

UCH-FC
MAG-EBE
H 468
C.1

**Enfrentando amenazas simultáneas: respuestas
demográficas de *Brachionus calyciflorus* frente a riesgo
de depredación y exposición a pesticida.**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

**Magíster en Ciencias Biológicas, con mención en Ecología y Biología
Evolutiva**

Facultad de Ciencias

por

IngerAndrea Heine Fuster

Enero, 2013

Director de Tesis: Rodrigo Ramos Jiliberto

Co-director de Tesis: Adriana Aránguiz Acuña



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

Inger Andrea Heine Fuster

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en ecología y biología evolutiva, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 17 de octubre de 2012

Director de Tesis:

Dr. Rodrigo Ramos Jiliberto

Co-director de Tesis:

Dra. Adriana Aránguiz Acuña

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Ramiro Bustamente

Dr. Pablo Sabat





Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Adriana Aránguiz y a Rodrigo Ramos por todo el apoyo que me brindaron, en todo sentido, durante la planificación y el desarrollo de esta tesis.

Agradezco el apoyo a mis compañeros de laboratorio por soportarme: Leslie, Claudio, Pasquinell, Feña, Lidia y en especial por su ayuda técnica a Catalina Alegría y Javier González

Le doy las gracias a mi familia que siempre me ha apoyado incondicionalmente.

Agradezco a CENMA por facilitar el espacio, equipos e insumos necesarios para realizar los experimentos de esta tesis y a CONICYT por la beca de magíster.



Índice de Materias

Resumen.....	vii
1. Introducción.....	1
2. Materiales y métodos.....	6
3. Resultados.....	12
4. Discusión.....	22
5. Literatura citada.....	26



Lista de figuras

- Figura 1.** Tasa de crecimiento poblacional (λ) de *B. calyciflorus* con defensa morfológica inducida y sin previa inducción, bajo un gradiente de concentraciones del pesticida Metamidofos.....13
- Figura 2.** Tasa de crecimiento de la primera generación F1 de *B. calyciflorus* defendidos (k+) y sin inducción de defensa (k-), expuestos a dos niveles de pesticida.14
- Figura 3.** Tasas de crecimiento poblacional de crías (F2) según la edad post-reproductiva de sus madres (F1) expuestas a diferentes tratamientos de kairomona y pesticida.....16
- Figura 4.** Magnitud del efecto de la adición de kairomona sobre la tasa de crecimiento poblacional de las crías, a diferentes edades post-reproductiva de sus madres.....17
- Figura 5.** Número de individuos de F2 a través de distintas edades post-reproductivas de las madres expuestas a diferentes tratamientos de kairomona y pesticida.....18
- Figura 6.** Efecto relativo de la kairomona (k+) en el número de individuos de F2
.....19
- Figura 7.** Abundancias relativas proyectadas en 30, 60, 90 y 120 días, a través de distintas edades post-reproductivas de las madres expuestas a diferentes tratamientos de kairomona y pesticida.....20
- Figura 8.** Efecto de la kairomona (k+) en la abundancia relativa de cada “cohorte” proyectado en 30 , 60, 90 y 120 días a través de distintas edades post-reproductiva de las madres.....21



Resumen

El desarrollo de defensas en respuesta a señales químicas liberadas por depredadores es una estrategia plástica presente en muchas especies que habitan diferentes ambientes. Estas respuestas son expresadas como cambios reversibles en morfología, conducta o de atributos de historia de vida, lo que implica un costo de *fitness* en estos organismos y sus poblaciones. La exposición a químicos de fuentes antrópicas, como pesticidas, en bajas dosis pueden causar efectos subletales sobre los organismos, lo que potencialmente generaría costos asociados a mecanismos de detoxificación y reparación. Considerando que los organismos son capaces de invertir energía y materiales en mecanismos que les permiten disminuir los efectos nocivos tanto de la depredación como de la contaminación química, es esperable la existencia de un compromiso entre las respuestas de las poblaciones sometidas a ambas señales. En este estudio se indagó sobre los mecanismos y consecuencias ecológicas de las interacciones entre factores naturales y antropogénicos, particularmente la exposición a sustancias químicas informativas de riesgo ambiental de distinta naturaleza. Específicamente (1) se evaluó el efecto de la expresión de defensas antidepredatorias inducibles en el rotífero de agua dulce *B. calyciflorus* sobre la tolerancia al pesticida Metamidofos y (2) se evaluó el efecto de la exposición a Metamidofos sobre los costos de la expresión de defensas antidepredatorias inducibles en *B. calyciflorus*. Nuestros resultados muestran: (a) que la expresión de defensas inducibles en *B. calyciflorus* no tuvo efectos sobre su tolerancia a Metamidofos, evaluada en su tasa de crecimiento poblacional; (b) en la generación parental no se observó un incremento en costos asociados a la expresión de defensas,

derivados de la exposición al pesticida Metamidofos. Sin embargo, en la descendencia se observó una variación en su número, tasas de crecimiento poblacional y abundancias proyectadas, efectos que fueron dependientes de la edad de la madre. Fue remarcable que, como consecuencia de la exposición a Metamidofos, los organismos incrementaron su esfuerzo reproductivo en su primera camada, produciendo un menor número de crías pero de mayor calidad. La respuesta poblacional de *B. calyciflorus* a la interacción entre presiones naturales (riesgo de depredación) y antropogénicas (exposición a pesticidas) ponen de manifiesto la relevancia y complejidad de los efectos transgeneracionales del ambiente materno en poblaciones zooplanctónicas y sugiere así mismo que la evaluación de efectos de factores aislados no permite una evaluación global del funcionamiento de los sistemas biológicos.

Palabras clave: Pesticida, kairomona, *B. calyciflorus*, defensas antidepredatorias, efecto transgeneracional

1. Introducción

La biodiversidad acuática se encuentra determinada por numerosos factores ambientales naturales, entre los que destacan la limitación de recursos, la depredación y condiciones abióticas particulares. Adicionalmente, las actividades humanas generan perturbaciones ambientales que interactúan con los factores naturales afectando potencialmente la estructura y dinámica de las comunidades, de maneras muchas veces desconocida.

Entre los factores naturales que modulan las comunidades acuáticas, la depredación es considerada como la mayor fuerza estructuradora de este tipo de sistemas (Murdoch et al. 1984, Lampert 1987). La depredación ejerce una presión severa sobre los organismos, con diversas consecuencias en su adecuación biológica, lo que frecuentemente impulsa el desarrollo respuestas adaptativas o estrategias antidepredatorias. Éstas pueden clasificarse en: (1) defensas constitutivas, que están presentes en organismos expuestos a riesgo de depredación constante, de modo que selectivamente son favorecidas defensas permanentes (Lima and Dill 1990) y (2) defensas inducibles, las que pueden definirse como un proceso plástico y reversible que incrementa la adecuación biológica en presencia de depredadores, a través de modificaciones fenotípicas conductuales, morfológicas o de historias de vida (Harvell and Tollrian 1999). Las defensas inducibles corresponden a respuestas fenotípicas plásticas, desarrolladas por los organismos frente a riesgo de depredación variable (Sih et al. 2000) y por tanto, a diferencia de las primeras, son expresadas solamente cuando el beneficio adaptativo obtenido es mayor al costo de generar y mantener la defensa (Stemberger 1988; Harvell 1990; Padilla and Adolph 1996, Tollrian and Harvell 1999).

Algunos costos asociados a este tipo de respuestas plásticas han sido identificados a nivel de individuos (Lima 1998, Tollrian and Harvell 1999, Relyea 2002, Benard 2004), de poblaciones (Stemberger 1988, Gilbert 2009, Aránguiz-Acuña et al. 2011a) y de comunidades (Taylor and Gabriel 1992; Werner and Anholt 1996; Tollrian and Dodson 1999; Relyea 2000, 2001; Werner and Peacor 2003; Garay-Narváez and Ramos-Jiliberto 2009, Aránguiz-Acuña et al. 2011b). Sin embargo, la variación de estos costos producto de la interacción con otras señales informativas de estresores de distinta naturaleza no son frecuentemente consideradas (ver Lass and Spaak 2003).

Adicionalmente, la expresión de defensas morfológicas, tales como las comúnmente observadas en especies zooplanctónicas, no es inmediata sino que experimenta un retraso generacional (e.g. rotíferos, Gilbert 1966; y cladóceros, Agrawal et al. 1999). El efecto del ambiente materno sobre la descendencia proporciona un mecanismo de adaptación transgeneracional de las respuestas plásticas fenotípicas, donde los estímulos ambientales que experimenta la madre modifican el fenotipo de su descendencia (Mousseau and Fox 1998). Luego, es esperable que la descendencia que obtiene el beneficio de la defensa pague los costos putativos asociados al estímulo experimentado por sus madres (Tollrain and Harvell 1999).

El estudio de las respuestas antidepredatorias inducibles ha concertando en la última década un amplio interés en el ámbito teórico y empírico debido a su ubicuidad, particularmente en especies acuáticas (Van Donk et al. 1999; Lürling and Van Donk 2000; Van Buskirk 2000) y a su efecto estabilizador sobre la dinámica de las comunidades. Existe amplia evidencia de que el desarrollo de defensas inducibles

disminuyen las fluctuaciones poblacionales y con ello el riesgo de extinción de dichas poblaciones, lo que revela su importancia en el mantenimiento de la biodiversidad (Ramos-Jiliberto 2003, Vos et al. 2004, Verschoor et al. 2004, Aránguiz-Acuña et al. 2011a).

Por otro lado, entre los factores antropogénicos determinantes de la estructura y dinámica de las comunidades, la contaminación de los ecosistemas ha sido identificada como una de las principales fuentes de degradación ambiental (Primack 2010), amenazando seriamente el mantenimiento de la biodiversidad (Millennium Ecosystem Assessment 2005). Los sistemas acuáticos continentales son comúnmente sumideros de residuos de diversas actividades antrópicas, como aguas residuales domésticas y residuos agroindustriales de amplio uso, como pesticidas y fertilizantes (Primack 2008).

Una gran variedad de pesticidas ingresan a los sistemas acuáticos a través de distintas vías, como son el rociado no intencional, las corrientes aéreas o la escorrentía, con diversos efectos sobre las poblaciones residentes (ver Schulz 2004). Dependiendo de la concentración y de la toxicidad de los pesticidas, su liberación al ambiente puede conducir a la disminución de las densidades poblacionales a través de efectos letales, por un incremento en la mortalidad, o a través de efectos subletales, por una disminución de la reproducción causada por la modificación de rasgos conductuales, morfológicos o de historia de vida de los individuos, como edad de la primera reproducción, fecundidad, periodo reproductivo y longevidad (Preston et al. 1999a; Preston et al. 1999b; Marcial and Hagiwara 2007). Los efectos letales de los pesticidas sobre las poblaciones acuáticas son comúnmente cuantificados en pruebas de toxicidad en laboratorio, las que

usualmente emplean especies indicadoras aisladas (ASTM 1988; OECD 1993; EPA 1994; NCh2083 1999; NCh2706 2002). Efectos sub-letales de la exposición a pesticidas de poblaciones acuáticas involucran mecanismos defensivos o compensatorios. Un ejemplo de estos últimos es el proceso que sufren los contaminantes orgánicos, que pueden ser eliminados rápidamente o a través de distintas fases, con la subsecuente eliminación de metabolitos, mediante un proceso llamado biotransformación (Newman 2001).

En síntesis, la depredación y la contaminación son dos importantes factores (natural y antropogénico, respectivamente) moduladores de la estructura y dinámica de poblaciones acuáticas. Ambos factores ejercen efectos letales y subletales sobre los individuos, e impactan en forma directa o indirecta a los componentes de las comunidades. Sin embargo, considerando que los organismos son capaces de invertir materiales y energía en mecanismos fisiológicos, conductuales y morfológicos que les permiten disminuir los efectos nocivos, tanto de la depredación como de la contaminación química, es esperable la existencia de un compromiso entre las respuestas de las poblaciones sometidas a ambas señales, lo que podría conducir a un conflicto entre la tolerancia a contaminantes y la invulnerabilidad a la depredación.

En este estudio se intenta avanzar en el entendimiento de los mecanismos y consecuencias ecológicas de las interacciones entre factores naturales y antropogénicos, particularmente a través de la generación de señales químicas informativas de riesgo ambiental de distinta naturaleza. Con este horizonte, los objetivos de este trabajo son (1) evaluar el efecto de la expresión de defensas antidepredadoras inducibles en un

herbívoro acuático sobre la tolerancia a un pesticida de amplio uso (Metamidofos) y (2) evaluar el posible incremento en costos de la expresión de defensas antidepredatorias inducibles en un herbívoro acuático derivado de la exposición a Metamidofos. Para esto se implementó un sistema experimental compuesto por especies planctónicas de extensa distribución, el rotífero herbívoro *Brachionus calyciflorus*, la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* como recurso alimenticio, e infoquímicos (kairomona) del rotífero carnívoro *Asplanchna girodi* como inductor de defensas antidepredatorias.

Mediante el logro de estos objetivos se espera probar las siguientes hipótesis:

- 1) Individuos de *B. calyciflorus* con morfos defendidos presentarán una menor tolerancia al pesticida Metamidofos.
- 2) La exposición a Metamidofos, incrementará los costos de la expresión de defensas antidepredatorias inducibles en *B. calyciflorus*.

2. Materiales y Métodos

2.1 Cultivo de organismos experimentales

Los organismos zooplanctónicos utilizados, fueron obtenidos de dos embalses templados de la zona central de Chile, en marzo de 2011. El depredador *Asplanchna girodi* fue aislado del embalse Rapel (34°09'S-71°26'W) y el herbívoro *Brachionus calyciflorus* del embalse Lo Orozco (33°23'S- 71°42'W). Se generaron cultivos de un único linaje clonal a partir de una hembra partenogénica, y se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio controladas (pH 7,5±0,1, temperatura 20±1°C, fotoperiodo 16:8, luz:oscuridad) por aproximadamente 6 meses previo a ser usados en experimentos.

Los cultivos stock de ambas especies fueron mantenidos en medio MBL Woods Hole modificado (Stemberger 1981). El herbívoro *B. calyciflorus* fue alimentado con la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* en densidad de $5 \cdot 10^5$ células·mL⁻¹ y el depredador *A. girodi* fue alimentado con *B. calyciflorus* en densidad de 1 ind·mL⁻¹. El medio de cultivo y el alimento de los stocks fue renovado cada 48 h.

2.2 Preparación de los medio de cultivos experimentales

Con el propósito de identificar la concentración mínima de la señal de depredación (kairomona), requerida para inducir defensas en la presa, se realizaron pruebas preliminares con medio precondicionado en un gradiente de densidades del depredador *Asplanchna girodi*. En base a estos resultados se definió una densidad de 0,5 ind·mL⁻¹

como umbral suficiente para la expresión de una defensa. La defensa obtenida en individuos de *B. calyciflorus* con esta concentración consistió en un incremento promedio de 45% de las espinas anteriores y 130% de las espinas posteriores, medidos en 50 individuos adultos de *B. calyciflorus*.

Para la realización de los experimentos se preparó un medio precondicionado con *A. girodi* (tratamientos k+) en la densidad umbral señalada, con recambio de medio en régimen diario, manteniendo *Asplanchna* en densidad de $0,5 \text{ ind}\cdot\text{mL}^{-1}$ más *B. calyciflorus* que sirvieron de presa ($1 \text{ ind}\cdot\text{mL}^{-1}$). Para los tratamientos sin kairomona (k-) se preparó un medio sin *Asplanchna*, sólo con la presa del depredador en igual densidad que el tratamiento anterior. En la preparación del medio precondicionado, cada día los rotíferos fueron removidos del medio tras permanecer en él por 24 h, con ayuda de un filtro de $50 \mu\text{m}$. El medio fue entonces filtrado a través de un filtro de membrana de $0,2 \mu\text{m}$, y el pH ajustado a $7,5 \pm 0,1$ para ser utilizado como medios experimentales.

Para cada uno de los experimentos, presentados más adelante, se reservaron 30 individuos provenientes de medio k- y 30 individuos provenientes de medio k+, para corroborar la presencia de defensas en los individuos expuestos a la señal de inducción. Para esto se contrastó la medida de las espinas posteriores, registrada para cada individuo, con el percentil 95 de la distribución de medidas obtenidas en los individuos sin inducción (k-). De esta manera se categorizó la medida de las espinas posteriores con valores 1 o 0, según si el atributo resultó mayor o menor que el percentil 95. Se expresó el resultado en porcentaje de inducción para cada uno de los experimentos.

El pesticida utilizado en este estudio corresponde a Metamidofos, un plaguicida organofosfatado soluble en agua, de nombre comercial: Monitor 600. Este insecticida, catalogado por el SAG como muy tóxico (Ib), correspondiente a la Clasificación toxicológica de plaguicidas en concordancia con los criterios de la Organización Mundial de la Salud (SAG 2000, 2012). En Chile, Metamidofos es utilizado extensivamente para combatir insectos plagas de variadas hortalizas, frutales y maíz.

La concentración utilizada fue seleccionada en base a pruebas preliminares de toxicidad sobre el recurso basal *P. subcapitata* y sobre el rotífero, las que arrojaron una inhibición en el crecimiento de la microalga a una concentración de $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (LOEC) del pesticida ($P < 0,001$) y una concentración letal para el 50% de la población (LC50) para *B. calyciflorus* de $2,24 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. En base a estas concentraciones seleccionadas se realizaron las diluciones definidas para los ensayos con el rotífero *B. calyciflorus*.

2.3 Efecto de la inducción de defensas sobre la tolerancia a un pesticida

A partir de los cultivos de *B. calyciflorus* inducidos y no inducidos (k- y k+) se seleccionaron 180 neonatos de menos de 6 horas de edad que serán cultivados posteriormente en medio libre de la señal de depredación (k-), de los cuales se reservaron individuos para fotografiar y confirmar la presencia de defensas. Los restantes 150 individuos fueron utilizados en el experimento. En tubos de ensayo con 10 mL de medio fueron inoculados 5 individuos, i.e. en densidad de $0,5 \text{ ind}\cdot\text{mL}^{-1}$, en medio libre de kairomona, con *P. subcapitata* como alimento, en densidad de $5\cdot 10^5 \text{ células mL}^{-1}$.

¹ y en un gradiente de pesticida: 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 y 1,6 mg·L⁻¹. Cada tratamiento fue replicado 5 veces y las condiciones experimentales fueron las mismas descritas previamente.

Experimentos de tabla de vida fueron conducidos con 2 factores: defensa (inducida/no inducida) y pesticida (en los seis niveles señalados), en orden a obtener un registro diario de reproducción y sobrevivencia. Se calculó la tasa finita de crecimiento poblacional utilizando la ecuación discreta de Euler-Lotka:

$$1 = \sum e^{-rx} l_x m_x \quad (1)$$

con $\lambda = e^r$ donde l_x y m_x son las funciones de sobrevivencia y de maternidad, respectivamente.

Para identificar diferencias entre valores de λ obtenidos en tratamientos de defensa y el gradiente de pesticida, se realizó un ANOVA de dos vías con aleatorizaciones (1500 aleatorizaciones, Manly 1997).

2.4 Efectos de un pesticida sobre los costos demográficos asociados a la presencia de defensas antidepredatorias

Del cultivo stock de *B. calicyflorus* se seleccionaron neonatos, los que fueron utilizadas para iniciar dos cultivos de 500 mL con una densidad de 1 ind·mL⁻¹. Uno de los cultivos fue mantenido con medio sin señal de inducción (k-), y el otro con medio con kairomona (k+), preparados como fue indicado previamente. Estos cultivos fueron mantenidos con

renovación diaria de medio y alimento en densidad $5 \cdot 10^5$ células·mL⁻¹. Transcurridos 5 días, se seleccionaron 300 hembras de cada morfo, portadoras de huevos, de las cuales se obtuvieron 150 neonatos (generación F1) de menos de 6 horas de edad. De cada tratamiento, 30 organismos fueron reservados para fotografiar y posteriormente evaluar la presencia de defensas antidepredatorias mediante la medición de estructuras morfológicas. Los restantes 120 individuos fueron utilizados en el experimento.

Se inocularon tubos de ensayo con 10 mL de medio y alimento en densidad de $5 \cdot 10^5$ células·mL⁻¹ con 5 individuos cada uno. Neonatos provenientes de madres de ambos morfos fueron sometidos a los siguientes tratamientos: a) un control con medio fresco, i.e., sin kairomona y sin pesticida (k-p-), b) tratamiento con kairomona y sin pesticida (k+p-), c) tratamiento sin kairomona y con pesticida, en concentración de 0,2 mg·L⁻¹ de Metamidofos (k-p+) y d) tratamiento con kairomona y con pesticida en igual concentración (k+p+). El experimento fue conducido a 17°C, 1000 lux y fotoperíodo 16:8 luz:oscuridad. Cada tratamiento fue replicado 6 veces, por lo que el experimento consistió en un diseño 2 (kairomona k+ y k-) \times 2 (pesticida 0 y 0,2 mg L⁻¹) \times 6 (réplicas) = 24 tubos experimentales. Diariamente se registró la sobrevivencia y la reproducción de los organismos de la generación F1. Se calculó la tasa finita de crecimiento poblacional (ver ecuaciones 1 y 2). Para identificar diferencias de valores de λ de F1, entre tratamientos se realizó un ANOVA de dos vías con pesticida y kairomona como factores, y un test post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples.

Las crías de F1, i.e. F2, fueron separadas diariamente y cultivadas en medio control (libre de pesticida y kairomona) en densidad de 1 ind·mL⁻¹, de acuerdo a la edad

de sus madre al momento de su nacimiento. La sobrevivencia y la reproducción de cada cohorte fue registrada cada 24 h hasta el cuarto día después de su primera reproducción. Se registró como edad post-reproductiva, el tiempo (días) tras el primer evento reproductivo de cada unidad experimental.

Con el propósito de evaluar la existencia de diferencias causadas por el pesticida entre las crías F2 de madres expuestas a los tratamientos con kairomona y pesticida se estimaron los valores de λ para un período de 4 días después de la primera reproducción, marco de tiempo suficiente para aproximarse al máximo potencial reproducción en estos organismos, ya que al día 4 después de la madurez se ha reproducido el 94% de las crías.

En F2 también se estimaron los efectos de la kairomona de tres maneras: (i) sobre la cantidad de crías producidas en cada cohorte, (ii) sobre la calidad de dichas crías (λ), y (iii) sobre la abundancia poblacional proyectada (que integra cantidad y calidad de la progenie) a partir de las crías. El efecto de la kairomona sobre λ y sobre la cantidad de crías se estimó por diferencias simples relativo al control. La proyección del crecimiento poblacional de cada una de las cohortes obtenidas bajo cada tratamiento, se obtuvo mediante la ecuación recursiva:

$$n_t = n_0 \lambda^t \quad (3)$$

Posteriormente se obtuvieron las abundancias relativas de cada cohorte, a través del tiempo. Finalmente se calculó por diferencias, el efecto de la kairomona sobre las abundancias relativas proyectadas.

3. Resultados

3.1 Efecto de la inducción de defensas sobre la tolerancia a un pesticida

El tamaño de las espinas posteriores en individuos sin inducción fue de $0,034 \pm 0,035\mu\text{m}$ (media \pm DS) y el de los individuos defendidos fue de $0,081 \pm 0,007\mu\text{m}$ (media \pm DS), estableciéndose un porcentaje de incremento en las espinas posteriores de 138% y un porcentaje de inducción en el 96,6% de los individuos medidos.

No hubo efecto de la interacción de pesticida y condición de defensa sobre las tasas de crecimiento de *B. calyciflorus* (ANOVA, $p = 0,785$), sino que sólo se observó un efecto del pesticida en la disminución del crecimiento poblacional ($p < 0,001$).

Las tasas de crecimiento de *B. calyciflorus* obtenidas para el gradiente de pesticida probado, alcanzaron valores significativamente mayores a 1 en concentraciones $\leq 0,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de pesticida y λ no difirió de 1 en la concentración de $1,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. No se registraron diferencias en λ entre morfos de *B. calyciflorus* en todo el rango de concentraciones de pesticida probadas (Fig. 1).

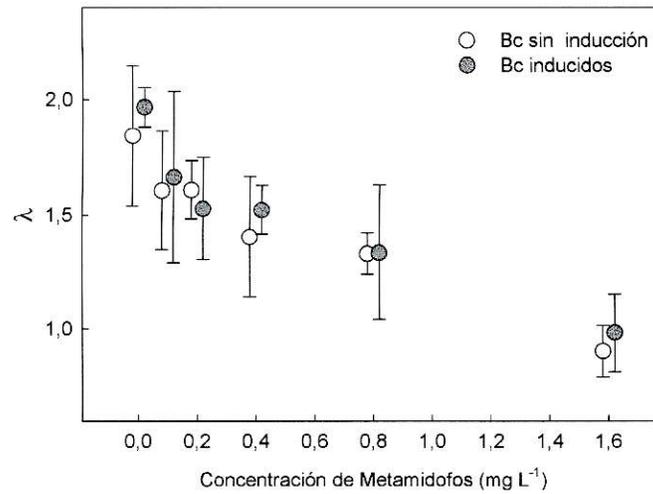


Figura 1: Tasa de crecimiento poblacional (λ) de *B. calyciflorus* con defensa morfológica inducida y sin previa inducción, bajo un gradiente de concentraciones del pesticida metamidofos. Se muestran valores medios y barras de error correspondientes a intervalos de confianza del 95%

3.2 Efectos del pesticida sobre los costos demográficos asociados a la presencia de defensas antidepredatorias

Los valores de λ obtenidos para la generación F1 difieren significativamente entre tratamientos sin y con adición de pesticida ($P < 0,001$). En estos últimos, se obtuvieron valores menores a los obtenidos en la condición control. No se observó un efecto de la adición de kairomona sobre el crecimiento de F1 en ninguno de los tratamientos (Fig. 4). Se estableció un porcentaje de elongación de las espinas posteriores de 145%, en el 96,6% de los individuos medidos.

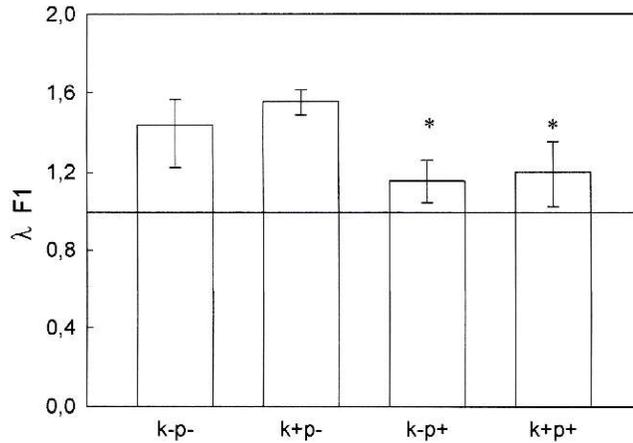


Figura 2: Tasa de crecimiento λ_1 de la primera generación F1 de *B. calyciflorus* defendidos (k+) y sin inducción de defensa (k-), expuestos a dos niveles de pesticida: presente (p+) y ausente (p-). Se muestran los valores medios y barras de error correspondientes a intervalos de confianza de 95%. Los asteriscos indican diferencias significativas, Tukey <0,001.

Los valores de λ de la generación F2 varían en tratamientos con pesticida y kairomona, siendo este cambio dependiente de la edad de las madres al momento del nacimiento de F2 (Figura 3). Las tasas de crecimiento observadas alcanzan valores mayores a 1, lo que da cuenta de poblaciones crecientes para todos los casos, a excepción de las crías de madres de edad post-reproductiva >4 días expuestas a kairomona y a pesticida, y de 5 días en el tratamiento con pesticida. Tanto en los tratamientos control, como en el tratamiento de madres expuestas sólo a kairomona, las crías de madres jóvenes (edad post-reproductiva 1) alcanzan un crecimiento menor a lo obtenido por las crías de madres de edad post-reproductiva mayor a dos días. En la condición control, esta tasa de crecimiento es menor a las obtenidas con los otros

tratamientos para madres de edad post-reproductiva 1. Sin embargo, al incrementar la edad de la madre, la tasa de crecimiento de las crías alcanza los más altos valores observados, respecto de los restantes tratamientos. El patrón es similar en tratamiento de madres expuestas solamente a kairomona, con un valor de λ menor en crías de madres de 1 día de edad post-reproductiva y un incremento con madres de edad 2, que luego se torna independiente de la edad de la madre. Este patrón se modifica con la adición de pesticida. En los tratamientos sólo con pesticida, la tasa de crecimiento es relativamente independiente de la edad de las madres hasta la cohorte proveniente de madres de edad post-reproductiva de 4 días y menor que en los tratamientos k-p- y k+p- (excepto para crías de madres de edad post-reproductiva 1). En los tratamientos con adición de kairomona y pesticida, las crías provenientes de madres de edad post-reproductiva 1 presentan el mayor valor de λ , sin embargo éste disminuye a medida que aumenta la edad de sus madres, hasta alcanzar los menores valores observados (<1). En ambos tratamientos de adición de pesticida, se observó una significativa reducción en el crecimiento de la cohorte proveniente de madres de 5 días, en los que se obtuvieron valores igual a cero (en el tratamiento k-p+) o levemente superior a cero (tratamiento k+p+). Esto debido a una disminución o ausencia de reproducción.

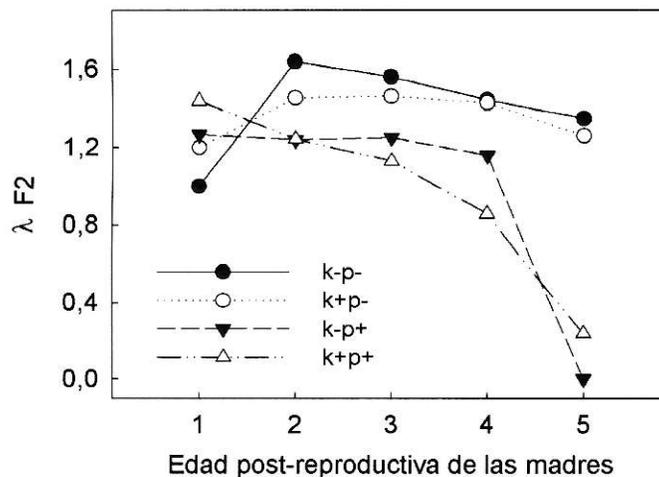


Figura 3: Tasas de crecimiento poblacional de crías (F2) según la edad post-reproductiva de sus madres (F1) expuestas a diferentes tratamientos de kairomona y pesticida. Círculos negros con línea continua corresponden a madres cultivadas en medio control (k-p-); círculos vacíos con línea punteada corresponden a madres cultivadas en medio con kairomona (k+p-); triángulos negros con línea discontinua corresponden a madres cultivadas en medio con pesticida (k-p+); triángulos vacíos con línea punteada y discontinua corresponden a madres cultivadas en medio con kairomona y pesticida k+p+.

En la Figura 4 se muestra la magnitud relativa del efecto de la adición de kairomona en el ambiente materno sobre la tasa de crecimiento de las crías, respecto de las distintas edades post-reproductivas de sus madres. El efecto de la exposición de madres a la kairomona es opuesto en crías provenientes de madres jóvenes (de 1 día) respecto de las crías provenientes de madres mayores. El efecto de la kairomona fue positivo para el crecimiento de la cohorte de hijas de madres de un día de edad post-reproductiva, e independiente de la exposición a pesticida. Contrariamente, el efecto de la adición de kairomona en las madres cultivadas en ausencia de pesticida presentan valores negativos. Con pesticida, en cambio, el efecto negativo de la exposición a kairomona está directamente relacionado con la edad de las madres. Para la edad post-

reproductiva 5 no se puede determinar el la magnitud de λ , debido a que λ en k-p+ fue cero.

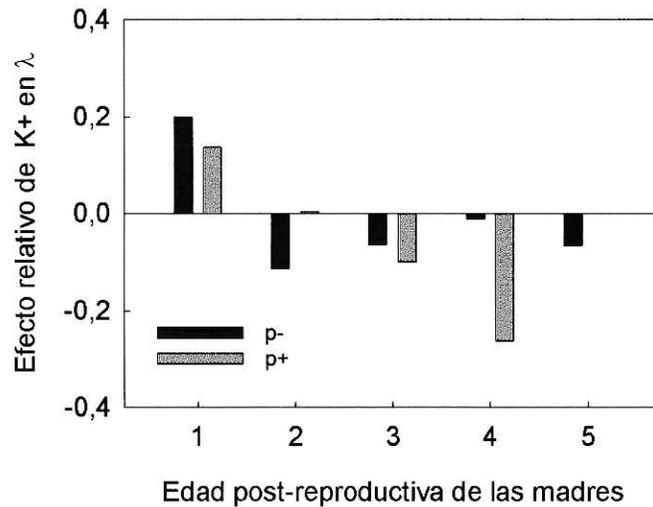


Figura 4: Magnitud del efecto de la adición de kairomona sobre la tasa de crecimiento poblacional de las crías, a diferentes edades post-reproductiva de sus madres. Los tratamientos con y sin pesticida se indican con p+ y p-, respectivamente.

Los tratamientos sin pesticida generaron un mayor número de crías de F1 que las nacidas en medio con el químico, ya sea con kairomona como sin ella. En el tratamiento sólo con kiromona se obtuvo un peak de abundancias en la edad post-reproductiva 2, disminuyendo en la medida que aumentó la edad de las madres. La mayor abundancia de crías obtenidas en medio k-p- también se da con madres entre edades 2 y 3, y disminuye hacia la edad 5. Los tratamientos con pesticida generaron abundancias de crías similares entre tratamientos de adición vs. no adición de kairomona, y esta abundancia es menos variable en el rango de edades de las madres (Fig. 5).

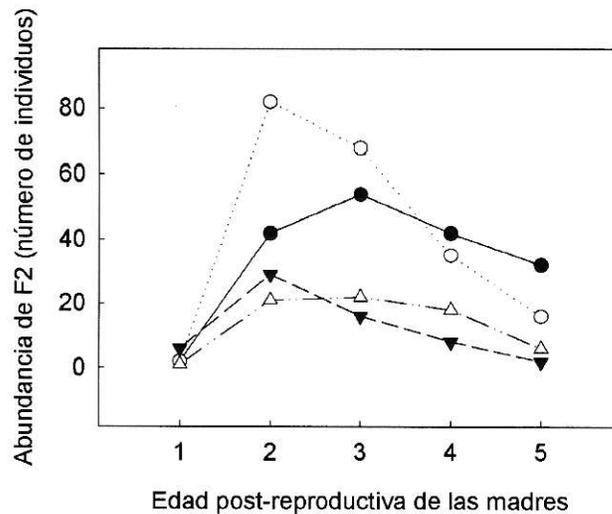


Figura 5: Número de crías producidas (individuos de F2) a través de distintas edades post-reproductivas de las madres expuestas a diferentes tratamientos de kairomona y pesticida. Círculos negros con línea continua corresponden a madres cultivadas en medio control (k-p-); círculos vacíos con línea punteada corresponden a madres cultivadas en medio sólo con kairomona (k+p-); triángulos negros con línea discontinua corresponden a madres cultivadas en medio sólo con pesticida (k-p+); triángulos vacíos con línea punteada y discontinua corresponden a madres cultivadas en medio con kairomona y pesticida k+p+.

A partir del número de individuos de F2 se obtuvo el efecto relativo de la kairomona para los casos con pesticida (p+) y sin pesticida (p-) (Figura 6). Se observa un efecto positivo con madres de edades 2 y 3 en el tratamiento p-, y está inversamente relacionado con la edad post-reproductiva de sus madres. El patrón opuesto se observa en el tratamiento p+, en el que el efecto de la adición de kairomona es negativo sobre crías provenientes de madres de edad 1 e incrementa a valores positivos en la medida que aumenta la edad de las madres.

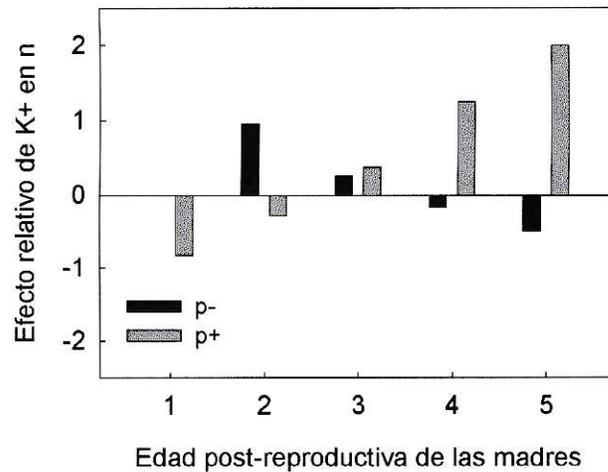


Figura 6: Efecto relativo de la kairomona (k^+) en el número de individuos de F2.

En la figura 7 se observa la proyección temporal de las abundancias relativas de cada cohorte. En el tratamiento control, i.e. k^- , el aporte mayoritario a la abundancia está dado por la segunda generación, que sobre el día 90 de proyección poblacional, corresponde al aporte exclusivo obtenido en dicho tratamiento. En el tratamiento de exposición a pesticida y señal de depredación, *B. calyciflorus* alcanza la mayor abundancia relativa en la primera cohorte, y a partir de los 60 días de proyección, corresponde al 100% de la abundancia lograda en ese tratamiento. En los tratamientos k^+ y k^+p^- , las mayores abundancias relativas son obtenidas de las generaciones 2 y 3, a los 30 días de proyección, lo que se mantiene en el tratamiento de adición de kairomona, en donde los aportes de cada generación se equiparan a través del tiempo. Con adición exclusiva de pesticida, en cambio, los aportes de las generaciones intermedias disminuyen a través del tiempo, dominando progresivamente el aporte de la primera generación.

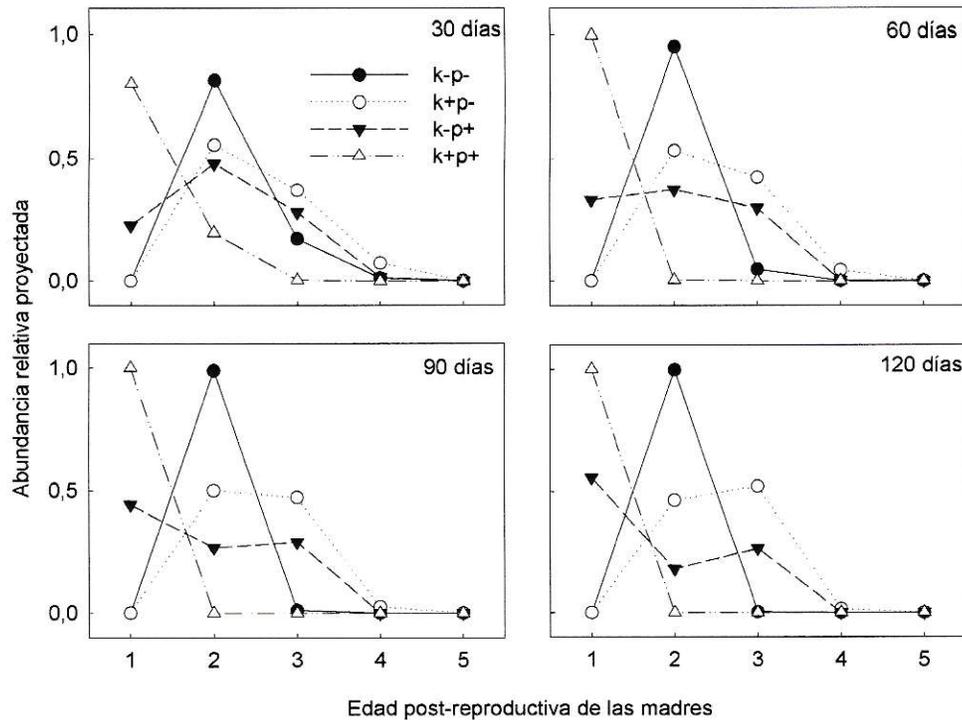


Figura 7: Abundancias relativas proyectadas en 30, 60, 90 y 120 días, a través de distintas edades post-reproductivas de las madres expuestas a diferentes tratamientos de kairomona y pesticida. Círculos negros con línea continua corresponden a madres cultivadas en medio control (k-p-); círculos vacíos con línea punteada corresponden a madres cultivadas en medio sólo con kairomona (k+p-); triángulos negros con línea discontinua corresponden a madres cultivadas en medio sólo con pesticida (k-p+); triángulos vacíos con línea punteada y discontinua corresponden a madres cultivadas en medio con kairomona y pesticida k+p+.

La figura 8 presenta el efecto de la adición de kairomona (k+) en la abundancia relativa obtenida de cada cohorte proveniente de las distintas edades post-reproductivas de las madres, proyectada en 30, 60, 90 y 120 días a través de distintas edades post-reproductiva de las madres.

Se observan similares tendencias a través de la ventana temporal de proyección realizada. La condición con pesticida generó un efecto positivo para el crecimiento de la cohorte proveniente de madres de edad 1, mientras que con madres mayores tuvo efectos

negativos o nulo. La condición sin pesticida no muestra efecto sobre el crecimiento de la cohorte proveniente de madres de edad 1, mientras que para la cohorte proveniente de madres de edad 2 el efecto es negativo y positivo en edades superiores. No se observa, por tanto, un patrón claro de efecto en el crecimiento de las cohortes relativo a la edad de sus madres, ni tampoco una alteración de estos efectos en el corto y mediano plazo.

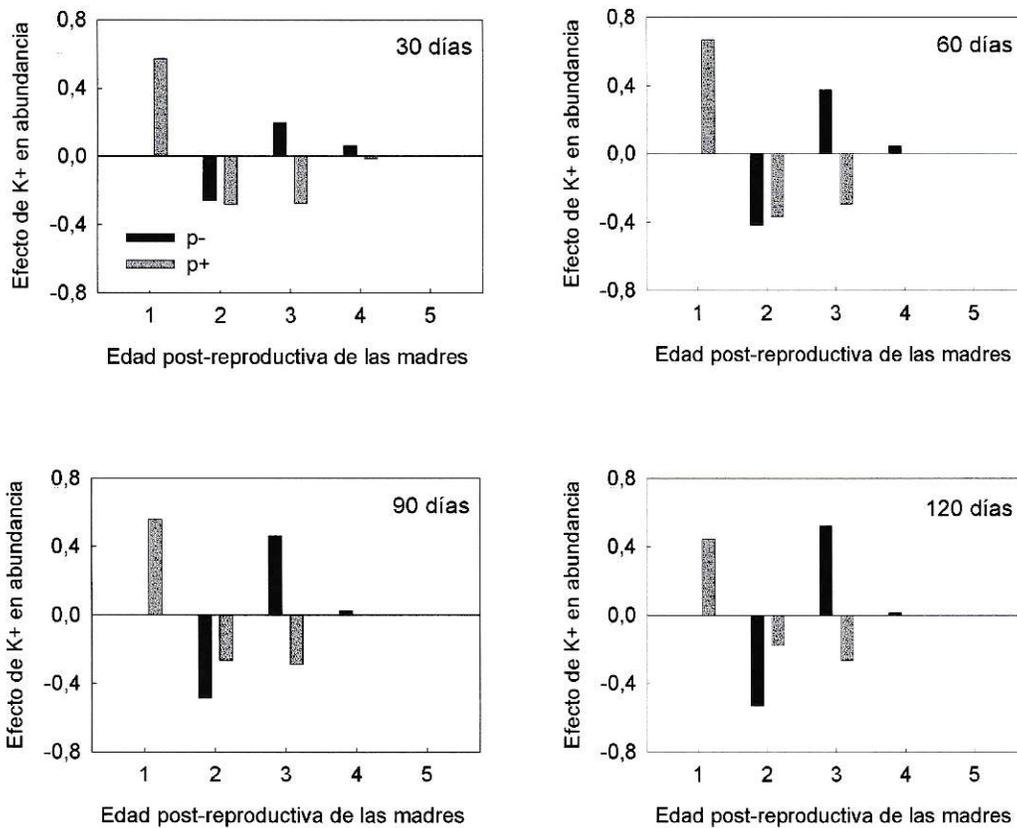


Figura 8: Efecto de la kairomona (k+) en la abundancia relativa de cada “cohorte” proyectado en 30 , 60, 90 y 120 días a través de distintas edades post-reproductivas de las madres. Barras negras condición sin pesticida (p-), barras grises condición con pesticida (p+)

4. Discusión

La exposición a señal de depredación de *Asplanchna* indujo en *Brachionus calyciflorus* la generación de crías con morfos defendidos. Sin embargo, la inducción de estas modificaciones morfológicas, consistentes principalmente en elongación de espinas anteriores y postero-laterales, no modificaron la tolerancia de los organismos a concentraciones subletales del pesticida Metamidofos. Previamente Hanazato and Dodson (1992) reportaron un resultado diferente, en el cual *Daphnia pulex* presentó una menor tolerancia al pesticida Carbaryl al estar presente la señal de depredación, donde una reducción en la tasa de crecimiento poblacional se explicaría por un sinergismo entre los dos estresores. Sin embargo, a diferencia de nuestro trabajo, donde el pesticida se aplicó a individuos previamente defendidos, en el trabajo de Hanazato and Dodson (1992) los organismos fueron expuestos al mismo tiempo a los dos estresores y, por tanto, la menor tolerancia a Carbaryl podría ser atribuida a la disrupción en la información química de la señal de depredación causada por el contaminante (Lürling and Schefer 2007).

Al analizar el efecto de la exposición a Metamidofos sobre los costos de la expresión de defensas, nuestros resultados no permitieron demostrar cambios en costos en la generación parental, donde sólo la exposición al pesticida causó una disminución en el fitness. Sin embargo, los efectos esperados se expresaron en la descendencia de las madres expuestas a ambos químicos, respuesta que fue dependiente de la edad de la madre. En particular, nuestros resultados sugieren que, frente a la exposición al

pesticida, los organismos expuestos a la señal de inducción reaccionan modificando su esfuerzo reproductivo en su primera camada, produciendo un menor número de crías pero de mayor calidad, expresada a través de una mayor tasa intrínseca de crecimiento poblacional (λ). Esta respuesta se modificó a partir de la segunda camada donde el efecto del pesticida causó un incremento en el costo de la defensa. Concordante con lo anterior, cuando el crecimiento de cada cohorte se proyectó a través del tiempo, se observó que en crías de hembras inducidas, el efecto del pesticida generó una mayor abundancia en la primera cohorte, mientras que cohortes más tardías no aportaron en la abundancia proyectada. Si bien existen estudios previos donde se reportan efectos sinérgicos entre toxicidad de ciertos pesticidas y la presencia de señales de depredación sobre la respuesta demográfica en diferentes especies animales (Barry 1998; Relyea 2003; Teplitsky et al. 2005), no han sido reportados incrementos en los costos de las defensas derivados de la exposición a pesticidas expresados transgeneracionalmente. En síntesis, una mayor asignación de recursos al incremento de la calidad de la descendencia temprana sería la estrategia utilizada por *B. calyciflorus* como respuesta al efecto del pesticida en hembras expuestas a la señal de depredación.

La menor calidad de las crías registrada en madres de mayor edad se ha observado previamente en rotíferos bajo otras condiciones experimentales, donde la calidad de las crías fue medida como tamaño corporal (Schröder and Gilbert 2009). En diferentes especies, el valor de ciertos componentes del fitness de las crías disminuye con la edad de las madres. Ejemplo de ello es el reducido tamaño y contenido de nutrientes en una especie de avispa parasítica (Giron and Casas 2003), o menor

sobrevivencia y fecundidad, en crías de coleópteros provenientes de madres de mayor edad (Opit and Throne 2007). En especies del zooplancton (copépodos), el tamaño de huevos, de camadas y el de individuos en estadio copepodito C1, disminuye con la edad de las madres, haciendo una menor contribución al crecimiento poblacional que crías de madres jóvenes (Jamieson and Santer 2003). En nuestros resultados, la adición de pesticida modificó cualitativamente este patrón, y generó una respuesta compensatoria en la población, con una mayor producción de crías en cohortes tardías, lo que sin embargo no se tradujo en un mayor crecimiento proyectado para esas cohortes.

A nivel fisiológico, ciertos pesticidas organofosforados como Metamidofos, inactivan la enzima acetilcolinesterasa (AChE) lo que, entre otros efectos, puede inhibir la ovoposición, causando retención de huevos en la cavidad corporal (Nogrady and Keshmiriam 1986). Este mecanismo podría explicar, al menos parcialmente, la disminución en el número de crías a consecuencia de la adición de pesticida. Adicionalmente, en oocitos en desarrollo, la actividad de la acetilcolinesterasa es localizada en la membrana celular y en el citoplasma, así como en el puente citoplasmático que conecta el oocito con el vitelario a través del cual los factores maternos sintetizados en el vitelario son transportados a los oocitos en formación (Ver Rainieri 1984). Esto podría explicar la expresión observada de efectos maternos, en que la exposición materna a los químicos generó una reducción en el fitness de sus crías.

Nuestros resultados indican que la exposición de los organismos a dos presiones ambientales, como son la señal de riesgo de depredación y el pesticida, gatilla respuestas complejas a nivel individual y poblacional producto del efecto interactivo entre los químicos. La exposición a kairomonas y al pesticida modificó la relación entre calidad

de las crías y edad de las madres, lo que podría generar la extinción de las líneas isogénicas provenientes de madres más viejas, debido a la progresiva disminución de su fecundidad (ver Schröder and Gilbert 2009). Adicionalmente, en estudios previos se ha observado una relación inversa entre la proporción de hembras míticas producidas y la edad de sus madres (Rougier and Pourriot 1977; Gilbert and Scroder 2007). De esta manera se podría esperar que la interacción de ambos estresores genere consecuencias en el balance entre: i) crecimiento poblacional vía partenogénesis y ii) la sobrevivencia a largo plazo y dispersión, vía producción de huevos de resistencia por reproducción sexual (Snell 1987; Serra and Carmona 1993; Serra and King 1999; Serra et al. 2004). Estos resultados confirman que diversas presiones ambientales dejan ver sus efectos en la descendencia de los organismos expuestos. Estas respuestas transgeneracionales tienen el potencial de generar impactos importantes en la dinámica poblacional y comunitaria (Beckerman et al. 2002, Ramos-Jiliberto and Aránguiz-Acuña 2013), determinando la estructura y funcionamiento de los ecosistemas. Por otro lado, desde la perspectiva de la gestión ambiental, nuestros resultados cuestionan la pertinencia y valor de las pruebas ectotoxicológicas estándar como las que contempla la actual normativa chilena. En dichos ensayos, se miden respuestas de corto plazo a sustancias purificadas únicas o a una mezcla desconocida de elementos. Por tanto, las pruebas tradicionales no son sensibles a la transmisión transgeneracional de efectos y de esta modo podrían estar subestimando seriamente la toxicidad de ciertos compuestos para el funcionamiento de la biota. Consideramos que debemos perseverar en la investigación ecológica orientada a comprender la respuesta de los sistemas biológicos a factores múltiples, tanto naturales como antropogénicos.

5. Literatura citada

- Agrawal AA, Laforsch C, Tollrian R (1999) Transgenerational induction of defenses in animals and plants. *Nature* 401: 60-63.
- Aránguiz-Acuña A, Ramos-Jiliberto R, Bustamante RO (2011a) Experimental evidence that induced defenses promote coexistence of zooplanktonic populations. *Journal of Plankton Research* 33: 469-477.
- Aránguiz-Acuña A, Ramos-Jiliberto R, Bustamante RO (2011b) Experimental assessment of interaction costs of inducible defenses in plankton. *Journal of Plankton Research* 33: 1445-1454.
- ASTM (1988) Standard guide for conducting renewal life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. ASTM E-1193: 739-755.
- Barry JM (1998) Endosulfan-enhanced crest induction in *Daphnia longicephala*: evidence for cholinergic innervation of kairomone receptors. *Journal of Plankton Research* 20: 1219-1231.
- Beckerman A, Benton TG, Ranta E, Kaitala V, Lundberg P (2002) Population dynamic consequences of delayed life-history effects. *Trends in Ecology & Evolution* 17: 263-269.
- Benard MF (2004) Predator-Induced Phenotypic Plasticity in Organisms with Complex Life Histories. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35: 651-673.
- EPA (1994) 10-Day chronic toxicity test using *Daphnia magna* or *Daphnia pulex*. SOP #2028. (online) URL: <http://www.ert.org/products/2028.Pdf> (accessed December 16, 2009).
- Garay-Narváez L, Ramos-Jiliberto R (2009) Induced defenses within food webs: the role of community trade-offs, delayed responses, and defense specificity. *Ecological Complexity* 6: 383-391.
- Gilbert JJ (1966) Rotifer Ecology and Embryological Induction. *Science* 151: 1234-1237.
- Gilbert JJ (2009) Predator-specific inducible defenses in the rotifer *Keratella tropica*. *Freshwater Biology* 54: 1933-1946.
- Gilbert JJ, Schröder T (2007) Intraclonal variation in propensity for mixis in several rotifers: variation among females and with maternal age. *Hydrobiologia* 593:121-128.

- Giron D, Casas J (2003) Mothers reduce egg provisioning with age. *Ecology Letters* 6: 273-277.
- Hanazato T, Dodson SI (1992) Complex effects of a kairomone of *Chaoborus* and an insecticide on *Daphnia pulex*. *Journal of Plankton Research* 14:1743-1755
- Harvell DC (1990) The ecology and evolution of inducible defenses. *The Quarterly Review of Biology* 65(3): 323-340.
- Harvell CD, Tollrian R (1999) Why inducible defenses? in: Tollrian R, Harvell CD (eds) *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses*. Princeton University Press, New Jersey. pp 3-10.
- Jamieson CD, Santer B (2003) Maternal aging in the univoltine freshwater copepod *Cyclops kolensis*: variation in egg sizes, egg development times, and naupliar development times. *Hydrobiologia* 510: 75-81.
- Lampert W (1987) Predictability in lake ecosystems: the role of biotic interactions. In: Schulze ED, Zwölfer H (eds) *Potential and Limitations of Ecosystem Analysis*. Ecological Studies 61 Springer-Verlag, Berlin pp 333-346
- Lass S, Spaak P (2003) Chemically induced anti-predator defences in plankton: a review. *Hydrobiologia* 491: 221-239.
- Lima SL (1998) Nonlethal effects in the ecology of predator-prey interactions. *Bioscience* 48: 25-34.
- Lima SL, Dill LM (1990) Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology* 68: 619-640.
- Lüring M, Scheffer M (2007) Info-disruption: pollution and the transfer of chemical information between organisms. *Trend in Ecology and Evolution* 22: 374-379.
- Lüring M, Van Donk E (2000) Grazer-induced colony formation in *Scenedesmus*, are there costs to being colonial? *Oikos* 88: 111-118.
- Manly BF (1997) *Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology*. Chapman and Hall, London.
- Marcial HS, Hagiwara A (2007) Effect of diazinon on life stages and resting egg hatchability of rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 593: 219-225.
- Millennium Ecosystem Assessment (2005) *Ecosystems and human well-being: Biodiversity synthesis*. World Resources Institute, Washington.

Mousseau TA, Fox CW (1998) The adaptive significance of maternal effects. *Trends Ecology and Evolution* 13: 403-407.

Murdoch WW, Scott MA, Ebsworth P (1984) Effects of the general predator, *Notonecta* (Hemiptera) upon a freshwater community. *Journal of Animal Ecology* 55: 791-808.

NCh2083 (1999) Aguas - Bioensayo de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphnia pulex* (Crustacea, cladocera). Instituto Nacional de Normalización, INN - Chile.

NCh2706 (2002) Calidad de agua - Bioensayo de inhibición de crecimiento de algas en agua dulce con *Selenastrum capricornutum* (*Raphidocelis subcapitata*).

Newman MC (2001) *Fundamentals of Ecotoxicology*, 2nd ed. CRC press, Florida.

Nogrady T, Keshmirian J (1986) Rotifer neuropharmacology—I. cholinergic drug effects on oviposition of *Philodina acuticornis* (Rotifera, Aschelminthes). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 83: 335-338.

OECD (1993) *Daphnia sp.*, acute immobilization test and reproduction test, Method 202, OECD Guidelines for Testing Chemicals. (online) URL: <http://www.oecd.org/dataoecd/17/21/1948249.pdf> (accessed December 16, 2009)

Opit GP, Throne (2007) Influence of Maternal Age on the Fitness of Progeny in the Rice Weevil, *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology* 36: 83-89.

Padilla PK, Adolph SC (1996) Plastic inducible morphologies are not always adaptive: the importance of time delays in a stochastic environment. *Evolutionary Ecology* 10: 105-117.

Preston BL, Cecchine G, Snell TW (1999a) Effects of pentachlorophenol on predator avoidance behavior of the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Aquatic Toxicology* 44: 201-212.

Preston BL, Snell TW, Dusenbery DB (1999b) The effects of sublethal pentachlorophenol exposure on predation risk in freshwater rotifer species. *Aquatic Toxicology* 47: 93-105.

Primack RB (2008) Threats to biodiversity. In: *A Primer of Conservation Biology*, 4th edn. Sinauer Associates, Sunderland pp 72-122.

- Primack RB (2010) Habitat destruction, Fragmentation, Degradation, and Global Climate Change. In: A Primer of Conservation Biology, 5th edn. Sinauer Associates, Sunderland, pp 173-244.
- Rainieri M (1984) Histochemical investigations of Rotifera Bdelloidea. I. Localization of cholinesterase activity. *Histochemical Journal* 16: 601-616.
- Ramos-Jiliberto R (2003) Population dynamics of prey exhibiting inducible defences: the role of associated costs and density-dependence. *Theoretical Population Biology* 64: 221-231.
- Ramos-Jiliberto R, Aránguiz-Acuña A (2013) Bidimensional transfer of effects among organisms: an overlooked concept in community ecology. *Revista Chilena de Historia Natural. In press.*
- Relyea RA (2000) Trait-mediated indirect effects in larval anurans: reversing competition with the threat of predation. *Ecology* 81: 2278-2289.
- Relyea RA (2001) The lasting effects of adaptive plasticity: predator-induced tadpoles become long-legged frogs. *Ecology* 82: 1947-1955.
- Relyea RA (2002) Costs of phenotypic plasticity. *American Naturalist* 159: 272-282.
- Relyea RA (2003) Predator cues and pesticides: a double dose of danger for amphibians. *Ecological Applications* 13: 1515–1521.
- Rougier CI, Pourriot R (1977) Aging and control of the reproduction in *Brachionus calyciflorus* (pallas) (rotatoria) *Experimental Gerontology* 12: 137-151.
- SAG (2000) Resolución N°2195 del 2000 del Servicio Agrícola y Ganadero. Disponible en: <http://www.sag.gob.cl>.
- SAG (2012) Lista de plaguicidas autorizados 22-10-2012. Disponible en: <http://www.sag.gob.cl>.
- Schröder T, Gilbert JJ (2009) Maternal age and spine development in the rotifer *Brachionus calyciflorus*: increase of spine length with birth orders. *Freshwater Biology* 54: 1054-1065.
- Schulz R (2004) Exposure, effects, and risk mitigation of insecticide pollution. *Journal of Environmental Quality* 33: 419-448.
- Serra M, Carmona MJ (1993) Mixis strategies and resting eeg production of rotifers living in temporally-varying habitats. *255/256:117-126*

Serra M, King CE (1999) Optimal rates of bisexual reproduction in cyclical parthenogens with density-dependent growth. *Journal of Evolutionary Biology* 12:263-271.

Serra M, Snell TW, King CE (2004). The timing of sex in cyclically parthenogenetic rotifers. In: A. Moya & E. Font (eds.), *Evolution. From molecules to ecosystems*. Oxford University Press, Oxford. pp. 135-146.

Sih A, Ziemba R, Harding KC (2000) New insights on how temporal variation in predation risk shapes prey behavior. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 3-4.

Snell, TW (1987) Sex, population dynamics and resting eggs production in rotifers. *Hydrobiologia* 144: 105-111

Stemberger RS (1981) A general approach to the culture of planktonic rotifers. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38: 721-724.

Stemberger RS (1988) Reproductive costs and hydrodynamic benefits of chemically induced defenses in *Keratellatestudo*. *Limnology and Oceanography* 33: 593-606.

Taylor BE, Gabriel W (1992) To grow or not to grow: optimal resource allocation for *Daphnia*. *American Naturalist* 139: 248-266.

Teplitsky C, Piha H, Laurila A, Merila J (2005) Common Pesticide Increases Costs of Antipredator Defenses in *Rana temporaria* Tadpoles. *Environmental Science & Technology* 39: 6079-6085.

Tollrian R, Dodson SI (1999) Inducible defenses in Cladocera: constraints, costs, and multipredator environments. In Tollrian R, Harvell CD (eds) *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses*. Princeton University Press, New Jersey. pp 177-202.

Tollrian R, Harvell CD (1999) The evolution of inducible defenses: current ideas. In Tollrian R, Harvell, CD (eds) *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses*. Princeton University Press, New Jersey. pp 306-321.

Van Buskirk J (2000) The costs of an inducible defense in anuran larvae. *Ecology* 81: 2813-2821.

Van Donk EM, Lüring, Lampert W (1999) Consumer-induced changes in phytoplankton: inducibility, costs, benefits, and the impact on grazers. In Tollrian R, Harvell CD (eds) *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses*. Princeton University Press, New Jersey. pp 89-103.

Verschoor AM, Vos M, van der Stap, I. (2004) Inducible defences prevent strong population fluctuations in bi- and tritrophic food chains. *Ecology Letters* 7: 1143-1148.

Vos M, Kooi BW, DeAngelis DL, Mooij WM (2004) Inducible defenses and the paradox of enrichment. *Oikos* 105: 471-480.

Werner EE, Anholt BR (1996) Predator-induced behavioral indirect effects: consequences to competitive interactions in anuran larvae. *Ecology* 77: 157-169.

Werner EE, Peacor SD (2003) A Review of Trait-Mediated Indirect Interactions in Ecological Communities. *Ecology* 84: 1083-1100.