

UCH-FC  
DOC-EBE  
C331i  
C.1

**INDUCCIÓN DE REPRODUCCIÓN SEXUAL EN  
*Brachionus calyciflorus* (ROTIFERA):  
RESPUESTAS FENOTÍPICAS, COSTOS Y  
CONSECUENCIAS POBLACIONALES**



**Tesis**

**Entregada a La**

**Universidad De Chile**

**En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos**

**Para Optar Al Grado De**

**Doctor en Ciencias con Mención en Ecología Y**

**Biología Evolutiva**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**José Luis Carvajal Salamanca**

**2012**

**Director de Tesis**

**Dr. Rodrigo Ramos Jiliberto**

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

José Luis Carvajal Salamanca

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día Lunes 29 de Octubre de 2012.

Director de Tesis:  
Dr. Rodrigo Ramos Jiliberto

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Rodrigo Vásquez

Dr. Ramiro Bustamante

Dr. Luciano Caputo





*A Carolina, a mi Familia*

## BIOGRAFIA



José Luis Carvajal Salamanca, Biólogo, Lic. en Biología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Realicé el Doctorado en Ciencias m/ Ecología y Biología Evolutiva, en la Universidad de Chile, financiado por beca CONICYT. Soy un apasionado de las ciencias, aficionado a la música y la fotografía. Durante mi periodo formativo, realicé una pasantía en el laboratorio de Ecología Evolutiva, Universidad de Valencia, con el Dr. Manuel Serra, financiada por gestión propia; además de participar en múltiples congresos y cursos en el extranjero. He colaborado como especialista en zooplancton, en proyectos del Altiplano Chileno. Mis intereses principales como investigador son la ecología de organismos acuáticos, análisis de ciclos vitales y rasgos de historias de vida de organismos zooplanctónicos.

## AGRADECIMIENTOS



Esta tesis fue financiada gracias a la Beca CONICYT para estudios de doctorado, Beca CONICYT 24081067 apoyo de tesis doctoral y beca CONICYT término de tesis.

Mis agradecimientos a los compañeros de trabajo en el laboratorio de Biodiversidad y ex-LEAB y al Dr. Rodrigo Ramos, quien fue el tutor de esta tesis de Doctorado. Agradezco los espacios para el desarrollo de esta investigación en su laboratorio, los seminarios para compartir ideas y el día a día en este arduo trabajo. Al grupo "Rotifera Chile", Adriana, Vero, Anita. Al apoyo técnico Magaly, Vilma, Angélica y Marta. Al Laboratorio de Biodiversidad y Bioensayos del Centro Nacional de Medio Ambiente (CENMA), por la utilización de sus instalaciones y al Camping Alemán de Rapel, por los muestreos de zooplancton en el embalse.

Mis agradecimientos al Dr. Manuel Serra, a cargo del Laboratorio de Ecología Evolutiva, Instituto Cavanilles, Universidad de Valencia, España y a todo su laboratorio. Al Dr. Eduardo García-Roger y Lluís por su apoyo en el muestreo en el Tancat de la Pipa, Valencia. Agradezco a la Prof. Irma Vila, por considerarme en diversos proyectos que fortalecieron mi crecimiento formativo, académico y personal. Gracias al Dr. Luis Zúñiga por fortalecer la autoformación, la libertad y el pensamiento crítico en mis distintas etapas de formación. Agradecido de personas cercanas que son parte de este camino, Juan Pablo, Caren, M<sup>a</sup> Alejandra, Adriana.

Agradecido de Carolina por encontrarte, estar conmigo siempre entre el verde y el azul y ser parte importante en esta etapa formativa y de mi vida. Gracias a mi familia Luisa, Manuel, Flavia, Bastián y Coni por el apoyo constante en este camino, por incentivar la libertad de pensamiento y el que-hacer en todo lo que emprendo, lo cuál es el valor máspreciado que me entregan y enseñan cada día de mi existencia.



## ÍNDICE DE MATERIAS

Dedicatoria	.....	ii
Biografía	.....	iii
Agradecimientos	.....	iv
Índice de Materias	.....	v
Lista de Tablas	.....	vii
Lista de Figuras	.....	ix
Resumen	.....	xii
Abstract	.....	xiv
Introducción general	.....	1
Literatura Citada	.....	13
Capítulo I: Inducción recurso-dependiente de reproducción sexual por alta densidad de conespecíficos en <i>Brachionus calyciflorus</i> : variabilidad clonal y generacional de la respuesta	.....	19
Resumen	.....	20
Introducción	.....	22
Métodos	.....	28
Resultados	.....	31
Discusión	.....	40
Literatura citada	.....	45

Capítulo II: Vulnerabilidad a la depredación de hembras partenogénicas y sexuales de *Brachionus calyciflorus* frente a su depredador *Asplanchna*

<i>sieboldi</i>	.....	49
Resumen	.....	50
Introducción	.....	51
Métodos	.....	54
Resultados	.....	56
Discusión	.....	59
Literatura citada	.....	61

Capítulo III: Compromiso entre cambio de estrategia reproductiva y defensas anti-depredatorias en *Brachionus calyciflorus* .....65

Resumen	.....	66
Introducción	.....	67
Métodos	.....	71
Resultados	.....	76
Discusión	.....	82
Literatura citada	.....	84
Discusión General	.....	89
Literatura citada	.....	94
Anexos	.....	95

## LISTA DE TABLAS



### CAPÍTULO I

**Tabla I.** Resultados de ANCOVA cuatro factores. La variable respuesta es el Número de hembras míticas y la covariable Número de crías totales. ( $R$  cuadrado corregida = 0,911). La diferencia de las medias es significativa al nivel  $p < 0,05$ . Los factores son: alimento (R), generación (F), intensidad de la señal (S) y Clon (C).

**Tabla II.** Comparaciones múltiples entre las medias marginales. El asterisco indica diferencias significativas al nivel  $p < 0,05$ . Se utilizó ajuste de Bonferroni. Los factores son: intensidad de la señal (S), generación (F) y nivel de alimento (R).

**Tabla III.** Comparaciones múltiples, entre las medias marginales estimadas. El asterisco indica diferencias significativas al nivel  $p < 0,05$ . Se utilizó ajuste de Bonferroni. Los factores son: generación (F) y nivel de alimento (R).

### CAPÍTULO II

**Tabla I.** Resultados de ANOVA de una vía para el parámetro  $K_t$  entre las presas: Hembras partenogenéticas no defendidas, Hembras sexuales no defendidas y Hembras partenogenéticas defendidas. Las diferencias de las medias es significativa al nivel  $p < 0,05$ .

**Tabla II.** Prueba a posteriori de Tukey parámetro  $V_{Max}$  entre las presas: Hembras partenogenéticas no defendidas (N.D.), Hembras sexuales no defendidas (N.D.) y Hembras partenogenéticas defendidas (D.). Las diferencias son significativas al nivel  $p < 0,05$ .

### CAPÍTULO III

**Tabla I.** Comparación entre pares en ANOVA dos factores, para evaluar el compromiso entre inducción de hembras sexuales y expresión de defensas: experimento 1. Ajuste por Bonferroni. La diferencia de las medias es significativa al nivel  $p < 0,05$ . Los factores son: conespecíficos (C) y kairomona (K).



**Tabla II.** Resultados de ANCOVA de una vía con la variable dependiente número de hembras míticas y la covariable número de crías totales (R cuadrado corregida = 0,977). La diferencia de las medias es significativa al nivel  $p < 0,05$ . Los factores son: conoespecíficos (C) y kairomona (K)

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUCCIÓN GENERAL

**Figura 1.** Ciclo de vida heterogónico de *B. calyciflorus* y rotíferos Monogonontos. Figura modificada a partir de Ortells (2002).

### CAPÍTULO I

**Figura 2.** Interacción entre factor Alimento-Generación-Intensidad de señal. El panel de la izquierda nos muestra el nivel Intensidad de la señal débil y el de la derecha Intensidad de la señal fuerte. En el eje X se muestra el factor alimento con sus dos niveles (Baja, Alta) y el eje Y muestra las medias marginales estimadas para el número de hembras míticas. Las líneas muestran las diferencias entre las medias para cada generación (Generación 3ª y Generación 19ª) respecto del factor alimento. Interacción significativa, ANCOVA factorial ( $p < 0,05$ ).

**Figura 3.** Interacción entre factor Alimento-Generación-Clon. El panel de la izquierda nos muestra el nivel Generación 3ª y el de la derecha Generación 19ª. En el eje X se muestra el factor alimento con sus dos niveles (Baja, Alta) y el eje Y muestra las medias marginales estimadas para el número de hembras míticas. Las líneas muestran la diferencias de las medias para cada clon, respecto de la concentración de alimento. Interacción significativa, ANCOVA factorial ( $p < 0,05$ ).

**Figura 4.** Interacción entre factor Alimento-Clon-Intensidad de la señal. El panel de la izquierda nos muestra el nivel Intensidad de señal débil y el de la derecha Intensidad de señal fuerte. En el eje X se muestra el factor alimento con sus dos niveles (Baja, Alta) y el eje Y muestra las medias marginales estimadas para el número de hembras míticas. Las líneas muestran la diferencias de las medias para cada clon, respecto de la concentración de alimento. Interacción significativa, ANCOVA factorial ( $p < 0,05$ ).

**Figura 5.** Relación entre Tasa intrínseca de crecimiento poblacional ( $r$ ) vs. Proporción de hembras míticas, regresión lineal A) Alta concentración de alimento, 3ª generación:  $R = 0,601$ ,  $p < 0,001^*$ ; B) Baja concentración de alimento, 3ª generación:  $R = 0,101$ ,  $p = 0,369$ ; C) Alta Concentración de alimento, 19ª generación :  $R = 0,486$ ,  $p < 0,001^*$  D) Baja Concentración de alimento, 19ª generación :  $R = 0,104$ ,  $p = 0,364$ . ANOVA de una vía ( $p < 0,05$ ).

## CAPÍTULO II

**Figura 1.** Respuestas funcionales de *Asplanchna sieboldi* consumiendo tres morfotipos de *B. calyciflorus* como presas. A) Hembras míticas no defendidas, B) Hembras amíticas no defendidas y C) Hembras amíticas defendidas. El parámetro  $K_t$  no presentó diferencias entre las tres curvas ( $p = 0,548$ , ANOVA), el parámetro  $V_{max}$  en C fue significativamente menor que A y B (Prueba de Tukey,  $p < 0,05$ ).

## CAPÍTULO III

**Figura 1.** Esquema del diseño experimental de compromiso entre expresión de defensas y mixis, experimento 1.  $F_0$ ,  $F_1$ ,  $F_2$  y  $F_3$ , representan las generaciones de los individuos experimentales. En  $F_1$  se indujo la defensa antidepredatoria y  $F_2$  se indujo a mixis. K+: Inducción de defensas con Kairomonas; C+: Inducción de mixis con conespecíficos. Bajo este diseño, se espera detectar compromisos con base energética. Las figuras  $\square$  representan hembras defendidas morfológicamente,  $\circ$  representan hembras amíticas y  $\bullet$  representan hembras míticas. El dibujo en el extremo derecho, representa el control experimental sin ninguna de las dos señales de inducción.

**Figura 2.** Esquema del diseño experimental de compromiso entre expresión de defensas y mixis, señales simultáneas, experimento 2. K+: Inducción de defensas con Kairomonas; C+: Inducción de mixis con conespecíficos. Bajo este diseño, se espera detectar compromisos por competencia de señales. Para simbología ver Figura 1. El dibujo del extremo derecho, representa el control experimental.

**Figura 3.** A) Proporción de hembras míticas de *B. calyciflorus* para cuatro tratamientos de inducción: (K+) kairomona de *Asplanchna*, (K-) ausencia de kairomona, (C+) alta densidad de conespecíficos y (C-) ausencia de conespecífico. Símbolo \* muestra diferencias significativas entre tratamientos (prueba a posteriori de Tukey  $p < < 0,001$ ) B) Número de hembras míticas y amíticas generadas en cada tratamiento. Los valores representan la media y su IC 95%. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas (prueba de Tukey,  $p < 0,05$ ).

**Figura 4.** A) Proporción de hembras míticas de *B. calyciflorus* en los tratamientos de inducción simultáneas. Referencias para cada tratamiento como en Fig. 3. Símbolo \* muestra diferencias significativas entre tratamientos (prueba a posteriori de Tukey  $p < 0,001$ ) B) Número de hembras míticas y amíticas para cada tratamiento. Los valores representan la media y su IC 95%. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas (prueba de Tukey,  $p < 0,05$ )

**Figura 5.** Imágenes de hembras de *B. calyciflorus* A) míticas defendidas, B) míticas no defendidas, C) amíticas defendidas y D) amíticas no defendidas.

## ANEXOS

**Figura A1.** Curvas de crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* frente a distintas concentraciones de la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*: 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 x  $10^6$  células x  $\text{mL}^{-1}$ . Datos indican medias  $\pm$  D.E.

**Figura A2.** Proporción de hembras míticas de *B. calyciflorus* en función de la concentración de señales de conoespecíficos. Los organismos fueron alimentados con la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* a  $1,0 \times 10^6$  células x  $\text{mL}^{-1}$ . Los valores representan la media y su IC 95%. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas (Prueba de Tukey  $p < 0,05$ ). Para el análisis los datos fueron transformados con la función Arcoseno.

**Figura A3.** Expresión de la defensa anti-depredatoria de *B. calyciflorus* a nivel individual cuando está expuesto a medio pre-condicionado con kairomona de *Asplanchna sieboldi* (K+) y medio no pre-condicionado (K-). Los valores representan la media y el error IC 95%. El símbolo \* sobre las barras indica diferencias significativas (ANOVA una vía  $p < 0,001$ )

## RESUMEN

*Brachionus calyciflorus* (Rotifera) tiene una fase reproductiva partenogénica y una fase sexual, el estímulo que induce el cambio entre estrategias reproductivas, es la percepción de infoquímicos por alta densidad de conespecíficos. Los agentes inductores no son excluyentes en el medio acuático y las señales no están aisladas de otros factores ambientales en la naturaleza. El objetivo principal de esta investigación fue evaluar la inducción de hembras sexuales de *B. calyciflorus* en respuesta a infoquímicos de conespecíficos, en relación a otras señales ambientales y detectar posibles compromisos entre la inducción de reproducción sexual y defensas morfológicas de *B. calyciflorus*. Se demostró experimentalmente en este estudio, que la reproducción sexual no se expresa independientemente de otros rasgos y de otros factores ecológicos, existiendo costos y compromisos. Se demuestra la dependencia de la disponibilidad de recursos en el ambiente una vez que la señal de mixis es alcanzada, y compromisos presumiblemente con base energética, entre la inducción de hembras sexuales y expresión de defensas morfológicas anti-depredatorias. Es la primera vez que experimentalmente se reporta este compromiso de forma explícita en esta especie. En este estudio se obtuvieron relaciones funcionales y ecológicas entre fases espaciales y temporales muy distintas, escenario ecológico que condiciona y altera la inducción de reproducción sexual en *B. calyciflorus*. Se concluye que las dinámicas en la fase activa de las poblaciones y la fase de diapausa, no se pueden separar y analizar de forma aislada de otros factores ecológicos relevantes, estas escalas temporales y espaciales son muy distintas pero a su vez son fuertemente dependientes una de la otra.

## ABSTRACT

*Brachionus calyciflorus* (Rotifera) has a parthenogenetic reproductive phase and a sexual phase, the stimulus that induces change between these strategies is the perception of infochemicals from high density of conspecific. The inducing agents are not mutually exclusive in the aquatic environment and the signals are not isolated from other environmental factors in the nature. The main goal of this research was to assess the response to the induction of sexual females of *B. calyciflorus* by infochemicals from conspecific, in relation to other environmental signals and also detect possible trade-off between the induction of sexual reproduction and morphological defenses of *B. calyciflorus*. In this study, it was experimentally demonstrated that sexual reproduction is not expressed independently of other traits and other ecological factors, existing costs and trade-off. It demonstrated the dependency of the availability of resources in the environment once the signal of induction for sexual reproduction is reached, and the trade-off has presumably an energy base, between the induction of sexual females and the expression of morphological defenses anti-predatory. This is the first time that experimentally is reported the trade-off between the expression of reproductive strategies and defensive strategies explicitly in this species. In this study were obtained functional and ecological relations, between spatial and temporal phases very different, ecological scenary that determines and alters the induction of sexual reproduction in *B. calyciflorus*. It is concluded that the dynamics in the active phase of the populations and the phase of diapause, cannot be separated and analyzed in isolation of other ecological factors, these temporal and spatial scales are very different, but at the same time are strongly dependent one of the other



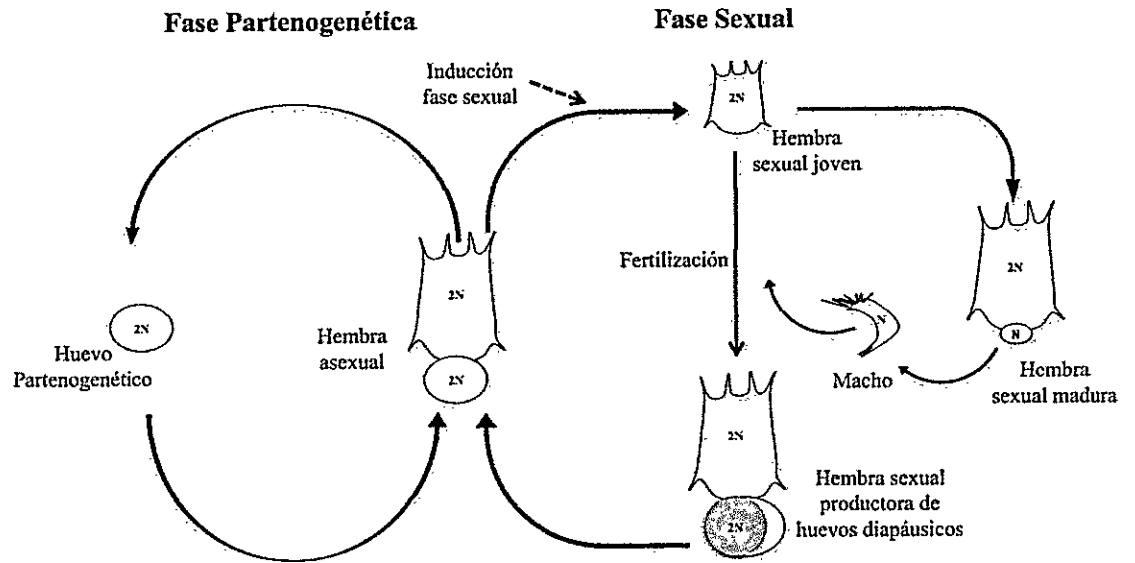
## INTRODUCCION GENERAL

La comunicación química en sistemas acuáticos tiene un rol ecológico importante y ha captado la atención de investigadores desde hace décadas. Muchos organismos planctónicos perciben señales químicas disueltas en el medio, generadas por distintos agentes, estimulando respuestas a nivel individual, tanto en su conducta como en el fenotipo, y a nivel poblacional afectando la reproducción y sobrevivencia (Larsson & Dodson, 1993). Dado que la presencia de agentes inductores no es excluyente en el medio acuático y las señales no están aisladas de otros factores ambientales en la naturaleza, los organismos están expuestos a un complejo escenario ecológico con señales simultáneas de intensidad variable.

Como consecuencia, esta alteración a nivel individual en los organismos y en parámetros poblacionales provocados por infoquímicos, puede llegar a modificar hasta la estructura trófica de un ecosistema acuático (Lass & Spaak, 2003). En las especies de zooplanctones, así como también algunas especies fitoplanctónicas, se han descrito algunas respuestas fenotípicas frente a señales químicas liberadas por competidores (Kirk, 1998; Burns, 2000; Lüring et al., 2003; Carvajal-Salamanca et al., 2008) y depredadores (Tollrian & Harvell, 1999; Lass & Spaak, 2003). Existe evidencia de los efectos generados por señales de conespecíficos, sin embargo, el mayor interés ha estado focalizado en la respuesta defensiva frente a señales liberadas por depredadores (Larsson & Dodson, 1993, Lampert, 1989; Tollrian & Harvell, 1999; Ramos-Jiliberto & Zúñiga, 2001; Lass & Spaak, 2003; Ramos-Jiliberto et al., 2004). En Rotifera y otros zooplanctones, el cambio desde una estrategia reproductiva partenogenética a una estrategia sexual, está relacionada con el estímulo ambiental de químicos liberados por conespecíficos en el medio, estrategia que permite la producción de estadios en

diapausa, con dinámicas en escalas temporales y espaciales muy distintas, pero que son interdependientes con las dinámicas ecológicas de los organismos de vida libre (Gyllström & Hansson, 2004; Gilbert, 2003). Por otra parte, en este mismo grupo, existen respuestas defensivas antidepredatorias inducibles, frente a señales químicas ambientales, las cuales pueden definirse como el mecanismo inducible que incrementa la adecuación biológica en presencia de depredadores (Tollrian & Harvell, 1999), respuestas activadas por la presencia de un consumidor que confiere algún grado de resistencia a ataques posteriores (Harvell, 1990).

Entre los organismos zooplanctónicos que presentan este tipo de respuestas fenotípicas, se encuentran los pertenecientes al phylum Rotifera, los cuales incluyen la sub-clase Monogononta (Segers, 2002). Los rotíferos monogonontos agrupan un número importante de especies de agua dulce, se caracterizan por presentar las tasas de reproducción más altas entre los metazoos, alcanzando densidades muy elevadas en la columna de agua y tienen una amplia distribución en hábitats planctónicos de aguas continentales (Wallace et al., 2006). Una de las características en la historia de vida de este grupo de rotíferos es que dentro de su ciclo de vida pueden cambiar desde un periodo reproductivo partenogenético a otro periodo reproductivo sexual conocido como mixis (Gilbert, 2002; 2003; Wallace et al., 2006) (Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo de vida heterogónico de *B. calyciflorus* y rotíferos Monogonontos. Figura modificada a partir de Ortells (2002).

La presencia predominante de hembras amícticas que producen huevos diploides en las poblaciones de este rotífero, desarrollan hembras partenogénicas en su descendencia cuando las densidades de la población son bajas y las condiciones de crecimiento poblacional son favorables. Sin embargo, aún cuando estas condiciones permanecen favorables y las poblaciones alcanzan densidades altas en la columna de agua, estos organismos cambian el tipo de reproducción desde partenogénesis a reproducción sexual generando hembras sexuales, con huevos haploides que desarrollan machos si no son fertilizadas, o desarrollan huevos en diapausa en caso de ser fertilizadas (Gilbert, 2003; 2007; Kubanek & Snell, 2008). Esta alternancia reproductiva es gatillada por la acumulación de una señal química ambiental, generada por la alta

densidad de conespecíficos (Gilbert, 2002; 2003; 2004; 2007; Stelzer & Snell, 2003; Fussmann et al., 2003; Schröder & Gilbert, 2004), condición única y necesaria para que organismos del género *Brachionus* cambien el tipo de reproducción (Kubanek & Snell, 2008).

Adicionalmente, muchas especies del género *Brachionus* responden a la acumulación de sustancias químicas solubles, llamadas genéricamente kairomonas, liberadas por depredadores invertebrados tales como el rotífero carnívoro *Asplanchna* y copepódos (Gilbert, 1967; Stemberger & Gilbert, 1984; Gilbert & Stemberger, 1984; Stemberger, 1988; Wallace et al., 2006). Esta respuesta implica la elongación de sus espinas anteriores, postero-laterales, o ambas, lo que representa una defensa morfológica que permite a las presas ser menos vulnerable a sus depredadores (Williamson, 1983; 1987; Stemberger & Gilbert, 1987; Gilbert, 1999; Tollrian & Harvell, 1999; Wallace et al., 2006). Esta respuesta de *B. calyciflorus* frente al depredador *Asplanchna*, ha sido de especial interés en los estudios de plasticidad fenotípica (Gilbert, 1966; Gilbert, 1980; Stemberger, 1990; Gilbert, 1999; Tollrian & Harvell, 1999; Aránguiz-Acuña et al. 2010, 2011a, 2011b).

Los rasgos fenotípicos de alternancia reproductiva y también las defensas morfológicas anti-depredatorias descritos anteriormente, en su gran mayoría han sido investigados de manera independiente, sin embargo en ambientes naturales los organismos no responden a señales únicas y en este sentido, es que los cambios en los rasgos de historia de vida junto a diversas señales ambientales, deben ser analizados y estudiados de forma conjunta y en escenarios ecológicos más complejos. Esto con el fin de encontrar relaciones funcionales entre la expresión de estos rasgos respecto de otros

atributos de historia de vida y otros factores ecológicos que pueden estar determinando el éxito de la respuesta en las dinámicas a corto y largo plazo. Los estudios poblacionales utilizando rotíferos del género *Brachionus*, usualmente consideran la fracción partenogenética de la población, sin embargo, Gylström & Hansson (2004), señalan que es indispensable considerar los estadios sexuales y la producción de huevos de diapausa, además de los rasgos relacionados a la ecología de los organismos de vida libre, ya que existen algunos componentes de la adecuación biológica a corto y largo plazo en estas dos fases reproductivas. Es así que el entendimiento de las causas y las consecuencias de las respuestas a una escala individual-poblacional a un estímulo ambiental biótico, son importantes ya que los efectos de este nivel pueden transmitirse a niveles superiores de organización (Wootton, 1994; Morin, 1999; Dambacher & Ramos-Jiliberto, 2007; Hoverman & Relyea, 2008), afectando relaciones ecológicas y funcionales en escalas temporales y espaciales muy distintas.

#### *Costos y compromisos (trade-offs)*

Uno de los principios centrales en la evolución de historias de vida, es que existen factores que limitan el potencial adaptativo de los organismos ya que los rasgos individuales no pueden variar independientemente, por estar sujetos a factores tales como restricciones y compromisos. Estos últimos tienen relación con ventajas en la adecuación biológica conferidas por algún rasgo, asociado a un efecto negativo generado en otro atributo (Resnik, 1985; Stearns, 1989; Roff, 1993, Agrawal et al., 2010). Es por esto que es crucial conocer las restricciones en la expresión de algunos rasgos de historia

de vida que determinan fuertemente la adecuación biológica de los organismos, como por ejemplo la transición de un tipo de reproducción a otra, en relación a la expresión de otros atributos en la historia de vida de estos organismos.

Los compromisos pueden manifestarse en correlaciones fenotípicas negativas entre dos rasgos, sin embargo una correlación negativa por sí misma no implica la existencia de un compromiso (Stelzer, 2005). A nivel genético los compromisos pueden ser causados por pleiotropía antagonista, existiendo genes que aumentan la fecundidad en una edad temprana en la adultez pero además tienen un rol y efectos negativos en la sobrevivencia a una edad mayor. A nivel ecológico, se puede manifestar por transporte de huevos en edad reproductiva lo cual puede disminuir la sobrevivencia debido a una mayor susceptibilidad a los depredadores. También los compromisos son llamados costos de reproducción, el cual surge por un aumento en la reproducción actual pagado por una disminución en la sobrevivencia y/o fertilidad futura (Stearns, 1992; Roff, 1993; Resnik, 1985). Estas correlaciones resultantes entre algunos rasgos, pueden ser causadas por asignación de recursos entre procesos que compiten tal como crecimiento somático, reproducción o acumulación de reservas, lo cual provocaría finalmente un compromiso entre ellos. La adquisición de un recurso respecto de la asignación de dicho recurso, puede tener como consecuencia tanto una correlación positiva como negativa entre rasgos que actualmente están en compromiso (Agrawal et al., 2010).

En organismos zooplanctónicos, se han cuantificado algunos costos y beneficios respecto de atributos de historias de vida, con el supuesto de asignación de recursos. Ejemplo de ello es la relación inversa encontrada entre el tamaño de la puesta y el volumen de los huevos en el cladóceros *Daphnia magna* (Guinnee et al., 2004). Un

ejemplo en relación a las defensas, es la generación de espinas en *Daphnia pulex*, que disminuyen la depredación por parte de *Chaoborus*, con un costo en sus tasas de reproducción (Riessen & Young, 2005). Además, se han investigado correlaciones fenotípicas entre reproducción y sobrevivencia frente a variabilidad ambiental como calidad, cantidad del alimento y temperatura en diversas especies de rotíferos y cladóceros (Sarma et al., 2002).

El análisis y las mediciones de los compromisos se pueden realizar a nivel de genotipo, fenotipo y también en los mecanismos que unen ambos niveles, tales como atributos del desarrollo y fisiológicos que resultan de la asignación de recursos entre funciones de reproducción, crecimiento, mantención, reserva y sobrevivencia (Roff, 1993). Cambiar desde una estrategia reproductiva a otra en rotíferos del género *Brachionus*, tiene costos poblacionales asociados, por ejemplo, si las hembras sexuales no son fertilizadas, estas no aportarían al crecimiento poblacional y a la adecuación biológica de la subpoblación presente en la columna de agua (Wallace et al., 2006). Adicionalmente existe un costo energético de la producción de huevos en diapausa como resultado de la reproducción sexual (Gilbert, 2010). Por otra parte, la expresión de defensas morfológicas también son costosas y existe un efecto negativo sobre el crecimiento en la población e incluso se han reportado efectos asociados a la dinámica de interacción con algunos competidores (Aránguiz-Acuña et al., 2010). Estos costos, así como también los beneficios que confieren estas estrategias de historia de vida en este tipo de organismos, han sido evaluados de forma independiente y no se ha analizado hasta ahora, si existe alguna relación o compromiso en la expresión de estos rasgos en rotíferos del género *Brachionus*.



Conocemos que algunos agentes inductores ambientales estimulan respuestas a nivel de fenotipo en organismos zooplanctónicos, y estos estímulos pueden afectar algún rasgo más que otro, pudiendo existir algunas correlaciones fenotípicas negativas entre estos. Una simple relación podría dar cuenta de la expresión fenotípica entre algunos rasgos y la manipulación experimental nos daría una idea de la base funcional del compromiso (Stearns, 1989; Roff, 1993), sin embargo no nos conduciría necesariamente a una respuesta adaptativa de estos. Existen algunas aproximaciones distintas para evaluar los compromisos, por poner algunos ejemplos están las correlaciones fenotípicas, manipulaciones experimentales, correlaciones genéticas de análisis de hermanos y correlaciones genéticas de experimentos de selección. En este mismo sentido, Resnik (1985), sugiere que para que dos funciones sean contrastadas en un compromiso, una contra la otra, es necesario la manipulación experimental directa. Esta es una buena aproximación para encontrar relaciones funcionales que estén restringiendo la magnitud de la respuesta entre algunos rasgos.

Una de las especies de organismos zooplanctónicos que cambian su tipo de estrategia reproductiva de partenogénesis a reproducción sexual y además expresa defensas morfológicas antidepredatorias, pertenecen al género *Brachionus* (Rotifera), esto nos permitiría evaluar las respuestas de estos rasgos en su conjunto y conocer si existe alguna relación funcional entre estos atributos.

Dado que los agentes inductores no son excluyentes en el medio acuático, las señales no están aisladas de otros factores ambientales en la naturaleza y el cambio de estrategia reproductiva desde partenogénesis a reproducción sexual de *B. calyciflorus* es estimulada por una señal química biótica en el ambiente, la respuesta a la inducción de

mixis podría estar modulada por otros factores ecológicos y otras señales químicas percibidas de forma simultánea generadas por distintos agentes.

Esto tiene implicancias ecológicas importantes, ya que esta fase inicial de inducción en rotíferos, es un punto crucial de interacción entre la fase activa en la columna de agua con la fase latente luego que la reproducción sexual sea exitosa. Hasta ahora los estudios se han concentrado en investigar las dinámicas en una escala ecológica focalizados en los individuos de vida libre, por otra parte aunque en menor número, algunas investigaciones han puesto su atención en las dinámicas a otra escala espacial y temporal, como es el banco de huevos en diapausa. Sin embargo son muy escasos los estudios que centran la atención en la interacción entre estas dos fases. Adicionalmente, en rotíferos, existe muy poca información acerca de los factores que alteran la magnitud de la respuesta a la inducción de hembras sexuales, tales como los costos en relación al ambiente y algunos compromisos con otros rasgos. Hasta ahora, la inducción de cambios en estrategias reproductivas y desarrollo de estrategias defensivas, no han sido abordadas en forma conjunta, con objetivos de investigación ecológica. Quedan, por tanto, abiertas interrogantes acerca de la relación entre estos cambios fenotípicos en la historia de vida de *B. calyciflorus*, la existencia de compromisos entre estos rasgos, sus efectos sobre la dinámica de la población y los mecanismos por los cuáles se transmiten los efectos de estas características individuales a la población.

Por esto, es necesario conocer la respuesta a la inducción de hembras sexuales en escenarios ecológicos más complejos con señales ambientales bióticas simultáneas y en relación a otros rasgos de historia de vida de *B. calyciflorus*. En esta investigación esta especie de rotífero, es utilizado como organismo modelo para estudiar si la respuesta a la

inducción de hembras sexuales es alterada por otras señales ambientales simultáneas y también por la expresión de otros rasgos de historia de vida que podrían estar en compromiso con este atributo.

El objetivo principal de esta investigación fue evaluar la respuesta a la inducción de hembras sexuales de *B. calyciflorus* por infoquímicos de conespecíficos, en relación a otras señales ambientales y también detectar posibles compromisos entre la inducción de reproducción sexual y defensas morfológicas de *B. calyciflorus*. Esta investigación es de tipo experimental y se utiliza este rotífero para evaluar algunos costos y compromisos asociados a la inducción de mixis a nivel de individuo y población. Se utilizó un depredador rotífero del género *Asplanchna* para inducir defensas antidepredatorias y como recurso alimenticio las microalgas *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Monoraphidium contortum*.

Esta investigación está organizada en tres capítulos, de los cuáles el primero tuvo como objetivo evaluar si la respuesta a la inducción de mixis por infoquímicos de conespecíficos, es distinta en un gradiente de alimento cuando el umbral de inducción es alcanzado, con el fin de conocer si la mayor disponibilidad de recursos tiene un mayor efecto en la respuesta de inducción de mixis. Complementariamente se evaluó el efecto del tiempo transcurrido desde la eclosión del huevo en diapausa sobre la expresión de mixis en *B. calyciflorus* y su variabilidad interclonal.

En el capítulo II el objetivo fue evaluar la vulnerabilidad a la depredación como consecuencia de la inducción de morfotipos sexuales. Para esto se cuantificó el consumo de *A. sieboldi* sobre morfos diferentes de *B. calyciflorus*: hembras sexuales y hembras partenogénicas de *B. calyciflorus*.

En el capítulo III se evaluó el compromiso entre inducción de hembras sexuales y expresión de defensas anti-depredatorias de *B. calyciflorus*. Para ello se plantearon dos experimentos centrales, uno destinado a evaluar la respuesta de la inducción de hembras sexuales en hembras previamente defendidas frente a las señales de inducción, y el segundo con inducción de señales simultáneas.

## Literatura citada

- Agrawal, A. A., J. K. Conner, & S. Rasmann. 2010. Tradeoffs and negative correlations in evolutionary ecology. In: M.A. Bell, W.F. Eanes, D.J. Futuyma, and J.S. Levinton, eds. *Evolution After Darwin: the First 150 Years*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Aránguiz-Acuña, A., Ramos-Jiliberto, R., & Bustamante, R. O. (2011) a. Experimental evidence that induced defenses promote coexistence of zooplanktonic populations. *Journal of Plankton Research*, 33(3), 469-477.
- Aránguiz-Acuña, A., Ramos-Jiliberto, R., & Bustamante, R. O. (2011) b. Experimental assessment of interaction costs of inducible defenses in plankton. *Journal of Plankton Research*, 33(9), 1445-1454.
- Aránguiz-Acuña, A., Ramos-Jiliberto, R., Sarma, N., Sarma, S. S. S., Bustamante, R. O., & Toledo, V. (2010). Benefits, costs and reactivity of inducible defences: an experimental test with rotifers. *Freshwater Biology*, 55(10), 2114-2122.
- Burns, C. W. (2000). Crowding-induced changes in growth, reproduction and morphology of *Daphnia*. *Freshwater Biology*, 43 (1), 19-29.
- Carvajal-Salamanca, J., Aránguiz-Acuña, A., Ramos-Jiliberto, R., & Zúñiga, L. R. (2008). Immediate and delayed life-history responses of *Daphnia ambigua* to conspecific cues. *Journal of Plankton Research*, 30 (10), 1117-1122.
- Dambacher, J. M., & Ramos Jiliberto, R. (2007). Understanding and predicting effects of modified interactions through a qualitative analysis of community structure. *The Quarterly Review of Biology*, 82 (3), 227-250.

- Fussmann, G., Ellner, S., & Hairston Jr, N. (2003). Evolution as a critical component of plankton dynamics. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 270, 1015-1022.
- Gilbert, J. J. (1966). Rotifer ecology and embryological induction. *Science*, 151, 1234-1237.
- Gilbert, J. J. (1967). Asplanchna and postero-lateral spine production in *Brachionus calyciflorus*. *Arch. Hydrobiol.*, 64(1), 1-62.
- Gilbert, J. J. (1980). Female polymorphism and sexual reproduction in the rotifer *Asplanchna*: Evolution of their relationship and control by dietary tocopherol. *American Naturalist*, 116, 409-431.
- Gilbert, J. J. (1999). Kairomone-induced morphological defenses in rotifers. In Tollrian R., & Harvell, C. D. (eds), *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses*. Princeton University Press, New Jersey, pp. 127-141.
- Gilbert, J. J. (2002). Endogenous regulation of environmentally induced sexuality in a rotifer: A multigenerational parental effect induced by fertilisation. *Freshwater Biology*, 47(9), 1633-1641.
- Gilbert, J. J. (2003). Environmental and endogenous control of sexuality in a rotifer life cycle: Developmental and population biology. *Evolution & Development*, 5(1), 19-24.
- Gilbert, J. J. (2004). Females from resting eggs and parthenogenetic eggs in the rotifer *Brachionus calyciflorus*: Lipid droplets, starvation resistance and reproduction. *Freshwater Biology*, 49(11), 1505-1515.

- Gilbert, J. J. (2007). Induction of mictic females in the rotifer *Brachionus*: Oocytes of amictic females respond individually to population density signal only during oogenesis shortly before oviposition. *Freshwater Biology*, 52 (8), 1417-1426.
- Gilbert, J. J. (2010). Effect of food concentration on the production and viability of resting eggs of the rotifer *Brachionus*: Implications for the timing of sexual reproduction. *Freshwater Biology*, 55(12), 2437-2446. doi:10.1111/j.1365-2427.2010.02455.x
- Gilbert, J. J., & Stemberger, R. S. (1984). *Asplanchna*-induced polymorphism in the rotifer *Keratella slacki*. *Limnology and Oceanography*, 29 (6) , 1309-1316.
- Guinnee, M.A., West, S.A., & Little, T.J. (2004). Testing Small Clutch Size Models with *Daphnia*. *The American Naturalist*, 163 (6), pp. 880-887.
- Gyllström, M., & Hansson, L. (2004). Dormancy in freshwater zooplankton: Induction, termination and the importance of benthic-pelagic coupling. *Aquatic Sciences*, 66(3), 274-295. doi:10.1007/s00027-004-0712-y
- Harvell, C. D. (1990). The ecology and evolution of inducible defenses. *Quarterly Review of Biology*, 323-340.
- Hoverman, J. T., & Relyea, R. (2008). Temporal environmental variation and phenotypic plasticity: A mechanism underlying priority effects. *Oikos*, 117(1), 23-32.
- Kirk, K. L. (1998). Enrichment can stabilize population dynamics: Autotoxins and density dependence. *Ecology*, 79(7), 2456-2462.

- Kubanek, J., & Snell, T. W. (2008). Quorum sensing in rotifers. In Winars S.C., & Bassler B.L (eds), *Chemical Communication among Bacteria*. ASM Press, Washington DC, pp. 453-461.
- Lampert, W. (1989). The adaptive significance of diel vertical migration of zooplankton. *Functional Ecology*, 3(1), 21-27.
- Larson, P., & Dodson, S. (1993). Chemical communication in planktonic animals. *Arch. Hydrobiol*, 129 (2), 129-155.
- Lass, S., & Spaak, P. (2003). Chemically induced anti-predator defences in plankton: A review. *Hydrobiologia*, 491(1), 221-239.
- Lüring, M., Roozen, F., Van Donk, E., & Goser, B. (2003). Response of *Daphnia* to substances released from crowded congeners and conspecifics. *Journal of Plankton Research*, 25(8), 967-978.
- Morin, P. J. (1999). *Community ecology*. Malden Mass. Blackwell Science.
- Ortells, R. (2002). *Diversidad genética y ecológica en especies crípticas de rotíferos: patrones y procesos*. Tesis doctoral, Universitat de València, València.
- Ramos-Jiliberto, R., & Zúñiga, L. R. (2001). Depth-selection patterns and diel vertical migration of *Daphnia ambigua* (crustacea: Cladocera) in lake El Plateado. *Revista Chilena De Historia Natural*, 74(3), 573-585.
- Ramos-Jiliberto, R., Carvajal, J. L., Carter, M., & Zúñiga, L. R. (2004). Diel vertical migration patterns of three zooplankton populations in a chilean lake. *Revista Chilena De Historia Natural*, 77(1), 29-41.
- Reznick, D. (1985). Costs of reproduction: An evaluation of the empirical evidence. *Oikos*, 44, 257-267.



- Riessen, H.P., & Young, J.D. (2005). Daphnia defense strategies in fishless lakes and ponds: one size does not fit all. *Journal of Plankton Research*. 27, 531-544.
- Roff, D. A. (1993). Life History Theory: a framework. In: *Evolution of life histories: theory and analysis*. Roff, D. A (Ed). Shapman & Hall, New York. Pp. 35-61.
- Sarma, S.S., Nandini, S., & Gulati, R.D. (2002). Cost of reproduction in selected species of zooplankton (rotifers and cladocerans). *Hydrobiologia* 481, 89-99.
- Schröder, T., & Gilbert, J. (2004). Transgenerational plasticity for sexual reproduction and diapause in the life cycle of monogonont rotifers: Intraclonal, intraspecific and interspecific variation in the response to crowding. *Functional Ecology*, 18(3), 458-466.
- Segers, H. (2002). The nomenclature of the rotifera: Annotated checklist of valid family and genus-group names. *Journal of Natural History*, 36(6), 631-640.
- Stearns, S. C. (1989). Trade-offs in life-history evolution. *Functional ecology*, 3(3), 259-268.
- Stearns, S. C. (1992). *The evolution of life histories*. Oxford: Oxford University Press.
- Stelzer, C. P. (2005). Evolution of rotifer life histories. *Rotifera X*. *Hydrobiologia* 546: 335-346
- Stelzer, C., & Snell, T. (2003). Induction of sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (monogononta, rotifera) by a density-dependent chemical cue. *Limnol. Oceanogr*, 48(2), 939-943.
- Stemberger, R. S. (1988). Reproductive costs and hydrodynamic benefits of chemically induced defenses in *Keratella testudo*. *Limnology and Oceanography*, 33 (4 part 1), 593-606.

- Stemberger, R. S. (1990). Food limitation, spination, and reproduction in *Brachionus calyciflorus*. *Limnology and Oceanography*, 35 (1), 33-44.
- Stemberger, R., & Gilbert, J. (1984). Spine development in the rotifer *Keratella cochlearis*: Induction by cyclopoid copepods and asplanchna. *Freshwater Biology*, 14, 639-647.
- Stemberger, R., & Gilbert, J. (1987). Defenses of planktonic rotifers against predators. In Kerfoot, W.C. and Sih, A. (eds), *Predation: Direct and Indirect Impacts on Aquatic Communities*. University Press of New England, Hanover, pp. 227-239.
- Tollrian, R., & Harvell, C. D. (1999). *The ecology and evolution of inducible defenses*. Princeton Univ Press, London.
- Wallace, R. L., Snell, T. W., Ricci, C., & Nogrady, T. (2006). *Rotifera. Vol 1, Biology, Ecology and Systematics 2nd Edition*. Kenobi Productions, Ghent, and Backhuys Publishers, Leiden.
- Williamson, C. E. (1983). Invertebrate predation on planktonic rotifers. *Hydrobiologia*, 104 (1), 385-396.
- Williamson, C. E. (1987). Predator-prey interactions between omnivorous diaptomid copepods and rotifers: The role of prey morphology and behavior. *Limnology and Oceanography*, 32 (1), 167-177.
- Wootton, J. T. (1994). Predicting direct and indirect effects: An integrated approach using experiments and path analysis. *Ecology*, 75(1), 151-165.

## CAPITULO I

INDUCCIÓN RECURSO-DEPENDIENTE DE REPRODUCCIÓN  
SEXUAL POR ALTA DENSIDAD DE CONESPECÍFICOS EN  
*BRACHIONUS CALYCIFLORUS*: VARIABILIDAD CLONAL Y  
GENERACIONAL DE LA RESPUESTA

## Resumen

*Brachionus calyciflorus* posee un ciclo de vida heterogónico, en el cual predomina la reproducción asexual cambiando de estrategia reproductiva a reproducción sexual, en respuesta a una señal ambiental biótica. El estímulo que gatilla esta inducción es la alta densidad de infoquímicos de conespecíficos. Se ha reportado que la reproducción sexual en estos organismos ocurre en condiciones de alimento favorables, condición necesaria para el crecimiento poblacional rápido y alcanzar los umbrales de inducción por densidad. Sin embargo, cuando los consumidores son muy abundantes los mecanismos de densodependencia y las fluctuaciones de recursos comienzan a operar. El objetivo central en esta investigación es separar los efectos de la señal química de inducción por alta densidad de conespecíficos de las condiciones de alimento, con el fin de evaluar si la magnitud de la respuesta a la inducción de hembras sexuales por alta densidad poblacional es alterada por la disponibilidad de alimento en el ambiente. Adicionalmente se evaluó el efecto del tiempo transcurrido desde la eclosión del huevo en diáspora sobre la respuesta de inducción de hembras sexuales en *B. calyciflorus* y variabilidad clonal en la respuesta. Los resultados indican que el alimento determina la magnitud de la respuesta de inducción de mixis cuando los umbrales de inducción de hembras sexuales son sobrepasados. Sugiriendo que el proceso de inducción al cambio de reproducción en *B. calyciflorus*, es una estrategia costosa la cuál necesariamente requiere de un ambiente con alta disponibilidad de recursos para obtener mayor inducción de mixis. Además, se obtuvo que la respuesta a la inducción es distinta en generaciones tardías desde la

eclosión del huevo en diapausa respecto de la inducción de mixis en generaciones tempranas y existe variabilidad clonal en la respuesta.

## Introducción

En sistemas acuáticos permanentes así como también en sistemas efímeros, las variables ambientales bióticas y abióticas, como la disponibilidad de alimento entre otros, fluctúan afectando severamente la sobrevivencia y reproducción de la población zooplanctónica (Lampert & Sommer, 1997; Gyllström & Hansson, 2004). Las dinámicas de las poblaciones de rotíferos que pertenecen a estos ambientes acuáticos, están determinadas por una serie de condiciones ambientales que podrían causar efectos densodependientes tales como limitación por recursos, autotoxicidad, depredación, competencia, parasitismo entre otras (Snell et al, 2001). El aumento de los tamaños poblacionales del zooplancton está acompañado de una alta disponibilidad del alimento en los sistemas, condición ambiental que determina tanto la abundancia como la distribución de los organismos en los cuerpos de agua. Este último atributo ecológico puede tener una serie de consecuencias positivas y beneficiosas, ya que una distribución agregada permite localizar parches de alimento, lugares de reconocimiento, encuentros macho hembra así como también protección contra los depredadores (Larsson & Dodson, 1993). Algunas características presentes en los ciclos de vida de estos organismos, tales como las estrategias reproductivas, se pueden ajustar o sincronizar con tales períodos, en copépodos ciclopoideos por ejemplo, se sugiere que la diapausa es una vía para ajustar el desarrollo temporal de reproducción, para luego coincidir con un período de alta abundancia de alimento y posiblemente baja competencia conservando energía desde períodos de crecimiento materno para otros períodos no favorables en los cuales se desarrollan los individuos (Gyllström & Hansson, 2004). Estas y otras estrategias de

historia de vida de los organismos zooplanctónicos están sujetas a señales ambientales tanto bióticas como abióticas presentes de forma simultánea, estimulando respuestas rápidas a estas señales, lo cuál desencadena una serie de consecuencias que afectan directa e indirectamente tanto las dinámicas poblacionales como comunitarias en la columna de agua.

*Brachionus calyciflorus*, pertenece al zooplancton y a la sub-clase Monogononta (Rotifera) (Segers, 2002), esta incluye especies que habitan sistemas de agua dulce con tasas reproductivas muy altas y se distribuyen ampliamente en hábitats planctónicos de aguas continentales (Wallace et al., 2006). *B. calyciflorus* tiene un tipo de reproducción heterogónica, en el cuál predomina la reproducción asexual por partenogénesis y episódicamente ocurre reproducción sexual (o mixis), la cuál incluye producción de machos (arrenotoquia) por un período muy breve de tiempo y concluye en la producción de huevos en diapausa (Wallace et al., 2006) (Figura 1, Introducción general); este cambio entre fase partenogenética y fase sexual en el ciclo de vida de *B. calyciflorus*, responde exclusivamente a un estímulo químico biótico, la alta densidad de conespecíficos (Gilbert, 2002; 2003; 2004; 2007; Stelzer & Snell, 2003; Fussmann et al., 2003; Schröder & Gilbert, 2004). Esta respuesta en las poblaciones de esta y otras especies de rotífero es rápida, una vez que es alcanzado el umbral de abundancia poblacional que estimula esta respuesta. Gilbert (2010), y otros estudios argumentan que el tiempo favorable para reproducción sexual en las poblaciones de rotíferos es cuando pueden ser producidos una gran cantidad de huevos en diapausa ricos en energía (Gilbert, 1980; 2007; Snell & Garman, 1986; Schröder & Gilbert, 2004; Serra et al., 2008), períodos de tiempo que deberían ocurrir cuando el crecimiento poblacional es

rápido, la densidad poblacional va en aumento y las condiciones de disponibilidad de alimento son favorables. En este mismo sentido Gyllström & Hansson (2004), sugieren que el químico proveniente de conespecíficos en altas densidades poblacionales puede ser una señal que indicaría que las condiciones son buenas para reproducción sexual ya que los encuentros macho-hembra serían altamente probables y más frecuentes entre machos jóvenes y hembras míticas fertilizables, conduciendo así a un gran número de hembras míticas fertilizadas. Una buena dieta debería maximizar el número y quizás también la viabilidad de huevos producidos por cada hembra mítica fertilizada. Estas ideas combinan la “hipótesis de encuentro macho-hembra” y la hipótesis de demanda de recurso así llamada por Serra et al. (2004), con el supuesto de que las condiciones llegarán a ser desfavorables en un tiempo más, por densodependencia cuando existen altas densidades poblacionales en el ambiente. El crecimiento poblacional rápido como consecuencia de un ambiente favorable con nutrientes y energía disponibles para las poblaciones, tienen consecuencia a su vez sobre estos recursos en respuesta a la cantidad de consumidores, existiendo efectos de densodependencia con fluctuaciones acopladas de las dinámicas consumidor-recurso (Lampert & Sommer, 1997). En una especie del género *Brachionus*, concretamente en una cepa Rusa de *Brachionus plicatilis* (Müller), existe antecedente que las concentraciones altas de alimento en el ambiente, permiten la inducción de hembras sexuales y estas concentraciones de alimento son considerablemente más altas que las necesarias para permitir solamente crecimiento poblacional positivo vía hembras partenogenéticas (Snell & Boyer, 1988 citado en Gilbert, 2010). Esto sugiere que la inducción de reproducción sexual en poblaciones de rotíferos, es una señal que estaría acompañada de un período con alta disponibilidad de



alimento en el medio. En este estudio nos centramos en los eventos previos a la generación de un huevo en diapausa, cuando se inicia el proceso de transición entre reproducción asexual y sexual, concretamente en la inducción de hembras sexuales, fase crucial para el éxito posterior de fertilización y producción de huevos en diapausa. La producción de estos huevos diapáusicos es una estrategia costosa y la alta disponibilidad de alimento en el ambiente es una condición necesaria para generar un huevo en diapausa viable respecto de un huevo partenogenético en *B. calyciflorus* (Gilbert, 2010). La fecundidad de hembras míticas fertilizadas es más baja que la de hembras amíticas bajo las mismas condiciones (Gilbert, 1993, Gilbert, 2010). Gilbert (2010), parece ser el primero que compara los efectos de concentración de comida sobre reproducción por hembras sexuales ya fertilizadas respecto de hembras amíticas, y también sobre la producción y viabilidad de huevos en diapausa. Sin embargo no toma en cuenta la fase de transición o de inducción de reproducción sexual. Hasta ahora la separación de los efectos de la disponibilidad del alimento sobre la fase de inducción de mixis no ha sido reportada para *B. calyciflorus*.

La señal de inducción para reproducción sexual en *Brachiomus calyciflorus* es un infoquímico percibido por esta especie, cuando existe alta densidad de conespecíficos en el medio. Esto quiere decir que la inducción de hembras sexuales en la población está sujeta a los umbrales de abundancias poblacionales de conespecíficos percibidas por este rotífero. Si estos umbrales son alcanzados por la población, quiere decir que la población está creciendo en condiciones favorables de alimento, estas las poblaciones estarían sujetas a fluctuaciones en su densidad debido al agotamiento de recursos en el ambiente cuando los consumidores son muy abundantes, producto de la competencia intra-

específica o densodependencia. En este mismo sentido, existe evidencia para algunas poblaciones de este rotífero, respecto de umbrales muy bajos de densidad poblacional para la inducción de hembras sexuales (Gilbert & Diéguez, 2010), lo cuál estaría indicando que la inducción de reproducción sexual sobre este umbral, esté relacionada con otros factores ambientales diferentes que alteran esta respuesta una vez que el umbral de inducción es alcanzado.

La hipótesis que conduce este capítulo es, debido a que la señal que induce el cambio desde reproducción partenogenética a reproducción sexual, es el infoquímico por alta densidad poblacional y además la abundancia de recursos fluctúa debido a la alta densidad de los consumidores, entonces la respuesta a la inducción de reproducción sexual debería estar relacionada con la cantidad de recursos disponibles cuando los umbrales de mixis son alcanzados. Es así que se espera que la inducción de hembras sexuales de *B. calyciflorus* será menor o nula cuando los recursos alimenticios están en baja concentración, siempre que la señal inductora de mixis esté presente. Adicionalmente, en este estudio se evaluó esta respuesta incluyendo variabilidad clonal en el sistema y también incluyendo la dependencia endógena para la inducción de mixis en generaciones tardías desde la eclosión del huevo en diapausa respecto de la inducción de mixis en generaciones tempranas.

El objetivo central en esta investigación es separar los efectos de infoquímicos por alta densidad y el alimento, para evaluar si la respuesta a la inducción de hembras sexuales una vez sobrepasado el umbral de inducción, está relacionada con la disponibilidad del recurso. Esto con el fin de conocer si la disponibilidad de recursos, altera la magnitud de la respuesta a la inducción de mixis. Sumado a esto, también es

relevante conocer si esta respuesta es variable a nivel clonal y si estas respuestas a la inducción en las primeras generaciones desde la eclosión del huevo en diapausa de *B. calyciflorus* es distinta que la respuesta en generaciones tardías desde la eclosión, tal como sugieren Gilbert (2003) y Schröder & Gilbert, (2004).

## Métodos

En este capítulo se utilizaron clones de *B. calyciflorus* obtenidos desde el Tancat de la Pipa, Valencia, España y todos los experimentos descritos aquí fueron desarrollados en el Laboratorio de Ecología Evolutiva, Instituto Cavanilles, Universidad de Valencia, España. Ver anexo I (Metodología general) para los detalles metodológicos de colecta, cultivos de organismos e inducción de mixis.

### *Diseño experimental*

Se realizó la eclosión de huevos en diapausa y la separación de cada clon de hembras amícticas de *B. calyciflorus* individualmente en medio MBL descritos en anexo I. En este experimento se utilizó un total de 15 clones, los cuales fueron puestos en su respectivo tratamiento.

Este experimento tiene un diseño con cuatro factores, Factor Clon (15), Factor Concentración Alimento (Baja, Alta), Factor Generación (Generación 3<sup>a</sup>, Generación 19<sup>a</sup>), Intensidad de señal (Débil, Fuerte). La concentración de alimento baja fue de  $0,15 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> y concentración alta de alimento fue de  $1,5 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>. Se registró la proporción de hembras míticas, recién nacidos, parámetros de Tablas de vida, tasa intrínseca de crecimiento ( $r$ ). Para la inducción de mixis en este capítulo se utilizó la Inducción por volumen, metodología descrita en el anexo I y descrita por Gilbert (2002; 2003; 2007; 2010) y otros investigadores. Los tratamientos con señal fuerte de inducción fueron cultivados en un volumen de 0,2 mL de medio MBL y tratamientos con señal

débil de inducción en volumen de cultivo con 2,5 mL de medio MBL y alimento. Ambos volúmenes de cultivos fueron necesarios para asegurar que los umbrales de inducción fueran suficientes pero con distinta intensidad. El número de réplicas por cada nivel y tratamiento fue de 3 madres de *B. calyciflorus*, con un total de 180 madres en la generación 3ª y 180 madres en la generación 19ª. Cada réplica fue observada cada 12 h y los neonatos se separaron en multiplacas de 96 pocillos con 0,2 mL de medio MBL y alimento ad-libitum. Estos neonatos una vez maduros (hembras con huevos) se categorizaron en hembras míticas o amíticas. Los 15 clones obtenidos desde la eclosión de los huevos en diapausa fueron separados y luego, se pusieron en los tratamientos en la generación 3ª desde la eclosión; estos mismos clones fueron seguidos cuidadosamente hasta la generación 19ª y puestos en los mismos tratamientos.

Los datos fueron analizados mediante ANCOVA factorial, utilizando el número de hembras míticas como variable respuesta y como covariable el número total de crías. Se realizaron pruebas de comparación múltiple para ver diferencias en las interacciones entre los factores ( $p < 0,05$ ). Se realizó también un análisis de regresión lineal y ANOVA ( $p < 0,05$ ) para relacionar la tasa intrínseca de crecimiento ( $r$ ) con la proporción de hembras míticas, para cada nivel del factor generación (3ª y 19ª) y del factor alimento (Bajo, Alto), para este análisis se obtuvo la tasa intrínseca de crecimiento utilizando la ecuación Lotka-Euler (Krebs, 1985):

$$\sum_{x=0}^n e^{-rx} \cdot l_x \cdot m_x = 1$$

dónde,  $l_x$  es sobrevivencia y  $m_x$  fertilidad edad específica,  $x$  es el tiempo y  $r$  es la tasa intrínseca de crecimiento obtenida iterando esta ecuación.

## Resultados

La Tabla I muestra los resultados del ANCOVA factorial. La interacción para los cuatro factores alimento-volumen-generación-clon es significativa, luego la interacción generación-Intensidad de la señal no fue significativa y todas las interacciones restantes y los factores por separados tienen un efecto significativo sobre el número de hembras míticas de *B. calyciflorus*. En este análisis la covariable número de crías totales, fue significativa, indicando que el número de crías es una variable relacionada linealmente con el número de hembras míticas (Tabla I).

Esto quiere decir que la concentración de alimento, la generación en la cuál se induce a mixis y el factor intensidad de la señal, tienen influencia sobre el número de hembras sexuales. Esto nos indica que una vez que la inducción de mixis está presente, la concentración de alimento tiene efecto sobre el número de hembras sexuales que son obtenidas en madres inducidas a reproducción sexual. Además, observamos que existe una dependencia endógena en la respuesta a la mixis respecto del número de generaciones que transcurre desde que eclosiona un huevo en diapausa y también que la respuesta a la inducción de mixis responde a una señal más fuerte o más débil para la inducción de hembras míticas. En la figura 2, vemos la interacción entre los factores alimento-generación-intensidad de señal, observando que las diferencias en el número de hembras míticas para baja y alta concentración de alimento es distinta en la generación 3ª y en la generación 19ª. La tabla II muestra las comparaciones múltiples para los tres factores Alimento-Generación-Intensidad de la señal y podemos observar en ella que el efecto de la intensidad de la señal es significativo en ambos niveles del factor generación

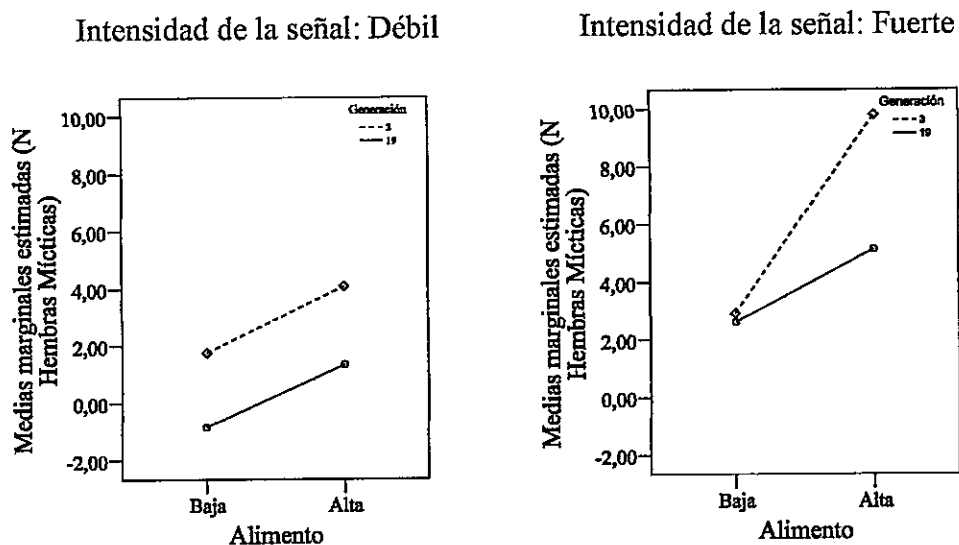
cuando existe alta concentración de alimento en los tratamientos, sin embargo solo es significativo este efecto sobre el número de hembras míticas en baja concentración de alimento en la generación 19<sup>a</sup>.

La interacción Alimento-Generación-Clon en la figura 3, muestra que las diferencias en la proporción de hembras sexuales es distinta, cuando comparamos entre Alta y baja concentración de alimento. En la tabla III podemos ver la comparación múltiple para factor Generación en cada concentración de alimento y vemos diferencias significativas entre generaciones para ambas concentraciones de alimento. La figura 4 nos muestra la interacción Alimento-Clon-Intensidad de la señal y vemos que las diferencias para el número de hembras míticas entre los clones no es igual para cada concentración de alimento y tampoco entre densidades.

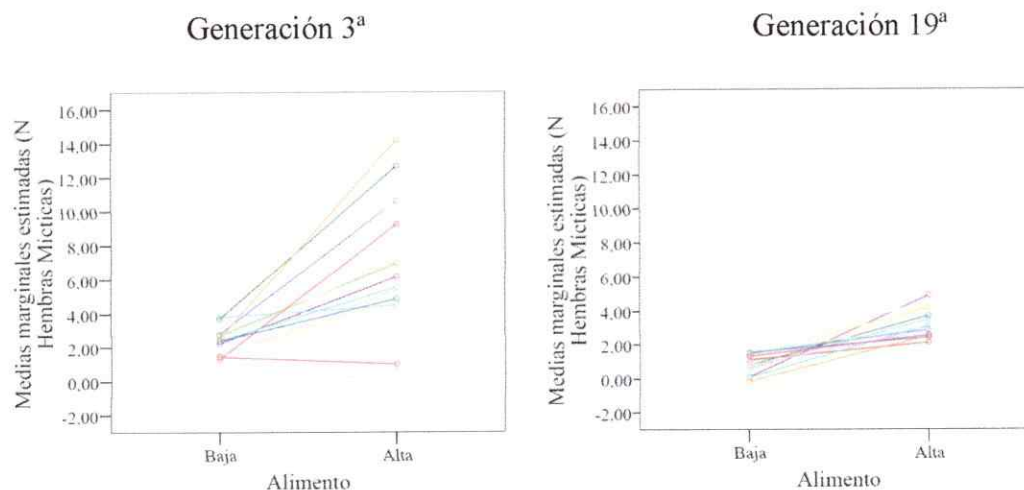


**Tabla I.** Resultados de ANCOVA cuatro factores. La variable respuesta es Número de hembras míticas y la covariable Número de crías totales. (R cuadrado corregida = 0,911). La diferencia de las medias es significativa al nivel  $p < 0,05$ . Los factores son: alimento (R), generación (F), intensidad de la señal (S) y Clon (C).

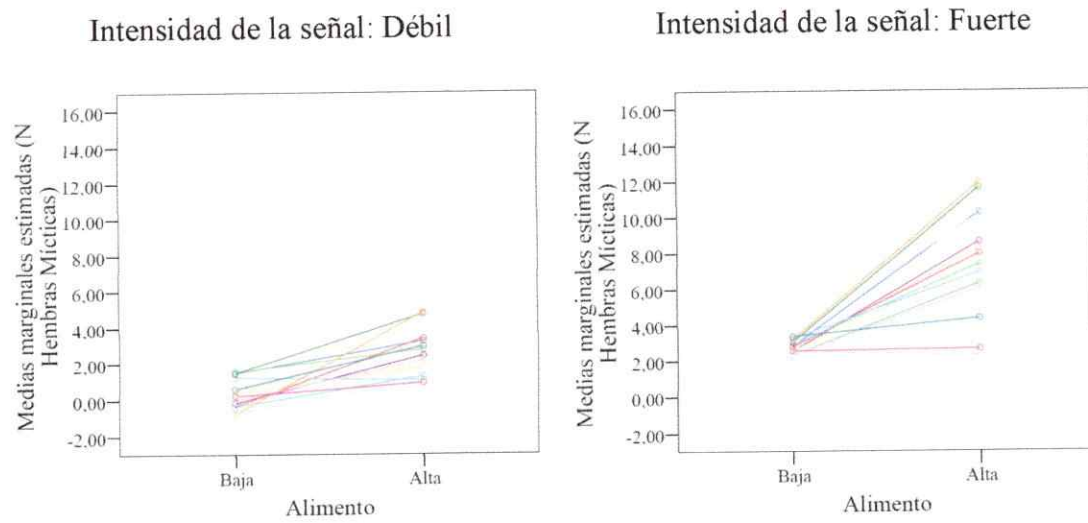
Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	p
N. de crías totales	117,683	1	117,683	73,723	0,000
Alimento (R)	953,114	1	953,114	597,080	0,000
Generación (F)	300,768	1	300,768	188,417	0,001
Intensidad de señal (S)	307,812	1	307,812	192,829	0,000
Clon (C)	365,717	14	26,123	16,365	0,000
R * F	92,073	1	92,073	57,679	0,000
R * S	24,941	1	24,941	15,624	0,000
F * S	0,758	1	0,758	0,475	0,491
R * F * S	78,906	1	78,906	49,431	0,000
R * C	258,563	14	18,469	11,570	0,000
F * C	419,111	14	29,936	18,754	0,000
R * F * C	225,911	14	16,137	10,109	0,002
S * C	82,807	14	5,915	3,705	0,000
R * S * C	89,466	14	6,390	4,003	0,000
F * S * C	87,458	14	6,247	3,913	0,000
R * F * S * C	98,261	14	7,019	4,397	0,001
Error	336,817	211	1,596		
Total	9510,000	332			
Total corregida	5957,602	331			



**Figura 2.** Interacción entre factor Alimento-Generación-Intensidad de señal. El panel de la izquierda nos muestra el nivel Intensidad de la señal débil y el de la derecha Intensidad de la señal fuerte. En el eje X se muestra el factor alimento con sus dos niveles (Baja, Alta) y el eje Y muestra las medias marginales estimadas para el número de hembras míticas. Las líneas muestran las diferencias entre las medias para cada generación (Generación 3<sup>a</sup> y Generación 19<sup>a</sup>) respecto del factor alimento. Interacción significativa, ANCOVA factorial ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.** Interacción entre factor Alimento-Generación-Clon. El panel de la izquierda nos muestra el nivel Generación 3ª y el de la derecha Generación 19ª. En el eje X se muestra el factor alimento con sus dos niveles (Baja, Alta) y el eje Y muestra las medias marginales estimadas para el número de hembras míticas. Las líneas muestran la diferencias de las medias para cada clon, respecto de la concentración de alimento. Interacción significativa, ANCOVA factorial ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.** Interacción entre factor Alimento-Clon-Intensidad de la señal. El panel de la izquierda nos muestra el nivel Intensidad de señal débil y el de la derecha Intensidad de señal fuerte. En el eje X se muestra el factor alimento con sus dos niveles (Baja, Alta) y el eje Y muestra las medias marginales estimadas para el número de hembras míticas. Las líneas muestran la diferencias de las medias para cada clon, respecto de la concentración de alimento. Interacción significativa, ANCOVA factorial ( $p < 0,05$ ).

**Tabla II.** Comparaciones múltiples entre las medias marginales. El asterisco indica diferencias significativas al nivel  $p < 0,05$ . Se utilizó ajuste de Bonferroni. Los factores son: intensidad de la señal (S), generación (F) y nivel de alimento (R).

R	F	S <sub>i</sub>	S <sub>j</sub>	Diferencia entre medias (S <sub>i</sub> -S <sub>j</sub> )	Error típico	p
Alta	3 <sup>a</sup>	Fuerte	Débil	5,701*	0,309	0,000
	19 <sup>a</sup>	Fuerte	Débil	3,799*	0,282	0,000
Baja	3 <sup>a</sup>	Fuerte	Débil	1,172	0,604	0,054
	19 <sup>a</sup>	Fuerte	Débil	3,465*	0,516	0,000

**Tabla III.** Comparaciones múltiples, entre las medias marginales estimadas. El asterisco indica diferencias significativas al nivel  $p < 0,05$ . Se utilizó ajuste de Bonferroni. Los factores son: generación (F) y nivel de alimento (R).

R	F <sub>i</sub>	F <sub>j</sub>	Diferencia entre medias (F <sub>i</sub> -F <sub>j</sub> )	Error típico	p
Alta	3 <sup>a</sup>	19 <sup>a</sup>	3,698*	0,260	0,000
Baja	3 <sup>a</sup>	19 <sup>a</sup>	1,453*	0,216	0,000

### Costos de la Mixis

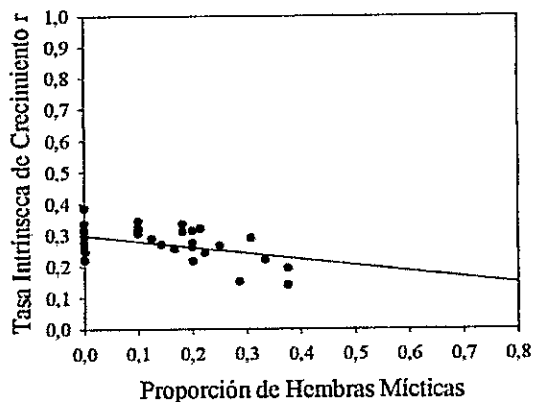
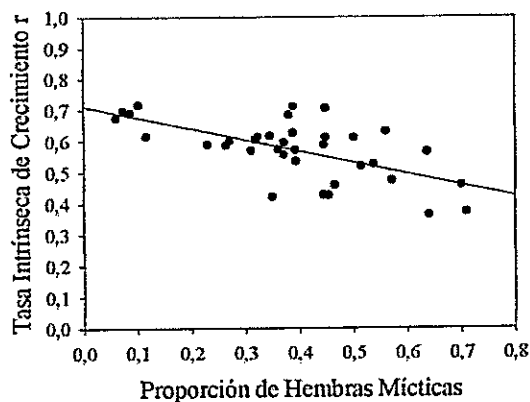
Otro resultado obtenido fue la relación negativa entre las tasas intrínsecas de crecimiento partenogenética ( $r$ ) de *B. calyciflorus* y la proporción de hembras míticas. En la figura 5, se observa una tendencia negativa en el análisis de regresión lineal para ambas variables, lo que sugiere que la inducción a la mixis tiene un costo sobre la tasa intrínseca de crecimiento poblacional ( $r$ ), sin embargo las regresiones significativas fueron obtenidas únicamente para las condiciones de alto recurso (ANOVA de una vía  $p < 0,05$ ).

Alta Concentración de Alimento

Baja Concentración de Alimento

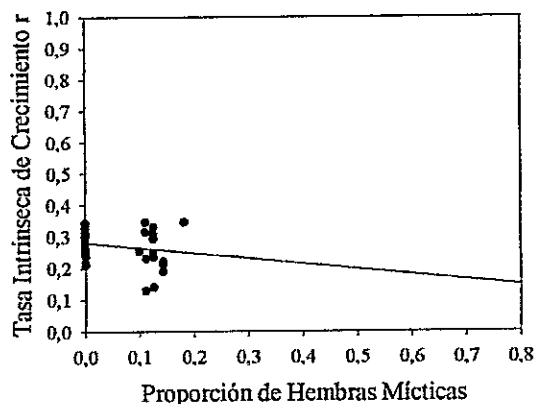
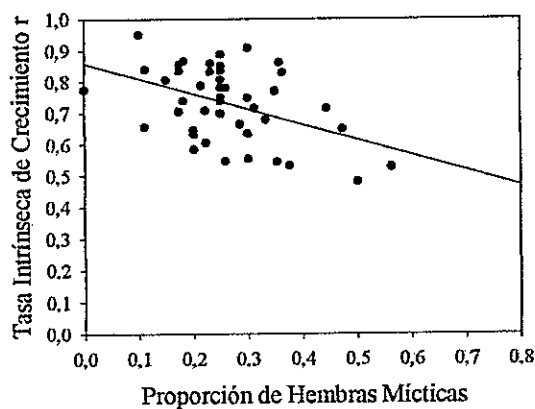
A) Generación 3

B) Generación 3



C) Generación 19

D) Generación 19



**Figura 5.** Relación entre Tasa intrínseca de crecimiento poblacional ( $r$ ) vs. Proporción de hembras míticas, regresión lineal A) Alta concentración de alimento, 3<sup>a</sup> generación:  $R = 0,601$ ,  $p < 0,001^*$ ; B) Baja concentración de alimento, 3<sup>a</sup> generación:  $R = 0,101$ ,  $p = 0,369$ ; C) Alta Concentración de alimento, 19<sup>a</sup> generación :  $R = 0,486$ ,  $p < 0,001^*$  D) Baja Concentración de alimento, 19<sup>a</sup> generación :  $R = 0,104$ ,  $p = 0,364$ . ANOVA de una vía ( $p < 0.05$ ).

## Discusión

Las poblaciones de rotíferos que habitan ambientes acuáticos permanentes o efímeros, están sujetos a una serie de factores que pueden causar efectos denso-dependientes incluyendo el alimento, competencia por interferencia, mixis, depredación entre otros (Snell et al, 2001). En este estudio con experimentos de laboratorio, logramos demostrar el efecto del alimento cuando la señal de mixis está presente. Los resultados indican que la concentración de alimento influye positivamente y el factor generación negativamente (Figuras 2 y 3) sobre la inducción de hembras sexuales en *B. calyciflorus*. Además, el factor clon tiene efecto significativo sobre la inducción de hembras míticas (Tabla I). Gilbert (2010) encuentra efectos de la concentración de comida sobre reproducción por hembras sexuales fertilizadas y hembras partenogénicas, y sobre la producción y viabilidad de huevos en diapausa. Los resultados obtenidos en esta investigación, demuestran que la fase de inducción, antes de la producción de huevos en diapausa, tiene relación con la disponibilidad de alimento influyendo en la inducción de hembras sexuales. Los factores relacionados al ambiente en el cuál se induce reproducción sexual, alterarían entonces la respuesta a este cambio de estrategia reproductiva en estas poblaciones de rotíferos. La separación de los efectos nos permite aclarar en cierta medida, supuestos respecto de la relación entre un ambiente favorable y reproducción sexual en este tipo de organismos, sin embargo, habría que refinar la resolución de los efectos obtenidos aquí y separar otros efectos sobre la inducción de reproducción sexual y la dependencia del ambiente en tales respuestas, tomando en consideración las características de los sistemas de los cuales se originan los clones estudiados, con el fin



de encontrar causalidades más directas entre factores ambientales y los efectos en las estrategias reproductivas. En este mismo sentido, con los resultados obtenidos en esta investigación, podemos sugerir que una vez que el umbral para inducción de hembras sexuales es alcanzado por las poblaciones, las fluctuaciones de alimento afectarían la inducción de hembras míticas. Esto no quiere decir que solo el alimento induce mixis, sino que una vez que la señal de alta densidad poblacional gatilla el cambio en el tipo de hembras, el alimento influye en la magnitud de la respuesta. Esta respuesta a la inducción de hembras sexuales, además, depende del número de generaciones que pasó después de eclosionar el huevo en diapausa, dependencia endógena reportada por Schröder & Gilbert (2004), para algunos clones de una cepa de Estados Unidos, y quienes encuentran menor propensión a la mixis en generaciones tempranas en seis clones de *B. calyciflorus*. La variabilidad clonal en este estudio, nos indica que la tendencia sugerida por Schröder & Gilbert (2004), no es general, ya que en los 15 clones evaluados en nuestros experimentos, nos sugiere una dependencia endógena, pero con un menor número de hembras míticas en generaciones tardías, tendencia opuesta encontrada por los autores mencionados. En nuestros experimentos, la mayor proporción de hembras sexuales encontrada en generaciones tempranas, puede tener relación con el ambiente de origen de los clones experimentales. En las muestras de terreno obtenidas en el Tancat de la Pipa, se observó una gran abundancia de copépodos y *Asplanchna* además de *B. calyciflorus* en altas densidades; aunque no se registró eficiencia de depredación, esto podría sugerir que la respuesta rápida a la mixis, o sea mayor en generaciones tempranas desde que eclosiona el huevo en diapausa en combinación con bajos umbrales de mixis, permitirían reproducción sexual y producción de huevos en

diapusa antes que los depredadores alcancen abundancias superiores y los consuman. En una cepa de *B. calyciflorus* de la Patagonia Argentina, los umbrales para inducción de mixis son muy bajos ( $6,7 \text{ ind mL}^{-1}$ ) y las proporciones de hembras sexuales son de las más altas encontradas hasta ahora (Gilbert & Diéguez, 2010) en generaciones tempranas desde que eclosiona el huevo en diapausa. Este reporte no toma en cuenta los factores asociados luego de alcanzar estos umbrales que podrían alterar la respuesta a la mixis en estos ambientes. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio, nos sugiere que las poblaciones de rotíferos con bajo umbral para estimular el cambio en el tipo de reproducción, estarían sujetos a las condiciones fluctuantes del ambiente, como por ejemplo las fluctuaciones de recursos disponibles, lo que alterará la respuesta a la inducción una vez que el umbral ya se alcanzó. Una vez que se alcanza la señal que gatilla el cambio entre reproducción asexual y sexual, las poblaciones están sujetas a la señal de inducción acompañada de la disponibilidad de alimento en el ambiente para responder. En relación al alimento esto está de acuerdo con Gyllström & Hansson (2004), respecto de condiciones favorables para reproducción sexual ya que los encuentros entre machos y hembras serían altamente probables y posteriormente la generación de un gran número de hembras míticas fertilizadas.

La tendencia negativa observada entre la tasa intrínseca de crecimiento partenogenético y la proporción de hembras sexuales sugiere que la respuesta a la inducción de reproducción sexual tiene un costo en la adecuación biológica de corto plazo de esta especie de rotífero (Gilbert, 2010), si consideramos este  $r$  como una medida de ésta. Sin embargo, este costo se expresa solo para alta concentración de alimento. Esta estrategia reproductiva en este tipo de organismos debería expresar un

adecuado balance entre los beneficios a corto y largo plazo de la inducción a la mixis. En el corto plazo, la mixis tiene un efecto negativo en la población disminuyendo la multiplicación (Figura 5). La relación entre la estrategia de inducción de hembras sexuales y ambientes favorables de crecimiento es positiva y coherente con la producción de huevos en diapausa (Serra & King, 1999), sin perder de vista que esto tiene lugar también bajo condiciones favorables para que la reproducción partenogenética siga ocurriendo. Esto puede estar en relación con el hecho que la respuesta a la inducción de hembras sexuales en la población, no alcanza una inducción igual al 100% en poblaciones naturales y tampoco en cultivos de laboratorio (Fussman et al, 2007), existiendo una fracción de individuos partenogenéticos que siempre aporta al crecimiento poblacional en la columna de agua. Esta correspondencia de la señal de inducción con las condiciones ambientales una vez que existe la respuesta a la mixis, tiene en el largo plazo, consecuencias favoreciendo la posterior diapausa y así la persistencia poblacional vía dispersión temporal en el mismo cuerpo de agua y espacial entre cuerpos de agua conectados. La variabilidad clonal observada está en acuerdo con la variabilidad en la respuesta a la inducción de mixis (Gilbert, 2002; Schröder & Gilbert, 2004) y nos permite sugerir una rápida adecuación de la especie a diferentes determinantes ambientales, mediante la estrategia de bet-hedging (Alekseev et al., 2007). En este estudio, los clones utilizados para los experimentos en el laboratorio fueron resultado directo de la reproducción sexual de rotíferos habitando la columna de agua en el Tancat de la Pipa, Valencia, España.

Estos elementos deberán integrarse adecuadamente en el futuro para ser capaces de analizar las trayectorias ecológicas y evolutivas de este tipo de organismos en

ambientes variables y poder relacionar las variables ambientales con las presiones selectivas respecto a los umbrales de propensión a la mixis (Fussman et al, 2003, Gilbert & Diéguez, 2010). Con el fin de poder proyectar las consecuencias adaptativas a nivel del banco de variabilidad genética (huevos en diapausa), respecto de las dinámicas ecológicas que estarían alterando las respuestas que unen las distintas escalas temporales y espaciales en este tipo de organismos.

## Literatura Citada

- Alekseev, V. R., De Stasio, B. T., & Gilbert, J. (2007). Diapause in aquatic invertebrates: Theory and human use (Vol. 84). Dordrecht: Springer.
- Fussmann, G. F., Kramer, G., & Labib, M. (2007). Incomplete induction of mixis in *Brachionus calyciflorus*: patterns of reproduction at the individual level. *Hydrobiologia*, 593(1), 111-119.
- Fussmann, G., Ellner, S., & Hairston Jr, N. (2003). Evolution as a critical component of plankton dynamics. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 270 (1510), 1015-1022.
- Gilbert, J. J. (1980). Female polymorphism and sexual reproduction in the rotifer *Asplanchna*: Evolution of their relationship and control by dietary tocopherol. *American Naturalist*, 116 , 409-431.
- Gilbert, J. J. (1993). Rotifera. In Adiyodi, K.G., & Adiyodi, R.G. (eds) *Reproductive Biology of Invertebrates. Vol VI, Part A. Asexual Propagation and Reproductive Strategies*. Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi, pp. 231-263.
- Gilbert, J. J. (2002). Endogenous regulation of environmentally induced sexuality in a rotifer: A multigenerational parental effect induced by fertilisation. *Freshwater Biology*, 47 (9), 1633-1641.
- Gilbert, J. J. (2003). Environmental and endogenous control of sexuality in a rotifer life cycle: Developmental and population biology. *Evolution & Development*, 5 (1), 19-24.

- Gilbert, J. J. (2004). Females from resting eggs and parthenogenetic eggs in the rotifer *Brachionus calyciflorus*: Lipid droplets, starvation resistance and reproduction. *Freshwater Biology*, 49(11), 1505-1515.
- Gilbert, J. J. (2007). Induction of mictic females in the rotifer *Brachionus*: Oocytes of amictic females respond individually to population-density signal only during oogenesis shortly before oviposition. *Freshwater Biology*, 52(8), 1417-1426.
- Gilbert, J. J. (2010). Effect of food concentration on the production and viability of resting eggs of the rotifer *Brachionus*: Implications for the timing of sexual reproduction. *Freshwater Biology*, 55(12), 2437-2446. doi:10.1111/j.1365-2427.2010.02455.x
- Gilbert, J. J., & Diéguez, M. C. (2010). Low crowding threshold for induction of sexual reproduction and diapause in a Patagonian rotifer. *Freshwater Biology*, 55(8), 1705-1718.
- Gyllström, M., & Hansson, L. (2004). Dormancy in freshwater zooplankton: Induction, termination and the importance of benthic-pelagic coupling. *Aquatic Sciences*, 66(3), 274-295. doi:10.1007/s00027-004-0712-y
- Krebs, C. J., (1985). *Ecology, the Experimental Analysis of Distribution and Abundance*, 3rd edn. Harper & Row, New York.
- Lampert W. & Sommer U. (1997) *Limnoecology: The Ecology of Lakes and Streams*. Oxford University Press, New York, 382 pp.
- Larson, P., & Dodson, S. (1993). Invited review Chemical communication in planktonic animals. *Arch. Hydrobiol*, 129 (2), 129-155.

- Schröder, T., & Gilbert, J. (2004). Transgenerational plasticity for sexual reproduction and diapause in the life cycle of monogonont rotifers: Intraclonal, intraspecific and interspecific variation in the response to crowding. *Functional Ecology*, 18(3), 458-466.
- Segers, H. (2002). The nomenclature of the rotifera: Annotated checklist of valid family and genus-group names. *Journal of Natural History*, 36(6), 631-640.
- Serra M., Snell T.W. & King C.E. (2004) The timing of sex in cyclically parthenogenetic rotifers. In Moya A., & E. Font E. (eds), *Evolution. From Molecules to Ecosystems*. University Press, Oxford, pp. 135–146.
- Serra, M., & King, C. E. (1999). Optimal rates of bisexual reproduction in cyclical parthenogens with density-dependent growth. *Journal of Evolutionary Biology*, 12(2), 263-271.
- Serra, M., Aparici, E., & Carmona, M.J. (2008). When to be sexual: sex allocation theory and population density-dependent induction of sex in cyclical parthenogens. *J. Plankton Res*, 30 (11), 1207-1214. doi: 10.1093/plankt/fbn077.
- Snell, T. W., Dingmann, B. J., & Serra, M. (2001). Density-dependent regulation of natural and laboratory rotifer populations. *Hydrobiologia*, 446(1), 39-44.
- Snell, T.W. & Boyer, E.M. (1988) Thresholds for mictic female production in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Müller). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 124, 73–85.
- Snell, T.W., & Garman, B.L. (1986). Encounter probabilities between male and female rotifers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 97 (3), 221–230.  
Doi:10.1016/0022-0981(86)90243-1

- Stelzer, C., & Snell, T. (2003). Induction of sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Monogononta, Rotifera) by a density-dependent chemical cue. *Limnol.Oceanogr*, 48(2), 939-943.
- Wallace, R. L., Snell, T. W., Ricci, C., & Nogrady, T. (2006). Rotifera. Vol 1, Biology, Ecology and Systematics 2nd Edition. Kenobi Productions, Ghent, and Backhuys Publishers, Leiden.



## CAPITULO II

VULNERABILIDAD A LA DEPREDACIÓN DE HEMBRAS  
PARTENOGENÉTICAS Y SEXUALES DE *BRACHIONUS*  
*CALYCIFLORUS* FRENTE A SU DEPREDADOR *ASPLANCHNA*  
*SIEBOLDI*

## Resumen

La transición desde un tipo de reproducción asexual a uno de tipo sexual en rotíferos implica cambios morfológicos en el estado adulto en los individuos de *B. calyciflorus*, con potenciales consecuencias sobre su desempeño. En este estudio se evaluó el polimorfismo reproductivo de *B. calyciflorus* en relación a la vulnerabilidad a sus depredadores. Con el propósito de conocer si existe o no vulnerabilidad diferencial a la depredación de los estadios sexuales, se cuantificó el consumo por parte del depredador *Asplanchna sieboldi* sobre morfotipos diferentes de su presa: hembras sexuales y hembras partenogénicas de *B. calyciflorus*. Para la obtención de cada uno de estos tipos de presa, se realizaron previamente las inducciones tanto de hembras sexuales con medio pre-condicionado de conoespecíficos de *B. calyciflorus*, como inducción de defensas con kairomonas del depredador *A. sieboldi*. Luego, se estimó el consumo de cada tipo de presa sobre un gradiente de densidades. La respuesta funcional de *A. sieboldi* no fue diferente para hembras sexuales y partenogénicas de manera significativa. Se concluyó que la inducción de reproducción sexual en las presas no afectó la vulnerabilidad a la depredación de *A. sieboldi* y se sugiere que esto tiene implicancias ecológicas importantes sobre la posterior reproducción y producción de huevos en diapusa.

## Introducción

*Brachionus calyciflorus* pertenece a la Clase Monogononta (Rotifera), en su ciclo de vida predomina la reproducción por partenogénesis y la reproducción sexual ocurre por inducción de condiciones ambientales. Está bien establecido que el factor ecológico clave que induce la mixis en esta especie es la alta densidad de conoespecíficos (Gilbert, 2002; 2003; 2004; 2007; Stelzer & Snell, 2003; Fussmann et al., 2003; Schröder & Gilbert, 2004).

La reproducción sexual involucra la producción de machos, que tras fecundar hembras sexuales permiten la generación de huevos en diapausa (Wallace et al., 2006). Cuando se induce el tipo de reproducción sexual, existe una diferenciación en las poblaciones de rotíferos, entre hembras partenogénicas y sexuales únicamente cuando son adultas (Lampert, 1987; Gilbert, 2002; Gilbert, 2003; Halkett et al., 2005). Las hembras amícticas o partenogénicas producen huevos diploides que desarrollan hembras partenogénicas en su descendencia y las hembras sexuales, producen huevos haploides que desarrollan machos si no son fertilizadas, o en caso contrario desarrollan huevos en diapausa (Gilbert, 2003; 2007).

Los morfotipos de estas hembras son diferenciables únicamente cuando están maduras, por el tamaño y tipo de huevos que producen. Una hembra adulta partenogénica desarrolla huevos diploides más grandes adjuntos externamente al cuerpo, respecto de hembras sexuales con huevos haploides y de tamaño considerablemente menor (Epp & Lewis, 1971; Gilbert, 1974; Wallace et al., 2006). Estas diferencias morfológicas en estado adulto en la población, producto de la

inducción de hembras sexuales, podría tener consecuencias en la vulnerabilidad a la depredación y un mayor consumo de este tipo de hembras respecto de hembras partenogénicas, puede tener consecuencias ecológicas importantes, ya que la depredación sobre estas, restringe la probabilidad de la futura producción de huevos en diapausa si las consumen antes de ser fertilizadas.

### *Depredación en rotíferos*

Las abundancias de las poblaciones naturales de rotíferos son reguladas fuertemente por procesos de depredación (Walz, 1997), existiendo relación estrecha entre la abundancia de depredadores y la densidad de algunas poblaciones de rotíferos. Entre los principales depredadores de algunas especies de rotíferos destacan rotíferos del género *Asplanchna*, entre otros invertebrados (Hampton & Gilbert, 2001; Lapesa et al., 2004; Wallace et al., 2006).

Con el propósito de reducir su vulnerabilidad a los depredadores, algunas especies de rotíferos han desarrollado distintos tipos de defensas antidepredatorias, incluyendo cambios morfológicos, conductas de escape y otros tipos de evasión (Williamson, 1983; 1987; Stemberger & Gilbert, 1987; Wallace et al., 2006). Las defensas inducibles son cambios fenotípicos plásticos en los organismos presa en respuesta a señales producidas por la presencia del depredador. En rotíferos, numerosas investigaciones han demostrado la expresión reversible de cambios morfológicos tales como el desarrollo o elongación de espinas anteriores o postero-laterales (Gilbert, 1999; Tollrian & Harvell, 1999). La inducción de estas proyecciones morfológicas en las presas, tienen una significativa

reducción en la captura e ingestión por depredadores invertebrados ya que esto dificulta su manipulación y su ingestión (Gilbert, 1967; Stemberger & Gilbert, 1984; Stemberger, 1988; Wallace et al., 2006; Aránguiz-Acuña et al. 2010).

Dado que las poblaciones de *B. calyciflorus* cuando inician la inducción de reproducción sexual, la respuesta a la inducción de hembras sexuales nunca es total, más bien es incompleta, resulta en una población con morfotipos mezclados tanto asexuales como sexuales (Gilbert, 2003; 2004), estas únicamente son distintas en estado adulto ya que el tamaño y tipo de huevos que adjuntan externamente son diferentes. Estas diferencias morfológicas por el efecto de la inducción a reproducción sexual, podría tener efectos negativos en la vulnerabilidad de *B. calyciflorus* a sus depredadores, ya que sus estrategias de escape y defensivas no serían muy eficientes en los morfotipos sexuales por el costo que implica producir huevos sexuales. Se espera, que el consumo de presas del tipo hembras sexuales, sea mayor que el de hembras partenogenéticas debido a que este tipo de hembras ya invierte energía en huevos sexuales, lo cuál no permitiría conductas de escape ni defensas eficientes contra la depredación por *Asplanchna*. Las consecuencias ecológicas por un consumo diferencial y mayor sobre hembras míticas respecto de hembras amíticas, estarían relacionadas con un efecto negativo en la posterior producción de huevos diapáusicos producto de la depredación de hembras sexuales no fertilizadas.

En este estudio el objetivo central es evaluar la vulnerabilidad a la depredación como consecuencia de la inducción de hembras sexuales. En particular, se cuantificó y comparó el consumo de *A. sieboldi* sobre morfos diferentes de *B. calyciflorus*: hembras sexuales y hembras partenogenéticas de *B. calyciflorus*.

## Métodos

*Brachionus calyciflorus* y el depredador *Asplanchna* fueron obtenidos desde el Embalse Rapel, VI región, Chile. Para la obtención de las presas, se obtuvieron hembras míticas con la metodología de inducción por medio pre-condicionado de conoespecíficos y la defensa antidepredatoria con inducción por kairomonas del depredador *Asplanchna*. La mantención e inducción de los morfotipos se describen en anexo I y los umbrales de inducción tanto para hembras sexuales como para defensas antidepredatorias en anexo III.

### *Respuestas funcionales de Asplanchna sieboldi*

El depredador *Asplanchna sieboldi* fue cultivado en baja densidad poblacional en medio MBL modificado y alimentados con una mezcla de *B. calyciflorus* y *Paremecium caudatus* como presas. Los tres tipos de presas experimentales ofrecidas separadamente a *A. sieboldi* fueron hembras sexuales no defendidas, hembras partenogenéticas no defendidas y hembras partenogenéticas defendidas de *B. calyciflorus*. En vasos precipitados de 50 mL con 10 mL de medio MBL con las presas en su densidad correspondiente para cada tratamiento, se inocularon dos depredadores adultos de *A. sieboldi*, previamente mantenidos en hambruna por un periodo de tiempo de 2 horas, antes de ofrecer las presas experimentales. Las densidades de las distintas presas fueron: 0,2 ind mL<sup>-1</sup>; 0,5 ind mL<sup>-1</sup>; 2 ind mL<sup>-1</sup>; 8 ind mL<sup>-1</sup> y 32 ind mL<sup>-1</sup>, cada una de estos tratamientos tuvo siete réplicas. Las condiciones controladas de laboratorio son:

temperatura de 24°C, luz continua y el tiempo de alimentación de los depredadores fue de una hora, transcurrido este tiempo, se fijaron los depredadores con formalina al 5%. Una vez fijados en formalina, se realizó análisis de contenido estomacal bajo microscopio (DM500 LEICA, Alemania), contabilizando sus presas a través de la identificación de cada trophi (aparato masticador) consumido por el depredador. Los datos fueron ajustados a una curva de respuesta funcional Holling tipo II (Rothhaupt, 1990; Lampert & Sommer, 1997):

$$V = \frac{V_{\max} \times S}{S + k_r}$$

dónde,  $V$  es la tasa de consumo del depredador,  $S$  la disponibilidad de presas,  $V_{\max}$  es el valor de saturación de la tasa de consumo y  $K_r$  es la concentración de presas a la cuál  $\frac{V_{\max}}{2}$  es alcanzada. Luego de este ajuste se realizó ANOVA de una vía para el parámetro  $K_r$  y prueba a posteriori de Tukey con un  $p < 0,05$  para  $V_{\max}$ , entre curvas.

## Resultados

No se encontraron diferencias significativas entre el consumo de hembras sexuales y hembras partenogénicas (Figura 1). El número de presas consumido fue más bajo y significativamente diferente cuando el tipo de presa fue *B. calyciflorus* defendido morfológicamente (Figura 1, panel C y Tabla II), el consumo máximo, dado por el parámetro  $V_{max}$  fue significativamente diferente de las respuestas funcionales para los otros dos tipos de hembra (Tabla II, Figura 1). La tasa del consumo de presas, como se esperaba, se ajusta a la respuesta funcional Holling tipo II. Entre los tipos de presas no defendidas de *B. calyciflorus*, sean del tipo sexual o partenogénicas, no existe diferencias significativas en el consumo por el depredador *A. sieboldi* para ninguno de los dos parámetros  $V_{max}$  (Tabla II) o  $K_t$  (Tabla I), obtenidos de las curvas ajustadas a la ecuación de Holling tipo II y posterior ANOVA de una vía para el parámetro  $K_t$  y prueba a posteriori de Tukey para  $V_{max}$ .

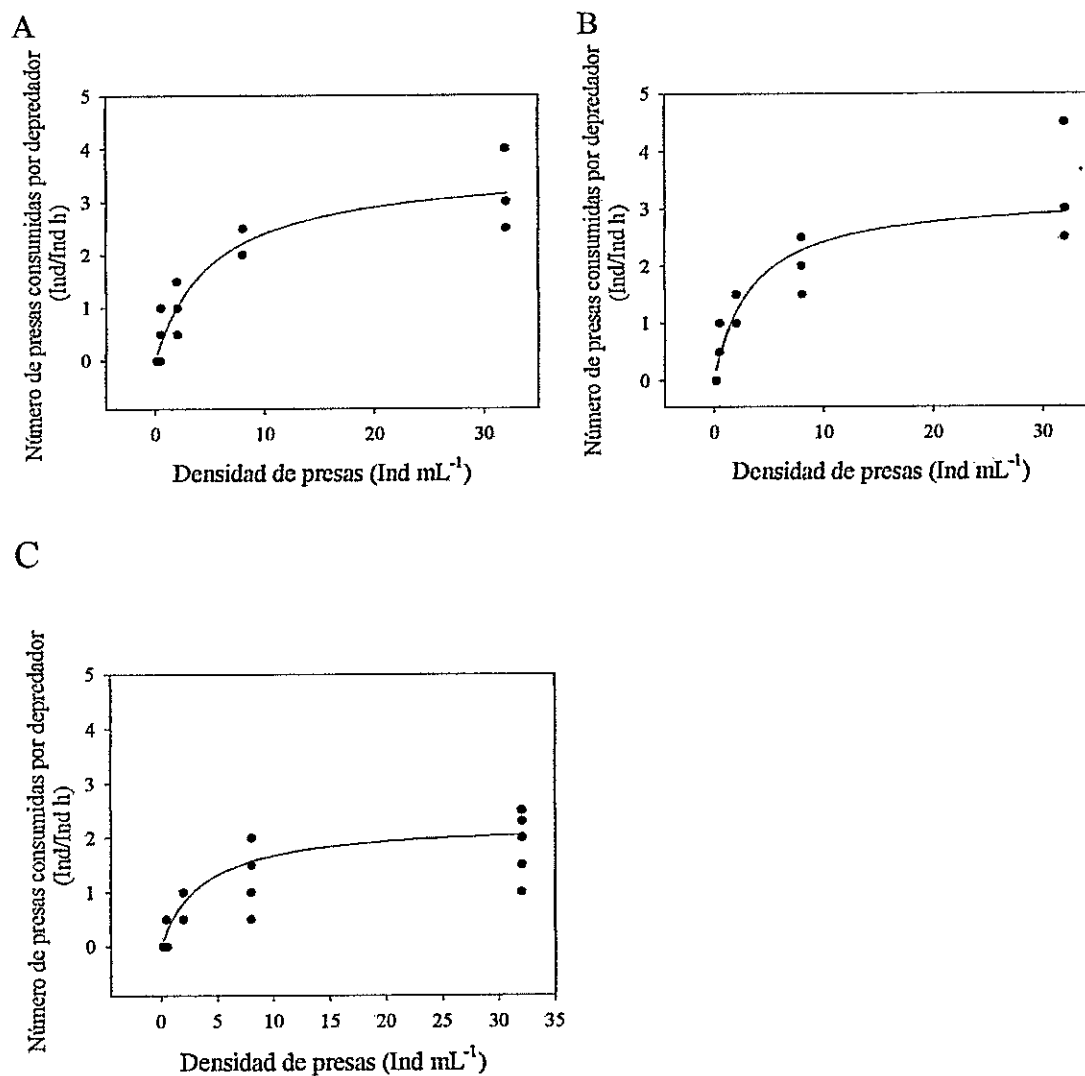


**Tabla I.** Resultados de ANOVA de una vía para el parámetro  $K_t$  entre las presas: Hembras partenogenéticas no defendidas, Hembras sexuales no defendidas y Hembras partenogenéticas defendidas. Las diferencias de las medias es significativa al nivel  $p < 0,05$ .

Fuente de Comparación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media Cuadrática	F	p
Entre grupos	2	7,176	3,588	0,627	0,548
Residual	14	80,066	5,719		
Total	16	87,242			

**Tabla II.** Prueba a posteriori de Tukey parámetro  $V_{Max}$  entre las presas: Hembras partenogenéticas no defendidas (N.D.), Hembras sexuales no defendidas (N.D.) y Hembras partenogenéticas defendidas (D.). Las diferencias son significativas al nivel  $p < 0,05$ .

	Diferencia entre medias	p	q	Valor p
Sexual N.D. vs. Partenogenética D.	1,371	3	4,865	<0,05
Sexual N.D. vs. Partenogenética N.D.	0,413	3	1,465	=0,56
Partenogenética N.D. vs. Partenogenética D.	0,958	3	4,389	<0,05



**Figura 1.** Respuestas funcionales de *Asplanchna sieboldi* consumiendo tres morfotipos de *B. calyciflorus* como presas. A) Hembras míticas no defendidas, B) Hembras amíticas no defendidas y C) Hembras amíticas defendidas. El parámetro  $K_t$  no presentó diferencias entre las tres curvas ( $p = 0,548$ , ANOVA), el parámetro  $V_{max}$  en C fue significativamente menor que A y B (Prueba de Tukey,  $p < 0,05$ ).

## Discusión

En esta investigación el consumo de hembras sexuales no defendidas por el depredador *A. sieboldi* no fue diferente del consumo de hembras partenogénicas no defendidas. Esto indica que la vulnerabilidad de *B. calyciflorus* a la depredación por *A. sieboldi* no es afectada por la inducción de reproducción sexual o por el morfotipo reproductivo. Los efectos de la vulnerabilidad de las presas han sido investigados extensivamente para *Asplanchna* depredando sobre *Brachionus calyciflorus* y otras especies de rotíferos (Nandini et al., 2003), así como también el éxito de captura e ingestión sobre *B. calyciflorus* con inducción de espinas posterolaterales alargadas vs. no alargadas, demostrando que la ingestión sobre *B. calyciflorus* espinado es significativamente menor (Iyer & Rao, 1996), consistente con el resultado en este estudio (Figura 1). El contacto entre *Asplanchna* y *B. calyciflorus* permite que este último contraiga su corona aumentando su presión hidrostática dentro de su pseudoceloma. Esta presión causa que las espinas posterolaterales se expandan incrementando el tamaño de la presa lo cual permite liberarse del depredador y luego nadar para escapar evitando la ingestión por *Asplanchna* (Wallace et al., 2006). La respuesta funcional de *A. sieboldi* se ajustó a una curva monótona Holling tipo II como ya se ha reportado en algunas investigaciones (Nandini & Sarma, 1999; Nandini et al., 2003). Las curvas obtenidas de la respuesta funcional de *A. sieboldi* sobre *B. calyciflorus* muestran que el tipo de presa menos consumida fueron hembras de *B. calyciflorus* defendidas morfológicamente, en comparación a las otras hembras no defendidas, confirmando que la defensa morfológica afecta la ingestión de este tipo de presas por parte de *A. sieboldi*, pero no el morfotipo reproductivo.

*Brachionus calyciflorus* cuando inicia la inducción de reproducción sexual, esta respuesta es incompleta, resultando una población con morfotipos mezclados tanto asexuales como sexuales (Gilbert, 2003; 2004). Esto sugiere que si ambos morfotipos conviven, el consumo no diferencial entre tipos de hembras sexuales y partenogénicas no defendidas, tendría consecuencias ecológicas en la dinámica de la columna de agua por depredación y además efectos indirectos sobre la dinámica a largo plazo por la reducción de la probabilidad de fertilización y posterior producción de huevos en diapausa si estas son depredadas antes de ser fertilizadas.

A pesar de no haberse detectado efectos del polimorfismo reproductivo sobre la vulnerabilidad, sería recomendable conocer si la ingestión de este tipo de hembras míticas, tiene algún efecto en la respuesta numérica de *A. sieboldi*, debido a la calidad de la hembra considerando el tipo de huevos que transporta y así conocer si el número de depredadores es afectado por el consumo de un tipo u otro de hembras.

## Literatura citada

- Agrawal, A. A., J. K. Conner, and S. Rasmann. 2010. Tradeoffs and negative correlations in evolutionary ecology. In: M.A. Bell, W.F. Eanes, D.J. Futuyma, and J.S. Levinton, eds. *Evolution After Darwin: the First 150 Years*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Aránguiz-Acuña, A., Ramos-Jiliberto, R., Sarma, N., Sarma, S. S. S., Bustamante, R. O., & Toledo, V. (2010). Benefits, costs and reactivity of inducible defences: an experimental test with rotifers. *Freshwater Biology*, 55(10), 2114-2122.
- Epp, R. W., & Lewis, W.M. (1971). Sexual dimorphism in *Brachionus plicatilis* (Rotifera): Evolutionary and adaptive significance. *Evolution*, 33 (3), 919-928.
- Fussmann, G., Ellner, S., & Hairston Jr, N. (2003). Evolution as a critical component of plankton dynamics. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 270 , 1015-1022. DOI 10.1098/rspb.2003.2335.
- Gilbert, J. J. (1967). *Asplanchna* and postero-lateral spine production in *Brachionus calyciflorus*. *Arch.Hydrobiol*, 64 (1), 1-62.
- Gilbert, J. J. (1974). Dormancy in rotifers. *Transactions of the American Microscopical Society*, 93 (4), 490-513.
- Gilbert, J. J. (1999). Kairomone-induced morphological defenses in rotifers. In Tollrian & Harvell (eds) *The ecology and evolution of inducible defenses*. Princeton University Press. pp. 127-141.

- Gilbert, J. J. (2002). Endogenous regulation of environmentally induced sexuality in a rotifer: A multigenerational parental effect induced by fertilisation. *Freshwater Biology*, 47 (9), 1633-1641.
- Gilbert, J. J. (2003). Environmental and endogenous control of sexuality in a rotifer life cycle: Developmental and population biology. *Evolution & Development*, 5 (1), 19-24.
- Gilbert, J. J. (2004). Females from resting eggs and parthenogenetic eggs in the rotifer *Brachionus calyciflorus*: Lipid droplets, starvation resistance and reproduction. *Freshwater Biology*, 49 (11), 1505-1515.
- Gilbert, J. J. (2007). Induction of mictic females in the rotifer *Brachionus*: Oocytes of amictic females respond individually to population-density signal only during oogenesis shortly before oviposition. *Freshwater Biology*, 52 (8), 1417-1426.
- Halkett, F., Simon, J. C., & Balloux, F. (2005). Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(4), 194-201. doi:10.1016/j.tree.2005.01.001
- Hampton, S. E., & Gilbert, J. J. (2001). Observations of insect predation on rotifers. *Hydrobiologia*, 446(1), 115-121.
- Iyer, N., & Rao, T. (1996). Responses of the predatory rotifer *Asplanchna intermedia* to prey species differing in vulnerability: Laboratory and field studies. *Freshwater Biology*, 36(3), 521-533.
- Lampert W. & Sommer U. (1997) *Limnoecology: The Ecology of Lakes and Streams*. Oxford University Press, New York, 382 pp.

- Lampert, W. (1987). Predictability in lake ecosystems: The role of biotic interactions. In: Schulze ED & Zwölfer H (Ed) Potential and Limitations of Ecosystem Analysis. Ecological Studies 61. Springer-Verlag, Berlin, pp. 333–346.
- Lapesa, S., Snell, T. W., Fields, D. M., & Serra, M. (2004). Selective feeding of *Arctodiaptomus salinus* (copepoda, calanoida) on co-occurring sibling rotifer species. *Freshwater Biology*, 49(8), 1053-1061.
- Nandini, S., & Sarma, S. (1999). Effect of starvation time on the prey capture behaviour, functional response and population growth of *Asplanchna sieboldi* (Rotifera). *Freshwater Biology*, 42(1), 121-130.
- Nandini, S., Pérez-Chávez, R., & Sarma, S. (2003). The effect of prey morphology on the feeding behaviour and population growth of the predatory rotifer *Asplanchna sieboldi*: A case study using five species of *Brachionus* (Rotifera). *Freshwater Biology*, 48(12), 2131-2140.
- Rothhaupt K.O. (1990) Changes of the functional responses of the rotifers *Brachionus rubens* and *Brachionus calyciflorus* with particle sizes. *Limnology and Oceanography*, 35, 24–32.
- Schröder, T., & Gilbert, J. (2004). Transgenerational plasticity for sexual reproduction and diapause in the life cycle of monogonont rotifers: Intraclonal, intraspecific and interspecific variation in the response to crowding. *Functional Ecology*, 18(3), 458-466.
- Stelzer, C., & Snell, T. (2003). Induction of sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Monogononta, Rotifera) by a density-dependent chemical cue. *Limnol.Oceanogr*, 48(2), 939-943.

- Stemberger, R. S. (1988). Reproductive costs and hydrodynamic benefits of chemically induced defenses in *Keratella testudo*. *Limnology and Oceanography*, 33, 593-606.
- Stemberger, R., & Gilbert, J. (1984). Spine development in the rotifer *Keratella cochlearis*: Induction by cyclopoid copepods and asplanchna. *Freshwater Biology*, 14(6), 639-647.
- Stemberger, R., & Gilbert, J. (1987). Defenses of planktonic rotifers against predators. In Kerfoot, W.C. and Sih, A. (eds), *Predation: Direct and Indirect Impacts on Aquatic Communities*. University Press of New England, Hanover, pp. 227-239.
- Tollrian, R., & Harvell, C. D. (1999). *The ecology and evolution of inducible defenses*. Princeton Univ Press, London.
- Wallace, R. L., Snell, T. W., Ricci, C., & Nogrady, T. (2006). *Rotifera*. Vol 1, *Biology, Ecology and Systematics* 2nd Edition. Kenobi Productions, Ghent, and Backhuys Publishers, Leiden.
- Walz, N. (1997). Rotifer life history strategies and evolution in freshwater plankton communities. In Streit B., Städler T. & Lively C.M. (eds) *Evolutionary Ecology of Freshwater Animals*. Birkhäuser. Verlag Basel, Basel, Switzerland, pp. 119-149.
- Williamson, C. E. (1983). Invertebrate predation on planktonic rotifers. *Hydrobiologia*, 104(1), 385-396.
- Williamson, C. E. (1987). Predator-prey interactions between omnivorous diaptomid copepods and rotifers: The role of prey morphology and behavior. *Limnology and Oceanography*, 32 (1), 167-177.



## CAPITULO III

COMPROMISO ENTRE CAMBIO DE ESTRATEGIA REPRODUCTIVA  
Y DEFENSAS ANTI-DEPREDATORIAS EN *BRACHIONUS*

*CALYCIFLORUS*

## Resumen

*Brachionus calyciflorus* (Orden Rotifera) tiene una fase reproductiva asexual partenogenética y otra conocida como mixis o fase sexual, la señal que induce este cambio es la percepción de infoquímicos por alta densidad de conespecíficos. Por otra parte, los organismos de esta misma especie expresan defensas morfológicas elongando sus las espinas posterolaterales en respuesta a la presencia de kairomona de su depredador *Asplanchna*. Estas estrategias reproductivas y defensivas han sido estudiadas por separado y en este trabajo se demuestra el compromiso existente entre estos rasgos de historia de vida de *B. calyciflorus*. Este capítulo está dividido en dos experimentos centrales, el primero está focalizado en la respuesta de inducción de mixis cuando las hembras están defendidas de su depredador *Asplanchna sieboldi*, y en el cuál se obtiene que la producción de hembras míticas fue inhibida cuando las madres inducidas con la señal de mixis fueron hembras defendidas morfológicamente. El otro experimento se focaliza en la respuesta a la inducción de mixis de *B. calyciflorus*, al enfrentarse a las dos señales distintas de forma simultánea: la kairomona del depredador y la señal de conespecíficos. Aquí se obtuvo un efecto inhibitorio débil pero significativo de la kairomona sobre la inducción de mixis. Los resultados de ambos experimentos apuntan a que la inducción de reproducción sexual y la inducción de defensas antidepredatorias no son rasgos independientes sino que están en compromiso. Las diferencias obtenidas a partir de ambos experimentos sugieren que la naturaleza del compromiso parece ser más energética que por infodisrupción de señales.

## Introducción

*Brachionus calyciflorus* se caracteriza, al igual que muchas especies de invertebrados acuáticos, por tener una fase reproductiva amíctica (ausencia de machos) predominante y otra fase conocida como mixis (aparición de machos y reproducción sexual) (Wallace et al., 2006) (Figura 1, Introducción general), resultando en una diferenciación entre hembras partenogénicas y sexuales en las poblaciones de rotíferos que habitan los sistemas acuáticos (Lampert, 1987; Gilbert, 2002; Gilbert, 2003; Halkett et al., 2005). Las hembras partenogénicas producen huevos diploides que desarrollan hembras partenogénicas en su descendencia y las hembras sexuales, producen huevos haploides que desarrollan machos si no son fertilizadas, o desarrollan huevos en diapausa en caso contrario (Gilbert, 2003; 2007). Estas hembras únicamente se pueden diferenciar cuando son ovígeras, por el tipo de huevos que producen. Estos dos tipos de hembras existen tanto en Cladocera como en Rotifera (Gilbert, 2002; 2003; 2004; Halkett et al., 2005). En el ciclo de vida de *B. calyciflorus* está bien establecido que el factor ecológico clave que induce la mixis es un infoquímico liberado por alta densidad de conoespecíficos (Gilbert, 2002; 2003; 2004; 2007; Stelzer & Snell, 2003; Fussmann et al., 2003; Schröder & Gilbert, 2004). Sin embargo, las vías por las cuáles el químico induce esta respuesta, no son del todo conocidas (Gilbert, 2003). El resultado final de la reproducción sexual es la producción de huevos en diapausa, los cuáles son considerados como una vía de escape espacial y temporal a condiciones ambientales adversas. Los huevos en diapausa pueden mantenerse viables hasta cientos de años (Gyllström &

Hansson, 2004). Por lo anterior, la reproducción sexual de estos organismos es una estrategia clave que determina componentes de adecuación biológica de largo plazo en ambientes variables. Por ello su inducción es un atributo crucial para la persistencia poblacional. Este tipo de respuestas fenotípicas estarían relacionadas a un conjunto de otros rasgos de historia de vida interconectados (Stearns, 1992), los cuáles en su conjunto determinan la adecuación biológica de este rotífero.

Las defensas inducibles son otro tipo de respuesta fenotípica en los organismos presa, frente al riesgo de depredación, fuerza estructuradora principal de las comunidades acuáticas (Lampert & Sommer, 1997; Gilbert, 1999; Tollrian & Harvell, 1999; Vos et al., 2004). Entre los depredadores invertebrados, *Asplanchna sieboldi* es una de las especies más voraces y puede alimentarse de casi todas las especies de *Brachionus* (Gilbert, 1980), estos últimos, producen espinas o elongación de éstas en respuesta a la acumulación de sustancias solubles (kairomonas) producidas por sus depredadores (Gilbert, 1967; Stemberger & Gilbert, 1984; Stemberger, 1988; Wallace et al., 2006). La efectividad de estas defensas ha sido demostrada para sistemas *Asplanchna* – *B. calyciflorus* y otras especies de rotíferos (Nandini et al., 2003).

La expresión de estos rasgos fenotípicos son restringidos por la variabilidad genética pero también por compromisos entre algunos rasgos de historia de vida. En la teoría de las historias de vida uno de los principios centrales es el límite del potencial adaptativo de los organismos y los rasgos individuales no pueden variar independientemente por estar sujetos a restricciones y compromisos. Estos tienen relación con ventajas en la adecuación biológica conferidas por algún rasgo, asociado a un efecto negativo generado en otro atributo (Resnik, 1985; Stearns, 1989; Roff, 1993,

Agrawal et al., 2010). Los compromisos pueden manifestarse en correlaciones fenotípicas negativas entre dos rasgos, sin embargo una correlación negativa por sí misma no implica la existencia de un compromiso (Stelzer, 2005). En el zooplancton son comunes los compromisos entre diferentes rasgos de historia de vida relevantes para su adecuación biológica. Por ejemplo, se han reportado correlaciones fenotípicas entre algunos atributos de reproducción y sobrevivencia en rotíferos tales como *Asplanchna girodi*, *Brachionus macracanthus*, *B. variabilis* and *Platyias quadricornis* y Cladoceros tales como *Ceriodaphnia cornuta*, *Daphnia carinata*, *D. laevis*, *Moina macrocopa*, *Pleuroxus aduncus*, *Scapholeberis kingi* y *Simocephalus vetulus* (Sarma et al., 2002). Así como también costos por expresión de defensas, como espinas en *Daphnia pulex*, que disminuyen la depredación por parte de *Chaoborus* y a su vez tiene efectos negativos sobre la reproducción de este cladocero (Riessen & Young, 2005).

Una de las aproximaciones para evaluar los compromisos es la manipulación experimental directa y contrastar funciones una contra la otra (Resnik, 1985), y así obtener relaciones funcionales que estén restringiendo la magnitud de la respuesta entre rasgos. Los costos así como también los beneficios que confiere la inducción de sexo en rotíferos, como las defensas morfológicas inducibles, han sido evaluados de forma independiente y no se ha analizado hasta ahora, si existe alguna relación o compromiso en la expresión entre estos rasgos para rotíferos del género *Brachionus*.

Dado que la expresión de sexualidad (mixis) y la expresión de defensas antidepredatorias inducibles en *B. calyciflorus* son estrategias costosas y rasgos altamente determinantes en el éxito reproductivo de rotíferos, y además, ambas respuestas son expresadas en el mismo organismo por señales químicas de naturaleza

distinta, entonces la expresión de estos rasgos serían restrictivos cuando existen respuestas a estímulos simultáneos, determinado por la asignación de recursos limitados o por la interferencia entre percepción de señales. La hipótesis sometida a prueba en este trabajo es que la inducción de hembras sexuales está sujeta a compromisos con la expresión de rasgos defensivos anti-depredatorios en *B. calyciflorus*, derivado de la asignación de recursos limitados. De modo que la respuesta a la inducción de hembras sexuales, será menor cuando la hembras inducidas a reproducción sexual, sean hembras defendidas morfológicamente y cuando los agentes inductores sean simultáneos. Se espera encontrar una correlación negativa entre inducción de hembras sexuales y expresión de defensas en el mismo individuo. Por ello, se diseñaron dos experimentos complementarios, destinados a evaluar la respuesta de la inducción de hembras sexuales en hembras previamente defendidas, y el segundo con inducción de señales en forma simultánea.

## Métodos

Los organismos utilizados en este capítulo fueron obtenidos en el embalse Rapel, VI Región, Chile; los cultivos, mantención y experimentos, fueron ejecutados en el laboratorio de Biodiversidad en el Centro Nacional de Medio Ambiente (CENMA), Fundación Universidad de Chile. En este capítulo se utilizó la metodología de inducción de mixis con medio pre-condicionado con alta densidad de conespecíficos (ver Anexo I, Metodología General).

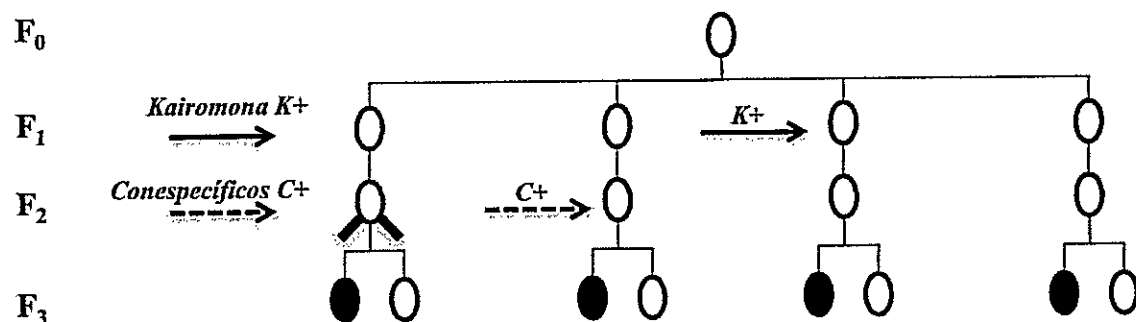
Previo a los experimentos descritos en este capítulo se realizaron algunos experimentos con el fin de obtener información cuantitativa acerca de las concentraciones de alimento de la microalga, densidades umbrales de conespecíficos como señal para la inducción de hembras sexuales de *B. calyciflorus* y también para la señal de inducción de defensas morfológicas utilizadas en el diseño experimental de los experimentos 1 y 2 (Ver anexo III).

### *Compromiso entre expresión de defensas y mixis: experimento 1*

Se realizó este experimento con el fin de identificar un posible compromiso entre inducción de hembras sexuales y la inducción de defensas morfológicas. Específicamente se investigó si la inducción de hembras sexuales es alterada debido a la inducción de defensas antidepredatorias. Con este diseño esperamos detectar compromisos con base energética, en el cual la asignación a la mantención de espinas

defensivas inhiba la asignación a mixis. Se examinó la proporción de hembras sexuales obtenidas desde madres con expresión de defensas y madres sin defensas. La inducción de la defensa se realizó en las abuelas (Figura 1). Para ello, los recién nacidos de *B. calyciflorus* obtenidos desde hembras amícticas fueron expuestos individualmente a medio MBL pre-condicionado con kairomona de *Asplanchna* (K+) ( $0,2 \text{ ind mL}^{-1}$ ), luego las hembras defendidas (espinadas) obtenidas fueron expuestas individualmente frente a medio MBL pre-condicionado con alta densidad de conespecíficos (C+). Todos los tratamientos fueron alimentados con  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  de *Pseudokirchneriella subcapitata*. Fotoperíodo L:O (16:8), T° 24 °C ( $\pm 0,2$ ), pH  $\approx 7,5$ . Los organismos experimentales iniciales provienen de madres cultivadas individualmente en medio MBL sin pre-condicionar (ausencia de las dos señales de inducción) por tres generaciones sucesivas al menos con el fin de evitar efectos maternos. En este experimento, se realizó la inducción de defensas anti-depredatorias con kairomona de *Asplanchna* (K+, Figura 1) en una generación, para los tratamientos con hembras defendidas, luego al obtener hembras defendidas se realizó la inducción de mixis para estas hembras, con alta densidad de conespecíficos (C+, Figura 1). Para evaluar la existencia de diferencias significativas en la proporción de hembras míticas entre los tratamientos y luego, para las diferencias entre número de hembras míticas y amícticas por tratamiento se realizó una prueba a posteriori de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para el análisis los datos y cumplir los supuestos, fueron transformados con la función raíz cuadrada.





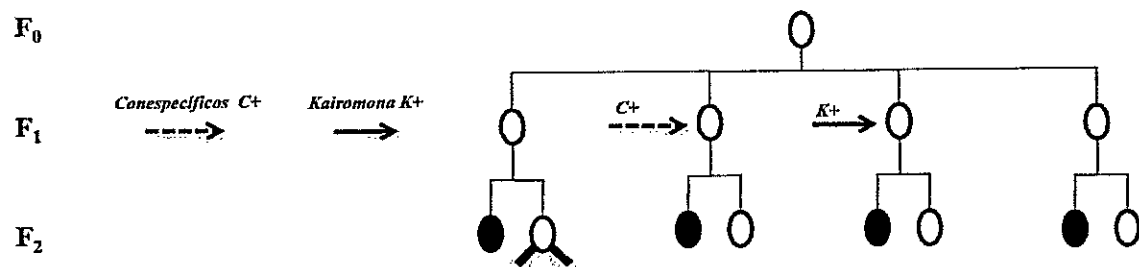
**Figura 1.** Esquema del diseño experimental de compromiso entre expresión de defensas y mixis, experimento 1. F<sub>0</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> y F<sub>3</sub>, representan las generaciones de los individuos experimentales. En F<sub>1</sub> se indujo la defensa antidepredatoria y F<sub>2</sub> se indujo a mixis. K<sup>+</sup>: Inducción de defensas con Kairomonas; C<sup>+</sup>: Inducción de mixis con conespecíficos. Bajo este diseño, se espera detectar compromisos con base energética. Las figuras ♀ representan hembras defendidas morfológicamente, ○ representan hembras amícticas y ● representan hembras míticas. El dibujo en el extremo derecho, representa el control experimental sin ninguna de las dos señales de inducción.

*Compromiso entre expresión de defensas y mixis, señales simultáneas: experimento 2*

En este experimento se pretende detectar compromisos a nivel de competencia entre percepción de señales. Con este diseño se investigó si la propensión a mixis es alterada debido a la presencia de señales simultáneas de inducción, inducción de hembras míticas en conjunto con señal de inducción de defensas antidepredatorias. Esperamos detectar disminución en la respuesta a la inducción de hembras sexuales, cuando las señales de inducción son simultáneas respecto de las señales por separado, debido a la competencia de señales ya que el mismo individuo responde a las dos señales de inducción. Sin embargo, no podemos descartar la base energética en el compromiso, debido a que pueda existir una asignación diferencial de recursos a una u otra estrategia, en la cual, la asignación a la mantención de espinas defensivas inhiba la asignación a mixis. Para esto se midió la inducción de hembras sexuales en hembras de *B. calyciflorus* expuestos a los dos tipos de señales químicas de forma simultánea: kairomonas del depredador (K+) y químicos provenientes de conespecíficos (C+) (Figura 2).

En este experimento, los recién nacidos de *B. calyciflorus* obtenidos desde hembras amíticas fueron expuestos individualmente a los siguientes tratamientos: medio MBL pre-condicionado con kairomona de *Asplanchna* (K+)(0,2 ind mL<sup>-1</sup>), MBL pre-condicionado con alta densidad de conespecíficos (C+), MBL pre-condicionado con ambas señales a la vez (K+C+) y el control con MBL sin pre-condicionar. La diferencia con el experimento anterior es la inducción simultánea de defensas anti-depredatorias (K+, Figura 2) y mixis (C+, Figura 2). En este experimento la concentración de cada

señal, tanto de conespecíficos de *B. calyciflorus* como de kairomona de *Asplanchna*, fue la misma que en el experimento anterior (ver Anexo III). Todos los tratamientos fueron alimentados con  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  con *Pseudokirchneriella subcapitata* contabilizados en cámara Neubauer (González, M et al, 1995), con fotoperíodo (16:8),  $T^\circ 24 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $\pm 0,2$ ) y  $\text{pH} \approx 7,5$ . Para evaluar la existencia de diferencias significativas para la proporción de hembras míticas entre tratamientos y luego las diferencias entre número de hembras míticas y amíticas por tratamiento, se realizó una prueba a posteriori de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para el análisis y cumplir los supuestos, los datos fueron transformados con la función raíz cuadrada. Además se realizó un ANCOVA en este experimento para evaluar si el número total de hembras afecta la respuesta a la inducción de hembras sexuales.

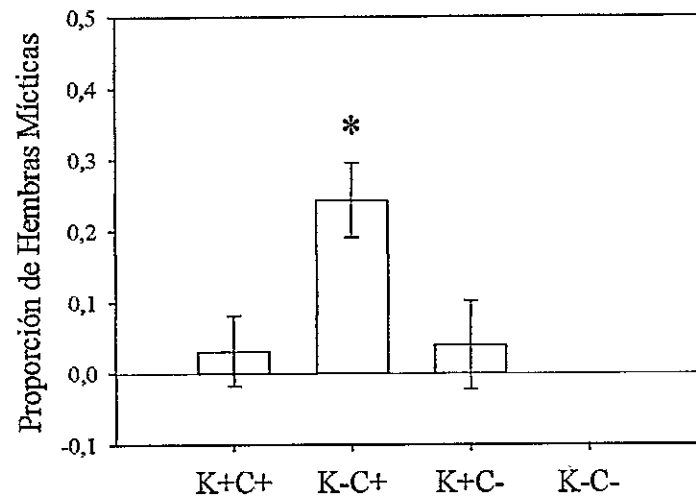


**Figura 2.** Esquema del diseño experimental de compromiso entre expresión de defensas y mixis, señales simultáneas, experimento 2. K+: Inducción de defensas con Kairomonas; C+: Inducción de mixis con conespecíficos. Bajo este diseño, se espera detectar compromisos por competencia de señales. Para simbología ver Figura 1. El dibujo del extremo derecho, representa el control experimental.

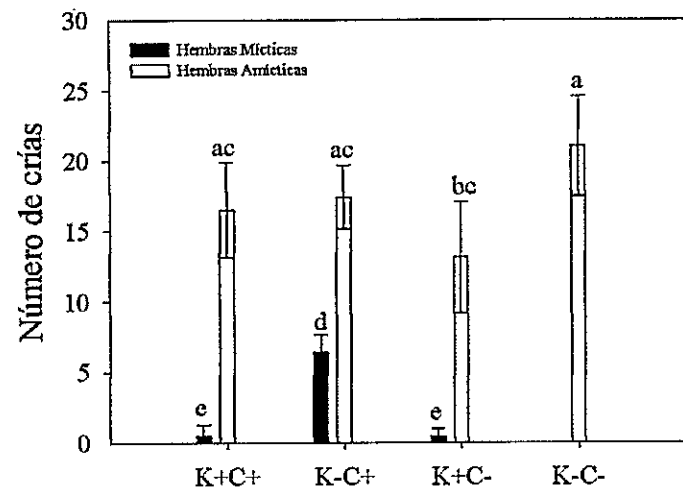
## Resultados

Los resultados en el experimento 1 (Figura 3), muestran que la proporción de hembras míticas fue significativamente más alto en el tratamiento K-C+ que en el tratamiento K-C- y que en el resto de los tratamientos (prueba a posteriori de Tukey  $p < 0,001$ ). Además cuando se analiza el número de hembras míticas para los mismos tratamientos, el número de hembras míticas en el tratamiento K-C+, es significativamente distinto del resto de los tratamientos (Figura 3B, prueba de Tukey,  $p < 0,05$ ). La Tabla I nos muestra la comparación entre pares para los tratamientos, el efecto de la inducción de hembras sexuales por conespecíficos (C) es significativo únicamente cuando existe inducción de defensas morfológicas por kairomonas (K).

A



B



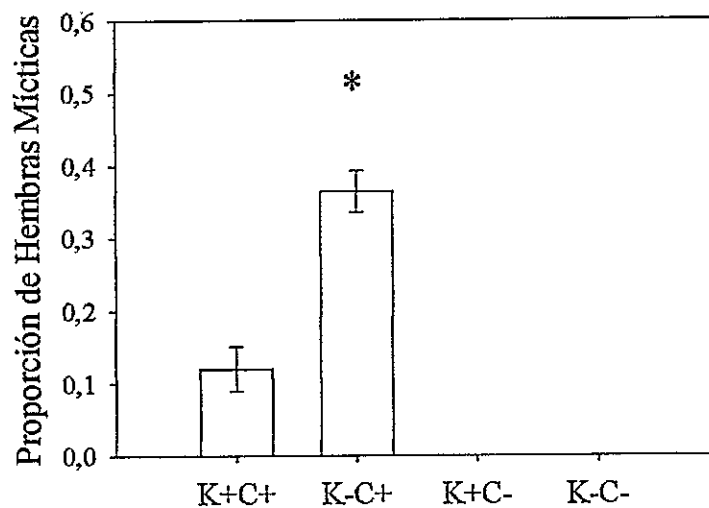
**Figura 3.** A) Proporción de hembras míticas de *B. calyciflorus* para cuatro tratamientos de inducción: (K+) kairomona de *Asplanchna*, (K-) ausencia de kairomona, (C+) alta densidad de conespecíficos y (C-) ausencia de conespecífico. Símbolo \* muestra diferencias significativas entre tratamientos (prueba a posteriori de Tukey  $p < 0,001$ ) B) Número de hembras míticas y amíticas generadas en cada tratamiento. Los valores representan la media y su IC 95%. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas (prueba de Tukey,  $p < 0,05$ ).

**Tabla I.** Comparación entre pares en ANOVA dos factores, para evaluar el compromiso entre inducción de hembras sexuales y expresión de defensas: experimento 1. Ajuste por Bonferroni. La diferencia de las medias es significativa al nivel  $p < 0,05$ . Los factores son: conespecíficos (C) y kairomona (K).

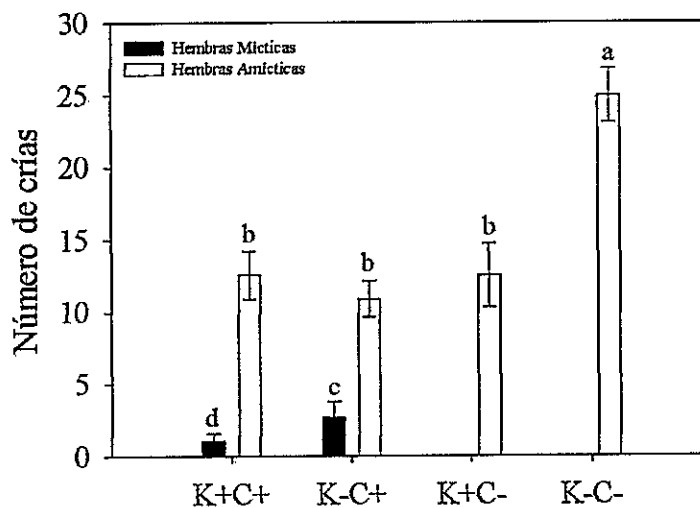
C	K <sub>i</sub>	K <sub>j</sub>	Diferencia entre medias (i-j)	Error típico	p
C-	-K-	+K	-0,103	0,066	0,131
C+	-K	+K	0,424*	0,066	0,000

En el experimento 2 se observa (Figura 4) que la respuesta de inducción de hembras míticas en el tratamiento K-C+ es la mayor entre todos los tratamientos, por lo tanto, la señal química de los conespecíficos sin la señal de kairomona del depredador *Asplanchna* estimula una mayor respuesta para inducción de hembras sexuales. Por otra parte, el tratamiento de señales simultáneas, K+C+ también tiene como resultado cierto nivel de inducción de mixis. Sin embargo tanto la proporción como la cantidad de hembras sexuales en este tratamiento es menor que el tratamiento K-C+ con la inducción solo con conespecíficos. Para los otros tratamientos sin señal de conespecíficos, no hubo producción de hembras sexuales. Podemos afirmar por estos resultados, que la inducción por sí sola de kairomonas del depredador *Asplanchna* no induce hembras sexuales. Finalmente, se obtuvo que en el experimento 2 la diferencia entre la inducción de mixis en los tratamientos K-C+ y K+C+ fue más débil que en experimento 1 (Ver figura 3 y 4).

A



B



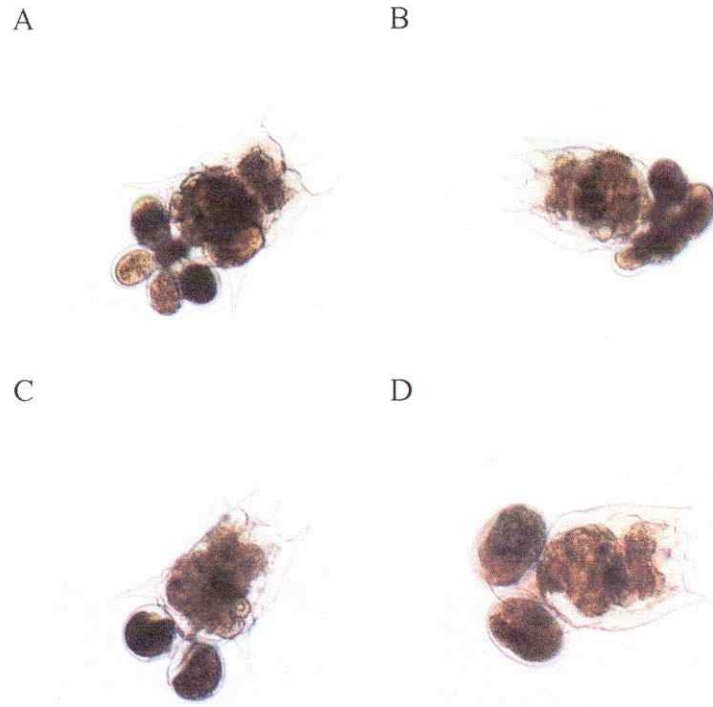
**Figura 4.** A) Proporción de hembras mícticas de *B. calyciflorus* en los tratamientos de inducción simultáneas. Referencias para cada tratamiento como en Fig. 3. Símbolo \* muestra diferencias significativas entre tratamientos (prueba a posteriori de Tukey  $p < 0,001$ ) B) Número de hembras mícticas y amícticas para cada tratamiento. Los valores representan la media y su IC 95%. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas (prueba de Tukey,  $p < 0,05$ )

Se realizó un ANCOVA con el fin de conocer si el número de crías totales tiene relación con las variables experimentales. La tabla II muestra los resultados, y observamos que la covariable está significativamente relacionada en forma lineal con el número de hembras míticas y que la interacción entre inducción con conespecíficos y kairomonas es significativa. Por último la figura 6 nos muestra imágenes de la morfología de *B. calyciflorus* para cada señal de inducción.

**Tabla II.** Resultados de ANCOVA de una vía con la variable dependiente número de hembras míticas y la covariable número de crías totales (R cuadrado corregida = 0,977). La diferencia de las medias es significativa al nivel  $p < 0,05$ . Los factores son: conespecíficos (C) y kairomona (K)

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	p
N. crías totales	,593	1	0,593	5,363	0,024
C	55,433	1	55,433	501,030	0,000
K	32,563	1	32,563	294,318	0,000
C * K	29,886	1	29,886	270,121	0,000
Error	5,864	53	0,111		
Total	427,000	58			
Total corregida	271,397	57			





**Figura 5.** Imágenes de hembras de *B. calyciflorus* A) míticas defendidas, B) míticas no defendidas, C) amíticas defendidas y D) amíticas no defendidas.

## Discusión

Claramente la señal de inducción de hembras sexuales es un químico proveniente de conespecíficos y la alta densidad de *B. calyciflorus* es un factor clave en este tipo de alternancia reproductiva.

Los resultados del experimento 1 sugieren que existe un compromiso entre la inducción de reproducción sexual y la inducción de rasgos morfológicos anti-depredatorios. Este resultado permite predecir que la inducción de hembras sexuales será menor cuando *Brachionus calyciflorus* está defendido contra su depredador. Esto tiene como consecuencia directa una menor tasa de encuentros entre machos y hembras, por lo tanto, se generarán posteriormente una menor cantidad de hembras míticas fertilizadas y luego menos huevos en diapausa. Esto es en consecuencia un efecto negativo en la adecuación biológica a largo plazo de *B. calyciflorus*. Presumiblemente, la causa de este compromiso sea la asignación limitada de recursos entre una y otra respuesta fenotípica. En la fisiología de las historias de vida una idea importante es la asignación diferencial de recursos internos limitados y su rol en el costo de la reproducción y compromisos entre rasgos (Calow & Townsend, 1981; Zera & Harshman, 2001; Ricklefs & Wikelski, 2002; Williams, 2005). El experimento 2 confirma la existencia de compromisos entre la inducción de hembras sexuales y la defensa antidepredatoria, aunque el tamaño del efecto, dado por la diferencia en producción de hembras míticas entre los tratamientos K+C+ y K-C+, fue relativamente débil. Esto sugiere que la hipótesis de infodisrupción o competencia entre percepción de señales

químicas alternativas no parece ser la mejor explicación para el compromiso evidenciado.

La señal química proveniente de alta densidad de conespecíficos de *B. calyciflorus* no ha sido caracterizada aún para esta especie y tampoco la kairomona de *Asplanchna* (Wallace et al., 2006), aunque Snell et al. (2006) demuestran que en otra especie de rotífero, *B. plicatilis* es una proteína MIP de tamaño entre 10kDa y 100 kDa la que induce hembras sexuales. Esto ilustra los varios espacios por cubrir en investigación dentro de este tema.

En esta investigación se demuestra que la inducción de mixis no es un rasgo independiente de la presencia de defensas anti-depredatorias de *B. calyciflorus* y es la primera vez que en rotíferos se relacionan experimentalmente la expresión de estrategias reproductivas sexuales y estrategias defensivas. Por lo tanto, podemos afirmar que existe una relación negativa entre inducción de hembras sexuales y expresión de defensas anti-depredatorias de *B. calyciflorus* y sugerir que este compromiso está sujeto a la asignación limitada de recursos. Este hallazgo nos permite predecir que la sincronización temporal de la presión de depredación con la inducción a la reproducción sexual podría generar efectos negativos severos sobre las poblaciones planctónicas.

## Literatura citada

- Calow, P., & Townsend, C. R. (1981). *Physiological ecology: An evolutionary approach to resource use*. Blackwell Scientific Publications.
- Fussmann, G., Ellner, S., & Hairston Jr, N. (2003). Evolution as a critical component of plankton dynamics. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 270, 1015-1022.
- Fussmann, G., Ellner, S., & Hairston Jr, N. (2003). Evolution as a critical component of plankton dynamics. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 270, 1015-1022.
- Gilbert, J. J. (1967). *Asplanchna* and postero-lateral spine production in *Brachionus calyciflorus*. *Arch.Hydrobiol*, 64 (1), 1-62.
- Gilbert, J. J. (1980). Female polymorphism and sexual reproduction in the rotifer *Asplanchna*: Evolution of their relationship and control by dietary tocopherol. *American Naturalist*, 116, 409-431.
- Gilbert, J. J. (1999). Kairomone-induced morphological defenses in rotifers. In Tollrian & Harvell (eds) *The ecology and evolution of inducible defenses*. Princeton University Press. pp. 127-141.
- Gilbert, J. J. (2002). Endogenous regulation of environmentally induced sexuality in a rotifer: A multigenerational parental effect induced by fertilisation. *Freshwater Biology*, 47(9), 1633-1641.

- Gilbert, J. J. (2003). Environmental and endogenous control of sexuality in a rotifer life cycle: Developmental and population biology. *Evolution & Development*, 5(1), 19-24.
- Gilbert, J. J. (2004). Females from resting eggs and parthenogenetic eggs in the rotifer *Brachionus calyciflorus*: Lipid droplets, starvation resistance and reproduction. *Freshwater Biology*, 49 (11), 1505-1515.
- Gilbert, J. J. (2007). Induction of mictic females in the rotifer brachionus: Oocytes of amictic females respond individually to population-density signal only during oogenesis shortly before oviposition. *Freshwater Biology*, 52 (8), 1417-1426.
- González, M., Parra, O., & Cifuentes, A. (1995). Técnicas de cultivo de microalgas en laboratorio. En K. Alveal., Ferrario, M.E., Oliveira, E.C., Stein, E. (Eds.). *Manual de Métodos Ficológicos*. Universidad de Concepción, Chile. pp. 219-249.
- Gyllström, M., & Hansson, L. (2004). Dormancy in freshwater zooplankton: Induction, termination and the importance of benthic-pelagic coupling. *Aquatic Sciences*, 66 (3), 274-295. doi:10.1007/s00027-004-0712-y
- Halkett, F., Simon, J. C., & Balloux, F. (2005). Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(4), 194-201. doi:10.1016/j.tree.2005.01.001
- Krebs, C. J., (1985). *Ecology, the Experimental Analysis of Distribution and Abundance*, 3rd edn. Harper & Row, New York.
- Lampert W. & Sommer U. (1997) *Limnoecology: The Ecology of Lakes and Streams*. Oxford University Press, New York, 382 pp.

- Lampert, W. (1987). Predictability in lake ecosystems: The role of biotic interactions. In Schulze ED & Zwölfer H (Ed) Potential and Limitations of Ecosystem Analysis. Ecological Studies 61. Springer-Verlag, Berlin, pp. 333–346.
- Nandini, S., Pérez-Chávez, R., & Sarma, S. (2003). The effect of prey morphology on the feeding behaviour and population growth of the predatory rotifer *Asplanchna sieboldi*: A case study using five species of brachionus (rotifera). *Freshwater Biology*, 48(12), 2131-2140.
- Reznick, D. (1985). Costs of reproduction: An evaluation of the empirical evidence. *Oikos*, 44, 257-267.
- Ricklefs, R. E., & Wikelski, M. (2002). The physiology/life-history nexus. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(10), 462-468.
- Riessen, H.P., & Young, J.D. (2005). Daphnia defense strategies in fishless lakes and ponds: one size does not fit all. *Journal of Plankton Research*. 27, 531-544.
- Roff, D. A. (1993). Life History Theory: a framework. In: Evolution of life histories: theory and analysis. Roff, D. A (Ed). Shapman & Hall, New York. Pp. 35-61.
- Sarma, S.S., Nandini, S., & Gulati, R.D. (2002). Cost of reproduction in selected species of zooplankton (rotifers and cladocerans). *Hydrobiologia* 481, 89–99.
- Schröder, T., & Gilbert, J. (2004). Transgenerational plasticity for sexual reproduction and diapause in the life cycle of monogonont rotifers: Intraclonal, intraspecific and interspecific variation in the response to crowding. *Functional Ecology*, 18(3), 458-466.

- Snell, T. W., Kubanek, J., Carter, W., Payne, A. B., Kim, J., Hicks, M. K., & Stelzer, C. P. (2006). A protein signal triggers sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (rotifera). *Marine Biology*, 149(4), 763-773.
- Stearns, S. C. (1989). Trade-offs in life-history evolution. *Functional ecology*, 3(3), 259-268.
- Stearns, S. C. (1992). *The evolution of life histories*. Oxford University Press.
- Stelzer, C. P. (2005). Evolution of rotifer life histories. *Rotifera X. Hydrobiologia* 546: 335-346
- Stelzer, C., & Snell, T. (2003). Induction of sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Monogononta, Rotifera) by a density-dependent chemical cue. *Limnology and Oceanography*, 48(2), 939-943.
- Stemberger, R. S. (1988). Reproductive costs and hydrodynamic benefits of chemically induced defenses in *Keratella testudo*. *Limnology and Oceanography*, 33, 593-606.
- Stemberger, R., & Gilbert, J. (1984). Spine development in the rotifer *Keratella cochlearis*: Induction by cyclopoid copepods and asplanchna. *Freshwater Biology*, 14(6), 639-647.
- Tollrian, R., & Harvell, C. D. (1999). *The ecology and evolution of inducible defenses*. Princeton Univ Press.
- Vos, M., Verschoor, A. M., Kooi, B. W., Wäckers, F. L., DeAngelis, D. L., & Mooij, W. M. (2004). Inducible defenses and trophic structure. *Ecology*, 85(10), 2783-2794.

Wallace, R. L., Snell, T. W., Ricci, C., & Nogrady, T. (2006). Rotifera. Vol 1, Biology, Ecology and Systematics 2nd Edition. Kenobi Productions, Ghent, and Backhuys Publishers, Leiden.

Williams, T. D. (2005). Mechanisms underlying the costs of egg production. *Bioscience*, 55(1), 39-48.

Zera, A. J., & Harshman, L. G. (2001). The physiology of life history trade-offs in animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32, 95-126.



## DISCUSIÓN GENERAL

En *B. calyciflorus* y muchos otros invertebrados acuáticos, la alternancia reproductiva y las defensas morfológicas anti-depredatorias, son respuestas cruciales a señales ambientales, insertas en un escenario ecológico complejo en los ambientes naturales. En esta investigación se demuestra experimentalmente, que el cambio a una estrategia reproductiva sexual, no se expresa independientemente de otros rasgos y de otros factores ecológicos, existiendo costos y también compromisos con otros componentes de la adecuación biológica. En particular, se detectaron costos asociados a la inducción de mixis en ambientes con alta disponibilidad de alimento cuando los umbrales de densidad poblacional son alcanzados. Esto nos lleva a concluir que la estrategia de alternar desde reproducción partenogenética a reproducción sexual, depende de la disponibilidad de alimento en el ambiente y no solamente la producción de huevos en diapausa depende de este factor ecológico, tal como reporta Gilbert (2010). Los resultados sugieren que la respuesta rápida a la mixis y una mayor magnitud en la respuesta en generaciones tempranas desde que eclosiona el huevo en diapausa relacionada con los umbrales de respuesta (Gilbert & Diéguez, 2010), permitiría que la reproducción sexual finalice en la producción de huevos en diapausa antes que los depredadores en el ambiente los consuman. Además, una vez alcanzados los umbrales que estimulan el cambio de estrategia reproductiva, la inducción estará sujeta a las condiciones y fluctuaciones de recursos disponibles en el ambiente. En este estudio se encontró además, un efecto en la respuesta recurso-dependiente a la inducción de mixis, respecto del número de generaciones que pasan desde que eclosiona un huevo en diapausa, y se dio cuenta de la alta variación interclonal en la respuesta. Esto aporta información acerca de las condiciones ecológicas en las que se desarrollan los organismos de vida libre, y sugiere

que las condiciones ambientales desde donde provienen los organismos en estudio, estarían determinando tanto las dinámicas ecológicas en los organismos de vida libre como los efectos a largo plazo en organismos con estrategias reproductivas heterogónicas. Por otro lado se detectaron compromisos presumiblemente con base energética, entre la inducción de hembras míticas y la expresión de defensas morfológicas anti-depredatorias en los organismos de estudio, y es la primera vez que experimentalmente se reporta este compromiso de forma explícita para este rotífero. Las consecuencias de este hallazgo nos permite proponer que la depredación sobre organismos en la columna de agua tendrá un efecto en la adecuación biológica a largo plazo en las poblaciones de *Brachionus*. En ambientes naturales, las poblaciones de rotíferos pueden exhibir dispersión agregada en respuesta a factores ambientales tales como la luz, alimento, depredadores, entre otros, escenarios en los cuáles los umbrales de la detección de señales químicas o densidad pueden ser suficientes o excederlos para iniciar este tipo de respuestas (Gilbert, 2004). Por último, en este estudio se generó información cuantitativa acerca de la dinámica individual y poblacional de transición entre estadios sexuales y asexuales, de transición entre estadios defendidos y no-defendidos, así como vulnerabilidad al consumo de presas de distintos estados de reproducción y defensas. Esta información experimental podrá servir para parametrizar modelos matemáticos que incorporen polimorfismo reproductivo y defensivo en la dinámica de poblaciones de invertebrados acuáticos. Uno de los aportes de esta investigación radica en la información obtenida acerca de algunas relaciones funcionales y ecológicas, respecto de la interacción entre fases espaciales y temporales muy

distintas, escenario ecológico que condiciona y altera la inducción de reproducción sexual en *B. calyciflorus*.

Nuestros resultados sugieren que la expresión de estos rasgos en un contexto ecológico variable tiene consecuencias desde la expresión individual en los organismos de vida libre hasta influir directa e indirectamente en niveles de adecuación biológica a largo plazo. Es decir, que las dinámicas tanto en la fase activa de las poblaciones como en la fase de dormancia, no se pueden separar (Gyllström & Hansson, 2004) y tampoco ser analizadas de forma aislada de otros factores ecológicos relevantes. Las respuestas fenotípicas evaluadas se encuentran en la interfase entre escalas temporales y espaciales distintas pero fuertemente dependientes una de la otra. Tales respuestas y evidencia de ellas nos permite considerar el traspaso de sus efectos entre estas distintas escalas de organización (Wootton, 1994; Morin, 1999; Hoverman & Relyea, 2008).

El éxito en la reproducción partenogenética se traduce en la producción de un gran número de individuos libres en corto tiempo, lo cual favorece la producción de huevos sexuales en masa, lo que permite la persistencia temporal y dispersión espacial. La limitación de recursos y presión de depredación son probablemente las fuerzas determinantes en el éxito del crecimiento partenogenético en rotíferos. Por otro lado, el éxito en la reproducción sexual estaría alterado por la diversidad clonal, la edad clonal, recursos disponibles, compromiso con otros rasgos fenotípicos y por supuesto, el número de individuos de vida libre. Estos procesos, que involucran transiciones entre estados libres y latentes, definen de manera irreductible el éxito reproductivo y la persistencia de las poblaciones de invertebrados acuáticos y por tanto, son fuentes principales de estructuración comunitaria en estos ambientes. Este trabajo aporta al

entendimiento de estos procesos y a la comprensión del rol de los estados latentes para la determinación y predicción de los patrones de distribución y abundancia de poblaciones acuáticas.

## Literatura citada

- Gilbert, J. J. (2004). Population density, sexual reproduction and diapause in monogonont rotifers: new data for *Brachionus* and a review. *J. Limnol*, 63 (Suppl.1), 32-36.
- Gilbert, J. J. (2010). Effect of food concentration on the production and viability of resting eggs of the rotifer *Brachionus*: Implications for the timing of sexual reproduction. *Freshwater Biology*, 55(12), 2437-2446. doi:10.1111/j.1365-2427.2010.02455.x
- Gyllström, M., & Hansson, L. (2004). Dormancy in freshwater zooplankton: Induction, termination and the importance of benthic-pelagic coupling. *Aquatic Sciences*, 66(3), 274-295. doi:10.1007/s00027-004-0712-y
- Hoverman, J. T., & Relyea, R. (2008). Temporal environmental variation and phenotypic plasticity: A mechanism underlying priority effects. *Oikos*, 117(1), 23-32.
- Morin, P. (1999). Productivity, intraguild predation, and population dynamics in experimental food webs. *Ecology*, 80(3), 752-760.
- Wootton, J. T. (1994). Predicting direct and indirect effects: An integrated approach using experiments and path analysis. *Ecology*, 75(1), 151-165.

ANEXOS

## ANEXO I. METODOLOGÍA GENERAL

Con el propósito de facilitar la lectura, en este apartado se reúne el detalle de las metodologías comunes utilizadas en los capítulos que componen esta investigación. En cada uno de los capítulos, se indica la metodología utilizada y en forma más detallada el diseño experimental para cada uno de ellos.

### *Colecta de organismos*

#### *Embalse Rapel, VI Región, Chile*

*Brachionus calyciflorus* fue colectado en el embalse Rapel (34° 8' 0" S, 71° 30' 0" O), embalse ubicado en la VI Región del Libertador General Bernardo O'Higgins, Chile. Rapel es un embalse artificial monomítico templado, con 288,6 km de perímetro, un ancho medio de 3,4 Km., situado a 200 m s.n.m., con aguas bien oxigenadas y abundante cantidad de nutrientes en todo el perfil vertical de la columna de agua (Ruiz & Bahamonde, 2003). Para la recolección de los organismos se utilizó la técnica de arrastre con una red y colector de zooplancton (HYDROBIOS, Alemania) con tamaño de poro de 125 µm. Los organismos vivos fueron transportados, identificados y separados bajo un microscopio estereoscópico o lupa (LEICA S8AP0, Alemania) en el laboratorio de Biodiversidad en el Centro Nacional de Medio Ambiente (CENMA), Fundación Universidad de Chile.



*Tancat de la Pipa, Valencia, España.*

*Brachionus calyciflorus* fue colectado en el “*Tancat de la Pipa*” (39° 19' 19.4" N, 0° 23' 16.46" O), un sistema acuático ubicado en la zona norte del parque natural de La Albufera, Valencia, España, el cuál posee una extensión aproximada de 40 hectáreas. El Tancat de la Pipa, es el resultado de un proyecto iniciado en el año 2007 de restauración de hábitats de agua dulce típicos del parque natural de La Albufera (Angarita, 2010). Desde este lugar se obtuvo *B. calyciflorus*, utilizando la misma técnica de arrastre descrita anteriormente. La muestra filtrada y los organismos vivos fueron transportados, identificados y separados bajo un microscopio estereoscópico en el Laboratorio de Ecología Evolutiva, Instituto Cavanilles, Universidad de Valencia, España. Los clones obtenidos desde este lugar fueron utilizados exclusivamente para el capítulo I en esta investigación.

#### *Cultivos de B. calyciflorus y Asplanchna*

Una vez separados los organismos en el laboratorio, se mantuvieron poblaciones de *B. calyciflorus* y *Asplanchna* en cultivos semi-contínuos con medio MBL modificado (ver detalles en Anexo I) (Stemberger, 1981; Gilbert, 2002; 2003; 2004), de aquí en adelante medio MBL. Los cultivos se realizaron en vasos de precipitado de vidrio de 50, 100, 500 y 1000 mL en una habitación termo-regulada con condiciones controladas de 20° C, 24° C y con fotoperíodo de 16:8 (L:O). *B. calyciflorus* fue alimentado con la microalga *Selenastrum capricornutum*, microalga que actualmente cambió al nombre científico *Pseudokirchneriella subcapitata*, de aquí en adelante se utilizará este último nombre, y

en los experimentos realizados en Valencia se utilizó la microalga *Monoraphidium contortum* (Capítulo I). En el caso de los experimentos con *Asplanchna* esta fue mantenida en las mismas condiciones controladas de temperatura y luz y alimentada con *B. calyciflorus*, *Paramecium caudatus* más microalga. Las microalgas fueron cultivadas con medio MBL a 20° C con luz artificial y aireados con una bomba de aire para acuarios con filtro de 0.2 µm (MINISART SARTORIUS). El inóculo inicial de la microalga para cada uno de los cultivos a lo largo de los experimentos, fueron realizados bajo campana de flujo laminar con el material y medio MBL previamente autoclavados (121°C, por 20 minutos). Luego para cada cultivo de la microalga en matraces de 1L y 2L, en crecimiento exponencial, fue centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos y resuspendida en medio MBL en las diluciones correspondientes a los tratamientos para cada experimento descrito más abajo. Las concentraciones de alimento fueron obtenidas desde un pelet concentrado contabilizado bajo microscopio, en una cámara Neubauer (González et al., 1995) y posteriormente se realizaron las diluciones.

#### *Medio MBL modificado*

Para cada reactivo del medio de cultivo, se prepararon soluciones stock de 1000 mL con agua desionizada (todo en g/L, excepto para vitaminas las cuales son en mg/L) (Stemberger, 1981; Gilbert, 2002; 2003; 2004) (Ver anexo I). Este medio MBL es utilizado tanto para cultivos de *B. calyciflorus*, *Asplanchna* como para las microalgas.

Una vez preparados los stocks minerales y stocks de vitaminas, éstos fueron conservados en botellas de borosilicato, refrigerados a 5° C. Para preparar el medio final, se diluyen los stocks 1000:1 en agua destilada. Las vitaminas, obtenidas en un laboratorio Farmacéutico, fueron preparadas en su dilución final y este stocks de vitaminas se adicionó al medio de cultivo final.

#### *Obtención de huevos en diapausa y diferentes clones de B. calyciflorus*

*Brachionus calyciflorus* una vez que fue separado directamente de la muestra de campo se identificó y separó en cultivos semi-contínuos alimentados ad-libitum con la microalga. Se prepararon varios cultivos en altas densidades poblacionales en un volumen de 200 mL de medio MBL, con el fin de obtener la mayor cantidad de huevos en diapausa. Estos cultivos fueron observados cada 24 horas, renovando el medio MBL y la microalga diariamente. Luego, al obtener los huevos en diapausa, éstos fueron separados, cuantificados cuidadosamente y almacenados en tubos eppendorf de 1,5 mL con una cantidad mínima de medio, refrigerados a 5°C en oscuridad por un período de tres o más semanas en diapausa. Posterior a este período en diapausa, los huevos se separaron en multiplacas de 96 pocillos, cada uno por separado, con medio MBL sin alimento, a 24°C luz continua, observando cada 12 horas hasta su eclosión y obtención de una hembra (Stem Female) por huevo, es decir, una línea clonal por huevo. Posteriormente cada individuo de cada clon fue separado para asignarlo a su tratamiento correspondiente.

### *Inducción de mixis de B. calyciflorus*

Se utilizaron dos técnicas para la inducción de mixis en laboratorio, una fue manipulando el volumen de cultivo en cada tratamiento y otra obteniendo medio pre-condicionado con alta densidad de conespecíficos, sin modificar el volumen de cultivo. Luego, en cada capítulo se indicará que metodología se utilizó.

#### *Inducción por volumen*

Para manipular el nivel de inducción de reproducción sexual o mixis, los neonatos de hembras amícticas de *B. calyciflorus* fueron cultivados individualmente en volúmenes muy bajos (0.2 mL) para tratamientos con intensidad fuerte de la señal y en volúmenes más altos (2.5 mL y 15mL) para obtener una intensidad débil de la señal para inducción de mixis. Los cultivos se realizaron en multiplacas de 96 y 24 pocillos y placas petri de 20 mL con medio MBL y microalga, en cámara de cultivos a 24°C y fotoperíodo 16:8 (L:O). Una de las razones para utilizar esta metodología de inducción es prevenir la confusión de efecto densidad y efecto de grupo (Gilbert, 2004). Los cultivos se renuevan cada 24 h, tanto el medio MBL como la microalga y la observación de los organismos experimentales se realizó cada 12 h.

#### *Inducción con medio pre-condicionado de conespecíficos*

Para obtener medio pre-condicionado con alta densidad de conespecíficos, se cultiva *B. calyciflorus* en vasos de precipitado de 1000 mL con 500 mL de medio, logrando una concentración de 60 individuos mL<sup>-1</sup>. Estos cultivos se renuevan cada 24 h. Una vez

filtrado, el pH del medio MBL fue controlado en  $\text{pH} \approx 7.5$ . El medio pre-condicionado es preparado en vasos de 1000 mL con 500 mL de MBL modificado + alga, en el cual se puso *B. calyciflorus* en cada vaso para lograr una concentración de  $60 \text{ individuos mL}^{-1}$ . Luego este se filtra en primer lugar con un filtro con tamaño de poro de  $60 \mu\text{m}$  rescatando el medio pre-condicionado y por otra parte *Brachionus*. Luego, el medio pre-condicionado rescatado por 24 h fue filtrado con un filtro  $0.45 \mu\text{m}$ , luego por un filtro  $0.2 \mu\text{m}$ , este último es el filtrado final que se utilizó para cultivar los organismos experimentales para cada tratamiento. Los organismos rescatados se contabilizan en una placa Petri bajo el microscopio estereoscópico (cada vaso con 500 mL de MBL nuevo + alga), y se cultivan en medio MBL nuevo, ajustando la densidad correspondiente y volver a pre-condicionar por 24 h.

#### *Inducción de defensas Antidepredatorias de B. calyciflorus*

Para los tratamientos en los cuáles se necesitó la inducción de defensas anti-depredatorias, la expresión de espinas posterolaterales largas de *B. calyciflorus*, se indujo con medio pre-condicionado con el depredador *Asplanchna*. El medio pre-condicionado con kairomonas de *Asplanchna* fue preparado y filtrado de la misma forma descrita para conoespecíficos pero cultivadas en vasos de 500 mL con 300 mL de MBL más microalga, en el cual se pusieron 60 individuos de *Asplanchna* en cada vaso para lograr una concentración de  $0.2 \text{ individuos mL}^{-1}$ . Una vez filtrado el medio, fue controlado el  $\text{pH} \approx 7.5$ . Este medio pre-condicionado es utilizado para obtener hijas defendidas

morfológicamente. Los cultivos contienen presas suficientes, *B. calyciflorus* y *Paramecium caudatus*, en una densidad baja para evitar la inducción de mixis, en los tratamientos. *P. caudatus* fue necesario para la mantención óptima del depredador en laboratorio, estos fueron obtenidos desde el Laboratorio de Biología de la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación.

## Literatura citada

- Angarita, J.P. (2010). Estimación del balance hídrico anual, en el humedal artificial del Tancat de la Pipa, con apoyo de modelos matemáticos de calidad de aguas; para contaminantes conservativos. Tesina, Master Oficial Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. Dpto. Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente, Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Gilbert, J. J. (2002). Endogenous regulation of environmentally induced sexuality in a rotifer: A multigenerational parental effect induced by fertilisation. *Freshwater Biology*, 47(9), 1633-1641.
- Gilbert, J. J. (2003). Environmental and endogenous control of sexuality in a rotifer life cycle: Developmental and population biology. *Evolution & Development*, 5(1), 19-24.
- Gilbert, J. J. (2004). Females from resting eggs and parthenogenetic eggs in the rotifer *Brachionus calyciflorus*: Lipid droplets, starvation resistance and reproduction. *Freshwater Biology*, 49(11), 1505-1515.
- González, M., Parra, O., & Cifuentes, A. (1995). Técnicas de cultivo de microalgas en laboratorio. En K. Alveal., Ferrario, M.E., Oliveira, E.C., Stein, E. (Eds.). *Manual de Métodos Ficológicos*. Universidad de Concepción, Chile. pp. 219-249.
- Ruiz, R., & Bahamonde, N. (2003). Distribución estacional de cladóceros y copépodos en el lago Rapel, Chile central Museo Nacional de Historia Natural. Publicación ocasional, Museo Nacional de Historia Natural (Chile) 58, 5-58.

Stemberger, R. S. (1981). A general approach to the culture of planktonic rotifers.  
Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 38(6), 721-724.



## ANEXO II. MEDIO MBL MODIFICADO

Para soluciones stocks de 1000 mL para cada reactivo y 100 mL para Vitaminas, con agua doble destilada o desionizada. Los stocks minerales deben ser conservados a una temperatura de 5°C (Stemberger 1981, Gilbert 2002, 2003, 2004).

*Macronutrientes*

1) $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	36,76	g/L
2) $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	36,97	g/L
3) $\text{NaHCO}_3$	25,2 (x2)	g/L
4) $\text{K}_2\text{HPO}_4$	4,35	g/L
5) $\text{NaNO}_3$	42,5	g/L
6) $\text{NaSiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$	28,42	g/L

*Micronutrientes*

1) $\text{Na}_2\text{EDTA}$	4,36	g/L
2) $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	3,15	g/L
3) $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,01	g/L
4) $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,022	g/L
5) $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,01	g/L

6) $MnCl_2 \times 4H_2O$	0,18	g/L
7) $NaMoO_4 \times 2H_2O$	0,006	g/L
8) $H_3BO_4$	0,13	g/L

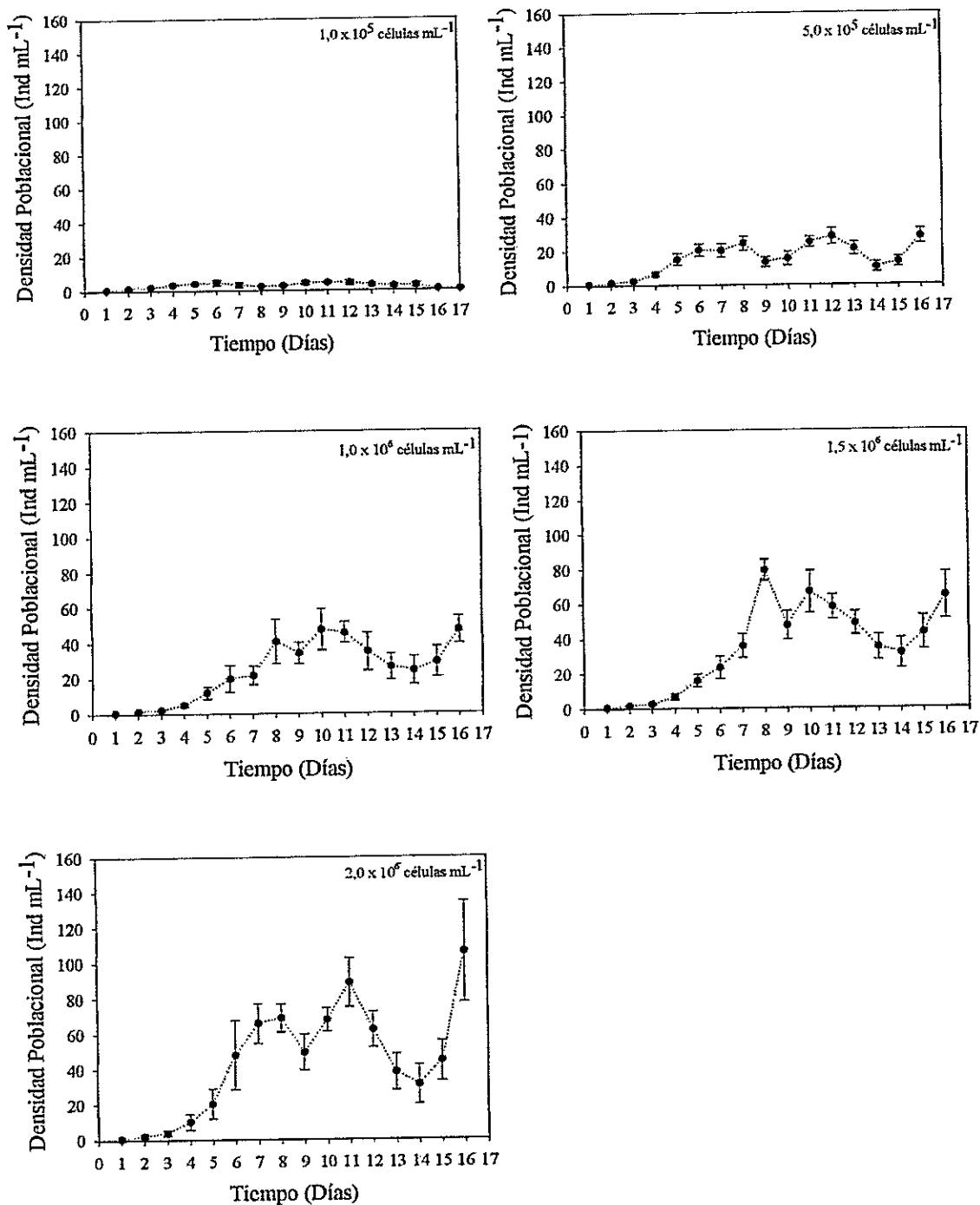
*Vitaminas*

Thiamine (B1)	10	1 mL/100 mL sln
Biotin	0,05	0,5 mL/100 mL sln
Cianocobalamina (B12)	0,05	0,5 mL/100 mL sln

## ANEXO III. EXPERIMENTOS PREVIOS

### *III.1 Crecimiento de B. calyciflorus a distintas concentraciones de recurso*

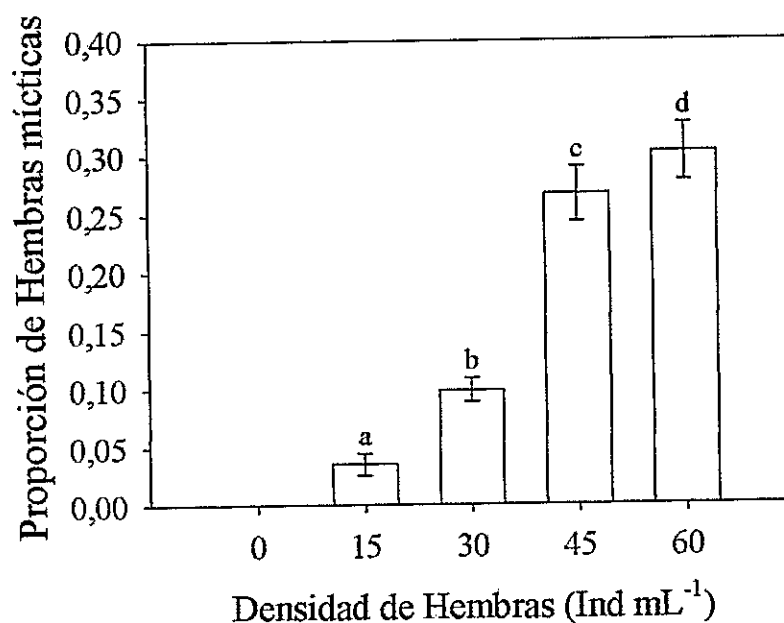
Objetivo: conocer la concentración de la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* que permitiera un crecimiento individual y poblacional adecuado tanto para asignación a reproducción como a defensas antidepredatorias frente a tratamientos de inducción de defensas anti-depredatorias y reproducción sexual de *B. calyciflorus*. En este experimento, se obtiene que una concentración de  $1,0 \times 10^6$  células  $\times$  mL<sup>-1</sup> es una concentración adecuada para el crecimiento, reproducción y expresión de defensas de *B. calyciflorus*.



**Figura A1.** Curvas de crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* frente a distintas concentraciones de la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*: 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 x 10<sup>6</sup> células x mL<sup>-1</sup>. Datos indican medias  $\pm$  D.E.

III.2 Densidades umbrales de conespecíficos para la inducción de hembras míticas de *B. calyciflorus*

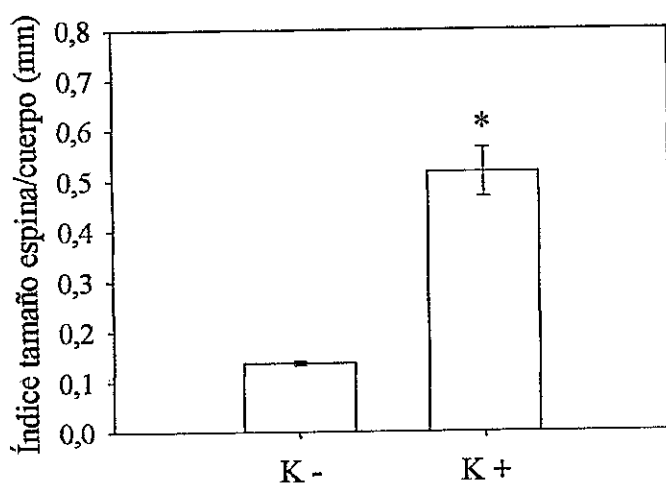
Objetivo: Conocer la densidad de conespecíficos necesaria para la mayor inducción de hembras míticas con la metodología de inducción de mixis con medio pre-condicionado.



**Figura A2.** Proporción de hembras míticas de *B. calyciflorus* en función de la concentración de señales de conespecíficos. Los organismos fueron alimentados con la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* a  $1,0 \times 10^6$  células  $\times$  mL<sup>-1</sup>. Los valores representan la media y su IC 95%. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas (Prueba de Tukey  $p < 0,05$ ). Para el análisis los datos fueron transformados con la función Arcoseno.

### III.3 Expresión individual de la defensa anti-depredatoria

Objetivo: evaluar la señal de kairomona y expresión de defensas anti-depredatorias de *B. calyciflorus*. La figura 5 muestra el índice tamaño de espina/ tamaño del cuerpo (mm) de *B. calyciflorus* cuando es expuesto a medio con kairomona de su depredador *Asplanchna* a una concentración de  $0,2 \text{ ind mL}^{-1}$  y expuesto a medio sin kairomona.



**Figura A3.** Expresión de la defensa anti-depredatoria de *B. calyciflorus* a nivel individual cuando está expuesto a medio pre-condicionado con kairomona de *Asplanchna sieboldi* (K+) y medio no pre-condicionado (K-). Los valores representan la media y el error IC 95%. El símbolo \* sobre las barras indica diferencias significativas (ANOVA una vía  $p < 0,001$ )