

UCH-FC
DOC-EBE
C323
C.1

**Plasticidad Fenotípica de las Defensas
Inducidas en *Daphnia pulex*: Respuesta
en Múltiples Rasgos, Potencial
Microevolutivo e Integración
Fenotípica**

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
Mauricio José Carter Montecinos**

Octubre, 2009

Director de Tesis:

Dr. Rodrigo Medel

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.

Mauricio José Carter Montecinos

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 de Tesis rendido el día 24, de Septiembre de 2009.

Directores de Tesis:

Dr Rodrigo Medel
.....

Dr Rodrigo Ramos-Jiliberto
.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr Ramiro Bustamante
.....

Dr Roberto Nespolo
.....

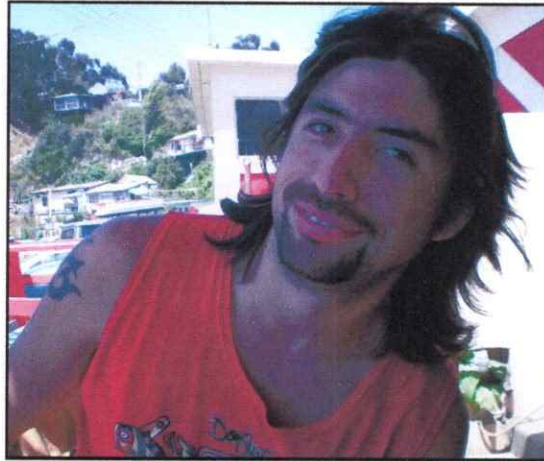
Dr Elie Poulin
.....

Dr David Veliz
.....





"Para mi Padre que puso los cimientos de la senda que hoy camino"



Nací en Santiago el 19 de marzo de 1980, desde muy temprano manifesté interés por la ciencia naturales, cosa que fue incentivada activamente por mis padres cuando era niño. Sin embargo, no es hasta cuando decido entrar a estudiar Biólogo en la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso en el año 1998 donde se desarrollan mis habilidades. Durante este periodo es que me encanto con la teoría evolutiva formalizada hace ya 150 años. Producto de esta inquietud es que me he esforzado por introducir la evolución de manera formal cada vez que he tenido la oportunidad de desarrollar una investigación. Es así como el ingreso al programa de doctorado en Ecología y Biología Evolutiva significó para mi una gran motivación. De esta manera, es que mi intereses científicos desarrollados durante el doctorado y especialmente durante la tesis doctoral persiguen estudiar la evolución como un fenómeno dinámico y presente día a día en nuestro alrededor.



Agradecimientos

En primer lugar agradezco a mis tutores: Al Dr. Andrew Beckerman que pese a no ser un tutor formal, fue quién me entregó la confianza y condiciones logísticas para llevar a cabo los experimentos que condujeron a esta tesis. En especial al Dr. Rodrigo Ramos-Jiliberto por su amistad, consejo y apoyo, y sobre todo por el intensivo trabajo que realizó junto a mí para dar forma al manuscrito aquí expuesto. Al Dr. Rodrigo Medel por brindarme el apoyo, confianza y espacio físico en mis dos primeros años del doctorado. Asimismo, quiero agradecer a los miembros de la comisión que evaluó mi tesis doctoral: Dr. Ramiro Bustamante, Dr. Roberto Nespolo, Dr. Elie Poulin y Dr. David Veliz, por su valioso aporte en el manuscrito final. También quiero agradecer al apoyo financiero que CONICYT me entregó durante los cuatro años del doctorado, y por el financiamiento de la Beca de Gestión Propia que me permitió desarrollar mi investigación en Inglaterra, y al CENMA dirigido por el Dr. Italo Serey que financiaron el último tramo de escritura de la tesis.

El trabajo experimental no hubiera sido posible sin la ayuda y consejo de Jessica Stapley, Stuart Dennis y Dirk Mikolajewski del laboratorio de Evolutionary Community Ecology en la Universidad of Sheffield. Del mismo modo agradezco el constante aporte crítico y metodológico de Leonardo Bacigalupe y Roberto Nespolo. Agradezco al ex Laboratorio de Ecología y Biocomplejidad ahora situado en el CENMA y especialmente a: Leslie Garay, Caren Vega, Jose Luis Carvajal, Ferananda Valdovinos, Veronica Toledo, Mauricio Fernandez, Patricia Silva, Javier González, Inger Heine y Angela Valiente por sus críticas y constantes aportes durante la parte final de análisis y escritura de la tesis. A mis amigos y compañeros de generación del Doctorado que han sido una fuente de conocimiento científico y

práctico durante estos cuatro años: Paulina Gonzales, Grisel Cavieres, Gaston Carvallo y Gonzalo Collado.

A mi familia y en especial a mi madre con su amor y apoyo incondicional, a mi hijo Benjamin fuente inspiradora de fuerza y amor, del cual aprendo día a día un poco más. Finalmente quiero agradecer a mi mujer America Paz quién ha sido un gran soporte en mi vida estos últimos dos años gracias a su paciencia, mente aguda, y amor.



Lista de símbolos, abreviaturas y nomenclatura

EC: Espina caudal en máxima inducción

AMI: Angulo espina/cuerpo en máxima inducción

TMI: Tamaño corporal en máxima inducción

NT: Diente cervical

TPR: Tamaño primera reproducción

NH: Número de huevos

EPR: Edad primera reproducción

***r*:** Tasa intrínseca de crecimiento *per capita*

V_G: Varianza genética

V_P: Varianza fenotípica

V_E: Varianza ambiental

V_{GXE}: Interacción genotipo ambiente

V_{PL}: Varianza de la plasticidad

INT: Índice de integración

Resumen

La plasticidad fenotípica es un fenómeno extendido en la naturaleza y es desarrollada por organismos que habitan ambientes heterogéneos. La mantención y evolución de estos fenotípicos esta condicionada a su vez por dos elementos: predictibilidad ambiental y relación entre el rasgo plástico y la adecuación biológica. En este contexto las defensas inducidas corresponden a un típico ejemplo de plasticidad que puede evolucionar y ser mantenida por selección natural. A lo largo de esta tesis se considera la expresión plástica de un conjunto de rasgos asociados a la defensas en *Daphnia pulex* en un extenso gradiente de riesgo de depredación. En primer lugar se profundiza en el patrón plástico de múltiples rasgos morfológicos y de historia de vida (Capítulo I); En segundo lugar el enfoque se centra en la repuesta plástica del rasgo defensivo diente cervical, y su potencial microevolutivo (Capítulo II). Finalmente se evaluó la existencia de patrones de integración fenotípica y sensibilidad de la matriz G en relación al riesgo de depredación (Capítulo III). Los resultados aquí expuestos indican que los rasgos responden de manera diferencial al riesgo de depredación, y que la expresión plástica significó costos en la adecuación biológica (edad a la primera reproducción). La norma de reacción de las defensas inducidas presentó V_G , por lo cual tiene potencial para responder a la selección natural. La integración fenotípica y Matriz G de los rasgos evaluados en *D. pulex* son insensibles al riesgo de depredación. Este trabajo contribuye al entendimiento integral de la respuesta plástica y de sus costos, la variación genética de la plasticidad, y la integración fenotípica frente al riesgo de depredación.

Palabras claves: Plasticidad fenotípica, *Daphnia pulex*, kairomonas, costos de la plasticidad, heredabilidad, integración fenotípica, defensas inducidas.

Abstract

Phenotypic plasticity is an ubiquitous phenomenon in nature and is developed by organisms that live in heterogeneous environments. Maintaining and evolution of these phenotypes is conditioned for two elements: Environmental predictability and relation between plastic trait and fitness. In this context induces defences corresponds a typical example of plasticity that could be evolved and be maintained by natural selection. A cross of this thesis is considered plastic expression of a set of traits associated to defences in *Daphnia pulex* in a broad predation risk gradient. In first place, I deepens in plastic pattern of multiple morphological and life history traits (Chapter I); in second place, I focus in plastic response of defensive trait neckteeth, and its microevolutionary potential (Chapter II). Finally, I evaluated existence of phenotypic integration patterns and G matrix sensibility face to predation risk (Chapter III). The results shown here indicate that traits response of differential way in front of predation risk, and that plastic response led to cost in component of fitness (age of first reproduction). Reaction norm of induce defence neckteeth show V_G , therefore potential response to natural selection. Phenotypic integration and G matrix of traits evaluated in *D. pulex* are insensible to predation risk. This work contributes to integral understanding of plastic response and its cost in fitness components, genetic variation of phenotypic plasticity, and phenotypic integration front of predation risk.

Keys words: Phenotypic plasticity, *Daphnia pulex*, kairomone, costo of plasticity, heritability, phenotypic intgration, induces defenses

Introducción General

La plasticidad fenotípica, descrita como la habilidad de los organismos de generar diferentes fenotipos dependiendo del contexto ambiental donde se encuentren, ha sido intensamente estudiada tanto empírica como teóricamente dadas sus implicancias ecológicas y evolutivas (Pigliucci 2005). Frente a escenarios de ambientes heterogéneos, se espera que la plasticidad fenotípica evolucione y se mantenga si es que se satisfacen las siguientes condiciones: predictibilidad ambiental, heterogeneidad ambiental, y asociación entre la respuesta plástica y la adecuación biológica (Scheiner 1993). En este sentido, las defensas inducidas corresponden a un tipo de plasticidad que reúne las tres condiciones descritas previamente (Tollrian & Harvell 1998). Las defensas inducidas se caracterizan por ser exhibidas solo en presencia de señales químicas de sus depredadores, los cuales varían en espacio y tiempo (Abrams 2000, Lass & Spaak 2001), y por ejercer un efecto positivo sobre la sobrevivencia de los organismos que la presentan (Agrawal et al 1999). De esta manera, el estudio de las defensas inducidas representa una oportunidad para profundizar sobre la ecología y evolución de la plasticidad fenotípica.

Dado el impacto que tiene el estrés ambiental sobre la adecuación biológica de los organismos, es que este tipo de variables han sido consideradas especialmente por ecólogos y biólogos evolutivos (Bijlsma & Loeschcke 2005). Específicamente, existen diversas hipótesis asociadas al impacto del estrés ambiental como un factor que afecta la plasticidad fenotípica y la arquitectura genética de las especies (Schlichting 1989; Hoffmann & Mørla 1999). Sin embargo, el entendimiento de la plasticidad fenotípica en ambientes naturales ha sido restringido por limitaciones

logísticas. Una limitación recurrente al estudio de la plasticidad es que ésta raramente ha sido evaluada en más de dos tratamientos, generalmente correspondientes a ambientes extremos. Consecuentemente, la plasticidad ha sido descrita mediante normas de reacción lineales (Relyea 2004). Sin embargo, las respuestas plásticas pueden ser mejor descritas en relación a un gradiente ambiental a través de normas de reacción no-lineales, lo que permite asociar los parámetros de la norma de reacción a atributos biológicos relevantes (Schlichting & Pigliucci 1998).

Es evidente que la plasticidad fenotípica no es un elemento aislado dentro de un organismo, y posiblemente este tipo de respuesta vea afectada su expresión dependiendo de la matriz de rasgos del organismo que la presenta. La *integración fenotípica* como una aproximación multivariada de la plasticidad se hace cargo de este tipo de problemática. Dos elementos caracterizan a la *integración fenotípica*: (i) la *modularidad*, definida como la agrupación funcional un conjunto de rasgos; y la (ii) *integración* que corresponde al patrón de correlaciones dentro de los módulos, que se espera sea mayor dentro de los módulos que entre módulos dentro de un organismo (Olson & Miller 1958; Berg 1960). En este contexto la genética cuantitativa se constituye como una aproximación convergente a la integración fenotípica, ya que se basa en el estudio de las correlaciones genéticas entre rasgos esencialmente a través del estudio de la matriz **G**. Ésta aproximación extiende el rango de preguntas ecológicas y evolutivas, y permite profundizar las consecuencias de la respuesta fenotípica multivariada de los organismos frente a los gradientes ambientales.

En esta tesis se aborda el estudio de la plasticidad fenotípica enfatizando las consecuencias de ésta sobre el organismo en su totalidad, así como sobre su adecuación biológica. Se utiliza un extenso rango ambiental en donde se desarrolla la plasticidad de las defensas inducidas, este diseño experimental permitirá visualizar el patrón umbral típico de las normas de reacción asociadas a defensas inducidas (Schlichting & Pigliucci 1998). De igual modo, se aborda el impacto de la heterogeneidad ambiental sobre las trayectorias evolutivas de la plasticidad fenotípica en tiempo ecológico. El entendimiento de estos patrones, a través del estudio de las correlaciones genéticas y costos asociados a la plasticidad (De Witt 1998), permitirá explicar las consecuencias ecológicas y evolutivas de la plasticidad (Pigliucci 2005; MÉRILA & Bjorklund 2004),

Para abordar esta problemática se utilizó un modelo presa-depredador conformado por el cladóceros *Daphnia pulex* y la larva del mosquito *Chaoborus spp.*. Existe abundante literatura que describe cómo *D. pulex* produce respuestas morfológicas conspicuas frente a señales químicas (kairomonas) de *Chaoborus spp.* (Tollrian & Dodson 1998). Además, se consideró la diversidad genética de la especie presa a través de la inclusión de varios linajes clonales, previamente genotipificados, en el diseño experimental. Lo anterior permite profundizar en la arquitectura genética de los rasgos asociados a la plasticidad.

En torno al objetivo central, cual es entender los patrones y consecuencias de la plasticidad en *Daphnia* frente a señales de su depredador *Chaoborus*, las preguntas que motivan esta tesis son las siguientes: (1.1) ¿Cómo es la respuesta de un conjunto de rasgos morfológicos y de historia de vida al riesgo de depredación?, (1.2) ¿cómo esta respuesta puede implicar costos en la adecuación biológica?, (2.1) ¿cuál es la

variación genética asociada a la inducción de la defensa?, (2.2) ¿cuál es el potencial microevolutivo de la plasticidad fenotípica?, (3.1) ¿la integración fenotípica es afectada por el gradiente de estrés asociado al riesgo de depredación?, (3.2) ¿cuál es la sensibilidad de la matriz **G** al gradiente ambiental impuesto? El tratamiento de cada grupo de preguntas se aborda consecutivamente en los tres capítulos que comprenden esta tesis.

Referencias

- Agrawal A.A., Laforsch, C. y Tollrian, R. (1999) Transgenerational induction of defences in animals and plants. *Nature* 401: 60-63.
- Berg R. (1960) The ecological significance of correlation pleiades. *Evolution* 14: 171-180.
- Bijlsma R. y Loeschke V. (2005) Environmental stress, adaptation and evolution: an overview. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 744-749.
- DeWitt T.J., Sih A., y Wilson D. S. (1998) Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution* 13: 77-81.
- Hoffmann A.A. y Merilä J. (1999) Heritable variation and evolution under favourable and unfavourable conditions. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 96-101.
- Lass S. y Spaak P. (2003) Chemically induced antipredator defences in plankton: a review. *Hydrobiologia* 491: 221-239.
- Merilä J. y Björklund M. (2004) Phenotypic integration as a constraint and adaptation. Pp. 107-129. In: *The Evolutionary Biology of Complex Phenotypes* (M. Pigliucci & K. Preston eds.). Oxford University Press, Oxford.

Pigliucci M. (2005) Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology and Evolution* 20: 481–486.

Olson E.D. y Miller R.L. (1958) *Morphological Integration*. University of Chicago Press, Chicago, IL.

Scheiner S. M. (1993) Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 35-68.

Schlichting, C.D. (1989) Phenotypic integration and environmental change. *Bioscience* 39: 460-464.

Schlichting C.D. y Pigliucci M. (1998) *Phenotypic evolution: a reaction norm perspective*. Sinauer, Sunderland, Mass.

Tollrian R. y Dodson S.I. (1998) Inducible defenses in cladocera: constraints, costs, and multipredator environments. In: *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses*

(Eds R. Tollrian & C.D. Harvell), pp. 177–202. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Materiales y métodos generales

Modelo de estudio

Daphnia pulex es un cladóceros miembro de la clase braquiópoda y subfilo crustácea. Éste crustáceo planctónico cosmopolita típico de posas someras y lagos. Los organismos fueron colectados a partir de dos lagunas someras sin afluentes, estas lagunas estaban separadas por 7 Km. de distancia lineal, y ambos sistemas estaban dentro de la zona urbana de la ciudad de Sheffield, Inglaterra. Ambas colectas se realizaron en el comienzo del verano boreal (Julio). Parte de los clones utilizados se obtuvieron de la Laguna Crabtree (53°24'17.46"N, 1°27'26.81"O), y el resto de los clones a partir de la Laguna Bagshaw (53°20'5.37"N, 1°27'8.12"O). Once líneas clonales fueron usadas, todos los experimentos fueron conducidos con individuos de la tercera camada de hembras mantenidas al menos por tres generaciones en las mismas condiciones. Las *Daphnias* fueron mantenidas en agua dura artificial (ASTM, 1989) y alimentadas con *Chlorella vulgaris*. Los experimentos fueron conducidos a 21°C con un régimen de luz 16:8 (L:O) (ver Beckerman et al. 2007). Se utilizó kairomona purificada de *Chaoborus flavicans* para preparar las diferentes concentraciones de kairomona que se utilizó para los tratamientos experimentales. Las kairomonas fueron obtenidas a partir de *Chaoborus* congelado (Honka's, Germany) siguiendo el protocolo de Tollrian (1995).

Identificación de clones

De una muestra compuesta de al menos 50 individuos de *D. pulex* obtenidas a partir de ambas lagunas (ver "modelo de estudio"). Se obtuvo el ADN total usado para la identificación, el cual fue extraído usando el método Amonio acetato. De una a 3 isohembras fueron maceradas en un ependorf para mejorar la eficiencia de la

digestión, la cual se realizó utilizando 10 uL de proteinasa K y 250 uL Digsol buffer. El material resultante fue resuspendido en 30 uL de TE, para de esta manera obtener una concentración final de más de 10 ng/μL de ADN. Para la genotipificación se utilizaron 6 loci microsatélite: Dp 90, Dp460, Dp 43, Dp 122, Dp 45, Dp78 (Colbourne et al. 2004). Los cuales fueron amplificados usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando 10 uL de reacción, incluyendo 1 μL de ADN, 1 μL de Buffer PCR (Qiagen), 1 μL de cada partidor ("primer"), 0.3 μL of 50mM MgCl₂, 1 μL of 2mM dNTP, y 0.05 μL de AND Taq polimerasa. El régimen térmico fue el siguiente: Ciclos de denaturación de 1 minuto a 94°C seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C; finalizando con una extensión final a 72°C por 10 minutos. El producto del PCR fue diluido 1:10 y visualizado en un secuenciador automático (ABI 377 DNA Sequencer).

Cultivo experimental

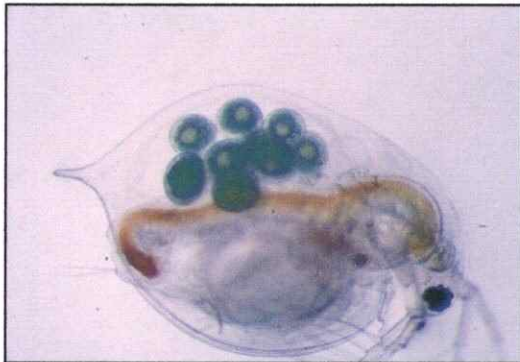
Todas las líneas clonales fueron puestas en siete concentraciones de kairomonas de *Chaoborus spp.* (0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 μL mL⁻¹). Para cada tratamiento madres de al menos la tercera generación, estando en entre su segunda y tercera camada fueron expuestas a las condiciones experimentales. Cinco neonatos de la siguiente camada (tercera) de cada madre fueron distribuidos individualmente en vasos de 60 mL, conteniendo 50 mL de agua dura, alimento (2 x 10⁵ cells mL⁻¹) y una apropiada concentración de señal del depredador. Así, cada línea clonal tuvo de 10 a 15 replicas en cada tratamiento, siendo alrededor de 100 individuos por cada línea clonal por cada una de las siete condiciones experimentales. Los neonatos fueron medidos cada día hasta que alcanzaron su edad de maduración evaluada como el instar en el cual pusieron huevos en sus cámaras de crías (Figura 1).



(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 1.- Estados del desarrollo de *D. pulex*. (A) Neonato; (B) Hembra con ovarios desarrollados; (C) Hembra con huevos recién puestos; (D) Hembra con huevos desarrollados (neonatos con ojo desarrollado).

Rasgos medidos

Se midieron varios rasgos morfológicos y de historia de vida para cada individuo sometido a condición experimental. Los rasgos morfológicos fueron obtenidos por medio de mediciones obtenidas de fotografías tomadas diariamente con una cámara digital. Las imágenes fueron analizadas usando el programa **ImageJ 1.41o** (Wayne Rasband, NIH, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Los rasgos morfológicos considerados aquí fueron: tamaño a la máxima inducción (TMI), ángulo de la espina en la máxima inducción (AMI) y largo espina caudal (EC), los cuales fueron medidos en milímetros (Figura 2). La inducción del diente cervical (NT) fue calculada en animales vivos usando el método de puntajes modificado a partir de Tollrian (1995). El puntaje fue asignado de acuerdo a la presencia de un pedestal y/o espinas en la parte dorsal de la cabeza. Los pedestales fueron clasificados como ausente (puntaje=0), pequeño (puntaje=30), y grande (puntaje=50). A cada espina grande se le asignó 10 puntos y a las espinas pequeñas 5 puntos (Figura 3). El máximo nivel de inducción de diente cervical obtenido en este experimento 140 puntos (gran pedestal, nueve espinas). Todos los puntajes fueron ajustados a este máximo, reflejando una inducción porcentual entre 0% a 100%. Los rasgos de historia de vida considerados para este estudio fueron tamaño a la madures o primera reproducción (TPR), tamaño de camada o número de huevos en la primera reproducción (NH), edad a la primera reproducción (EPR), además se hizo una estimación de la tasa intrínseca de crecimiento (r) calculada como: $\ln(\text{NH})/(\text{EPR})$. La estimación de r es considerada una aproximación a la adecuación biológica de los organismos estudiados.

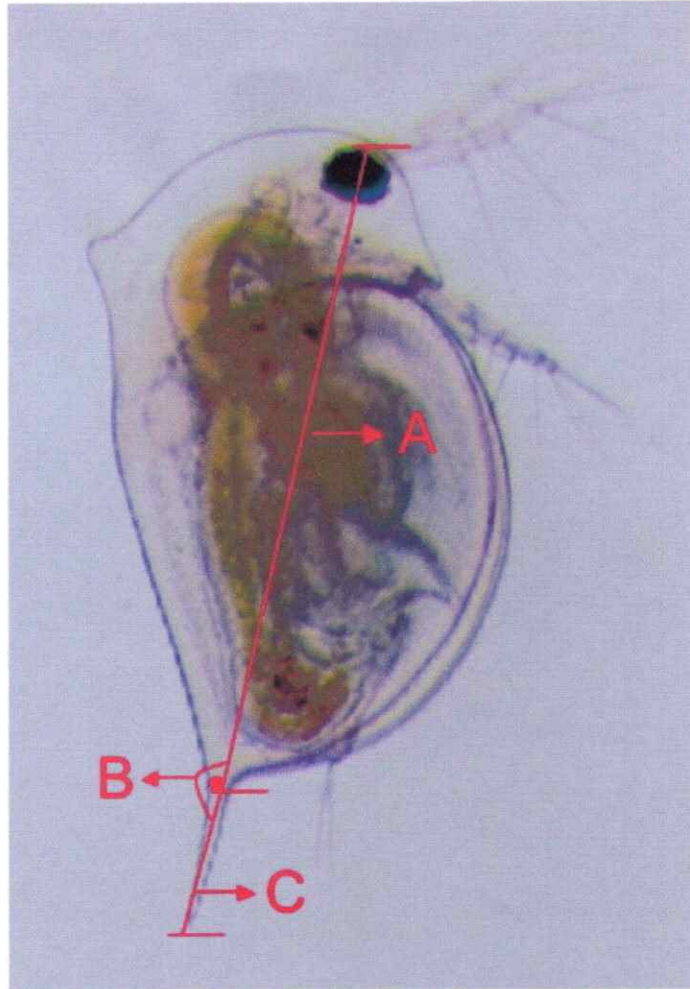
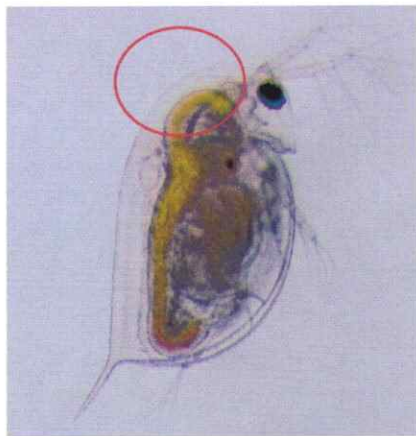
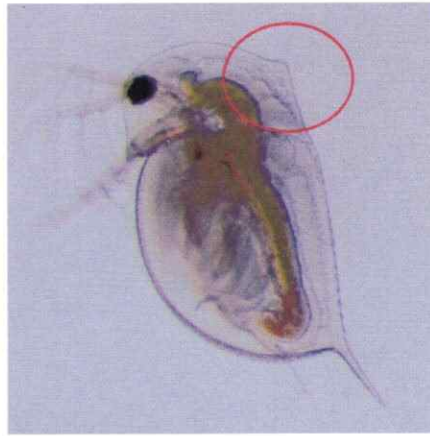


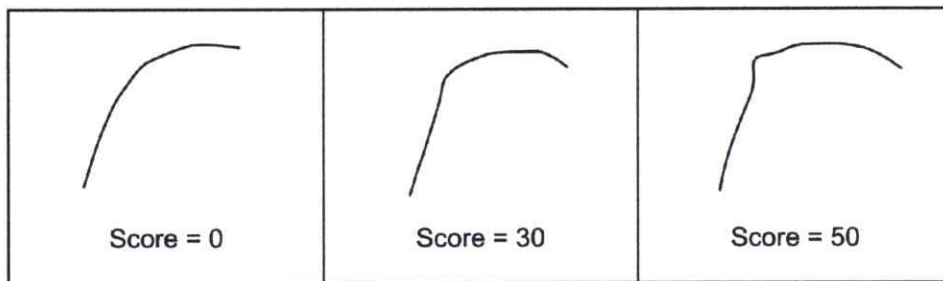
Figura 2. Esquema de mediciones morfológicas. (A) Largo corporal (TMI); (B) Angulo espina-cuerpo (AMI) ; (C) Espina caudal (EC).



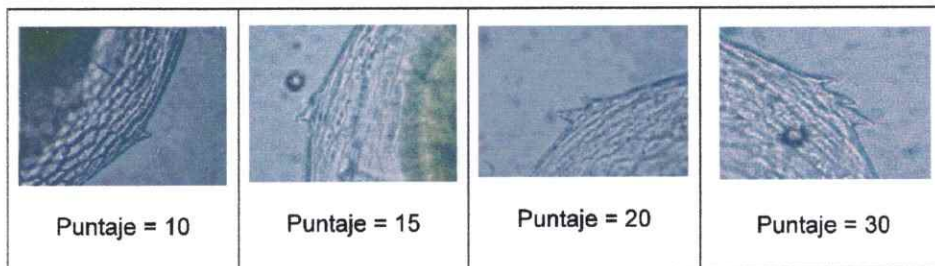
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 3. Puntaje inducción de diente cervical. (A) Individuo sin inducción; (B) Inducción con de pedestal; (C) Esquema del puntaje de inducción para la forma del pedestal; (D) Puntaje asignado para las espinas del pedestal.

Referencias

- Beckerman A.P., Wieski K. & Baird D.J. (2007) Behavioural versus physiological mediation of life history under predation risk. *Oecologia* 152: 335–343.
- Colbourne J.K., Robinson B., Bogart K. y Lynch M. (2004) Five hundred and twenty-eight microsatellite markers for ecological genomic investigations using *Daphnia*. *Molecular Ecology* 4: 485–490
- Tollrian R. (1995). Predator-induced morphological defensas - costs, life-history shifts, and maternal effects in *Daphnia pulex*. *Ecology* 76: 1691–1705.

Capítulo I

Respuesta plástica de múltiples rasgos en *Daphnia pulex* en presencia de kairomonas de *Chaoborus spp.*

Resumen

Frente a la heterogeneidad ambiental en la que habitan los organismos, éstos desarrollan una serie de estrategias fenotípicas que conducen a la optimización de la adecuación biológica. Organismos del género *Daphnia* han sido utilizados extensamente para evaluar la respuesta fenotípica frente a la heterogeneidad ambiental, en particular por su capacidad de desarrollar defensas inducidas en respuesta a depredadores. En este trabajo se utiliza un amplio gradiente de riesgo de depredación, impuesto por las kairomonas de *Chaoborus*, para determinar la respuesta específica de los rasgos asociados a la inducción en *Daphnia*. Los rasgos considerados son del tipo morfológico, de historia de vida, y una medida de la adecuación biológica (r). Los resultados indican que todos los rasgos de *D. pulex* aquí evaluados responden al estímulo generado por las kairomonas, aunque de manera diferencial. Dentro de los rasgos morfológicos, el diente cervical (“*neckteeth*”) es el que presenta el patrón más extremo de variación fenotípica, en contraposición al tamaño corporal en el momento de la inducción, el cual no presenta una tendencia frente al gradiente. Los rasgos de historia de vida responden aumentando sus medias a medida que aumenta el riesgo de depredación, pero el resultado neto es una disminución en la adecuación biológica (r). Los rasgos asociados a la defensa muestran cierto grado de asociación, lo cual sugiere una respuesta integrada de los rasgos morfológicos frente al riesgo de depredación. Estos resultados demuestran que el efecto de las señales químicas de un depredador sobre el fenotipo de sus presas puede extenderse a un conjunto de rasgos morfológico y de

historia de vida que simultáneamente generan un fenotipo defensivo. La existencia de costos entre la inducción y los rasgos de historia de vida, indican la necesidad de considerar el contexto ecológico para determinar el impacto de este patrón fenotípico en *D. pulex*.

Palabras clave: Plasticidad fenotípica, kairomonas, rasgos morfológicos, rasgos de historia de vida, defensas inducidas.

Introducción

La heterogeneidad ambiental es uno de los principales factores que impulsa las dinámicas ecológicas y evolutivas en los sistemas naturales. Frente a esta condición, los organismos presentan una serie de estrategias, o arreglo de rasgos dirigidos a optimizar su adecuación biológica (Stearns 1992). Estas estrategias van desde la variabilidad genética en las poblaciones gatillada por sexualidad y ciclos reproductivos, a respuestas fenotípicas específicas a un estímulo ambiental (Miner et al 2005; Pigliucci 2005). La depredación puede ser considerada como una dimensión más de la heterogeneidad ambiental ya que, al igual que muchos otros factores, ésta varía en espacio y tiempo (Schlichting & Pigliucci 1998; Tollrian & Harvell 1999), modulando las dinámicas ecológicas y evolutivas (Relyea 2002; Agrawal et al 2002; Laforsh & Tollrian 2004).

Frente a la depredación, muchos organismos presa han desarrollado defensas para evitar o mitigar los efectos de los depredadores (Tollrian & Dodson 1999). Las defensas pueden ser clasificadas entre constitutivas e inducibles, siendo estas últimas uno de los ejemplos más sofisticados de plasticidad fenotípica (Schlichting & Pigliucci 1998). La principal característica de las defensas inducidas es que solo se desarrollan en presencia de algún estímulo o señal del depredador. Así, la exhibición

de defensas aumenta la protección frente al depredador, entregando ventajas en la adecuación biológica, en comparación a organismos en que no se han inducido defensas (Harvell & Dodson 1998). Eventualmente el desarrollo de estas respuestas plásticas puede conllevar costos (De Witt et al 1998; Relyea 2002), los cuales pueden ser de mantención y control de la respuesta plástica, o incluso costos genéticos asociados a la respuesta particular de algunos genes versus otros (De Witt et al. 1998). En los sistemas acuáticos, los organismos del zooplancton habitan en ambientes cargados de información química, la cual en un contexto natural entrega información relacionada a la presencia, abundancia o actividad de otros individuos, gatillando respuestas conductuales o fisiológicas (Dicke & Sabelis 1988). Las presas tienen la capacidad de detectar estas sustancias y ajustar una diversidad de rasgos fenotípicos para incrementar su adecuación biológica frente a estímulos de un determinado depredador. Estos rasgos pueden ser morfológicos, tales como espinas (Barry 2000; Carter et al 2008, Hammil et al 2008; Stabell et al 2003; Tollrian 1995); cambios conductuales, como migración vertical o cambios en la actividad (De Meester et al 1999; Dodson 1988; Ramos-Jiliberto et al 2004); y cambios en rasgos de historia de vida, como retraso en la edad de la madurez o tamaño de camada (Carter et al 2008; Spitze 1992; Stibor & Lüning 1994; Dodson & Havel 1988). De esta manera, el interés en este trabajo es evaluar la magnitud y sensibilidad de las respuestas plásticas considerando un ensamble de rasgos, frente a las condiciones ambientales generadas por un gradiente de riesgo de depredación. Además, se evalúa la diversidad interclonal de la plasticidad en *Daphnia*, utilizando 11 líneas clonales obtenidas de la misma región.

La mayoría de las investigaciones empíricas que han abordado la inducción de defensas antidepredatorias consideran la presencia o ausencia de un depredador o sus señales como promotores de la inducción de defensas (Tollrian & Harvell 1999; Relyea 2004), pero escasamente se ha considerado el efecto de un gradiente de riesgo de depredación sobre uno o más rasgos (Hammil et al 2008). Adicionalmente, considerar la variabilidad genética que contiene una población permite extrapolar de manera más concreta la plasticidad fenotípica de las defensas inducidas a poblaciones naturales (Scheiner & Yampolsky 1998). Específicamente, nuestros objetivos son: (I) Establecer la extensión y magnitud de la respuesta fenotípica de *Daphnia* frente al gradiente de riesgo de depredación, (II) establecer asociaciones entre rasgos morfológicos en estado de inducción, y (III) determinar las posibles consecuencias de las defensas inducibles sobre los componentes de la adecuación biológica de los organismos estudiados.

Materiales y métodos

Para una descripción de los métodos y procedimientos relacionados con el modelo de estudio, la identificación de clones, el cultivo experimental y los rasgos medidos, consúltese Materiales y Métodos Generales (Pagina 6-12).

Análisis de variación fenotípica

Para la evaluación de los rasgos morfológicos y de historia de vida frente a las diferentes condiciones experimentales, se condujo un análisis de varianza multivariado (MANOVA) sobre los pseudovalores estimados con rutinas de *Jackknife* (Roff 2002). Se utilizó análisis de varianza (ANOVA) factorial para determinar la respuesta de cada rasgo de manera independiente. Todas las

mediciones morfológicas fueron realizadas en el segundo estadio ontogenético. En aquellos casos en los cuales los valores de un rasgo no cumplían con los supuestos de normalidad y heterocedasticidad (i.e. EPR, ver M. y M. Generales), se realizó ANOVA con aleatorizaciones. Para identificar cuáles fueron los niveles de factor que generaron las diferencias significativas en los rasgos estudiados, se realizaron pruebas *a posteriori* de Tukey.

Para establecer la relación funcional entre los rasgos morfológicos, se ajustaron funciones mediante modelos aditivos generales (GAM). Las funciones se construyeron, para cada tratamiento experimental, relacionando el rasgo inducción del diente cervical (NT) con los predictores AMI y EC, de la forma:

$$E(NT) = f_1(EC) + f_2(AMI)$$

Se utilizó además, como medida de la adecuación biológica, una estimación aproximada de la tasa intrínseca de crecimiento poblacional (r), por individuo y por cada tratamiento:

$$r = \frac{\ln(NH)}{EPR}$$

, donde NH corresponde al número de huevos en la primera reproducción, y EPR es la edad a la primera reproducción. Las estimaciones fueron consideradas como un rasgo para cada individuo y luego fueron analizadas mediante ANOVA factorial, para estimar diferencias entre tratamientos. Para identificar cuáles fueron los niveles que generaron las diferencias, se realizaron pruebas *a posteriori* de Tukey.

La estimación de la matriz de varianza y covarianza fenotípica para todos los rasgos con rutinas Jackknife y la prueba de MANOVA se realizó usando rutinas creadas por Roff (2002) en el programa S-PLUS 2000 (versión 2). Las pruebas de ANOVA con mínimos cuadrados y el ajuste de modelo y estimación de peso de cada

variable con GAM fueron realizadas en el programa **R** (versión 2.6.2). Los ANOVAs con randomizaciones fueron hechos con el programa RT (versión 2.1).

Resultados

Los tratamientos experimentales afectaron la respuesta de los rasgos morfológicos y de historia de vida en *D. pulex*. Las matrices fenotípicas entre tratamientos, considerando los rasgos en condición de inducción (tratamiento 0.1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ a 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de kairomonas), resultaron ser significativamente diferentes (MANOVA-Jackknife.Wilk's $\lambda = 0.759$; $F_{5,943} = 2.491$; $P < 0.001$). Todos los rasgos evaluados mostraron variaciones en sus medias fenotípicas a lo largo del gradiente de concentración de kairomonas (Tabla 1.1.). De la misma forma, los rasgos evaluados respondiendo de manera significativamente diferente a las condiciones experimentales; además la respuesta entre clones y su interacción con los tratamientos de kairomonas también fue significativa (Fig. 1.1; 1.2.). Para los rasgos de historia de vida, las pruebas *a posteriori* revelan diferencias significativas entre los tratamiento experimentales. Tales diferencias se manifiestan especialmente entre comparaciones de los extremos del gradiente de kairomonas. Para **EPR**, la prueba con randomizaciones evidenció diferencias significativas ($F_{6,539} = 18.1$; $P < 0.001$) y las comparaciones múltiples revelan diferencias significativas entre tratamientos 0 y 0.5, 0.75, 1 y 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$; diferencias significativas entre 0.1 y 0.5, 0.75, 1 y 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$; y diferencias significativas entre 0.25 K con 0.5 K, 0.75 K, 1 K y 2 K. Para los tres rasgos de historia de vida el patrón fue similar; estos rasgos respondieron aumentando sus medias a medida que la concentración de kairomonas aumenta. Para los rasgos morfológicos las pruebas *a posteriori* revelan patrones de diferenciación

Tabla 1.1. Rasgos morfológicos y de historia de vida de *Daphnia* bajo los tratamientos de kaitomonas de *Chaoborus* spp. Las mediciones de los rasgos morfológicos corresponden al *instar* de máxima inducción. EC: Longitud espina caudal; TMI: Tamaño en máxima inducción; AMI: Angulo espina-cuerpo; NT: Inducción de diente cervical. NH: Número de huevos; TPR: Tamaño primera reproducción; EPR: Edad primera reproducción; *r*: Tasa intrínseca de crecimiento poblacional.

Rasgos	0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ Media \pm DS (n=169)	0.1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ Media \pm DS (n=152)	0.25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ Media \pm DS (n=161)	0.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ Media \pm DS (n=161)	0.75 $\mu\text{L mL}^{-1}$ Media \pm DS (n=162)	1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ Media \pm DS (n=156)	2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ Media \pm DS (n=156)
EC (mm)	0.227 \pm 0.03	0.230 \pm 0.03	0.235 \pm 0.03	0.240 \pm 0.02	0.236 \pm 0.02	0.239 \pm 0.02	0.237 \pm 0.02
TMI (mm)	0.880 \pm 0.06	0.879 \pm 0.06	0.874 \pm 0.03	0.882 \pm 0.05	0.882 \pm 0.05	0.897 \pm 0.08	0.88 \pm 0.06
AMI (grados ^o)	187.8 \pm 5.14	185.9 \pm 5.36	185.9 \pm 4.10	185.7 \pm 3.47	185.9 \pm 4.10	185.01 \pm 3.82	185.79 \pm 4.39
NT (%)	0 \pm 0	11.56 \pm 12.6	30.07 \pm 19.3	46.27 \pm 19.1	41.46 \pm 19.0	50.57 \pm 17.81	39.28 \pm 25.16
NH	8.31 \pm 1.92	8.65 \pm 2.55	8.71 \pm 2.43	9.44 \pm 2.55	9.39 \pm 2.12	9.91 \pm 2.63	9.00 \pm 2.50
TPR (mm)	1.88 \pm 0.11	1.92 \pm 0.12	1.94 \pm 0.12	1.96 \pm 0.12	1.96 \pm 0.10	1.97 \pm 0.13	1.94 \pm 0.12
EPR (días)	6.62 \pm 0.95	6.87 \pm 0.91	6.84 \pm 0.88	7.32 \pm 0.89	7.27 \pm 0.81	7.23 \pm 0.94	7.08 \pm 0.81
<i>r</i>	0.320 \pm 0.05	0.311 \pm 0.05	0.313 \pm 0.05	0.304 \pm 0.04	0.307 \pm 0.04	0.31 \pm 0.05	0.31 \pm 0.05

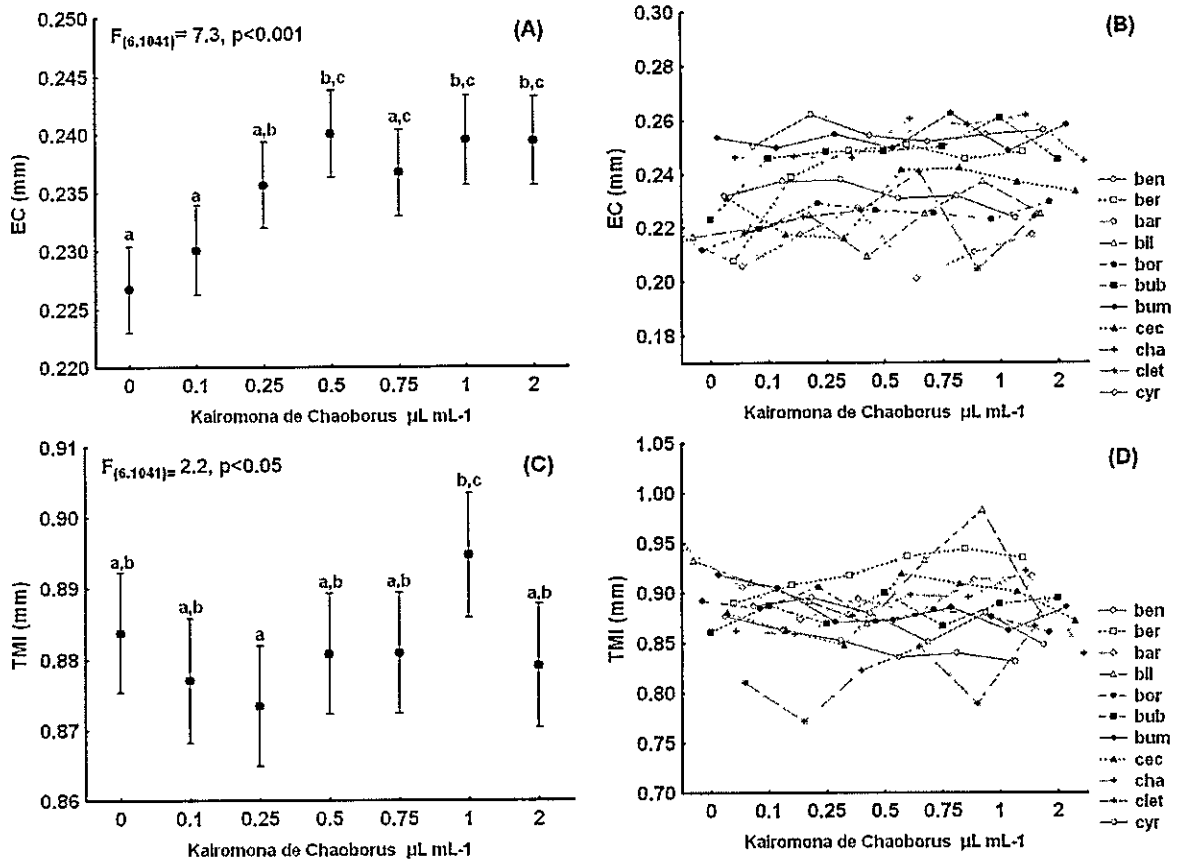


Figura 1.1. Respuesta plástica de los rasgos morfológicos de *Daphnia pulex* al gradiente de concentración de Kairomonas de *Chaoborus*. **A** y **B** corresponden a espina caudal (EC), evaluada a nivel poblacional y considerando la variación interclonal respectivamente; **C** y **D** corresponden al tamaño máximo en inducción (TMI), evaluada a nivel poblacional y considerando la variación interclonal respectivamente. Barras verticales indican intervalos de confianza del 95%. Las letras indican grupos categorizados con pruebas *a posteriori* de Tukey ($\alpha < 0.05$).

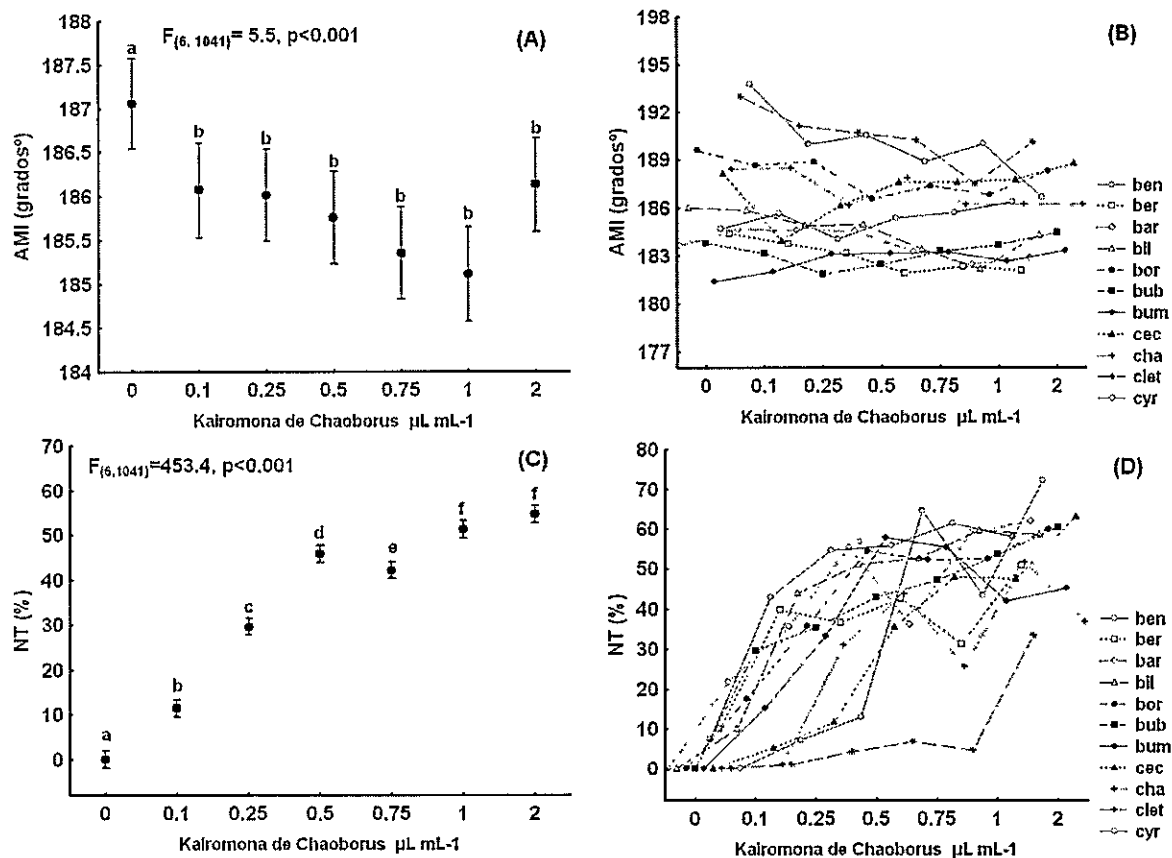


Figura 1.2. Respuesta plástica de los rasgos morfológicos de *Daphnia pulex* al gradiente de concentración de Kairomonas de *Chaoborus*. A y B corresponden a ángulo en máxima inducción (AMI), evaluada a nivel poblacional y considerando la variación interclonal respectivamente; C y D corresponden al diente cervical (NT), evaluada a nivel poblacional y considerando la variación interclonal respectivamente. Barras verticales indican intervalos de confianza del 95%. Las letras indican grupos categorizados con pruebas *a posteriori* de Tukey ($\alpha < 0.05$).

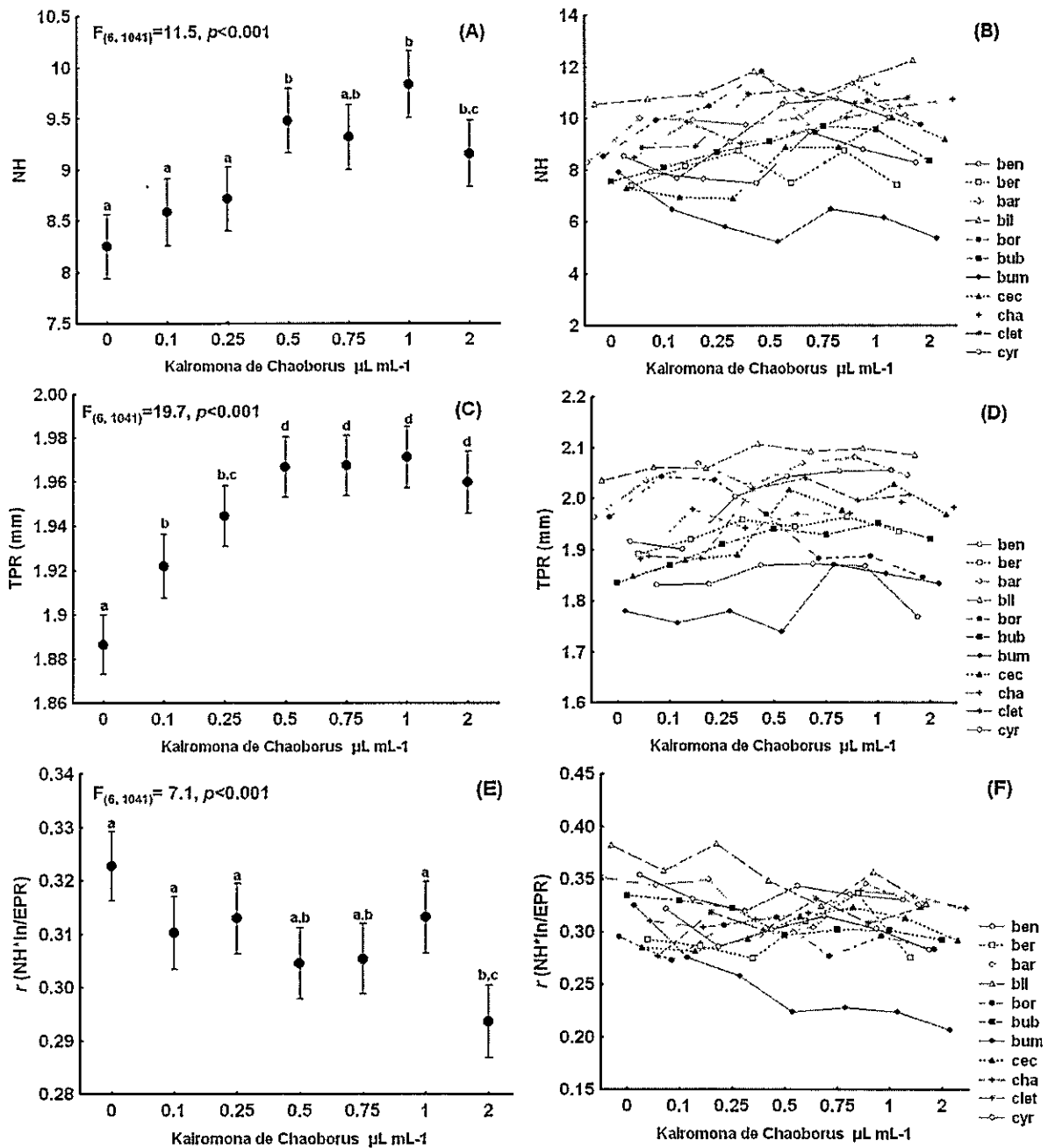


Figura 1.3. Respuesta plástica de los rasgos de historia de vida de *Daphnia pulex* al gradiente de concentración de Kairomonas de *Chaoborus*. (A) Número de huevos (NH); (B) Tamaño primera reproducción (TPR); (C) r (tasa intrínseca de crecimiento poblacional). Barras verticales indican intervalos de confianza del 95%. Las letras indican grupos categorizados con pruebas *a posteriori* de Tukey ($\alpha < 0.05$).

Tabla 1.2. Resultado del ajuste de los modelos construidos (GAM) y la significancia de la función de los rasgos para cada tratamiento.

Tratamientos	R ² (ajustado)	Desv. Expl. (%)	F(EC) valor <i>p</i>	F(AMI) Valor <i>p</i>
0.1	0.1	14.2	0.12	<0.01
0.25	0.225	25.2	<0.05	<0.001
0.5	0.062	9.39	0.47	<0.05
0.75	0.176	20.7	<0.01	<0.01
1	0.151	20.9	0.057	<0.01
2	0.166	21.7	<0.001	0.15

significativos generados por los tratamientos. La magnitud y dirección del cambio fue diferente para cada rasgo, siendo el rasgo TMI el menos sensible a la exposición de kairomonas de *Chaoborus*. Existieron asociaciones fenotípicas significativas, probadas con las funciones GAM. Las funciones de ajustes hechas con GAM para el rasgo NT versus los rasgos morfológicos EC y AMI mostraron ser significativas en todos los tratamientos donde hubo inducción (Tabla 1.2.). Pese a que la variación explicada no supera el 25%, el peso de las variables fue no-significativa solo para el tratamiento 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ en el caso de AMI y en los tratamientos 0.25, 0.75 y 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para EC. De esta manera se establece cierto nivel de asociación entre las variables morfológicas vinculadas a la inducción.

Discusión

La inducción de defensas en respuesta a la presencia de depredadores es una clara señal del rol modulador que tiene el ambiente sobre el fenotipo de los organismos. Esta inducción no se restringe a un rasgo particular sino a la totalidad del organismo, que es el que finalmente resiste o evita la depredación, pudiendo así persistir en el tiempo. La mayoría de la evidencia que se ha acumulado en torno a la existencia de defensas inducidas, se centra en uno o dos rasgos en particular, no considerando el organismo como un todo (Relya 2004), en pocas ocasiones se ha

considerado la diversidad genética propia de las poblaciones naturales (Weber & Declerck 1997; Declerck & Weber 2003), y las aproximaciones experimentales se limitan a extremos del gradiente, más que a la amplitud de un gradiente en particular. La relevancia del presente trabajo recae en que se consideró estas limitaciones, ya que: (i) Este trabajo analiza la respuesta de un conjunto de rasgos morfológicos y de historia de vida simultáneamente; (ii) además considera un conjunto de líneas clonales (11) con el objetivo de representar la diversidad genética de una población tipo; (iii) y amplía el gradiente de concentraciones de kairmonas con el fin de detallar la norma de reacción de cada rasgo a lo largo del gradiente de riesgo de depredación. Así, los organismos aquí estudiados mostraron una respuesta en la totalidad de los rasgos evaluados (4 morfológicos y 3 de historias de vida), lo cual indica que la matriz fenotípica cambió dentro del gradiente de kairmona de *Chaoborus* al cual los organismos estuvieron expuestos. Y la respuesta fue diferencial dependiendo del rasgo evaluado a largo del gradiente experimental utilizado.

Las presas como *Daphnia* suelen modificar varios rasgos cuando se enfrentan a riesgo de depredación (Tollrian & Harvell 1999). En particular numerosos rasgos morfológicos pueden expresarse de manera simultánea para dificultar la captura y manipulación por parte del depredador (Krueger & Dodson 1981; Spitze & Sandler 1996; Scheiner & Berrigan 1998). Los rasgos medidos aquí experimentaron respuestas fenotípicas diferenciales al gradiente de riesgo de depredación, es así como, en estado o edad de máxima inducción podemos ver que el diente cervical (NT) y la espina caudal (EC) presentan un patrón similar asociado a rasgos umbrales (Roff 2002), en contraste al ángulo espina-cuerpo (AMI) que muestra un patrón de cambio gradual. En contraste el rasgo tamaño corporal en máxima inducción no

parece mostrar un patrón en relación al gradiente (Fig. 1.1., 1.2.). Mientras que la evidencia asociada a NT y EC es abundante en torno a su función como defensa antidepredatoria (Lüning 1992; 1994) y por tanto esperable su que su respuesta plástica sea de tipo umbral. Para el rasgo ángulo espina-cuerpo en máxima inducción (AMI), existe escasa evidencia de su respuesta frente a la inducción de depredadores. Carter et al. (2008) reporta cambios en el ángulo espina-cuerpo en *D. ambigua* en presencia de señales de un depredador invertebrado (Ácaro acuático). Dado el grado de respuesta y el patrón exhibido, se busco algún grado de asociación de los rasgos morfológicos al gradiente experimental. De esta manera, para los rasgos diente cervical (NT), espina caudal (EC) y ángulo espina-cuerpo (AMI), en el estado de máxima inducción, se encontró una asociación significativa (Tabla 1.2.). Esta aproximación que permite determinar la significancia de la función de los rasgos EC y AMI como predictores de NT, sugieren la acción conjunta e integrada de estos rasgos en el desarrollo de un fenotipo defensivo. Sin embargo, tomamos estos resultados con precaución, ya que el ajuste obtenido en cada uno de los tratamientos no supera el 25% de la variación explicada. Pese a ser una evaluación sencilla de la respuesta integrada de varios rasgos frente a un gradiente ambiental, las diferencias encontradas en magnitud y sensibilidad de las respuestas para cada rasgo evidencian la complejidad de estas estrategias fenotípicas. Por lo anterior, se deriva que el registro de las consecuencias fenotípicas y la eventual evaluación de los costos de estas respuestas, deben considerar la multidimensionalidad del fenómeno.

La evaluación de la relevancia que tiene para un fenotipo la presencia de una defensa inducida frente a un depredador, conduce necesariamente a una estimación de los costos de presentar tales morfos (De Witt et al 1998). Los que son evaluados

en rasgos de historia de vida dada su cercanía a la adecuación biológica. Nuestros resultados muestran un retraso en la edad de la primera reproducción, y aumento en el tamaño de la primera reproducción y fertilidad, con mayores niveles de kairomonas, además de una de la tasa intrínseca de crecimiento *per capita* (r) la cual evidenció disminución en su valor, pero solo en niveles extremos del gradiente de kairomonas (Fig. 1.3.; Tabla 1.1.). Estos resultados son consistentes con los encontrados para *D. pulex* frente a la presencia de *Chaoborus spp.* (Tollrian & Dodson 1998; Sell 2003). Tanto las estimaciones realizadas solo a partir de tablas de vida (i.e. Scheiner & Berrigan 1998) o las que son acompañadas de experimentos de depredación (Hammil et al 2008). Aparentemente, la inducción de defensas en los primeros estadios o edades tuvo consecuencias en el tiempo necesario para llegar a la reproducción, lo cual afecta negativamente a r , sin embargo como consecuencia de esto los organismos llegan además más grandes a su primera reproducción permiten la postura de un mayor número de huevos conllevando un efecto positivo sobre el r (Fig. 1.3.; Tabla 1.1.). Dado que la defensas morfológicas (EC; NT, AMI) se presentan en los primeros tres estadios del desarrollo, el retraso de la reproducción podría significar un aumento en de la vulnerabilidad en el tiempo, principalmente considerando que los ambientes donde habita *D. pulex* se caracterizan por su heterogeneidad y lo que resulta beneficiosos en presencia de *Chaoborus*, no necesariamente es beneficioso en presencia de otros depredadores (Weber & Declerck 1997; Brett 1992; Caramujo et al 1997; Laforsh & Tollrian 2004).

En conclusión y de acuerdo con nuestros objetivos, en este trabajo se documentan diferentes normas de reacción para los múltiples rasgos morfológicos y de historia de vida en *D. pulex* frente a un amplio gradiente ambiental de kairomonas

de *Chaoborus spp.*. Además, logramos determinar que algunos rasgos morfológicos que presentan respuestas al riesgo de depredación muestran asociación en su respuesta, arrojando indicios de respuestas integradas frente a la depredación por *Chaoborus*. Y la plasticidad fenotípica de estos rasgos afecto a los componentes de la adecuación biológica compuesto por los rasgos de historia de vida, evidenciando la aparente existencia de costos en la inducción de defensas.

Referencias

- Agrawal A.A., Laforsch C. y Tollrian R. (1999) Transgenerational induction of defences in animals and plants. *Nature* 401: 60–63.
- Barry M.J. (2000) Inducible defences in *Daphnia*: Responses to two closely related predator species. *Oecologia* 124: 396-401.
- Brendonck L. y De Meester L. (2003) Egg banks in freshwater zooplankton: Evolutionary and ecological archives in the sediment. *Hydrobiologia* 491: 65–84.
- Brett M. T. (1992) *Chaoborus* and fish-mediated influences on *Daphnia longispina* population structure, dynamics and life history strategies. *Oecologia* 89: 69–77.
- Burks R.L., Lodge D.M., Jeppesen E. y Lauridsen T.L. (2002) Diel horizontal migration of zooplankton: Costs and benefits of inhabiting the litoral. *Freshwater Biology* 47: 343–365.
- Caramujo M.J., Crispin M.C. y Boavida M.J. (1997) Assessment of the importance of fish predation versus copepod predation on life history traits of *Daphnia hyalina*. *Hydrobiologia* 360: 243-252.
- Carter M.J., Vega-Retter C. y Ramos-Jiliberto R. (2008) Non-lethal effects of invertebrate predators on *Daphnia*: morphological and life-history consequences of

water mite kairomone. *Freshwater Biology* 53: 1857-1867.

Çelik K., Schindler J.E., Foris W.J. y Knight J.C. (2002) Predator-mediated coexistence of exotic and native crustaceans in a freshwater lake? *Biological Invasions* 4: 451-454.

DeWitt T.J., Sih A., y Wilson D. S. (1998) Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution* 13: 77-81.

De Meester L., Dawidowicz P., van Gool E. y Loose C.J. (1999) Ecology and evolution of predator-induced behavior of zooplankton: depth selection behavior and diel vertical migration. In: *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses* (Eds R. Tollrian & C.D. Harvell), pp. 160-176. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Dicke M. y Sabelis M.W. (1988) Infochemical Terminology: Based on Cost-Benefit Analysis rather than origin of compounds? *Functional Ecology* 2: 131-139.

Dodson S.I. (1988) Ecological role of chemical stimuli for zooplankton: Predator-avoidance behavior in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* 33: 1431-1439.

Dodson S.I. y Havel J.E. (1988) Indirect prey effects: Some morphological and life history response of *Daphnia pulex* exposed to *Notonecta undulata*. *Limnology and Oceanography* 33: 1274-1285.

Hammil E., Rogers A. y Beckerman A.P. (2008) Costs, benefits and the evolution of inducible defences: a casestudy with *Daphnia pulex*. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 705-715.

Havel J.E. (1985) Cyclomorphosis of *Daphnia pulex* spined morphs. *Limnology and Oceanography* 30: 853-861.

Havens K.E. (1990) Chaoborus predation and zooplankton community structure in a

- rotifer-dominated lake. *Hidrobiología* 198: 215–226.
- Karban R. y Agrawal A.A. (2002) Herbivore offense. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33:641-64.
- Krueger D.A. y Dodson S.I. (1981) Embryological induction and predation ecology in *Daphnia pulex*. *Limnology and Oceanography* 26:219-223.
- Lafors C. y Tollrian R. (2004) Extreme helmet formation in *Daphnia cucullata* induced by small-scale turbulence. *Journal of Plankton Research* 26:81-87.
- Lampert W. (1997) Zooplankton research: The contribution of limnology to general ecological Paradigms. *Aquatic Ecology* 31: 19–27, 1997
- Lass S. y Spaak P. (2003) Chemically induced anti-predator defences in plankton: a review. *Hydrobiologia* 491: 221–239.
- Miner B.G., Sultan S.E., Morgan S.G., Padilla D.K. and Relyea R.A. (2005) Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution*, 20, 685–692.
- Parejko K. (1991) Predation by Chaoborids on Typical and Spined *Daphnia pulex*. *Freshwater Biology* 25: 211–217.
- Parejko K. y Dodson S.I. (1991) The evolutionary ecology of an antipredator reaction norm: *Daphnia pulex* and *Chaoborus americanus*. *Evolution* 45: 1665–1674.
- Persaud A.D. y Yan N.D. (2001) Accounting for spatial variability in the design of sampling programmes for *Chaoborus* larvae. *Journal of Plankton Research* 23: 279–285.
- Pigliucci M. (2005) Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology and Evolution* 20: 481–486.

- Ramos-Jiliberto R., Carvajal J.L., Carter M.J. y Zuñiga L.R. (2004) Diel vertical migration patterns of three zooplankton populations in a Chilean lake. *Revista Chilena de Historia Natural* 77: 29-41.
- Riessen H.P. (1999) Predator-induced life history shifts in *Daphnia*: a synthesis of studies using meta-analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56: 2487-2494.
- Relyea R.A. (2002) Cost of phenotypic plasticity. *The American Naturalist* 159: 272-282.
- Relyea R.A. (2004) Integrating phenotypic plasticity when death is on the line: Insight from predator-prey systems. In: Phenotypic Integration (Eds M. Pigliucci & K. Preston), pp. 176-190. Oxford University Press, N.Y.
- Roff D. (2002) Comparing G matrices: A manova approach. *Evolution* 56: 1286-1291.
- Sell A.F. (2000) Morphological defenses induced in situ by the invertebrate predator Chaoborus: comparison of responses between *Daphnia pulex* and *D. rosea*. *Oecologia* 125:150-160.
- Scheiner S.M. y Berrigan D. (1998) The Genetics of Phenotypic Plasticity. VIII. The cost of plasticity in *Daphnia pulex*. *Evolution* 52: 368-378.
- Schlichting C. D., y Pigliucci M. (1998) Phenotypic evolution: a reaction norm perspective. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Spitze, K. (1992) Predator-mediated plasticity of prey life history and morphology: Chaoborus americanus predation on *Daphnia pulex*. *The American Naturalist* 139: 229-247.
- Spitze, K. y Sadler T.D. (1996) Evolution of a generalist genotype: Multivariate

analysis of the adaptiveness of phenotypes plasticity. *The American Naturalist* 148: 108-123.

Stabell O.B., Ogbedo F., y Primicerio R. (2003) Inducible Defences in *Daphnia* Depend on Latent Alarm Signals from Conspecific Prey Activated in Predators. *Chemical Senses* 28:141-153.

Stearns S.C. (1992) The evolution of life histories. Oxford University Press, Oxford

Stibor A. y Lüning J. (1994) Predator-induced phenotypic variability in the pattern of growth and reproduction in *Daphnia hyalina* (Crustacea: Cladocera). *Functional Ecology* 8: 97-101.

Tollrian R. (1993) *Daphnia pulex* as an example of continuous phenotypic plasticity-morphological effects of Chaoborus kairomone concentration and their quantification. *Journal of Plankton Research* 15: 1309–1318.

Tollrian R. (1995) Predator-induced morphological defenses-costs, life-history shifts, and maternal effects in *Daphnia pulex*. *Ecology* 76: 1691–1705.

Tollrian R. y Dodson S.I. (1999) Inducible defenses in cladocera: constraints, costs, and multipredator environments. In: *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses* (Eds R. Tollrian & C.D. Harvell), pp. 177–202. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Tollrian R. y Harvell D. (1999) *The ecology and evolution of inducible defenses*. Princeton University Press, Princeton, N.J.

Weber A. y Declerck S. (1997) Phenotypic plasticity of *Daphnia* life history traits in response to predator kairomones: genetic variability and evolutionary potencial. *Hydrobiologia* 360: 89-99.

Capítulo II

Plasticidad fenotípica y variación genética del diente cervical en *Daphnia pulex*

Resumen

La evolución y mantención de las defensas inducidas en una presa dependen de la existencia de variación genética (V_G) en el rasgo defensivo, de la existencia de señales del depredador y de la eficiencia de la defensa antidepredatoria. La descripción de la plasticidad en un amplio gradiente ambiental permite en este caso identificar diferentes parámetros que caracterizan la inducción, posibilitando la visualización y extrapolación en ambientes naturales. En esta investigación se consideró la norma de reacción del diente cervical (“*neckteeth*”) en un amplio gradiente de riesgo de depredación mediado por kairomonas de *Chaoborus spp.* Se encontró heredabilidades significativas para el diente cervical de similares magnitudes a lo largo del gradiente ambiental, además de correlaciones genéticas de este rasgo entre ambientes. Asimismo, se encontraron heredabilidades significativas en los parámetros que describen la norma de reacción, específicamente para la máxima inducción (asíntota) y para el umbral concentración kairomonas (punto de inflexión). Nuestros resultados indican que el rasgo morfológico defensivo diente cervical puede responder a la selección natural independiente de la condición ambiental donde se desarrollen estos organismos, y que la plasticidad de la defensa considerada como un rasgo puede responder en al menos dos de los parámetros que describen su norma de reacción. Así, este trabajo contribuye al entendimiento de la ecología y potencial evolutivo de la plasticidad fenotípica en ambientes heterogéneos.

Palabras claves: Defensas inducidas, Norma de reacción no-lineal, heredabilidad, diente cervical, riesgo de depredación.

Introducción

Los organismos son el resultado de la interacción de sus arreglos genéticos y del ambiente en que habitan y se desarrollan (Fisher 1930). Así, los organismos generan una serie de estrategias fenotípicas que les permiten optimizar su adecuación biológica y así subsistir en ambientes fluctuantes. Entre las estrategias o respuestas fenotípicas que más se han documentado en los últimos 20 años, se encuentra la plasticidad fenotípica (Miner et al. 2005; Pigliucci 2005). Es así como se ha desarrollado un gran cuerpo teórico y empírico orientado a entender las respuestas morfológicas, conductuales y de historia de vida frente a gradientes ambientales (Pigliucci & Schlichting 1998), enfatizando la importancia ecológica de la plasticidad (Miner et al 2005, Nussey 2007), así como de sus consecuencias evolutivas en las especies que la presentan (Pigliucci 2005, Nussey 2007). Definida como la capacidad de un genotipo de generar diferentes fenotipos dependiendo del ambiente (Bradshaw 1965), la plasticidad permite a los organismos ajustarse a ambientes fluctuantes. La evolución de la plasticidad fenotípica es posible cuando los óptimos fenotípicos varían con las condiciones ambientales (van Tienderen 1991). Sin embargo, dado que la plasticidad podría en algunos casos resultar maladaptativa (Eshel & Matessi 1998) o restringirse dentro de un gradiente ambiental (Gotthard & Nylin 1995), es importante entender la base ecológica y evolutiva de la variación fenotípica entre ambientes (Miner et al. 2005; Pigliucci 2005, Postma & van Noordwijk 2005).

Para describir la plasticidad fenotípica se han desarrollado dos aproximaciones metodológicas: el *estado del carácter* y la *norma de reacción*. Ambas aproximaciones son actualmente intercambiables, teniendo ventajas y desventajas (ver Roff 1997). Por un lado, el principal fundamento del estado del carácter es considerar conceptualmente que el mismo rasgo medido en dos ambientes puede ser considerados como dos rasgos que están genéticamente correlacionados (Falconer 1952). Por otro lado, la *norma de reacción* es un concepto que define la plasticidad a partir de funciones que describen la variación que presenta un determinado genotipo (De Jong 1990, Via et al 1995). Esta aproximación se centra en los parámetros que describen la curva de la plasticidad (De Jong 1990, Stearns et al 1991). Bajo el supuesto de considerar la plasticidad como un rasgo el cual puede presentar variación dentro de una población, Scheiner y Goodnight (1984), y Scheiner y Lyman (1989) proponen que la varianza fenotípica de la plasticidad (V_{PI}) es el resultado de la suma de la contribución del ambiente (V_E) mas interacción genotipo ambiente ($V_{G \times E}$), es decir descomponer la plasticidad en su componente plástico y en el no-plástico. Esta simplificación es análoga al intercepto y la pendiente cuando consideramos una norma de reacción lineal, sin embargo cuando la norma de reacción es no-lineal se adicionan coeficientes y la V_G no es independiente del ambiente (Scheiner 1993). En este trabajo abordamos la estimación de parámetros de una norma de reacción no-lineal, y con un diseño de clones profundizamos en la estimación de la variación genética de los parámetros de la norma de reacción, a la vez que estimamos algunos parámetros de varianza y covarianza genética para evaluar la plasticidad desde el *estado del carácter*. La respuesta plástica a considerar aquí será la inducción de rasgos defensivos en

Daphnia, en presencia de señales químicas liberadas por su depredador *Chaoborus*.

Las presas adoptan una serie de estrategias para reducir la mortalidad producida por la depredación (Tollrian & Dodson 1998). En particular, los cladóceros exhiben una amplia variedad de estrategias antidepredatorias (ver Larsson & Dodson 1993; Tollrian & Dodson 1998). Algunas estrategias se asocian con evitar el encuentro con los depredadores (migración vertical o producción de huevos de resistencia). Otras estrategias se asocian con disminuir la probabilidad de encuentro con el depredador evitando ser detectados (reducción de pigmentación del ojo, tamaño corporal, actividad de nado o incremento en la transparencia corporal). El incremento del tamaño corporal, así como adaptaciones morfológicas tales como dientes cervicales (Hammil et al. 2008, Havel & Dodson 1984, Sell 2000), elongación de espina caudal (Carter et al. 2008; Mort 1986; Pijanowska 1990) y crestas protectoras (Tollrian, 1990, 1994; Beaton & Hebert, 1997), pueden obstaculizar la manipulación e ingestión de la presa facilitando el escape (Tollrian & Dodson 1998).

Organismos que habitan ambientes fluctuantes pueden desarrollar respuestas plásticas específicas a estos ambientes, siempre y cuando estas respuestas se asocien con beneficios en la adecuación biológica (Scheiner 1993, 2002). Se ha demostrado que varias especies de *Daphnia* condicionan la expresión de estas defensas morfológicas a la presencia de la larva de mosquito *Chaoborus* (Capítulo I; Spitze 1992; Tollrian 1995). Frente a este riesgo de depredación, *Daphnia* desarrolla morfos que resultan ser menos vulnerables a la depredación por *Chaoborus* (Krueger & Dodson 1981; Havel & Dodson 1984; Parejko 1991; Spitze & Sadler 1996). En sistemas acuáticos, donde la visión es limitada, es común que el desarrollo de

defensas contra depredadores esté gatillada por la percepción de exudados o señales químicas (“kairomonas”) disueltas en el medio (Tollrian y Dodson 1998). En particular, se han desarrollado una serie de experiencias con el objetivo de entender la dinámica microevolutiva de la inducción de defensas en las presas (Stibor & Lampert 2000; Stirling & Roff 2000; Weber & Declerck 1997; Weber et al 2003), además de evaluar los costos de esta compleja expresión plástica (Hammil et al 2008).

El valor del estudio de la norma de reacción como un descriptor de la plasticidad fenotípica, recae en la capacidad de identificar patrones en la plasticidad que no son posible a través de la estudio directo del rasgo plástico (Schlichting & Pigliucci 1998). Es así como, identificar o interpretar los parámetros tales como la pendiente, intercepto, etc. permite visualizar la plasticidad como un rasgo y eventualmente estudiar la norma de reacción que puede responder a fuerzas ecológicas y evolutivas. En este trabajo se estudia la plasticidad fenotípica, considerando la variabilidad genética presente en una población de *Daphnia pulex* que desarrolla defensas inducidas, frente a diferentes concentraciones de kairomonas de *Chaoborus spp.* En este sentido, nosotros nos preguntamos lo siguiente: ¿Existe varianza genética en el diente cervical que pueda responder a la selección natural?, y ¿cuál es la arquitectura genética asociada la norma de reacción del diente cervical a lo largo del gradiente de riesgo de depredación? Para responder esto: Primero se describirá la norma de reacción del diente cervical a lo largo del gradiente de kairomonas; segundo se estimará la varianza genética del diente del cuello en diferentes niveles de inducción; y tercero se determinará si la norma de reacción

descrita por sus parámetros tiene varianza genética que pueda responder a la selección natural.

Materiales y Métodos

Para una descripción de los métodos y procedimientos relacionados con el modelo de estudio, la identificación de clones, el cultivo experimental y los rasgos medidos, consúltese Materiales y Métodos Generales (Pagina 6-12).

Análisis de la norma de reacción

Aquí se consideró el rasgo *diente cervical*, que es el rasgo con más clara respuesta fenotípica al gradiente de kairomonas impuesto experimentalmente. Además este rasgo se asocia positivamente con la sobrevivencia de los fenotipos que la presentan en presencia de *Chaoborus spp.* (Capítulo I; Hammil et al 2008).

La norma de reacción fue analizada con un modelo logístico de tres parámetros, usando una aproximación no-lineal de efectos fijos (ver Pinhero & Bates 2000). Esta aproximación permitió examinar explícitamente la variación en la norma de reacción, asociada con el efecto aleatorio de los clones. Los tres parámetros del modelo logístico corresponden a la asíntota (máxima inducción), un punto de inflexión (concentración umbral) y un parámetro de forma (abruptez). El modelo de efectos mixtos permitió establecer la variabilidad genética para cada uno de estos caracteres de la norma de reacción.

Arquitectura genética de la inducción

Se estimaron la heredabilidad y correlaciones genéticas (en sentido amplio) a partir de dos aproximaciones de la plasticidad fenotípica. La primera consistió en la estimación de los parámetros genéticos sobre el rasgo inducido en cada ambiente y a

su vez entre cada uno de los ambientes considerados en el experimento (7 niveles de inducción). La segunda correspondió a la estimación de las varianzas genéticas de cada parámetro obtenido a partir del ajuste no-lineal (asíntota, umbral y abruptez), además de la correlación genética entre los parámetros. El procedimiento para la estimación fue el mismo para las dos aproximaciones. De esta manera, basado en el diseño experimental de líneas clonales con el rasgo focal medido en la progenie, se estimaron los componentes de varianza: **G**, la varianza genética (en sentido amplio); y **E**, la varianza ambiental o varianza residual. Usando el modelo animal (programa MTDFREML) se realizó un procedimiento de máxima verosimilitud restringida (Boldman et al 1995).. El procedimiento consiste en calcular por medio de iteraciones el modelo completo (GE) usando diferentes valores semilla, hasta asegurarse de alcanzar un máximo global de verosimilitud. Además se probó el modelo considerando sólo el ambiente a través de la restricción del parámetro G del modelo completo, estimando de esta manera un nuevo valor de verosimilitud. La significancia estadística del componente G fue determinado con una prueba de razón de verosimilitud (LRT), donde el χ^2 crítico es seleccionado usando los grados de libertad correspondientes al número de parámetros usados en el modelo completo (aquí, g.d.= 1; $\chi^2_{\text{crítico}} = 3.841$). Las iteraciones fueron hechas hasta que las diferencias en las sucesivas verosimilitudes fueron menores que 10^{-5} . Las covarianzas y correlaciones genéticas fueron estimadas de la misma manera, pero incluyendo los pares de rasgos en una versión multivariada del programa donde se ejecuto el modelo animal (Boldman et al 1995). Nosotros además presentamos los errores estándar asintóticos.

Resultados

Norma de reacción

La norma de reacción que describe las plasticidad fenotípica de la inducción del *diente cervical* frente al gradiente de concentración de kairomonas de *Chaoborus spp.*, estuvo bien caracterizada por el modelo sigmoideo, que usó como factor aleatorio el clon para determinar las diferencias interclonales de esta población de *D. pulex*. El modelo permitió también determinar que existe variación en los atributos de la norma de reacción entre los once clones evaluados (Fig. 1). Los tres parámetros ajustados de la función logística difirieron significativamente dentro de la población (Tabla 2.1). Además, la máxima inducción presentó covarianzas negativas con el umbral de inducción (-0.5544) y con la magnitud de la inducción (-0.13706), mientras que la covarianza entre el umbral de inducción y la magnitud de inflexión fue positiva (0.00270). **Cyril** fue el clon que generó (comparativamente) la máxima inducción de defensas, mientras que **Chardonnay** mostró ser el clon menos reactivo (Fig. 1; Tabla 2.2.). La mayoría de los clones mostraron umbrales de inducción en torno a las concentraciones $0.1 \mu\text{L mL}^{-1}$ y $0.25 \mu\text{L mL}^{-1}$ de kairomonas de *Chaoborus*. Solo el clon **Cletus** se apartó de la tendencia, presentando un umbral en torno a $0.8 \mu\text{L mL}^{-1}$ (Fig. 1; Tabla 2.2.). **Cletus** también presentó el mayor valor para el parámetro de forma, siendo éste en torno al 0.2, en contraste con el resto de los clones donde el valor fue entre 0.02 y 0.09 (Fig. 1; Tabla 2.2.).

Tabla 2.1. Detalle del ajuste del modelo sigmoideo, para la inducción de defensa en *Daphnia* en función de la concentración de kairomona de *Chaoborus*.

Población	Valor Medio	F	P
Asíntota	59.03	769.54	<0.0001
Umbral	0.234	14.263	<0.0001
Abruptez	0.062	48.498	<0.0001

Tabla 2.2. Parámetros de ajuste del modelo sigmoideo para cada clon evaluado, junto a sus respectivos errores estándar (EE).

Clones	Asíntota ± EE	Umbral ± EE	Abruptez ± EE
Cletus	48.831 ± 3.174	0.835 ± 0.049	0.202 ± 0.040
Bernardo	51.132 ± 1.565	0.123 ± 0.014	0.047 ± 0.013
Boris	60.559 ± 1.347	0.155 ± 0.011	0.061 ± 0.008
Bubba	56.950 ± 1.294	0.130 ± 0.012	0.080 ± 0.011
Bummerboy	60.881 ± 0.916	0.096 ± 0.003	0.022 ± 0.012
Cecil	59.648 ± 1.436	0.348 ± 0.017	0.081 ± 0.011
Benja	64.286 ± 1.026	0.138 ± 0.007	0.048 ± 0.006
Billy	66.511 ± 0.837	0.170 ± 0.006	0.057 ± 0.004
Barney	64.462 ± 0.972	0.096 ± 0.003	0.023 ± 0.011
Chardonnay	44.717 ± 3.747	0.188 ± 0.032	0.083 ± 0.024
Cyril	69.371 ± 2.170	0.284 ± 0.021	0.093 ± 0.017

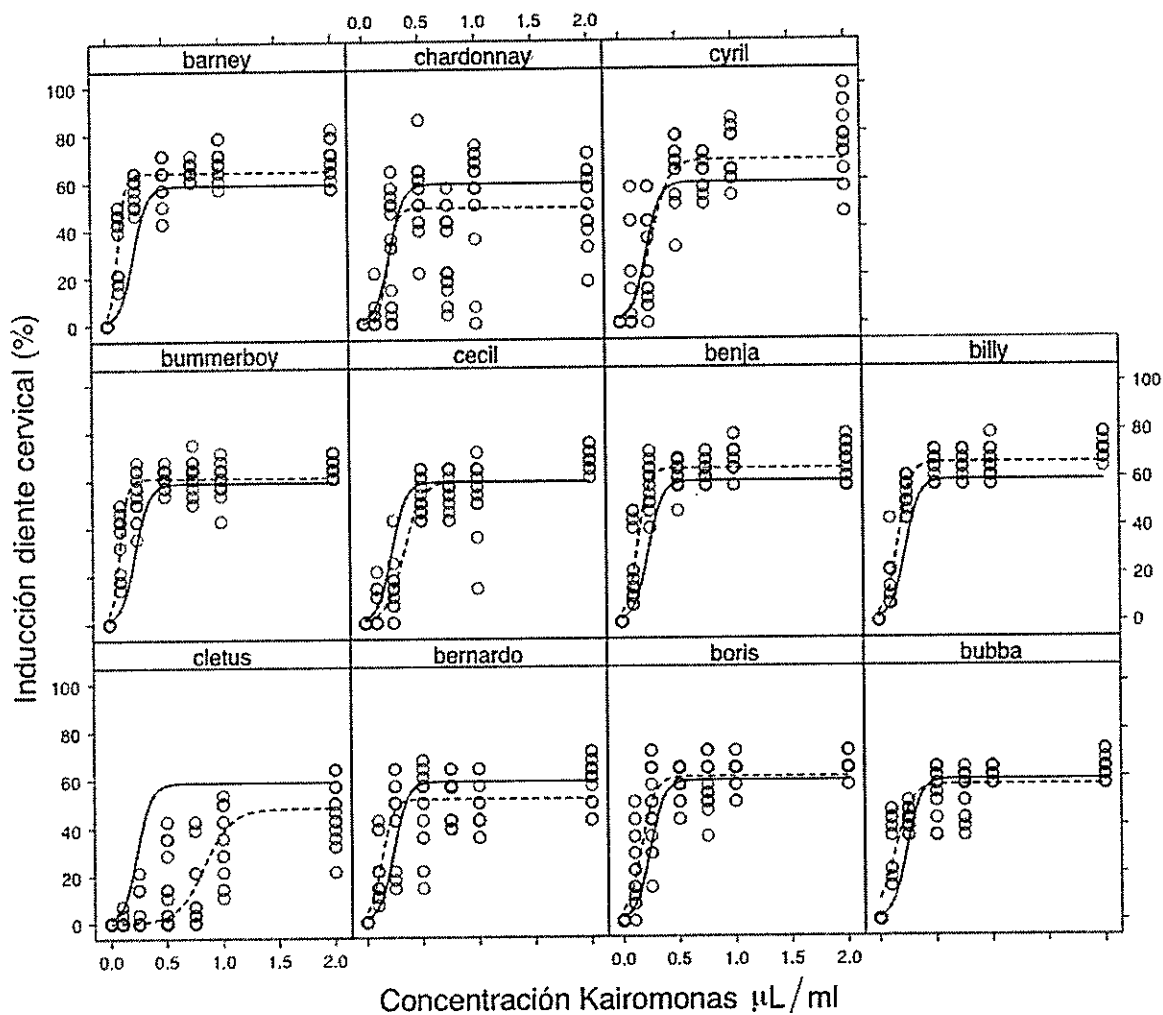


Figura 2.1.- Variación interclonal en la norma de reacción para la inducción del *diente cervical*. Cada panel corresponde a un clon particular. La línea sólida indica el ajuste sigmoideo poblacional y la segmentada corresponde al ajuste para cada clon.

Heredabilidad en sentido amplio y correlación genética

La heredabilidad en sentido amplio fue significativa en todas las condiciones experimentales donde hubo inducción de defensas. El rango de valores obtenidos de heredabilidades fue de 0.33 - 0.55 (Tabla 2.3). Los tratamientos 0.5 y 0.75 $\mu\text{L mL}^{-1}$ mostraron las mayores heredabilidades, mientras que 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ mostró el menor valor. En el resto de los tratamientos, el valor de heredabilidad fue homogéneo (0.4).

Las correlaciones genéticas tuvieron valores altos (>0.6) en aquellos casos en que la estimación fue significativa. Las estimaciones significativas además se concentraron en ambientes donde la inducción de defensas era conspicua (0.25 a 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$) (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Heredabilidad y correlaciones genéticas (en sentido amplio) del diente cervical, dentro del gradiente de kairomonas. En negrita se indican las estimaciones que fueron significativas.

$\mu\text{L mL}^{-1}$	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0	2.0
0.1	0.40 \pm	0.50 \pm	0.47 \pm	0.50 \pm	0.15 \pm	0.53 \pm
	0.119 ***	0.265	0.264	0.118	0.337	0.247
0.25		0.40 \pm	0.65 \pm	0.71 \pm	0.23 \pm	0.26 \pm
		0.117 ***	0.212 *	0.183 *	0.341	0.318
0.5			0.52 \pm	0.79 \pm	0.72 \pm	0.73 \pm
			0.120 **	0.134 **	0.192 *	0.164 *
0.75				0.55 \pm	0.24 \pm	0.74 \pm
				0.118 **	0.319	0.164
1.0					0.33 \pm	0.67 \pm
					0.116 **	0.206 *
2.0						0.40 \pm
						0.118 **

Significancia $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$

Tabla 2.4. Matriz G de los parámetros de la norma de reacción. En la diagonal están las heredabilidades en sentido amplio (H^2), sobre la diagonal las correlaciones genéticas. En negrita se indican las estimaciones que resultaron significativas.

	Asíntota	Umbral	Abruptez
Asíntota	0.71 \pm 0.121 *	-0.52 \pm 0.253	-1.00 \pm 0.755
Umbral		0.90 \pm 0.047 ***	1.00 \pm 0.901
Abruptez			0.11 \pm 0.212

Significancia $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$

En relación a los parámetros de la norma de reacción, dos de ellos (asíntota y umbral de inducción) presentaron heredabilidad significativa, con altos valores de heredabilidad (Tabla 2.4.). Tanto la heredabilidad de la abruptez como las correlaciones genéticas entre los parámetros, no resultaron significativas.

Discusión

La plasticidad fenotípica es un fenómeno ampliamente distribuido en la naturaleza, en este sentido las defensas inducidas representan un tipo de plasticidad que trasciende el nivel orgánico, afectando las interacciones ecológicas de las especies que la presentan, además de tener consecuencias en las trayectorias evolutivas de éstas. La especificidad de las defensas inducidas de una presa frente a un determinado depredador en términos microevolutivos nos dirige a dos diferentes líneas de argumentos. El primero es que: la aparición y mantención de este rasgo defensivo está condicionado a las presiones de selección impuestas por los depredadores. El segundo es que su evolución actual y futura está condicionada a la varianza genética presente en la población. En esta investigación nos centramos en el segundo argumento, entregando evidencias de la base genética de la plasticidad fenotípica de *Daphnia pulex* frente a su depredador *Chaoborus spp.*, a través de lo siguiente: (I) La norma de reacción es descrita por un modelo no-lineal (sigmoideo) (Fig. 1) y los parámetros de la norma de reacción varían entre los clones evaluados (Tabla 2.2); (II) El rasgo defensivo evaluado (*diente cervical*) presenta varianza genética dentro del gradiente de inducción; (III) Al menos dos de los parámetros que describen la norma de reacción de la defensa antidepredatoria muestran varianza genética distinta de cero. Estos resultados no solo indican que el rasgo defensivo

presenta capacidad de respuesta a la selección natural en cada ambiente, sino que además la norma de reacción como un rasgo frente al riesgo de depredación presenta potencial de respuesta evolutiva.

Norma de reacción

El alcance explicativo de la norma de reacción como descriptor de la plasticidad fenotípica recae en dos elementos: El primero se relaciona con el tipo de curva que explica mejor la plasticidad de un rasgo dentro de un gradiente ambiental (Kingsolver et al 2004; Pigliucci 2005); el segundo con la interpretación biológica de los parámetros que describen esta curva, los cuales pueden ser finalmente blanco de la selección natural (Gibert et al. 1998). Nuestros datos se ajustaron a una curva sigmoidea, en concordancia con anteriores resultados obtenidos con el mismo sistema depredador-presa (Hammil et al 2008). Los parámetros obtenidos a partir de la norma de reacción sigmoidea nos entregan relevante información biológica asociada con el patrón de plasticidad. Es así como, el valor umbral (0.234, ver tabla 2.1) refleja sobre qué concentración de kairomonas en que se desencadena la inducción de defensas en la población. En otras palabras, el valor umbral indica la “reactividad” de los organismos frente al estímulo. Así, podemos distinguir entre aquellos clones, tales como **Barney** o **Bummerboy**, que mostraron ser más sensible a la concentración de kairomonas y aquellos clones, como **Cletus**, que mostraron un umbral mayor (Tabla 2.2.). Por otro lado, el parámetro asintótico representa el mayor valor de inducción posible en presencia de kairomonas. Mientras **Cyril** mostró ser el clon con mayor inducción relativa (69.371), **Chardonnay** fue el clon con menor valor de inducción (44.717). Ambos parámetros son de suma importancia en torno a considerar los costos asociados con la plasticidad (De Witt et al 1998). Ya que la

sensibilidad (umbral) asociada a la inducción de defensas y magnitud de estas (Máxima inducción), pueden significar costos energéticos en la producción de estructuras que pueden afectar la adecuación biológica de los organismos que presentan estas defensas.

Heredabilidad y correlaciones genéticas de la inducción

La varianza y covarianza genética de rasgos con importancia ecológica determina la potencial respuesta microevolutiva de estos rasgos a la selección natural. En este escenario el cambio de rasgos defensivos sometidos a intensa selección (por ejemplo depredación) evolucionan solo en presencia de varianza genética. Nuestros resultados muestran heredabilidad *en sentido amplio* significativa y con un valor similar (Tabla 2.3) a lo largo del gradiente ambiental evaluado. Trabajos previos han evaluado la varianza genética en rasgos morfológicos y de historia de vida en cladóceros como *Daphnia* (Baer & Lynch 2003; Barata & Baird 1998; Deng & Lynch 1996; Pfrender & Lynch 2000; Platt & Spitze 2000; Scheiner & Yampolsky 1998; Weber & Declerck 1997). Sin embargo, este es el primer trabajo que documenta la existencia de varianza genética en uno de los rasgos más estudiados en este contexto: el diente cervical en *Dania*. La presencia de varianza genética en este rasgo mostraría que la inducción es un rasgo que puede estar respondiendo a la selección natural en condiciones naturales. Por otro lado, la varianza genética estimada en condiciones controladas suele variar, especialmente cuando son afectadas las medias de los rasgos evaluados y los gradientes ambientales varían en calidad (Charmantier & Garant 2005; Hoffman & Mëriila 1999). Sin embargo, la varianza genética de las defensas parecen mantenerse constante dentro del gradiente de riesgo de depredación evaluado (Tabla 2.3.). Dado que el mismo

rasgo medido en dos ambientes puede ser considerado como dos rasgos que están genéticamente correlacionados y a su vez ser una medida de la plasticidad (Falconer 1952), nosotros estimamos las correlaciones genéticas entre todos los ambientes en que el rasgo defensivo se expresó. Nuestros resultados muestran valores significativos en la mayoría de los pares de rasgos que estaban en el medio del gradiente, es decir, en torno a la zona umbral de reactividad de la población de *D. pulex* frente a las kairomonas de *Chaoborus spp.* (Tabla 2.3.; Fig. 1). Estas correlaciones nos indican las restricciones sobre las cuales estaría condicionada la plasticidad de estos rasgos (Scheiner & Lyman 1989). Sin embargo, dado que nuestro diseño experimental no permitió determinar la interacción genotipo-ambiente, el alcance explicativo de las correlaciones es limitado (Roff 1997, Pigliucci 2005). Por tanto, nuestros resultados deben ser interpretados como un indicio de la existencia de varianza genética de la plasticidad, al menos desde la perspectiva del estado del carácter.

Varianza genética de la plasticidad

Gran parte de las estimaciones de varianza genética asociada a respuestas plásticas se han realizado considerando la norma de reacción como una respuesta lineal en dos ambientes (ver Nussey et al 2007; Pigliucci 2005). Estas aproximaciones centran el estudio en la elevación y magnitud de la plasticidad. Eventualmente también son evaluadas las correlaciones entre estos parámetros para determinar restricciones al cambio de la plasticidad, si es que estos parámetros fueran blanco de la selección natural (Gomulkiewicz & Kirkpatrick 1992). Considerando una norma de reacción no-lineal y usando una aproximación análoga a Scheiner y Lyman (1989), nosotros estimamos la matriz de varianza y covarianza

genética (Matriz G) sobre los parámetros plásticos (Tabla 2.4.). El parámetro asintótico que representa la máxima inducción, mostró tener heredabilidad significativa (Tabla 2.4), indicando la existencia de varianza genética disponible para que la selección natural genere un cambio en el valor máximo del rasgo defensivo. El parámetro umbral, que representa la concentración de kairomona sobre la cual los organismos desencadenan la inducción, también presentó heredabilidad significativa (Tabla 2.4.). Esto indica que existe varianza genética disponible para que la selección natural genere cambios en la reactividad de los individuos frente a la existencia de riesgo de depredación. Por otro lado Hammil y colaboradores (2008), planteaban que el hecho de que el alto umbral de inducción (y su equivalencia en densidad) en relación a las condiciones naturales sea un rasgo ancestral de defensa en *D. pulex*. Nosotros estamos en desacuerdo con esta hipótesis, ya que la media de los rasgos en organismos con partenogénesis cíclica (con eventos punteados de sexualidad) tales como las *Daphnias* pueden alejarse de las medias esperadas dadas las condiciones naturales donde habitan, pudiendo llevar a la conclusión de que son rasgos maladaptativos. Sin embargo, este fenómeno llamado deslizamiento genético o “*genetic slippage*” (Prefender & Lynch 2000) explica que el valor de los rasgos son afectados fuertemente por la alta diversidad genética en el comienzo de la estación (previo a la selección clonal) y en este escenario la media de los rasgos suele no correlacionarse directamente con las condiciones selectivas del medio que habitan estos organismos. Finalmente, el hecho de que las correlaciones no sean significativas nos dice mucho acerca del potencial microevolutivo de estos rasgos plásticos (Scheiner 2002, Nussey et al 2007), ya que la no existencia de estas correlaciones implica que los parámetros

de la norma de reacción pueden responder sin restricción a la selección natural mediada por los depredadores.

En este estudio hemos primero descrito la plasticidad de un rasgo morfológico en *D. pulex*, como una respuesta no-lineal al riesgo de depredación. Segundo, se evaluó y verificó la existencia de variación genética, tanto en el rasgo defensivo en sí mismo como en su plasticidad. La estimación de los parámetros que describen la plasticidad permitió identificar posibles trayectorias y restricciones para la norma de reacción de una defensa inducida en *Daphnia pulex*. La existencia de variación genética indica que la inducción de defensa como rasgo y como respuesta plástica, puede estar respondiendo a la selección natural impuesta por los depredadores, ya sea en la magnitud máxima del rasgo inducido como en su reactividad a la concentración de señales de depredadores.

Referencias

- Baer C.F. y Lynch M. (2003) Correlated evolution of life-history with size at maturity in *Daphnia pulicaria*: patterns within and between populations. *Genetics Research* 81: 123-132.
- Barata C. y Baird D.J. (1998) Phenotypic plasticity and constancy of life-history traits in laboratory clones of *Daphnia magna* Straus: effects of neonatal length. *Functional Ecology* 12: 442-452.
- Beaton M. J. y Hebert P. D. N. (1997) The cellular basis of divergent head morphologies in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* 42: 346-356.
- Bradshaw A.D. (1965) Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in genetics* 13: 115-155.

- Boldman K. G., Kriese L. A., Van Vleck L. D., Van Tassell C. P., y Kachman S. D. (1995) A manual for use of MTDFREML. A set of programs to obtain estimates of variances and covariances. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service., Lincoln.
- Carter M.J., Vega-Retter C. y Ramos-Jiliberto R. (2008) Non-lethal effects of invertebrate predators on *Daphnia*: morphological and life-history consequences of water mite kairomone. *Freshwater Biology* 53: 1857-1867.
- Çelik K., Schindler J.E., Foris W.J. y Knight J.C. (2002) Predator-mediated coexistence of exotic and native crustaceans in a freshwater lake? *Biological Invasions* 4: 451-454.
- Charmantier A. y Garant D. (2005) Environmental quality and evolutionary potential: lessons from wild populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272: 1415-1425.
- De Jong G. (1990) Quantitative genetics of reaction norms. *Journal of Evolutionary Biology* 3: 447-468.
- Deng H. W. y Lynch M. (1996) Change in genetic architecture in response to sex. *Genetics* 143: 203-212.
- Dicke M. y Sabelis M. W. (1988) Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Functional Ecology* 2: 131-139.
- Dodson S.I. (1989) Predator-induced reaction norms. *Bioscience* 39: 447-452.
- Eshel I., y C. Matessi (1998) Canalization, genetic assimilation and preadaptation: a quantitative genetic model. *Genetics* 149: 2119-2133.

- Falconer D. S. (1952) The Problem of Environment and Selection. *The American Naturalist* 86: 293-298.
- Fisher R.A. (1930) The genetical Theory of Natural Selection. Oxford University Press, London. A complete variorum edition, 1999.
- Gibert P., Moreteau B., David J.R. y Scheiner S.M. (1998) Describing the evolution of reaction norm shape: body pigmentation in *Drosophila*. *Evolution* 52: 1501-1506.
- Gomulkiewicz R. y Kirkpatrick M. (1992) Quantitative genetics and the evolution of reaction norms. *Evolution* 46: 390-411.
- Gotthard K. y Nylin S. (1995) Adaptive plasticity and plasticity as an adaptation: a selective review of plasticity in animal morphology and life-history. *Oikos* 74: 3-17.
- Hammil E., Rogers A. y Beckerman A.P. (2008) Costs, benefits and the evolution of inducible defences: a casestudy with *Daphnia pulex*. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 705-715.
- Havel J.E. (1985) Cyclomorphosis of *Daphnia pulex* spined morphs. *Limnology and Oceanography* 30: 853-861.
- Havel J.E. y Dodson S.I. (1984) Chaoborus predation on typical and spined morphs of *Daphnia pulex*: behavioral observations. *Limnology and Oceanography* 29: 487-494.
- Havens K.E. (1990) Chaoborus predation and zooplankton community structure in a rotifer-dominated lake. *Hidrobiologia* 198: 215-226.
- Hoffmann A.A. y Merilä J. (1999) Heritable variation and evolution under favourable and unfavourable conditions. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 96-101.
- Kingsolver J.G., Gregory J.R. y Schillichta J.G. (2004) Quantitative genetics of

- continuous reaction norms: Thermal sensitivity of caterpillar growth rates. *Evolution*, 58: 1521-1529.
- Kirkpatrick M., Lofsvold D. y Bulmer M. (1990) Analysis of the inheritance, selection, and evolution of growth trajectories. *Genetics* 124: 979-993.
- Kirkpatrick M. y Heckman N. (1989) A quantitative genetic model for growth, shape, reaction norms, and other infinite-dimensional characters. *Journal of Mathematical Biology*. 27: 429-450.
- Krueger D.A. y Dodson S.I. (1981) Embryological induction and predation ecology in *Daphnia pulex*. *Limnology and Oceanography* 26:219-223.
- Laforsh C. y Tollrian R. (2004) Extreme helmet formation in *Daphnia cucullata* induced by small-scale turbulence. *Journal of Plankton Research* 26:81-87.
- Larsson, P. y Dodson, S. (1993) Chemical communication in planktonic animals. *Archiv für Hydrobiologi* 129: 129-155.
- Lass S. y Spaak P. (2003) Chemically induced antipredator defences in plankton: a review. *Hydrobiologia* 491: 221-239.
- Leuk, C. y Litt, A.H. (1987) Effects of predation by *Chaoborus flavicans* on crustacean zooplankton of Lake Lenore, Washington. *Freshwater Biology* 18: 185-192.
- Lynch M. y Walsh J. B. (1998) *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Miner B.G., Sultan S.E., Morgan S.G., Padilla D.K. y Relyea R.A. (2005) Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution*, 20: 685-692.
- Mort M. (1986) *Chaoborus* predation and the function of phenotypic variation in

Daphnia. *Hydrobiologia* 133: 39-44.

Nussey D.H., Wilson A.J. y Brommer J.E. (2007) The evolutionary ecology of individual phenotypic plasticity in wild populations. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 831-844.

Parejko K. y Dodson S.I. (1991) The evolutionary ecology of an antipredator reaction norm: *Daphnia pulex* and *Chaoborus americanus*. *Evolution* 45: 1665-1674.

Persaud A.D. y Yan N.D. (2001) Accounting for spatial variability in the design of sampling programmes for *Chaoborus* larvae. *Journal of Plankton Research* 23: 279-285.

Pigliucci M. (2005) Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology and Evolution* 20: 481-486.

Pijanowska J (1990) Cyclomorphosis in *Daphnia*: an adaptation to avoid invertebrate predation. *Hydrobiologia* 198:41-50

Pfrender M.E. y Lynch M. (2000) Quantitative genetic variation in *Daphnia*: Temporal changes in genetic architecture. *Evolution* 54: 1502-1509.

Pinhero J.C. y Bates D.M. (2000) *Mixed Effects Models in S and S-PLUS*. Springer, New York.

Platt T. y Spitze K. (2000) Genetic variation in a subtropical population of *Daphnia*. *Hydrobiologia* 435: 191-196.

Postma E. y van Noordwijk (2005) Genetic variation for clutch size in natural populations of birds from a reaction norm perspective. *Ecology* 86: 2344-2357.

Roff D. A. (1997) *Evolutionary quantitative genetics*. Chapman and Hall, New York.

Roff D. (2002) Comparing G matrices: A manova approach. *Evolution* 56: 1286-

1291.

Sell A.F. (2000) Morphological defenses induced in situ by the invertebrate predator Chaoborus: comparison of responses between *Daphnia pulex* and *D. rosea*. *Oecologia* 125: 150-160.

Scheiner S. M. (1993) Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 35-68.

Scheiner, S. M. (2002) Selection experiments and the study of phenotypic plasticity. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 889-898.

Scheiner S. M., y Goodnight C. J. (1984) The comparison of phenotypic plasticity and genetic variation in populations of the grass *Dunrhoni* spicuru. *Evolution* 38: 845-855.

Scheiner S. M., y Lyman. R. F. (1991) The genetics of phenotypic plasticity. II. Response to selection. *Journal of Evolutionary Biology* 4: 23-50.

Scheiner S. y Yampolsky L.Y. (1998) The evolution of *Daphnia pulex* in a temporally varying Environment. *Genetics Research* 72: 25-37.

Schlichting C. D. y Pigliucci M. (1998) Phenotypic evolution: a reaction norm perspective. Sinauer, Sunderland, Mass.

Spitze K. (1992) Predator-mediated plasticity of prey life history and morphology: Chaoborus americanus predation on *Daphnia pulex*. *The American Naturalist* 139: 229-247.

Spitze K. y Sadler T.D. (1996) Evolution of a generalist genotype: Multivariate analysis of the adaptiveness of phenotypes plasticity. *The American Naturalist* 148: 108-123.

Stearns S., de Jong G. y Newman B. (1991) The Effects of Phenotypic Plasticity on

- Genetic Correlations. *Trends in Ecology and Evolution* 6: 122-126.
- Stibor H. y Lampert W. (2000) Components of additive variance in life-history traits of *Daphnia hyalina*: seasonal differences in the response to predator signals. *Oikos* 88: 129-138.
- Stirling G. y Roff D. (2000) Behaviour plasticity without learning: phenotypic and genetic variation of naive *Daphnia* in an ecological trade-off. *Animal behaviour* 59: 929-941.
- Tollrian R. (1990) Predator-induced helmet formation in *Daphnia cucullata* (Sars). *Archiv für Hydrobiologie* 119: 191-196.
- Tollrian, R. (1994) Fish-kairomone induced morphological changes in *Daphnia lumholtzi* (Sars). *Archiv für Hydrobiologie* 130: 69-75.
- Tollrian R. (1995) Predator-induced morphological defenses-costs, life-history shifts, and maternal effects in *Daphnia pulex*. *Ecology* 76: 1691-1705.
- Tollrian R. y Dodson S.I. (1998) Inducible defenses in cladocera: constraints, costs, and multipredator environments. In: *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses* (Eds R. Tollrian & C.D. Harvell), pp. 177-202. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Via S. (1984) The quantitative genetics of polyphagy in an insect herbivore. II. Genetic correlations in larval performance within and among host plants. *Evolution* 38: 896-905.
- Via S., Gomulkiewicz R., De Jong G., Scheiner S.M., Schlichting C.D. y van Tienderen P.H. (1995). Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 212-217.

van Tienderen P. H. (1991) Evolution of generalists and specialists in spatially heterogeneous environments. *Evolution* 45:1317-1331.

Van Tienderen P.H. y Koelewijn H.P. (1994) Selection on reaction norms, genetic correlations and constraints. *Genetics Research* 64: 115-125.

Weber A. y Declerck S. (1997) Phenotypic plasticity of *Daphnia* life history traits in response to predator kairomones: genetic variability and evolutionary potential. *Hydrobiologia* 360: 89-99.

Weber A., Vesela S. y Repka S. (2003) The supposed lack of trade-off among *Daphnia galeata* life history traits is explained by increased adult mortality in *Chaoborus* conditioned treatments *Hydrobiologia* 491: 273-287.

Xie P., Iwakuma, T. y Fujii K. (1998) Studies on the biology of *Chaoborus flavicans* (Meigen) (Diptera: Chaoboridae) in a fishfree eutrophic pond, Japan. *Hydrobiologia* 368: 83-90.

Yan N.D., Nero R.W., Keller W. y Lasenby D.C. (1985) Are *Chaoborus* larvae more abundant in acidified than in nonacidified lakes in central Canada? *Holarctic Ecology* 8: 93-99.

Young H.P. y Riessen J.D. (2005) *Daphnia* defense strategies in fishless lakes and ponds: one size does not fit all. *Journal of Plankton Research* 27: 531-544.

Capítulo III

Integración fenotípica y constancia de la matriz **G** de *Daphnia pulex* en un gradiente de riesgo de depredación

Resumen

En general los organismos responden a la heterogeneidad ambiental cambiando un conjunto de caracteres, los cuales confluyen en maximizar la adecuación biológica en cada ambiente. Así, el estudio de fenotipos integrados es relevante para estimar costos de la plasticidad, y eventualmente límites y restricciones al cambio evolutivo. Una serie de hipótesis se sostienen en torno del efecto estresante del ambiente sobre la integración fenotípica (INT) y la matriz varianza y co-varianza genética (matriz **G**) de estos rasgos en la naturaleza. *Daphnia pulex* se caracteriza por desarrollar conspicuas defensas antidepredatorias en otros rasgos morfológicas y de historia de vida. Aquí se considera el estrés impuesto por el gradiente de riesgo de depredación sobre un conjunto de rasgos en *D. pulex*. Pese a la extensión del gradiente experimental utilizado y la clara respuesta de todos los rasgos evaluados, la INT de rasgos morfológicos asociados a la defensa y rasgos de historia de vida no parece cambiar en respuesta al gradiente impuesto. De la misma forma la matriz **G** también parece ser insensible al gradiente ambiental, aunque varios componentes de ésta matriz **G** mostraron ser significativos, por lo que se puede esperar que respondan a la selección natural por depredación. Por un lado nuestros resultados rechazan la hipótesis de aumento de integración fenotípico en un gradiente ambiental asociado al estrés, y aunque la matriz **G** tiene potencial para responder a la selección natural ésta es relativamente estable a la heterogeneidad ambiental.

Palabras claves: Integración fenotípica, matriz G, gradiente de riesgo de depredación, genética cuantitativa

Introducción

Frente a las dinámicas condiciones ambientales que enfrentan los organismos en la naturaleza, éstos suelen generar estrategias fenotípicas que maximizan su adecuación biológica, siendo éstas la expresión de un conjunto de rasgos que actúan de manera simultánea. Pese a la aceptación generalizada de que diferentes rasgos responden de manera coordinada a estímulos ambientales, la mayoría de las aproximaciones al estudio de plasticidad se han centrado en no más de un rasgo a la vez (Merilä & Björklund 2004; Pigliucci 2005; Relya 2004), produciendo una serie de modelos para la evolución de la plasticidad fenotípica limitados a un rasgo en particular (Via & Lande 1985; van Tienderen 1991; Gomulkiewicz & Kirkpatrick 1992; Scheiner 1993). Actualmente, existe creciente interés por examinar rasgos múltiples y determinar cómo éstos interactúan, generando fenotipos integrados (Pigliucci & Preston 2004).

El concepto de integración fenotípica no es nuevo. Tempranamente, Olson y Miller (1958) se referían al patrón y magnitud de covariación dentro de un determinado arreglo de rasgos, mientras Berg (1960) planteaba hipótesis específicas sobre las cuales la integración de rasgos puede o no ser favorecida. Actualmente, existe un considerable progreso teórico, metodológico y conceptual en torno al estudio de la integración fenotípica (Arnold 1992, Arnold et al 2001; Cheverud 1996; Schlichting & Pigliucci 1998; Stepan et al 2002; Wagner 1984). Sin embargo, aún no es claro cómo las restricciones evolutivas y la selección natural afectan los patrones de integración de múltiples rasgos.

Los patrones de varianza y covarianza entre rasgos reflejan el grado de integración que existe en determinados fenotipos. La importancia de conocer los patrones de integración fenotípica radica en que éstos pueden ejercer fuertes restricciones a la tasa y dirección del cambio evolutivo (Arnold 1992; Björklund 1996; Schluter 1996). Este patrón de restricciones puede ejercer sus efectos desde dos vertientes: (a) a través de la existencia de baja varianza genética, o por medio de compromisos genéticos entre componentes de la adecuación biológica. En genética cuantitativa, estas restricciones son resumidas en la matriz de varianza y covarianza genética (Matriz **G**). Esta matriz, que exhibe las varianzas genéticas sobre la diagonal y las covarianzas genéticas fuera de la diagonal (Lynch & Walsh 1998), es el elemento central del modelo del cambio evolutivo propuesto por Lande (1979). Es así como la estabilidad o sensibilidad a escala ecológica y evolutiva de la Matriz **G**, ha sido una problemática central de la biología evolutiva de la última década, básicamente porque representa un puente entre los procesos micro y macro evolutivos (Arnold et al 2008; Stepan et al 2002).

Existen tres niveles de problema sobre los cuales la estabilidad de la matriz **G** es relevante: (i) Cómo las poblaciones responden a ambientes fluctuantes (variación en el paisaje adaptativo), (ii) cómo la selección afecta las medias fenotípicas produciendo cambios en la matriz **G** (Lande 1979), y (iii) cómo la matriz **G** puede ser usada para reconstruir los patrones históricos de selección, probando la deriva como modelo nulo de la diferenciación (Lande 1979; Jones et al 2003; Hohenlohe & Arnold 2008). En este trabajo se profundiza en la primera aproximación sobre el estudio de la matriz **G**. De esta manera, la evaluación de la sensibilidad de la Matriz **G** a cambios ambientales permitiría determinar si los patrones de integración

fenotípica exhiben variación en función de las condiciones ambientales que enfrentan los organismos.

La selección natural favorecerá la evolución de la plasticidad fenotípica siempre que ésta se traduzca en beneficios para la adecuación biológica de los organismos que la presentan (Scheiner 1993). En este sentido, las interacciones ecológicas tales como la polinización, depredación o parasitismo se constituyen como excelentes ejemplos de este fenómeno, en donde la aparición y mantención de un determinado rasgo plástico está condicionado a la interacción entre organismos. Por ejemplo, considerando la interacción polinizador-planta, Berg (1960) propone que la selección debiera favorecer dos elementos en torno a los patrones de varianza y covarianza de una planta: (i) un incremento en la integración fenotípica de plantas con una estrecha interacción con sus polinizadores, y (ii) un desacoplamiento de los rasgos vegetativos asociados a la polinización. Es plausible esperar que este patrón opere en otros modelos biológicos sujetos a presiones coevolutivas, tales como la interacción depredador-presa. En este tipo de sistemas, la generación de un fenotipo defensivo por parte de la presa está estrechamente relacionado con el tipo de depredador (Tollrian & Harvell 1998), y se podría esperar que los arreglos de rasgos defensivos estén altamente correlacionados entre sí, en comparación a otros rasgos que no estén directamente asociados con la defensa.

La aparición, mantención y evolución de las defensas inducidas se explican por la presión selectiva que ejercen los depredadores sobre las presas en ambientes variables (Agrawal 2001), sujeto a que existan señales que permitan desencadenar respuestas plásticas específicas, y costos asociados a la exhibición de los rasgos defensivos (Relyea 2002). Dos razones pueden conducir a que organismos que

presentan inducción de defensas muestren integración fenotípica en sus rasgos. Entonces la integración puede ser promovida a medida que las señales ambientales indiquen que la interacción con el depredador se acrecientan, permitiendo la producción de fenotipos defensivos eficientes (Lafors & Tollrian 2004). Además, el aumento de las señales del depredador significa una condición de estrés, que implica reasignación de recursos asociados a generar las estrategias defensivas (Schlichting 1989).

Daphnia pulex es uno de aquellos modelos biológicos que han sido extensamente estudiados en torno a su capacidad de generar defensas frente a señales químicas de sus depredadores (Tollrian & Dodson 1998). Este cladócer, habitante de aguas someras continentales, se caracteriza por exhibir defensas morfológicas conspicuas para enfrentar la depredación de la larva de mosquito *Chaoborus spp.*. Tales defensas son desarrolladas en presencia directa del depredador, o de señales químicas asociadas a éste (Agrawal et al 1999). En este trabajo utilizamos *D. pulex* como modelo de estudio, a fin de dilucidar si el nivel de integración fenotípica puede variar con la magnitud del riesgo de depredación. Específicamente, nuestros objetivos son evaluar si: (i) El conjunto de rasgos evaluados presentan variación en su integración fenotípica dentro de un gradiente de riesgo de depredación, (ii) los rasgos asociados más directamente con las defensas presentan mayor grado de integración fenotípica, y (iii) las matrices fenotípicas (**P**) y matrices genéticas (**G**) evidencian diferencias dentro del gradiente ambiental evaluado.

Materiales y métodos

Para una descripción de los métodos y procedimientos relacionados con el modelo de estudio, la identificación de clones, el cultivo experimental y los rasgos medidos, consúltese Materiales y Métodos Generales (Pagina 6-12).

Índice de integración

El índice de integración (INT) para *Daphnia pulex* fue calculado en los siete tratamiento experimentales de riesgo de depredación. La estimación del índice se realizó a partir de la varianza de los autovalores de la matriz de correlación fenotípica (Wagner 1984; Cheverud et al 1989). Este índice fue corregido por los diferentes tamaños de muestrales por medio de la sustracción del valor integrado esperado al azar ($T-1/N$), de acuerdo con el modelo de pleiotropía al azar (Wagner 1984), donde T es el número de rasgos y N es el número de individuos medidos. Se calcularon índices parciales de integración para rasgos morfológicos de defensa (cuatro rasgos), y para rasgos de historia de vida (tres rasgos). La significancia estadística de las estimaciones de INT se realizó mediante dos procedimientos de aleatorización alternativos. Primero, se permutaron los valores de rasgos entre los individuos de cada tratamiento, calculando para cada aleatorización una nueva matriz de correlaciones y su correspondiente INT. Segundo, se construyeron intervalos de confianza del 95% para los INT, a través de un remuestreo con reposición (bootstrap, 5000 aleatorizaciones) de los individuos con sus respectivos valores de rasgos, y posterior construcción de las respectivas matrices de correlación aleatorias. Estos intervalos de confianza permitieron además comparar los INT entre tratamientos experimentales. Estos procedimientos fueron implementados en códigos MATLAB (R2007a).

Matriz de varianza y covarianza

El diseño de líneas clonales con los rasgos de interés evaluados en la progenie, permite la obtención, a partir de la matriz de varianza y covarianza fenotípica (**F**), y la matriz de varianza y covarianza genética (**G**) en *sentido amplio*, y de la matriz de varianza y covarianza ambiental específica o varianza residual (**E**) (Lynch & Walsh 1998). Para estimar los componentes de variación fenotípica se usó el modelo animal Programa MTDFREML), que consiste en un método de máxima verosimilitud restringida (Boldman et al 1995). Este procedimiento iterativo se llevo a cabo hasta que las diferencias en las sucesivas verosimilitudes fueron menores a 0.00001 para cada componente estimado. Para cada varianza y covarianza, el análisis iterativo consistió en estimar el modelo completo a partir de valores semillas ($V_G=0.5; V_E=0.5; R_G=0.1$), hasta obtener el máximo global de máxima verosimilitud. La significancia estadística de los componentes de **G** fueron determinados a través de una prueba de razones de similitudes (LRT), donde el χ^2 es elegido considerando los grados de libertad que en este caso corresponden al número de elementos restringidos del modelo inicial (g.l.= .1; $\chi^2_{crit}= 3.841$). Las covarianzas y correlaciones genéticas fueron estimadas de manera similar, pero incluyendo los pares de rasgos en una versión multivariada del programa Animal Model (Boldman et al. 1995). Además se presentan los errores estándar asintóticos, los cuales deben ser considerados aproximaciones basadas en grandes tamaños muestrales.

Comparaciones de matrices de varianza y covarianza

La comparación de matrices fenotípicas y genéticas de *Daphnia pulex* para los siete tratamientos experimentales se llevo a cabo por medio de dos aproximaciones: Análisis de varianza multivariado (MANOVA) con Jackknife y el

método Jerárquico de Flury. El MANOVA-Jackknife desarrollado por Roff (2002, 2006) usa el procedimiento de Jackknife para producir una distribución de pseudovalores a partir de la matriz de elementos (rasgos) dentro de cada nivel experimental). Estos pseudovalores son producidos a través de la sustracción de una línea clonal a la vez (Roff 2006). El método jerárquico de Flury (1988) consiste en un procedimiento de comparación de matrices a través de la generación de componentes principales, cuya aplicación sobre la comparación de matrices G fue desarrollada por Phillips y Arnold (1999). El método se basa en comparar la máxima verosimilitud de dos o más matrices a partir de comparaciones jerárquicas de sus estructuras. La prueba considera la siguiente progresión (1) estructura no relacionada, indicando que las matrices no comparten ningún autovector, (2) componentes principales parcialmente comunes, indicando que la matrices comparten algún autovector, (3) componentes principales comunes, indicando que las matrices comparten todos los autovectores, pero no los autovalores, (4) proporcionalidad, indicando que las matrices comparten todos los autovectores y los autovalores difieren de manera constante, y (5) igualdad, indicando que las matrices comparten todos los autovectores y autovalores. Un LRT es calculado para cada modelo contra el modelo “estructuralmente no relacionado” (aproximación “jump-up”, ver Phillips & Arnold 1999; Stepan et al 2002). Se realizaron 5000 randomizaciones, donde en cada iteración un linaje fue asignado al azar. Para realizar las comparaciones de las matrices G y P a través de las pruebas jerárquicas de Flury, se usó el programa CPCrand (Phillips & Arnold 1999).

Resultados

Integración fenotípica

Los rasgos evaluados dentro del gradiente de concentración de kairomonas presentaron índices de integración fenotípica (INT) significativos, ya sea cuando fueron agrupados en morfológicos asociados a la inducción, o cuando la estimación sólo consideró los rasgos de historia de vida (Fig. 3.1.). Cuando sólo los rasgos morfológicos fueron considerados, la magnitud del INT fluctuó entre 0.108 y 0.297, equivalente a una variación en la integración fenotípica de 2.72 a 7.42% de un máximo posible de integración ($INT_{\max} = 4$). Cuando la estimación se realizó considerando los rasgos de historia de vida, la magnitud de INT fluctuó entre 0.947 y 1.217, equivalente a una variación de 31.57 a 40.59% de un máximo posible de integración ($INT_{\max} = 3$). La sobreposición de los intervalos de confianza entre los INT evaluados en cada tratamiento indica que no existieron diferencias significativas en la magnitud de la integración dentro del gradiente experimental, tanto para los rasgos morfológicos como para los de historia de vida.

Matriz de varianza y covarianza

La heredabilidad en sentido amplio (H^2) para todos los rasgos fue significativa en al menos un nivel experimental a lo largo del gradiente de riesgo de depredación evaluado, aunque en muchos casos éstas variaron entre tratamientos para el mismo rasgo (Fig 3.2). Las variaciones en las H^2 significativas no parecen relacionarse con el gradiente ambiental evaluado. Para los rasgos morfológicos, se encontraron H^2 significativas en la mayoría de los tratamientos en los rasgos tamaño en la máxima inducción (TMI), longitud de la espina caudal (EC), ángulo espina-cuerpo (AMI) y diente cervical (NT) (Fig. 3.2). Para los rasgos de historia de vida el

patrón fue similar, ya que fueron encontradas H^2 significativas en el número de huevos (NH) y tamaño en la primera reproducción (TPR) (Fig. 3.2). En general, las correlaciones genéticas en sentido amplio (R^2) significativas fueron altas (>0.5) y mantuvieron su signo dentro del gradiente evaluado (Fig. 3.2.). Las R^2 negativas fueron encontraron en los parámetros TMI/AMI, EC/TPR (en todos los tratamientos), EC/NH, y AMI/NT. Mientras que las R^2 positivas se encontraron en los parámetros NH/TPR, NH/NT, y TMI/NH (Fig. 3.2). Además, parece existir una transición estructural de las R^2 entre los tres niveles más bajos de concentración de kairomonas (0, 0.1 y 0.25, Fig. 3.2), mientras que en los siguientes tres niveles (0.5, 0.75 y 1, Fig. 3.2) la estructura de R^2 se mantiene constante y difiere en al menos una R^2 con los tres primeros niveles experimentales. Finalmente el tratamiento con mayor concentración de kairomonas presentó una estructura visualmente diferente, en relación a los otros niveles experimentales. La magnitud y signo de las correlaciones genéticas para todos los rasgos mostraron estar estrechamente asociadas a las correlaciones fenotípicas. Este patrón muestra el grado de correspondencia de la estructura de correlaciones genéticas sobre la estructura de correlaciones fenotípicas. Además, este patrón parece no ser afectado por el gradiente experimental de kairomonas.

Comparaciones de matrices de varianza y covarianza

Las comparaciones de matrices **P** mostraron ser significativamente diferentes usando MANOVA Jackknife (Wilk's $\lambda = 0.63$, $F_{168,6386} = 3.04$, $P < 0.001$). Sin embargo, no fueron significativas las comparaciones de matrices **G** a través del gradiente de riesgo de depredación (Wilk's $\lambda = 0.11$, $F_{168,288} = 0.72$, $P = 0.99$). La comparación de matrices usando la aproximación de Flury y el procedimiento

“jump-up” mostró una compleja red de diferencias entre las matrices cuando se efectuaron comparaciones pareadas (Tabla 3.1). Las comparaciones pareadas de matrices **G** muestran en general que las matrices no se diferencian en su estructura (Tabla 3.1.). Varias parejas de matrices mostraron no tener ninguna similitud estructural, mientras algunas se diferenciaron significativamente en al menos uno de sus componentes principales (Tabla 3.1). Las comparaciones pareadas de matrices **F** mostraron un patrón claro, ya que las mayores diferencias se visualizan en comparaciones extremas. En comparaciones de tratamientos más cercanos dentro gradiente de kairomonas, las diferencias son sólo en sus componentes principales, el cual corresponde a un menor nivel jerárquico de diferencias según el modelo de comparación de Flury. Sólo la comparación 0.1 con 0.25 resultó no ser significativamente diferente (Tabla 3.1).

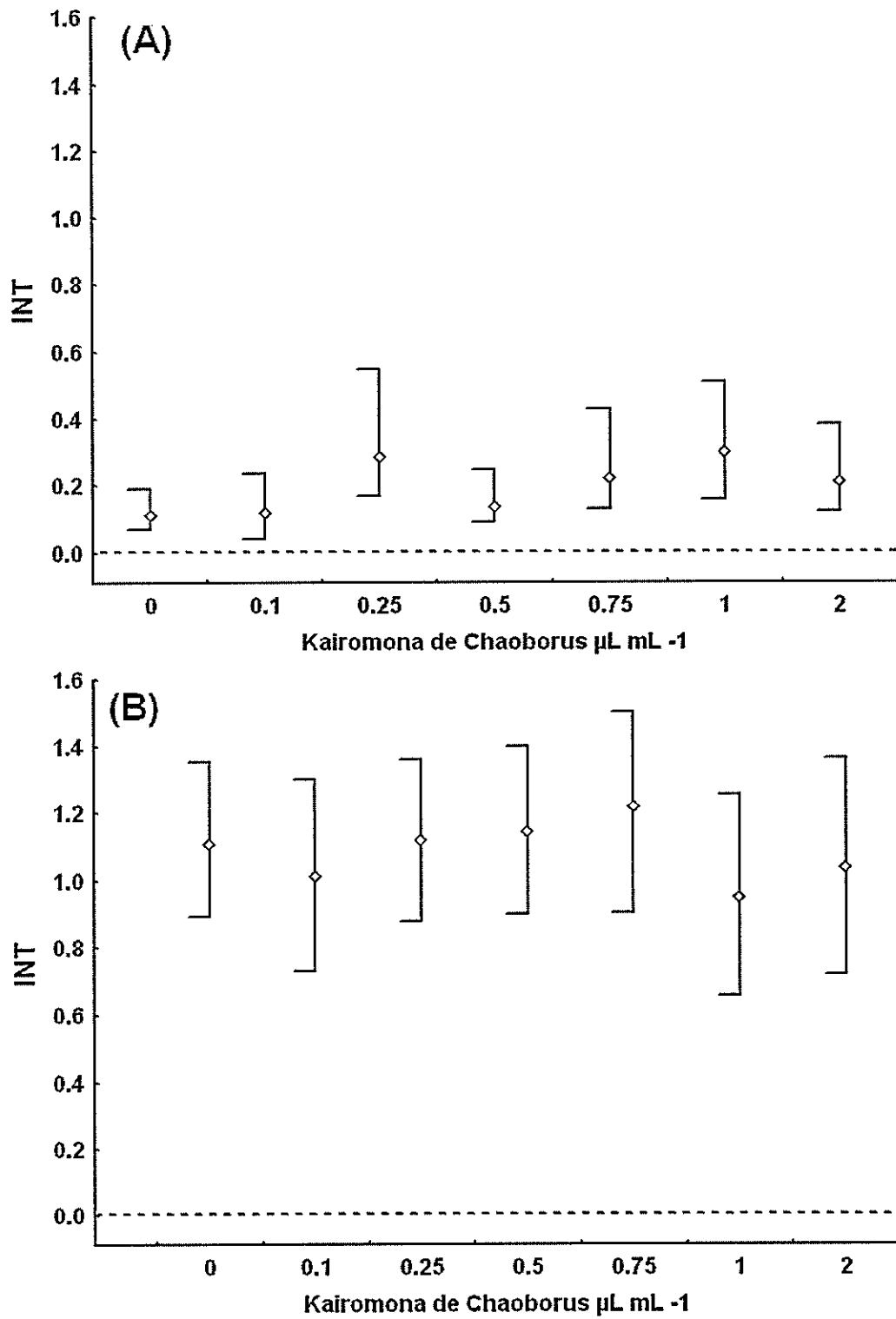


Figura 3.1. Índice de integración fenotípica (INT) para rasgos morfológicos (A) y de historia de vida (B). Las barras de error indican intervalos de confianza de 95%.

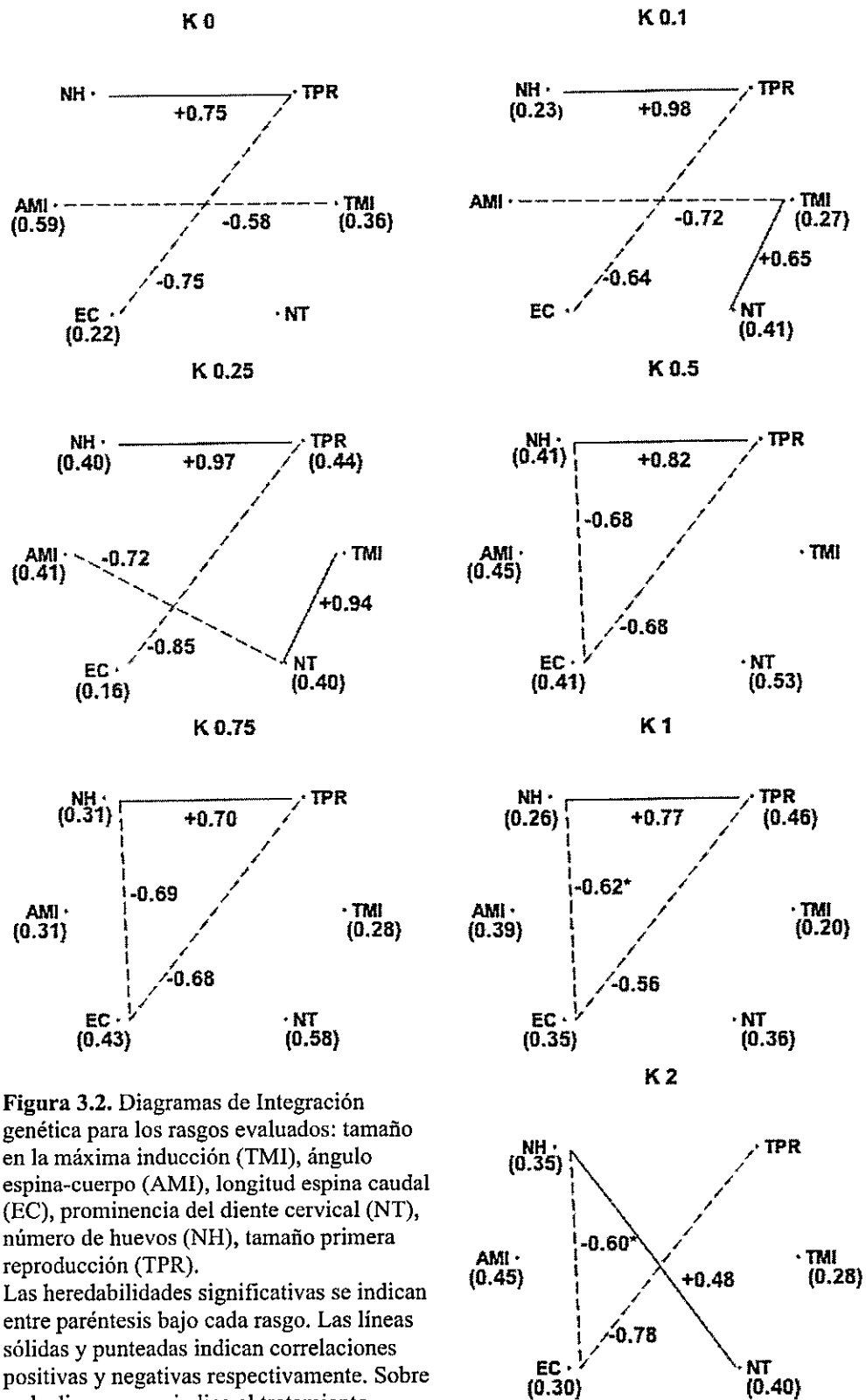


Figura 3.2. Diagramas de Integración genética para los rasgos evaluados: tamaño en la máxima inducción (TMI), ángulo espina-cuerpo (AMI), longitud espina caudal (EC), prominencia del diente cervical (NT), número de huevos (NH), tamaño primera reproducción (TPR). Las heredabilidades significativas se indican entre paréntesis bajo cada rasgo. Las líneas sólidas y punteadas indican correlaciones positivas y negativas respectivamente. Sobre cada diagrama se indica el tratamiento experimental.

Tabla 3.1. Comparaciones pareadas usando la prueba jerárquica de Flury para las matrices G a lo largo del gradiente. El orden de diferenciación es: no relación (NR), componentes principales parcialmente comunes (CPC(#)), componentes principales comunes (CPC (C)), proporcionalidad entre matrices (no hubo casos.) y matrices iguales (Igual).

Matriz G	0.1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ [K]	0.25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ [K]	0.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ [K]	0.75 $\mu\text{L mL}^{-1}$ [K]	1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ [K]	2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ [K]
0	NR	NR	NR	CPC (C)	Igual	Igual
0.1		Igual	Igual	NR	Igual	CPC (1)
0.25			Igual	NR	NR	NR
0.5				Igual	Igual	Igual
0.75					Igual	Igual
1						Igual
Matriz F	0.1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ [K]	0.25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ [K]	0.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ [K]	0.75 $\mu\text{L mL}^{-1}$ [K]	1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ [K]	2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ [K]
0	CPC (C)	NR	NR	NR	NR	NR
0.1		Igual	NR	NR	NR	NR
0.25			NR	CPC (3)	CPC (1)	CPC (1)
0.5				NR	NR	NR
0.75					CPC (2)	CPC (C)
1						CPC (2)
1						CPC (2)

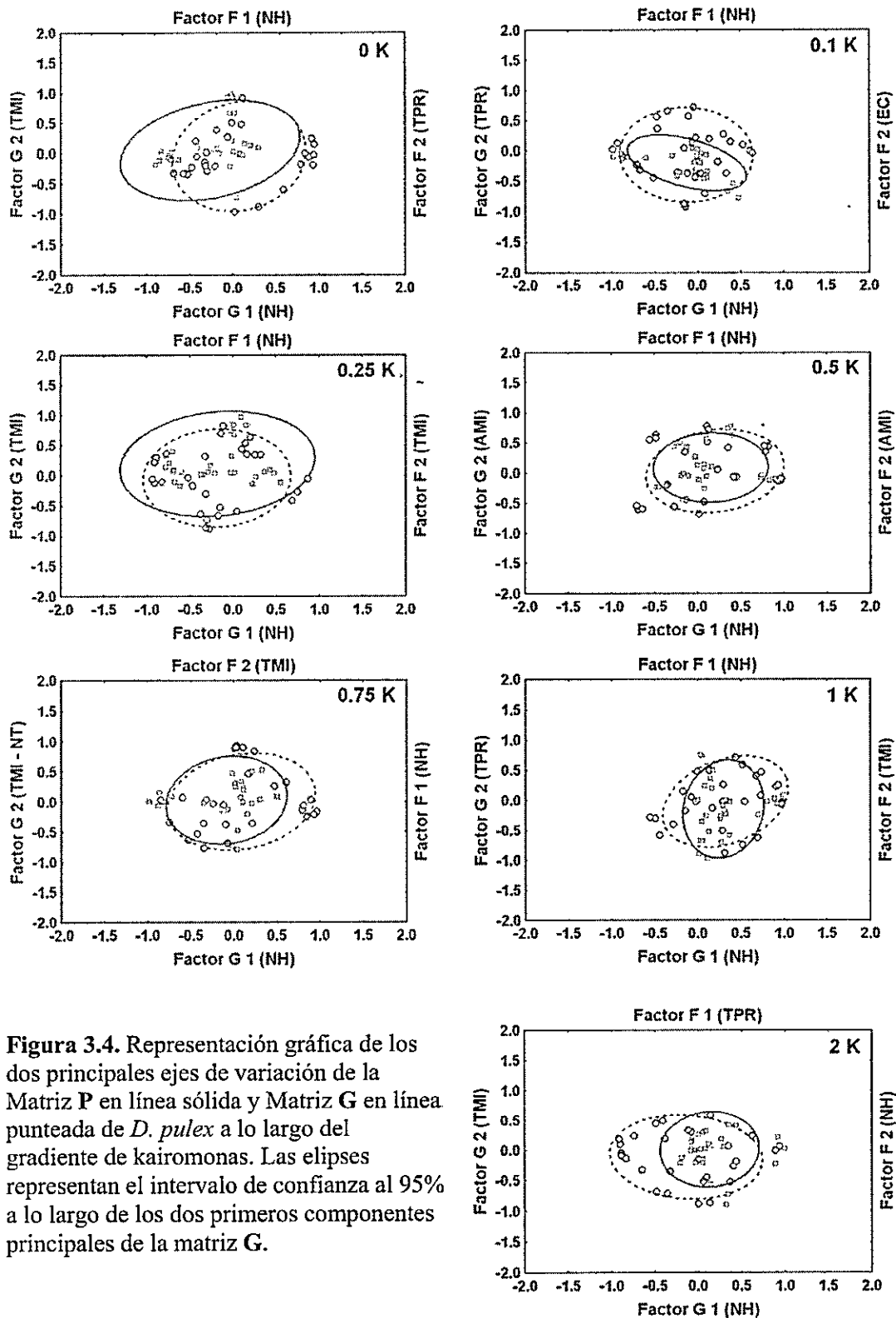


Figura 3.4. Representación gráfica de los dos principales ejes de variación de la Matriz P en línea sólida y Matriz G en línea punteada de *D. pulex* a lo largo del gradiente de kairomonas. Las elipses representan el intervalo de confianza al 95% a lo largo de los dos primeros componentes principales de la matriz G.

Discusión

Tres conjuntos de resultados emergen a partir de la comparación de las matrices fenotípicas y genéticas de *Daphnia pulex* a lo largo de los tratamientos de riesgo de depredación. Primero, los rasgos evaluados presentaron INT significativos cuando fueron agrupados tanto en rasgos morfológicos asociados a la inducción como en rasgos de historia de vida. Sin embargo, los tratamientos no afectaron el grado de integración fenotípica de los rasgos. Estos resultados nos conducen a afirmar que no existe un efecto integrador del estrés ambiental impuesto por el riesgo de depredación sobre los rasgos considerados aquí. Segundo, los mayores niveles de integración se registraron entre rasgos de historia de vida, no así en los rasgos morfológicos que están asociados directamente a la inducción de defensas. Por lo cual, rechazamos también la segunda hipótesis planteada inicialmente. Tercero, heredabilidades *en sentido amplio* (H^2) y correlaciones genéticas (R^2) significativas fueron estimadas exitosamente para todos los rasgos en al menos uno de los siete niveles experimentales. La magnitud de los elementos de la matriz **G** no parecen variar debido al gradiente, sino más bien la variación se evidencia en la estructura de la matriz. Estos resultados son consistentes con las comparaciones estadísticas de matrices **G**, las cuales muestran no diferenciarse significativamente a través de las prueba MANOVA Jaccknife. Por otro lado, las diferencias significativas encontradas con la prueba de Flury en algunas comparaciones pareadas estarían evidenciando cambios en la estructura de la matriz **G**, pero estos cambios no serían importantes en la variación global de la matriz. A su vez, la significativa diferenciación global y estructural de las matrices **P** se corresponde con los efectos de los tratamientos

experimentales. Estos resultados nos llevan a apoyar en parte la tercera de la hipótesis propuesta.

La mayor parte de la evidencia asociada a la Integración Fenotípica se relaciona con comparaciones dentro y entre poblaciones (Arnold et al 2008; Merilä & Björklund 2004), asumiendo que la matriz **P** y **G** evaluada representa a la población o especie en cuestión. Sin embargo, otras líneas de evidencia apuntan a que los componentes de las matrices de varianzas y covarianzas son contexto dependientes (Arnold et al 2008; Charmantier & Garant 2005). En particular la depredación, como un factor que gatilla condiciones estresantes en ambientes naturales, ha mostrado que afecta los componentes de varianza de los rasgos en las presas sometidas a riesgo de depredación (ver Capítulo II, Dingemanse et al 2009; Kraft et al 2006; Relyea 2005). La literatura experimental relacionada al riesgo de depredación se ha centrado en comparar el efecto de diferentes depredadores, más que un gradiente de riesgo de depredación (Freeman et al 2009; Hoverman & Relyea 2007), bajo el argumento de que los organismos generan arreglos fenotípicos defensivos específicos para cada depredador. Nosotros esperábamos que el aumento de la intensidad del gradiente implicara costos o restricciones fenotípicas que influyeran la integración fenotípica, sin embargo cambios en la integración fenotípica al parecer no se relacionan con la intensidad o amplitud del gradiente, sino que más bien con el tipo de ambiente al cual se someten los organismos.

Nuestros resultados indican que las matrices **P** fueron afectadas con el gradiente ambiental, tanto en magnitud como en su estructura (Tabla 3.1.). Sin embargo, la matriz **G** de *D. pulex* muestra, en términos generales, ser insensible al gradiente ambiental impuesto en el contexto de las “líneas de resistencia” descrita

por Schluter (1996) las comparaciones jerárquicas de flury son especialmente útiles, ya que permiten visualizar las potenciales trayectorias evolutivas de las poblaciones o especies en el paisaje adaptativo. Las variaciones en la magnitud y dirección de los ejes de la matriz G podrían tener consecuencias sobre la potencial respuesta de los rasgos morfológicos a la selección, dependiendo de la densidad de depredadores donde se encuentre. Nosotros encontramos que las líneas de menor resistencia evolutiva (Schluter 1996) caracterizadas por los ejes principales de variación de las matrices G de *D. pulex* (Fig. 3.4.) no varían con respecto al gradiente. Esta visión multivariada de la matriz G es robusta con la estimación de los parámetros genéticos en cada ambiente (Fig 3.2). Por otro lado, no existen diferencias visuales en la expresión de las correlaciones fenotípicas frente a las genéticas dentro del gradiente. Esto implica que la inducción de cambios fenotípicos no implica cambios en la variación fenotípica o genética (Fig. 3.3). Este conjunto de resultados tienen sentido cuando consideramos la escala taxonómica de la evaluación experimental y las características del gradiente ambiental impuesto en este experimento. En general la evidencia asociada a la diferenciación de los componentes de la matriz G dentro de una determinada especie compara poblaciones con diferentes regímenes (tipos) ambientales que hayan conducido a la diferenciación (Doroszuk et al. 2008), más que con la variación en la intensidad de un particular factor ambiental como fue el caso de nuestra investigación. De esta manera, al igual que las comparaciones de INT la extensión del gradiente ambiental no parece ser importante en producir diferenciación en la matriz G . Es probable que la diferenciación intrapoblacional sea esperable cuando se consideren tipos de ambientes más que el gradiente de un particular ambiente.

Pese a la evidente estabilidad de la matriz **G**, esto no significa que la arquitectura genética de *D. pulex* no pueda responder a la selección natural. La ausencia de correlaciones genéticas entre el diente cervical (NT) y los rasgos de historia de vida explicita la ausencia de costos genéticos de la inducción de este rasgo defensivo, permitiendo la respuesta a la selección natural en presencia de señales del depredador. Patrón opuesto se puede apreciar entre la espina caudal (EC) y los rasgos de historia de vida, donde la aparición de compromisos genéticos implica la restricción de la potencial respuesta al cambio evolutivo de EC en presencia de señales de depredadores pese a la existencia de variación genética. La ausencia de un patrón entre las correlaciones genéticas restantes encontradas dentro del gradiente evaluado, puede atribuirse al modelo de estudio usado en esta investigación. Organismos con partenogénesis cíclica con eventos punteados de reproducción sexual, pueden presentar una fuerte influencia de varianza no-aditiva y la existencia de desequilibrio de ligamento en la variación genética estimada, lo cual podría generar arreglos genéticos no relacionados con los patrones selectivos experimentados en generaciones anteriores. Este fenómeno denominado desacoplamiento genético ("*genetic slippage*") ha sido descrito previamente (Lynch & Deng 1994; Via & Shaw 1996; Pfrender & Lynch 2000), y se le ha considerado como una estrategia genética para ambientes fluctuantes. Este fenómeno puede explicar la aparición de correlaciones genéticas y fenotípicas que no se relacionan directamente con la inducción de defensas morfológicas y de historia de vida.

En conclusión, en este trabajo se evalúa la sensibilidad de las matrices **P** y **G** al gradiente ambiental impuesto por el riesgo de depredación. Nuestros resultados en *Daphnia* muestran que la integración fenotípica aparentemente no varía en relación

al gradiente ambiental, pese a existir evidencia de cambios en la estructura de correlaciones fenotípicas en *D. pulex*. El hecho de que la matriz **G** no muestre cambios dentro del gradiente apoya en general los resultados en literatura, que identifican a la matriz **G** como relativamente invariable en relación al contexto ecológico y por tanto ser una propiedad de la especie (Bjorklund 2004; Arnold et al 2008). Sin embargo, esta aproximación experimental si es complementada con la evaluación de las dinámicas ambientales de los sitios de origen de estos organismos, podría permitir un mejor entendimiento de la ecología y evolución de la integración fenotípica en las defensas en *D. pulex*.

Referencias

- Agrawal A.A., Laforsch, C. y Tollrian, R. (1999) Transgenerational induction of defences in animals and plants. *Nature* 401: 60-63.
- Agrawal A.A., Brodie III E. D. y Rieseberg L.H. (2001) Possible consequences of genes of major effect: transient changes in the G-matrix. *Genetica* 112–113:33–43.
- Arnold S.J. (1992) Constraints on phenotypic evolution. *The American Naturalist* 140: 85-107.
- Arnold S. J. Pfrender M. E. y Jones A. G. (2001) The adaptive landscape as a conceptual bridge between micro- and macroevolution. *Genetica* 112-113: 9-32.
- Arnold S.J, Bürger R., Hohenlohe P.A., Ajie B.C., y Jones A.G. (2008) Understanding the evolution and stability of the G-Matrix. *Evolution* 62: 2451-2461.
- Berg R. (1960) The ecological significance of correlation pleiades. *Evolution* 14: 171-180.
- Bijlsma R. y Loeschcke V. (2005) Environmental stress, adaptation and evolution: an

overview. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 744-749.

Björklund M. (1996) The importance of evolutionary constraints in ecological time scales. *Evolutionary Ecology* 10: 423-431.

Björklund M. (2004) Constancy of the G matrix in ecological time. *Evolution* 58: 1157-1164.

Boldman K. G., Kriese L. A., Van Vleck L. D., Van Tassell C. P., y Kachman S. D. (1995) A manual for use of MTDFREML. A set of programs to obtain estimates of variances and covariances. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service., Lincoln.

Charmantier A. y Garant D. (2005) Environmental quality and evolutionary potential: lessons from wild populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272: 1415-1425.

Cheverud J. M. (1996) Developmental integration y the evolution of pleiotropy. *American Zoologist* 36: 44-50.

Cheverud J., Wagner G. y Dow M. (1989) Methods for the comparative analysis of variation patterns. *Systematic Zoologist* 38: 201-213

Dingemans N.J., Van der Plas F., Jright J., Réale D., Schrama M., Roff D.A., Van der Zee E. y Barber I. (2009) Individual experience and evolutionary history of predation affect expression of heritable variation in fish personality and morphology. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276: 1285-1293.

Doroszuk A., Wojewodzic, M.W., Gort G. y Kammenga J.E. (2008) Rapid Divergence of Genetic Variance-Covariance Matrix within a Natural Population. *The American Naturalist* 171: 231-304.

Flury B (1988). Common Principal Components and Related Multivariate Models.

Wiley: New York.

Freeman A.S., Meszaros J. y Byers J.E. (2009) Poor phenotypic integration of blue mussel inducible defenses in environments with multiple predators. *Oikos* 118: 758-766.

Gomulkiewicz R. y Kirkpatrick M. (1992) Quantitative genetics and the evolution of reaction norms. *Evolution* 46: 390-411.

Hammil E., Rogers A. y Beckerman A.P. (2008) Costs, benefits and the evolution of inducible defences: a case study with *Daphnia pulex*. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 705-715.

Hoffmann A.A. y Merilä J. (1999) Heritable variation and evolution under favourable and unfavourable conditions. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 96-101.

Hohenlohe P.A. y Arnold S.J. (2008) MIPoD: A Hypothesis-Testing Framework for Microevolutionary Inference from Patterns of Divergence *The American Naturalist* 171: 366-385.

Hoverman J.T. y Relyea R.A. (2007) The rules of engagement: how to defend against combinations of predators. *Oecologia* 154: 551-560.

Kraft P. G., Wilson R. S., Franklin C. E. y Blows M. W. (2006) Substantial changes in the genetic basis of tadpole morphology of *Rana lessonae* in the presence of predators. *Journal of Evolutionary Biology* 19: 1813-1818.

Jones A. G., Arnold S. J. y Berger R. (2003) Stability of the G-matrix in a population experiencing pleiotropic mutation, stabilizing selection, and genetic drift. *Evolution* 57: 1747-1760.

Laforsch C. y Tollrian R. (2004) Extreme helmet formation in *Daphnia cucullata*

- induced by small-scale turbulence. *Journal of Plankton Research* 26:81-87.
- Lande R. (1979) Quantitative genetic analysis of multivariate evolution, as applied to brain: body size allometry. *Evolution* 33: 402-416.
- Lass S. y Spaak P. (2003) Chemically induced antipredator defences in plankton: a review. *Hydrobiologia* 491: 221-239.
- Lynch M. y Deng H.W. (1994) Genetic slippage in response to sex. *The American Naturalist* 144: 242-261.
- Lynch M. y Walsh J. B. (1998) Genetics and Analysis of Quantitative Traits. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Merilä, J. y Björklund M. (2004) Phenotypic integration as a constraint and adaptation. Pp. 107-129. In: The Evolutionary Biology of Complex Phenotypes (M. Pigliucci & K. Preston eds.). Oxford University Press, Oxford.
- Olson E.D. & Miller R.L. (1958) Morphological Integration. University of Chicago Press, Chicago, IL.
- Pfrender M.E. y Lynch M. (2000) Quantitative genetic variation in *Daphnia*: Temporal changes in genetic architecture. *Evolution* 54: 1502-1509.
- Phillips P.C. y Arnold D.E. (1999) Hierarchical comparison of genetic variance-covariance matrices. I. Using the Flury hierarchy. *Evolution* 53: 1506-1515.
- Pigliucci M. (2005) Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology and Evolution* 20: 481-486.
- Pigliucci M. y Preston K. (2004) Phenotypic Integration. Oxford University Press, Oxford.
- Relyea R. A. (2002) Cost of phenotypic plasticity. *The American Naturalist* 159: 272-282.

- Relyea R. A. (2004) Integrating phenotypic plasticity when death is on the line: Insights from predator-prey systems. Pp. 176-194. In: *The Evolutionary Biology of Complex Phenotypes* (M. Pigliucci & K. Preston eds.). Oxford University Press, Oxford.
- Relyea R. A. (2005) The heritability of inducible defenses in tadpoles. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 856-866.
- Roff D.A. (2002) Comparing G matrices: A manova approach. *Evolution* 56: 1286-1291.
- Roff D.A. (2006) *Computer-Intensive Methods of Data Analysis in Biology*. Cambridge University Press: Cambridge
- Scheiner S. M. (1993) Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 35-68.
- Scheiner S.M. (2002) Selection experiments and the study of phenotypic plasticity. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 889-898.
- Schlichting, C. D. (1989) Phenotypic integration and environmental change. *Bioscience* 39: 460-464.
- Schlichting C. D. y Pigliucci M. (1998) *Phenotypic evolution: a reaction norm perspective*. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Schluter D. (1996) Adaptive radiation along genetic lines of least resistance. *Evolution* 50: 1766-1774.
- Steppan S. J., Phillips P. C. y Houle D. (2002) Comparative quantitative genetics: evolution of the G matrix. *Trends in Ecology and Evolution* 17:320-327.
- Tollrian R. & Dodson S.I. (1998) Inducible defenses in cladocera: constraints, costs, and multipredator environments. In: *The Ecology and Evolution of Inducible*

Defenses (Eds R. Tollrian & C.D. Harvell), pp. 177–202. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Tollrian R. y Harvell D. (1998) The ecology and evolution of inducible defenses. Princeton University Press, Princeton, N.J.

van Tienderen P. H. (1991) Evolution of generalists and specialists in spatially heterogeneous environments. *Evolution* 45:1317-1331.

Via, S. y Lande R. (1985) Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution* 39: 505-522.

Via S. y Shaw A.J. (1996) Short-term evolution in the size and shape of pea aphids. *Evolution* 50:163-173.

Wagner G. P. (1984) Coevolution of functionally constrained characters: prerequisites for adaptive versatility. *BioSystems* 17: 51-55.

Discusión General

Este trabajo tuvo como objetivo transversal el estudio de la plasticidad fenotípica, el efecto integrador y la arquitectura genética de un conjunto de rasgos frente a un gradiente de estrés ambiental al que se enfrentan los organismos. En esta investigación abordamos esta problemática a través de diferentes aristas de la plasticidad fenotípica de *Daphnia pulex* frente a la presencia de kairomonas de *Chaoborus spp.*

En el primer capítulo, la plasticidad fenotípica fue descrita para varios rasgos morfológicos y de historia de vida de *Daphnia* frente al gradiente ambiental impuesto por diferentes niveles kairomonas de *Chaoborus*. Específicamente, se determinó que los rasgos aquí evaluados, tanto morfológicos como de historia de vida, mostraron diferentes las normas de reacción frente al gradiente ambiental. Se encontró además asociación estadística entre varios rasgos morfológicos, lo cual indica la posible correlación fenotípica en los rasgos morfológicos asociados a las defensas inducidas. Finalmente, se evidenciaron consecuencias de la plasticidad sobre los componentes de la adecuación biológica, en particular retraso en la primera reproducción y aumento del tamaño a la primera reproducción, lo que contribuyó de manera negativa sobre la adecuación biológica de *D. pulex*, estos resultados son interpretados como posibles costo de la plasticidad fenotípica. En el segundo capítulo, se descompone la variación fenotípica del diente cervical y su norma reacción dentro del gradiente ambiental. Nosotros encontramos que la heredabilidad del diente cervical es significativa en todos los ambientes, pero no varía a lo largo del gradiente. Además, dos parámetros que describen la norma de reacción de esta defensa morfológica a lo largo del gradiente presentaron heredabilidades

significativas. Estos resultados implican que el diente cervical y la norma de reacción de este rasgo defensivo pueden potencialmente responder a la selección natural. La relevancia de esta aproximación recae esencialmente en asociación de atributos biológicos a los parámetros que describen la norma de reacción, atributos que no es posible evaluar a partir del estudio merístico del rasgo o de la simplificación metodológica de las normas de reacción lineales. En el tercer capítulo, desde la perspectiva de la *Integración Fenotípica* se evalúa el impacto del estrés ambiental sobre los organismos en su totalidad. La evidencia sin embargo, nos indica que pese a que la matriz de rasgos fenotípicos en *D. pulex* se diferenció a lo largo del gradiente ambiental, el estrés ambiental no tuvo impacto sobre nuestros estimadores de la integración fenotípica, consecuentemente la matriz **G** tampoco pareció no responder al gradiente ambiental. Estos resultados aportan al rechazo de una serie de hipótesis que asocian al estrés con cambios en la integración fenotípica y la sensibilidad de los componentes de la matriz **G**.

Considerando que las aproximaciones experimentales corren el riesgo de no representar los patrones naturales que invocan las preguntas en un comienzo, es necesario fortalecer metodológicamente los diseños experimentales, permitiendo de esta manera una mejor aproximación al fenómeno natural. Dado esto, es que por un lado esta tesis hace un esfuerzo especial en extender las condiciones experimentales que conducen a la expresión de la plasticidad fenotípica, mejorando esencialmente la resolución de las respuestas plásticas. Por otro lado, la consideración desde diferentes perspectivas de varios rasgos de manera simultánea, es un intento por evitar la visión particularizada de los fenotipos, que aunque exitosa se aleja de lo que realmente constituye un organismo en su totalidad. Así se permitió mejorar la

comprensión global de costos y compromisos tanto a nivel fenotípicos como genéticos.

Finalmente, a partir del desarrollo de ésta tesis es posible derivar una serie de preguntas en relación a la ecología y evolución de la plasticidad fenotípica. A mi juicio, desde la perspectiva ecológica es necesario profundizar ¿en qué condiciones de estrés es posible encontrar cambios en la integración fenotípica?. La relevancia de esta pregunta por un lado se relaciona con el hecho de considerar la plasticidad de los organismos en su totalidad, y por otro la extensa literatura é hipótesis asociada al efecto de los ambientes estresantes hace necesario testear estas preguntas en otras dimensiones ambientales. Desde la perspectiva evolutiva preguntas como ¿Cuan común es la existencia de varianza genética en la norma de reacción en la naturaleza?; y ¿Cuál es la consecuencia microevolutiva de la presencia de varianza genética en la plasticidad de estos rasgos en condiciones naturales?. Permitiría extrapolar los resultados de ésta tesis a un contexto natural y así determinar el impacto de la plasticidad fenotípica sobre las dinámicas evolutivas en una escala ecológica.