. platae* encontrados entre descendientes de caracoles provenientes de una población natural. Se pretende además precisar el mecanismo de herencia que involucra a los genes que codifican la coloración y estudiar la competencia espermática a partir del uso del albinismo como marcador genético.

6.2. Materiales y Métodos

6.2.1. Origen y mantenimiento de los caracoles

Los caracoles utilizados para realizar las observaciones y las cruzas mayoritariamente provenían de las cohortes descritas en el Capítulo 3, mientras que otros individuos fueron criados en grupos o individualmente con agua renovada semanalmente, suplementada con CaCO_3 , y alimentados con lechuga *ad libitum*. Todos los caracoles utilizados para las experiencias fueron descendientes de individuos originarios del Lago Regatas (Parque Tres de Febrero, 34° 34' 24" S, 58° 24' 53" O. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina).

6.2.2. Pigmentación de la conchilla y de las partes blandas del cuerpo

Los individuos vivos fueron observados con una lupa Olympus con iluminación epi- y diascópica para determinar la presencia o ausencia de pigmento en las partes blandas del cuerpo de los neonatos o de los embriones al momento cercano a la eclosión (en la que ya se diferencian los ojos y sus pigmentos, (Capítulo 2). Las conchillas vacías fueron tratadas con una solución de hipoclorito de sodio para eliminar el periostraco y determinar si el pigmento de las bandas se ubicaba en este o en la matriz de la conchilla (Estebenet *et al.*, 2006); esta solución remueve la porción orgánica externa de la conchilla mientras que la matriz calcárea permanece inalterada. La observación de la continuidad o interrupción de las bandas se realizó sobre 72 conchillas de caracoles provenientes del estudio de las cohortes del Capítulo 3.

6.2.3. Herencia de la pigmentación de la conchilla y de las partes blandas del cuerpo

Para determinar el mecanismo de herencia del gen que codifica la producción del pigmento se realizaron varias cruzas controladas, entre individuos de fenotipo salvaje y albino para los que se desconocía su genotipo. La proporción de fenotipos obtenidos para la F1 fue calculada a partir de dos masas de huevos de las que se desconocían los progenitores; sin embargo formaban parte de un *pool* de cría en el que todos los individuos eran de fenotipo salvaje. Además se realizaron cruzas entre individuos de fenotipo salvaje de la F1 (no se realizaron todas las posibles combinaciones debido a la dificultad para criarlos hasta alcanzar la madurez sexual) y fue determinada la proporción fenotípica de la descendencia; las hembras involucradas en estas cruzas eran vírgenes y las cópulas posteriores fueron siempre con el mismo macho. También se realizaron dos cruzas controladas entre machos de fenotipo albino de la F1 y hembras vírgenes de fenotipo salvaje provenientes de un *pool* de cría. Finalmente se realizaron cruzas entre cuatro hembras albinas vírgenes proveniente de la F1 con machos albinos de la F1 y una retrocruza entre una hembra virgen proveniente de la F2 y un macho albino de la F1.

6.2.4. Modelo de competencia espermática

En el ensayo realizado para determinar la competencia espermática se utilizaron cuatro hembras albinas vírgenes, tres de ellas provenientes de la cohorte I (Capítulo 3) que se encontraban en su tercer año de vida y una cuarta hembra de un año de edad que era descendiente de los individuos de la cohorte I. A estas hembras se le permitió copular una única vez con un macho albino, y una

vez que depositaron la primera masa de huevos se les permitió copular por única vez con un segundo macho de fenotipo salvaje y genotipo heterocigota. Para cada masa de huevos se contabilizó el número de huevos, la viabilidad de las masas y el número de neonatos de fenotipo salvaje y albino.

6.3. Resultados

6.3.1. Pigmentación de la conchilla y de las partes blandas del cuerpo

Fueron observados dos fenotipos discretos en cuanto a la pigmentación de la conchilla así como a la pigmentación de las partes del cuerpo. El fenotipo salvaje presentó pigmentación oscura, tanto en la conchilla como en las partes blandas. Los pigmentos oscuros de la conchilla se disponen en bandas espirales, cuyo número varió entre cuatro y 10 y cuyo ancho fue también muy variable. El fenotipo denominado albino carece de esos pigmentos tanto en las partes blandas del cuerpo como de bandas en la conchilla (excepto por dos zonas pigmentadas que se describen más abajo).

Las conchillas y las partes blandas del cuerpo (por ejemplo: manto, pie y ojos) de los individuos de fenotipo salvaje presentaron pigmentos oscuros (figura 6.1B). Los individuos de fenotipo albino carecieron de pigmentos oscuros en las partes blandas del cuerpo y en la conchilla (figura 6.1A), excepto por la presencia en la conchilla de dos bandas oscuras de ubicación subsutural y periumbilical (figura 6.2). El aspecto general de la conchilla es amarillento mientras que las partes blandas de los individuos albinos lucen transparentes o blanquecinas, y aquellas zonas con mayor cantidad de glándulas de moco se ven amarillentas (figura 6.3). Una zona oscura observada en la zona inferior del pie de los caracoles albinos corresponde al opérculo evidenciado por la transparencia del pie (figura 6.3).

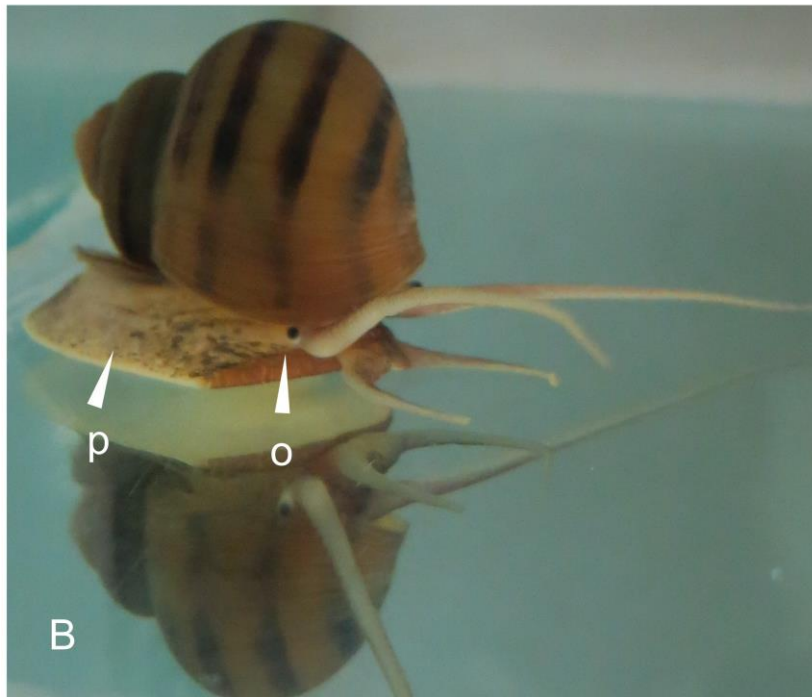
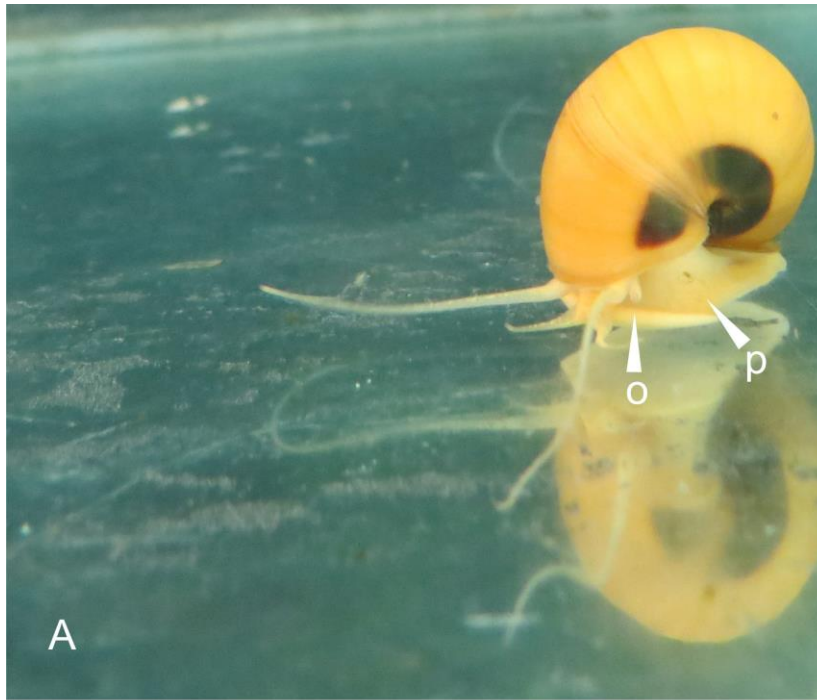


Figura 6.1 Ejemplares adultos de fenotipo albino (A) y salvaje (B) de *Asolene platae*, (A) ausencia de pigmentación oscura en el cuerpo y conchilla, (B) cuerpo y conchilla pigmentados (o: ojo, p: pie).

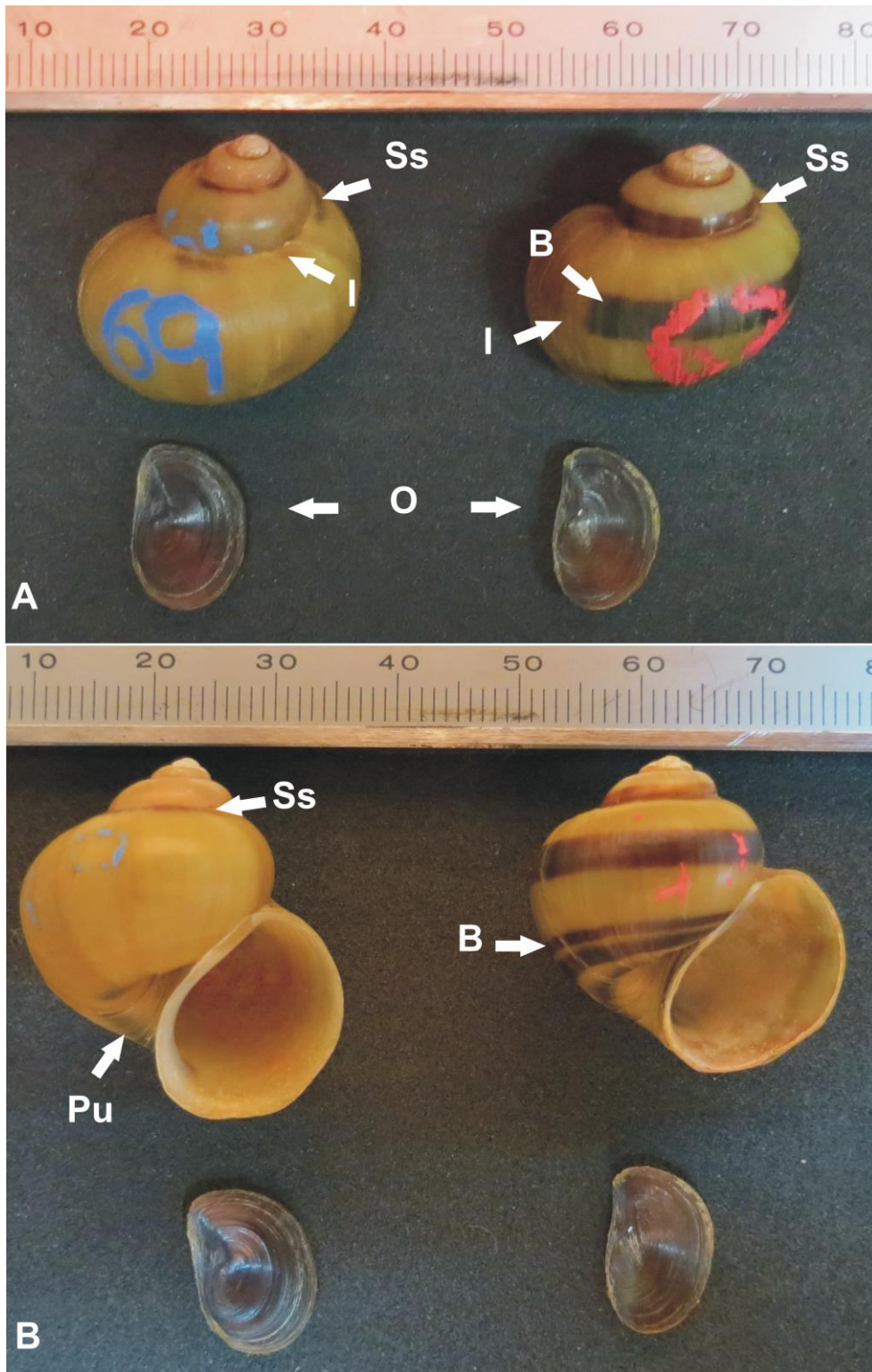


Figura 6.2 Conchillas y opérculos de caracoles de fenotipo albino y salvaje de *A. platae*, en A) vista dorsal y B) vista ventral de las conchillas de caracoles adultos; las flechas indican: B: banda característica del fenotipo salvaje; I: interrupción de las bandas; Ss: banda subsutural; Pu: banda periumbilical y O: opérculo de ambos fenotipos.

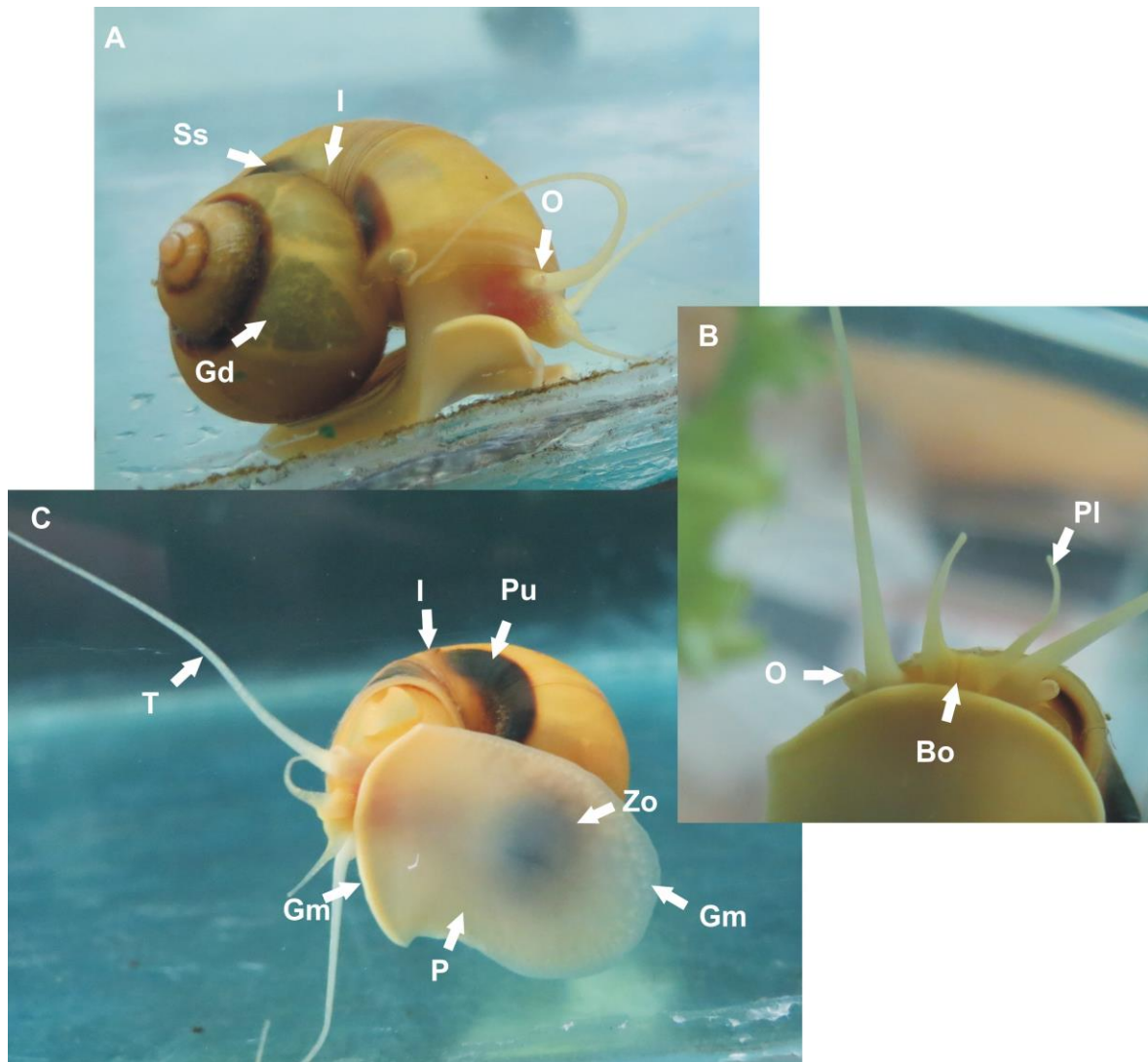


Figura 6.3 Fotos ilustrativas de ejemplares albinos de *A. platae* en las que se observa el mismo caracol en diferentes posiciones. A) Se observa la banda subsutural (Ss) interrumpida (I); el pie (P), los tentáculos (T) y ojos (O) sin pigmentos y la glándula digestiva (Gd). B) Detalle del ojo, palpos labiales (PI) y boca (Bo) sin pigmentos. C) Detalle de la banda periumbilical (Pu) interrumpida (I) y detalle de la coloración del pie con glándulas de moco (Gm) y la zona oscura del opérculo (Zo).

En el 32% de los caracoles estudiados (n total= 72) las bandas espirales de la conchilla características de cada fenotipo se interrumpieron aunque frecuentemente reaparecieron después de cierto tiempo. El 46 % de las hembras (n total de hembras = 35) mostró interrupciones mientras que solo el 19 % de los machos lo hizo (n total de machos = 37). El opérculo de ambos fenotipos

descriptos no presenta diferencias en la coloración (figura 6.2). La falta de pigmentos oscuros en la conchilla permite observar por transparencia la glándula digestiva (figura 6.3), que en los caracoles albinos es la única zona de las partes blandas del cuerpo que presenta una coloración oscura; también por transparencia se pueden observar en este fenotipo las gónadas femeninas o masculinas.

La bandas espirales presentes en las conchillas de los individuos albinos, (subsutural y periumbilical) aparecieron en la teleoconcha durante el desarrollo intracapsular, mientras que las otras bandas características del fenotipo salvaje, generalmente aparecieron al momento de la eclosión o poco después de esta (figura 6.4). Las bandas presentes en ambos fenotipos (subsutural y periumbilical) permanecieron inalteradas después del tratamiento de las conchillas con hipoclorito de sodio, mientras que la pigmentación general amarillenta fue removida de las conchillas de ambos fenotipos después del mismo tratamiento, por lo tanto se ubican los pigmentos amarillos en el periostraco (figura 6.5).

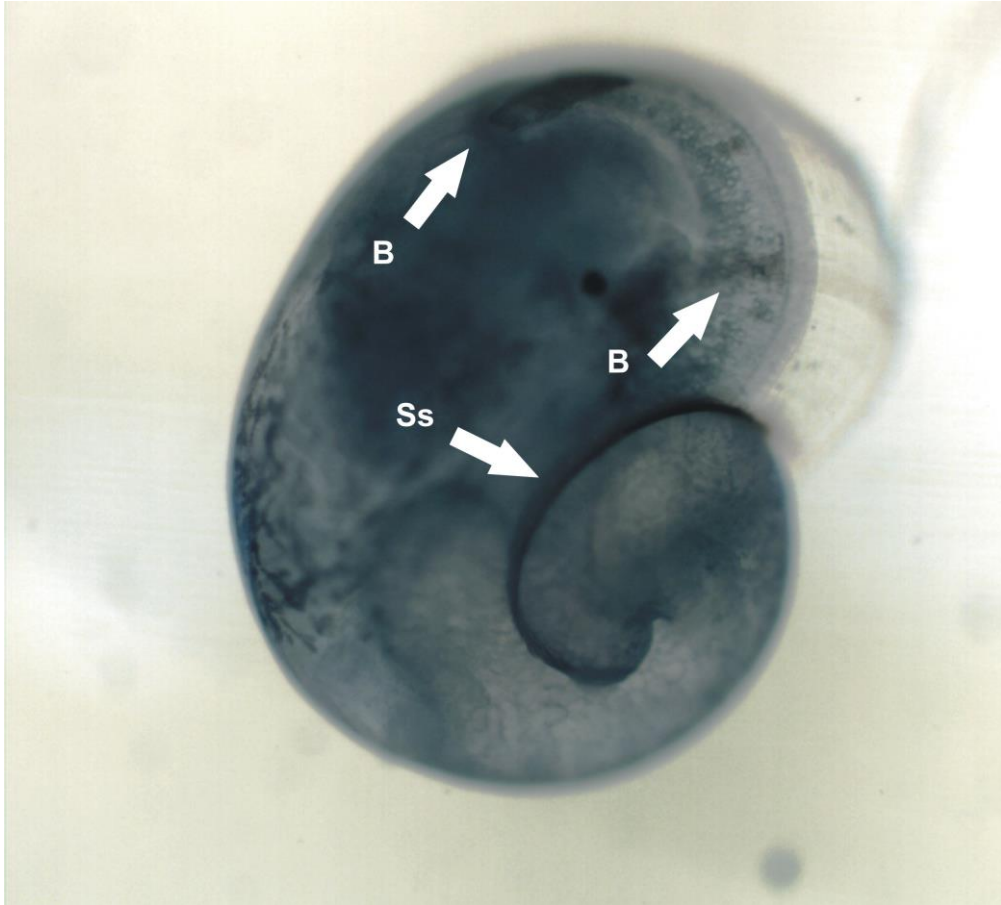


Figura 6.4 Embrión de fenotipo salvaje al momento de la eclosión, con bandas espirales (B) características del fenotipo y la banda subsutural (Ss).

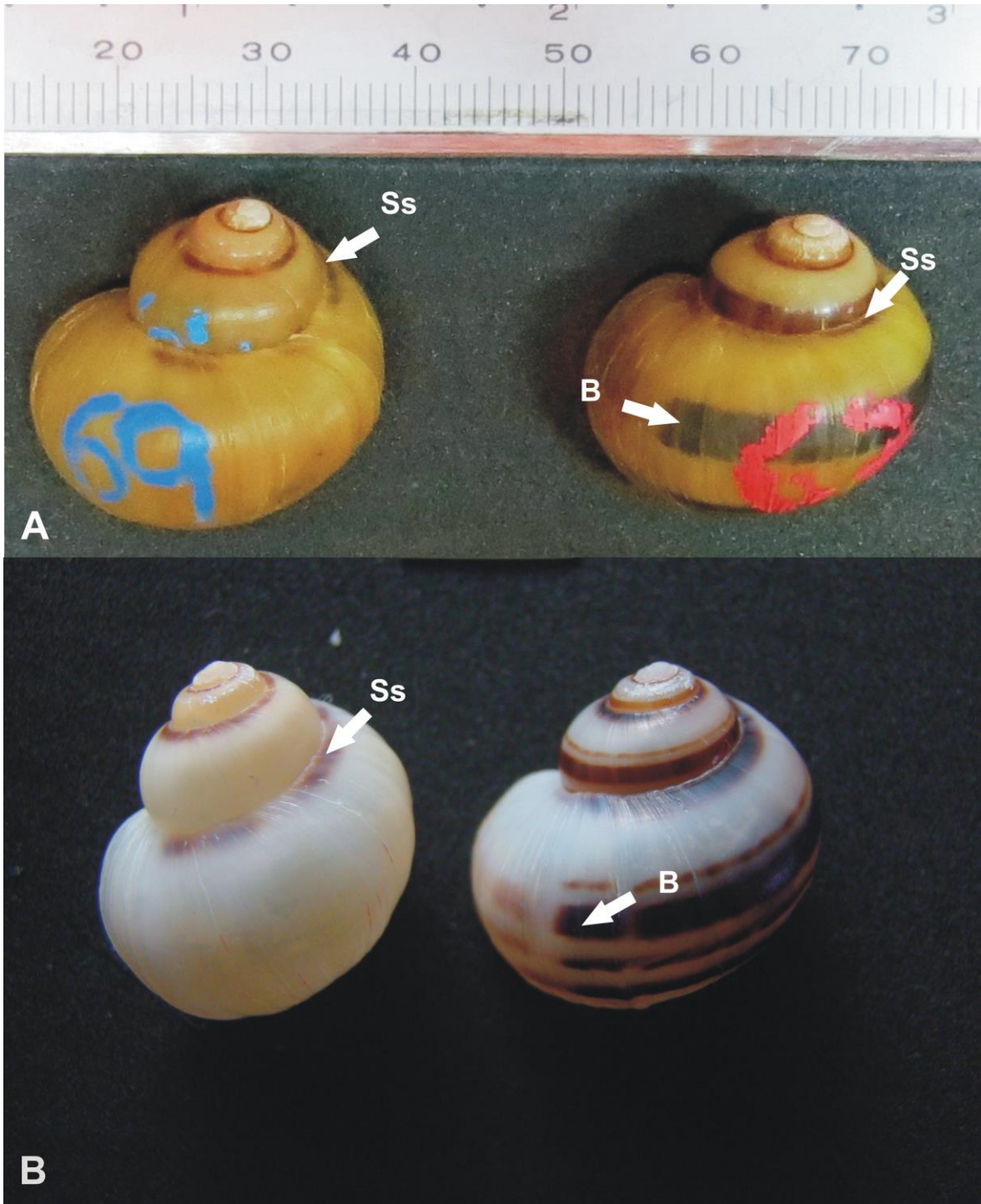


Figura 6.5 Conchillas de adultos de *A. platae* de fenotipos albino y salvaje sin tratamiento A) y tratadas con hipoclorito de Na^+ B). Las flechas indican, B: banda característica del fenotipo salvaje; Ss: banda subsutural.

6.3.2. Mecanismo de herencia de la pigmentación de la conchilla y de las partes blandas del cuerpo

A partir de la cruce entre un macho de fenotipo salvaje y una hembra de fenotipo salvaje (F1) se obtuvieron dos masas de huevos con una descendencia promedio albina del 22 % y del 78 % de fenotipo salvaje (figura 6.5). De las cinco cruces realizadas entre individuos de fenotipo salvaje de la F1 se obtuvieron seis masas de huevos que dieron una descendencia (F2) de 74 % en promedio de neonatos de fenotipo salvaje y un 26 % de albinos; las cruces entre dos machos albinos (F1) y dos hembras salvajes (provenientes del *pool* de cría) dieron toda la descendencia de fenotipo salvaje.

Una hembra albina de la F2 fue cruzada con un macho albino de la F1 (retrocruza indicada con un * en la figura 6.5) y todos los descendientes de la única masa de huevos fueron de fenotipo albino; esta misma hembra luego de copular una vez con un macho de fenotipo salvaje produjo masas de huevos con proporción variable de albinos (ver Sección 6.3.3); los neonatos de la última masa de huevos fueron en un 43 % de fenotipo salvaje y en un 57 % de fenotipo albino.

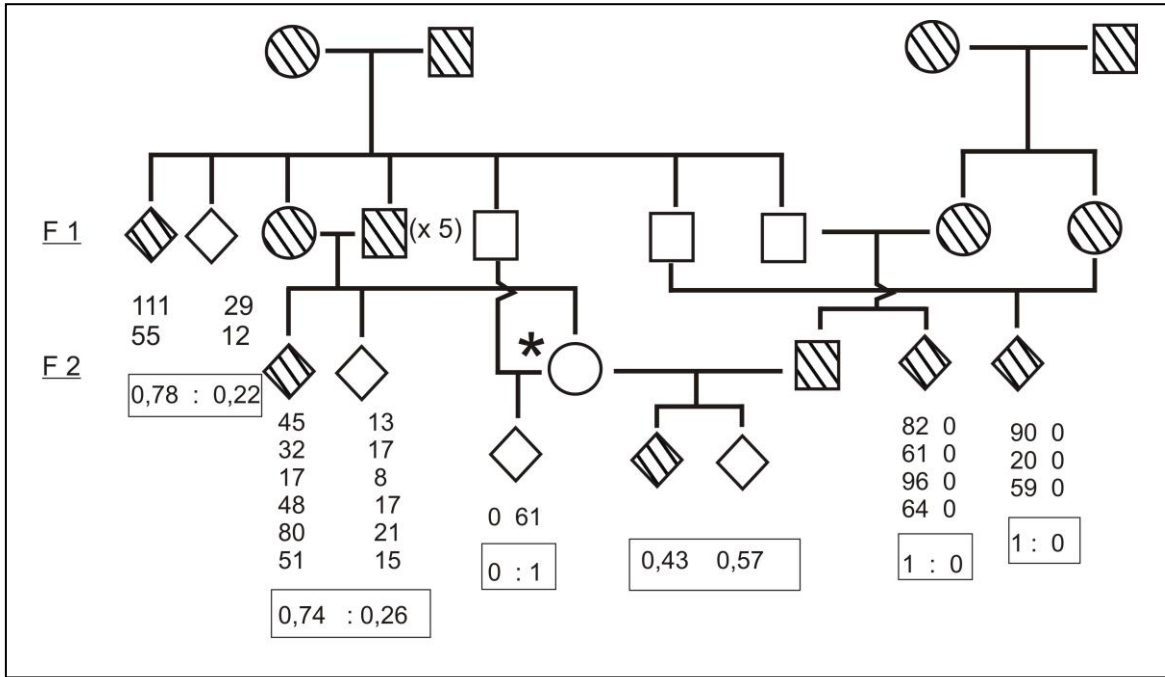


Figura 6.5 Diagrama de cruces controladas realizadas en *A. platae*. Círculos: hembras; cuadrados: machos; rombos: progenie no sexada; rayas: fenotipo salvaje; liso: fenotipo albino. Los números en la misma línea indican el número de individuos de cada fenotipo en una masa de huevos; las proporciones dentro de las cajas indican la proporción promedio de albinos y salvajes en el total de masas de huevos analizadas.

6.3.3. Modelo de competencia espermática

De las cuatro hembras que participaron en este ensayo tres depositaron masas de huevos inviables, en las que los huevos presentaron embriones aunque en ningún caso alcanzaron a completar su desarrollo. La única hembra que ovipuso masas fértiles (indicada con * en la figura 6.5), depositó la primera masa de huevos en la que todos los neonatos fueron albinos (figura 6.6); a partir de la segunda masa de huevos, depositada luego de la cópula con un macho salvaje, la proporción de neonatos de fenotipo albino descendió progresivamente y comenzó a aumentar la proporción de neonatos de fenotipo salvaje. Se observa que las proporciones de albino-salvaje de la descendencia cambió de una masa de huevos a otra y el descenso de los neonatos de fenotipo albino llegó al 57 %

(figura 6.6); las dos últimas proporciones observadas de fenotipos salvaje y albino se acercan al 50%, aunque en ambos casos el valor del fenotipo albino supera el 50%.

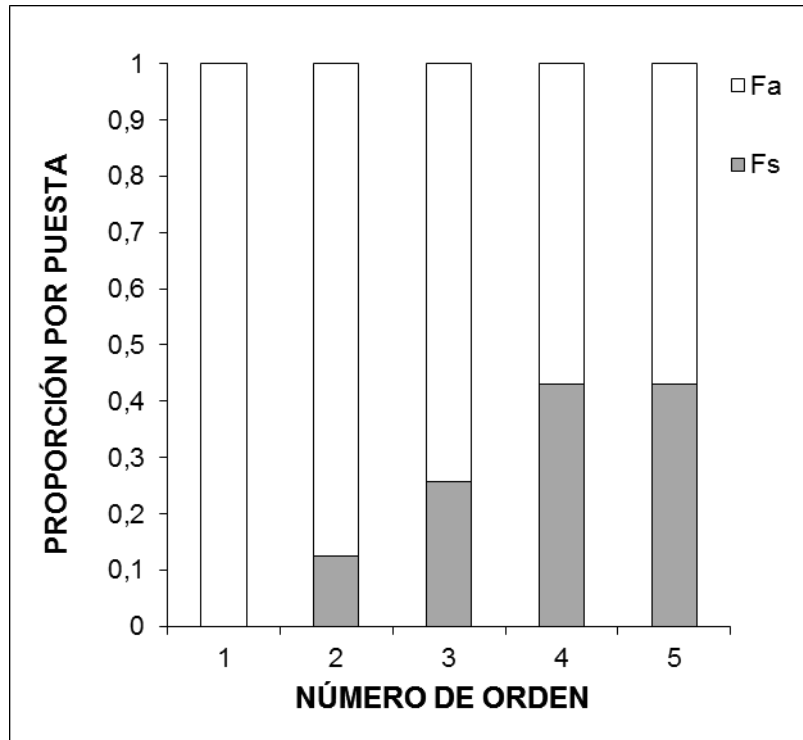


Figura 6.6 Proporciones de neonatos de fenotipo salvaje (Fs) y fenotipo albino (Fa) provenientes de cinco masas de huevos depositadas por una hembra albina, después de copular por primera vez con un macho albino y posteriormente con un macho de fenotipo salvaje. Abscisas: secuencia en que fueron depositadas las masas de huevos.

6.4. Discusión

El patrón de coloración de bandas espirales oscuras, muy variables en número y ancho, descrito en este capítulo para la conchilla de *A. platae* se corresponde con el modelo general propuesto para los ampuláridos, como por ejemplo en *Pomacea canaliculata* (Estebenet *et al.*, 2006), aunque en otros ampuláridos como *Pomacea scalaris* (Simone, 2004) y *Pila virescens* (Keawjam, 1986) las bandas espirales están ausentes, o pueden ser irregulares como en *Saulea vitrea* (Perera y Walls, 1996). La falta de pigmentación en *A. platae* es el primer registro de albinismo en el género *Asolene*; sin embargo en otros ampuláridos como *Pomacea bridgesii* (Perera y Walls, 1996), *Marisa cornuarietis* (Dillon, 2003) y *P. canaliculata* (Yusa, 2004), ya se han descrito con diferente grado de detalle.

Los individuos denominados en este capítulo como albinos presentan una coloración general de la conchilla amarillenta y en determinadas zonas particulares coloración oscura; esta última se encuentra localizado únicamente en dos bandas de la conchilla (subsutural y periumbilical). Perera y Walls (1996) entre los varios fenotipos de *P. bridgesii* que describen mencionan una variante con la conchilla amarilla y la parte blanda del animal de color blanco, mientras que Yusa (2004) describe para *P. canaliculata* un fenotipo de color amarillo sin pigmentos oscuros, patrón que se correspondería con el descrito en este capítulo para *A. platae*, aunque presenta una llamativa diferencia por la presencia de las bandas subsutural y periumbilical. En *M. cornuarietis* (Dillon, 2003) la variedad de conchilla *Golden* es de color amarillo sin bandas pero el color de las partes blandas es indistinguible del fenotipo salvaje. Por lo tanto las variaciones de la pigmentación de la conchilla dentro de los ampuláridos son amplias, y no se

pueden unificar los patrones de pigmentación descritos para las diferentes especies. En cuanto a la pigmentación del opérculo de *A. platae* no se encontraron diferencias entre los fenotipos albino y salvaje, en ambos la coloración fue oscura y por las observaciones realizadas sobre las fotos de Perera y Walls (1996) parece que tampoco se diferencian entre todos los fenotipos descritos para *P. bridgesii*.

Las bandas espirales de las conchillas de los individuos de ambos fenotipos (salvaje y albino) permanecieron inalteradas después del tratamiento de la misma con hipoclorito de sodio, por lo que su ubicación corresponde a la matriz calcárea (Estebenet *et al.*, 2006); sin embargo la coloración amarilla de las conchillas se pierde en buena parte con el tratamiento químico indicando que se ubica en el periostraco, porción orgánica de la conchilla. La ubicación del pigmento de las bandas y de la coloración general de la conchilla en *A. platae* se corresponde con la descrita para *P. canaliculata* (Estebenet *et al.*, 2006).

La aparición de las bandas sucede en diferentes momentos del desarrollo de los caracoles, intracapsular para las bandas subsutural y periumbical (presentes en ambos fenotipos) y post-eclosión para las restantes bandas del fenotipo salvaje, similar a lo que sucede en *P. canaliculata* (Estebenet *et al.*, 2006), ya que las bandas aparecen después de la eclosión. Esta diferenciación en dos grupos de bandas no se ha registrado en otros ampuláridos en los que se han descrito las variaciones de color de la conchilla (Yusa, 2004; Perera y Walls, 1996; Dillon, 2003).

Los caracoles del fenotipo albino de *A. platae* descrito en este trabajo carecen de pigmentos oscuros en las partes blandas del cuerpo, por lo tanto los individuos albinos lucen blanquecino-amarillentos y translúcidos en las porciones

más delgadas de las partes blandas; posiblemente las regiones más amarillentas se correspondan con áreas que presentan mayor cantidad de glándulas secretoras de moco.

Los individuos de *A. platae* que presentaron pigmentos oscuros en el cuerpo también mostraron bandas oscuras (características del fenotipo salvaje), mientras que los individuos que carecieron de pigmentos oscuros en las partes blandas no mostraron las características bandas oscuras del fenotipo salvaje (a excepción de las bandas subsutural y periumbilical); por lo tanto, y como ocurre en *P. canaliculata* (Yusa, 2004), la herencia del color marrón de las bandas del fenotipo salvaje (excepto las dos de posición extrema) y de las partes blandas del cuerpo estarían bajo el control de un mismo gen. Este patrón difiere del encontrado en *M. cournuaretis* (Dillon, 2003) en la que el color de la conchilla y de las partes blandas del cuerpo se heredan de forma independiente.

Como se mencionó anteriormente, la pigmentación tanto del cuerpo como de la conchilla está sujeta a control genético; sin embargo, el ambiente o el estado fisiológico probablemente ejercen cierta influencia sobre el grado de expresión, ya que se ha observado en varias conchillas la interrupción y reaparición de las bandas. En otros moluscos, ciertos factores ambientales como la alimentación en *Carinarion* spp. (Jordanes *et al.*, 2000), la temperatura en *Cepaea* spp. (Cowie y Jones, 1985) y la intensidad lumínica en *Mytilus edulis* (Mitton, 1977; Trevelyan y Chang 1987) tienen influencia en la intensidad de la pigmentación de la conchilla o de las valvas. Por otra parte, en *P. canaliculata* se observó un descenso del número de bandas y un aumento del ancho de las bandas de las conchillas conforme aumenta la profundidad a la que se encontraban los caracoles (Galan *et al.*, 2015). Sin embargo esta variación en la profundidad puede representar otras

variables que no fueron medidas y que posiblemente tengan efecto sobre la pigmentación, como son la iluminación y el tipo de alimento. Los individuos de *A. platae* fueron criados a profundidades constantes, por lo que es posible descartar algún posible efecto de esta variable.

Hasta aquí se ha estudiado la herencia del color de las bandas de la conchilla y de las partes blandas del cuerpo de *Asolene platae*; sin embargo, queda por aclarar la herencia de las bandas subsutural y periumbilical que estuvieron presentes siempre en ambos fenotipos estudiados. Podría plantearse que es otro pigmento el involucrado en esta coloración y que están codificados por otro gen, como ocurre en *Littorina obtusata*, en la que la herencia de la coloración no puede ser explicada por un gen con varios alelos (Kozminsky, 2014). Además, las bandas subsutural y periumbilical aparecieron durante el desarrollo antes que las restantes bandas, y en *Littorina obtusata* (Kozminsky, 2014) distintos pigmentos también aparecen en diferentes momentos del desarrollo. Por otra parte podría esperarse que en ambientes naturales o con mayor variabilidad genética, se expresen otras combinaciones de pigmentación posibles para *A. platae* como las descritas para *P. bridgesii* (Perera y Walls, 1996) y para *Marisa cornuarietis* (<http://pantheon.yale.edu>).

A partir de los resultados obtenidos de las cruzas realizadas, el gen que codifica para el pigmento oscuro de las partes blandas como de la conchilla (a excepción de las bandas subsutural y umbilical) de *Asolene platae*, corresponde al tipo de herencia mendeliana simple, donde la condición de fenotipo albino está dada por un genotipo homocigota recesivo y la condición de salvaje por el genotipo homocigota dominante o bien por el heterocigota dominante-recesivo, al igual que en otros ampuláridos como *M. cornuarietis* (Dillon, 2003) y *P.*

canaliculata (Yusa, 2004). La determinación del tipo de herencia que involucra a los genes que determinan el albinismo fue de suma importancia para dar comienzo al estudio sobre competencia espermática haciendo uso del albinismo como marcador genético.

Los ensayos de competencia espermática resultaron fallidos posiblemente porque tres de las cuatro hembras comenzaron la actividad sexual a edades muy avanzadas. Para la única hembra fértil se observó un reemplazo gradual del esperma del primer macho por el del segundo, en el que las proporciones de neonatos albinos decrecieron progresivamente de una masa de huevos a la otra. Es decir que de una masa de huevos a la siguiente la proporción se acercó cada vez más a la esperada para una cruce entre un individuo albino y un heterocigota (50% albino-50% salvaje), y se alejó de lo esperado para la cruce entre dos individuos albinos (100% albino). En las últimas dos puestas el porcentaje de albinos fue mayor al 50 %, posiblemente porque aun esté aportando esperma del primer padre albino a la masa de huevos y como consecuencia el porcentaje de albinos es levemente mayor.

Se observó en la cuarta masa de huevos depositada que el porcentaje alcanzado es cercano al esperado para una masa de huevos paternizada completamente por el segundo padre (43 % de neonatos de fenotipo salvaje). La hembra posee, con una cópula suficiente esperma para oviponer entre 230 a 670 huevos (Capítulo 2), por lo tanto es posible que el esperma del segundo macho desplace al del primero más o menos rápido. Además las masas de huevos depositadas durante este proceso, hasta completar el reemplazo de esperma, presentan paternidad múltiple, fenómeno que también ocurre en *P. canaliculata* (Yusa, 2004).

A partir de esta única hembra estudiada en la que se observó reemplazo de esperma, se podría plantear que ocurre competencia espermática como ocurre en *P. canaliculata* (Yusa, 2004). Aunque para esta última especie no se tuvo en cuenta cuantas veces copuló cada hembra, por lo tanto podría haber mucha diferencia en las cantidades de esperma almacenado y como consecuencia los tiempos de reemplazo podrían ser variables (entre 4 y 38 días; Yusa, 2004).

El paraesperma y euesperma (Capítulo 2) podrían estar involucrados en el mecanismo de competencia espermática. Estos dos tipos espermáticos también se encuentran presentes en *P. canaliculata* (Sachwatkin, 1920; Andrews, 1964; Winick *et al.*, 2001, 2009). Entre las posibles funciones atribuidas al paraesperma se mencionan la nutricia, ya que se destruyen liberando nutrientes en el tracto genital de la hembra (Andrews, 1964) y la de transporte o *carrier*, aumentando la movilidad del euesperma (Winick, 2001). Por otra parte existen otras hipótesis que explican la función del paraesperma al mejorar el éxito de la fertilización del euesperma ante la competencia espermática (Higginson y Pitnick, 2011), mediante la formación de tapones espermáticos que bloqueen el paso de esperma de otro macho o podrían tener directamente una función espermicida (Baur, 1998). Sin embargo, es indispensable continuar y profundizar los estudios tanto en *A. platae* como en el resto de los ampuláridos para comprender los diferentes modelos de competencia espermática.

7. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos en la presente tesis en condiciones de laboratorio permiten conocer características de la biología de *Asolene platae*. Esta especie, de la que se conocía muy poco, pertenece a uno de los géneros de ampuláridos con masas de huevos gelatinosas y subacuáticas, que son aquellos que han recibido menos atención dentro de la familia.

Las masas de huevos de *A. platae* presentaron microcristales de calcita tanto en la matriz gelatinosa como dentro de los huevos, los cuales se disponen en varias capas apiladas. Al momento de la eclosión el embrión ataca con la rádula la capsula interna del huevo, perforándola y produciendo el colapso de esta; por acción del pie sale del huevo y reptar sobre la gelatina de la masa de huevos. Aunque en apariencia lucen totalmente desarrollados, los neonatos adquieren la capacidad de respirar aire y de alimentarse de material vegetal varias semanas después de la eclosión (Capítulo 2).

En *A. platae* la oviposición es un proceso que ocurre bajo el agua, y aunque las masas de huevos son depositadas por lo general en sustratos duros, no comestibles, son predadas por conoespecíficos, incluso por la propia madre. Durante la cópula subacuática los machos permanecen adheridos a la conchilla de la hembra, la que generalmente se mantiene inmóvil; durante este proceso, que tiene una duración muy variable, los individuos de ambos sexos permanecen con los tentáculos fuertemente enrollados. Las hembras poseen la capacidad almacenar espermia viable por un período de hasta 169 días. El estudio del fluido espermático mostró dos tipos de células diferentes: el euesperma fértil, uniflagelado, y el paraesperma infértil, pluriflagelado (Capítulo 2).

En relación con el ciclo de vida en condiciones controladas de laboratorio a 25 °C de temperatura (Capítulo 3), se concluye que *A. platae* es una especie de crecimiento lento, continuo y asintótico y que las hembras alcanzan en general tallas un poco mayores que las de los machos. Se observó además un significativo dimorfismo tanto en la talla como en la edad a la madurez, con machos que maduran a tallas y edades menores que las hembras. El ciclo de vida es por lo menos cuatrienal e iteróparo, con una baja supervivencia en las primeras semanas post-eclosión. La fecundidad promedio fue de 1448 huevos por hembra.

En *A. platae* la temperatura tiene un importante efecto sobre la actividad en general, aunque a todas las temperaturas estudiadas casi la mitad del tiempo los caracoles se mantuvieron quietos, con el cefalopodio extendido pero sin desplazarse. El rango óptimo de temperaturas para *A. platae* se encontraría entre los 25-30 °C, ya que temperaturas de 35 °C o más parecen perjudiciales, no solo porque la actividad disminuye sino porque también aumenta la tasa de mortalidad. Por otra parte, a 20 °C y temperaturas menores la actividad desciende rápidamente y las tasas de crecimiento son menores. La duración del desarrollo embrionario fue muy variable a temperaturas constantes pero también mostró una relación inversa con la temperatura; el umbral térmico inferior de desarrollo fue de 16 °C aproximadamente y las estimaciones de los días-grados acumulados por encima de ese umbral necesarios para la eclosión variaron entre 107.5 y 120.5 °C.d (Capítulo 4).

El estudio de las diferencias de las conchillas de machos y hembras de *A. platae* evidenció la falta de dimorfismo sexual externo en cuanto a la forma y dimensiones de la conchilla, lo que además permite descartar una de las posibles

explicaciones del dimorfismo de la conchilla en los ampuláridos, atribuido al desarrollo del complejo copulatorio (Estebenet *et al.*, 2006), ya que en esta especie también se encuentra desarrollado (Martín, 1984). En ambos sexos se detectó alometría estática: los individuos de mayor tamaño presentan aberturas más redondeadas mientras que aquellos más pequeños poseen aberturas más estrechas. Por otra parte, el peso de la conchilla de las hembras es relativamente menor que el de los machos para una misma talla, posiblemente debido al aporte de carbonato de calcio que hacen las hembras a las masas de huevos en forma de microcristales de calcita (Capítulo 2) y a la relativamente alta fecundidad (Capítulo 3).

En relación con las variaciones de la coloración de la conchilla de *A. platae* se concluye que el patrón de bandas espirales oscuras, con amplia variación en número y ancho, se corresponde con el de los ampuláridos en general. Por otra parte, se registró por primera vez el albinismo en el género *Asolene*, que se caracteriza por la falta de pigmentos oscuros de la conchilla (a excepción de las dos bandas extremas, subsutural y periumbilical, que no parecen ser homólogas del resto) y de las partes blandas del cuerpo. Las cruzas controladas de hembras vírgenes permitieron determinar el mecanismo involucrado en la herencia de los pigmentos oscuros de las bandas del fenotipo salvaje, que es de tipo mendeliano simple, en el que la condición homocigota recesiva determina el albinismo. Este hallazgo permitió avanzar en el estudio sobre competencia espermática haciendo uso del albinismo como marcador genético. Aunque los ensayos resultaron fallidos en su mayoría, en la única hembra que resultó fértil se observó la mezcla y el reemplazo de esperma de al menos dos padres (Capítulo 6).

Evolución de las puestas de huevos en la familia Ampulariidae

Una de las características distintivas descritas para *A. platae* es la presencia de microcristales de carbonato de calcio, de particular interés porque es el primer reporte para ampuláridos con puestas de huevos subacuáticas. Por otra parte, la cristalización del carbonato de calcio en forma de calcita en *A. platae* difiere de los cristales de vaterita de los ampuláridos con puestas de huevos aéreas tanto del Nuevo Mundo (*Pomacea*) como del Viejo Mundo (*Pila*). Por lo tanto, los cristales de calcita de las puestas de huevos de *A. platae* podrían representar una apomorfía de esta especie o del género *Asolene*, aunque es necesario estudiar primero este aspecto en las restantes especies del género y en los otros géneros con puestas gelatinosas. La microcristales de calcita o de otros polimorfos del carbonato de calcio dispersos en la matriz gelatinosas de la puesta podrían haber sido los precursores de las cáscaras calcáreas de los huevos tanto en los ancestros de *Pila* como en los de *Pomacea*, ya que los últimos modelos filogenéticos (Hayes *et al.*, 2105) sugieren que las mismas aparecieron en forma independiente.

Las masas de huevos de *A. platae* sufren un alto grado de canibalismo (Capítulo 2) y son predados en laboratorio por *P. canaliculata* y en la naturaleza por larvas de odonatos y por oligoquetos (Zelaya, 1999). Por otra parte en *P. canaliculata* la oviposición aérea, junto con el desarrollo de la cáscara calcárea y la presencia de perivitelininas tóxicas (Heras *et al.*, 2008; Frassa *et al.*, 2010; Dreón *et al.*, 2010, 2013) disminuyen la predación, aunque los caracoles adultos y juveniles de *P. canaliculata* consumen huevos de la misma especie (Saveanu y Martín, 2014). La predación intra- e interespecífica sobre las masas de huevos acuáticas podría haber ejercido una gran presión selectiva para la evolución de la

oviposición aérea en los ampuláridos como *Pomacea* (Turner, 1998; Horn *et al.*, 2008) y *Pila*.

Competencia espermática y otros mecanismos de selección sexual en *A. platae*

En los organismos dioicos o gonocóricos existen grandes diferencias en la inversión que realiza cada uno de los progenitores en la reproducción. En general, las hembras ponen mucho de su esfuerzo reproductivo en el esfuerzo parental que beneficia a la progenie mientras que los machos invierten fundamentalmente en el esfuerzo de cópula. El éxito reproductivo del macho dependerá en general del número de hembras con las que consiga copular, por lo que son ordinariamente promiscuos, y con lo buen o mal competidor por una pareja que un individuo sea (Krebs y Davies, 1985).

En *A. platae* se observó que las hembras son poliándricas, ya que presentan cópulas múltiples y una hembra cópula con más de un macho (Capítulo 2). El esperma de dos machos consecutivos se mezcla en el sistema reproductor de la hembra y aparentemente el esperma del segundo macho desplaza al del primero (Capítulo 6). Por lo tanto, como en *P. canaliculata*, existiría selección sexual a través del mecanismo de competencia espermática (Yusa, 2004).

En relación con los dos tipos espermáticos observados en *A. platae*, (euesperma y paraesperma, Capítulo 2), se puede concluir que se corresponderían con la denominación de esperma heteromorfo en el que ambos tipos celulares son producidos en el mismo testículo y en que solo uno de los dos

está involucrado en la fertilización. Cuando los diferentes tipos de espermatozoides se unen físicamente para aumentar la motilidad o transporte a través del tracto genital de la hembra se denominan conjugados (Higginson y Pitnick, 2011). Aunque en *P. canaliculata* se sugirió que el paraesperma podría tener función de transporte (Winik *et al.*, 2001), esta opción puede ser descartada para *A. platae* ya que el euesperma y el paraesperma fueron observados en una misma muestra de eyaculado pero separados unos de otros.

Existen varias hipótesis sobre las posibles funciones del esperma heteromorfo (e.g.: transporte y nutrición del euesperma por parte del paraesperma, aumento del éxito de la fertilización ante competencia espermática, y control de la proporción sexual entre otras). En el mecanismo de competencia espermática el paraesperma podría formar tapones que bloqueen el pasaje del esperma del rival o destruirlo (Baur, 1998) pero son necesarios estudios más detallados para poder determinar la función del paraesperma en *A. platae*.

En general, los machos intentarían copular con el mayor número de hembras posibles, y en *A. platae* se observó que el tiempo de cópula en acuarios comunes en lo que se encontraban otros machos y hembras fue menor al tiempo de cópula de parejas aisladas (Capítulo 2). Por lo tanto ante la presencia de otras hembras disponibles los machos probablemente acorten la cópula para poder copular con otra hembra.

El tiempo de cópula en *A. platae* es relativamente largo aunque se corresponde con los menores valores de *P. canaliculata* (Andrews, 1964; Berthold, 1991; Albrecht *et al.*, 1996; Burela y Martín, 2007, 2011); por otra parte el tiempo de cópula de esta última no se vio afectado por la presencia de

merodeadores (Burela y Martín, 2011) y tampoco se observó tiempo de guarda post-inseminación (Burela y Martín, 2011). Sin embargo, para esta misma especie los machos producen regalos nupciales que posiblemente los posicionen como mejores competidores en situaciones de competencia por parejas (Burela y Martín, 2014). Por lo tanto es posible plantear que los machos de *A. platae* no dedican tanto esfuerzo para la cópula como los de *P. canaliculata*, ya que nunca se observó producción de regalos nupciales (obs. pers). De todas maneras es indispensable realizar estudios más específicos sobre el comportamiento de cópula para determinar los mecanismos involucrados en la competencia entre machos en *A. platae*.

Potencial invasivo de *A. platae*

A partir de los resultados del estudio del ciclo de vida en condiciones de laboratorio (Capítulo 3), se determinaron varios parámetros que no solo aportan al conocimiento básico de la especie sino que permiten realizar un análisis de los atributos invasivos de *A. platae*. La baja supervivencia post-eclosión, el lento crecimiento, la madurez tardía y la baja fecundidad en relación con los valores de *P. canaliculata* (Estebenet y Cazzaniga, 1992; Estebenet y Cazzaniga 1993; Albrecht *et al.*, 1996; Estebenet y Martín, 2002; Martín y Estebenet, 2002) sugieren un potencial invasivo mucho menor. Las únicas características del ciclo de vida de *A. platae* que favorecerían el establecimiento de nuevas poblaciones son su gran longevidad y la iteroparidad, características estas últimas que son compartidas con poblaciones de *P. canaliculata* de zonas templadas (Estebenet y Martín, 2002). La baja viabilidad de las masas de huevos y el alto grado de canibalismo y predación a que estarían expuestas las masas de huevos subacuáticas posiblemente reducen su potencial invasivo, mientras que la

capacidad de almacenar esperma viable por varios meses (Capítulo 2) puede ser considerada una característica clave a favor del mismo (Jerde *et al.*, 2009). Por otra parte el rango óptimo de temperatura para *A. platae* estuvo entre 25 y 30°C, aunque mostró un amplio rango de tolerancia a la temperatura; sin embargo, posiblemente estos rangos no reflejen exactamente los de la especie ya que los individuos provienen de una única población y que además está ubicada en el límite austral de su distribución. Por otra parte, los bajos niveles de actividad a bajas temperaturas y la alta mortalidad a temperaturas elevadas podrían explicar el estrecho rango de distribución de esta especie en relación con *P. canaliculata* (Capítulo 4). Por lo mencionado anteriormente, aunque sin descartar el posible efecto por la estrecha variabilidad genética de la población original, el potencial de establecimiento de *A. platae* en áreas nuevas sería mucho menor que el observado para casi todas las especies de *Pomacea* (Cowie *et al.*, 2009) y posiblemente esté más cercano al potencial invasivo de *Marisa*, ya que esta presenta masas de huevos subacuáticas y gelatinosas (Demian y Ibrahim, 1971) y valores de fecundidad comparables con los de *A. platae* (Aufderheider *et al.*, 2006; Oehlmann *et al.*, 2000, 2006). Por otra parte, *A. platae* es más sensible a las temperaturas extremas y el rango natural de distribución es menor al de *P. canaliculata* (Hayes *et al.*, 2012) por lo que se esperaría una distribución menos extensa ante una posible translocación fuera de su rango nativo (Capítulo 4).

Aunque por todo lo mencionado anteriormente *A. platae* posea un potencial invasivo mucho menor al de *P. canaliculata*, la posibilidad de llegada a nuevas áreas es alta ya que especímenes del género *Asolene*, conocidos como caracoles cebra, son comercializados o intercambiados por acuaristas debido al llamativo bandeo de sus conchillas. Esta translocación por acción antrópica a nuevas

áreas, favorecería la llegada a zonas de climas tropicales o subtropicales en los que sí podrían asentarse. Si bien no cabría esperar un impacto de la intensidad del de *P. canaliculata*, podrían generar impactos a otra escala sobre especies y comunidades nativas, al competir por los recursos como el alimento o los sitios de oviposición, o al poner a disposición un nuevo recurso trófico como son las masas de huevos y los propios caracoles.

El aporte realizado en la presente tesis es fundamental para conocer aspectos de la biología de *A. platae*, especie perteneciente a uno de los géneros de ampuláridos sudamericanos muy poco estudiados. Este estudio en condiciones de laboratorio facilita la comprensión e interpretación del ciclo de vida en condiciones naturales. Por otra parte el estudio de la morfología, ecología y comportamiento son indispensables para intentar explicar las relaciones filogenéticas entre los géneros de ampuláridos y las presiones de selección a las que están sometidos. Es por esto que, aunque se han logrado importantes avances en esta tesis, es indispensable realizar este tipo de estudios en otras especies de ampuláridos para intentar comprender la evolución en esta familia.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ÅKERLUND G. 1969. Oxygen consumption of the ampullariid snail *Marisa cornuarietis* L. in relation to body weight and temperature. *Oikos*, 20(2): 529–533.
- ALBRECHT EA, CARREÑO N y CASTRO-VÁZQUEZ A. 1996. A quantitative study of copulation and spawning in the South American apple-snail *Pomacea canaliculata* Lamarck (Prosobranchia, Ampullariidae). *Veliger*. 39:142-147.
- ALBRECHT EA, CARREÑO N y CASTRO-VÁZQUEZ A. 1999. A quantitative study of environmental factors influencing the seasonal onset of reproductive behaviour in the South American apple-snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Journal of Molluscan Studies*, 65: 241–250.
- ALBRECHT EA, KOCH E, CARREÑO NB y CASTRO-VÁZQUEZ A. 2005. Control of the seasonal arrest of copulation and spawning in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Prosobranchia: Ampullariidae): differential effects of food availability, water temperature, and day length. *Veliger*, 47(3): 169-174.
- ANDREWS EB. 1964. The functional anatomy and histology of the reproductive system of some pilid gastropod molluscs. *Proceedings of the Malacological Society of London*, 36:121-140.
- ANDREWS EB. 1965. The functional anatomy of the mantle cavity, kidney and blood system of some pilids gastropods (Prosobranchia). *Journal of Zoology*, 146: 70–94.
- AUFDERHEIDE JR, WARBRITTON R, POUNDS N, FILE-EMPERADOR S, STAPLES C, CASPERS N y FORBES V. 2006. Effects of husbandry parameters on the life-history traits of the apple snail, *Marisa cornuarietis*: effects of

- temperature, photoperiod, and population density. *Invertebrate Biology*, 125(1): 9–20.
- AVACA MS, NARVARTE M, MARTÍN PR y VAN DER MOLEN S. 2013. Shell shape variation in the Nassariid *Buccinanops globulosus* in northern Patagonia. *Helgoland Marine Research*, 67(3): 567-577.
- BAHL K. 1928. On the reproductive processes and development of *Pila globosa* (Swainson). Part I. Copulation and oviposition. *Memoirs of the Indian Museum*, 9: 1-11.
- BARTELT N. 1970. Water and ion balance in the eggs of the freshwater snail, *Marisa cornuarietis*. Thesis of Master of Science, Coral Gables Florida (FL), Universidad de Miami.
- BAUR B. 1994. Parental care in terrestrial gastropods. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 50:5-14.
- BAUR B. 1998. Sperm competition in molluscs. In: Sperm Competition and Sexual Selection (Ed. por Birkhead TR & Møller AP), pp. 255–305. London: Academic Press.
- BERTHOLD T. 1989. Comparative conchology and functional morphology of the copulatory organ of the Ampullariidae (Gastropoda, Monotocardia) and their bearing upon phylogeny and paleontology. *Abhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg*, (NF), 28:141-164.
- BERTHOLD T. 1991. Vergleichende Anatomie, Phylogenie und Historische Biogeographie der Ampullariidae (Mollusca: Gastropoda). *Abhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg*, (NF), 29: 1–256.
- BIELER R. 1993. Ampullariid phylogeny – Book review and cladistics re-analysis. *The Veliger*, 36: 291-299.

- BIRKHEAD TR y MØLLER AP. 1998. *Sperm competition and sexual selection*. Academic Press. 826pp.
- BOOKSTEIN FL. 1997. *Morphometric tools for landmark data*. Cambridge University Press.
- BURELA S y MARTÍN PR. 2007. Nuptial feeding in the freshwater snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Malacologia*, 49: 465–470.
- BURELA S y MARTÍN PR. 2009. Sequential pathways in the mating behavior of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Malacologia*, 51:157-164.
- BURELA S y MARTÍN PR. 2011. Evolutionary and functional significance of lengthy copulations in a promiscuous apple snail, *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Journal of Molluscan Studies*, 77(1): 54-64.
- BURELA S y MARTÍN PR. 2014. Nuptial gifts in *Pomacea canaliculata* (Ampullariidae, Caenogastropoda): experimental and field evidence about their function. *Malacologia*, 57(2): 319-327.
- BURKY A. 1974. Growth and biomass production of an amphibious snail, *Pomacea urceus* (Müller), from the Venezuelan Savannah. *Proceedings of the Malacological Society of London*, 41: 127-143.
- CAMAMA CG, TORRES MAJ, MANTING MME, GOROSPE JJ y DEMAYO CG. 2014. Landmark-based geometric analysis in describing the shell of the freshwater gastropod *Vivipara angularis* (Gastropoda: Viviparidae) from Lake Dapao, Pualas, Lanao del Sur, Mindanao, Philippines. *Advances in Environmental Sciences-International Journal of the Bioflux*, 6(1): 44-54.

- CARLSSON NOL, BRÖNMARK C y HANSSON LA. 2004. Invading herbivory: the golden apple snail alters ecosystem functioning in Asian wetlands. *Ecology*, 85: 1575-1580.
- CASTELLANOS ZJA y FERNÁNDEZ D. 1976. La familia Ampullariidae en la República Argentina. En: R. A. Ringuelet (ed.), *Fauna de agua dulce de la República Argentina*, 15(1): 1-33. Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura, Buenos Aires.
- CATALÁN NMY, FERNÁNDEZ SN y WINIK BC. 2002. Oviductal structure and provision of eggs envelopes in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda, Prosobranchia, Ampullariidae). *Biocell*, 26: 91-100.
- CAZZANIGA NJ y ESTEBENET AL. 1984. Revisión y notas sobre los hábitos alimentarios de los Ampullariidae (Gastropoda). *Historia Natural*, 4: 213-224.
- CAZZANIGA NJ. 1990. Sexual dimorphism in *Pomacea canaliculata*. *Veliger*, 33: 390-394.
- COELHO ARA, CALADO GJP, DINIS MT. 2012 Freshwater snail *Pomacea bridgesii* (Gastropoda: Ampullariidae), life history traits and aquaculture potential. *AAFL Bioflux*, 5: 3.
- COHEN SC y STRATHMANN RR. 1996. Embryos at the edge of tolerance: effects of environment and structure of egg masses on supply of oxygen to embryos. *Biological Bulletin*, 190: 8-15.
- COWIE RH y JONES JS. 1985. Climatic selection on body colour in *Cepaea*. *Heredity*, 55: 261-267.
- COWIE RH. 2002. Apple snails (Ampullariidae) as agricultural pests: their biology, impacts and management. Pp. 145-192, en: G. M. Baker, ed., *Molluscs as crop pests*, CABI Publishing, Wallingford, New Zealand, 576 pp.

- COWIE RH y THIENGO SC. 2003. The apple snails of the Americas (Mollusca: Gastropoda: Ampullariidae: *Asolene*, *Felipponea*, *Marisa*, *Pomacea*, *Pomella*): a nomenclatural and type catalog. *Malacologia*, 45(1): 41–100.
- COWIE RH, HAYES KA y THIENGO SC. 2006. What are apple snails? Confused taxonomy and some preliminary resolution. Pp. 3-23, en: JOSHI RC y SEBASTIAN LS (eds.), *Global advances in ecology and management of golden apple snails*. Philippine Rice Research Institute, Nueva Ecija, 600 pp.
- COWIE R, DILLON R, ROBINSON D y SMITH J. 2009. Alien nonmarine snails and slugs of priority quarantine importance in the United States: a preliminary risk assessment. *American Malacological Bulletin*, 27(1/2):113-132.
- DEMIAN E y IBRAHIM A. 1971. The eggs masses, egg laying and mating behaviour of the snail *Marisa cornuarietis* (L.). *Bulletin of the Zoological Society of Egypt*, 23:1-12.
- DEMIAN E y IBRAHIM A. 1972. Sexual dimorphism and sex ratio in the snail *Marisa cornuarietis* (L.). *Bulletin of the Zoological Society of Egypt*, 24: 52-63.
- DEMIAN E y YOUSIF F. 1973. Embryonic development and organogenesis in the snail *Marisa cornuarietis* (Mesogastropoda: Ampullariidae). *Malacologia*, 12(1): 123–150.
- DILLON RT. 2003. The inheritance of golden, a shell color variant of *Marisa cornuarietis*. *Malacological Review*, 31/32: 155-157.
- DREON MS, HERAS H y POLLERO RJ. 2006. Biochemical composition, tissue origin and functional properties of egg perivitellins from *Pomacea canaliculata*. *Biocell*, 30(2):359-365.

- DREÓN MS, ITUARTE S, HERAS H. 2010. The role of the proteinase inhibitor ovorubin in apple snail eggs resembles plant embryo defense against predation. PLoS One 5: e15059.
- DREÓN MS, FRASSA MV, CEOLÍN M, ITUARTE S, QIU J. 2013. Novel animal defenses against predation: a snail egg neurotoxin combining lectin and pore-forming chains that resembles plant defense and bacteria attack toxins. PLoS One 8 (5): e63782.
- DRYDEN IL y MARDIA KV. 1998. Statistical shape analysis (Vol. 4). Chichester: Wiley.
- ESTEBENET AL y CAZZANIGA NJ. 1992. Growth and demography of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) under laboratory conditions. *Malacological Review*, 25: 1–12.
- ESTEBENET AL y CAZZANIGA NJ. 1993. Egg variability and the reproductive strategy of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Apex*, 8(4): 129-138.
- ESTEBENET AL. 1998. Allometric growth and insight on sexual dimorphism in *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Malacologia*, 39(1-2): 207-213.
- ESTEBENET AL y CAZZANIGA NJ. 1998. Sex related differential growth in *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Journal of Molluscan Studies*, 64: 119–123.
- ESTEBENET AL y PIZANI NV. 1999. Elección de pareja, cópula y desove en *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). IV Congreso Latinoamericano de Malacología (Resúmenes): 91, Coquimbo, Chile.

- ESTEBENET AL y MARTÍN PR, 2002, *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae): Life-history traits and their plasticity. *Biocell*, 26: 83–89.
- ESTEBENET AL y MARTÍN PR. 2003. Shell interpopulation variation and its origin in *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) from Southern Pampas, Argentina. *Journal of Molluscan Studies*, 69(4), 301-310.
- ESTEBENET AL, MARTÍN PR y BURELA S. 2006. Conchological variation in *Pomacea canaliculata* and other South American Ampullariidae (Caenogastropoda, Architaenioglossa). *Biocell*, 30(2): 329-335.
- FANG L, WONG PK, LIN L, LAN C y QIU JW. 2010. Impact of invasive apple snails in Hong Kong on wetland macrophytes, nutrients, phytoplankton and filamentous algae. *Freshwater Biology*, 55(6): 1191-1204
- FISHER RA. 1930. The Genetical Theory of Natural Selection. Clarendon Press, Oxford.
- FORBES VE, SELCK H, PALMQVIST A, AUFDERHEIDE J, WARBRITTON R, POUNDS N y CASPERS N. 2007. Does bisphenol a induce superfeminization in *Marisa cornuarietis*? Part I: Intra-and inter-laboratory variability in test endpoints. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(3): 309-318.
- FRASSA MV, CEOLÍN M, DREON MS, HERAS H. 2010. Structure and stability of the neurotoxin PV2 from the eggs of the apple snail *Pomacea canaliculata*. *Biochim Biophys Acta* 1804: 1492–1499.
- FREIBURG MW y HAZELWOOD DH. 1977. Oxygen consumption of two amphibious snails: *Pomacea paludosa* and *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia: Ampullariidae). *Malacologia*, 16: 541–548.

- GALAN GL, PORQUIS HC y BULASA MAR. 2015. Shell Band Pattern of Golden Apple Snail (*Pomacea canaliculata*, Lamarck) in Selected Aquatic Habitats. *International Journal of Environmental Science and Development*, 6(8): 625-628.
- GAMARRA-LUQUES C, WINIK BZC, VEGA IA, ALBRECHT EA, CATALÁN NMY, CASTRO-VÁZQUEZ A. 2006. An integrative view to structure, function, ontogeny and phylogenetical significance of the male genital system in *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Biocell*, 30:345-357.
- GETTYS LA, HALLER WT, MUDGE CR y KOSCHNICK TJ. 2008. Effect of temperature and feeding preference on submerged plants by the island apple snail, *Pomacea insularum* (d'Orbigny, 1839) (Ampullariidae). *The Veliger*, 50: 248-254.
- GURDEBEKE P y VAN BOCXLAER B. 2013. Conchological differentiation in an ongoing radiation of *Lanistes* gastropods from ancient Lake Malawi: how adaptive is shell morphology?. En: Geologica Belgica Jongerendag: *Journée des Jeunes* 16(1-2): 118-119.
- HANNING GW. 1979. Aspects of reproduction in *Pomacea paludosa* (Mesogastropoda: Pilidae). MS Thesis, Florida State Univ, Tallahassee, FL. 138 pp.
- HAYES KA, JOSHI RC, THIENGO SC y COWIE RH. 2008. Out of South America: multiple origins of non-native apple snails in Asia. *Diversity and Distributions*, 14, 701-712.
- HAYES KA, COWIE RH y THIENGO SC. 2009a. A global phylogeny of apple snails: Gondwanan origin, generic relationships, and the influence of outgroup choice (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 98(1), 61-76.

- HAYES KA, COWIE RH, JØRGENSEN A, SCHULTHEIß R, ALBRECHT C y THIENGO SC. 2009b. Molluscan models in evolutionary biology: apple snails (Gastropoda: Ampullariidae) as a system for addressing fundamental questions. *American Malacological Bulletin*, 27: 47–58.
- HAYES KA, COWIE RH, THIENGO SC y STRONG EE. 2012 Comparing apples with apples: clarifying the identities of two highly invasive Neotropical Ampullariidae (Caenogastropoda). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 166: 723–753.
- HAYES KA, BURKS RL, CASTRO-VÁZQUEZ A, DARBY PC, HERAS H, MARTÍN PR, QIU J-W, THIENGO SC, VEGA IA, WADA T, YUSA Y, BURELA S, CADIerno MP, CUETO JA, DELLAGNOLA FA, DREON MS, FRASSA MV, GIRAUD-BILLOUD M, GODOY MS, ITUARTE S, KOCH E, MATSUKURA K, PASQUEVICH Y, RODRIGUEZ MC, SAVEANU L, SEUFFERT ME, STRONG EE, SUN J, TAMBURI NE, TIECHER MJ, TURNER RL, VALENTINE-DARBY PL y COWIE RH. 2015. Insights from an integrated view of the biology of apple snails (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Malacologia*, 58 (1-2). EN PRENSA.
- HEILER KCM, SCHULTHEIß R, GEERTZ T y ALBRECHT C. 2007. Caught in the act: insights into the sex life of *Lanistes ovum* (Gastropoda: Ampullariidae). *Antwerp: World Congress of Malacology, Abstracts*, p. 94.
- HEILER KCM, VON OHEIMB PV, EKSCHMITT K y ALBRECHT C. 2008. Studies on the temperature dependence of activity and on the diurnal activity rhythm of the invasive *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Mollusca*, 26:73-81.
- HERAS H, GARIN CF y POLLERO RJ. 1998. Biochemical composition and energy sources during embryo development and in early juveniles of the snail *Pomacea canaliculata* (Mollusca: Gastropoda). *Journal of Experimental Zoology*, 208(6):375-383.

- HIGGINSON DM y PITNICK S. 2011. Evolution of intra-ejaculate sperm interactions: do sperm cooperate?. *Biological Reviews*, 86 (1): 249-270.
- HOGDSON, AN. 1997. Paraepermatogenesis in gastropod molluscs. *Invertebrate Reproduction and Development*, 31:31-38.
- HOOVER MW. 1955. Some effects of temperature on the growth of southern peas. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 66: 308-312.
- HORGAN FG, STUART AM y KUDAVIDANAGE EP. 2014. Impact of invasive apple snails on the functioning and services of natural and managed wetlands. *Acta Oecologica*, 54: 90-100.
- HORN K, JOHNSON S, BOLES K, MOORE A, SIEMANN E y GABLER C. 2008. Factors affecting hatching success of golden apple snail eggs: effects of water immersion and cannibalism. *Wetlands*, 28(2):544-549.
- JAHAN MS, AKTER MS, SARKER MM, RAHMAN MR y PRAMANIK MN. 2001. Growth ecology of *Pila globosa* (Swainson)(Gastropoda: Pilidae) in simulated habitat. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4(5): 581-584.
- JERDE C, BAMPFYLDE C y LEWIS M. 2009. Chance establishment for sexual, semelparous species: overcoming the Allee effect. *American Naturalist*, 173:734-746.
- JORDAENS K, VAN RIEL P, GEENEN S, VERHAGEN R y BACKELJAU T. 2001. Food-induced body pigmentation questions the taxonomic value of colour in the self-fertilizing slug *Carinarion* spp. *Journal of Molluscan Studies*, 67(2): 161-167.
- KEAWJAM RS. 1986. The apple snails of Thailand: distribution, habitats and shell morphology. *Malacological Review*, 19: 61-81.
- KEAWJAM RS. 1987. The apple snails of Thailand: aspects of comparative anatomy. *Malacological Review*, 20: 69-89.

- KERR PF. 1965. Optical Mineralogy. 3rd ed. New York (NY): McGraw-Hill Book Company.
- KLINGENBERG CP. 2011. MORPHOJ: an integrated software package for genetic morphometrics. *Molecular Ecology*, 11, 353-357.
- KOCH E, WINIK BZC, CASTRO-VÁZQUEZ A. 2009. Development beyond the gastrula stage and digestive organogenesis in the snail *Pomacea canaliculata* (Architaenioglossa – Ampullariidae). *Biocell*, 33:49-65.
- KOZMINSKY E. 2014. Inheritance of the background shell color in the snails *Littorina obtusata* (Gastropoda, Littorinidae). *Russian Journal of Genetics*, 50(10): 1038-1047.
- KREBS JR y DAVIES NB. 1985. An introduction to behavioural ecology. *Blackwell Scientific Publications*. Oxford, London, 292 pp.
- LARDIES MA y FERNÁNDEZ M. 2002. Effect of oxygen availability in determining clutch size in *Acanthia monodon*. *Marine Ecology Progress Series*, 239: 139-146.
- LELE SR y RICHTSMEIER JT. 2001. An invariant approach to statistical analysis of shapes. CRC Press. .
- LÉON JA, HAYES KA y COWIE RH. 2014. Ampullariidae revisionary systematics: clarifying the taxonomic status of *Asolene platae* (Maton, 1811) and *Asolene pulchella* (Anton, 1838). Póster. Simposio gasterópodos terrestres y de agua dulce, *Mollusca 2014*, junio 2014, Ciudad de México.
- LINCOLN R, BOXSHALL G, CLARK P. 1998. Dictionary of ecology, evolution and systematics. *Cambridge University press*. 358 pp.
- LOWE S, BROWNE M, BOUDJELAS S y DE POORTER M. 2000. 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database (p. 12). Auckland, New Zealand: Invasive Species Specialist Group

- LUM-KONG A y KENNY JS. 1989. The reproductive biology of the ampullariid snail *Pomacea urceus* (Müller). *Journal of Molluscan Studies*, 55(1), 53-65.
- LV S, ZHANG Y, LIU H-X, HU L, YANG K, STEINMANN P, CHEN Z, YING Z, JU W, UTZINGER J y ZHOU X. 2009. Invasive Snails and an Emerging Infectious Disease: Results from the First National Survey on *Angiostrongylus cantonensis* in China. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(2): e368. doi:10.1371/journal.pntd.0000368
- MAROIS R y CROLL R. 1991. Hatching asynchrony within the egg mass of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 19(2):139-146.
- MARTÍN SM. 1980. Contribución al estudio histológico del complejo peniano de algunas ampularias argentinas. *Neotropica*, 26(75):47-52.
- MARTÍN SM. 1984. Estudio del complejo penial de *Asolene platae* (Maton) (Mollusca Gasteropoda). *Neotropica*, 30(83):107-110.
- MARTÍN SM. 1987. Ciclo reproductivo de *Asolene platae* Maton (Gastropoda: Ampullariidae) del arroyo Miguelin (Punta Lara, Buenos Aires). *Neotropica*, 33(89):19-28.
- MARTÍN SM. 1988. Morfología genital de *Asolene (Asolene) platae* (Maton) (Mollusca: Gastropoda: Ampullariidae). *Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral*, 19(2):209-213.
- MARTÍN SM. 2002. Características de los desoves de *Pomacea scalaris* (d'Orbigny, 1835) y *Asolene platae* (Maton 1809) Hylton Scott, 1957 (Mollusca, Gastropoda, Ampullariidae). *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay*, 8(76-77):149-153.

- MARTÍN PR y ESTEBENET AL. 2002. Interpopulation variation of life-history traits in *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) in southwestern Buenos Aires Province, Argentina. *Malacologia*, 44: 153-163.
- MARTÍN PR; BURELA S, TIECHER MJ. 2013. Insights into the natural history of Ampullariids from the Lower Río de la Plata Basin, Argentina. *Tentacle*, 21: 11-13
- MICHELSON EH. 1961. On the generic limits in the family Pilidae (Prosobranchia: Mollusca). *Breviora*, 133:1-10.
- MINTON RL y WANG LL. 2011. Evidence of sexual shape dimorphism in *Viviparus* (Gastropoda: Viviparidae). *Journal of Molluscan Studies*, 77: 315-317.
- MITTON JB. 1977. Shell color and pattern variation in *Mytilus edulis* and its adaptive significance. *Chesapeake Science*, 18: 387-390.
- MORAN AL y WOODS HA. 2007. Oxygen in egg masses: interactive effects of temperature, age, and egg-mass morphology on oxygen supply to embryos. *The Journal of Experimental Biology*, 210: 722–731.
- NUTTONSON MY. 1958. Wheat-climate relationships and the use of phenology in ascertaining the phenothermal requirements of wheat. *American Institute of Crop Ecology*, Washington,D.C., 388 pp
- OEHLMANN J, SCHULTE-OEHLMANN U, TILLMANN M y MARKERT B. 2000. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology*, 9(6): 383-397.
- OEHLMANN J, SCHULTE-OEHLMANN U, BACHMANN J, OETKEN M, LUTZ I, KLOAS W y TERNES TA. 2006. Bisphenol A induces superfeminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda: Prosobranchia) at

- environmentally relevant concentrations. *Environmental Health Perspectives*, 114(1): 127-133.
- PERERA G y WALLS JG. 1996. *Apple snails in the aquarium*. TFH Publications, Inc., Neptune City, New Jersey, 121 pp.
- PIZANI NV, ESTEBENET AL y MARTÍN PR. 2005. Effects of submersion and aerial exposure on clutches and hatchlings of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *American Malacological Bulletin*, 20: 55-63.
- POINTIER JP y JOURDANE J. 2000. Biological control of the snail hosts of schistosomiasis in areas of low transmission: the example of the Caribbean area. *Acta Tropica*, 77(1): 53-60.
- POINTIER JP y DAVID P. 2004. Biological control of *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host of schistosomes, by *Marisa cornuarietis* in ponds of Guadeloupe: long-term impact on the local snail fauna and aquatic flora. *Biological Control*, 29(1): 81-89.
- RANJAH AR. 1942. The embryology of the Indian applesnail, *Pila globosa* (Swainson) (Mollusca, Gastropoda). *Records of the Indian Museum*, 40: 217-322.
- RAWLINGS TA, HAYES KA, COWIE RH y COLLINS TM. 2007. The identity, distribution, and impacts of non-native apple snails in the continental United States. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 97.
- ROHLF FJ. 1993. Relative warp analysis and an example of its application to mosquito wing. Pp. 131-159, en: Marcus, L.F., Bello, E. y García Valdecasas, A. (Eds), *Contributions to morphometrics*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid,
- ROHLF FJ. 2010. TPSDig2, version 2.16. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.

- ROHLF FJ y SLICE D. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology*, 39, 40-59
- SACHWATKIN V. 1920. Das urogenitalsystem von *Ampullaria gigas* Spix. *Acta zoologica*, 1(1-2): 67-130.
- SAVEANU L y MARTÍN PR. 2013. Pedal surface collecting as an alternative feeding mechanism of the invasive apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Journal of Molluscan Studies*, 79: 11–18.
- SAVEANU L y MARTÍN PR. 2014. Egg cannibalism in *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, ampullariidae) from southern pampas: an alternative trophic strategy? *Malacologia*, 57 (2): 341-351
- SAWASDEE B y HEINZ RK. 2010. Metal sensitivity of the embryonic development of the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia). *Ecotoxicology*, 19(8): 1487-1495.
- SCHULTE-OEHLMANN U, FIORONI P, OEHLMANN J y STROBEN E. 1994. The genital system of *Marisa cornuarietis* (Gastropoda, Ampullariidae). A morphological and histological analysis. *Zoologische Beiträge*, 36(1): 59-81.
- SELCK H, AUFDERHEIDE J, POUNDS N, STAPLES C, CASPERS N y FORBES V. 2006. Effects of food type, feeding frequency, and temperature on juvenile survival and growth of *Marisa cornuarietis* (Mollusca: Gastropoda). *Invertebrate Biology*, 125(2): 106–116.
- SEUFFERT ME y MARTÍN PR. 2009. Influence of temperature, size and sex on aerial respiration of on *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) from southern Pampas, Argentina. *Malacologia*, 51: 191–200.
- SEUFFERT ME y MARTÍN PR. 2010. Dependence on aerial respiration and its influence on microdistribution in the invasive freshwater snail *Pomacea*

- canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Biological Invasions*, 12: 1695–1708.
- SEUFFERT ME, BURELA S y MARTÍN PR. 2010. Influence of water temperature on the activity of the freshwater snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae) at its southernmost limit (Southern Pampas, Argentina). *Journal of Thermal Biology*, 35: 77–84.
- SEUFFERT ME, SAVEANU L y MARTÍN PR. 2012. Threshold temperatures and degree-day estimates for embryonic development of the invasive apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Malacologia*, 55(2): 209–217.
- SEUFFERT ME y MARTÍN PR. 2013., Juvenile growth and survival of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae) reared at different constant temperatures. *SpringerPlus*, 2: 312.
- SIMONE LRL. 2004. Comparative morphology and phylogeny of representatives of the superfamilies of Architaenioglossans and the Annulariidae (Mollusca, Caenogastropoda). *Arquivos do Museu Nacional*, Rio de Janeiro, 62(4): 387-504.
- SMITH JW. 2006. Ampullariidae pathways. Pp. 113–120, en: R. C. JOSHI y L. S. SEBASTIAN (Eds.), *Global advances in ecology and management of golden apple snails*. Philippine Rice Research Institute, Nueva Ecija, Philippines, 600 pp.
- TABUGO SRM, TORRES MAJ y DEMAYO CG. 2010. Relative warp and correlation analysis based on distances of the morphological shape of the shell of the golden apple snail *Pomacea canaliculata* from Iligan City, Philippines. International Conference on Environmental Engineering and Applications, 10-12 de Septiembre de 2010, Singapore. Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), pp. 81-85.

- TAMBURI NE y MARTÍN PR. 2009a. Reaction norms of size and age at maturity of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) under a gradient of food deprivation. *Journal of Molluscan Studies*, 75: 19-26.
- TAMBURI NE y MARTÍN PR. 2009b. Feeding rates and food conversion efficiencies of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Malacologia*, 51: 221 -232.
- TAMBURI NE y MARTÍN PR. 2012. Effect of food availability on morphometric and somatic indices of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Malacologia*, 55: 33-41.
- TAMBURI NE y MARTÍN PR. 2013. Allometric and trophic effects on shell morphology of *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae) from a geometric morphometrics viewpoint. *Molluscan Research*, 33(4): 223-229.
- TOMPA A. 1980. Studies on the reproductive biology of gastropods: part III. Calcium provision and the evolution of terrestrial eggs among gastropods. *Journal of Conchology*, 30(3):145-154.
- TREVELYAN GA y CHANG ES. 1987. Light-induced shell pigmentation in post-larval *Mytilus edulis* and its use as a biological tag. *Marine ecology progress series*, 39 (2): 137-144.
- TURNER RL y MCCABE C. 1990. Calcium source for protoconch formation in the Florida apple snail, *Pomacea paludosa* (Prosobranchia: Pilidae): more evidence for physiologic plasticity in the evolution of terrestrial eggs. *Veliger*, 33:185-189.
- TURNER RL. 1998. Effects of submergence on embryonic survival and developmental rate of the Florida applesnail, *Pomacea paludosa*: implications for egg predation and marsh management. *Florida Scientist*, 61:118-129.

- VOGLER RE, BELTRAMINO AA, GUTIÉRREZ-GREGORIC DE, PESO JG, GRIFFIN M y RUMI A. 2012. Threatened Neotropical mollusks: analysis of shape differences in three endemic snails from High Paraná River by geometric morphometrics. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83(4): 1045-1052.
- WINIK BZC, CATALÁN NMY y SCHLICK OC. 2001. Genesis of the apyrene sperm in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae): an ultrastructural study. *Journal of Molluscan Studies*, 67:81-93.
- WINIK BZC, CATALÁN M, GAMARRA-LUQUES C, CASTRO-VÁZQUEZ A. 2009. Ectaquasperm-like parasperm in an internally fertilizing gastropod. *Invertebrate Biology*, 128:223-223.
- YANG S, LOGAN J y COFFEY DL. 1995. Mathematical formulae for calculating the base temperature for growing degree days. *Agricultural and Forest Meteorology*, 74: 61-74.
- YUSA Y y SUZUKI Y. 2003. A snail with unbiased population sex ratios but highly biased brood sex ratios. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences.*, 270(1512): 283-288.
- YUSA Y. 2004. Inheritance of colour polymorphism and the pattern of sperm competition in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae).
- YUSA Y. 2006 Genetics of sex-ratio variation inferred from parent-offspring regressions and sib correlations in the apple snail *Pomacea canaliculata*. *Heredity* 96 (1), 100-105.
- YUSA Y. 2007a. Causes of variation in sex ratio and modes of sex determination in the Mollusca-an overview. *American Malacological Bulletin*, 23 (1): 89-98.
- YUSA Y 2007b. Nuclear sex-determining genes cause large sex-ratio variation in the apple snail *Pomacea canaliculata*. *Genetics*, 175 (1), 179-184.

ZELAYA DG. 1999. Dinámica poblacional de *Asolene puelchella* (Anton 1839) en el Lago Regatas, Ciudad de Buenos Aires. Taller de Biología de Ampullariidae, Uspallata, Mendoza, 15-19 de diciembre de 1999.