

Aproximación morfológica y molecular al conocimiento de las ofiuras (Echinodermata: Ophiuroidea) en el Parque Nacional Marino Las Baulas (Pacífico Norte, Costa Rica)

Andrea Varela-Sánchez¹, José Templado^{1*} & Annie Machordom¹

1. Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN-CSIC). José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid, España; varelasaa@gmail.com, templado@mncn.csic.es, annie@mncn.csic.es

* Correspondencia

Recibido 11-X-2019. Corregido 18-III-2020. Aceptado 23-V-2020.

ABSTRACT: Morphological and molecular approaches to the study of ophiuroids (Echinodermata: Ophiuroidea) at Las Baulas Marine National Park (North Pacific, Costa Rica). **Introduction:** Information on the class Ophiuroidea is very scarce, despite it consisting of the highest number of species within the phylum Echinodermata, with up to 2 100 species. In particular, there are hardly any study focused specifically to ophiuroids found along the Pacific coast of Costa Rica. **Objective:** Morphological and genetic characterization of ophiuroids of the shallow intertidal and sublittoral areas of Las Baulas Marine National Park (Pacific coast of Costa Rica). **Methods:** Sampling was conducted between January and April of 2018 at seven locations: Punta del Morro, Playa Carbón, Playa Ventanas, Playa Grande, Playa Tamarindo Ciudad, Playa Tamarindo and Playa Langosta. A total of 214 ophiuroids were characterized using taxonomic keys and original descriptions and a molecular analysis of the mitochondrial *Cytochrome oxidase I* (COI) gene. **Results:** An analysis of morphological and genetic characters indicates that 11 species are present in the study site. Four may represent new species, nine constitute new records for the area and one (*Ophiophragmus* aff. *stellatus*) is recorded in Costa Rica for the first time. Additionally, juvenile individuals of different species were identified, and two cryptic species were detected. **Conclusions:** According to the molecular analysis, COI is useful to delimit ophiuroid species and to establish phylogenetic relationships at lower (genera and species) but not higher taxonomic levels. This study also provides images and morphological remarks for future comparative studies.

Key words: Echinodermata; barcode; ophiuroids; molecular identification; Eastern Tropical Pacific.

Varela-Sánchez, A., Templado, J., & Machordom, A. (2020). Aproximación morfológica y molecular al conocimiento de las ofiuras (Echinodermata: Ophiuroidea) en el Parque Nacional Marino Las Baulas (Pacífico Norte, Costa Rica). *Revista de Biología Tropical*, 68(3), 803-817.

Costa Rica es reconocida por su impresionante riqueza biológica (Obando-Acuña, 2002; MINAE – SINAC - CANAGEBIO – FONAFIFO, 2018). Sin embargo, mientras la biodiversidad terrestre ha sido por lo general bien documentada, el conocimiento de la contraparte marina es incompleto, habiéndose centrado mayoritariamente en el estudio de las tortugas marinas (Alvarado, Herrera, Corrales,

Asch, & Paaby, 2011; Santidrián-Tomillo et al., 2017). Una recopilación de toda la información existente hasta la fecha sobre la biodiversidad marina del país se recoge en la monografía de Wehrtmann y Cortés (2009), la cual constituye una importante base de partida para cualquier investigación que se desarrolle en este ámbito.

Los equinodermos son uno de los principales componentes de la macrofauna. En

la mayor parte de los ecosistemas bentónicos forman parte importante de las cadenas tróficas del océano y ocupan los más diversos roles funcionales (Hughes, Brunner, Cook, Kelly, & Wilson, 2012). A pesar de ello, su conocimiento es todavía muy incipiente en la Región Panámica (Alvarado, Solís-Marín, & Ahearn, 2010; Alvarado, Barraza, & Sancho-Mejías, 2013) y particularmente deficiente en el caso de las ofiuras. Igualmente, son muy pocas las publicaciones dedicadas a los equinodermos de la vertiente pacífica de Costa Rica (Alvarado & Fernández, 2005; Alvarado & Chiriboga, 2008; Alvarado & Cortés, 2009; Azofeifa et al., 2017), ninguna referida específicamente a los Ophiuroidea (Alvarado & Fernández, 2005). Los datos aportados sobre este grupo por Alvarado et al. (2017) proceden de la exhaustiva revisión de los ejemplares depositados en distintos museos y en diversas bases de datos.

Sorprendentemente, a pesar de su importancia ecológica como reductores de la eutrofización (Giraldi et al., 2017) y bioindicadores de la calidad del agua (Hughes, 1998) entre otros, y de constituir la clase de equinodermos más diversa, el número de publicaciones sobre este grupo es muy inferior con respecto a las clases Asteroidea (estrellas de mar) o Echinoidea (erizos). Lo mismo sucede respecto a la información sobre secuencias nucleotídicas disponible en GenBank. Sin duda, ello se debe a la dificultad en la identificación de las especies. De hecho, la taxonomía a nivel específico de los Ophiuroidea sigue siendo en la actualidad muy deficiente e inestable. Por lo general, la descripción de nuevas especies en el pasado se ha basado en escasos caracteres, principalmente de las estructuras esqueléticas externas, aunque en los últimos años se ha abordado una redefinición de los distintos caracteres morfológicos y discutido su utilidad taxonómica (Martynov, 2010; Thuy & Stöhr, 2016). Por otro lado, la mayor parte de las diagnósticos de las especies se basa en las fases adultas, mientras que las fases juveniles solo se han descrito en apenas medio centenar de especies, a pesar de que los caracteres de los juveniles difieren considerablemente de los de los adultos (Stöhr, 2005).

La clase Ophiuroidea comprende alrededor de 2 100 especies reconocidas como válidas (Stöhr, O'Hara, & Thuy, 2012) repartidas en 33 familias actuales de acuerdo con la reciente clasificación propuesta por O'Hara, Stöhr, Hugall, Thuy y Martynov (2018), aunque se considera que todavía quedan por describir algunos centenares de ellas. En cualquier caso, esta clasificación se encuentra actualmente en fase de total reestructuración (Thuy & Stöhr, 2016; O'Hara, Hugall, Thuy, Stöhr, & Martynov, 2017; O'Hara et al., 2018). Son muy pocos los estudios moleculares realizados centrados en niveles taxonómicos inferiores, algunos de los cuales muestran la existencia de conjuntos de especies crípticas (e.g. O'Hara, Byrne, & Cisternas, 2004; Stöhr, Boissin, & Chenuil, 2009; Naughton, O'Hara, Appleton, & Cisternas, 2014; Boissin, Egea, Féral, & Chenuil, 2015) que requieren de una adecuada diferenciación y descripción morfológica.

El presente estudio se ha centrado en los Ophiuroidea del litoral del Parque Nacional Marino las Baulas (PNMLB). La caracterización ecológica de su sector marino aportada por el proyecto BIOMARCC-SINAC-GIZ (2015) de apoyo al Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC), constituye la única aportación al conocimiento de la biodiversidad marina de este Parque. En este proyecto se destaca la alta diversidad de equinodermos y, entre ellos, se mencionan dos especies de ofiuras: *Ophiocoma aethiops* y *Ophiocoma alexandri*, ahora considerada como *Ophiocomella alexandri* (O'Hara et al. 2018). Asimismo, Alvarado y Fernández (2005) señalaron que las ofiuras eran el grupo de equinodermos más abundante en el Parque Nacional Marino Ballena (Pacífico, Costa Rica) y señalaron que estas dos últimas especies eran las más frecuentes.

Los objetivos concretos que se persiguen con este estudio son: i) caracterizar morfológica y genéticamente las especies de ofiuras de la franja intermareal del PNMLB, ii) establecer la posición filogenética de las especies recolectadas mediante las secuencias del marcador mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I

(COI) y iii) testar la utilidad de dicho marcador a nivel de género y especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio: El muestreo se realizó en el PNMLB, ubicado en la provincia de Guanacaste, en el Pacífico Norte de Costa Rica. Este Parque se extiende aproximadamente 22 km sobre el litoral marino hasta una cota batimétrica de 40 m, abarcando las playas Punta del Morro, Carbón, Ventanas, Grande, Tamarindo y Langosta, con manglares en Tamarindo y Ventanas. Incluye bosques, playas, algunos acantilados, zonas intermareales rocosas, esteros y manglares. La totalidad del parque cubre una superficie de 26 788 ha, de la cual el 97 % (26 056.58 ha) es área marina (BIOMARCC-SINAC-GIZ 2015). La conservación de este parque nacional marino es importante, dado que figura como un lugar de anidamiento de la tortuga baula o laúd (*Dermochelys coriacea*), especialmente en Playa Grande (Nordmoe et al., 2004; BIOMARCC-SINAC-GIZ, 2015). La zona intermareal donde se desarrolló el muestreo en este trabajo está influenciada por mareas semidiurnas con un rango de amplitud de hasta unos tres metros (Lizano, 2006) y se divide en dos subsistemas: la zona intermareal rocosa y la zona intermareal arenosa (BIOMARCC-SINAC-GIZ, 2015).

Toma de muestras: El periodo de recolección se extendió entre enero y abril de 2018 en la zona intermareal. El muestreo se llevó a cabo durante la marea baja, abarcando los diferentes hábitats presentes (sustrato rocoso, arenoso y arrecife muerto). Se realizó una identificación preliminar de los ejemplares observados y se establecieron 12 morfoespecies, etiquetadas como Opae, OpA, OpB, OpC, OpD, OpE, OpF, OpG, OpH, OpI, OpJ y OpK, según se iban encontrando. Se extrajeron fragmentos de brazo de cada ofiura, así como individuos completos de cada morfotipo considerado. El fragmento de brazo cortado no fue mayor de la mitad de éste, asegurando así la supervivencia de los ejemplares de estudio. Se recolectaron

finalmente muestras de 214 ejemplares en total (Apéndice 1), de los cuales 15 fueron individuos completos. Empezando por el área más septentrional del parque, en Punta del Morro se tomaron 17 muestras, en Playa Carbón y Playa Grande, 33, en Playa Ventanas, 33. En Playa Tamarindo se hizo una distinción entre dos zonas para la recolección, debido a que una de ellas tiene gran aglomeración de turistas por encontrarse en área hotelera (denominada en este estudio Playa Tamarindo Ciudad). En esta playa se recolectaron muestras de 37 ejemplares, y en la zona más alejada, sin aglomeración (denominada en este estudio simplemente como Playa Tamarindo), 26. Por último, en Playa Langosta, ubicada más al sur del PNMLB, se obtuvieron 35 muestras. Así, el muestreo se desarrolló en siete puntos del parque, para abarcar toda su línea de costa. De cada ofiura se tomó una fotografía, tanto dorsal como ventral, antes de su liberación al mar o de fijar los individuos completos, tomando además las coordenadas de cada punto de colecta (Apéndice 2). Las muestras se fijaron al momento en etanol absoluto. Todos los datos de la recolección se almacenaron en la base de datos EPICOLLECT. Las muestras se depositaron en el Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid (MNCN-CSIC) y se conservan en etanol absoluto a 5 °C.

Identificación morfológica: Para las identificaciones morfológicas de los individuos se utilizó un microscopio estereoscópico LEICA MZ16 A, con toma de fotografías de los principales caracteres diagnósticos, y las claves taxonómicas y descripciones existentes (principalmente de Clark, 1948; Booloottian & Leighton, 1966; Brusca, 1980; Granja-Fernández et al., 2014; Hendler, 1996; McClendon, 1909; Nielsen, 1932 y Ziesennehenne, 1940, entre otros). Se atendió a los caracteres diagnósticos tradicionales (ver Hendler, 1996) redefinidos y actualizados por Stöhr et al. (2012): disco dorsal, escudos radiales, placas primarias, placas dorsales, placas accesorias y placas laterales de los brazos, espinas del brazo, disco ventral, hendiduras bursátiles, mandíbulas, papilas

orales, dientes, escudo oral, escudos adorales, placas ventrales de los brazos y escamas tentaculares. Para la nomenclatura específica se han seguido los criterios de Stöhr, S., O'Hara, T., & Thuy, B. (2020) y para su clasificación la propuesta reciente de O'Hara et al. (2018).

Análisis moleculares: A partir de segmentos de los brazos se obtuvo el tejido para la extracción del ADN mediante el kit de extracción BioSprint 15 DNA Blood Kit (Qiagen) de acuerdo con su protocolo, con una extensión del tiempo de homogeneización con proteína K de alrededor de 18 horas y utilización de ARNasa. Se amplificaron fragmentos del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI). Los cebadores utilizados fueron CO1a-H (5'-TGT ATA RGC GTC TGG RTA GTC-3'), CO1f-L (5'- CCT GCA GGA GGR GGA GAY CC-3') modificados de Palumbi et al. (2002) y COI-Of-Rint (5'-TGA ATA ACG ACG TGG CAT TC-3') diseñado en este estudio. La pareja de cebadores CO1f-L /CO1a-H genera secuencias de 649 pares de bases (pb), mientras que la pareja CO1f-L /COI-Of-Rint genera secuencias de 629 pb, en ambos casos tras eliminar la región de los cebadores. Cada amplificación se llevó a cabo en un volumen de 50 µl con 1 o 2 µl de ADN diluido de 20 a 50 veces, con 5 µl de tampón 10x con MgCl₂, 1 µl de dNTPs 40 mM, 1 µl de cada cebador 10 µM y 0.3 µl de Taq polimerasa de 5 U/µl. Las condiciones de las PCR fueron las siguientes: 2 min a 94 °C, seguido por un ciclo de desnaturalización de 45 s a 94 °C, anillamiento de 45 s a 45 °C, elongación de 1 min a 72 °C y un post-ciclo de 10 min a 72 °C. Los ciclos de desnaturalización, anillamiento y elongación se repitieron 40 veces. Los fragmentos de ADN amplificados se purificaron cortando y filtrando las regiones de las bandas amplificadas tras su migración en un gel de agarosa al 1.5 % en TA (TRIS-acético, pH = 8) y se enviaron para su secuenciación a Secugen S. L. (Madrid). Mediante el programa Sequencher 4.1.4 se editaron las secuencias obtenidas.

Análisis filogenéticos: En primer lugar, para comprobar que el gen COI es

filogenéticamente informativo para este grupo, se realizó un test de saturación a partir de los datos de divergencia (% entre cada par de individuos y las transiciones y transversiones en cada posición del codón obtenidos con PAUP* (Swofford, 2001). Se creó una tabla en Excel con esos datos y se generaron los gráficos para los cambios de cada posición del codón a fin de comprobar si existe saturación del marcador.

Para los análisis filogenéticos se añadieron 115 secuencias obtenidas en GenBank (Apéndice 3) a las 209 generadas en este trabajo, obteniendo así una matriz de 324 secuencias. Se fijaron como grupo externo los asteroideos *Achantaster planci* y *Patiria miniata*. Las relaciones fueron deducidas por inferencia bayesiana utilizando MrBayes v3.2.1 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Se analizaron cuatro cadenas de Markov-Monte Carlo (MCMC) para estimar las probabilidades posteriores en dos carreras en paralelo durante 150 millones de generaciones con un comienzo aleatorio y teniendo en cuenta las tres posiciones de los codones. Se extrajeron los parámetros y árboles cada 15000 generaciones para obtener el árbol consenso (MCC, "maximum clade credibility") que se editó en FigTree (Rambaut, 2016) (Apéndice 4). Por último, con el software MEGA X se calcularon las distancias genéticas intra e interespecíficas.

Delimitación de especies: Se generaron seis matrices, agrupando en cada matriz individuos del mismo género o géneros próximos, siempre formando un grupo monofilético. Con jModeltest se obtuvieron los modelos evolutivos que mejor se ajustaron a los datos.

Para la delimitación de las especies se utilizó el método bGMYC ("Generalized Mixed Yule Coalescent") en un marco bayesiano. Para llevarlo a cabo se necesita un árbol ultramétrico, que aquí fue obtenido con el programa BEAST (Drummond & Rambaut, 2007), utilizando un reloj molecular relajado ("uncorrected relaxed clock") con un proceso de especiación de muestreo incompleto ("speciation: birth-death incomplete sampling"), comenzando con un árbol aleatorio e incluyendo el modelo

obtenido con jModeltest. El análisis para cada matriz se corrió un número de réplicas suficiente para que las dos cadenas de análisis hubieran convergido. En todos los casos fue de 100 millones de generaciones, salvo para *Ophionereis*, donde el número de réplicas de 50 millones fue suficiente. También se comprobó la estabilidad de los parámetros obtenidos y si su muestreo fue suficiente mediante el programa Tracer (Rambaut, Suchard, Xie, & Drummond, 2014). Se obtuvo el árbol MCC con TreeAnnotator (Drummond & Rambaut, 2007). Finalmente, la delimitación de especies mediante bGMYC se llevó a cabo en R (Reid & Carstens, 2012). Para evitar la sobre- y subestimación de especies, se consideró una probabilidad de co-especificidad de 0.5, la cual representa la media posterior del análisis (Reid & Carstens, 2012). Los parámetros utilizados para cada matriz, tasa de cambio en la coalescencia (ph1 y ph2), tasa de cambio en la especiación (pc1 y pc2), el número de especies potenciales (t1 y t2), los puntos de comienzo (start) y la escala (scale) se especifican en la Tabla 1.

RESULTADOS

Análisis filogenéticos: En el tratamiento bayesiano la desviación entre las dos carreras fue menor de 0.01 y con Tracer se comprobó que los valores de ESS (“effective simple size”) fueran mayores de 200, por lo que se

pudo confirmar la convergencia de ambas carreras del análisis y un muestreo suficiente de los distintos parámetros.

En el filograma obtenido por MrBayes (colapsado en la Fig. 1 y detallado en el Apéndice 4) se observa que en un clado con apoyo de 1 de probabilidad posterior (PP) se situaron OpH y OpJ, con ramas muy cortas entre sí, junto con individuos del género *Ophioderma*. Los individuos OpF se relacionaron con los dos ejemplares de *Ophiocomella alexandri* con un apoyo de PP también máximo. Los denominados como Opae y OpC se posicionaron junto a *Ophiocoma aethiops* dentro del mismo clado con una PP de 0.93. Los etiquetados como OpD, OpA_039 y OpB formaron un grupo monofilético de alto apoyo (PP= 1) como grupo hermano de *Ophionereis reticulata* y *Ophionereis annulata* (PP= 0.97). Las muestras OpA y OpE se agruparon monofiléticamente con la máxima probabilidad asociados como grupo hermano con dos individuos del género *Ophiophragmus*, salvo OpA_193, más alejado de los anteriores y formando una politomía con el grupo anterior, *Microphiopholis gracillima* y *Amphipholis linopneusti*. En este pequeño clado, OpA_004 se posicionó como grupo hermano del resto (OpA_008, OpA_124, OpA_156 y OpE_040). Los individuos OpK formaron un grupo monofilético (PP = 1) con especies del género *Ophiactis*, dos con *O. simplex*, una con *O. rubropoda* y otra sin

TABLA 1
Parámetros utilizados para cada grupo en bGMYC (“Generalized Mixed Yule Coalescent”)

TABLE 1
Parameters used for each group in bGMYC (“Generalized Mixed Yule Coalescent”)

Grupo	ph1	ph2	pc1	pc2	t1	t2	start	scale
<i>Ophionereis</i>	0	5	0	4	1	8	(2,2,6)	(1,1,0.3)
<i>Ophiothrix</i>	0	1	0	1	1	25	(1,1,13)	(1,1,0.3)
<i>Ophiocoma</i>	0	5	0	1.5	1	10	(3,0.6,5)	(3,5,0.3)
<i>Amphiuridae</i>	0	5	0	4	1	8	(2,2,6)	(1,1,0.3)
<i>Ophioderma</i>	0	6	0	20	1	10	(2,2,5)	(1,1,0.3)
<i>Ophiactis</i>	0	2	0	2.5	1	20	(1,1,16)	(1,1,0.3)

ph1, ph2: tasa de cambio en la coalescencia. **pc1, pc2:** tasa de cambio en la especiación. **Start:** puntos de comienzo. **Scale:** escala.

ph1, ph2: coalescent rate. **pc1, pc2:** speciation rate. **Start:** start points, **Scale.**

definir a nivel de especie. Por último, tanto los OpG como OpI se situaron junto a individuos del género *Ophiotrix*, los primeros junto a *Ophiotrix spiculata* (PP = 1) y el segundo junto a *Ophiotrix lineata* (PP = 0.96).

Como visión general, esta filogenia no resultó acorde con las categorías taxonómicas superiores, mostró un gran número de politomías a varios niveles y presentó muchas ramas con valores de probabilidad muy bajos. Los tests de saturación indicaron una cierta saturación en divergencias superiores al 15 - 20 %.

Los altos valores de divergencia encontrados entre integrantes del mismo género y entre las distintas familias pudieron ser los responsables de escasa definición en las relaciones basales del grupo. De hecho, la divergencia media intraespecífica fue de 1.5 %, y la media interespecífica dentro del mismo género de 20.5 %. La divergencia entre familias osciló en un rango que fue del 19 al 28 %. OpJ y OpH divergieron en un 0.31 %. En el linaje de *Ophioderma longicauda* la mayor distancia fue de 7.51 %. La asociación de OpB y OpD_112 presentó una distancia entre ellas de 0.46 %, más alejadas con el resto de las OpD, con una divergencia de OpD_083 de 5.4 % y 8.6 %, respectivamente. *Ophionereis annulata* se distanció de las OpD con alrededor del 10 % de divergencia. En el grupo de OpA (salvo OpA_193) y OpE, resultó una distancia mayor entre OpA_004 y el resto: de media se encontró a una distancia de las demás de 1.9 % y el resto entre sí de 1.1 %. Por último, la divergencia dentro del linaje del género *Ophiactis* osciló entre 0.86 y 1.72 %.

Delimitación de especies: En el género *Ophioderma*, OpH_139 y OpJ_194 resultaron agrupadas como una misma especie y sin asociación con ninguna de las obtenidas del GenBank. Las tres secuencias de *Ophioderma longicauda* obtenidas de GenBank se diferenciaron en dos grupos, separando *O. longicauda* (KU895218) de las otras dos. En el grupo en el que había representantes de *Ophiocoma aethiops*, se añadieron las muestras designadas como Opae y OpC como una misma especie, como ocurrió para los

dos individuos de *Ophiocomella alexandri* y las OpF. Todas las OpD junto con OpA_039 formaron un grupo, excepto OpD_112, que formó otro junto con OpB. Todas las OpA se agruparon en una misma especie con OpE, exceptuando a OpA_193. Los dos individuos de *Ophiactis simplex*, *Ophiactis* sp., *Ophiactis rubropoda*, OpK_209, OpK_210 y OpK_210 se consideraron como una misma especie. La probabilidad de que *O. rubropoda* fuera una especie diferente a las anteriores fue de un 2 %. *Ophiotrix spiculata* se asoció a las OpG. Por último, OpI conformó un linaje propio. Así, el método bGMYC de delimitación de especies, previa a la identificación morfológica, dio como resultado 10 especies en el PNMLB: OpH + OpJ = *Ophioderma* sp., Opae + OpC = *Ophiocoma aethiops*, OpF = *Ophiocomella alexandri*, OpD + OpA_039 = *Ophionereis* sp.1, OpD_112 + OpB = *Ophionereis* sp.2, OpA + OpE = Amphiuridae indet 1, OpA_193 = Amphiuridae indet 2, OpK = *Ophiactis* sp., OpG = *Ophiotrix spiculata*, OpI = *Ophiotrix rudis*.

Identificación morfológica de las especies: La información aportada por los análisis filogenéticos obtenidos y la delimitación de especies, distinguen 10 especies. Añadiendo la identificación morfológica se llega a que las 12 morfoespecies identificadas preliminarmente durante la recolecta representan 11 taxones de rango específico repartidos en dos órdenes (Ophiacanthida y Amphilepidida), seis familias (Ophiocomidae, Ophiodermatidae, Ophionereididae, Ophiotrichidae, Amphiuridae y Ophiactidae) y ocho géneros (*Ophiocoma*, *Ophiocomella*, *Ophioderma*, *Ophionereis*, *Ophiotrix*, *Microphiopholis*, *Ophiophragmus* y *Ophiactis*) representados en la Tabla 2.

En el Apéndice 5 para cada especie se aportan fotografías del disco y de los brazos (por sus caras oral y aboral), las sinonimias (en su caso), observaciones pertinentes sobre los ejemplares revisados, datos de distribución geográfica y citas en Costa Rica, así como los datos disponibles sobre hábitats. En lo referente al “material estudiado” se indica

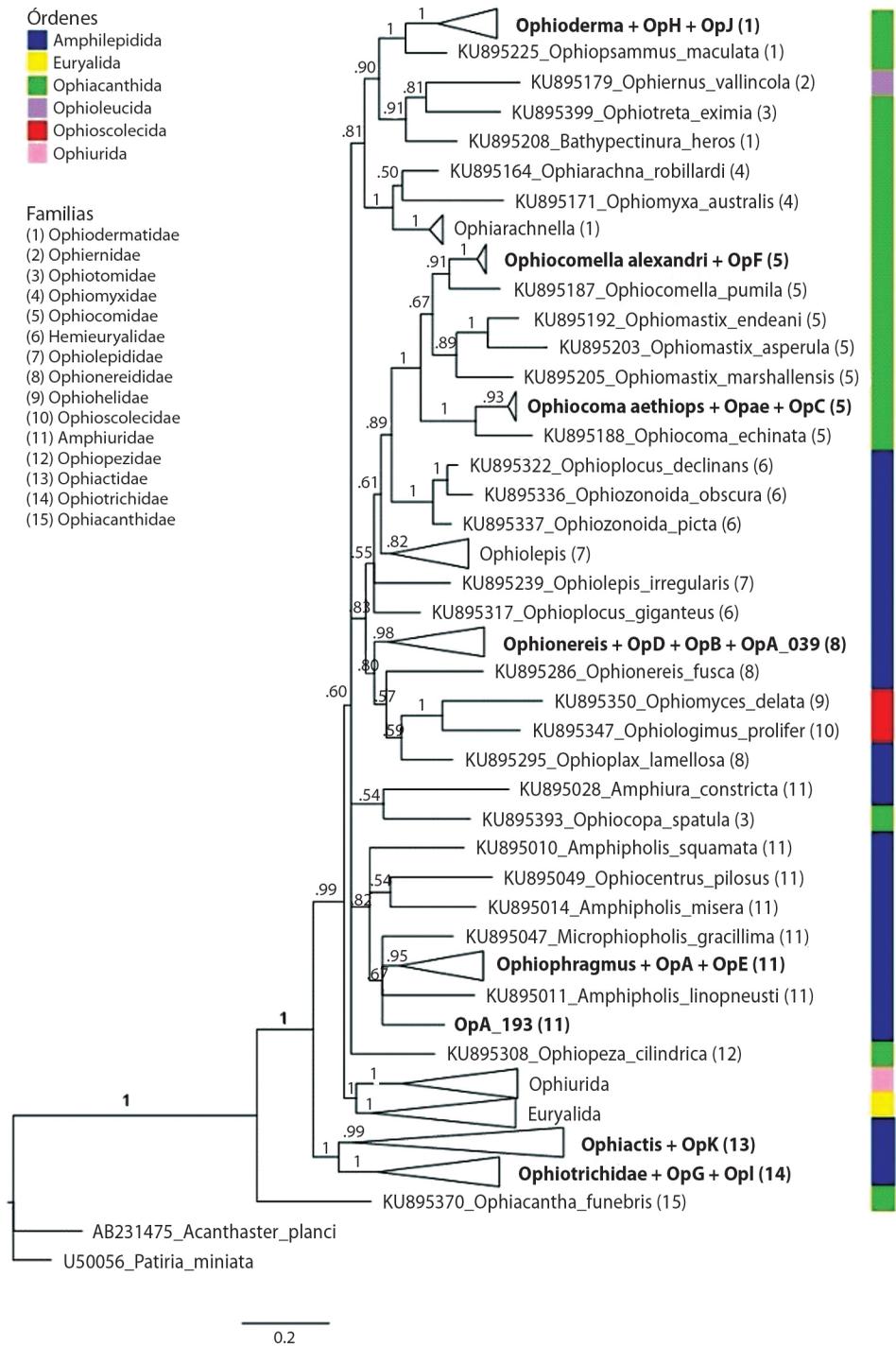


Fig. 1. Árbol colapsado resultante de la inferencia bayesiana basado en el gen COI. En la leyenda se indican los distintos órdenes y familias representados (el árbol detallado se muestra en el Apéndice 4).

Fig. 1. Collapsed tree resulting from bayesian inference based on the COI gen. The different orders and families are indicated in the legend (the detailed tree is shown in Appendix 4).

TABLA 2
Especies identificadas en el PNMLB y su clasificación taxonómica según las evidencias morfológicas y moleculares (se indica también las claves de morfoespecie correspondientes a cada una)

TABLE 2
Identified species in the PNMLB and their taxonomic classification according to morphological and molecular evidence (morphospecies keys are also indicated)

Orden	Familia	Género	Especie	Etiquetas
Amphilepidida	Amphiuridae	<i>Microphiopholis</i>	<i>puntarenae</i>	OpA_193
			<i>platydisca</i>	OpA_004
		<i>Ophiophragmus</i>	aff. <i>stellatus</i>	OpA, OpE
	Ophiactidae	<i>Ophiactis</i>	<i>simplex</i>	OpK
	Ophionereididae	<i>Ophionereis</i>	aff. <i>annulata</i> 1	OpD, OpA_039
			aff. <i>annulata</i> 2	OpD_112, OpB
	Ophiotrichidae	<i>Ophiotrix</i>	<i>spiculata</i>	OpG
<i>rudis</i>			OpI	
Ophiacanthida	Ophiocomidae	<i>Ophiocoma</i>	<i>aethiops</i>	Opae, OpC
		<i>Ophiocomella</i>	<i>alexandri</i>	OpF
	Ophiodermatidae	<i>Ophioderma</i>	aff. <i>panamensis</i>	OpH, OpJ

el ejemplar completo que se utilizó para la descripción morfológica.

Aproximación a la riqueza y distribución en PNMLB: En el Apéndice 6 se especifica el número de ejemplares recolectados de cada especie en cada localidad. En resumen, la diversidad de especies encontradas de ofiuras varió según la localidad. Las playas con mayor diversidad fueron Playa Tamarindo Ciudad, con siete especies, y Playa Langosta, con seis. Le siguen en diversidad Playa Ventanas y Playa Grande con cinco especies, y Playa Carbón y Playa Tamarindo, con cuatro. El menor número de especies observado fue en Punta del Morro con tres. La especie más abundante en el Parque resultó ser *Ophiocoma aethiops*, seguida de *Ophiocomella alexandri*, *Ophionereis* aff. *annulata* 1 y *Ophiotrix spiculata*. El resto de las especies se encontraron muy poco representadas. La mayor abundancia de *O. aethiops* se observó en Playa Langosta, donde los individuos formaban aglomeraciones masivas.

En cuanto a los hábitats, *O. aethiops* y *Ophiophragmus* aff. *stellatus* fueron las únicas especies encontradas en los tres sustratos disponibles. En general, el sustrato predominante fue el rocoso (47.20 %), seguido del arenoso

(39.72 %) y el arrecife muerto (13.08 %). En el Apéndice 7 se muestran los porcentajes de individuos recolectados en cada sustrato.

DISCUSIÓN

Se aporta el registro de ofiuras observadas en el Parque Nacional Marino las Baulas y se asignan los ejemplares encontrados a once especies, de las que nueve constituyen nuevos aportes para el Parque: *Ophionereis* aff. *annulata* 1, *Ophionereis* aff. *annulata* 2, *Microphiopholis platydisca*, *Microphiopholis puntarenae*, *Ophiophragmus* aff. *stellatus*, *Ophiotrix* (*Ophiotrix*) *rudis*, *Ophiotrix* (*Ophiotrix*) *spiculata*, *Ophioderma* aff. *panamensis* y *Ophiactis simplex*, y dos, *Ophiocoma aethiops* y *Ophiocomella alexandri*, que ya se habían documentado previamente (BIO-MARCC-SINAC-GIZ, 2015). Asimismo, se aportan 209 nuevas secuencias del marcador COI para que puedan ser de utilidad en futuras investigaciones.

Debido a que el objetivo del estudio era principalmente cualitativo, los datos de distribución y abundancias deben tomarse como una aproximación. La disponibilidad de los

diferentes sustratos no es equilibrada en las distintas localidades. Además, el menor número de especies presente en arrecife muerto (13.08 %) puede responder a la dificultad de muestreo en ese sustrato, caracterizado por presentar multitud de cavidades y túneles internos cuyo único acceso sería la destrucción del propio hábitat. Por el contrario, el arrecife muerto parece ofrecer un gran número de nichos y superficie que ocupar. Asimismo, la mayor abundancia de individuos recolectados en el sustrato rocoso puede deberse a la facilidad de localizarlos en ese medio levantando las rocas sueltas.

Según los resultados obtenidos, el PNMLB puede considerarse con una alta diversidad de ofiuras si se compara con otras localidades del Pacífico de Costa Rica donde se han realizado estudios similares sobre los equinodermos. Alvarado & Fernández (2005) citaron seis especies de ofiuras en el Parque Nacional Marino Ballena, Alvarado & Chiriboga (2008) encontraron seis especies en la Isla del Coco, y Azoifeifa-Solano et al. (2017) citan dos especies en el sistema estuarino de Térraba-Sierpe. Además, hay que tener en cuenta que en este estudio solo se han obtenido ejemplares del intermareal, sin haberse muestreado estuarios, manglares, ni mayores profundidades, por lo que el número de especies presentes se considera subestimado.

Los resultados obtenidos sugieren cierta cautela en su interpretación, ya que se han observado algunas diferencias entre las identificaciones derivadas de los métodos moleculares y las morfológicas. De no ser por el uso adicional de herramientas moleculares, la morfología de los ejemplares juveniles hubiera podido inducir a errores y considerarse como especies distintas. Es el caso de OpJ (Apéndice 5, Fig. A.5.12), que gracias a la delimitación molecular se ha resuelto como un juvenil de OpH (Apéndice 5, Fig. A.5.11), con una distancia genética de 0.31 %, ya que los caracteres morfológicos, como escudos orales y placas de los brazos sin desarrollar, y la coloración son muy diferentes a los que presenta el adulto. Ambos se determinaron como *Ophioderma* aff. *panamensis*, pues las características

morfológicas del ejemplar estudiado no se ajustan completamente a la descripción de esta especie (presentando este individuo los escudos radiales cubiertos por granulación, carente en los de *O. panamensis*). Por este motivo, podría tratarse de una nueva especie, pero es necesario disponer de individuos de *O. panamensis* para ampliar los análisis tanto morfológicos como moleculares. Otros casos de individuos juveniles que se han podido emparejar con sus adultos son OpC: juveniles de *Ophiocoma aethiops* (Opae), OpA_039: juvenil de *Ophionereis* aff. *annulata* 1 (OpD) y OpB_009: juvenil de *Ophionereis* aff. *annulata* 2 (OpD_112).

Por otro lado, la delimitación molecular, al contrario que en los anteriores casos, separa como diferentes especies individuos morfológicamente similares y que se habían identificado previamente como la misma. Por ejemplo, el ejemplar OpD_112 resultó con una divergencia del 8.6 % con respecto al resto de OpD y OpA_039 sí se agrupó con el resto de las OpD. Asimismo, al ejemplar OpB se diferenció de los OpD por presentar un tamaño relativo muy pequeño y con diferencias en la coloración, aunque los caracteres morfológicos son similares. Este ejemplar presentó una divergencia con respecto al resto del 5.4 %. Sin embargo, OpD_112 y OpB solo divergen el 0.46 % la una de la otra, constituyendo así, una misma especie, siendo OpB un juvenil. De este modo, el linaje formado por las OpD y OpA_039 y el formado por OpD_112 y OpB podrían constituir nuevas especies y un caso de especies crípticas (*Ophionereis* aff. *annulata* 1 y *Ophionereis* aff. *annulata* 2, respectivamente). En ambos casos se dejó como *affinis* ya que los análisis filogenéticos y de delimitación de especies nos dicen que no pertenecen a la misma especie que la secuencia de *Ophionereis annulata* disponible en GenBank (con una divergencia del 10 % aproximadamente) y los caracteres morfológicos son similares a la descripción de *O. annulata* salvo que los individuos de este estudio no presentan una placa primaria central evidente. El trabajo del que se extrajo esa secuencia de *O. annulata* (Hugall, O'Hara, Hunjan, Nilsen, & Moussalli, 2015) no aporta

datos sobre su identificación, por lo que podría no ser acertada. Para llegar a una conclusión definitiva es necesario disponer de individuos de *O. annulata* y realizar los pertinentes análisis morfológicos y moleculares.

La existencia de especies crípticas puede explicarse por tres factores: caracterización morfológica insuficiente, especiación reciente o “cladogénesis estática” (existencia de aislamiento genético que no se traduce en una divergencia morfológica) (Bickford et al., 2007). En la clase Ophiuroidea se han detectado varios complejos de especies crípticas (O’Hara et al., 2004; Stöhr et al., 2009; Naughton, et al., 2014; Boissin et al., 2015; Weber, Stöhr, & Chenuil, 2017). Para ello las herramientas moleculares se muestran muy útiles para detectar estos casos, así como para identificar a los individuos juveniles (Bribiesca-Contreras, Solís-Marín, Laguarda-Figueras, & Zaldívar-Riverón, 2013).

Un linaje conocido como un complejo de especies es el de *Ophioderma longicauda* (Weber et al., 2017) lo que explica que de las tres secuencias que incluimos en este estudio para esa especie, el análisis dGMYC las separa en dos especies, con una divergencia de 7.51 %, un valor muy elevado para tratarse de un mismo taxón. Por otro lado, en el linaje de *Ophiactis simplex* (OpK) hay un rango de distancia genética que va del 0.86 al 1.54 % y también está considerado como un complejo de especies que se encuentra en revisión (Granja-Fernández, comunicación personal, 2018). *Ophiactis rubropoda* se encuadra dentro de este linaje junto con *O. simplex*, y ambas forman parte de un grupo único por presentar hemoglobina en su sistema vascular junto con *Ophiactis virens* y *Hemipholis elongata* (Christensen, Christensen, & Weisrock, 2008). La discriminación morfológica entre *O. simplex* y *O. rubropoda* es difícil, pero esta última se distribuye en el Caribe (Pomory, 2007), mientras que la primera habita en el Pacífico (Granja-Fernández et al., 2014). La distancia genética del COI entre ellas es pequeña (la que hay entre *O. rubropoda* y OpK_210 es de 1.72 %) con respecto a lo que ocurre en otros taxones

separados por el Istmo de Panamá (Christensen et al., 2008), cerrado hace unos 3.5 millones de años (De Gracia, O’Dea, Rodríguez, & D’Croz, 2012). Por ejemplo, especies hermanas de camarón separados por el istmo presentaron una divergencia de aproximadamente el 5 % (Christensen et al., 2008). Una hipótesis plausible sería que la divergencia es intraespecífica, con cambios en el fenotipo, y que su distribución en ambos lados del istmo se produjo por acción humana más reciente, como ocurrió con *Ophiothela mirabilis*, una especie nativa del Pacífico que invadió el Océano Atlántico en las últimas décadas por la probable asociación a los cascos de los barcos (Barboza, Mattos, & Paiva, 2015). Finalmente, no existen dudas de que las OpG corresponden a *Ophiothrix* (*Ophiothrix*) *spiculata* y que el único individuo OpI pertenece a *Ophiothrix* (*Ophiothrix*) *rudis*; resultados robustos por obtenerse tanto molecular como morfológicamente.

También en nuestros resultados se da el caso contrario: ejemplares que difieren morfológicamente pero que no difieren en el marcador molecular utilizado. Por ejemplo, sucede con *Microphiopholis platydisca* (OpA_004), que se diferenció de *Ophiophragmus* aff. *stellatus* (OpA y OpE) atendiendo a su morfología y, sin embargo, el filograma y el método de delimitación de especies apenas muestran diferencias entre ellas. La distancia genética entre *Microphiopholis platydisca* y el resto es de 1.9 %. Además, se incluye formando un grupo monofilético con *Ophiophragmus filigraneus* y *Ophiophragmus wurdemani*. En cuanto a *Microphiopholis puntarenae*, los análisis moleculares la sitúan formando una politomía junto con los géneros *Amphipholis* y *Ophiophragmus* y queda muy alejado de *Microphiopholis platydisca*. Estos resultados muestran que estos géneros no están bien resueltos y, por lo tanto, para poder llegar a una conclusión, es necesario hacer un análisis morfológico-molecular de más especímenes y quizá el uso de otros marcadores moleculares. *Ophiophragmus* aff. *stellatus* responde por completo a la descripción de Ziesenhenné (1940) salvo que la papila

oral media no presenta forma de espina y por ello se dejó como *affinis*. Para poder saber si se trata de una especie nueva se necesita el estudio de individuos de *O. stellatus*.

En lo que se refiere a los taxones de rango superior, el árbol filogenético obtenido apoya la monofilia de los órdenes Ophioscolecida, Euryalida, Ophiurida y el superorden Euryophiurida, relación que ya encontró Martynov (2010) basándose en caracteres de las articulaciones de las espinas de los brazos. Por otro lado, la relación obtenida como grupos hermanos de las familias Ophiactidae y Ophiotrichidae está apoyada fuertemente por los trabajos anteriores de Smith, Paterson y Lafay (1995) y O'Hara, Hugall, Thuy y Moussalli (2014). Sin embargo, por lo general las familias se encuentran mejor resueltas como monofiléticas en anteriores trabajos (Hunter, Brown, Alexander, Kroeger, & Rose, 2016), basados en un gen mitocondrial (ARNr 16S) y un gen nuclear (ARNr 18S). Es importante señalar que los taxones aquí estudiados constituyen una representación incompleta y se precisa de una gran cantidad de secuencias para descifrar relaciones ancestrales (Hunter et al., 2016). Además, en la prueba de saturación se observa que alrededor del 15 % de divergencia el marcador comienza a saturarse. La distancia genética media intraespecífica (1.5 %) y la interespecífica dentro del mismo género (20.5 %) son del mismo orden de magnitud que las encontradas en equinodermos en general por Hoareau y Boissin (2010) (1.3 y 20.3 %, respectivamente). Las divergencias entre familias en este trabajo se encuentran en un rango del 19 - 28 %, por lo que el marcador utilizado pierde calidad informativa a esos niveles y superiores. La inclusión de taxones bastante diferenciados en este análisis podría ser la explicación de estos resultados e indicarían una subvaloración con respecto a las divergencias reseñadas.

Recientemente, se están considerando nuevos caracteres morfológicos internos como diagnósticos, sobre todo en niveles taxonómicos superiores, al tiempo que los estudios moleculares se van ampliando con el uso de

varios marcadores, transcriptomas y bases de datos masivos (O'Hara, Hugall, Thuy, Stöhr, & Martynov, 2017).

En cualquier caso, este trabajo pretende ser una contribución al conocimiento de las ofiuras de la Región Pacífica Panameña sin pretensiones filogenéticas. En total, combinando los caracteres morfológicos y genéticos, se han identificado 11 especies, cuatro de las cuales podrían ser nuevas, nueve constituyen nuevos registros en el PNMLB y una de las especies se ha encontrado por primera vez en Costa Rica (*Ophiophragmus* aff. *stellatus*). Se aporta un nuevo inventario de especies marinas del PNMLB, mediante la caracterización morfológica y genética de las ofiuras, con una aproximación a su abundancia y distribución. Con el seguimiento de las comunidades de ofiuras se puede contribuir a evaluar la salud del ecosistema intermareal, que sufre intensas actividades propias del desarrollo costero de la ciudad de Tamarindo dentro del Parque. Conocer el estado de la biodiversidad de una zona es siempre importante para llevar a cabo actuaciones adecuadas de conservación. Por otro lado, se aportan observaciones morfológicas e imágenes como contribución a la taxonomía de este grupo de equinodermos, se analizan algunos aspectos filogenéticos, y la utilidad del marcador COI a distintos niveles taxonómicos y se provee de secuencias de ADN mitocondrial, que pueden llegar a contribuir a una gran gama de estudios como análisis filogenéticos, biogeográficos y evolutivos.

Declaración de ética: los autores declaran que todos están de acuerdo con esta publicación y que han hecho aportes que justifican su autoría; que no hay conflicto de interés de ningún tipo; y que han cumplido con todos los requisitos y procedimientos éticos y legales pertinentes. Todas las fuentes de financiamiento se detallan plena y claramente en la sección de agradecimientos. El respectivo documento legal firmado se encuentra en los archivos de la revista.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido parcialmente cubierto por el Ministerio de Economía y Competitividad (proyecto CTM2014-57949-R). Se agradece la ayuda de Roberto Zuñiga Muñoz y a la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad en la obtención de los permisos del Gobierno de Costa Rica. Un sincero agradecimiento al administrador del Parque Nacional Marino Las Baulas, Rodney Piedra Chacón, y a su equipo. Se agradece la colaboración de Julio José Rodríguez Lozano en el trabajo de campo, a Rebeca Granja-Fernández por su valiosa aportación en las identificaciones y a Iván Acevedo García, Violeta López Márquez, Paula Carolina Rodríguez Flores y David Buckley por el apoyo en el laboratorio y análisis de los datos. Por último, agradecer a Javier Diéguez Uribeondo por dirigir el máster que hizo posible este trabajo.

RESUMEN

Introducción: El conocimiento de la Clase Ophiuroidea es muy escaso y deficiente, a pesar de ser la que presenta el mayor número de especies del Filo Echinodermata con hasta 2100. Además, apenas existen publicaciones dedicadas específicamente al grupo de las ofiuras en la vertiente pacífica de Costa Rica. **Objetivo:** La caracterización morfológica y genética de las ofiuras de la franja intermareal y sublitoral somero del Parque Nacional Marino Las Baulas (Pacífico de Costa Rica). **Métodos:** El periodo de recolecta se extendió entre enero y abril de 2018 y tuvo lugar a lo largo de siete localidades: Punta del Morro, Playa Carbón, Playa Ventanas, Playa Grande, Playa Tamarindo Ciudad, Playa Tamarindo y Playa Langosta. Se ha realizado la caracterización de 214 ofiuras mediante claves taxonómicas, descripciones originales y el marcador mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI). **Resultados:** En total, combinando los caracteres morfológicos y genéticos, se han identificado 11 especies, cuatro de las cuales podrían ser nuevas, nueve constituyen nuevos registros en el parque y una de las especies se ha encontrado por primera vez en Costa Rica (*Ophiophragmus* aff. *stellatus*). Además, se han identificado individuos juveniles y se han encontrado dos especies crípticas. **Conclusión:** Del estudio molecular se concluye que el marcador COI es útil para delimitar molecularmente las especies y establecer relaciones filogenéticas para los niveles taxonómicos de género y especie, pero no para los superiores. Se aportan observaciones morfológicas e imágenes como contribución a la taxonomía del grupo.

Key words: Echinodermata; barcode; ophiuroids; molecular identification; Eastern Tropical Pacific.

REFERENCIAS

- Alvarado, J.J., Barraza, E., & Sancho-Mejías, T.I. (2013). Central America Echinoderms: Diversity, Ecology and Future Perspectives. In J.J. Alvarado & F.A. Solis-Marín (Eds.), *Echinoderm Research and Diversity in Latin America* (pp. 67-99). Berlin: Springer-Verlag.
- Alvarado, J.J., Chacón-Monge, J.L., Solis-Marín, F.A., Pineda-Enríquez, T., Caballero-Ochoa, A.A., Rivera, S.S., & Chaves, R.R. (2017). Equinodermos del Museo de Zoología de la Universidad de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 65, S272-S287.
- Alvarado, J.J., & Chiriboga, A. (2008). Distribución y abundancia de equinodermos en las aguas someras de la Isla del Coco, Costa Rica (Pacífico Oriental). *Revista de Biología Tropical*, 56(2), 99-111.
- Alvarado, J.J., & Cortés, J. (2009). Part 36: Echinoderms. En I.S. Wehrtmann & J. Cortés (Eds.), *Marine Biodiversity of Costa Rica, Central America* (pp. 421-433). Berlin: Springer.
- Alvarado, J.J., & Fernández, C. (2005). Equinodermos del Parque Nacional Marino Ballena, Pacífico, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 53(3), 275-284.
- Alvarado, J.J., Herrera, B., Corrales, L., Asch, J., & Paaby, P. (2011). Identificación de las prioridades de conservación de la biodiversidad marina y costera en Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 59(2), 829-842.
- Alvarado, J.J., Solis-Marín, F.A., & Ahearn, C.G. (2010). Echinoderm (Echinodermata) diversity in the Pacific coast of Central America. *Marine Biodiversity*, 40, 45-56. DOI: 10.1007/s12526-009-0032-5
- Azofeifa-Solano, J.C., Mena, S., Alvarado, J.J., Chacón-Monge, J.L., Clarke, T.M., Herrera-Correal, J., & Wehrtmann, I.S. (2017). Echinoderm diversity of a tropical estuary in the largest river basin of the Costa Rican Pacific, Eastern Tropical Pacific. *Chek List*, 13(3), 2113, 11 pp.
- Barboza, C.A.D.M., Mattos, G., & Paiva, P.C. (2015). Brittle stars from the Saint Peter and Saint Paul Archipelago: Morphological and molecular data. *Marine Biodiversity Records*, 8, 1-9. DOI: 10.1017/S1755267214001511
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., ... Das, I. (2007). Cryptic species as window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22, 148-155.
- BIOMARCC-SINAC-GIZ (2015). *Caracterización Ecológica del Sector Marino del Parque Nacional Marino Las Baulas de Guanacaste*. San José-Costa Rica.

- Boissin, E., Egea, E., Féral, J.P., & Chenuil, A. (2015). Contrasting genetic structures in *Amphipholis squamata*, a complex of brooding, self-reproducing sister species sharing life history traits. *Marine Ecology Progress Series*, 539, 165-177.
- Booolootian, R.A., & Leighton, D. (1966). A key to the species of Ophiuroidea (brittle stars) of the Santa Monica Bay and adjacent areas. *Contributions in Science*, 93, 1-20.
- Bribiesca-Contreras, G., Solís-Marín, F.A., Laguarda-Figueras, A., & Zaldivar-Riverón, A. (2013). Identification of echinoderms (Echinodermata) from an anchialine cave in Cozumel Island, Mexico, using DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*, 13(6), 1137-1145.
- Brusca, R.C. (1980). *Common Intertidal Invertebrates of the Gulf of California* (2da Ed.). Tucson, Arizona: The University of Arizona Press.
- Christensen, A.B. (2004). A new distribution record and notes on the biology of the brittle star *Ophiactis simplex* (Ophiuroidea, Echinodermata) in Texas. *Texas Journal of Science*, 56, 175-179.
- Christensen, A.B., Christensen, E.F., & Weisrock, D.W. (2008). Population genetic structure of North American *Ophiactis* spp. brittle stars possessing hemoglobin. *Marine Biology*, 154, 755-763. DOI: 10.1007/s00227-008-0968-1
- Clark, H.L. (1940). Eastern Pacific Expeditions of the New York Zoological Society. XXI. Notes on Echinoderms from the West Coast of Central America. *Zoologica*, 25, 331-352.
- Clark, H.L. (1948). A report on the Echini of the warmer eastern Pacific, based on the collections of the Velero III. *Allan Hancock Pacific Expedition*, 8, 225-352.
- De Gracia, C., O'Dea, A., Rodríguez, F., & D'Croz, L. (2012). Respuesta ambiental en el Pacífico frente a la subducción de la dorsal asísmica de Cocos (Panamá y Costa Rica). *Revista de Biología Tropical*, 60(2), 893-908.
- Drummond, A.J., & Rambaut, A. (2007). Beast: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 214.
- Giraldi, N.R., Bertolini, C., Emmerson, M.C., Roberts, D., Sigwart, J.D., & O'Connor, N.E. (2017). Aggregations of brittle stars can provide similar ecological roles as mussel reefs. *Marine Ecology- Progress Series*, 563, 157-167.
- Granja-Fernández, R., Herrero-Pérezrul, M.D., López-Pérez, R.A., Hernández, L., Rodríguez-Zaragoza, F.A., Jones, R.W., & Pineda-López, R. (2014). Ophiuroidea (Echinodermata) from coral reefs in the Mexican Pacific. *Zookeys*, 406, 101-145. DOI: 10.3897/zookeys.406.6306
- Hendler, G. (1996). Taxonomic atlas of the benthic fauna of the Santa Maria Basin and western Santa Barbara Channel. Class Ophiuroidea. Santa Barbara Museum of Natural History. *Miscellaneous Taxa*, 14, 113-179.
- Hendler, G., Baldwin, C.C., Smith, D.G., & Thacker, C.E. (1999). Planktonic dispersal of juvenile brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea) on a Caribbean reef. *Bulletin of Marine Science*, 65, 283-288.
- Hoareau, T.B., & Boissin, E. (2010). Design of phylum-specific hybrid primers for DNA barcoding: address in the need for efficient COI amplification in the Echinodermata. *Molecular Ecology Resources*, 10, 960-967.
- Hugall, A.F., O'Hara, T.D., Hunjan, S., Nilsen, R., & Moussalli, A. (2015). An Exon-capture System for the entire Class Ophiuroidea. *Molecular Biology and Evolution*, 33(1), 281-294.
- Hughes, D.J. (1998). *An overview of dynamics and sensitivity characteristics for conservation management of marine SACs* (Vol. 4). Scottish Association for Marine Science/English Nature (UK Marine SACs Project).
- Hughes, A.D., Brunner, L., Cook, E.J., Kelly, M.S., & Wilson, B. (2012). Echinoderms Display Morphological and Behavioural Phenotypic Plasticity in Response to Their Trophic Environment. *PLoS One*, 7(8).
- Hunter, R.L., Brown, L.M., Alexander, H.C., Kroeger, Z.A., & Rose, S. (2016). Additional insights into phylogenetic relationships of the Class Ophiuroidea (Echinodermata) from rRNA gene sequences. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 54, 269-275.
- Ives, J.E. (1889). Variation in *Ophiura panamensis* and *Ophiura teres*. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 41, 76-77.
- Laguarda-Figueras, A., Solís-Marín, F.A., & Caballero-Ochoa, A.A. (2017). *Actualización del Catálogo de los Equinodermos Recientes de México (Fase III)*. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (Informe final SNIB-CONABIO. Proyecto No. HA018). Ciudad de México.
- Lizano, O.G. (2006). Algunas características de las mareas en la costa pacífica y caribe de centroamérica. *Ciencia y Tecnología*, 24(1), 51-64.
- Lyman, T. (1860). Descriptions of new Ophiuridae, belonging to the Smithsonian Institution and to the Museum of Comparative Zoology at Cambridge. In J. Wyman et al. (Eds.), *Proceedings of the Boston Society of Natural History* (Vol. 7, pp. 252-262). Cambridge, Boston: Riverside.

- Lyman, T. (1865). Ophiuroidea and Astrophytidae. *Illustrated catalogue of the Museum of Comparative Zoology*, 1, 1-200.
- Lyman, T. (1874). Ophiuridae and Astrophytidae: new and old. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College*, 3, 221-272.
- Maluf, L.Y. (1991). Echinoderm fauna of the Galápagos Island. In M.J. James (Eds.), *Galápagos Marine Invertebrates: Taxonomy, Biogeography, and Evolution in Darwin in Darwin's Islands* (pp. 345-365). New York: Plenum Press.
- Martynov, A. (2010). Reassessment of the classification of the Ophiuroidea (Echinodermata), based on morphological characters. I. General character evaluation and delineation of the families Ophiomyxidae and Ophiacanthidae. *Zootaxa*, 2697, 1-154.
- McClendon, J. F. (1909). The ophiurans of the San Diego region. *University of California Publications in Zoology*, 6(3), 33-64.
- MINAE – SINAC – CONAGEBIO – FONAFIFO (2018). *Resumen del Sexto Informe Nacional de Costa Rica ante el Convenio de Diversidad Biológica*. Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo - Apoyo técnico para que las Partes Elegibles desarrollen el Sexto Informe Nacional para el CDB (6NR-LAC) Costa Rica.
- Naughton, K.M., O'Hara, T.D., Appleton, B., & Cisternas, P.A. (2014). Antitropical distributions and species delimitation in a group of ophiocomid brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea: Ophiocomidae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 78, 232-244.
- Nielsen, R. (1932). Ophiurans from the Gulf of Panama, California and the Strait of Georgia. *Videnskabelige Meddelelser Naturhistorisk Forening i København*, 91, 346.
- Nordmoe, E.D., Sieg, A.E., Sotherland, P.R., Spotila, J.R., Paladino, V., & Reina, R.D. 2004. Nest site fidelity of leatherback turtles at Playa Grande, Costa Rica. *Animal Behaviour*, 68(2), 387-304.
- O'Hara, T.D., Byrne, M., & Cisternas, P. (2004). The *Ophiocoma erinaceus* complex: another case of cryptic speciation in echinoderms. In T. Heinzeller & J.H. Nebelsick (Eds.), *Echinoderms. Proceedings of the 11th International Echinoderm Conference* (pp. 537-542). Munich: Taylor & Francis Group.
- O'Hara, T.D., Hugall, A.F., Thuy, B., & Moussalli, A. (2014). Phylogenomic resolution of the class ophiuroidea unlocks a global microfossil record. *Current Biology*, 24, 1874-1879. DOI: 10.1016/j.cub.2014.06.060
- O'Hara, T.D., Hugall, A.F., Thuy, B., Stöhr, S., & Martynov, A. (2017). Restructuring higher taxonomy using broad-scale phylogenomics: The living Ophiuroidea. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 107, 415-430. DOI: 10.1016/j.ympev.2016.12.006
- O'Hara, T.D., Stöhr, S., Hugall, A.F., Thuy, B., & Martynov, A. (2018). Morphological diagnoses of higher taxa in Ophiuroidea (Echinodermata) in support of a new classification. *European Journal of Taxonomy*, 416, 1-35.
- Obando-Acuña, V. (2002). *Biodiversidad en Costa Rica: Estado del conocimiento y gestión*. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: INBIO.
- Palumbi, S.R., Martin, A., Romano, S., McMillan, W.O., Stice, L., & Grabowski, G. (2002). The simple fool's guide to PCR. Version 2. Univ Hawaii. 1-45. DOI: 10.1186/s13620-015-0060-3
- Pomory, C.M. (2007). Key to the common shallow-water brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea) of the gulf of Mexico and Caribbean Sea. *Caribbean Journal of Science, Special Publication*, 10, 1-42.
- Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, D., & Drummond, A.J. (2014). *Tracer* (versión 1.6). Recuperado de <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Rambaut, A. (2016). *FigTree. A Graphical Viewer of Phylogenetic Trees* (versión 1.4.3). Recuperado de <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- Reid, N.M., & Carstens, B.C. (2012). Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: a Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model. *BMC Evolutionary Biology*, 12, 196.
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J.P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572-1574.
- Santidrián-Tomillo, P., Robinson, N.J., Fonseca, L.G., Quirós-Pereira, W., Arauz, R., Beange, M., ... Wallace, B.P. (2017). Secondary nesting beaches for leatherback turtles on the Pacific coast of Costa Rica. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45(3), 563-571.
- Smith, A.B., Paterson, G.L.J., & Lafay, B. (1995). Ophiuroid phylogeny and higher taxonomy: morphological, molecular and palaeontological perspectives. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 114, 213-243.
- Solís-Marín, F.A., Caballero-Ochoa, A.A., Frontana-Urbe, S.C., Laguarda-Figueroa, A., & Durán, A. (2017). *Catálogo de Autoridades Taxonómicas de los Equinodermos de México. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICML)* (Informe final, SNIB-CONABIO, proyecto No. Z002). México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- Stöhr, S. (2005). Who's who among baby brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea): postmetamorphic

- development of some North Atlantic forms. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 143, 543-576.
- Stöhr, S., Boissin, E., & Chenuil, A. (2009). Potential cryptic speciation in Mediterranean populations of *Ophioderma* (Echinodermata: Ophiuroidea). *Zootaxa*, 2071, 1-20.
- Stöhr, S., O'Hara, T.D., & Thuy, B. (2012). Global diversity of brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea). *PLoS ONE*, 7. DOI: 10.1371/journal.pone.003194
- Stöhr, S., O'Hara, T., & Thuy, B. (Eds.) (2020). World Ophiuroidea Database. Ophiuroidea. Accessed through: World Register of Marine Species. Recuperado de <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=123084> on 2020-02-27
- Swofford, D.L. (2001). *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony* (*and Other Methods)*, (Version 4.0b8). Sinauer, Sunderland, MA.
- Thuy, B., & Stöhr, S. (2016). A New morphological phylogeny of the Ophiuroidea (Echinodermata) accords with molecular evidence and renders microfossils accessible for cladistics. *PLoS ONE*, 11(5), e0156140. DOI: 10.1371/journal.pone.0156140
- Weber, A.A., Stöhr, S., & Chenuil, A. (2017). Species delimitation in the presence of strong incomplete lineage sorting and hybridization: Lessons from *Ophioderma* (Ophiuroidea: Echinodermata). *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 131, 138-148.
- Wehrtmann, I.S., & Cortés, J. (2009). *Marine Biodiversity of Costa Rica, Central America*. Berlin: Springer.
- WoRMS Editorial Board (2020). World Register of Marine Species. Recuperado de <http://www.marinespecies.org> at VLIZ
- Ziesenhenné, F. (1940). New ophiurans of the Allan Hancock Pacific Expedition. *Allan Hancock Pacific Expedition*, 8, 7-60.
- Ziesenhenné, F.C. (1955). A review of the genus *Ophioderma* M. and T. In (Ed. not indicated). Essays in the natural sciences in honor of Captain Allan Hancock on the occasion of his birthday July 26, 1955 (pp. 185-201). Los Angeles: University of Southern California.