



ACTA N° 157

-----En la ciudad de San Carlos de Bariloche, Provincia de Río Negro, República Argentina, siendo las 9:00 hs del día 21 de Marzo del año dos mil doce, en el Centro Regional Universitario Bariloche perteneciente a la Universidad Nacional del Comahue, se constituye el Jurado que dictaminará sobre el Trabajo de Tesis Doctoral de la Lic. Lic. Patricia Elizabeth GARCÍA, alumna de la Carrera de Postgrado Doctorado en Biología realizada bajo la Dirección de la Dra. María del Carmen Diéguez y la codirección del Dr. Horacio Zagarese.-----

-----El Jurado ha sido designado según Resolución CRUB N° 442/11, y está integrado por: Dr. Walter Helbling (CONICET, Estación de Fotobiología de Playa Unión), Dr. Carlos Marcelo Luquet (CONICET-INIBIOMA), Dra. Irene R. Schloss (CONICET Instituto Antártico Argentino) y la Dra. María del Carmen Diéguez (CONICET, INIBIOMA) en calidad de Directora de Tesis.-----

-----La presentación se titula: "*Efectos interactivos entre la temperatura y la radiación solar sobre organismos acuáticos en un contexto de cambio climático*"-----

-----Los Miembros del Jurado han expresado por **unanimidad** mediante dictámenes escritos previos a este acto, que la Tesis ha sido aceptada para su defensa.-----

-----La Dra. Irene R. Schloss no asiste al presente acto académico por razones debidamente justificadas, participando en la primera instancia de la defensa a través de comunicación virtual.-----

-----Habiéndose procedido a la primera instancia de la defensa, los Miembros del Jurado consideran por **unanimidad** pasar a la defensa oral y pública (segunda instancia) transcurrida la cual emiten el siguiente Dictamen: "La Licenciada Patricia Elizabeth García ha desarrollado un trabajo de investigación original, con aportes valiosos para el conocimiento científico. Las distintas fases del trabajo de investigación involucraron trabajo en terreno, recolección de muestras, experimentación en laboratorio y aplicación de metodologías analíticas de alto nivel. El análisis de datos y el tratamiento estadístico es correcto lo que permitió arribar a conclusiones interesantes y muy fundadas con los datos obtenidos. La tesis está bien estructurada y su redacción es adecuada. En el texto corregido se incorporaron todos los comentarios y sugerencias realizados por el jurado. En la primera instancia de la defensa la tesista respondió satisfactoriamente a todas las preguntas formuladas. La exposición oral fue clara, presentándose de manera sintética la mayoría de los resultados obtenidos. La tesista respondió con solvencia a las preguntas realizadas"-----

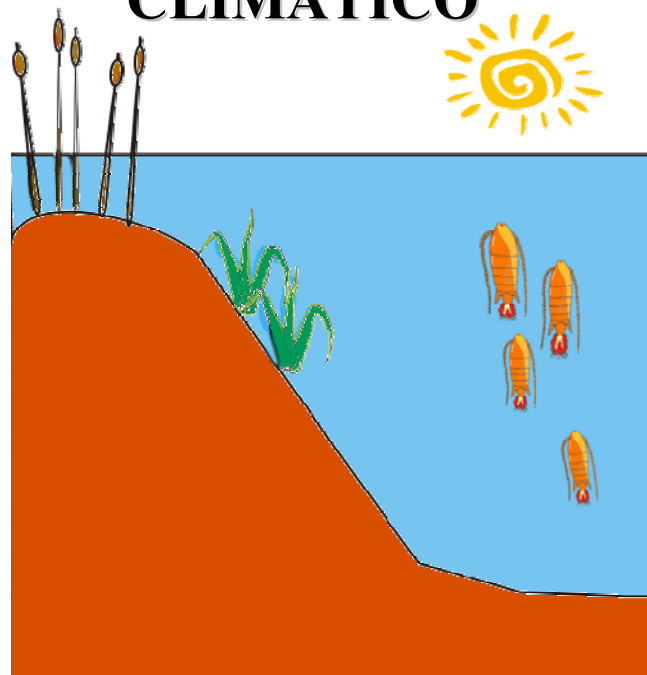
-----Por lo expuesto el Tribunal considera por **unanimidad, Aprobar** la Tesis Doctoral y su defensa calificándola con la nota de **Sobresaliente (10)**-----

-----Con lo que se da por finalizado el acto, firmando los Integrantes del Jurado en cuatro ejemplares de un mismo tenor y a un solo efecto.-----

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE
CENTRO REGIONAL UNIVERSITARIO BARILOCHE



EFFECTOS INTERACTIVOS ENTRE LA TEMPERATURA Y LA RADIACIÓN SOLAR SOBRE ORGANISMOS ACUÁTICOS EN UN CONTEXTO DE CAMBIO CLIMÁTICO



Autora: Lic. Patricia E. García

Directora: Dra. María del Carmen Diéguez

Co-director: Dr. Horacio E. Zagarese

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en Biología

2012

Dedicada a mi familia y mis seres queridos...

Índice de contenidos

	Página
Resumen.....	ii
Abstract.....	v
Introducción General.....	1
Objetivos.....	11
Área de estudio General	14
Materiales y Métodos General.....	15
Capítulo 1	
<i>Determinación y caracterización de compuestos foto-protectores en Boeckella spp</i>	
1.1 Introducción.....	21
1.2 Objetivos.....	27
1.3 Especies analizadas.....	28
1.4 Métodos analíticos y experimentales.....	32
1.5 Resultados.....	36
1.6 Discusión.....	44
Capítulo 2	
<i>Efectos de la radiación PAR+UVA y la temperatura sobre la bio-acumulación de compuestos foto-protectores</i>	
2.1 Introducción.....	50
2.2 Objetivos.....	53
2.3 Características de las especies estudiadas del género <i>Boeckella</i>	54
2.4 Metodología experimental.....	61
2.5 Resultados.....	64
2.6 Discusión.....	81
Capítulo 3	
<i>Efectos de la concentración basal de compuestos foto-protectores sobre su bio-acumulación</i>	
3.1 Introducción.....	88
3.2 Objetivos.....	89
3.3 Materiales y Métodos.....	90
2.4 Resultados.....	93
2.5 Discusión.....	102
Capítulo 4	
<i>Efectos de temperatura y de la exposición la RUV sobre la mortalidad y fecundidad en Boeckella spp.</i>	
4.1 Introducción.....	106
4.2 Objetivos.....	108
4.3 Materiales y Métodos.....	109
4.4 Resultados.....	114
4.5 Discusión.....	118
Conclusiones finales.....	121
Agradecimientos.....	124
Bibliografía.....	126
Anexo (Publicaciones, Trabajo de respaldo).....	148

Resumen

El incremento de la temperatura y de la radiación ultravioleta (RUV) sobre la superficie de la tierra ha sido objeto de numerosos estudios durante las últimas décadas. La temperatura tiene un rol preponderante en la dinámica de los ecosistemas terrestres y acuáticos y los pronósticos de su incremento a consecuencia del calentamiento global indican modificaciones sustanciales en las características físico-químicas del medio acuático, la dinámica de sus organismos y de sus tramas tróficas. El impacto de la RUV sobre los ambientes acuáticos incluye efectos sobre el medio físico (p.e. clima óptico) y químico (p.e. transformación de la materia orgánica disuelta) que pueden resultar interactivos tendiendo en algunos casos a incrementar el impacto de la radiación de onda corta debido a la pérdida de absorbancia del agua. Además, la RUV afecta estructuras y funciones de los organismos vivos de diversas maneras, involucrando daños en procesos celulares tales como la asimilación de nutrientes, orientación y motilidad, la fotosíntesis, la transcripción y la replicación del ADN. En conjunto la temperatura y la RUV, entre otros factores, tienen un rol determinante sobre la fisiología y comportamiento de los organismos acuáticos.

Los organismos planctónicos en particular, utilizan tres estrategias básicas para contrarrestar los efectos nocivos de la exposición a la RUV. Estas estrategias incluyen evitar la radiación (migración), la producción y acumulación de compuestos que actúan como pantallas solares y/o antioxidantes (foto-protección química) y, por último, la reparación del daño molecular (foto-reparación enzimática).

El objetivo general de esta investigación fue analizar el efecto combinado de la temperatura y de la exposición a la radiación tanto visible como RUV sobre la foto-protección química en un conjunto de especies de copépodos planctónicos del género *Boeckella* (COPEPODA: CENTROPAGIDAE). Estas especies habitan sistemas acuáticos expuestos a niveles de radiación elevados y su distribución geográfica está influenciada por su afinidad por las temperaturas templado-frías y frías, características de una diversidad de ambientes patagónicos. Para ello, se analizaron copépodos provenientes de seis especies del género *Boeckella*, *B. antiqua*, *B. brasiliensis*, *B. brevicaudata*, *B. gracilis*, *B. gibbosa* y *B. gracilipes* (dos poblaciones alopátricas), obtenidas en cuerpos de agua en un gradiente altitudinal del Norte Andino-Patagónico. En estas especies de *Boeckella* se pudieron identificar dos tipos básicos de compuestos foto-protectores, los aminoácidos tipo micosporina o MAAs, que actúan como pantallas solares; y los pigmentos carotenoides que actúan como antioxidantes. Se registraron 5 tipos de aminoácidos tipo micosporinas: Micosporina-Glicina, Shinorina, Porphyrina-334, Palithene y un compuesto desconocido denominado MAA-332.

Por otra parte, se realizaron experimentos de laboratorio para analizar el efecto inductor de la radiación sobre la acumulación de compuestos foto-protectores en 5 especies de *Boeckella*. En todos los casos, la presencia de radiación visible (PAR) y de radiación ultravioleta A (UVA) produjo un aumento significativo en la concentración tanto de MAAs como de carotenoides. Los MAAs fueron acumulados en los organismos expuestos a la radiación inclusive en ausencia de una fuente dietaria, mientras que en el caso de los carotenoides se supone que fueron adquiridos a través de la dieta.

Además, con la finalidad de analizar el efecto conjunto de la temperatura y de la exposición a la radiación PAR+UVA se realizaron una serie de ensayos de laboratorio manipulando experimentalmente la radiación en un gradiente térmico pronunciado de 5 a 20 °C y utilizando 4 especies de *Boeckella*. Los resultados obtenidos indicaron que la temperatura y la exposición a la radiación PAR+UVA actúan interactivamente afectando la proporción de compuestos foto-protectores. Se observaron tres patrones de acumulación de compuestos foto-protectores con relación al gradiente térmico ensayado (5 a 20°C): i) un incremento en la proporción de compuestos foto-protectores a temperaturas mayores a 16°C en *B. antiqua* y *B. gracilis*, ii) un incremento de la proporción de compuestos a temperaturas menores a 8°C en *B. brevicaudata* y *B. gracilipes* del Lago Morenito y, por último, iii) niveles semejantes y elevados de acumulación de compuestos foto-protectores a temperaturas contrastantes (5 y 16°C) , observada en la población de *B. gracilipes* de la Laguna Verde.

La bio-acumulación de compuestos foto-protectores en *Boeckella* spp. fue estudiada también mediante la aplicación de modelos cinéticos de primer orden, con el fin de analizar el rol de la temperatura sobre la foto-protección química. A partir de datos empíricos obtenidos en ensayos de laboratorio controlando niveles de temperatura y radiación, se calcularon las tasas de eliminación, ganancia neta y ganancia bruta de compuestos foto-protectores. El análisis de estas tasas en función de la temperatura reveló que la eliminación de los MAAs y de los carotenoides se incrementó con la temperatura en la mayoría de las especies de *Boeckella* estudiadas. Por el contrario, el efecto de la temperatura sobre la ganancia neta y bruta de estos compuestos fluctuó entre especies y entre poblaciones de la misma especie. Los modelos cinéticos de primer orden resultaron útiles para describir de manera general el comportamiento de la bio-acumulación de compuestos foto-protectores en las especies estudiadas y comparar sus respuestas en relación con la temperatura. Sin embargo, la capacidad de predicción de este modelo es limitada debido a que no tiene en cuenta otros factores que regularían la bio-acumulación. De hecho, ensayos complementarios de laboratorio con dos especies de *Boeckella*, *B. antiqua* y *B. gracilipes* de la Laguna Verde, evidenciaron que la concentración basal de compuestos foto-protectores también

tiene el potencial de afectar la bio-acumulación de estos compuestos, reconociéndose dos patrones contrastantes. En *B. gracilipes* de la Laguna Verde, especie con elevados niveles de concentración basal, el patrón se caracterizó por una gran estabilidad de la concentración de los compuestos, reflejada en la escasa eliminación y ganancia de compuestos tanto en condiciones de PAR+UVA como en oscuridad. Por otro lado, en *B. antiqua*, especie cuyos niveles basales de foto-protección química son naturalmente variables, se halló una respuesta notablemente plástica de ajuste de las concentraciones de compuestos dependiente de la concentración basal en escenarios de radiación contrastantes.

Por otra parte, el análisis experimental del efecto de la RUV-B y de la temperatura sobre la tolerancia en dos especies de *Boeckella*: *B. gracilis* y *B. antiqua* reveló respuestas disímiles en ambas especies y también la ausencia de un efecto interactivo entre la temperatura y la RUV-B sobre la mortalidad. En las dos especies la mortalidad dependió fuertemente de la dosis de RUV-B aplicada, resultando máxima a una dosis de UV-B del 100% equivalente a de 324 J m^{-2} . *B. gracilis* presentó mayor mortalidad a 20°C mientras que la mortalidad en *B. antiqua* fue independiente de la temperatura.

Por otra parte, se analizó experimentalmente el efecto de la temperatura y la RUV sobre la reproducción de *Boeckella antiqua*. El tamaño de camada resultó afectado en el tratamiento con radiación PAR+UVA sólo a 5°C , lo cual indicaría que la exposición al PAR+UVA se traduce en una disminución del potencial reproductivo especialmente a bajas temperaturas. La mayor cantidad de huevos se halló en incubaciones a 12°C tanto bajo PAR como bajo PAR+UVA, lo cual sugiere un óptimo térmico para la producción de huevos.

En síntesis, los resultados obtenidos indican que en las especies de *Boeckella* analizadas la foto-protección química respondería a dos estrategias que reflejan adaptaciones a las condiciones ambientales predominantes. Por un lado, la estrategia de las especies que habitan lagos y lagunas de altura, con niveles elevados de exposición a la RUV y escenarios térmicos muy fluctuantes, que se caracteriza por una elevada concentración basal de compuestos foto-protectores y una gran resiliencia de la concentración frente a cambios en los niveles de radiación y de temperatura. Por otro lado, la estrategia de las especies de *Boeckella* que habitan cuerpos de agua pedemontanos, que poseen una mayor variabilidad natural en la concentración de compuestos foto-protectores y también una mayor plasticidad en su respuesta a cambios en los niveles de la RUV y de la temperatura.

Summary

The effect of raising temperature and increased ultraviolet radiation (UVR) on the earth surface has been the focus of numerous studies during the last decades. Temperature has multiple effects on terrestrial and aquatic ecosystems and, at a global scale, foreseen warming is expected to alter physical and chemical features as well as the dynamics of organisms and foodwebs. The impact of UVR on aquatic systems include effects on the physical (i.e. light climate) and chemical environments (i.e. dissolved organic matter transformation) that may interact, thereby, increasing the impact of short wavelength radiation in the environment due to the loss of absorbance of the water. Furthermore, UVR can alter the structure and functionality of living organisms in several ways. UV damage may involve changes in cellular processes such as nutrition, orientation, motility, photosynthesis and DNA transcription and replication. Thus, temperature and UVR, among other key-role factors, may regulate the physiology and behavior of aquatic organisms.

Planktonic organisms have different strategies to cope with the negative effects of UVR exposure. These strategies comprise behavioral traits such as avoidance (diel vertical migration), the synthesis and accumulation of photo-protective compounds (chemical photo-protection) and the repair of the molecular damage (enzymatic photo-repair).

The central goal of this investigation was to analyze the combined effect of temperature and UVR on the chemical photo-protection in a group of species of planktonic copepods belonging to the genus *Boeckella* (COPEPODA: CENTROPAGIDAE). In Patagonia, these species inhabit aquatic ecosystems exposed to high levels of UVR and have a geographic distribution influenced by their high affinity for cold and temperate environments. For this purpose, six species of *Boeckella*, *B. antiqua*, *B. brasiliensis*, *B. brevicaudata*, *B. gracilis*, *B. gibbosa* and two allopatric populations of *B. gracilipes*, were obtained from lakes and ponds in an altitudinal gradient in Northwestern Patagonia. In these species, two types of photo-protective compounds could be identified, the mycosporine-like amino acids (MAAs) which act as sunscreens, and the carotenoid pigments that are antioxidants. Five different mycosporine-like amino acids were determined: Mycosporine-Glycine, Shinorine, Porphyrin-334, Palithene and an unknown compound named as MAA-332.

Laboratory experiments were designed and performed to analyze the inductive effect of radiation on the concentration of photo-protective compounds in four species of *Boeckella*. In all cases, the availability of visible light (PAR) and ultraviolet radiation A (UVA), increased

significantly the concentration of MAAs and carotenoid pigments. Notably, the MAAs were accumulated even when copepods were fed a diet free of these compounds.

In addition, a series of laboratory assays were performed with four species of *Boeckella* in order to untangle the interactive effects of temperature and UVR on the accumulation of photo-protective compounds, under two radiation treatments (PAR+UVA and dark) and in a temperature gradient (5 to 20°C). The results from these trials indicated that both temperature and exposure to PAR+UVA were factors affecting alone and also concomitantly chemical photo-protection by their role in determining the level of accumulation of MAAs and carotenoids. The bioaccumulation of photoprotective compounds in relation to temperature and radiation varied among species and among populations of the same species, which was reflected in three patterns: i- the increase of photo-protective compounds at temperatures above 16°C, observed in *Boeckella antiqua* and *B. gracilis*, ii- the increase of photo-protective compounds at temperatures below 8°C, recorded in *B. brevicaudata* and *B. gracilipes* from Lake Morenito, and at last, iii- the presence of high levels of photo-protective compounds and higher levels of accumulation at contrasting temperatures (5 and 16°C), measured in the population of *B. gracilipes* from Laguna Verde.

The bio-accumulation of photo-protective compounds in *Boeckella* spp. was further studied through first order kinetic models, aiming to analyze the role of temperature on chemical photo-protection. The bio-accumulation rates, elimination, net gain and uptake, were calculated using empirical data resulting from the temperature-radiation assays. These rates were studied in relation to temperature, revealing that the elimination of MAAs and carotenoids increased along with temperature in most of the species of *Boeckella* included in this study. On the contrary, the effect of temperature on the net gain and on the uptake rates of these compounds varied among species and populations of the same species. These first order kinetic models were useful to describe the general pathway of the accumulation of photo-protective compounds in *Boeckella*, allowing also comparing their particular responses to temperature. However, this approach is limited to predict the behavior in nature where several factors may influence the bioaccumulation of photo-protective compounds. In fact, complementary laboratory assays using *Boeckella antiqua* and *B. gracilipes* from Laguna Verde, detected that the basal concentration of photo-protective compounds had the potential to affect the bio-accumulation of these compounds in two ways. In *B. gracilipes* from Laguna Verde, bearing naturally high basal concentrations of photo-protective compounds, the concentration pattern observed could be defined as stable and characterized by almost negligible changes in the elimination and gain rates, both in dark and PAR+UVA. On the other

hand, in *B. antiqua* that bears fluctuating levels of photo-protective compounds, the concentrations varied with the treatment, showing an increment in their bio-accumulation at lower basal concentrations.

The study of the effect of temperature and RUV-B on the mortality of *B. gracilis* and *B. antiqua* showed up differential responses of the two species, as well as the absence of interaction between temperature and RUV-B. In both species, the mortality depended on the RUV-B dose applied, resulting highest at the 100% UV-B, equivalent to 324 J m^{-2} . The mortality of *B. gracilis* was found to be highest at 20°C while *B. antiqua*'s was independent of the temperature.

The effect of temperature and RUV on reproduction was analyzed through laboratory experiments in *B. antiqua*. The results evidenced that these variables affected concomitantly the reproduction of this species. The lowest clutch size was found in the treatment combining PAR+UVA at 5°C , thereby suggesting that exposure to PAR+UVA represented a cost reflecting in a lower reproductive potential, especially at low temperature. The highest clutch size was recorded in the incubations performed at 12°C regardless of the light treatment, suggesting a thermal optimum for the reproduction of *B. antiqua*.

Overall, the results obtained indicated that chemical photo-protection in *Boeckella* seemed to fit into two different strategies, reflecting species and/or population adaptations to local prevailing conditions in the underwater light and temperature scenarios. Species that inhabit high altitude lakes and ponds, with high exposure to solar radiation and fluctuating temperature, bear elevated basal levels of photo-protective compounds, which were found to be resilient. On the other hand, *Boeckella* species that inhabit piedmont lakes bear comparatively more plastic levels of photo-protective compounds that were readily responsive to changes in temperature and radiation scenarios.

Introducción general

Introducción general

El cambio climático es una de las amenazas actuales más severas para los ecosistemas terrestres y acuáticos y su impacto se refleja a diferentes escalas de complejidad en los sistemas vivos. Las fluctuaciones históricas y presentes del clima terrestre se encuentran en estrecha relación con la dinámica de los gases atmosféricos. El cambio climático que experimenta actualmente la Tierra es consecuencia de la alteración de la composición de la atmósfera, producto del incremento de las emisiones de gases derivados de las actividades humanas (IPCC, 2007; Hansen et al, 2007). En particular, las emisiones de los denominados gases del efecto invernadero, principalmente de dióxido de carbono (CO_2), de metano (CH_4), y en menor medida de óxido nitroso (N_2O), han afectado la composición de la atmósfera debido a que interactúan con el ozono (O_3) reduciendo la concentración de este gas en la estratósfera (IPCC 2007; Hansen et al, 2007). El O_3 y los aerosoles proveen los filtros primarios atmosféricos que reducen la radiación ultravioleta (Díaz et al, 2006) existiendo una relación inversa entre el espesor de la columna de O_3 estratosférico y la intensidad de RUV-B que alcanza la superficie de la tierra (McKenzie et al, 2011). La disminución de la concentración de O_3 estratosférico fue registrada por primera vez sobre la Antártida a mediados de la década del '80 (Farman et al, 1985; Solomon et al, 1986; Farman, 1988); y desde entonces se observa una disminución sostenida, correlacionada principalmente con el uso de compuestos clorofluorcarbonados (Farman et al, 1985; Solomon et al, 1986; Molina et al, 1987; Farman, 1988; Thrush, 1988). El impacto más fuerte se percibió durante la década del 90 (Madronich et al, 1998; Häder et al, 2007a; McKenzie et al, 2011). Estudios recientes han señalado una disminución de la emisión de sustancias fluoroclorocarbonadas destructoras de la capa de O_3 , propiciada por el Protocolo de Montreal (McKenzie et al, 2003; Solomon, 2004; Häder et al, 2007b; McKenzie et al, 2007; Häder et al, 2011; McKenzie et al, 2011). Sin embargo, a pesar de este decrecimiento, cada primavera se registra sobre la Antártida una disminución en la concentración de O_3 debido a la combinación de reacciones iniciadas en presencia de radiación solar y estimuladas por las bajas temperaturas de la región (Solomon, 2004).

La destrucción de la capa de ozono ha determinado una mayor incidencia de la radiación solar sobre la superficie terrestre, especialmente de la fracción del ultravioleta. La radiación solar es el conjunto de radiaciones electromagnéticas que provienen del sol e incluyen (a los fines prácticos) desde la radiación ultravioleta hasta el infrarrojo (Fig. A) (Wetzel, 2001). La franja correspondiente a la radiación ultravioleta (RUV) comprende la región del espectro entre los 200 y 400 nm, definiéndose arbitrariamente como RUV-C la franja entre 200-280 nm, RUV-B entre 280-315 nm y

RUV-A entre 315-400 nm (Fig. B; Wetzel, 2001). La región denominada radiación visible o PAR por sus siglas en inglés (*Photosynthetic Active Radiation*) abarca entre los 400 y los 700 nm, mientras que la radiación infrarroja o radiación térmica se define después de los 700 nm hasta más de 2.5 μm (Fig. A) (Wetzel, 2001; Wetzel, 2003). La RUV-C es absorbida casi completamente por los gases de la estratósfera mientras que la RUV-B y RUV-A inciden sobre la superficie de la tierra resultando en un importante agente foto-activador tanto en ambientes terrestres como acuáticos (Wetzel, 2003).

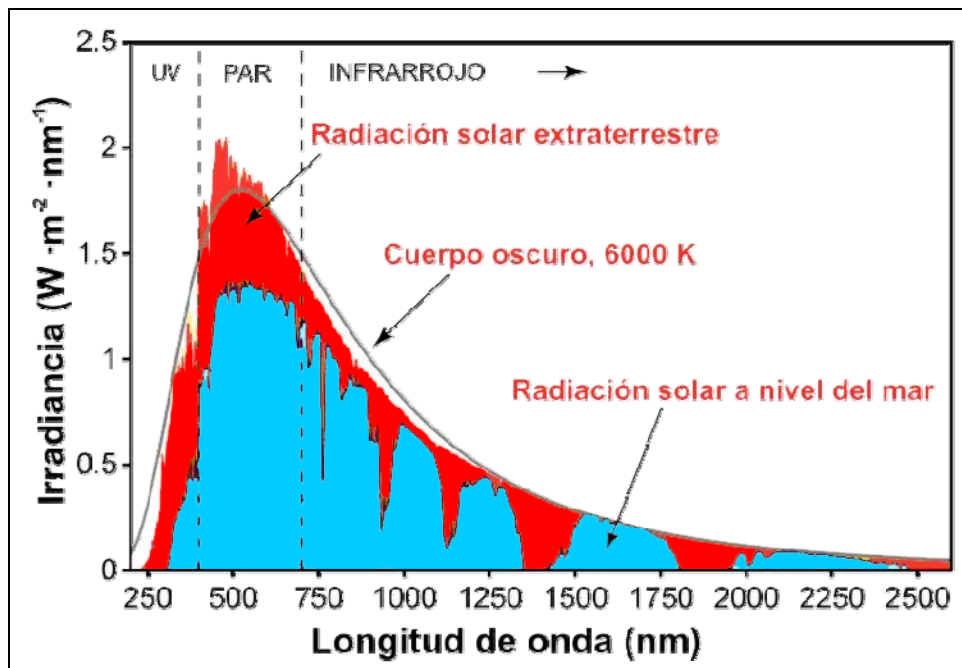


Figura A: Esquema del espectro electromagnético. Modificado de Blumthaler y Webb (2003).

La presencia de la atmósfera mantiene en equilibrio la recepción de la energía proveniente del sol y la emisión que la tierra devuelve al espacio. Este balance energético, se denomina efecto invernadero y permite mantener la temperatura en un margen que posibilita la vida en la Tierra (Trenberth et al, 2009). Sin embargo, el aumento de la concentración de los gases del efecto invernadero de origen antropogénico produce un aumento del efecto invernadero que, altera el balance energético y supone cambios en el clima (Karl y Trenberth, 2003; Hansen et al, 2005; Hansen et al, 2007). De hecho entre los años 1906 y 2005 la temperatura global se incrementó aproximadamente en 0.7°C , resultando el calentamiento más acentuado en altas latitudes (Hansen et al, 2005; IPCC, 2007; Swanson et al, 2009; Solomon et al, 2010). Los efectos del incremento de la temperatura global son numerosos y puede mencionarse que a nivel de los organismos vivos se han detectado alteraciones debidas al aumento de la temperatura que incluyen, por ejemplo, el corrimiento de la línea de vegetación en altura (Theurillat y Guisan, 2001), desplazamientos hacia el

norte de especies en el hemisferio norte (Barry et al, 1995; Lima et al, 2007), corrimiento de las barreras térmicas (Hughes, 2010; Parmesan y Yohe, 2003; Parmesan et al, 2005; Perry et al, 2005; Parmesan, 2006; Jönsson et al, 2011), cambios en la fenología (Parmesan y Yohe, 2003; Parmesan, 2006; Ji et al, 2010) y hasta la extinción de algunas especies (Root et al, 2003; Thomas et al, 2004).

Radiación solar en los sistemas acuáticos

La radiación solar que alcanza la superficie de la tierra varía con la latitud, estación del año, hora del día y las condiciones meteorológicas. En los sistemas acuáticos, una porción de la radiación que incide sobre la superficie del agua escapa debido a que es reflejada hacia la atmósfera. La reflectividad depende de varios factores como por ejemplo el ángulo de incidencia de la luz, las características físicas de la superficie del agua y también las condiciones meteorológicas. Una fracción de la luz que penetra en el sistema acuático es absorbida por las sustancias disueltas y las partículas suspendidas, mientras que otra parte es dispersada (“scattering”). La energía dispersada varía dependiendo de la concentración y de las propiedades ópticas de las partículas en suspensión, fluctuando ampliamente a nivel estacional y en sentido vertical y horizontal en el ambiente (Wetzel, 2001; Wetzel, 2003). Todos estos factores interactúan creando un gradiente lumínico vertical que ejerce un efecto sobre la producción y la actividad general del ambiente acuático (Lampert y Sommer, 2007). La reducción de la intensidad lumínica debido a la absorción y a la dispersión de luz se denomina *atenuación vertical de la radiación solar*. La irradiancia recibida a una profundidad dada, depende no sólo de la radiación en la superficie, sino también, de las propiedades ópticas del agua, que determinan el coeficiente de atenuación vertical de la radiación solar o K_d (Wetzel, 2001). En el medio acuático la intensidad de la radiación solar decrece exponencialmente con el incremento de la profundidad como describe el modelo que se presenta a continuación:

$$E_d(Z) = E_d(0) e^{-K_d Z}$$

$$K_d = (\ln E_d(0) - \ln E_d(Z)) / Z$$

Dónde, el K_d es el coeficiente de atenuación vertical de la radiación solar y $E_d(0)$ y $E_d(Z)$ son las intensidades lumínicas en la superficie y a la profundidad Z . Mayores valores de K_d implican una mayor atenuación de la radiación solar y un gradiente óptico vertical más pronunciado (Lampert y Sommer, 2007). El agua pura absorbe fuertemente las longitudes de onda mayores a 650 nm, mientras que longitudes de onda menores presentan una rápida absorción en la columna de agua que depende en gran medida, de la concentración del Carbono Orgánico Disuelto (COD) (Morris et al, 1995; Hargreaves, 2003). El clima óptico subacuático determina la calidad y la disponibilidad del COD en el medio acuático, y a la vez el COD interviene en la atenuación de la luz regulando el clima óptico subacuático (Wetzel, 2001). Generalmente los cuerpos de agua más transparentes

presentan K_d bajos, mientras que aguas más turbias, con más sólidos en suspensión y/o mayor concentración de COD presentan K_d más altos (Morris et al, 1995).

Relacionados con el proceso de cambio climático se detectan cambios en la temperatura, en la precipitación, en la concentración de CO_2 y mayores niveles de RUV que impactan en los ecosistemas globales con efectos sobre la vegetación y los suelos y alteraciones en la cantidad de carbono que se exporta desde los sistemas terrestres a los acuáticos (Steinberg, 2003; Pace et al, 2004; Wong y Williams, 2010). El cambio climático puede alterar la concentración del COD en las aguas naturales y por lo tanto afectar su transparencia a la RUV (Zepp et al, 2007). El COD atenúa principalmente a la RUV-B mientras que el carbono orgánico particulado (COP) disminuye la también RUV-A y el PAR en la columna de agua (Häder et al, 2007b). El COD es fragmentado por la RUV en subunidades más pequeñas en un proceso conocido como foto-oxidación (photobleaching) común en las aguas naturales (Zagarese et al, 2001). Las unidades pequeñas resultantes pueden ser utilizadas directamente por el bacterioplancton (Pérez et al, 2003).

En síntesis, los efectos más significativos del cambio climático sobre las aguas superficiales serán el resultado del balance entre el aporte y la degradación de materia orgánica disuelta (MOD) que producirán distintos escenarios ópticos dependiendo del signo del balance aporte/degradación (Steinberg, 2003; Pace et al, 2004; Wong y Williams, 2010). Una disminución en el subsidio de MOD terrestre (MOD alóctona) a los cuerpos de agua produciría un incremento concomitante en la penetración de la radiación en la columna de agua (Scully et al, 2003; Williamson y Zagarese, 2003; Häder et al, 2007b), mientras que un aumento del aporte atenuaría la penetración de la radiación (Evans et al, 2006; Monteith et al, 2007; Williamson y Rose, 2010; Zepp et al, 2011)

Las respuestas de los ecosistemas frente a la variabilidad del clima incluyen efectos sinérgicos, antagónicos o nulos con respecto a la RUV, debido a que esta variable puede afectar diversos niveles de complejidad de los sistemas bióticos, desde la materia orgánica hasta las comunidades acuáticas (Häder et al, 2007b). Los efectos de la RUV sobre los organismos vivos dependen de la longitud de onda. Se conoce que longitudes de onda larga son requeridas para la visión en animales, la fotosíntesis en las plantas así como también algunas longitudes de onda cercanas a la región UV-A estarían involucradas en la foto-reparación, mientras que longitudes de onda más corta son generalmente dañinas (Grad et al, 2001; Williamson et al, 2001; MacFadyen et al, 2004). La RUV-B (280-315 nm) produce daño en las moléculas, en procesos celulares tales como la asimilación de nutrientes, orientación y movilidad, en la fotosíntesis y/o en la transcripción y replicación del ADN (Sancar y Sancar, 1988; Karentz et al 1991a; Siebeck y Bôhm, 1991; Siebeck et al, 1994; de Vries et al, 1995; Williamson, 1995; De Lange et al, 1999; Buma et al, 2003; De Lange y

Van Reeuwijk, 2003). Por otro lado, la RUV-A (315-400 nm) es mayormente absorbida por moléculas orgánicas tales como proteínas, lípidos y ARN. La disipación de la energía absorbida genera sub-productos denominados especies reactivas oxígeno (ROS) entre las que se puede mencionar al peróxido de hidrogeno, que pueden dañar componentes celulares (Lesser y Shick, 1989; Browman et al, 2000).

Adaptaciones de los organismos acuáticos a la exposición a la radiación

La penetración de RUV en el ambiente acuático conlleva a un determinado nivel de exposición de la materia y de los organismos a la energía radiante. La existencia de un gradiente lumínico en la columna de agua crea un gradiente vertical de exposición a la RUV que puede resultar un factor de estrés para los organismos vivos (Hargreaves, 2003).

Los organismos acuáticos han desarrollado diferentes estrategias para afrontar los efectos nocivos de la RUV. En el plancton se observan tres estrategias comunes: *i*) evitar la RUV mediante la migración vertical diurna hacia estratos más profundos y menos luminosos; *ii*) la foto-protección, mediante la producción y/o adquisición de compuestos foto-protectores que absorben y disipan la energía (pantallas solares) o bien contrarrestan el daño (antioxidantes) y, *iii*) la reparación enzimática del daño a nivel molecular (Zagarese et al, 1997a).

La migración vertical es un comportamiento común en los animales del plancton que ha sido objeto de numerosos estudios tanto en ambientes marinos como dulceacuícolas (Dodson, 1988; Williamson et al, 1996; Krebs, 2001; Leech y Johnsen, 2003). Los organismos planctónicos evitan las capas superficiales de agua durante las horas del día desplazándose hacia estratos más profundos (migración vertical diaria o, según sus siglas en inglés, DVM). Se ha observado que este comportamiento puede ser inducido por diversos factores como la temperatura (Kessler y Lampert, 2004), la cantidad y la calidad el alimento (Kessler, 2004), la presencia de depredadores visuales (Dodson, 1988; Leibold, 1990) y también por la radiación solar (Rhode et al, 2001; Van Gool y Ringelberg, 2003; Alonso et al, 2004; Cooke et al, 2008; Leech et al, 2005a y b; Fisher et al, 2006; Hansson y Hylander 2009b; Hylander et al, 2009; Leech et al, 2009).

Numerosos organismos incluyendo bacterias, hongos, plantas y animales presentan compuestos químicos que absorben en el rango de la RUV y que poseen función de foto-protección. En el zooplancton se encuentran tres compuestos foto-protectores principales: melanina, aminoácidos tipo micosporinas o MAAs y carotenoides (Hairston, 1976; Byron, 1982; Hebert y Emery, 1990; Sommaruga y Garcia-Pichel, 1999; Tartarotti et al 2004; Persaud et al, 2007;

Hansson y Hylander 2009a; Rautio et al, 2009; Rautio y Tartarotti, 2010). La melanina se encuentra principalmente en cladóceros y su función principal es la de actuar como pantalla solar (Hebert y Emery, 1990; Rhode et al; 2001; Rautio et al, 2009; Rautio y Tartarotti, 2010). Los aminoácidos tipo micosporinas o MAAs actúan también como pantallas solares disipando la energía proveniente de la RUV en forma de calor (Shick y Dunlap, 2002). Por último, los pigmentos carotenoides son compuestos antioxidantes que neutralizan los radicales libres producto de la lisis molecular por exposición a la RUV (Byron, 1982; Ringelberg et al, 1984). También existen enzimas antioxidantes que contrarrestan los daños que pueden ocurrir por el incremento de los ROS producto de la exposición a la RUV (Bartling et al, 1993; Borgeraas y Hessen, 2000; Borgeraas y Hessen, 2002).

Por otra parte, la foto-reparación enzimática es un mecanismo específico para reparar los daños producidos por la exposición a la RUV (Buma et al, 2003). En este proceso interviene la enzima foto-liasa, cuya función es la de revertir los dímeros de pirimidina en dos nucleótidos de pirimidina mediante energía proveniente de longitudes de onda corta cercana a la RUV y de la radiación visible (Sancar y Sancar, 1988; Todo et al 1993; Friedberg et al, 1995; Williamson et al, 2001).

En la Región Patagónica se han desarrollado algunos estudios acerca del impacto del cambio en los niveles incidentes de radiación solar y de la temperatura (Gonçalves et al, 2002; Hernandez Moresino y Helbling, 2010; 2011). Sin embargo, hasta el momento son escasas las investigaciones que intentan evaluar el efecto conjunto de ambas variables a diferentes escalas de complejidad en los sistemas vivos (Gonçalves et al, 2010; Häder et al, 2011; Zepp et al, 2011) (Fig. B).

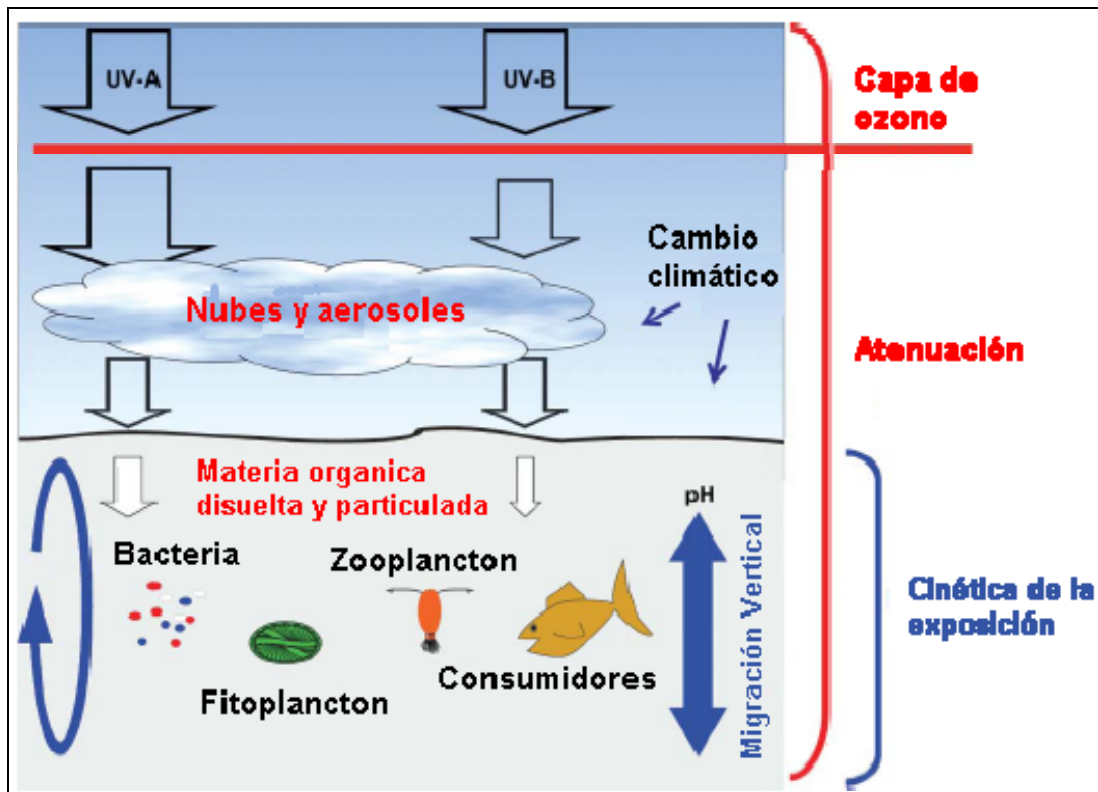


Figura B: Diagrama de la interacción entre el cambio climático y la RUV en ecosistemas acuáticos (Modificado de Gonçalves et al, 2010).

Un aspecto limitante en la prospección del impacto del aumento de la radiación y la temperatura en la región Patagónica ha sido el escaso número de estaciones de monitoreo continuo y hasta la carencia de mediciones puntuales. Una mejora al respecto entre los años 1990 y 2000, fue la instalación de varios instrumentos de alta resolución para registrar los niveles incidentes de radiación solar (por ejemplo, ELDONET; GUV-510) (Orce y Helbling, 1997; Villafañe et al, 2001; Díaz et al, 2006; Häder et al, 2007a). El análisis de las mediciones de irradiancia de UV-B, UV-A y PAR en la Patagonia ha revelado un incremento de sur a norte con una gran variabilidad debido a la nubosidad, a la combinación del ángulo cenital y de la disminución moderada de la capa de ozono (Díaz et al, 1994). La RUV (280-400nm) promedio es más alta en latitudes bajas debido a un menor ángulo cenital (Díaz et al, 2006; Vernet et al, 2009). Específicamente la fracción de la radiación UV-B ha evidenciado un incremento de sur a norte con una marcada variabilidad diaria (Orce y Helbling, 1997; Orce et al, 1997; Villafañe et al, 2002; Häder et al, 2007a). La RUV-A en la región parecería estar más afectada por las condiciones atmosféricas locales (Díaz et al, 2006); mientras que la incidencia del PAR evidenció una gran variabilidad estacional así como un incremento de sur a norte (Orce y Helbling, 1997; Villafañe et al, 2002).

Por otra parte, en la Argentina se ha observado un incremento sostenido en las temperaturas medias mínimas del verano, mientras que las temperaturas máximas estivales han decrecido en la parte norte de Argentina y se incrementaron en el sur (Rusticucci y Barrucand, 2004). En la parte central y norte de Patagonia se registró un aumento de la temperatura de 0.5°C entre 1900 y 1980 en cinco estaciones meteorológicas (Le Houérou, 1996; Labraga y Villalba, 2009). La Patagonia presenta además un incremento en el número de días y noches cálidos en invierno y un decrecimiento del número de días y noches frías durante el verano (Rusticucci y Barrucand, 2004). En general, los incrementos más fuertes de la temperatura atmosférica de la región Patagónica se observan en la parte sur, en la Provincia de Santa Cruz. Este incremento podría acentuarse principalmente durante el verano resultando en un impacto significativo sobre el balance de masa glaciar debido a la pérdida por fusión, fenómeno que ha contribuido dramáticamente al retroceso observado en los glaciares de la región (Fundación Torcuato Di Tella, 2006). Algunos autores predicen también cambios en las precipitaciones, que tendrán una tendencia negativa en la Región Noroeste de la Patagonia (Le Houérou, 1996; Fundación Torcuato Di Tella, 2006).

Actualmente preocupan los efectos potenciales de las interacciones entre del incremento concomitante de radiación solar y el calentamiento global. Se prevé que estas interacciones pueden ser complejas e involucrar procesos químicos y físicos así como también una retroalimentación entre estos (Caldwell et al, 2007; McKenzie et al, 2007; Wilson et al, 2007).

Las latitudes altas y medias de la tierra serán las más afectadas por el cambio climático (Zepp et al, 2007). En particular en Sudamérica, la región Patagónica aparece como una de las áreas focales más relevantes para realizar análisis sobre la interacción de la radiación y temperatura crecientes sobre sistemas vivos. Un aspecto de importancia para predecir los efectos potenciales sobre la biota es conocer las estrategias y la plasticidad de los organismos para enfrentar niveles mayores de RUV y temperatura. En este sentido, la biota acuática patagónica conforma comunidades simples de diversidad baja y alta endemidad, adaptadas a climas templado-fríos y fríos (Marinone et al, 2006). Los copépodos calanoideos del género *Boeckella* (Centropagidae) son un modelo muy interesante para analizar el efecto combinado de los niveles incrementales de la RUV y la temperatura, dada su distribución en ambientes vulnerables, debido a su latitud y/o altitud. Este grupo de especies se distribuye actualmente en Australasia, Islas subantárticas, Península Antártica y en las regiones australes y de altura de Sudamérica, restringiéndose a ambientes con bajas temperaturas y altamente expuestos a la radiación solar. En Sudamérica, *Boeckella* se halla principalmente en la Región Andina del Dominio Austral (Menu-Marque et al, 2000), alcanzando hasta Ecuador y Colombia en ambientes localizados a más de 4000 m.s.n.m.

(Löffler, 1963; Gavia, 1989; Locascio de Mitrovich y Menu-Marque, 1997). En Argentina se distribuyen 17 especies de *Boeckella* de las cuales 7 especies han sido halladas en la Región Patagónica. Estas especies de *Boeckella* han sido objeto de estudios pormenorizados que evidenciaron la gran variedad de adaptaciones que presentan en conjunto para hacer frente a niveles ambientales elevados de radiación solar, entre las que se incluye la migración vertical, la adquisición de compuestos foto-protectores, presencia de mecanismos de foto-reparación y de enzimas antioxidantes (Cabrera et al, 1997; Zagarese et al, 1997a; Rocco et al, 2002; De los Ríos, 2005; Pérez et al, 2006; Pérez 2007; Zagarese et al, 1997b; Zagarese et al, 1998 a y b; Tartarotti et al, 1999; Tartarotti et al, 2000; Helbling et al, 2002; Alonso et al, 2004; Pérez et al, 2006; Souza et al, 2007).

Objetivos

Objetivo general

El objetivo central de este trabajo es analizar los efectos principales e interactivos de la radiación y la temperatura sobre organismos acuáticos de la región patagónica utilizando como modelo de estudio al género *Boeckella*. Debido a que la foto-protección química es una precondition para habitar ambientes con elevada exposición a la radiación solar, la variable respuesta seleccionada es la variación de compuestos foto-protectores, específicamente de los aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) y de los pigmentos carotenoides. Por otra parte, debido a que la síntesis y acumulación de estos compuestos responde como cualquier otro proceso metabólico a la temperatura, se incorpora el análisis del efecto de la temperatura sobre la bio-acumulación. De esta manera se plantea el estudio del efecto concomitante de niveles variables de RUV y temperatura sobre la foto-protección en un grupo de especies con alta especificidad por ambientes con elevada exposición a la radiación solar localizados en climas fríos y templado-fríos.

Objetivos específicos

1. Describir los compuestos foto-protectores (MAAs y carotenoides) presentes en el género *Boeckella*, relacionar su concentración con características ambientales y analizar el efecto de la radiación experimental (PAR+UVA) en la acumulación de estos compuestos (**Capítulo 1**).
2. Establecer el/los patrones de variación de los compuestos foto-protectores en diferentes especies de *Boeckella* en relación con la temperatura y la radiación ultravioleta. Estudiar experimentalmente las variaciones inter e intraespecíficas en la respuesta en la acumulación de MAAs y carotenoides en escenarios variables de temperatura y radiación (**Capítulo 2**).
3. Analizar experimentalmente el efecto de la concentración basal de compuestos foto-protectores sobre la bio-acumulación de MAAs y carotenoides en el género *Boeckella* (**Capítulo 3**).
4. Analizar experimentalmente la tolerancia a la RUV-B en *Boeckella* spp. en un gradiente térmico (5 °C-20 °C) y estudiar el efecto de la temperatura y de la exposición a la radiación PAR+UVA sobre la fecundidad de *Boeckella antiqua* (**Capítulo 4**).

Este trabajo de tesis está organizado en las siguientes secciones:

Introducción general: en esta sección se presentan los antecedentes acerca de la importancia de la temperatura y la radiación solar como factores ecológicos con influencia sobre las propiedades físicas y químicas de los ecosistemas acuáticos y de sus organismos. También se detalla una serie de evidencias e inferencias acerca de las posibles interacciones entre la temperatura y la radiación solar en un contexto de cambio climático global, enfatizando en su impacto potencial en los organismos acuáticos y sus mecanismos de protección química a la exposición a la radiación.

Área de estudio general: se describen las zonas geográficas donde se encuentran incluidos los lagos y lagunas de donde se colectaron las especies del copépodo calanoideo *Boeckella* spp. utilizadas como modelos de estudio en este trabajo.

Materiales y Métodos generales: en esta sección se describen las metodologías generales de recolección, procesamiento de muestras y en algunos casos aclimatación de los organismos para su utilización en los diferentes trabajos que componen esta investigación.

Capítulo 1: En este capítulo se presenta un estudio general o “screening” realizado en seis especies de *Boeckella* spp. colectadas en diversos ambientes para estudiar la presencia natural de compuestos foto-protectores (carotenoides y MAAs) y su relación con características medioambientales. Además, se analiza empíricamente el efecto inductor de la radiación PAR+UVA sobre la acumulación de MAAs y carotenoides en cinco especies de *Boeckella* en un entorno a temperatura constante (12°C).

Capítulo 2: En este capítulo se presenta un estudio pormenorizado del efecto de la temperatura y la radiación PAR+UVA sobre la acumulación de MAAs y carotenoides utilizando cuatro especies del copépodo *Boeckella*. El estudio se llevó a cabo mediante incubaciones experimentales con *Boeckella* spp manipulando dos condiciones de radiación (PAR+UVA y Oscuridad) en un gradiente térmico de 5 a 20°C (5, 8, 12, 16, 20°C). Se determinaron los cambios en la concentración de compuestos luego de las incubaciones y se estudió su relación con la temperatura mediante modelos cinéticos de primer orden obtenidos en base a los resultados experimentales. Por último, se analizó la existencia de patrones de foto-protección con relación a la temperatura en las cuatro especies de *Boeckella*.

Capítulo 3: En este capítulo se analizó el efecto de la concentración basal de compuestos foto-protectores en la acumulación de MAAs y carotenoides en dos especies de *Boeckella*. Para este estudio se realizaron experimentos en dos fases, una de aclimatación en oscuridad para inducir la pérdida de compuestos foto-protectores a fin de obtener copépodos con diferentes concentraciones basales. En la fase siguiente se realizaron experimentos de bio-acumulación con los copépodos con diferente concentración basal de compuestos foto-protectores a 12°C y en condiciones de PAR+UVA y oscuridad.

Capítulo 4: En este capítulo se estudio el efecto de la exposición a la RUV-B en el gradiente térmico mencionado anteriormente en dos especies de *Boeckella* con la finalidad de analizar la existencia de una interacción entre la RUV-B y la temperatura sobre la tolerancia de los copépodos. Por otra parte, se estudio empíricamente el efecto de la exposición a la radiación PAR y PAR+UVA sobre la producción de huevos de *Boeckella antiqua* en el gradiente térmico de 5 a 20°C. Este trabajo tuvo la finalidad general de verificar la existencia de un impacto interactivo entre la radiación y la temperatura en parámetros poblacionales de *Boeckella*.

Área de estudio general

Para llevar a cabo este estudio se obtuvieron ejemplares de *Boeckella* spp. de poblaciones de distintos cuerpos de agua localizados entre los paralelos 39 y 41°S y los meridianos 70 y 71° O, en el Norte de la Región Andino-Patagónica, en las provincias de Neuquén y Río Negro. La región posee numerosos cuerpos de agua, tanto profundos como someros, localizados a diferentes alturas y entornos. El área de estudio comprende cuerpos de agua localizados en un gradiente longitudinal oeste-este, caracterizado por un relieve montañoso al Oeste y un cambio abrupto hacia el Este con sierras y mesetas recortadas que descienden hacia los valles de los principales ríos, conocido como área extra-andina (Correa, 1998).

El área de estudio comprende tres provincias fitogeográficas: i) la provincia Altoandina, ii) la Provincia Subantártica y iii) la Provincia Patagónica. La Provincia Altoandina abarca las altas montañas de la cordillera andina y se caracteriza por la presencia bosques achaparrados de Lengua (*Nothofagus pumilio*) y algunas gramíneas xéofilas rasteras o en forma de cojín. La Provincia Subantártica presenta dos distritos característicos: el Distrito de los bosques perennifolios caracterizado por bosques de Coihue (*Nothofagus dombeyi*), y el distrito de los bosques caducifolios cuyas principales especies son Ñire (*Nothofagus antarctica*) y la Lengua, mientras que la porción septentrional se puede encontrar Ciprés (*Austrocedrus chilensis*). Otras especies de importancia del bosque mixto de la Provincia Subantártica son el Radal (*Lomatia hirsuta*), la Laura (*Schinus patagonicus*) y el Maitén (*Maitenus boaria*) (Cabrera y Willink, 1980; Correa, 1998). Por último, en la Provincia Patagónica hallamos dos distritos: el Distrito de la Payunia que se ubica en una meseta basáltica caracterizada por matorrales de Neneo (*Mulinum spinosum*), y especies arbustivas tales como el Calafate enano (*Berberis empetrifolia*), el Mosaiquillo (*Baccharis magellanica*) y *Senecio* spp, entre otras. En el Distrito de Patagonia septentrional también conocido como Región Extra-Andina, predomina una vegetación esteparia de gramíneas tipo coirón (*Stipa speciosa*, *S. humilis*, *Poa ligularis*) y también arbustos como el Palo piche (*Fabiana imbricata*), Michay (*Berberis darwinii*) y el Neneo entre otros (Cabrera y Willink, 1980; Correa, 1998) (Fig. C).

El clima del área es templado o templado frío, influenciado por el ingreso de masas de aire que penetran a la región por el oeste. La Cordillera de los Andes es una importante barrera para estas masas húmedas que penetran desde el Océano Pacífico, las cuales descargan su humedad a ambos lados del cordón montañoso, generando al este de la misma un gradiente de precipitación que va desde más de 3500 mm en los faldeos cordilleranos, hasta casi los 500 mm a

pocos kilómetros hacia el este, ya sobre el área de sierras y mesetas patagónicas. El volumen de las precipitaciones es mayor en el otoño e invierno (Acevedo et al, 1995; Paruelo et al, 1998). Sin embargo, en esta región las lluvias se producen durante todo el año, inclusive en el verano (Cabrera y Willink, 1980). La temperatura del área de estudio es de aproximadamente 8°C de promedio anual el área de Bariloche y sus alrededores, mientras que hacia el norte en el Parque Nacional Laguna Blanca, la temperatura anual media es de 14°C (Correa, 1998). Otra característica importante de la Región Patagónica es la presencia de vientos provenientes del oeste que varían entre 15 y 22 km h⁻¹ de promedio anual (Paruelo et al, 1998).

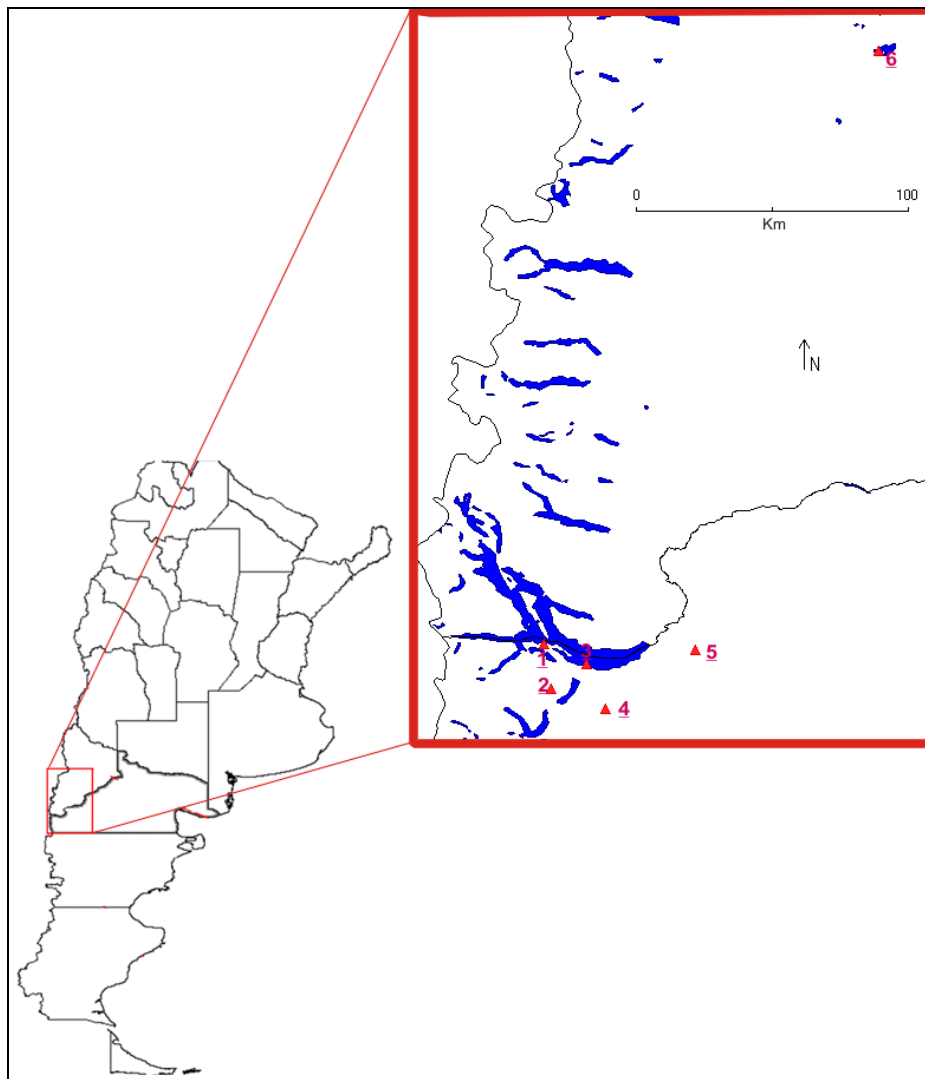


Figura C: Área de estudio en la Región Patagónica: 1) Lago Morenito (Provincia Subantártica, Distrito de bosque perennifolio); 2) Laguna Toncek (Provincia Altoandina); 3) Laguna teleférico (Provincia Subantártica, Distrito de bosque perennifolio), 4) Laguna Verde (Provincia Subantártica, Distrito de bosque caducifolio), 5) Laguna Los Juncos (Provincia Patagónica, Distrito Septentrional) y 6) Laguna Blanca (Provincia Patagónica, Distrito de la Payunia).

Materiales y Métodos Generales

Para los estudios particulares que se presentan en todos los capítulos se utilizó la metodología de campo y laboratorio que se describe a continuación. Los aspectos metodológicos específicos de cada estudio se describen en detalle en cada capítulo.

Colecta de muestras

En cada localidad mencionada en el área de estudio se registró la localización geográfica, la altura (GPS Garmin) y parámetros físico-químicos del agua tales como el pH (Hanna HI8424), la conductividad (Orion 115), la temperatura (Hanna HI8424) y el oxígeno disuelto (Hanna HI9142). También se realizaron mediciones del clima óptico subacuático en cada cuerpo de agua, mediante un radiómetro sumergible (Ocean Optic UBS2000). Se midieron espectros de radiación a diferentes profundidades según el cuerpo de agua, los cuales fueron utilizados para determinar el coeficiente de atenuación (k_d) de diferentes fracciones de la radiación solar incidente. Estos coeficientes fueron calculados mediante la regresión de los valores de irradiancia en función de la profundidad según Perez et al (2010). Además, en cada sitio se colectaron muestras de agua a fin de obtener parámetros limnológicos adicionales, tales como la concentración de carbono orgánico disuelto (COD). En el laboratorio se filtraron las muestras de agua a través de filtros GF/F y se obtuvieron los espectros de absorbancia mediante con un espectrofotómetro UV-visible Hewlett Packard P 8453-E. El cálculo de la concentración de COD utilizando las absorbancias fue realizado según la metodología propuesta por Morris et al (1995) y Pérez (2007).

En cada ambiente se tomaron muestras de zooplancton que fueron fijadas con formol al 4%. La identificación taxonómica del zooplancton se realizó en cámaras de Bogorov de 5 mL, bajo microscopio estereoscópico (Olympus Z30), mientras que los rotíferos y los estadios de nauplii y copepodito fueron identificados y contabilizados en cámaras de Sedgwick-Rafter de 1 mL, bajo microscopio (Olympus BX50). Adicionalmente en los cuerpos de agua con una profundidad mayor a 2 m se colectaron muestras en profundidad mediante el uso de una botella limnológica Schinder-Patalas de 12 L con el fin de determinar la distribución y la abundancia de copépodos calanoideos en la columna de agua.

Las muestras de zooplancton vivo fueron obtenidas mediante barridos horizontales con una red de arrastre de 200 µm de poro. La captura concentrada de la red se colocó en baldes con agua y luego fue trasvasada a bidones de policarbonato de 6 L para su traslado al Laboratorio de Fotobiología del INIBIOMA. Una vez en el laboratorio, la muestra se dividió en varios recipientes conteniendo agua del Arroyo Gutiérrez (que alimenta al laboratorio) filtrada por una malla Nytex de 40 µm de abertura de poro. Posteriormente se realizó la separación de hembras y machos de *Boeckella* spp. de la muestra concentrada. El procedimiento de separación consistió en remover individualmente de la muestra a los copépodos mediante una leve succión con una pipeta Pasteur. Los mismos se colocaron en frascos de vidrio de 2.5 L conteniendo agua filtrada con el agregado del alga flagelada *Chlamydomonas reinhardtii* (cultivos de laboratorio en medio MBL), manteniéndose de esta manera durante 24 h. El régimen térmico de estos cultivos se estableció teniendo en cuenta la temperatura que se aplicaría en los experimentos (5, 8, 12, 16 y 20 °C) y con la finalidad de aclimatar a los copépodos a la temperatura experimental. Se aplicó un foto-período de 12h Luz: 12h Oscuridad.

Con la finalidad de analizar la presencia de compuestos foto-protectores, parte de los copépodos provenientes de las muestras concentradas fueron colocados en una cápsula de petri conteniendo agua destilada para remover partículas adheridas. Luego se separaron en grupos de entre 30 a 200 individuos (dependiendo de la especie) y finalmente se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml que fueron mantenidos en un freezer a -20°C hasta el análisis de los compuestos foto-protectores. Por otra parte, para estimar el peso seco se separaron dos sub-muestras de 200 (*B. antiqua*, *B. gracilis*, *B. brevicaudata*, *B. gibbosa* y *B. brasiliensis*) y de 1000 individuos (en las dos poblaciones distintas de *B. gracilipes*) machos y hembras colectados al azar en un filtro GF/C prepesado. Posteriormente los filtros se colocaron en estufa a 60°C por 3 días y luego se registró el peso en una balanza analítica Kern. Este el valor de peso seco fue considerado para expresar las concentraciones de compuestos foto-protectores por unidad de biomasa.

Análisis de pigmentos foto-protectores

Aminoácidos tipo micoporinas (MAAs)

La presencia de aminoácidos tipos micoporinas en *Boeckella* spp. se estudio alternativamente mediante dos técnicas. La técnica espectrofométrica permitió detectar la presencia de MAAs y obtener un perfil comparativo de concentración de los mismos en diferentes especies de *Boeckella* spp. y entre tratamientos experimentales en un misma especie. La técnica

del HPLC (High Performe Liquid Cromatography) permitió la determinación de las diferentes especies de MAAs a la vez que permitió cuantificar la concentración de los mismos.

Técnica espectro-fotométrica

La extracción de Aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) de muestras de *Boeckella* spp. se realizó mediante la técnica de Sommaruga y García-Pichel (1999). Las muestras provenientes de los diferentes experimentos de bio-acumulación se retiraron del freezer a -20°C al momento de la extracción y en condiciones de baja iluminación. La muestra de *Boeckella* spp. contenida en cada eppendorf se colocó en un mortero, se agregó un volumen conocido de Metanol (CH_3OH) al 20% y se maceró posteriormente. El material resultante del macerado se colocó en un tubo Falcon de 12 ml a 45°C durante 2 h en un baño térmico y finalmente se conservó por 24 h a 8°C en heladera y en oscuridad. Trascorrido ese período de tiempo se filtró el sobrenadante de cada tubo a través de un filtro GF/F de $0.47\ \mu\text{m}$. El extracto obtenido se colocó en una cubeta de cuarzo de 10 mm de paso óptico y se procedió a leer la absorbancia en un espectrofotómetro UV-visible Hewlett Packard P 8453-E. El máximo de absorción (320-335 nm), corregido por la línea de base, obtenido de la lectura del espectro de absorbancia de cada muestra se normalizó con el peso seco de la muestra, resultando la concentración de MAAs en unidades de absorbancia (AU) por unidad de peso seco (P.S.), AU mg^{-1} P. S.

Técnica de HPLC

La extracción de MAAs para la determinación con la técnica HPLC se realizó siguiendo la metodología propuesta por Tartarotti y Sommaruga (2002) y Tartarotti et al (2004). Las muestras conservadas en freezer a -20°C , se liofilizaron en el laboratorio de Microbiología y Biotecnología Aplicada (INIBIOMA). Posteriormente, se realizó la extracción de los MAAs de cada muestra utilizando un volumen conocido de Metanol (CH_3OH) 20% grado HPLC. Posteriormente se aplicó ultrasonido durante un minuto con un ciclo de $0.5\ \text{min}^{-1}$ y una amplitud de 20% con un sonicador Sonic Vibra Cell. Luego se aplicó al extracto un baño térmico (45°C) durante 2 h en oscuridad y, trascurrido ese tiempo, se centrifugó el extracto en una micro-centrífuga a 10000 r.p.m durante 20 segundos. El sobrenadante obtenido se extrajo cuidadosamente con una pipeta y se colocó en un tubo eppendorf nuevo. El pellet remanente luego de la centrifugación, fue sometido a una nueva extracción con un volumen conocido de Metanol 20%, la aplicación del baño térmico por 2

h, repitiéndose el proceso de centrifugado. El sobrenadante resultante de esta segunda extracción se colocó en el mismo recipiente que el extracto de la primera extracción. La lectura del extracto se realizó con un equipo de cromatografía Äktabasic; Amersham©, equipado con una columna Phenomenex C-8 de 5 mm de tamaño de poro (250 x 4.6 mm de diámetro interno), protegida con una pre-columna Brownlee RP-8. Las muestras se analizaron con una fase móvil de Metanol acuoso 25% (grado HPLC) (vol: vol) y 0.1% de ácido acético a un flujo de 0.79 ml·min⁻¹. La concentración de MAAs se calculó a través del área del pico máximo registrado en el HPLC a 310, 332 y 334 nm, utilizando los coeficientes de extinción publicados de cada compuesto (Takano et al, 1978; Ito y Hirata, 1977; Dunlap y Chalker, 1986; Tartarotti et al, 2001). La concentración de MAAs se normalizó al peso seco de la muestra en mg, resultando las unidades en µg de MAAs·mg⁻¹ P.S.

Pigmentos carotenoides

La extracción de pigmentos carotenoides se realizó según la técnica propuesta por Hairston (1979a). El pellet remanente después de la extracción de MAAs y determinación de su concentración mediante espectrofotometría fue resuspendido en 5 ml de etanol (CH₃CH₂OH) al 96%, manteniéndose luego a 8°C en oscuridad durante 24 h. Posteriormente, se centrifugó, se retiró el sobrenadante y se lo colocó en un tubo de centrifuga limpio. El pellet resultante fue sometido a una nueva extracción repitiéndose el procedimiento descrito anteriormente. Trascorridas 24 h de incubación se realizó una nueva centrifugación y el sobrenadante obtenido se colocó junto con el sobrenadante de la primera extracción. Posteriormente, se filtró todo el extracto por un filtro GF/F Whatman, se colocó en una cubeta de cuarzo de 10 mm de paso óptico y se realizó la lectura de la absorbancia espectrofotométrica a 478 nm (Hewlett Packard P 8453-E), longitud de onda que corresponde al máximo de absorción de la astaxantina. Finalmente se calculó la concentración de carotenoides utilizando el coeficiente de extinción de la astaxantina (2500) según Hairston (1979a), normalizándose la concentración al peso de la muestra de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$[\text{Carotenoides}] = \frac{\text{Absorbancia}_{478} \times \text{Volumen extraccion} \times 10^4}{\text{Coeficiente de extinción} \times \text{Peso seco de la muestra}}$$

Capítulo 1

Determinación y caracterización de los compuestos foto-protectores en Boeckella spp

1.1 Introducción

En el zooplancton se reconocen tres compuestos foto-protectores que actúan como pantallas solares y/o antioxidantes: la melanina, los carotenoides y los aminoácidos tipo micosporinas (MAAs). La melanina es un pigmento derivado de la tirosina y compuestos relacionados mediante transformaciones complejas (Blois, 1978; Sugumaran, 1991), que se acumula en el exoesqueleto o cutícula de los cladóceros. Si bien la función primaria de las melaninas es la de actuar como pantallas solares, algunos de sus precursores actuarían como antioxidantes, dada su capacidad de capturar radicales libres (Blois, 1978; Herbert y Emery, 1990). En los cladóceros por lo general la melanina está distribuida en zonas expuestas a la radiación como la parte dorsal y ventral del caparazón, la cabeza y las antenas (Hobæk y Wolf, 1991), lo cual reduce la transmitancia de la radiación ultravioleta (RUV) (Rhode et al, 2001; Fig. 1.1). La melanización en algunas especies de cladóceros ha sido considerada como una condición para la colonización de ambientes expuestos a niveles elevados de radiación, como por ejemplo las lagunas someras del ártico (Rautio y Korhola, 2002). Los clones melanizados de *Daphnia pulex* habitan preferencialmente las capas superficiales de los cuerpos de agua, mientras que los clones no-melanizados evitan las zonas expuestas a la radiación (Rhode et al, 2001).

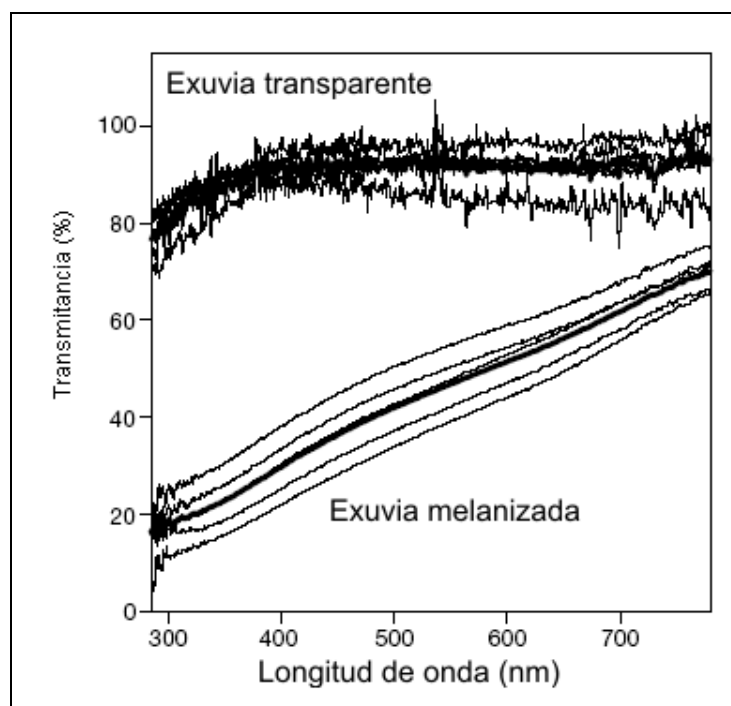


Figura 1.1: Espectro de transmitancia de exuvias melanizadas y no-melanizadas de *Daphnia pulex* (Modificado de Rhode et al, 2001).

Los carotenoides son los pigmentos más ampliamente conocidos. Son sintetizados por bacterias, algas, hongos y plantas y confieren una coloración amarillo-anaranjado-rojiza. Pertenecen a la familia de los terpenos y están formados por al menos 8 unidades de isopreno, es decir, 40 átomos de carbono (Fig. 1.2). Los animales no pueden sintetizarlos y por lo tanto los adquieren a través de la dieta. Dentro del zooplancton de agua dulce los carotenoides están presentes en diversos grupos, encontrándose en ciliados, rotíferos y crustáceos, copépodos y cladóceros. Los carotenoides tienen varias funciones entre las que se puede mencionar el ser precursores de la vitamina A y actuar como antioxidantes neutralizando los radicales libres, las especies reactivas de oxígeno y reduciendo el impacto de los compuestos aromáticos policíclicos de carbono (ROS y APH respectivamente por sus siglas en inglés) producidas como consecuencia de la exposición a la RUV (Goodwin, 1986).

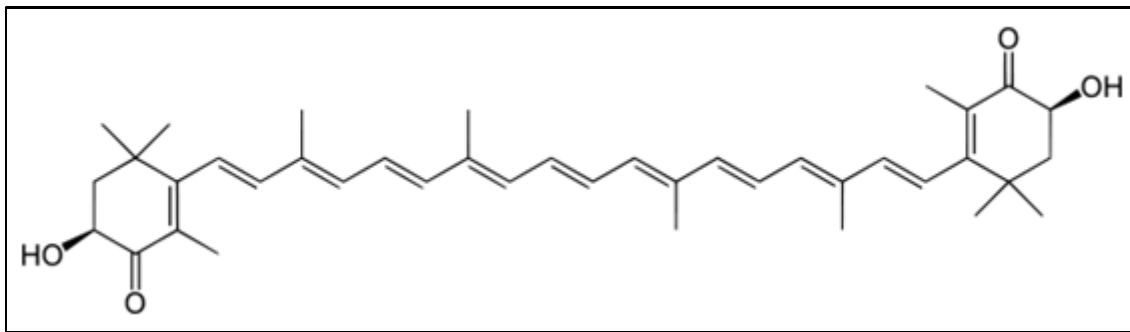


Figura 1.2: Estructura molecular del compuesto carotenoide Astaxantina (Goodwin, 1986).

En particular en los copépodos, la coloración rojiza se debe principalmente al compuesto astaxantina (Fig. 1.3) y a sus ésteres (Hairston, 1976; Hairston, 1979a; Hairston, 1979b; Andersson et al, 2003; Moeller et al, 2005; Høleten et al, 2009; Sommaruga, 2010). También se han encontrado copépodos verde-azulados cuya coloración resulta de la unión de los carotenoides con una proteína (Cheesman et al, 1967). En ambientes de altura con elevada exposición a la RUV y sin depredadores visuales predominan las poblaciones de copépodos altamente coloreados (Ringelberg y Hallegraeff, 1976; Hairston, 1979a; Byron, 1981; Hansson, 2000; Hansson, 2004; Persaud et al, 2007). Los carotenoides son transferidos a los huevos y a las larvas nauplii que eventualmente pueden presentar una coloración más intensa que otros estadios de desarrollo (Hairston, 1976; Lotocka et al, 2004). Si bien la bio-acumulación de los carotenoides en el zooplancton es a través de la dieta (Hairston, 1979a; Byron, 1981; Lotocka y Styczyńska-Jurewicz, 2001; Lotocka et al, 2004; Moeller et al, 2005; Hansson et al, 2007; Rhodes et al, 2007;

Sommaruga et al, 2010), la concentración de estos pigmentos en este grupo de animales no necesariamente refleja los carotenoides presentes en el fitoplancton, sino que depende de factores físicos como el nivel de exposición a la radiación, y biológicos, como la coexistencia con depredadores visuales (Hairston, 1979a; Ringelberg, 1981; Hansson, 2000; Hansson, 2004; Hansson y Hylander, 2009a). En este sentido, se conoce que la acumulación de carotenoides en los copépodos del género *Diaptomus* que coexisten con peces planctófagos resulta en una solución de compromiso en respuesta a la necesidad de foto-protección y a la presión de depredación (Hansson 2000; Hansson, 2004).

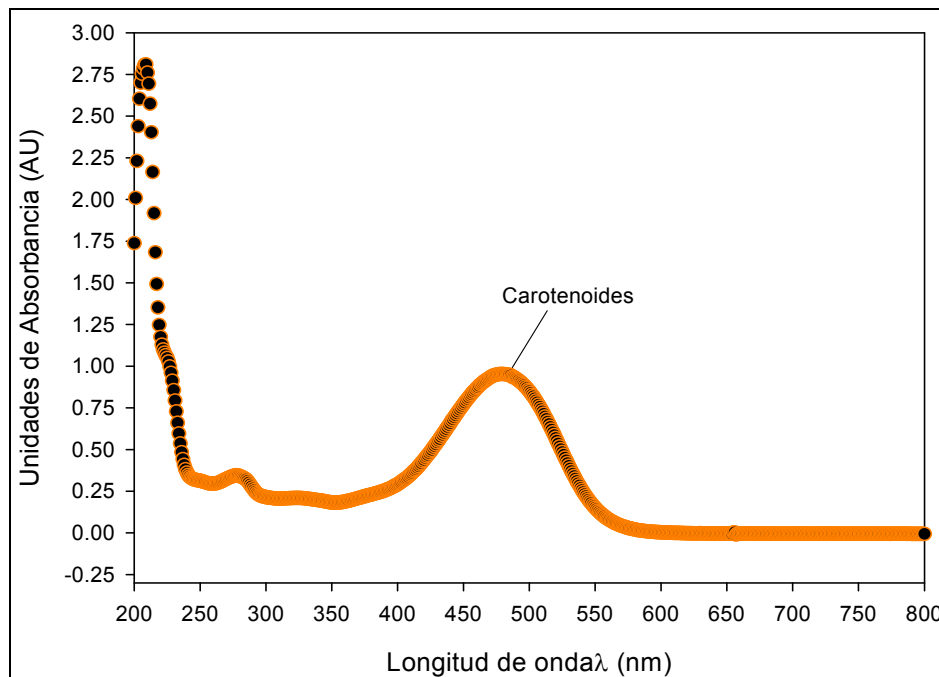


Figura 1.3: Espectro de absorción del compuesto carotenoides Astaxantina.

Los MAAs son compuestos foto-protectores incoloros que se encuentran en una gran variedad de organismos incluyendo bacterias (Oren y Gunde-Cimerman, 2007), hongos (Libkind et al, 2004; Sommaruga et al, 2004), algas (Sommaruga y García-Pichel, 1999; Banaszack et al 2000;) y metazoos entre los que se pueden mencionar rotíferos (Banaszack, 2003; Obertegger et al, 2008), corales (Dunlap y Chalker, 1986; Dunlap y Shick, 1998; Shick y Dunlap, 2002), anémonas, (Karentz et al, 1991a, Shick y Dunlap, 2002), crustáceos (Tartarotti et al, 2001; Tartarotti et al, 2004; Hansson y Hylander, 2009a) y peces (Shashar et al, 1998). La función foto-protectora de los MAAs ha sido inferida a partir de sus propiedades de absorción en el rango de la RUV, con máximos entre 310 y 360 nm (Fig. 1.4) (Dunlap y Shick, 1998; Shick y Dunlap, 2002). Particularmente el MAAs conocido como Porphyra-334, se ha utilizado como escudo de

fluorescencia, demostrándose que no genera radicales potencialmente dañinos luego de la exposición a la RUV (Conde et al, 2000).

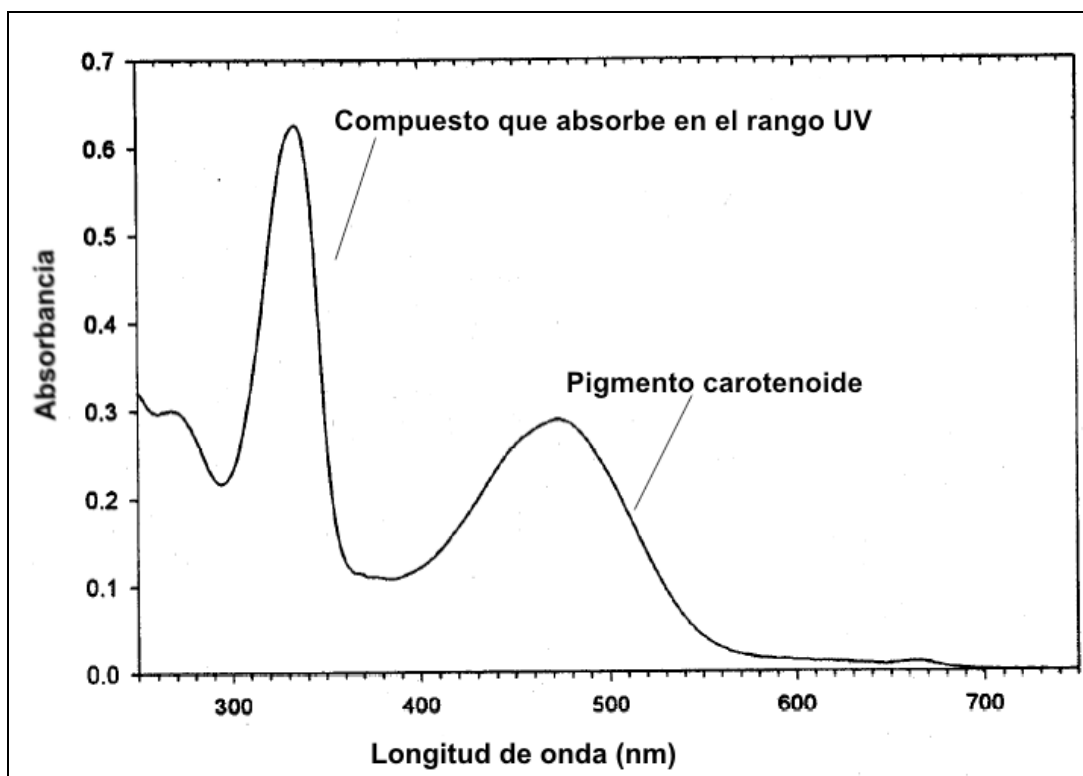


Figura 1.4: Espectro de absorción de un aminoácido tipo micospolina o MAAs, compuesto fotoprotector con función de pantalla solar y de un pigmento carotenoides en *Cyclops abyssorum* (Modificado de Sommaruga y García-Pichel, 1999).

Los MAAs son solubles en agua, tienen bajo peso molecular y altos coeficientes de extinción molar. La molécula está constituida por un anillo de ciclohexenona sustituido por un compuesto nitrogenado (aminoácidos o amino-alcoholes), siendo la glicina el aminoácido más frecuente en los MAAs (Fig. 1.5) (Favre-Bonvin et al, 1987; Shick y Dunlap, 2002; Cockell y Knowland, 1999; Sommaruga y García-Pichel, 1999). Su principal función es la de actuar como pantalla solar, absorbiendo diferencialmente a la RUV (Adams y Shick, 1996; Cockell y Knowland, 1999; Sommaruga y García-Pichel, 1999; Shick y Dunlap, 2002; Hansson y Hylander, 2009a). Se ha sugerido también que los MAAs actuarían como antioxidantes (Dunlap y Yamamoto, 1995), que resultarían eficientes en el almacenamiento interno de nitrógeno (Oren y Gunde-Cimerman, 2007) y que intervendrían en procesos reproductivos (Bandaranayake et al, 1997).

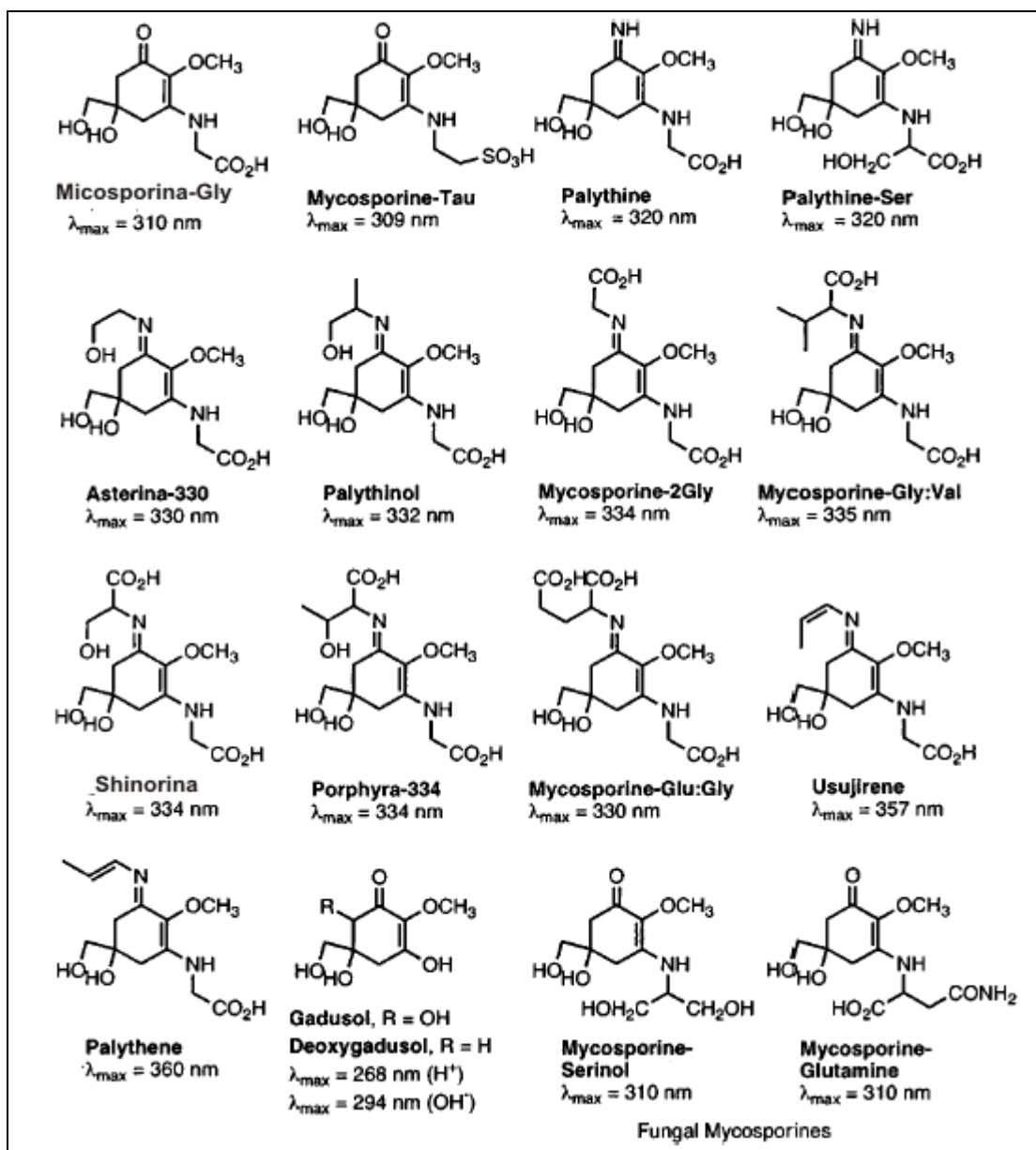


Figura 1.5: Estructuras químicas y máximos de absorción de los aminoácidos tipo micosporinas o MAAs (modificado de Shick y Dunlap, 2002).

Los aminoácidos tipo micosporinas se producen a través de la ruta metabólica del ácido “shikimico” (Favre-Bonvin et al, 1987; Shick y Dunlap, 2002). Esta ruta metabólica se encuentra en bacterias, hongos y algas (Favre-Bonvin et al, 1987; Dunlap y Shick, 1998; Cockell y Knowland, 1999; Karentz et al, 1991a; García-Pichel et al, 1993; Sommaruga y García-Pichel, 1999; Shick y Dunlap, 2002; Libkind et al, 2004). Sin embargo, estudios recientes presentan una ruta alternativa para la producción de MAAs, que incluye un mecanismo inusual de giros de enzimas comunes (Balskus y Walsh 2010; Schmitd, 2011).

Por otra parte, se han descubierto genes que contienen información sobre la ruta del ácido “shikimico” en el metazoo *Nematostella vectensis* (Starcevic et al, 2008) y en el coral *Acropora microphthalma* (Starcevic et al, 2010). Se acepta que los animales en general adquieren los MAAs a través de la dieta como se ha observado en diferentes organismos como por ejemplo en erizos de mar, krill, corales, anémonas y peces entre otros (Chalker et al, 1988; Stochaj et al, 1994; Carroll y Shick, 1996; Mason et al, 1998; Bandaranayake y Des Rocher, 1999; Newman et al, 2000; Carefoot et al, 2000; Moeller et al, 2005; Hylander y Jephson, 2010). Además, existen algunas evidencias que sugieren que la vía de adquisición de los MAAs incluiría algún organismo endosimbionte unicelular autótrofo, como por ejemplo *Symbiodium* (Banaszak y Trench, 1995; Carroll y Shick, 1996; Shick et al, 1999; Shick y Dunlap, 2002; Banaszak et al, 2000) y/o a la presencia de ciertas bacterias (Shick et al, 1992; Dunlap y Shick 1998; Shick y Dunlap, 2002; Yakovleva y Baird, 2005).

En particular en los copépodos planctónicos se ha observado que algunas especies como *Leptodiaptomus minutus* presentan una acumulación preferencial de MAAs (Moeller et al, 2005; Persaud et al, 2007), mientras que otras especies como *Arctodiaptomus jurisowitchi* acumulan principalmente carotenoides (Sommaruga, 2010). Particularmente en el género de copépodos calanoideos *Boeckella* se ha verificado una relación positiva entre la concentración de MAAs y la altitud del hábitat, lo cual es indicativo de su rol foto-protector (Tartarotti et al, 2001; Tartarotti et al, 2004; Persaud et al, 2007). Por otra parte, evidencia empírica indica claramente que en algunas especies de *Boeckella* la bio-acumulación de MAAs es efectivamente inducida tanto por la radiación ultravioleta como por la radiación visible (Pérez et al, 2006; Pérez, 2007).

1.2 Objetivos

1- Describir los compuestos foto-protectores MAAs y carotenoides presentes en 6 especies del género *Boeckella* (*B. antiqua*, *B. brasiliensis*, *B. gracilis*, *B. brevicaudata*, *B. gracilipes*, y *B. gibbosa*) que habitan lagos y lagunas patagónicas con diferentes características ecológicas. Relacionar la concentración de los compuestos foto-protectores con características físico-químicas de los ambientes.

2- Analizar experimentalmente el efecto inductor de la radiación PAR+UVA sobre la bio-acumulación de MAAs y de pigmentos carotenoides en diferentes especies de *Boeckella* (*B. antiqua*, *B. gracilis*, *B. brevicaudata*, *B. gracilipes*, y *B. gibbosa*).

Hipótesis de Trabajo

1- La concentración de compuestos foto-protectores, MAAs y carotenoides, en el género *Boeckella* se relaciona con variables físico-químicas del hábitat.

2- La acumulación de MAAs y carotenoides en *Boeckella* spp. puede ser inducida mediante la exposición a la radiación PAR+UVA.

3- La plasticidad de la capacidad de acumulación de compuestos foto-protectores en *Boeckella* puede variar de manera interespecífica e intraespecífica.

1.3 Especies analizadas

Descripción general de los compuestos foto-protectores y lugar de procedencia de los individuos

Para describir los compuestos foto-protectores, MAAs y carotenoides, en el género *Boeckella*, se estudiaron 6 especies que se distribuyen en el área geográfica descrita en la sección de área de estudio general. Las especies de *Boeckella* consideradas para el relevamiento de compuestos foto-protectores fueron: *B. antiqua*, *B. brasiliensis*, *B. gracilis*, *B. brevicaudata*, *B. gracilipes*, y *B. gibbosa* (Fig. 1.6). En la tabla 1.1 se presenta la ubicación y una serie de características ecológicas relevantes de los lugares de procedencia de cada especie. Los ambientes donde se colectaron las especies de *Boeckella* analizadas en esta tesis se encuentran entre los 39 y 41° S y entre los 70 y 71° O y pueden clasificarse como lagunas de meseta (Los Juncos y Laguna Blanca), lagunas de altura (Laguna Toncek y Laguna Verde) y cuerpos de agua pedemontanos (Lago Morenito y Laguna Teleférico) (Fig. 1.7). En las lagunas de meseta *Boeckella* spp. alcanza abundancias poblacionales altas desde el otoño hasta mediados de la primavera. En las lagunas de altura los copepoditos IV y/V de *Boeckella* atraviesan períodos prolongados bajo el hielo, desde el otoño hasta mediados de la primavera. En lagos pedemontanos *Boeckella* desarrolla abundancias elevadas durante el otoño e invierno, sin embargo, suele estar presente a lo largo de todo el año. La colecta de *Boeckella* spp. se llevó a cabo durante períodos de máxima abundancia poblacional.

Teniendo en cuenta aquellas características ambientales que se reconocen como determinantes de la foto-protección, cabe mencionar que los ambientes incluidos en este estudio se encuentran en un gradiente de altura de 758 a 1750 m.s.n.m y de profundidad de 1 a 15 m. Los niveles de penetración de la luz en los distintos ambientes son contrastantes como se refleja en sus coeficientes de atenuación, particularmente de la fracción UV (K_{d320}), que fluctuaron entre 0.61 y 93 m^{-1} . Los niveles de carbono orgánico disuelto (COD) variaron en el gradiente ambiental entre 0.5 y 35 $mg\ l^{-1}$. Asimismo, los diferentes ambientes presentaron valores contrastantes en variables físico-químicas como el pH (6.1-9.3), y la conductividad (12.3 y 461 $\mu S\ cm^{-1}$) (Tabla 1.1).

Las especies *B. antiqua* y *B. brasiliensis* se encuentran en lagunas muy someras de meseta, que característicamente presentan una elevada turbidez y concentraciones altas de COD. *B. gracilis* y *B. brevicaudata* coexisten en un cuerpo de agua pedemontano turbio, muy somero y temporario. *B. gibbosa* se encuentra restringida a lagunas de altura extremadamente

transparentes, mientras que *B. gracilipes* explota tanto lagunas de altura como lagos someros pedemontanos con elevada transparencia (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Especies de *Boeckella* incluídas en el estudio de los compuestos foto-protectores, lugar de procedencia, características ambientales y climas ópticos. Datos propios y publicados en ^a Morris et al 1995, ^b Alonso et al 2004, ^c Perotti et al 2005, ^d Tartarotti et al 2004, ^e Modenutti 1993.

Especie	Lugar	Ubicación	Altura (m.s.n.m.)	Zmax (m)	pH	Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	COD (mg L^{-1})	Kd ₃₂₀ (m^{-1})	Kd _{PAR} (m^{-1})
<i>B. antiqua</i>	Los Juncos	41°03'S, 71°00'O	928	1	9.27±0.65	461.79 ± 109.27	35.95	93	5.16
<i>B. gracilis</i> <i>B. brevicaudata</i>	Teleférico	41°07'S, 71° 22'O	816	1	7.09±0.17	183 ± 42.12	4.42-6.77	56	1.33
<i>B. gracilipes</i>	Verde	41° 16'S 71° 18'O	1545	5	7.28±0.62	28.96± 2.55	1.23-1.95	2.23	0.32
<i>B. gracilipes</i>	Morenito	41° 03'S, 71° 30'O	758	12	7.6±0.33	69.65± 2.33	1.8-3	2.5	0.84
<i>B. brasiliensis</i>	Blanca	39°03'S, 70°23'O	1293	15	9.29 ^c	1022 ^c	11.58	19.14	1.65
<i>B. gibbosa</i>	Toncek	41°12'S, 71°29'O	1750	12	6.1 ^e	12.3 ^d	0.49 ^a	0.61 ^a	0.16 ^a



Figura 1.6: Especies de *Boeckella* incluidas en el estudio de compuestos foto-protectores. Diferentes coloraciones de: a) *B. antiqua*, b) *B. brasiliensis*, c) *B. gracilis*, d) *B. brevicaudata*, e) *B. gracilipes*, y f) *B. gibbosa*.



Figura 1.7: Ambientes de procedencia de *Boeckella* spp: a) Laguna Los Juncos (*B. antiqua*), b) Laguna Blanca (*B. brasiliensis*), c) Laguna Teleférico (*B. gracilis* y *B. brevicaudata*), d) Laguna Verde (*B. gracilipes*), e) Lago Morenito (*B. gracilipes*) y f) Laguna Toncek (*B. gibbosa*).

1.4 Métodos experimentales y analíticos

Relevamiento de compuestos foto-protectores en *Boeckella* spp.

En los ambientes descritos anteriormente se colectaron muestras vivas de 6 especies: *B. antiqua*, *B. gracilis*, *B. brevicaudata*, *B. gracilipes*, *B. gibbosa* y *B. brasiliensis*, con la finalidad de determinar la presencia, composición y concentración de sus compuestos foto-protectores (MAAs y carotenoides). Parte de la muestras fueron preparadas para el estudio de los compuestos foto-protectores como se detalló en los métodos generales. En el laboratorio, estas muestras (2-4 réplicas por especie y/o población) fueron tratadas a fin de extraer los compuestos foto-protectores para su análisis mediante las técnicas espectrofométricas y HPLC.

Efecto inductor de la exposición a la radiación PAR+UVA

La colecta de los copépodos y las condiciones de aclimatación se describieron en la sección de materiales y métodos generales. Con la finalidad de determinar la capacidad de bio-acumulación de pigmentos foto-protectores en diferentes especies de *Boeckella* se realizaron experimentos de laboratorio con individuos provenientes de poblaciones de otoño e invierno. Este estudio experimental se realizó con 5 especies (*B. antiqua*, *B. gracilis*, *B. brevicaudata*, *B. gibbosa* y dos poblaciones alopátricas de *B. gracilipes*). Las incubaciones experimentales consistieron en la exposición de *Boeckella* spp. en dos tratamientos de radiación (PAR+UVA y oscuridad).

Los experimentos se realizaron en frascos de cultivos de 2 L a temperatura constante (12°C), en una cámara de incubación Sanyo, con dos tratamientos de radiación (Fig. 1.8). Un tratamiento consistió en la aplicación de radiación PAR+UVA provista por 10 tubos fluorescentes y 2 tubos Q-Panel 340 (Fig. 1.9). Este tratamiento se denominó PAR+UVA, sin embargo también incluyó una pequeña dosis de UV-B (Fig. 1.10). Específicamente la irradiancia de UV-B fue 0.095 W m⁻², la de UV-A fue 3.5 W m⁻² y la de PAR fue 7.851 E+13 μmol de cuanta m⁻² s⁻¹. El otro tratamiento, oscuridad, fue protegido de la radiación mediante la aplicación de una cubierta de papel aluminio sobre los recipientes experimentales (Fig. 1.8). Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, con 200 copépodos por réplica. El recambio de medio de cultivo se realizó cada 1.5 días agregándose una concentración de 10⁴ cél. ml⁻¹ de *Chlamydomonas reinhardtii*. Se realizó un experimento por cada especie y la duración fue de 10 días.

Al inicio de cada experimento se tomaban 2 muestras de copépodos para la determinación de la concentración inicial de compuestos foto-protectores y 2 muestras para la determinación de peso seco (ver sección de materiales y métodos generales). Al finalizar el experimento, los individuos vivos de cada réplica eran contabilizados y luego eran colocados en tubos eppendorf y mantenidos en el freezer a -20°C hasta la extracción de compuestos foto-protectores. En todos los casos se midió como variable respuesta la concentración de MAAs y carotenoides (Tabla 1.2).

Tabla 1.2: Esquema del diseño experimental para el análisis del efecto de la exposición a la radiación PAR+UVA sobre la acumulación de de compuestos foto-protectores (MAAs y pigmentos carotenoides) en *Boeckella* spp.

Tratamientos	Compuestos foto-protectores	<i>B. antiqua</i>	<i>B. gracilis</i>	<i>B. brevicaudata</i>	<i>B. gibbosa</i>	<i>B. gracilipes</i> (2 poblaciones)
Inicial						
PAR+UVA	MAAs	*	*	*	*	*
Oscuridad						
Inicial						
PAR+UVA	Carotenoides	*	*	*	*	-
Oscuridad						



Figura 1.8: Incubaciones experimentales de *Boeckella* spp: tratamientos de radiación PAR+UVA y oscuridad (panel izquierdo). Arreglo de tubos fluorescentes y Q-panel 340 en el incubador SANYO MLR50 y réplicas pertenecientes a los tratamientos PAR+UVA y oscuridad (panel derecho).

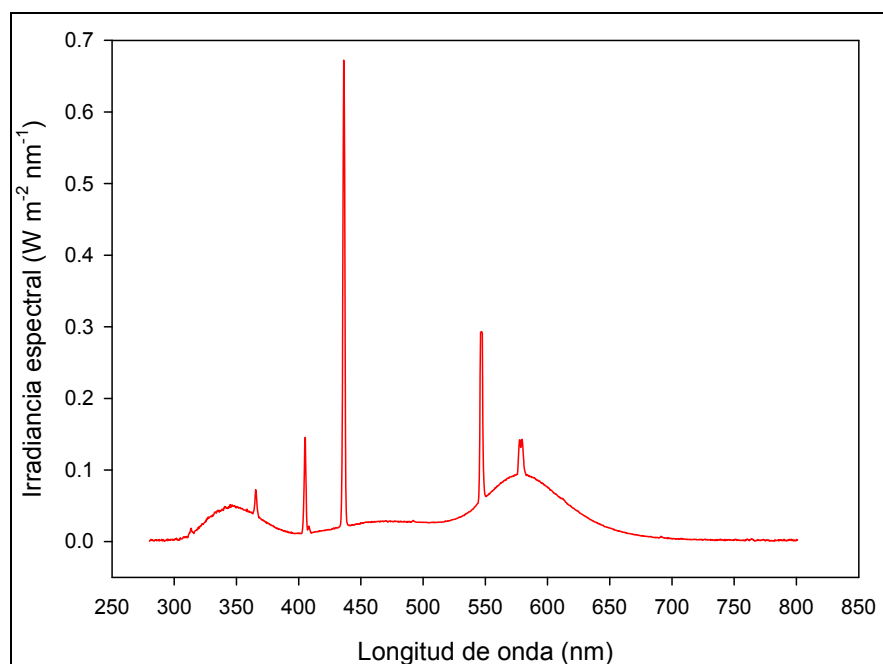


Figura 1.9: Espectro de radiación emitido por el arreglo de tubos Q-panel 340 y PAR utilizado en las incubaciones experimentales.

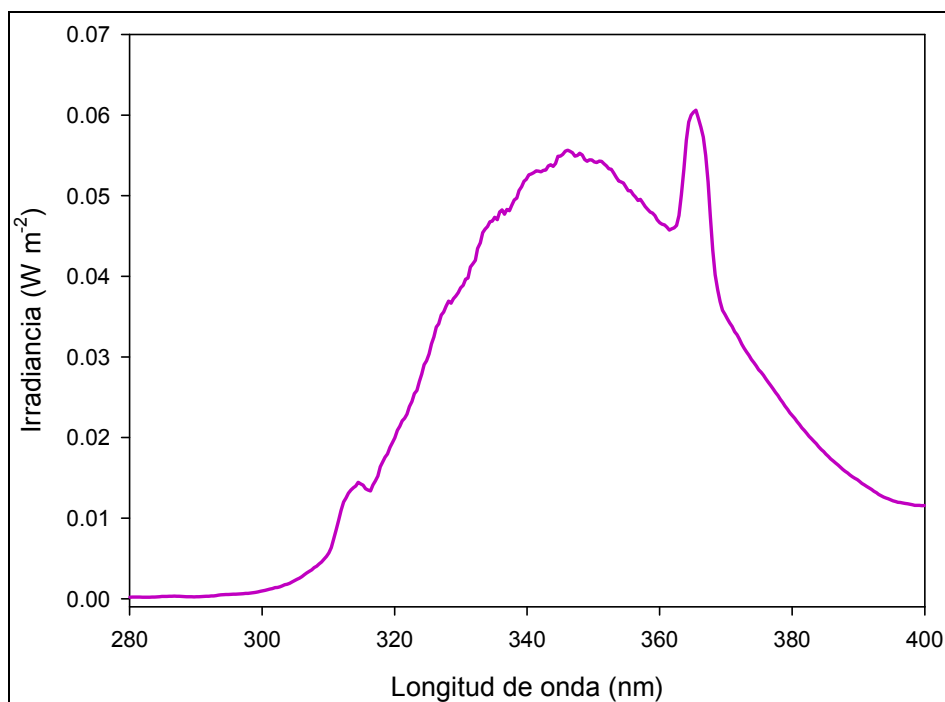


Figura 1.10: Irradiancia espectral de los 2 tubos Q-panel 340 aplicada en los experimentos de bio-acumulación (tratamiento con UVA).

Análisis estadísticos

Las relaciones entre las variables físico-químicas y la concentración de compuestos foto-protectores (MAAs y carotenoides) se estudiaron mediante análisis de regresión. Los datos fueron ajustados a modelos simples lineales ó exponenciales.

Para estudiar el efecto inductor de la radiación PAR+UVA sobre la concentración de compuestos foto-protectores en las distintas especies de *Boeckella* se utilizó análisis de la variancia de una vía (One-Way ANOVA). Cada especie fue tratada por separado, considerando las concentraciones de MAAs y carotenoides al inicio y al final de cada tratamiento (PAR+UVA y oscuridad).

En todos los casos y previamente al análisis de la variancia y/o regresión, se comprobó la normalidad y homocedasticidad de los datos. En aquellos casos en que los datos no se ajustaron a alguno de los supuestos anteriores, se aplicó una transformación logarítmica con el fin de normalizarlos y/o de equalizar su variancia. El análisis de los datos fue realizado mediante los siguientes paquetes estadísticos: STATISTICA 6.0, SIGMAPLOT 9.0 integración SIGMASTAT 3.1 y el software libre "R".

1.5 Resultados

Descripción general de los compuestos foto-protectores en *Boeckella*

La composición de los aminoácidos tipo micosporinas se determinó mediante la técnica de HPLC en 4 especies del género *Boeckella*: *B. antiqua*, *B. brasiliensis*, *B. gracilis* y en dos poblaciones alopátricas de *B. gracilipes*. Se hallaron 5 compuestos distintos: MAA-332 (compuesto desconocido no atribuible a los MAAs descritos hasta el momento), Micosporina-Glicina, Shinorina, Porphyra-334 y Palithene. En la figura 1.11 se presentan cromatogramas obtenidos mediante lectura del HPLC en el que se puede observar los picos de elución de cada compuesto y los tiempos en minutos a los que se produce el máximo. Los compuestos Micosporina-Glicina y Porphyra-334 se registraron en todas las especies de *Boeckella* analizadas.

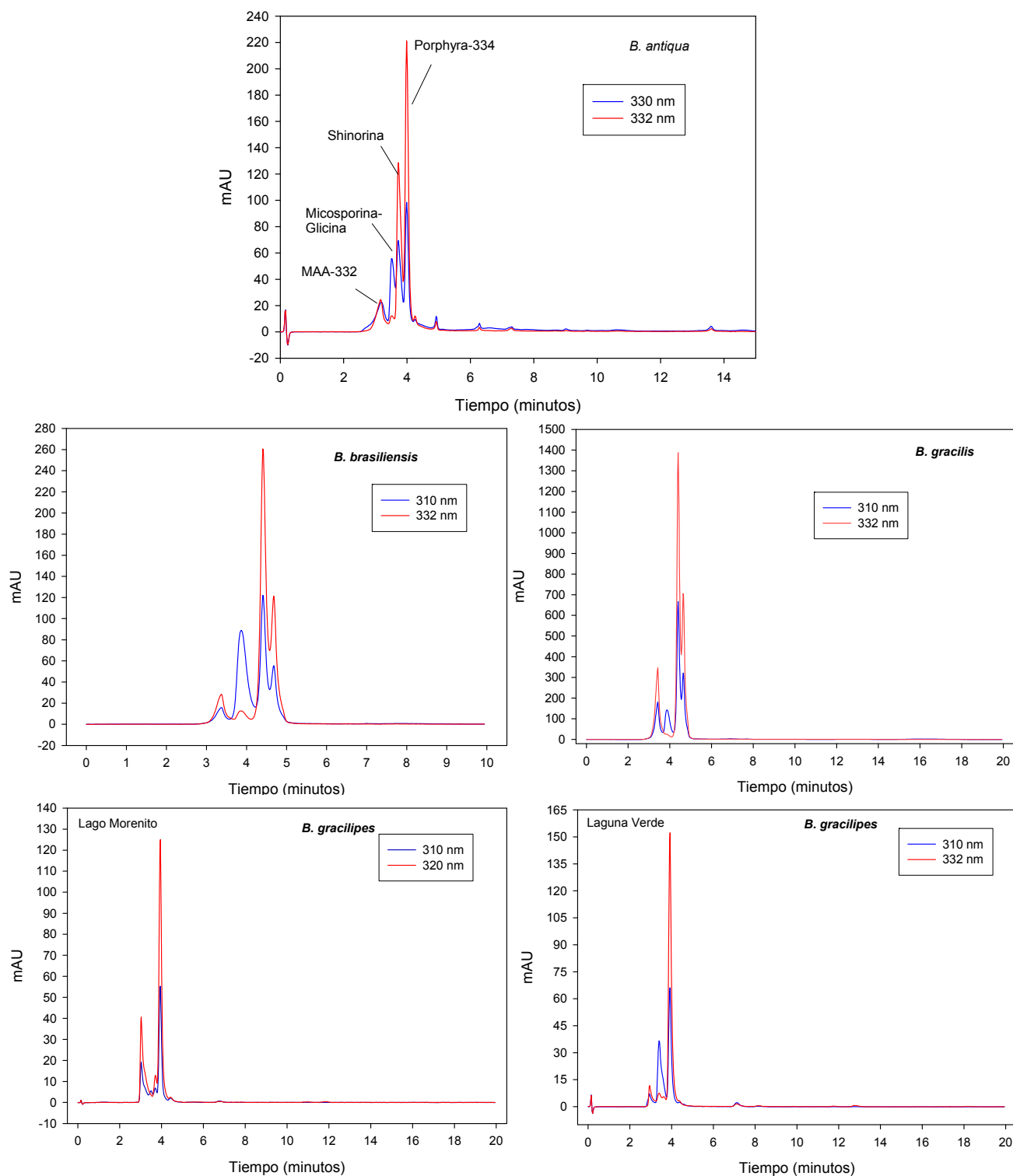


Figura 1.11: Cromatogramas de los extractos metanólicos de MAAs obtenidos con la técnica de HPLC: a) *B. antiqua*; b) *B. brasiliensis*; c) *B. gracilis*; d) *B. gracilipes* del Lago Morenito y e) *B. gracilipes* de la Laguna Verde. La unidad mAU corresponde a unidades de absorbancia. Los picos de absorbancia se atribuyen a los compuestos MAA-332, Micosporina-Glicina, Shinorina y Porphyra-334.

La concentración total de MAAs fue muy variable entre las distintas especies de *Boeckella* (Fig. 1.12 y Tabla 1.3). *B. brasiliensis* presentó la concentración más baja de MAAs, mientras que *B. gibbosa* exhibió la mayor concentración. En algunas especies de *Boeckella* se estimaron los MAAs totales a partir de los datos obtenidos mediante la técnica espectrofotométrica, resultando en un patrón de concentración semejante al observado mediante la técnica del HPLC (Tabla 1.3).

En el caso de *B. antiqua* se encontraron 4 compuestos, MAA-332, Micosporina-Glicina, Shinorina y Porphyra-334. Los compuestos que presentaron mayor concentración fueron Shinorina ($0.30 \pm 0.026 \mu\text{g mg}^{-1}$ P.S.) y Porphyra-334 ($0.24 \pm 0.008 \mu\text{g mg}^{-1}$ P.S.). *B. brasiliensis* presentó los mismos compuestos que *B. antiqua* aunque, la mayor concentración correspondió al compuesto Shinorina ($0.033 \pm 0.027 \mu\text{g mg}^{-1}$ P.S.). Por otra parte, en *B. gracilis* se hallaron concentraciones altas de Shinorina ($2.99 \pm 1.10 \mu\text{g mg}^{-1}$ P.S.), Porphyra-334 ($1.78 \pm 0.67 \mu\text{g mg}^{-1}$ P.S.) y MAA-332 ($1.27 \pm 0.56 \mu\text{g mg}^{-1}$ P.S.), y una concentración relativamente menor de Micosporina-Glicina ($0.48 \pm 0.10 \mu\text{g mg}^{-1}$ P.S.).

En el caso de *B. gracilipes*, la población proveniente de la Laguna Verde presentó una concentración mucho mayor de MAAs totales ($8.86 \pm 2.6 \mu\text{g mg}^{-1}$ P.S.), mientras que en la población del Lago Morenito se registró una concentración de $3.12 \pm 1.07 \mu\text{g mg}^{-1}$ P.S. (Fig. 1.12).

En cuanto a los pigmentos carotenoides, su concentración fue también altamente variable en las seis especies de *Boeckella*, presentando un patrón semejante al observado en los MAAs. Al respecto, en *B. brasiliensis* se registraron los niveles más bajos de carotenoides, mientras que *B. gibbosa* presentó la mayor concentración de estos pigmentos de manera similar a lo que ocurrió con los MAAs. Las especies *B. gracilis* y *B. brevicaudata* registraron valores similares en la concentración de carotenoides (Tabla 1.3).

En otro orden, cabe mencionar que el peso seco por individuo fue muy variable en las diferentes especies de *Boeckella* estudiadas, entre 0.001 y 0.142 mg, siendo *B. gracilipes* del Lago Morenito la de menor biomasa, *B. brevicaudata* fue la de mayor peso y las especies de peso intermedio fueron *B. antiqua*, *B. gibbosa* y *B. gracilis* (Tabla 1.3).

Tabla 1.3: Relevamiento de compuestos foto-protectores y peso seco de *Boeckella* spp. a- dato tomado de Persaud et al, 2007.

Especie	Lugar	MAAs	MAAs	Carotenoides	Peso seco
		(AU mg ⁻¹ P.S.)	(µg mg ⁻¹ P.S.)	(µg mg ⁻¹ P.S.)	(mg)
<i>B. antiqua</i>	Los Juncos	0.013± 0.004	0.71± 0.22	1.43± 0.33	0.062 ±0.018
<i>B. gracilis</i>	Teleférico	0.11± 0.082	6.48± 2.44	1.27± 0.711	0.013 ±0.003
<i>B. brevicaudata</i>		0.017± 0.004	-----	1.37± 0.59	0.142 ±0.017
<i>B. gracilipes</i>	Verde	-----	8.86 ± 2.6	-----	0.005 ±0.001
<i>B. gracilipes</i>	Morenito	-----	3.12± 1.07	-----	0.001 ±0.0007
<i>B. brasiliensis</i>	Blanca	0.013± 0.003	0.73±0.11	0.34± 0.14	0.07
<i>B. gibbosa</i>	Toncek	0.242± 0.034	10.6a	7.40± 2.33	0.016

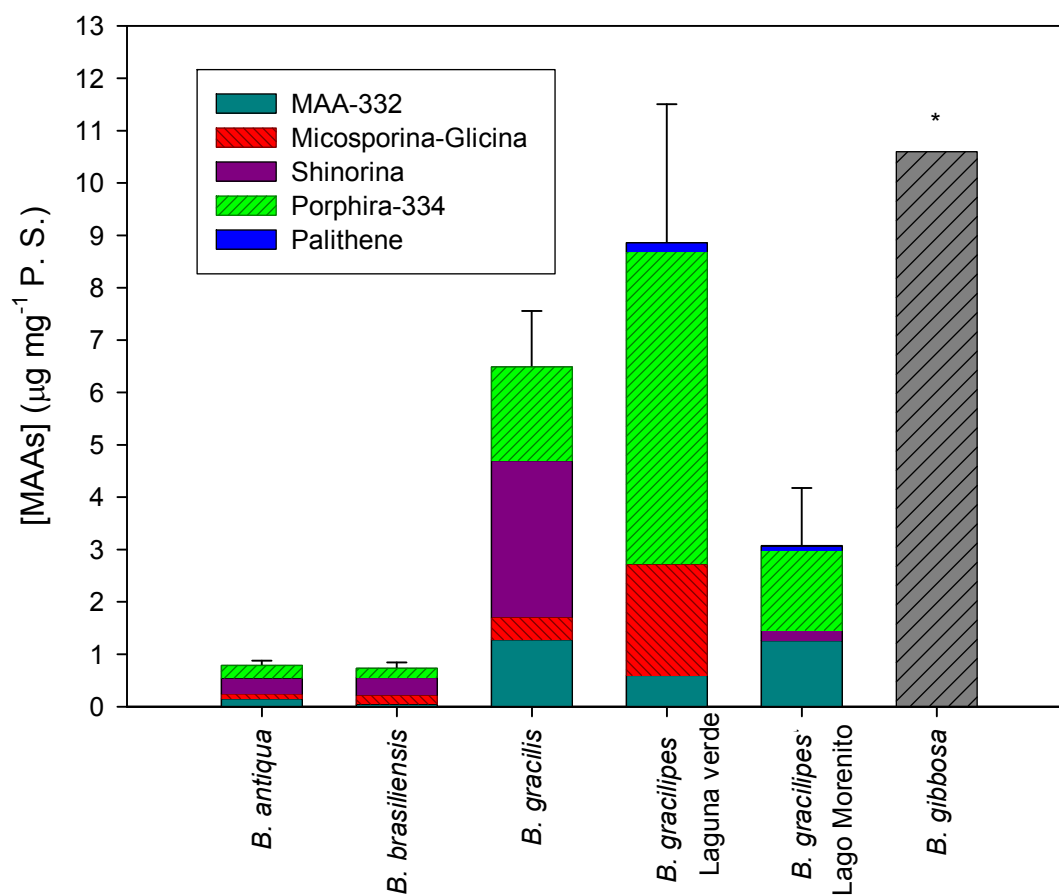


Figura 1.12: Concentración de los MAA presentes en *Boeckella* spp. * Valor tomado de Persaud et al, 2007.

Relación entre la concentración de compuestos foto-protectores y las características ambientales

La concentración de los compuestos foto-protectores en *Boeckella* spp. se relacionó con algunas de las variables físico-químicas medidas en los ambientes. En el caso de los MAAs, su concentración presentó una relación directa con la altura del cuerpo de agua ($r^2=0.35$, $p<0.05$), sin embargo cabe mencionar que los desvíos en la concentración de MAAs de *B. gracilis* y *B. gracilipes* ubicadas en extremos del gradiente altitudinal fueron muy elevados. Por otra parte, los MAAs disminuyeron exponencialmente con el incremento de la conductividad ($r^2=0.9$, $p<0.05$) y con el Kd PAR ($r^2=0.79$, $p<0.05$). La concentración de MAAs fue independiente del Kd320 ($p=0.234$). En el caso de los carotenoides su concentración fue independiente de la mayoría de las variables ambientales medidas, aunque se observó una relación inversa con el Kd PAR ($r^2=0.93$, $p<0.05$).

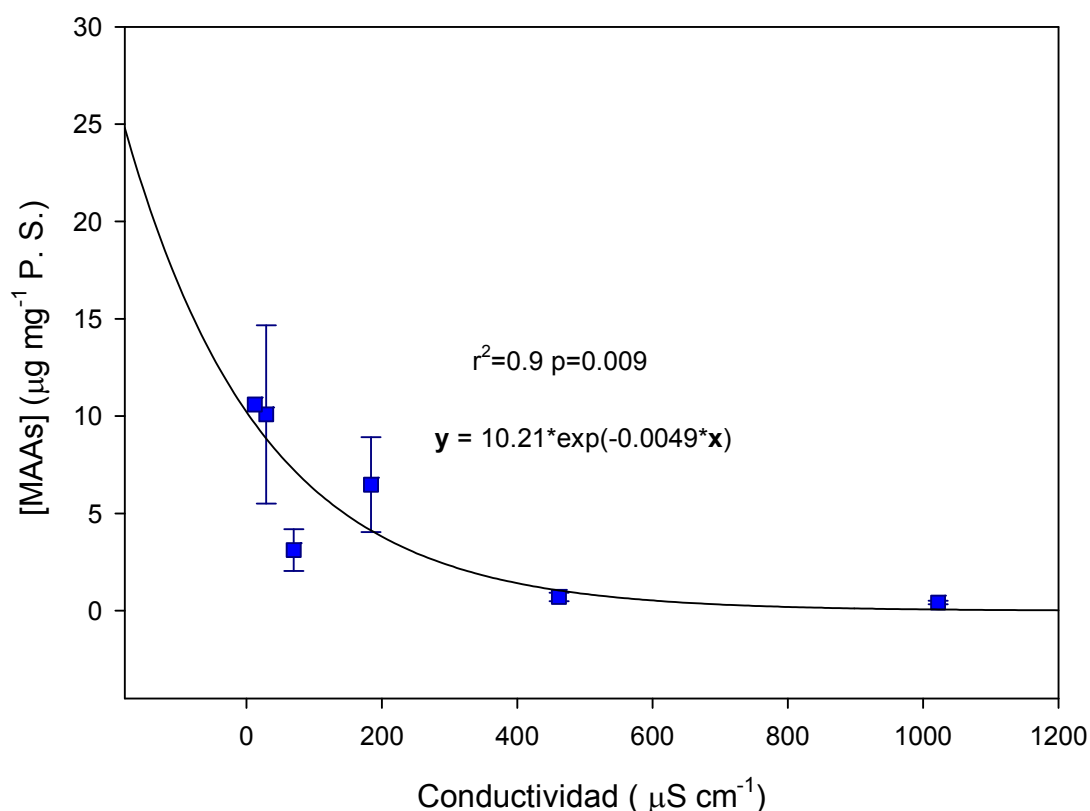


Figura 1.13: Relaciones entre la concentración de MAAs en el género *Boeckella*, la conductividad (panel izquierdo) y el Kd PAR (panel derecho) en los ambientes de procedencia.

Efectos de la radiación sobre la concentración de compuestos foto-protectores en *Boeckella*

La concentración de los MAAs y de los carotenoides se incrementó en el tratamiento PAR+UVA en comparación con el tratamiento oscuro y con respecto a la concentración inicial en la mayoría de las especies estudiadas (Fig. 1.14). Por el contrario, en el caso de *B. gracilis* los carotenoides no presentaron diferencias en los distintos tratamientos (Tabla 1.4 y Fig. 1.14 panel derecho). Las concentraciones de compuestos foto-protectores halladas en los copépodos provenientes del tratamiento oscuro fue semejante a las concentraciones iniciales en la mayoría de las especies. Sin embargo, en el caso de *B. gibbosa* se observó una disminución significativa de la concentración de MAAs y carotenoides en el tratamiento oscuro respecto de la concentración inicial (Fig. 1.14 panel izquierdo).

Tabla 1.4: Análisis de la variancia de una vía (One-way Anova) sobre la concentración de MAAs y carotenoides para analizar el efecto inductor de la radiación (PAR+UVA) en *B. antiqua*, *B. gracilis*, *B. gibbosa* y *B. brevicaudata*.

Compuesto	Especie	F	p
MAAs	<i>B. antiqua</i>	63.544	<0.05
	<i>B. brevicaudata</i>	11.613	<0.05
	<i>B. gibbosa</i>	10.667	<0.05
	<i>B. gracilis</i>	7.042	<0.05
Carotenoides	<i>B. antiqua</i>	14.908	<0.05
	<i>B. brevicaudata</i>	10.096	<0.05
	<i>B. gibbosa</i>	19.102	<0.05
	<i>B. gracilis</i>	5.001	0.064

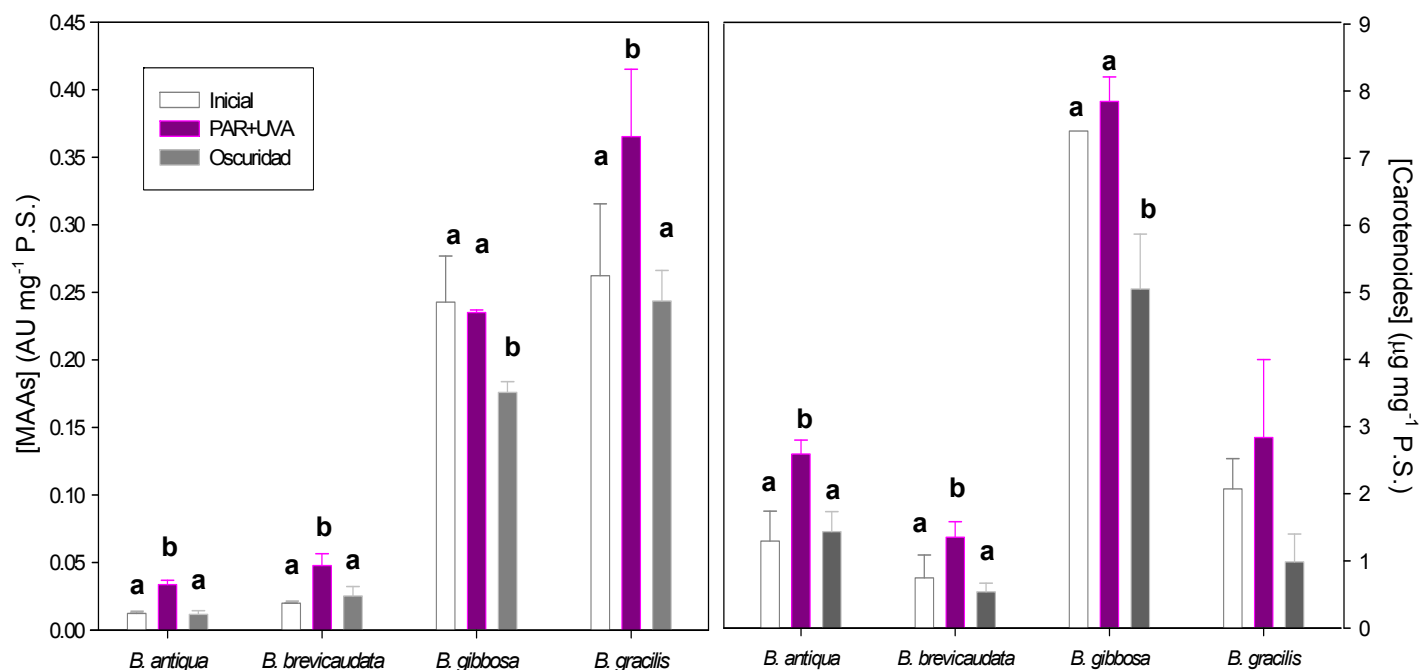


Figura 1.14: Concentración final promedio de compuestos foto-protectores ($\pm 1DS$) MAAs (panel izquierdo) y carotenoides (panel derecho) en *Boeckella* spp. en las incubaciones de laboratorio realizadas a 12°C. Barras blancas: concentración inicial; barras violetas: concentración final en el tratamiento PAR+UVA y barras grises: concentración final en el tratamiento en oscuridad. Las letras sobre las barras indican grupos homogéneos para cada especie (Prueba a posteriori Tukey).

En *Boeckella gracilipes*, la población proveniente de la Laguna Verde fue la que presentó la mayor concentración inicial de MAAs ($9.03 \pm 0.035 \mu\text{g mg}^{-1} \text{ P.S.}$) comparada con la población del Lago Morenito ($2.17 \pm 0.50 \mu\text{g mg}^{-1} \text{ P.S.}$) (Fig. 1.15). Las incubaciones experimentales realizadas con *B. gracilipes* de las dos poblaciones revelaron dos patrones diferentes de respuesta (Fig. 1.15). Por un lado, en los copépodos provenientes del Lago Morenito el tratamiento PAR+UVA estimuló la bio-acumulación de MAAs, mientras en aquellos de la Laguna Verde no se verificó un efecto significativo de este tratamiento. En el tratamiento oscuro no se observaron cambios con respecto a los niveles iniciales de compuestos tanto en *B. gracilipes* del Lago Morenito como de la Laguna Verde (Tabla 1.5 y Fig. 1.15).

Tabla 1.5: Análisis de la variancia de dos vías (Two-way Anova) aplicado para analizar el efecto de la radiación sobre la bio-acumulación de MAAs en *B. gracilipes*.

Compuesto	Población	F	p
MAAs	Lago Morenito	49.329	<0.05
	Laguna Verde	1.031	0.389

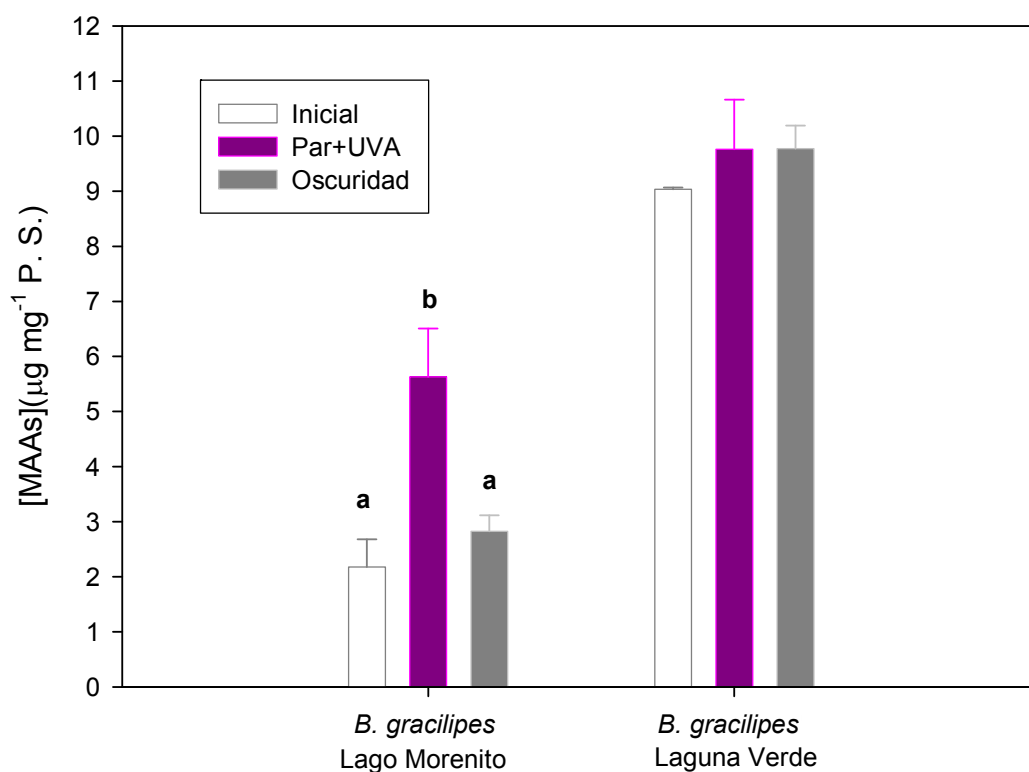


Figura 1.15: Concentración promedio de MAAs ($\pm 1DS$) en *Boeckella gracilipes* del Lago Morenito y de la Laguna Verde. Barras blancas: concentración inicial; barras violetas: concentración final en el tratamiento PAR+UVA y barras grises: concentración final en el tratamiento en oscuridad. Las letras indican grupos homogéneos (Prueba a posteriori de Tukey).

1.6 Discusión

En este capítulo se analizó la foto-protección química en 6 especies de *Boeckella*, *B. antiqua*, *B. brasiliensis*, *B. gracilis*, *B. gibbosa*, *B. brevicaudata* y *B. gracilipes*, a través de un relevamiento o “screening” de los MAAs y carotenoides presentes en copépodos colectados en sus ambientes naturales. Estas especies habitan diversos tipos de cuerpos de agua, lagunas de altura sobre los Andes, lagos pedemontanos someros y profundos y lagunas de meseta del norte de la Patagonia. Mediante la técnica de HPLC se determinaron cinco compuestos diferentes de MAAs: un compuesto desconocido hasta el momento y denominado MAA-332, Micosporina-Glicina, Shinorina, Porphyrina-334 y Palithene. Algunos de estos MAAs ya habían sido reportados previamente en algunas especies del *Boeckella* como en *B. poppei*, *B. titicacae*, *B. gibbosa*, *B. gracilipes*, *B. meteoris* y *B. antiqua* (Rocco et al, 2002; Helbling et al, 2002; Tartarotti et al, 2004; Pérez et al, 2006; Pérez, 2007; Persaud et al, 2007). Los MAAs de *B. gracilis* de la Laguna Teleférico y *B. gracilipes* provenientes del Lago Morenito incluidos en esta tesis constituyen nuevos registros.

En el caso de los MAAs, se detectó una amplia variación interespecífica e intraespecífica (interpoblacional) en su concentración (Fig. 1.14 y 1.15). Con respecto a la composición de los MAAs, la presencia del compuesto Porphyrina-334 fue común a todas las especies de *Boeckella* y contribuyó en gran medida a la concentración total de MAAs. Este compuesto es frecuente en algas marinas (Carreto et al, 1990; Banaszak et al, 2000; Banaszak et al, 2006) así como también en animales marinos (p. e. anemonas, corales y equinodermos) (Dunlap y Yamamoto, 1995; Bandaranayake y Des Rocher, 1999; Carefoot et al, 2000; Banaszak, 2003) y de agua dulce (p. e. crustáceos y peces) (Shashar et al, 1998; Helbling et al, 2004; Tartarotti et al, 2004; Hansson et al, 2007). El compuesto Micosporina-Glicina se halló en la mayoría de las especies de *Boeckella* analizadas, lo cual, unido a la característica de su estructura química simple podría interpretarse como una indicación de su rol como precursor de otros MAAs de mayor complejidad estructural, como ha sido sugerido en investigaciones previas (Shick y Dunlap 2002; Suh et al, 2003; Shick, 2004).

En el caso de los carotenoides en *Boeckella*, la técnica de análisis sólo permitió determinar su concentración aunque probablemente domine el carotenoide “Astaxantina” que es uno de los compuestos más comunes en crustáceos marinos y dulceacuícolas (Hairston, 1976; Hairston, 1979a; Goodwin, 1986; Hansson, 2000; Lotocka y Styczyńska-Jurewicz, 2001; Hansson, 2004). Las especies de *Boeckella* analizadas presentaron una gran variación en la concentración de carotenoides (Tabla 1.3). *Boeckella gibbosa* fue la especie con mayor concentración de

carotenoides, mientras que *B. antiqua*, *B. gracilis* y *B. brevicaudata* presentaron valores más bajos aunque similares entre sí. Estas concentraciones estuvieron en el intervalo de variación reportado en estudios previos (Pérez, 2007; Persaud et al, 2007; García et al, 2008).

Las concentraciones de compuestos foto-protectores en *Boeckella* spp. presentaron relaciones significativas con algunas características de los ambientes. La concentración de MAAs en copépodos se incrementó con la altitud del ambiente, resultando los niveles más elevados de estos compuestos en *Boeckella gibbosa* y *B. gracilipes* de ambientes de altura. En *Boeckella* spp. la concentración de MAAs decreció exponencialmente con la conductividad del ambiente. Las mayores concentraciones de MAAs se hallaron en las especies que habitan ambientes cuyas conductividades típicas son muy bajas (p.e. de lagos de altura < 20 $\mu\text{S cm}^{-1}$ y lagos pedemontanos < 80 $\mu\text{S cm}^{-1}$), y por lo tanto, no podría atribuírseles una función en la regulación osmótica, como ha sido propuesto en la literatura. Los MAAs son moléculas pequeñas generalmente sin carga que pueden comportarse como solutos osmóticos compatibles en el citoplasma ayudando a controlar la presión osmótica dentro de las células. Por lo tanto, su bio-acumulación contribuiría a la adaptación a ambientes con altas concentraciones salinas (Oren y Gunde-Cimerman, 2007). Tanto los lagos de altura como los pedemontanos poseen una notable transparencia ($K_d\text{PAR} < 1$) que resulta en niveles altos de penetración de la radiación solar. Los resultados obtenidos indicarían que las mayores concentraciones de MAAs en los ambientes naturales responden a una adaptación a la elevada exposición a la radiación y no a otras funciones putativas de los MAAs relacionadas por ejemplo con su capacidad de soluto osmótico. Entonces los niveles altos de MAAs en *B. gibbosa* y *B. gracilipes* podrían interpretarse como una respuesta a la elevada penetración de la radiación teniendo en cuenta su función foto-protectora. En este contexto, es de remarcar que los mayores niveles de MAAs en *Boeckella* se observaron en ambientes que presentan una fuerte limitación por nitrógeno (Díaz et al, 2000; 2007). Al respecto, Sommaruga (2010) sugirió un patrón de acumulación diferencial de carotenoides por sobre MAAs en el copépodo *Arctodiaptomus jurisowitchi* en ambientes de altura. Este autor propuso que en esos ambientes la limitación por nitrógeno podría restringir la acumulación de MAAs en el fitoplancton y el zooplancton dado que estos compuestos son moléculas nitrogenadas que hasta funcionarían como un reservorio de este elemento. En ese escenario la acumulación diferencial de carotenoides permitiría alcanzar niveles de foto-protección elevados para enfrentar las condiciones de radiación.

Numerosos estudios han remarcado la importancia de la radiación solar como factor ecológico determinante en los lagos de altura y pedemontanos de los Andes (Zagarese et al, 1999; Marinone et al, 2006). En esta tesis se hallaron las concentraciones más elevadas de MAAs y de

carotenoides en *B. gibbosa*. Esta es una especie restringida a lagos de altura de la Patagonia, y con una tolerancia muy alta a la exposición a la RUV (Zagarese et al, 1997b). Estudios previos han indicado que en la laguna Toncek *B. gibbosa* evita los estratos superficiales lo que resulta en una distribución agregada en los estratos profundos de la columna de agua durante el día (Modenutti, 1993; Balseiro y Zagarese, 1994; Marinone et al, 2006). Además posee mecanismos de foto-protección y foto-reparación muy eficientes (Zagarese et al, 1997a; Zagarese et al, 1997b; Tartarotti et al, 2004; Persaud et al, 2007) y también una notable actividad enzimática antioxidante (Souza et al, 2010). La foto-protección química observada en *B. gibbosa* resultaría una respuesta adaptativa a las condiciones de exposición a la radiación que, en conjunto con sus capacidades de foto-reparación y evasión, permiten a esta especie explotar ambientes muy expuestos a la RUV (Morris et al, 1995; Zagarese et al, 1999).

Por otra parte, *Boeckella gracilipes* de otro cuerpo de agua de altura, la Laguna Verde, también presentó concentraciones muy elevadas de MAAs. Estos niveles fueron superiores a los hallados en la población del Lago Morenito, un ambiente pedemontano y relativamente más profundo (Tabla 1.1). En la Laguna Verde, *B. gracilipes* se distribuye de manera homogénea en la columna de agua durante el día. Si bien esta laguna presenta una concentración de COD $<2 \text{ mgL}^{-1}$ (Morris et al, 1995), más elevada que otras lagunas de altura, su escasa profundidad limita la capacidad de evitar los estratos iluminados como es frecuente en cuerpos de agua más profundos de la región (Tartarotti et al, 1999; Alonso et al, 2004). Por otra parte, hasta el momento se ha observado *B. gracilipes* de un lago de altura profundo de los Andes chilenos (Laguna Negra, 2700 m s.n.m., $Z_{\text{max}}=320\text{m}$) presenta niveles de tolerancia a la RUV elevados atribuibles a la foto-protección química (Tartarotti et al, 1999) mientras que *B. gracilipes* de lagos pedemontanos presentaría mayor vulnerabilidad debido a niveles más bajos de foto-protección (Zagarese et al, 1997a).

Los resultados presentados en esta tesis señalan que *B. gracilipes* presenta mayor concentración de compuestos foto-protectores, particularmente de MAAs en ambientes más expuestos y en los que no existe un refugio profundo para evitar la radiación durante el día. La población de *B. gracilipes* de la Laguna Verde resulta una excepción en la distribución de la especie en la región, ya que habitualmente predomina en lagos pedemontanos profundos. Se puede hipotetizar que las características de atenuación que presenta la Laguna Verde unida a la acumulación de compuestos foto-protectores en *B. gracilipes* son condiciones que permiten a esta especie explotar toda la columna de agua de este lago de altura.

Por otra parte, los resultados de los experimentos de bio-acumulación de compuestos foto-protectores en cinco especies del género *Boeckella* indicaron claramente que los MAAs pueden ser inducidos por la radiación PAR+UVA inclusive cuando el alimento carece de estos compuestos (Pérez et al, 2006; Pérez, 2007; García et al, 2010). La dieta utilizada no puede considerarse como la fuente de estos compuestos ya que los análisis de extractos metanólicos de *Chlamydomonas reinhardtii* realizados mediante la técnica de HPLC no evidenciaron la presencia de MAAs en los cultivos (Pérez et al, 2006; García et al, 2010). Una de las hipótesis planteadas para explicar el origen de los MAAs en los copépodos estudiados considera la intervención de bacterias endosimbiontes ya que este tipo de interacción ecológica ha sido relacionada con la acumulación de los MAAs (Stochaj y Grossman, 1997; Shick et al, 1999; Banaszak et al, 2000; Banaszak et al, 2006). Numerosos estudios han demostrado la existencia de una flora bacteriana interna en especies zooplanctónicas marinas y dulceacuícolas (Sochard et al, 1979; Gowing y Silver, 1983; Muskó, 1988; Nagasawa, 1988; Nagasawa y Nemoto, 1988; Plante et al, 1989; Günzl, 1991; Gowing y Wishner, 1992; Peter y Sommaruga, 2008). En *Boeckella antiqua*, el análisis experimental de la adquisición de MAAs controlando la abundancia de bacterias mediante el antibiótico Chloramphenicol resultó en una disminución significativa de la bio-acumulación de MAAs, sugiriendo la intervención de un procariota (Pérez et al, 2008; García et al, 2010). Recientemente, Pérez et al (enviado) observaron que en *Boeckella* la flora microbiana no sólo es una fuente directa de MAAs sino que controlaría además la acumulación de estos compuestos a partir de una dieta basada en el dinoflagelado *Peridinium*. Estos autores pudieron secuenciar algunas de las bandas que son exclusivas de los copépodos que no recibieron antibiótico y que no aparecen en los tratados con antibiótico. La comparación de las secuencias permitió establecer una similitud con grupos de bacterias cuyo genoma incluye genes que codifican para la ruta metabólica de ácido "shikímico", la vía de síntesis putativa de los MAAs.

En el caso de los carotenoides la evidencia existente apunta a que los animales acumulan estos compuestos a través de la dieta (Goodwin, 1986). Particularmente en los crustáceos, se ha determinado la bio-acumulación del carotenoide astaxantina que deriva de los β -carotenos presentes en el fitoplancton (Ringelberg, 1980; Goodwin, 1986; Lotocka et al, 2004). En el calanoideo *Leptodiaptomus minutus* se ha observado el incremento de carotenoides a partir de una dieta compuesta por el alga *Cryptomonas* (Moeller et al, 2005). En el caso de los experimentos de bio-acumulación aquí presentados, se podría afirmar que los carotenoides acumulados por *Boeckella* spp. provienen del alimento provisto, la clorofícea flagelada *Chlamydomonas reinhardtii*, cuyo complejo pigmentario incluye la presencia de carotenos.

Además el análisis genómico de esta flagelada presenta la expresión de genes que regularían la síntesis de estos pigmentos (Bohne y Linden, 2002; Lohr et al, 2005).

En cuanto a la respuesta de *Boeckella* spp. a los tratamientos de radiación, se observó que la exposición al tratamiento PAR+UVA estimuló la bio-acumulación tanto de MAAs como de carotenoides, sugiriendo su rol como compuestos foto-protectores en *Boeckella* al igual que en otros copépodos (Hairston, 1979a; Byron, 1982; Sommaruga y García-Pichel, 1999; Shick y Dunlap, 2002; Hansson y Hylander, 2009a; Rautio y Tartarotti, 2010).

En *B. antiqua*, *B. gracilis*, *B. brevicaudata* y *B. gracilipes* del Lago Morenito el tratamiento PAR+UVA indujo la acumulación de MAAs resultando en concentraciones mayores que al inicio de los experimentos y que en el tratamiento oscuro. Este grupo de especies habita cuerpos de agua pedemontanos de un altitud intermedia (700 a 900 m.s.n.m.) (Tabla 1.1). Por el contrario, las especies que habitan lagos de altura (>1500 m. s.n.m), *B. gibbosa* y *B. gracilipes* (Laguna Verde), no presentaron diferencias entre la concentración inicial de MAAs y la concentración final el tratamiento con PAR+UVA. Los niveles naturales elevados de compuestos foto-protectores en ambas especies podrían exceder los niveles inducibles por las intensidades de radiación establecidas en el tratamiento PAR+UVA. Cabe mencionar que la irradiancia a la que están expuestos los organismos de altura (p.ej. Cerro Catedral a 2000 m.s.n.m.) es 10-15% más elevada que la que reciben los organismos pedemontanos (p.ej. Laboratorio de Fotobiología, INIBIOMA-UNComa a 805 m.s.n.m.) en condiciones de cielo despejado, mientras que en condiciones de nubes bajas la diferencia debido a la altura es mayor (Dra. Susana Díaz, comunicación personal).

En el caso de los pigmentos carotenoides, se observó que la presencia de PAR+UVA también estimuló diferencialmente su bio-acumulación en *Boeckella*. *B. antiqua*, *B. gracilis* y *B. brevicaudata* presentaron valores basales similares, mientras que *B. gibbosa* presentó la mayor concentración de carotenoides probablemente debido a que habita un ambiente altamente expuesto y sin depredadores visuales. De manera similar a lo que ocurrió con los MAAs, en el tratamiento oscuro se observó una disminución de los carotenoides en *B. gibbosa*.

Estos resultados permiten inferir que las mayores concentraciones de compuestos foto-protectores halladas en las especies de *Boeckella* que habitan lagos de altura responderían a su exposición a la radiación más que a otras funciones potenciales como las que se discutieron en este capítulo. Por otra parte, se comprobó el efecto inductor de la radiación PAR+UV sobre los compuestos foto-protectores. En conjunto la evidencia reunida, resalta la importancia de los MAAs y carotenoides en la foto-protección de *Boeckella* y su valor adaptativo para hacer frente a ambientes con elevada exposición a la radiación solar.

Capítulo 2

Efectos de la radiación PAR+UVA y la temperatura sobre la bio-acumulación de compuestos foto-protectores

2.1 Introducción

La temperatura y la radiación (PAR+UV) tienen el potencial de afectar, directa e indirectamente, la dinámica y la supervivencia de diversos organismos de las comunidades acuáticas (Williamson et al, 1994; Moore et al, 1996; Rae y Vincent 1998; Persaud y Williamson, 2005; Cooke et al, 2006; Cooke et al, 2008; Williamson et al, 2010). En numerosas especies del plancton dulceacuícola y marino, se ha observado que la exposición a la radiación solar estimula la síntesis y/o la acumulación de compuestos foto-protectores, tales como los MAAs (Shick y Dunlap, 2002), los pigmentos carotenoides (Hairston, 1976; Hairston, 1979a; Andersson et al, 2003; Moeller et al, 2005; Holeton et al, 2009; Sommaruga, 2010) y las melaninas (Blois, 1978; Herbert y Emery, 1990; Hobæk y Wolf, 1991; Rhode et al, 2001; Rautio y Korhola, 2002). En los copépodos, se conoce que la exposición natural y experimental a radiación ultravioleta y visible induce a la acumulación de MAAs y de carotenoides (Hairston, 1976; Byron, 1982; Ringelberg et al, 1984; Hansson, 2000; Tartarotti et al, 2001; Hansson, 2004; Moeller et al, 2005; Tartarotti y Sommaruga, 2006; Hansson et al, 2007). Por ejemplo, en la naturaleza el copépodo calanoideo *Boeckella* presenta los niveles de foto-protección química más elevados en lagos de altura y antárticos (Tartarotti et al, 1999; Helbling et al, 2002; Rocco et al, 2002; Tartarotti et al, 2004; Persaud et al, 2007; García et al, 2010; Souza et al, 2010).

La temperatura por su parte podría afectar la foto-protección debido a su capacidad de inducir cambios en la estructura molecular y función de los compuestos foto-protectores. En este sentido, se conoce que los extractos metanólicos de MAAs presentan una gran variabilidad en cuanto a la estabilidad respecto a la temperatura (Carreto y Carignan, 2011 y referencias allí citadas). En el caso de los pigmentos carotenoides, la oxidación química y la foto-oxidación son potenciadas por la temperatura, incrementando las transformaciones en su estructura. Por ejemplo, en algunos carotenoides de especies vegetales comerciales se ha observado que en su forma más estable adquieren la configuración “all trans” y que por efecto de calor moderado se isomerizan a sus formas cis en una extensión comparable a la energía absorbida (Pérez Gálvez y Garrido Fernández, 1997).

La foto-protección química es uno de los mecanismos adaptativos más frecuentes en organismos acuáticos. Sin embargo, existen escasas evidencias de la interacción de la temperatura y la RUV sobre los organismos. En este sentido, se ha detectado que la temperatura y la exposición a la RUV pueden tener un impacto negativo sobre la fotobiología de diferentes especies de corales escleractinios, lo cual es reconocido como el fenómeno de decoloración o “photobleaching”. Esta decoloración se produce porque los cambios bruscos en la temperatura reducen la densidad de las zooxantelas que viven en simbiosis con los corales y/o reducen sus concentraciones de pigmentos fotosintéticos. A su vez los corales quedan más expuestos a la RUV debido a una disminución

concomitante de los MAAs que producen las zooxantelas (Lesser y Farrell 2004; Ferrier-Pages et al, 2007). También en corales, se ha detectado una estimulación en la síntesis y/o bio-acumulación de MAAs con el incremento conjunto de la temperatura y la radiación (Michalek-Wagner, 2001).

En los copépodos en particular, algunas investigaciones han relacionado la concentración de carotenoides con la temperatura. Hairston (1979b) observó que las mayores concentraciones de carotenoides en el calanoideo *Diaptomus nevadensis* se registraban en el invierno, y mediante una serie de experimentos determinó que los copépodos pigmentados presentaban mayor supervivencia a temperaturas bajas. Posteriormente, Byron (1981) determinó una relación indirecta entre la concentración de los carotenoides y la temperatura en 41 poblaciones de copépodos calanoideos. La relación entre la concentración de MAAs y la temperatura en copépodos ha sido escasamente estudiada. Tartarotti y Sommaruga (2006) hallaron una relación directa entre la concentración de MAAs en el fitoplancton y la temperatura, y entre la concentración de MAAs del copépodo *Cyclops abyssorum* y la del fitoplancton en el lago de altura alpino Gossenköllensee. Por otra parte, Moeller et al (2005) registraron concentraciones de MAAs más elevadas durante el invierno en el calanoideo *Leptodiaptomus minutus* del Lago Giles (Pennsylvania, USA).

En el escenario de cambio climático actual, y con un pronóstico para la Región Patagónica de incremento de los niveles de RUV y de temperatura media, resulta interesante investigar el efecto conjunto de la temperatura y la radiación solar sobre organismos adaptados a climas templado-fríos y fríos. En particular, en los copépodos del género *Boeckella*, existen fuertes adaptaciones a los climas fríos, lo cual permite a algunas especies colonizar ambientes con gran variación térmica como lagos de altura y antárticos, los cuales están altamente expuestos a la RUV. Esta preferencia térmica resultaría limitante para explotar ambientes más cálidos, en donde las especies de *Boeckella* restringen temporalmente el desarrollo de sus poblaciones al otoño e invierno (Gaviria, 1989; Menu-Marque et al, 2000). Los ambientes de altura, los antárticos, así como las lagunas someras patagónicas donde *Boeckella* predomina están expuestos a niveles de RUV elevados. Este hecho sugiere que este género posee una serie de adaptaciones para hacer frente a la radiación. En este sentido, la mayoría de las especies de *Boeckella*, presentan niveles elevados de foto-protección por MAAs y carotenoides, mecanismos enzimáticos de reparación (Zagarese et al, 1997a; Rocco et al, 2002) y enzimas antioxidantes (Souza et al, 2007; Souza et al, 2010). Por otra parte, también evitan durante el día los estratos superficiales en lagos de altura (Modenutti, 1993; Balseiro y Zagarese, 1994; Marinone et al, 2006) y en los lagos pedemontanos de elevada transparencia característicos de la Región andino-patagónica (Balseiro y Modenutti, 1990; Balseiro et al, 2001; Alonso et al, 2004).

En cuanto al aumento de temperatura, se han observado múltiples efectos directos e indirectos en el zooplancton, afectando desde los organismos y sus procesos fisiológicos hasta la ecología de las comunidades. Estos efectos serían más fuertes en especies estenotermas frías, las

cuales son particularmente vulnerables a temperaturas cálidas (Moore et al, 1996). En relación con los mecanismos de foto-protección se podría inferir que tanto la bio-acumulación de compuestos foto-protectores como la foto-reparación enzimática estarían regulados por la temperatura del ambiente y, de hecho, existen algunas evidencias que apoyan esta hipótesis. Por ejemplo en levaduras, la unión de la enzima fotoliasa al ADN dañado debido a la exposición a la RUV se halló impedida a una temperatura de 5°C en comparación a 37°C (Harm y Rupert, 1970). Rocco et al (2002) observaron que poblaciones antárticas del copépodo *B. poppei* presentan mecanismos de foto-reparación limitados, probablemente debido a las temperaturas que experimentan y que su tolerancia excepcional a la RUV se debe principalmente a sus compuestos foto-protectores. De la misma forma, la bio-acumulación de compuestos foto-protectores podría verse afectada directa e indirectamente por la temperatura. Entre los efectos directos se puede mencionar que la eficiencia en la alimentación decrece con el incremento de la temperatura, así como también la capacidad de filtración (tasa de alimentación) (Vanderploeg, 1990), lo cual afectaría la incorporación de compuestos foto-protectores a partir de la dieta. Por otra parte, la temperatura influye indirectamente sobre los organismos mediante su efecto sobre el medio físico ya que es un factor determinante de propiedades del agua como la viscosidad, el oxígeno disuelto, etc. (LaBerge y Hann, 1990).

En el capítulo 1, se presentó evidencia experimental acerca de la capacidad inductora de la radiación PAR+UVA sobre la bio-acumulación de MAAs y de carotenoides en varias especies de *Boeckella*. Como patrón general se observó que la exposición al PAR+UVA produjo en la mayoría de las especies ensayadas una mayor bio-acumulación de compuestos foto-protectores. Dada la adaptación de *Boeckella* a las bajas temperaturas se podría hipotetizar que tanto la temperatura como la presencia de RUV podrían afectar las concentraciones de compuestos foto-protectores. En este sentido, resulta interesante conocer la relación entre la acumulación de MAAs y carotenoides y la temperatura en el género *Boeckella*.

2.2 Objetivos

1. Establecer los patrones de acumulación de compuestos foto-protectores (MAAs y carotenoides) de diferentes especies de *Boeckella* en relación con la temperatura, bajo tratamientos de radiación PAR+UVA y oscuridad.
2. Obtener a partir de los resultados experimentales las tasas cinéticas de bio-acumulación de los compuestos foto-protectores (tasas de ganancia neta, de eliminación y de ganancia bruta) y estudiar su relación con la temperatura.
3. Comparar las variaciones inter e intra-específicas de la concentración de compuestos foto-protectores en respuesta a la temperatura y a la radiación PAR+UVA en *Boeckella* spp.

Hipotesis de trabajo

- 1.- La acumulación de compuestos foto-protectores, MAAs y carotenoides, en *Boeckella* spp. depende de la temperatura y el escenario de radiación.
- 2.- La bio-acumulación de compuestos foto-protectores es especie-específica, más aún puede variar a nivel intraespecífico.

2.3 Características de las especies estudiadas del género *Boeckella*

Boeckella antiqua

La población del copépodo *Boeckella antiqua* (Capítulo 1, Fig. 1.6a) de la laguna Los Juncos (Capítulo 1, Fig. 1.7a) fue seleccionada para analizar la foto-protección por MAAs y carotenoides. Esta especie presenta un dimorfismo sexual moderado, siendo los machos más pequeños (1.6 ± 0.12 mm) que las hembras (1.71 ± 0.20 mm). El tamaño promedio de la camada de la población de esta especie en la laguna Los Juncos es de 7.15 ± 2.33 huevos hembra⁻¹. Los huevos, las larvas nauplii y los estadios de copepodito de *B. antiqua* se caracterizan por su intensa coloración marrón-rojiza, mientras que los adultos presentan una coloración azul-verdosa o anaranjada. *B. antiqua* presenta una distribución vertical y horizontal homogénea durante el día, probablemente debido a la escasa profundidad de la laguna y a la turbulencia causada por los fuertes vientos que son característicos de la región (Perez, 2007).

Boeckella gracilis y *B. brevicaudata*

Las dos especies de copéodos calanoideos que habitan la Laguna Teleférico, *Boeckella gracilis* y *B. brevicaudata* (Capítulo 1, Fig. 1.6 c y d respectivamente) son fácilmente distinguibles entre sí ya que sus tallas son diferentes. *B. gracilis*, la especie de menor talla, presenta un fuerte dimorfismo sexual, la longitud del macho es de 0.97 ± 0.04 mm, mientras que la hembra alcanza unos 1.39 ± 0.07 mm. El tamaño promedio de camada de *B. gracilis* es 25.09 ± 6.64 huevos hembra⁻¹. Todos los estadios de desarrollo de *B. gracilis*, como así también las masas de huevos son muy pigmentados, caracterizándose por una coloración anaranjado-rojiza.

Boeckella brevicaudata es más conspicua que *B. gracilis* no sólo por su mayor talla y robustez general, sino también por su coloración marrón-rojiza intensa. Los huevos también son muy pigmentados, tendiendo a un color marrón oscuro. En este copépodo las hembras también son mayores que los machos, con una longitud total de 2.89 ± 0.12 mm y 2.44 ± 0.14 mm, respectivamente. Esta especie presentó un tamaño de la camada promedio de 88 ± 12.57 huevos hembra⁻¹.

Se supone que ambas especies presentan una distribución vertical y horizontal homogénea, debido a la escasa profundidad de la laguna (Capítulo 1, Tabla 1.1). Sin embargo, se observa una distribución temporal muy acotada en el caso de *B. brevicaudata*, cuyo desarrollo poblacional se restringe al invierno. *B. gracilis* explota prácticamente el hidropériodo completo, desde junio hasta diciembre, dependiendo de la disponibilidad de agua en el ambiente.

Boeckella gracilipes

Para el estudio del efecto de la temperatura y la radiación (PAR+UVA) sobre la fotoprotección de *Boeckella gracilipes*, se analizaron individuos de dos poblaciones de ambientes que presentan características contrastantes, una laguna de altura (Laguna Verde) y un lago pedemontano (Lago Morenito) (Capítulo 1, Fig. 1.7 d y e).

En la población de *Boeckella gracilipes* de la Laguna Verde, los machos presentan una longitud total media de 0.95 ± 0.03 mm, mientras que las hembras alcanzan un promedio de 1.02 ± 0.07 mm. El tamaño promedio de la camada en *B. gracilipes* en este ambiente es 5.33 ± 0.95 huevos hembra⁻¹. Los huevos y los copepoditos de *B. gracilipes* de la Laguna Verde presentan una pigmentación anaranjada brillante, mientras que los adultos son menos conspicuos (Fig. 2.1 a). En cuanto a *B. gracilipes* del Lago Morenito, tanto los machos como las hembras son ligeramente más pequeños que los de la Laguna Verde. La talla promedio de los machos de *B. gracilipes* es 0.86 ± 0.04 mm mientras que las hembras alcanzan una longitud promedio de 0.95 ± 0.07 mm. El tamaño de camada promedio en el Lago Morenito es de 5.85 ± 2 huevos hembra⁻¹. En este lago todos los estadios de *B. gracilipes* son hialinos (Fig. 2.1 b).

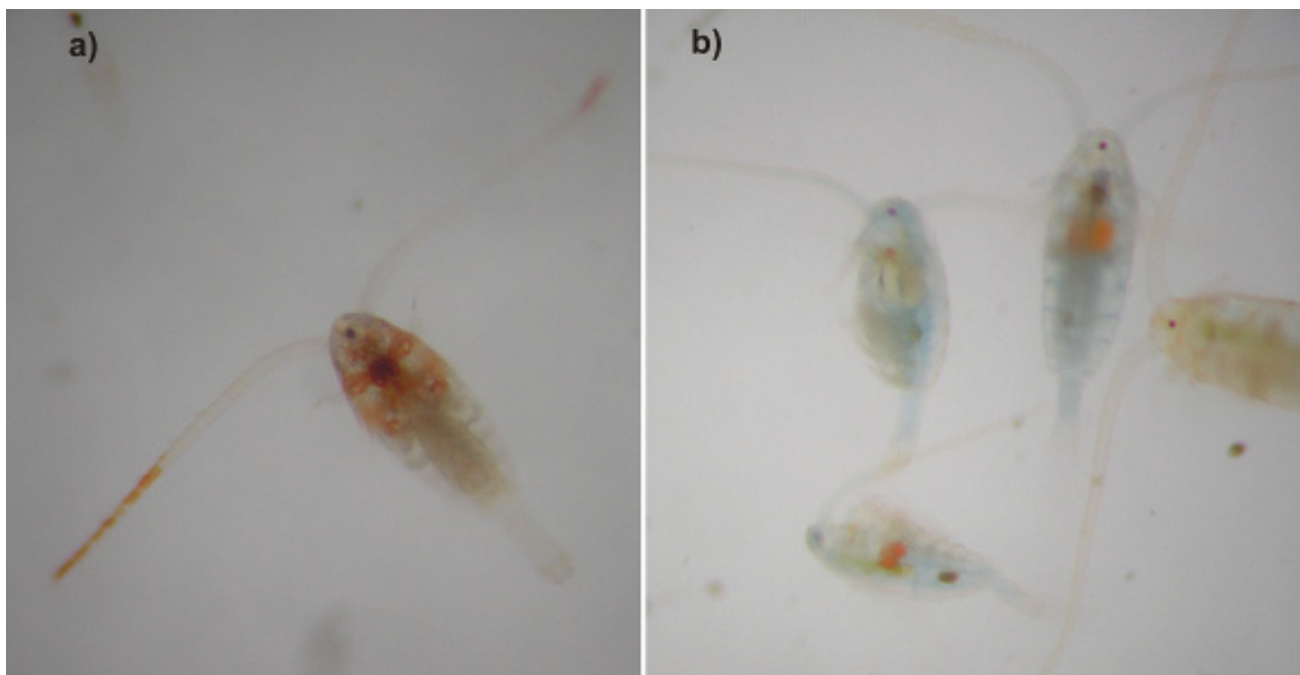


Figura 2.1: *Boeckella gracilipes* provenientes de: a) Laguna Verde y b) Lago Morenito. Se observa una diferencia marcada en la coloración entre las dos poblaciones.

Las muestras para determinar la distribución de *Boeckella gracilipes* se colectaron mediante una botella limnológica Schindler-Patalas de 12 L. Durante dos días consecutivos del mes de Marzo del 2010 se tomaron muestras de agua a distintas profundidades primero en el Lago Morenito (0, 3, 6 y 8 m) y al día siguiente en la Laguna Verde (0, 1, 2 y 3 m). La distribución vertical diurna de esta especie, resultó contrastante en los dos ambientes. En la Laguna Verde se observó que los copépodos explotan toda la columna de agua (Fig. 2.2 panel izquierdo); mientras que en el Lago Morenito evitan los estratos superficiales y su abundancia se incrementa progresivamente hacia estratos más profundos (Fig. 2.2 panel derecho).

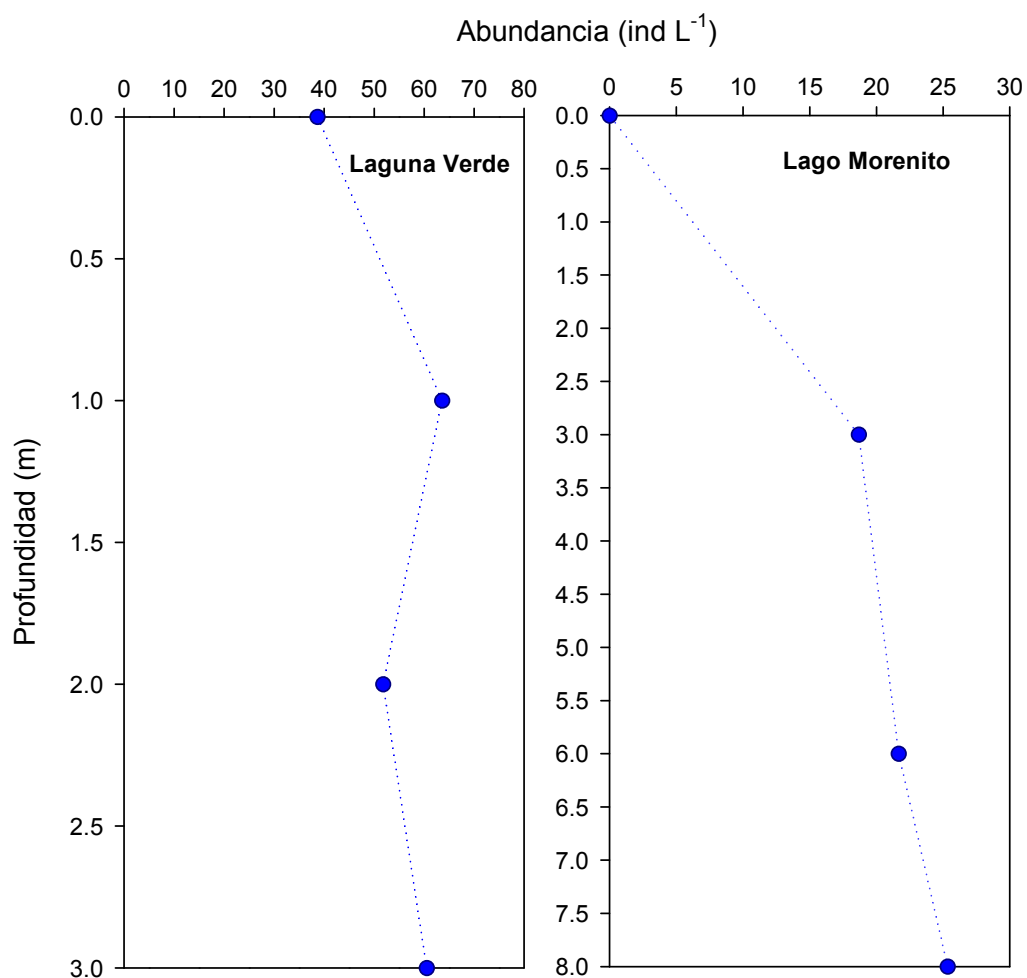


Figura 2.2: Distribución vertical diurna de *Boeckella gracilipes* en la Laguna Verde (panel izquierdo) y en el Lago Morenito (Panel derecho).

Descripción comparativa de los ambientes

Los ambientes relevados para la recolección de *Boeckella* spp. presentaron una amplia variación en los parámetros físico-químicos (Tabla 2.1). La temperatura fue uno de los parámetros más variables. Sin embargo los datos obtenidos deben considerarse como puntuales ya que corresponden a los meses de recolección del zooplancton para los experimentos de laboratorio (Tabla 2.1).

La mayor temperatura promedio se registró en la Laguna Verde, mientras que la menor temperatura promedio correspondió al Lago Morenito. La conductividad varió ampliamente, siendo la laguna Los Juncos la que presentó el valor medio más elevado, mientras que los valores más bajos

se registraron en la laguna Verde. Por otra parte, en la laguna Los Juncos se registraron los valores de pH más básicos, mientras que en el resto de los cuerpos de agua el pH fluctuó cercano a la neutralidad. Con respecto a la concentración del carbono orgánico disuelto (COD), las mayores concentraciones estimadas fueron las de la laguna Los Juncos y las menores concentraciones las de la Laguna Verde (Tabla 2.1).

Tabla 2.1: Variables físico-químicas registradas los sitios de obtención de *Boeckella* spp (promedio \pm 1DS). Los periodos de muestreo dependieron de la presencia y abundancia de *Boeckella* spp. en el ambiente.

Parámetros	Los Juncos	Teleférico	Verde	Morenito
Temperatura (°C)	10.03 \pm 5.32	12.29 \pm 8.4	13.55 \pm 6.47	8.04 \pm 6.01
Conductividad (μ S cm ⁻¹)	461.79 \pm 109.27	183 \pm 42.12	28.96 \pm 2.55	69.65 \pm 2.33
Sólidos totales (mg L ⁻¹)	4.6 \pm	92.2 \pm 20.90	14 \pm 1	0.71 \pm 0.45
pH	9.27 \pm 0.65	7.09 \pm 0.17	7.28 \pm 0.62	7.6 \pm 0.33
Oxígeno Disuelto (mg L ⁻¹)	10.50 \pm 1.84	9.29 \pm 2.83	9.46 \pm 0.45	9.72 \pm 0.55
Período	Mayo-Agosto 2007	Mayo-Noviembre 2008	Enero -Junio 2009	Junio-Diciembre 2009

A continuación se presentan las condiciones de radiación al pelo de agua medidas al mediodía a fines del verano en los lagos Morenito y Laguna Verde y a fines de la primavera en las lagunas Teleférico y Los Juncos. Se puede observar que la Laguna Los Juncos y la Laguna Teleférico presentaron condiciones similares, mientras que la Laguna Verde presentó una mayor irradiancia (Fig. 2.3). Estos datos son puntuales y definitivamente están influenciados por las condiciones instantáneas locales y temporales de nubosidad, temperatura del agua, etc. Sin embargo, ilustran que la laguna de altura recibe una mayor irradiancia que los ambientes pedemontanos.

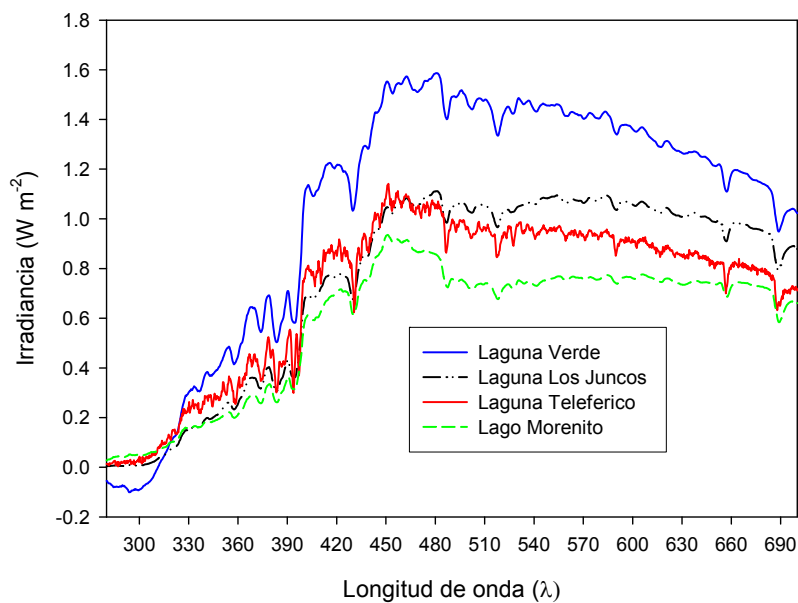


Figura 2.3: radiación incidente al pelo de agua medidas con un espectroradiómetro (Ocean Optics USB 2000) en los sitios de muestreo.

En los cuerpos de agua muestreados, los grupos más importantes dentro del zooplancton fueron los copépodos, los cladóceros y los rotíferos (Tabla 2.2). En cuanto a los copépodos calanoideos, en todas las lagunas se encontró el género *Boeckella*, mientras que en la laguna Los Juncos se halló además al calanoideo depredador *Parabroteas sarsi*. Entre los cladóceros, *Ceriodaphnia dubia* estuvo presente en todos los ambientes, mientras que *Daphnia* se encontró en la Laguna Los Juncos (*D. dadayana* y *D. obtusa*) y en el Lago Morenito (*D. ambigua*) (Tabla 2.2).

Tabla 2.2: Especies de zooplancton presentes en las lagunas Los Juncos, Verde y Teleférico y en el Lago Morenito al momento de recolección de *Boeckella* spp.

	Los Juncos	Teleférico	Verde	Morenito
COPEPODA				
<i>Boeckella antiqua</i>	x			
<i>Boeckella brevicaudata</i>		x		
<i>Boeckella gracilipes</i>			x	x
<i>Boeckella gracilis</i>		x		
<i>Parabroteas sarsi</i>	x			
Ciclopoidea	x	x	x	x
CLADOCERA				
<i>Alona</i> sp.	x			
<i>Bosmina longirostris</i>		x	x	x
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	x	x	x	x
<i>Chidorus</i> sp.	x	x		
<i>Daphnia</i> cf. <i>obtusa</i>	x			
<i>Daphnia ambigua</i>				x
<i>Daphnia dadayana</i>	x			
<i>Ilyocryptus</i> sp.	x			
<i>Simocephalus</i> sp.	x			
ROTIFERA				
<i>Brachionus angularis</i>	x			
<i>Brachionus urceolaris</i>	x			x
<i>Filinia longisecta</i>	x			
<i>Keratella cochlearis araucana</i>				x
<i>Keratella morenoi</i>	x			
<i>Lecane</i> sp.	x	x	x	x
<i>Monostyla</i> sp.			x	x
<i>Polyarthra vulgaris</i>		x		x
<i>Synchaeta</i> cf. <i>grandis</i>				x
<i>Synchaeta kitina</i>				x
<i>Trichocerca</i> sp.	x			x

2.4 Metodología experimental

Análisis de la variación experimental de compuestos foto-protectores en relación con la temperatura y la exposición a la radiación

Para determinar el efecto de la temperatura y de la radiación PAR+UVA sobre la concentración de compuestos foto-protectores se utilizaron dos análisis complementarios. La variación de los compuestos foto-protectores fue descrita en base a la proporción de las concentraciones tanto de MAAs como de carotenoides (concentración final / concentración inicial) en las diferentes condiciones experimentales. El segundo análisis fue la utilización de tasas cinéticas de bio-acumulación.

Diseño experimental

La recolección de los copépodos en los sitios de muestreo y su aclimatación fue descrita en la sección de materiales y métodos generales y en los períodos que se presentan en la Tabla 2.1. El montaje de los experimentos y de los controles iniciales para obtener la concentración de los compuestos foto-protectores fue realizado según se describió en el Capítulo 1 (Fig. 1.8).

El diseño experimental para estudiar el efecto de la temperatura y de la radiación sobre la bio-acumulación de MAAs y carotenoides consistió en un factorial con 2 variables independientes: 1- temperatura (5 niveles: 5, 8, 12, 16 y 20°C) y 2- radiación experimental (2 niveles: PAR+UVA y oscuridad). Este diseño fue aplicado independientemente para estudiar la variación de compuestos foto-protectores en 4 especies de *Boeckella*: *B. antiqua*, *B. gracilis*, *B. brevicaudata* y *B. gracilipes*. En todos los casos se midió como variable respuesta la concentración final de MAAs y carotenoides (Tabla 2.3).

Tabla 2.3: Esquema del diseño experimental para el análisis del efecto de la temperatura y de la exposición a la radiación en la variación de MAAs y carotenoides en *Boeckella* spp.

Factores	Concentración de compuestos foto-protectores	
	MAAs	Carotenoides
Temperatura 5 niveles (5, 8, 12, 16 y 20°C)	*	*
Tratamientos de radiación 2 niveles (PAR+UVA y oscuridad)	*	*

Variación experimental de los compuestos foto-protectores en relación con la temperatura y la exposición a la radiación

Para determinar el efecto de la temperatura y de la radiación (simulada en el tratamiento PAR+UVA) sobre la variación de MAAs y carotenoides se estandarizó por la concentración inicial de cada compuesto al comienzo de cada experimento mediante la fórmula que se presenta a continuación. Este procedimiento se realizó con el fin de obtener variables respuesta normalizadas por las concentraciones iniciales de ambos compuestos.

$$\text{Proporción del Compuesto foto - protector} = \frac{\text{Concentración del compuesto Final}}{\text{Concentración del compuesto Inicial}}$$

Análisis de la bio-acumulación de compuestos foto-protectores: tasas de bio-acumulación

Las tasas de bio-acumulación de compuestos foto-protectores fueron calculadas aplicando un modelo cinético de primer orden. El uso de este modelo supone que, *i)* los procesos de bio-acumulación, eliminación y acumulación o uptake, se ajustan a una cinética de primer orden y que *ii)* la tasa de ganancia neta depende de la exposición a la radiación (en este caso PAR+UVA). Por otra parte, se consideró que la acumulación de compuestos foto-protectores no aumenta en condiciones de oscuridad.

Las reacciones de primer orden obedecen a la siguiente relación:

$$r = \frac{\Delta[C]}{\Delta[t]} = h [C]$$

Dónde r es la tasa de reacción, C es la concentración final, t es el tiempo y h es una constante.

Al integrar la ecuación de primer orden se obtiene:

$$\ln [C]_t = -kt + [C]_0$$

$$h = \ln [C]_0 - \ln [C]$$

Dónde $[C]_0$ es la concentración inicial.

Las tasas cinéticas se calcularon utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Tasa de eliminación } (q) = \frac{\text{Ln}(\text{CPF})_{\text{inicial}} - \text{Ln}(\text{CPF})_{\text{oscuridad}}}{\text{Tiempo de duración del experimento (Días)}}$$

$$\text{Tasa de ganancia Neta } (k - q) = \frac{\text{Ln}(\text{CPF})_{\text{expuesto}} - \text{Ln}(\text{CPF})_{\text{inicial}}}{\text{Tiempo de duración del experimento (Días)}}$$

$$\text{Tasa de ganancia bruta } (k) = q + (k - q)$$

Dónde CPF es la concentración de compuestos foto-protectores (MAAs o carotenoides según corresponda) en el tratamiento con PAR+UVA ($\text{CPF}_{\text{expuesto}}$) y en el tratamiento en oscuridad ($\text{CPF}_{\text{oscuridad}}$), ponderados por la duración del experimento en días. Esta operatoria se repitió para obtener las tasas cinéticas de bio-acumulación a cada temperatura ensayada experimentalmente (5, 8, 12, 16 y 20°C).

Análisis estadísticos

Para analizar los efectos individuales e interactivos de la temperatura y de la exposición a la radiación PAR+UVA sobre la variación de los MAAs y carotenoides se aplicó el análisis de la varianza de dos vías (TWO-WAY ANOVA). Los factores analizados fueron la temperatura con 5 niveles y la presencia de radiación con 2 niveles. Se realizaron las comparaciones múltiples *a posteriori* entre los distintos niveles de los factores mediante el test de Tukey (Zar, 1999). En las diferentes especies de *Boeckella* spp. estudiadas, las relaciones obtenidas entre las tasas cinéticas de bio-acumulación de MAAs y carotenoides y la temperatura fueron ajustadas a modelos lineales simples.

En todos los casos y previamente al análisis de la varianza y/o de regresión, se comprobó la normalidad y homocedasticidad de los datos. En aquellos casos en que los datos no se ajustaron a alguno de los supuestos anteriores, se aplicó una transformación logarítmica con el fin de normalizarlos y/o de equalizar su varianza. El análisis de los datos fue realizado mediante los siguientes paquetes estadísticos: SIGMAPLOT 9.0 integración SIGMASTAT 3.1.

2.5 Resultados

Variación de los compuestos foto-protectores en relación con la temperatura y la exposición a la radiación

Boeckella antiqua

La concentración inicial de MAAs en los individuos de *Boeckella antiqua* fluctuó alrededor de 0.0129 ± 0.004 AU mg^{-1} P.S., mientras que la concentración inicial de los carotenoides en esta especie presentó un promedio general de 1.43 ± 0.27 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ P.S. La concentración de ambos tipos de compuestos se relacionó significativamente con la temperatura y la exposición al PAR+UVA, observándose asimismo un efecto interactivo entre ambas variables (Tabla 2.4). El incremento de la temperatura resultó en un incremento concomitante gradual en la proporción de MAAs respecto a la concentración inicial, resultando más elevadas las proporciones de compuestos a 16°C y 20°C en el tratamiento PAR+UVA (Fig. 2.4 panel izquierdo). En el tratamiento oscuro se observó una disminución paulatina de la proporción de MAAs con el incremento de la temperatura (Fig. 2.4). En el caso de los carotenoides las mayores proporciones se observaron a 16°C (Fig. 2.4 panel derecho). La proporción de carotenoides aumentó con la temperatura, sin embargo el patrón fue menos claro que en el caso de los MAAs. En el tratamiento oscuro se observó que la concentración de carotenoides decreció (proporción < 1) con el incremento de la temperatura (Fig. 2.4). En síntesis, la radiación PAR+UVA resultó inductora de la concentración tanto de MAAs como de carotenoides (Fig. 2.4).

Tabla 2.4: Análisis de la variancia de dos vías (Two-way Anova) para estudiar el efecto de la temperatura y de la radiación sobre la variación de MAAs y carotenoides en *B. antiqua*.

Compuesto	Factor	gl	F	P
MAAs	Temperatura	4	5.489	<0.05
	Radiación	1	677.807	<0.05
	Temperatura* Radiación	4	28.18	<0.05
Carotenoides	Temperatura	4	33.15	<0.05
	Radiación	1	200.898	<0.05
	Temperatura* Radiación	4	31.277	<0.05

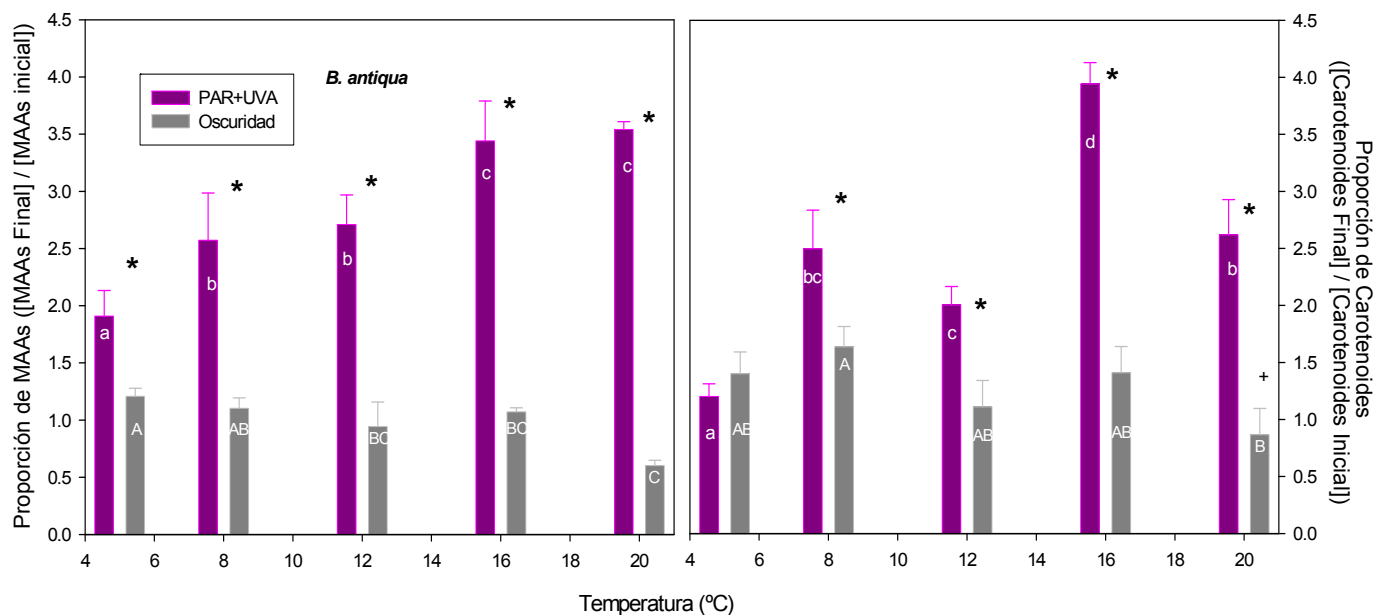


Figura 2.4: Proporción de compuestos foto-protectores ([Concentración final]/[Concentración inicial]), MAAs (panel izquierdo) y carotenoides (panel derecho), en *B. antiqua* en las incubaciones de laboratorio a diferentes temperaturas y condiciones de radiación. Barras violetas: proporción de compuestos foto-protectores en el tratamiento PAR+UVA. Barras grises: proporción de compuestos foto-protectores en el tratamiento de oscuridad. El asterisco (*) en la parte superior de las barras indica las diferencias entre los tratamientos de radiación a cada temperatura. Las letras minúsculas y mayúsculas, indican respuestas similares en las distintas temperaturas en el tratamiento PAR+UVA y oscuridad respectivamente (Prueba a posteriori de Tukey).

Boeckella gracilis

La concentración de MAAs hallada en *B. gracilis* al inicio de los experimentos presentó un promedio de $0.1229 \pm 0.089 \text{ AU}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ P.S.}$; mientras que los pigmentos carotenoides presentaron un promedio de $1.24 \pm 0.59 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ P.S.}$ La temperatura y la exposición a la radiación tuvieron efectos significativos e interactivos en la variación de MAAs y carotenoides (Tabla 2.5). En el caso de los MAAs se registraron proporciones elevadas a 5, 16 y 20°C, mientras que a 8 y a 12°C las proporciones fueron similares y cercanas a 1 (Fig. 2.5 panel izquierdo). En el tratamiento oscuro se observó un decrecimiento en la proporción de MAAs con el incremento de la temperatura (Fig. 2.5).

En *B. gracilis* la mayor proporción de carotenoides se observó en las incubaciones a 20°C (Fig. 2.5 panel derecho). En el tratamiento oscuro la proporción de carotenoides fue semejante en las incubaciones a 5, 16 y 20°C; mientras que a 8 y 12 °C las proporciones fueron menores (Fig. 2.5). La radiación PAR+UVA ejerció un efecto inductor sobre la proporción de carotenoides a todas las temperaturas ensayadas excepto a 5°C. A esta última temperatura, la proporción de carotenoides fue más elevada en el tratamiento oscuro (Fig. 2.5).

Tabla 2.5: Análisis de la variancia de dos vías (Two-way ANOVA) para estudiar el efecto de la temperatura y de la radiación sobre la variación de MAAs y carotenoides en *B. gracilis* de la Laguna Teleférico.

Compuesto	Factor	gl	F	P
MAAs	Temperatura	4	12.227	<0.05
	Radiación	1	169.134	<0.05
	Temperatura*Radiación	4	9.86	<0.05
Carotenoides	Temperatura	4	11.371	<0.05
	Radiación	1	28.445	<0.05
	Temperatura*Radiación	4	9.138	<0.05

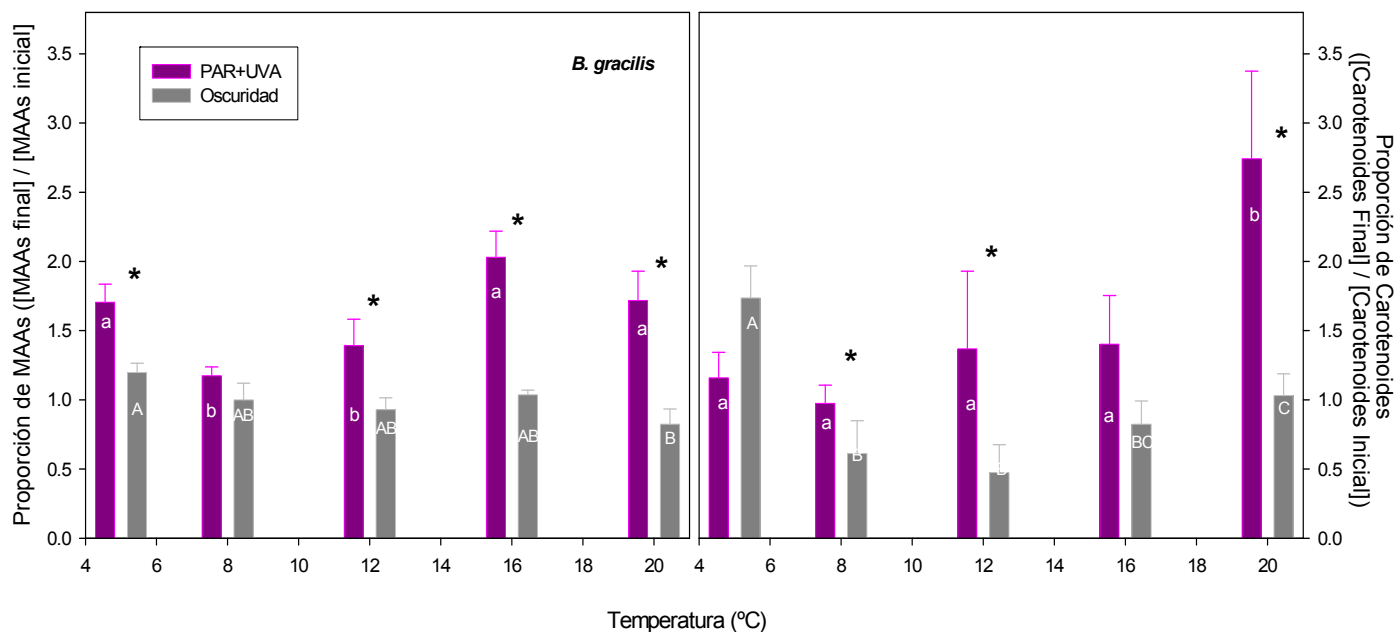


Figura 2.5: Proporción de compuestos foto-protectores ([Concentración final]/[Concentración inicial]), MAAs (panel izquierdo) y carotenoides (panel derecho), en *B. gracilis* en las incubaciones de laboratorio a diferentes temperaturas y condiciones de radiación. Barras violetas: proporción de compuestos foto-protectores en el tratamiento PAR+UVA. Barras grises: proporción de compuestos foto-protectores en el tratamiento de oscuridad. El asterisco (*) en la parte superior de las barras indica las diferencias entre los tratamientos de radiación a cada temperatura. Las letras minúsculas y mayúsculas, indican respuestas similares en las distintas temperaturas en el tratamiento PAR+UVA y oscuridad, respectivamente (Prueba a posteriori deTukey).

Boeckella brevicaudata

B. brevicaudata no resistió la incubación a 16 y 20°C, por lo tanto las incubaciones fueron realizadas a 5, 8, 10 y 12°C.

La concentración inicial promedio de MAAs de *B. brevicaudata* fue $0.0167 \pm 0.0045 \text{ AU}\cdot\text{mg}^{-1}$ P.S., mientras que la de carotenoides fue de $1.28 \pm 0.77 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ P.S. La temperatura, la exposición a la radiación PAR+UVA y la interacción de ambos factores tuvieron efectos significativos en la variación de ambos compuestos (Tabla 2.6). En el caso de los MAAs, en condiciones de PAR+UVA se observó un decrecimiento en las proporciones en relación con la temperatura (Fig. 2.6 panel izquierdo). En el caso de los pigmentos carotenoides, se observó una mayor proporción en las incubaciones a 5 y 12°C (Fig. 2.6, panel derecho). En el tratamiento oscuro las proporciones tanto de MAAs como de carotenoides decrecieron con el incremento de la temperatura (Fig. 2.6). En la mayoría de los casos la presencia de radiación PAR+UVA produjo un incremento en la proporción de carotenoides comparada con el tratamiento en oscuridad, excepto a 8°C en la cual la proporción promedio resultó mayor en el tratamiento oscuro (Fig. 2.6).

Tabla 2.6: Análisis de la variancia de dos vías (Two-way ANOVA) para estudiar el efecto de la temperatura y de la radiación sobre la variación de MAAs y carotenoides en *B. brevicaudata* de la Laguna Teleférico.

Compuesto	Factor	gl	F	P
MAAs	Temperatura	3	32.16	<0.05
	Radiación	1	163.623	<0.05
	Temperatura*Radiación	3	9.324	<0.05
Carotenoides	Temperatura	3	13.947	<0.05
	Radiación	1	51.525	<0.05
	Temperatura*Radiación	3	21.377	<0.05

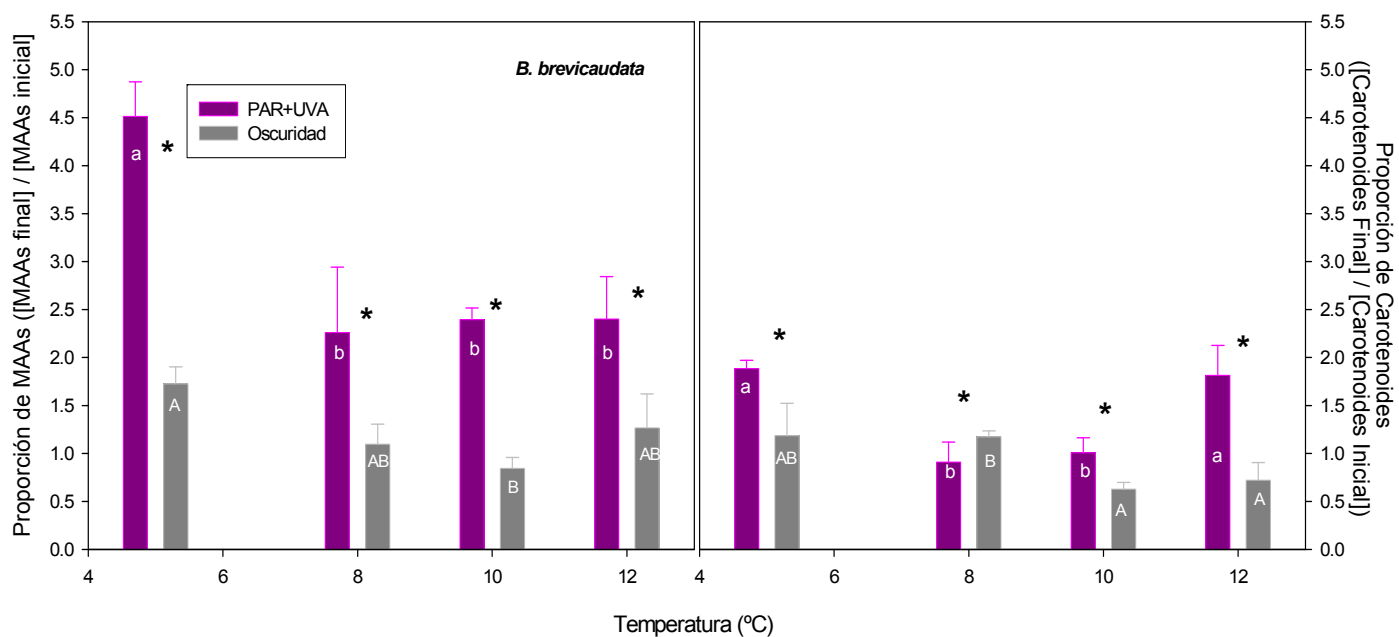


Figura 2.6: Proporción de compuestos foto-protectores ([Concentración final]/[Concentración inicial]), MAAs (panel izquierdo) y carotenoides (panel derecho), en *B. brevicaudata* en las incubaciones de laboratorio a diferentes temperaturas y condiciones de radiación. Barras violetas: proporción de compuestos foto-protectores en el tratamiento PAR+UVA. Barras grises: proporción de compuestos foto-protectores en el tratamiento de oscuridad. El asterisco (*) en la parte superior de las barras indica las diferencias entre los tratamientos de radiación a cada temperatura. Las letras minúsculas y mayúsculas, indican respuestas similares en las distintas temperaturas en el tratamiento PAR+UVA y oscuridad, respectivamente (Prueba a posteriori de Tukey).

Variación intraespecífica de los MAAs en *Boeckella gracilipes*: respuesta de poblaciones alopátricas (Laguna Verde y Lago Morenito)

En esta sección se presentan los resultados del estudio experimental para analizar la existencia de respuestas intra-específicas diferenciales en la determinación de la foto-protección por MAAs frente a cambios en la temperatura y en la exposición a la radiación PAR+UVA.

Caracterización de las poblaciones

En *Boeckella gracilipes* el estudio de los MAAs indicó diferencias en la concentración y composición de estos compuestos en los copépodos provenientes de diferentes poblaciones (Fig. 2.7). En cuanto a la concentración total de los MAAs, resultó tres veces más elevada en los copépodos de la Laguna Verde que en los del Lago Morenito (Mann-Whitney $Z=64$, $p<0.05$). Por otra parte, se detectaron diferencias en los MAAs presentes entre los copépodos de las dos poblaciones. En ambas poblaciones de *Boeckella* se detectaron un total de cinco MAAs, de los cuales sólo tres compuestos, Porphyra-334, MAA-332 y Palithene, fueron hallados en ambas poblaciones. En el caso de Porphyra-334, la concentración fue mucho más elevada en *B. gracilipes* proveniente de la Laguna Verde que en los individuos del Lago Morenito (Mann-Whitney $Z=129$, $p<0.05$). En el caso del compuesto MAA-332 se observó un patrón inverso al anterior, registrándose una concentración significativamente mayor en la población del Lago Morenito ($1.26 \pm 0.46 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ P. S.) que en la población de la Laguna Verde ($0.16 \pm 0.06 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ P. S.) ($t=7.46$; $p<0.05$). El compuesto Palithene presentó bajas concentraciones en ambas poblaciones, sin embargo, su concentración fue significativamente mayor en la población de la Laguna Verde (Mann-Whitney $Z=123$, $p<0.05$) (Fig. 2.7). El compuesto Micosporina-Glicina sólo fue hallado en las muestras de campo de la población proveniente de la Laguna Verde con una concentración promedio de $2.08 \pm 0.83 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ P. S. Por último, el compuesto Shinorina sólo se halló en la población de *B. gracilipes* del Lago Morenito con una concentración promedio inicial de $0.20 \pm 0.099 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ P. S. (Fig. 2.7).

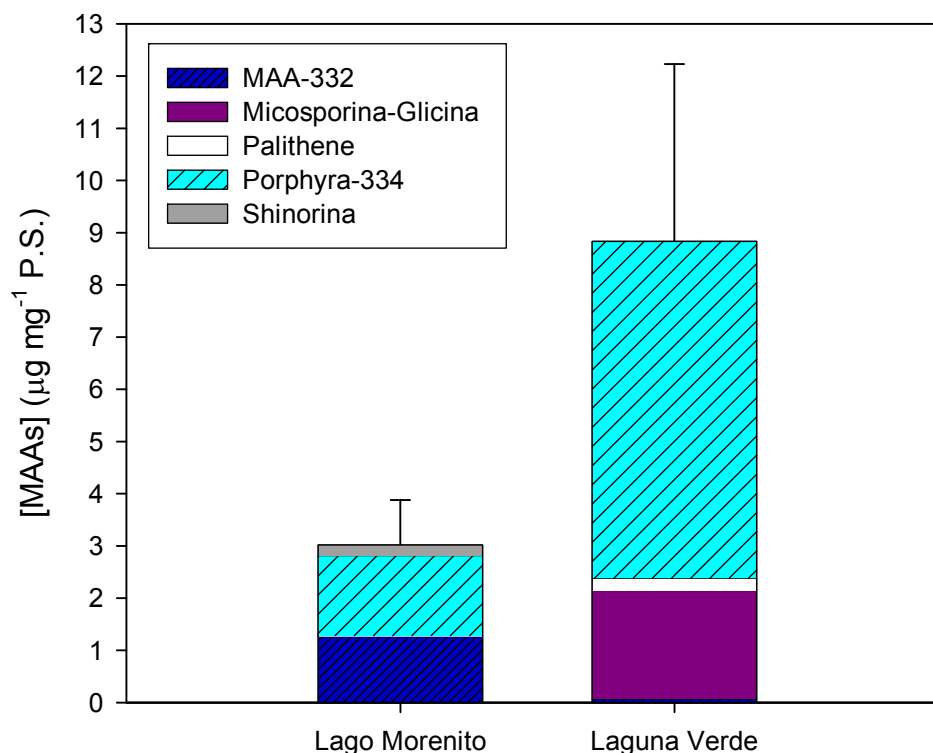


Figura 2.7: Concentración de los distintos aminoácidos tipo micoporinas (MAAs) presentes en dos poblaciones alopátricas de *B. gracilipes* provenientes del Lago Morenito y de la Laguna Verde.

Efectos de la temperatura y la exposición a la radiación PAR+UVA sobre la variación experimental de los MAAs totales

La variación de los MAAs en las dos poblaciones de *B. gracilipes* (L. Verde y L. Morenito) se vió afectada significativamente por la temperatura y por la exposición a la radiación (Tabla 2.7). Sin embargo, sólo en la población proveniente del Lago Morenito existió además un efecto interactivo entre la temperatura y la exposición a la radiación PAR+UVA.

En el caso de la población de *B. gracilipes* de la Laguna Verde, el tratamiento de radiación resultó en una mayor concentración de los MAAs, excepto a 12°C en el que se observaron proporciones similares en ambos tratamientos (Fig. 2.8 A). La proporción final de los MAAs de los copépodos de la Laguna Verde fue más elevada a 5 y a 16°C (Fig. 2.80). En el caso de la población de *B. gracilipes* del Lago Morenito los máximos valores de MAAs se produjeron a 8°C y en presencia de PAR+UVA, con una proporción promedio ($\pm 1DS$) de 3.52 ± 0.12 . En el tratamiento oscuro se observó una disminución en la proporción de MAAs con el incremento de la temperatura (Fig. 2.8 B). La

proporción de MAAs en los copépodos provenientes del Lago Morenito fue significativamente mayor en comparación con los de la Laguna Verde (Mann-Whitney T= 4443, p<0.05).

Tabla 2.7: Análisis de la variancia de dos vías (Two-way ANOVA) para estudiar el efecto de la temperatura y de la radiación sobre la variación MAAs totales en *B. gracilipes* de la Laguna Verde y el Lago Morenito.

Población	Factor	gl	F	P
Verde	Temperatura	4	59.978	<0.05
	Radiación	1	28.467	<0.05
	Temperatura*Radiación	4	2.197	0.083
Morenito	Temperatura	4	98.34	<0.05
	Radiación	1	428.037	<0.05
	Temperatura*Radiación	4	25.77	<0.05

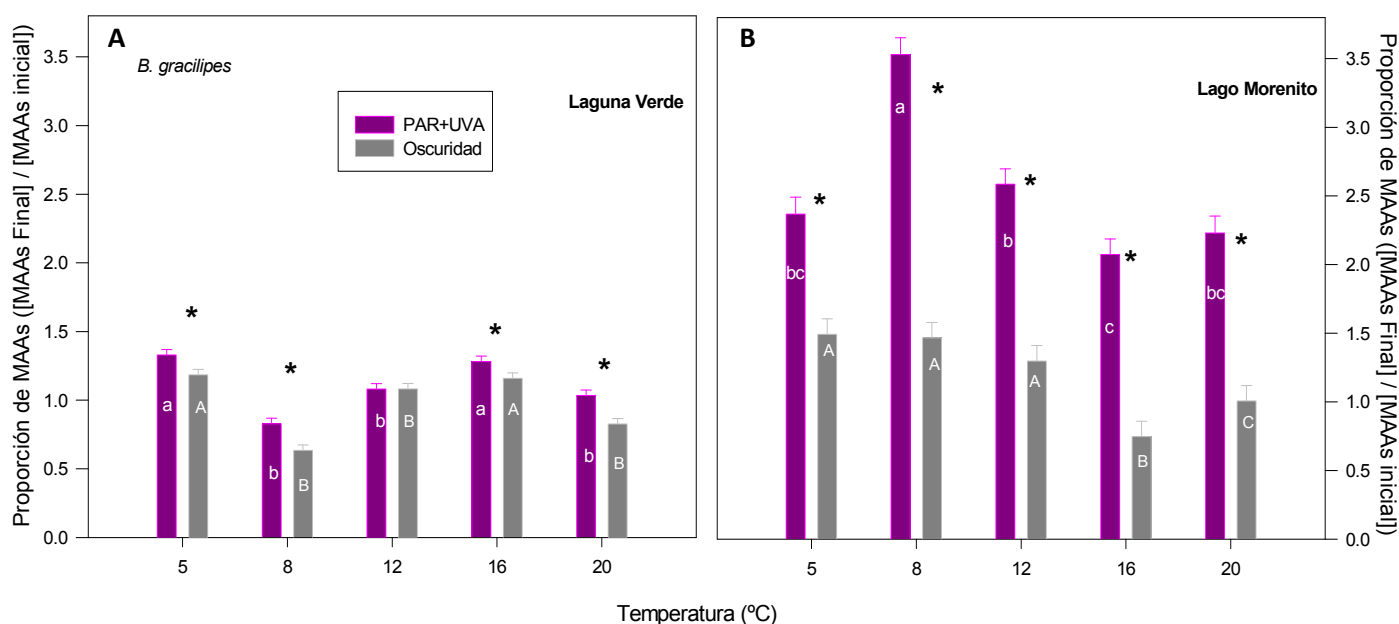


Figura 2.8: Proporción de MAAs ([Concentración final]/[Concentración inicial]) en *B. gracilipes* de la Laguna Verde (panel izquierdo) y del Lago Morenito (panel derecho) en las incubaciones de laboratorio a diferentes temperaturas y condiciones de radiación. Barras violetas: proporción de MAAs en el tratamiento de PAR+UVA. Barras grises: proporción de MAAs en el tratamiento en oscuridad. El asterisco (*) en la parte superior de las barras indica las diferencias entre los tratamientos de radiación a cada temperatura. Las letras minúsculas y mayúsculas, indican respuestas similares en las distintas temperaturas en el tratamiento PAR+UVA y oscuridad, respectivamente (Prueba a posteriori de Tukey).

Variación de los aminoácidos tipo micosporinas en B. gracilipes

Los MAAs que presentaron una concentración mayor al 5% con respecto al total fueron analizados en relación con la temperatura y la presencia de radiación en las dos poblaciones de *B. gracilipes*.

En el caso de la población proveniente de la Laguna Verde, los compuestos Porphyra-334 y Micosporina-Glicina, fueron afectados significativamente por la temperatura y por la radiación. Se verificó la existencia de un efecto interactivo entre ambas variables sobre la proporción de Porphyra-334 (Tabla 2.8). En el caso de la población proveniente del Lago Morenito los compuestos Porphyra-334, MAA-332 y Shinorina fueron afectados por la temperatura, la presencia de radiación y por la interacción entre ambas variables (Tabla 2.8). El compuesto Porphyra-334 presentó una mayor proporción a 5°C en la población de la Laguna Verde, mientras que en la población del Lago Morenito la mayor proporción se halló a 8°C (Fig. 2.9 a y c). El tratamiento PAR+UVA afectó significativamente la proporción de Porphyra-334 sólo en los copépodos provenientes del Lago Morenito (Fig. 2.9). La proporción de Porphyra-334 de los copépodos provenientes del Lago Morenito fue significativamente mayor que la de los copépodos de la Laguna Verde (Mann-Whitney T=4427, $p<0.05$).

La temperatura y el tratamiento de radiación afectaron significativamente la proporción de Micosporina-Glicina en los copépodos de la Laguna Verde (Tabla 2.8). Los mayores valores de este compuesto se obtuvieron a 5, 12 y 16°C (Fig. 2.9).

El compuesto MAA-332, presente sólo en los copépodos del Lago Morenito, fue afectado por la temperatura, por la presencia de radiación y por la interacción entre ambos factores. Las mayores proporciones de MAA-332 se registraron a 8°C en el tratamiento PAR+UVA. En el tratamiento oscuro la variación del MAA-332 fue menor (Fig. 2.9). Por último, el compuesto Shinorina, presentó las mayores proporciones promedio a 8°C en el tratamiento PAR+UVA (Fig. 2.9).

Tabla 2.8: Análisis de la variancia de dos vías (Two-way ANOVA) para estudiar el efecto de la temperatura y de la radiación sobre la variación de los distintos MAAs en *B. gracilipes* de la Laguna Verde y del Lago Morenito.

Población	Compuestos	Factor	F	P
L. Verde	Porphyra-334	Temperatura	83.129	<0.05
		Radiación	1.095	0.3
		Temperatura* Radiación	2.902	<0.05
	Micosporina-Glicina	Temperatura	27.038	<0.05
		Radiación	170.047	<0.05
		Temperatura* Radiación	0.784	0.541
L. Morenito	Porphyra-334	Temperatura	81.505	<0.05
		Radiación	488.661	<0.05
		Temperatura* Radiación	6.922	<0.05
	MAA-332	Temperatura	17.471	<0.05
		Radiación	10.102	<0.05
		Temperatura* Radiación	3.554	<0.05
	Shinorina	Temperatura	3.093	<0.05
		Radiación	176.212	<0.05
		Temperatura* Radiación	6.061	<0.05

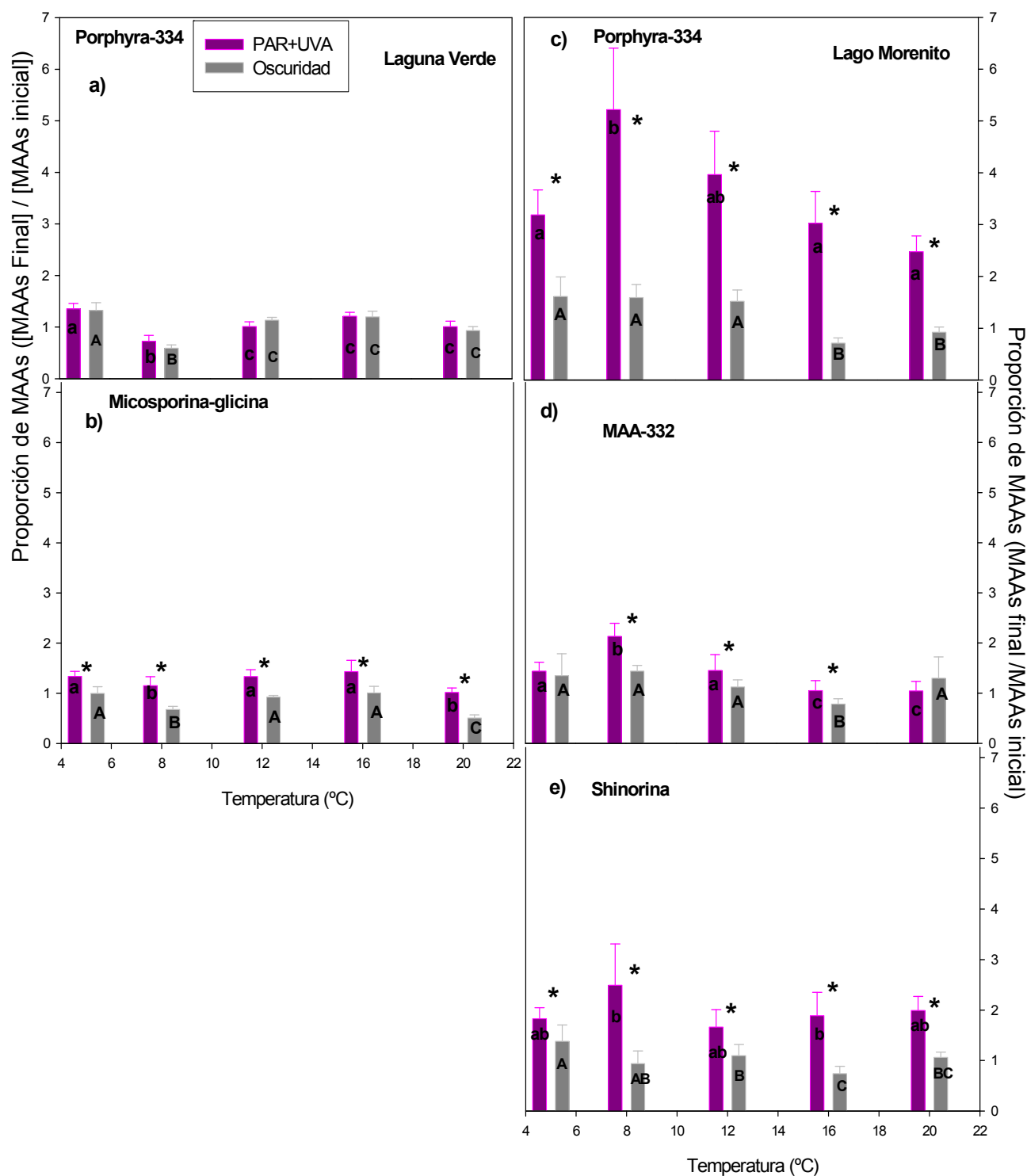


Figura 2.9: Variación de MAAs ([MAAs final] / [MAAs inicial]) en *Boeckella gracilipes* de la Laguna Verde (paneles a la izquierda) y el Lago Morenito (paneles a la derecha): a) Porphyra-334; b) Micosporina-Glicina; c) Porphyra-334; d) MAA-332 y e) Shinorina. Barras violetas: proporción de MAAs en el tratamiento PAR+UVA y barras grises: proporción de MAAs en oscuridad. El asterisco (*) en la parte superior de las barras indica las diferencias entre los tratamientos de radiación a cada temperatura. Las letras minúsculas y mayúsculas, indican respuestas similares en las distintas temperaturas en el tratamiento PAR+UVA y oscuridad, respectivamente (Prueba a posteriori de Tukey).

Bio-acumulación de compuestos foto-protectores

La bio-acumulación de compuestos foto-protectores fue analizada mediante la aplicación de un modelo cinético de primer orden, suponiendo una variación lineal de la concentración de compuestos foto-protectores con la temperatura. Se calcularon las tasas cinéticas de eliminación, de ganancia neta y de ganancia bruta para ambos tipos de compuestos foto-protectores en cuatro especies del género *Boeckella*.

Boeckella antiqua

Las tasas cinéticas (eliminación, ganancia bruta y ganancia neta) de bio-acumulación de MAAs y carotenoides, presentaron en todos los casos una relación directa significativa con la temperatura. La tasa cinética de ganancia bruta de ambos compuestos presentó la mayor pendiente, seguida por la tasa cinética de eliminación y de ganancia neta respectivamente (Tabla 2.9 y Fig. 2.10).

Tabla 2.9: Coeficientes de determinación y análisis de la variancia de los modelos lineales ajustados entre las tasas de ganancia bruta, eliminación y ganancia neta de los MAAs y carotenoides y la temperatura en *B. antiqua*.

Compuesto	Tasas cinéticas de bio-acumulación	r^2	F	P
MAAs	Tasa de Ganancia bruta (k)	0.69	29.692	<0.05
	Tasa de Eliminación (q)	0.553	16.095	<0.05
	Tasa de Ganancia Neta (k + q)	0.78	47.672	<0.05
Carotenoides	Tasa de Ganancia bruta (k)	0.517	13.921	<0.05
	Tasa de Eliminación (q)	0.416	9.259	<0.05
	Tasa de Ganancia Neta (k + q)	0.483	12.123	<0.05

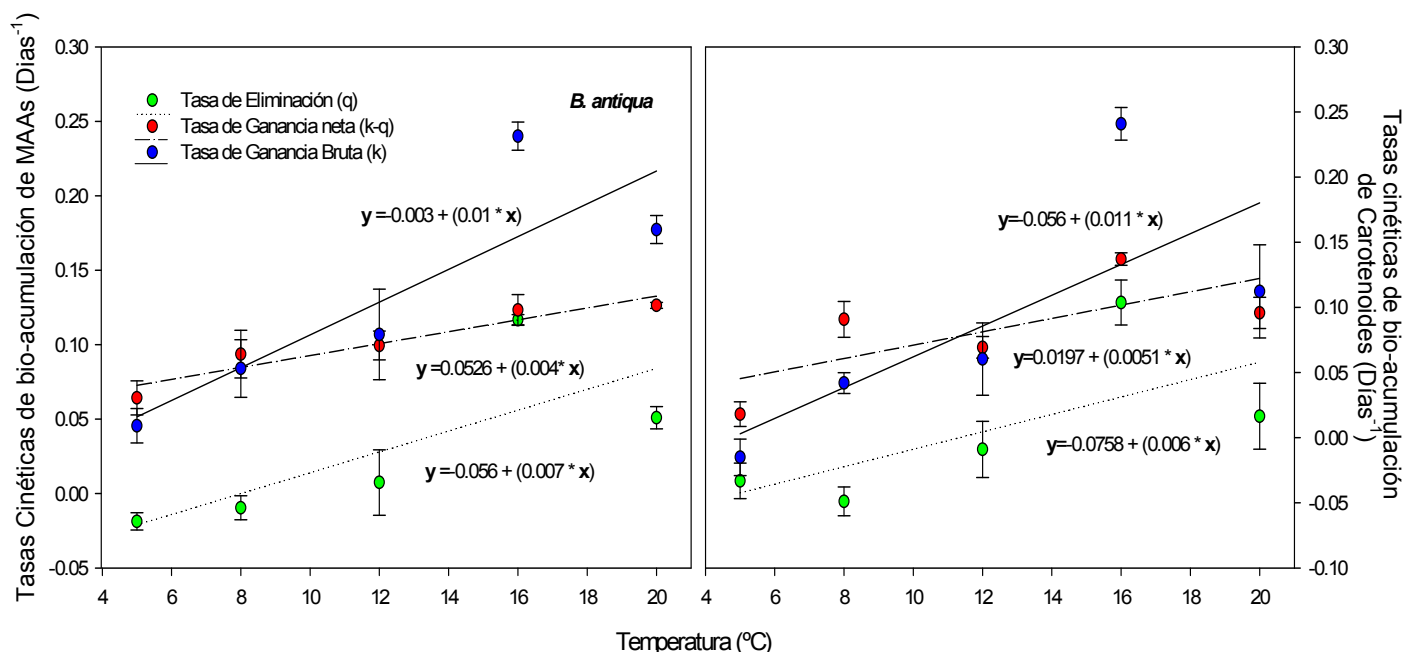


Figura 2.10: Tasas cinéticas (promedio±1DS) de bio-acumulación de MAAs (panel izquierdo) y de carotenoides (panel derecho) en relación con la temperatura en *B. antiqua*. Tasas de ganancia bruta (círculos azules), eliminación (círculos verdes) y ganancia neta (círculos rojos). Las rectas corresponden al modelo lineal ajustado que se muestra en cada caso.

Boeckella gracilis

Las tasas cinéticas de eliminación y ganancia bruta de bio-acumulación de MAAs se incrementaron significativamente con la temperatura en *B. gracilis*. La tasa de eliminación fue la que mayor pendiente presentó, mientras que la pendiente de la tasa de ganancia bruta en función de la temperatura fue menor (Fig. 2.11 panel izquierdo). En el caso de los carotenoides, sólo la tasa cinética de ganancia neta fue dependiente de la temperatura ($F=7.26$, $p<0.05$) (Tabla 2.10 y Fig. 2.11 panel derecho).

Tabla 2.10: Coeficientes de determinación y análisis de la variancia de los ajustes a modelos lineales entre las tasas de ganancia bruta, eliminación y ganancia neta de MAAs y carotenoides y la temperatura en *B. gracilis*.

Compuesto	Tasas cinéticas de bio-acumulación	r ²	F	P
MAAs	Tasa de Ganancia bruta (k)	0.53	16.17	<0.05
	Tasa de Eliminación (q)	0.56	18.368	<0.05
	Tasa de Ganancia Neta (k + q)	0.16	2.693	0.123
Carotenoides	Tasa de Ganancia bruta (k)	0.233	4.265	0.058
	Tasa de Eliminación (q)	0.07	0.106	0.75
	Tasa de Ganancia Neta (k + q)	0.361	7.926	<0.05

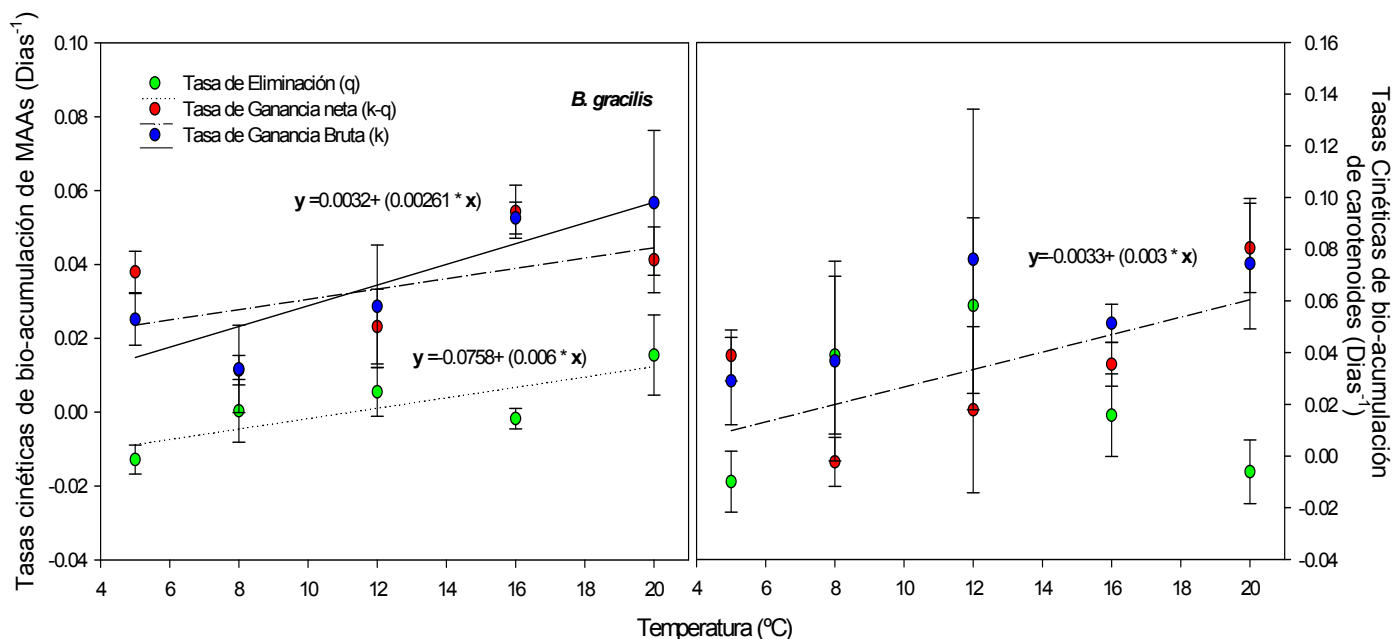


Figura 2.11: Tasas cinéticas (promedio±1DS) de bio-acumulación de MAAs (panel izquierdo) y de carotenoides (panel derecho) en relación con la temperatura en *B. gracilis*. Tasas de ganancia bruta (círculos azules), eliminación (círculos verdes) y ganancia neta (círculos rojos). Las rectas corresponden al modelo lineal ajustado que se muestra en cada caso.

Boeckella brevicaudata

En *B. brevicaudata* las tasas de eliminación de MAAs y de carotenoides presentaron una relación directa y significativa con la temperatura (Tabla 2.11). Adicionalmente, la tasa de ganancia neta de MAAs disminuyó significativamente con el incremento de la temperatura ($r^2=0.49$, $p<0.05$) (Fig. 2.12). Las tasas de ganancia bruta de MAAs y de carotenoides fueron independientes de la temperatura (Fig. 2.12).

Tabla 2.11: Coeficientes de determinación y análisis de la variancia de los ajustes a modelos lineales entre las tasas de ganancia bruta, eliminación y ganancia neta de bio-acumulación (MAAs y carotenoides) y la temperatura en *Boeckella brevicaudata* de la Laguna Teleférico.

Compuesto	Tasas cinéticas de bio-acumulación	r ²	F	P
MAAs	Tasa de Ganancia bruta (k)	0.036	0.492	0.495
	Tasa de Eliminación (q)	0.325	6.273	<0.05
	Tasa de Ganancia Neta (k + q)	0.497	12.845	<0.05
Carotenoides	Tasa de Ganancia bruta (k)	0.122	1.669	0.221
	Tasa de Eliminación (q)	0.49	11.558	<0.05
	Tasa de Ganancia Neta (k + q)	0.04	0.575	0.463

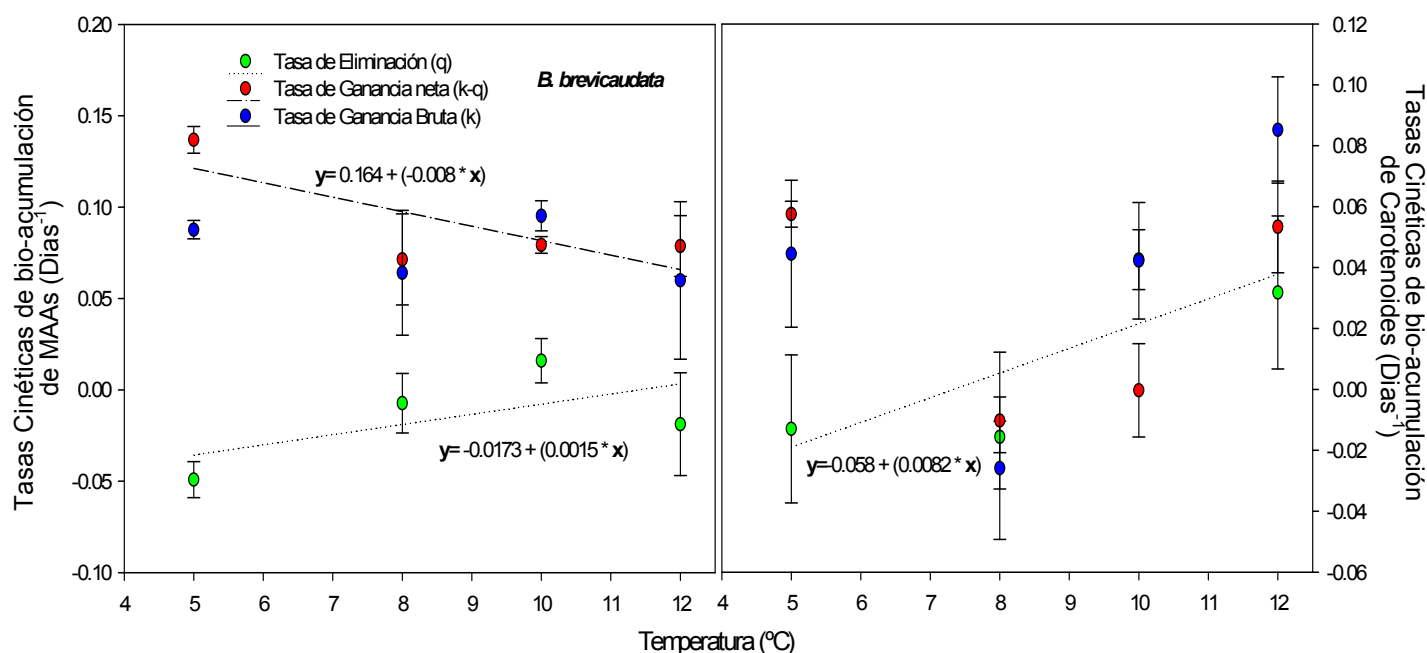


Figura 2.12: Tasas cinéticas (promedio \pm 1DS) de bio-acumulación de MAAs (panel izquierdo) y de carotenoides (panel derecho) en relación a la temperatura en *B. brevicaudata*. Tasas de ganancia bruta (círculos azules), eliminación (círculos verdes) y ganancia neta (círculos rojos). Las rectas corresponden al modelo lineal ajustado que se muestra en cada caso.

Variación en las tasas de bio-acumulación de MAAs en dos poblaciones alopátricas de *Boeckella gracilipes*

En las dos poblaciones de *B. gracilipes* estudiadas la bio-acumulación de MAAs presentó patrones diferentes en función de la temperatura. Las tasas cinéticas de bio-acumulación de MAAs fueron dependientes de la temperatura en la población proveniente del Lago Morenito, mientras que en la población de la Laguna Verde resultaron independientes de esta variable (Tabla 2.12).

En *B. gracilipes* del Lago Morenito las tasas de eliminación y de ganancia bruta se incrementaron con la temperatura, siendo la tasa de eliminación la que mayor pendiente presentó. La tasa de ganancia neta de MAAs disminuyó con el incremento de la temperatura (Tabla 2.12 y Fig. 2.13).

Tabla 2.12: Coeficientes de determinación y análisis de la variancia de los ajustes a modelos lineales entre las tasas de ganancia bruta, eliminación y ganancia neta de MAAs y la temperatura en poblaciones de *B. gracilipes* de la Laguna Verde y del Lago Morenito.

Población	Tasas cinéticas de bio-acumulación	r ²	F	P
L. Verde	Tasa de Ganancia bruta(k)	0.01	0.301	0.588
	Tasa de Eliminación (q)	0.03	1.064	0.311
	Tasa de Ganancia Neta (k + q)	0.02	0.665	0.422
L. Morenito	Tasa de Ganancia bruta (k)	0.17	5.157	<0.05
	Tasa de Eliminación (q)	0.49	24.026	<0.05
	Tasa de Ganancia Neta (k + q)	0.19	6.124	<0.05

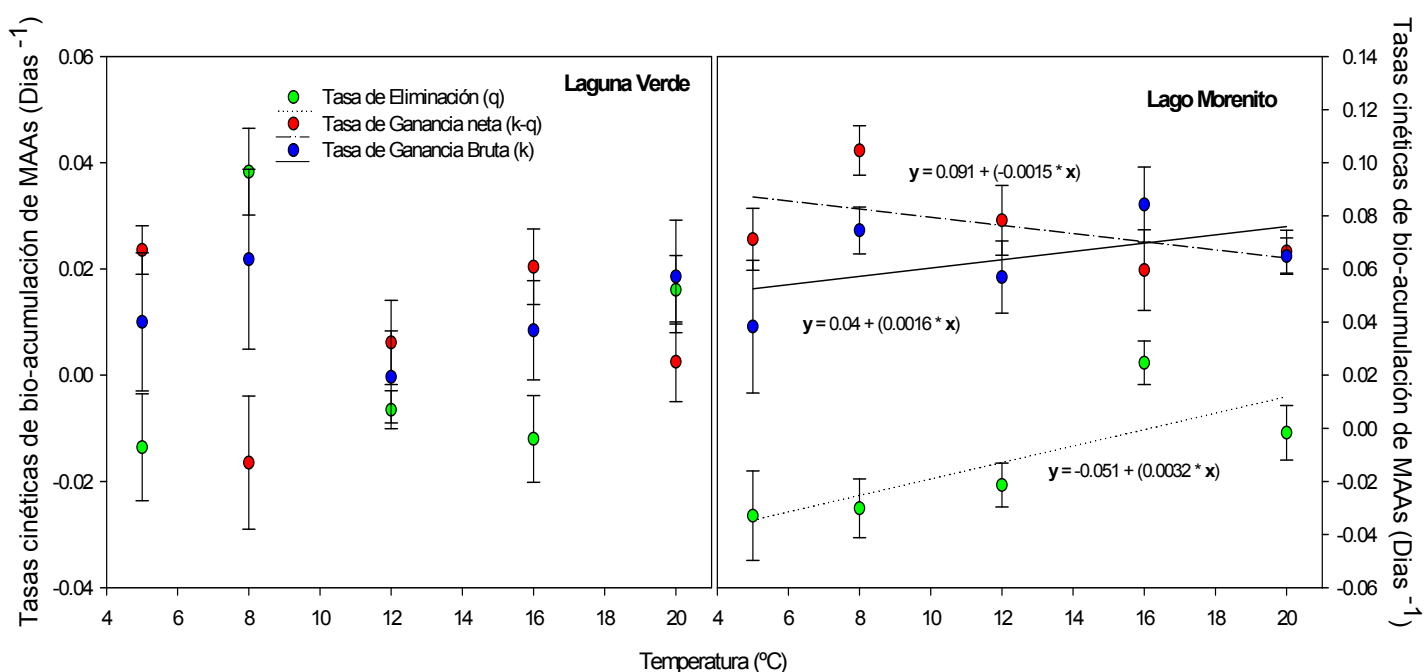


Figura 2.13: Relación entre las tasas (promedio±1DS) de bio-acumulación de MAAs y la temperatura en *B. gracilipes* de la Laguna Verde (panel izquierdo) y del Lago Morenito (panel derecho). Ganancia bruta (círculos azules), eliminación (círculos verdes) y ganancia neta (círculos rojos). Las rectas corresponden al modelo lineal ajustado que se muestra en cada caso.

2.6 Discusión

Variación en la concentración y composición de los MAAs en relación con la temperatura y la exposición a la radiación

En este capítulo se estudió el efecto conjunto de la temperatura y la radiación PAR+UVA sobre el nivel de MAAs y carotenoides en diferentes especies de *Boeckella*. En todas las especies estudiadas se observó que la presencia de PAR+UVA indujo a una mayor proporción tanto de MAAs como de carotenoides al final de las incubaciones. Esta inducción de compuestos foto-protectores por exposición a la radiación ha sido observada previamente en otros copépodos (Hairston, 1979b; Moeller et al, 2005; Hansson et al, 2007). Por otra parte, en la mayoría de las especies de *Boeckella* se observó un efecto interactivo significativo entre el tratamiento de radiación PAR+UVA y la temperatura sobre la proporción tanto de MAAs como de carotenoides.

En *B. antiqua* y *B. gracilis* se observaron las mayores proporciones de MAAs en las incubaciones a 16 y 20°C. El hábitat de ambas especies se caracteriza por ser extremadamente somero (<1 m), con elevada turbidez, fuerte resuspensión y amplia fluctuación térmica tanto a nivel estacional como diario (Pérez, 2007; García et al, 2008). Las temperaturas experimentales a las que se observaron las mayores diferencias entre la concentración inicial y la final de MAAs en *B. antiqua* y *B. gracilis* coinciden con las temperaturas de primavera-verano y períodos de elevada exposición a la radiación en los ambientes de origen. En el caso particular de *B. antiqua* esto ha sido registrado previamente por Pérez (2007).

En *B. brevicaudata* y *B. gracilipes* del Lago Morenito, las mayores proporciones de MAAs se hallaron en las incubaciones a 5 y 8°C respectivamente. En el caso de *B. brevicaudata*, su ciclo de desarrollo transcurre durante el invierno, con temperaturas en la columna de agua siempre por debajo de los 8°C, siendo las temperaturas mayores a 12°C limitantes para su supervivencia. Cabe mencionar que García (2010) y Laspoumaderes et al (2010) evidenciaron que el ciclo poblacional de *B. brevicaudata* se desarrolla a temperaturas menores a 9°C en la Laguna Fantasma, un ambiente somero cercano a la Laguna Teleférico. En esta especie la temperatura a la que se observó la mayor diferencia entre la concentración inicial y la final de MAAs fue a 5°C.

B. gracilipes del Lago Morenito presenta mayor abundancia poblacional en el otoño y hasta el fin de la primavera, habitando los estratos profundos (Fig. 2.2), que poseen una mayor estabilidad térmica. Balseiro y Modenutti, 1990 describieron un patrón anual semejante de abundancia y distribución de la especie en el Lago Escondido, un ambiente somero cercano. En el Lago Morenito las capas más profundas suelen tener una menor temperatura que las capas superficiales, siendo

además las capas profundas las menos luminosas (Helbling et al, 2001; Pérez et al, 2002; Alonso et al, 2004).

La variabilidad intra-específica de la concentración de los MAAs como respuesta a la temperatura y a la radiación PAR+UVA observada en las poblaciones de *B. gracilipes* del Lago Morenito y de la Laguna Verde, reflejaría la existencia de adaptaciones locales al clima térmico y óptico. Esto puede evidenciarse de evidencia previa acerca de los patrones de concentración de MAAs de diferentes poblaciones de *B. gracilipes* de lagos y embalses norpatagónicos presentados por Tartarotti et al, 2004.

En el caso de la población de la Laguna Verde, se observó en general una menor magnitud de la proporción de MAAs en el tratamiento PAR+UVA que en la población del Lago Morenito. Además, el efecto de la temperatura sobre la variación de los MAAs fue también menor en la población de la Laguna Verde. Esta mayor estabilidad tanto a los tratamientos de radiación y de temperatura en los copépodos de la Laguna Verde podría deberse tanto a una adaptación a niveles altos de radiación (Zagarese et al, 1999) como de fluctuación térmica de este cuerpo de agua de altura (Úbeda et al, 1999) y/o a la interacción entre ambos factores. Por otra parte, esta menor plasticidad podría responder a la conveniencia de poseer niveles basales elevados de MAAs debido a la imposibilidad de evitar niveles altos de radiación en este ambiente somero (Fig. 2.3). Sin embargo, cabe especular que las condiciones experimentales de intensidad de la radiación aplicadas no resultaran inductoras de mayores concentraciones de MAAs, como fue sugerido en el caso de *B. gibbosa* (García et al, 2010). En cuanto a la temperatura, esta especie permanece en la laguna durante todo el año, desarrollando su período reproductivo hacia fin del verano. Los copépodos entran en diapausa como copepodito IV y/o V, permaneciendo en ese estadio a lo largo del período de congelamiento de la laguna (Junio a Octubre) (observación personal). Fuera del período de congelamiento, los niveles de temperatura de la laguna son muy variables en términos diario y estacional, debido a su baja resiliencia térmica dada su escasa profundidad. En meses estivales la temperatura llega a 22°C en toda la columna de agua (observación personal), mientras que a fin del verano puede presentar una variación de 2 a 3 °C entre la superficie y el fondo (Úbeda et al, 1999). En el caso de la población del Lago Morenito, la mayor acumulación observada en los tratamientos de radiación y temperatura se debería a que esta población se encuentra bajo una mayor estabilidad ambiental en relación a estos dos factores. Esto se debería en parte a su posibilidad de seleccionar estratos con menor exposición a la RUV y con mayor estabilidad térmica. En este contexto, la especie mantiene un menor nivel de MAAs probablemente adecuado al clima óptico, y presenta una plasticidad mayor en la respuesta de los MAAs que estaría determinada tanto por la temperatura como por la radiación (García et al, 2011).

Adicionalmente, *B. gracilipes* posee una composición de MAAs distinta en la Laguna Verde y en el Lago Morenito. En los copépodos de la Laguna Verde se presenta un conjunto de dos compuestos predominantes, Porphyra-334 y Micosporina-Glicina; mientras que en los copépodos del Lago Morenito predominan Porphyra-334, MAAs 332 y Shinorina. Las diferencias interpoblacionales en la concentración de MAAs en *B. gracilipes*, podrían atribuirse a los diferentes niveles de exposición de ambas poblaciones; mientras que las observadas en la composición de los MAAs podrían atribuirse a la dieta específica de los copépodos en cada ambiente, a la composición de su flora endosimbionte, entre otros. El compuesto Porphyra-334, que presentó altas concentraciones en ambas poblaciones, no resultó estimulado por el tratamiento PAR+UVA en *B. gracilipes* de la Laguna Verde. Sin embargo, los copépodos del Lago Morenito incrementaron en las mismas condiciones su proporción, especialmente a bajas temperaturas (Fig. 2.9). Tartarotti et al (2004) hallaron diferencias tanto de concentración como de composición en los MAAs de poblaciones de *B. gracilipes* distribuidas a lo largo de un embalse y atribuyeron estas diferencias al metabolismo y/o a la presencia de bacterias entéricas que transformarían los MAAs ingeridos. AEn esta tesis no se analizó la presencia e incidencia de la flora endosimbionte en *B. gracilipes* y se descartó además la incidencia de los MAAs dietarios. Sin embargo, los resultados experimentales indican la existencia de un efecto de la temperatura y de la radiación sobre el patrón de bio-acumulación de los MAAs.

Por otra parte, los pigmentos carotenoides siguieron un patrón semejante al de los MAAs. Se observó que el tratamiento PAR+UVA estimuló una mayor proporción de estos compuestos independientemente de la temperatura, evidenciando el rol inductor preponderante de la radiación. En *B. antiqua* y *B. gracilis* se produjeron las mayores proporciones de carotenoides a 16 y 20°C respectivamente; mientras que en *B. brevicaudata* las mayores concentraciones se hallaron a 5 y 12°C. En el tratamiento oscuro, la tendencia general en las tres especies fue a la disminución de la proporción de carotenoides con el aumento de la temperatura.

Los carotenoides son compuestos muy fluctuantes que pueden presentar variación cíclica diaria en su concentración. En copépodos se ha observado la existencia de un ritmo circadiano en la alimentación y una metabolización rítmica de los carotenoides que influiría en su concentración (Ringelberg y Hallegraeff, 1976; Hallegraeff et al, 1978). Sin embargo, Hairston (1980) desestimó la importancia de los dos factores mencionados sobre estas variaciones en la concentración de carotenoides en varias especies de copépodos. Este autor planteó alternativamente que las diferencias de concentración se deberían a un falla en la estandarización del ayuno de los animales que se reflejaría en una mayor o menor concentración de pigmentos provenientes de los alimentos en el tubo digestivo (Hairston, 1980).

La variación observada en las concentraciones de carotenoides podría reflejar ciertas fluctuaciones debidas a la metodología de extracción. Específicamente se trataría de cambios en la estructura molecular debido a la rápida transformación de estos compuestos por oxidación una vez fuera de los tejidos (Boon et al, 2010). Si bien el procedimiento aplicado para la extracción y medición fue en todos los casos el mismo, no se pueden descartar pequeñas desviaciones en cuanto a los tiempos de extracción, especialmente cuando se realizaron extracciones sucesivas de los macerados.

Efectos de la temperatura y de la exposición a la radiación PAR+UVA sobre la bio-acumulación de compuestos foto-protectores

Los patrones de bio-acumulación de MAAs y carotenoides observados en los tratamientos de radiación y temperatura, o bien la ausencia de un patrón se pudieron analizar más claramente teniendo en cuenta las tasas cinéticas de bio-acumulación: eliminación, ganancia bruta y ganancia neta. Estas tasas variaron entre especies, poblaciones de la misma especie y tipo de compuesto foto-protector (MAAs o carotenoides), presentando en algunos casos dependencia térmica y en otros casos resultando independientes de la temperatura.

Teniendo en cuenta la tasa de ganancia neta, que refleja el comportamiento conjunto de incorporación de compuestos y de pérdida en el gradiente térmico, se observó que en el caso de los MAAs existirían tres patrones de bio-acumulación en relación con la temperatura. Se observó un patrón incremental en la bio-acumulación de MAAs en *B. antiqua* (Fig. 2.10 panel izquierdo) y *B. gracilis* (Fig. 2.11 panel izquierdo). El patrón contrario, bio-acumulación decreciente con la temperatura, se observó en *B. brevicaudata* (Fig. 2.12 panel izquierdo) y *B. gracilipes* del Lago Morenito (2.13 panel derecho), mientras la concentración de MAAs se mantuvo estable a diferentes temperaturas en *B. gracilipes* de la Laguna Verde (Fig. 2.13 panel izquierdo). En el caso de los carotenoides su bio-acumulación se incrementó con la temperatura en *B. antiqua* (Fig. 2.10 panel derecho) y *B. gracilis* (Fig. 2.11 panel derecho). Mientras que en *B. brevicaudata* resultó estable a diferentes temperaturas (Fig. 2.12 panel derecho). Estos resultados prueban la hipótesis planteada acerca de la importancia de la temperatura y la radiación como factores que influyen sobre la incorporación de compuestos foto-protectores. Además, revelan la existencia de diferentes patrones de reacción tanto a nivel interespecífico como intraespecífico.

El modelo obtenido permite inferir las respuestas de la foto-protección de las diferentes especies de *Boeckella* en un contexto de temperaturas crecientes y niveles elevados de radiación, aunque minimizando el efecto potencial de otros factores ambientales. En este sentido, las especies del género *Boeckella* estudiadas presentarían diferentes estrategias de foto-protección como ha sido

sugerido en estudios previos (Zagarese et al, 1997a y b; Tartarotti et al, 1999; Rocco et al, 2002; Tartarotti et al, 2004; Pérez et al, 2006). En todos los casos se observó una capacidad de ajuste de la concentración de compuestos foto-protectores con la temperatura, ya sea porque el incremento de la ganancia de compuestos resultó mayor que la eliminación o bien la igualó.

Los resultados obtenidos validan la hipótesis planteada acerca de la existencia de variación inter e intraespecífica en el ajuste de los compuestos foto-protectores en relación con la temperatura y la exposición a la radiación. Estas variaciones dependen además del tipo de compuesto foto-protector.

La utilización de un modelo cinético de primer orden para investigar el efecto de la temperatura sobre la concentración de compuestos foto-protectores resultó útil para obtener una primera aproximación de la importancia de esta variable en la bio-acumulación. Sin embargo, este modelo tiene ciertas limitaciones. Una de ellas es que se basa en las concentraciones iniciales y finales, y por lo tanto, no resulta un buen descriptor de la dinámica de bio-acumulación entre esos dos puntos. Por otra parte, este modelo es una simplificación de las condiciones que operan en la naturaleza y que en conjunto regularían también la bio-acumulación de compuestos foto-protectores. En este sentido hay que tener en cuenta que los compuestos foto-protectores pueden cumplir otras funciones. Por ejemplo, si bien la función foto-protectora de los MAAs es reconocida, estos compuestos son antioxidantes (Shick y Dunlap, 2002; Yakovleva et al, 2004), pueden ser acumulados como solutos compatibles mediante un estrés salino (Oren, 1997), por desecación (Tirkey y Adhikary, 2005; Wright et al, 2005) o estrés térmico (Michalek-Wagner, 2001; Shick y Dunlap, 2002). Se ha sugerido además que los MAAs pueden funcionar como pigmentos accesorios para la captación de luz en la fotosíntesis o como una reserva de nitrógeno intracelular (Oren y Gunde-Cimerman, 2007). En algunos casos se ha comprobado que la acumulación de MAAs puede estar condicionada por la disponibilidad de nitrógeno en el ambiente (Sommaruga, 2010; Carreto y Carignan, 2011). Por otra parte, otros factores como la presencia de depredadores visuales puede influenciar la bio-acumulación de los carotenoides en particular. Se ha observado la acumulación preferencial de aminoácidos tipo micosporinas por sobre los carotenoides en copépodos provenientes de ambientes con peces planctívoros, debido a que estos últimos incrementan la vulnerabilidad ya que confieren coloración (Hansson, 2004). En síntesis, el modelo lineal ajustado al comportamiento de los compuestos foto-protectores en función de la temperatura permite la comparación de la respuesta de bio-acumulación de diferentes especies en un escenario térmico y en un entorno controlado. Sin embargo, resulta un enfoque limitado para realizar proyecciones en un sistema natural complejo donde además de la temperatura una multiplicidad de factores e interacciones entre los mismos afectarían la bio-acumulación de estos compuestos.

Por último en el transcurso del trabajo experimental se observó que la magnitud de la respuesta de bio-acumulación también estaría influenciada por las concentraciones iniciales y/o basales de compuestos foto-protectores. Debido a esto, se planteó la necesidad de realizar una exploración básica para estudiar el efecto de las concentraciones basales sobre la bio-acumulación de compuestos foto-protectores fijando la temperatura. Esta investigación se presenta en el Capítulo 3.

Capítulo 3

Efectos de la concentración basal de compuestos foto-protectores sobre su bio-acumulación

3.1 Introducción

La presencia y concentración de compuestos foto-protectores tales como los MAAs y los carotenoides en copépodos planctónicos es muy variable y depende de factores tales como la exposición a la radiación, el clima óptico y la temperatura, entre otros (Capítulo 1 y 2; Hairston, 1979 a y b; Sommaruga y Garcia-Pichel, 1999; Tartarotti et al, 2001; Shick y Dunlap, 2002; Hansson, 2004). Por otra parte, se observan variaciones específicas e intra-específicas que pueden atribuirse a adaptaciones locales. Hasta el momento se desconoce la base genética de la foto-protección aunque como ya ha sido expuesto, los metazoos carecen de la capacidad de sintetizar *de novo* compuestos como los carotenoides y los MAAs. Por lo tanto dependen de relaciones ecológicas como la nutrición (adquisición dietaria) (Caroll y Shick; 1996; Moeller et al, 2005; Hylander y Jephson, 2010) y/o simbiosis con microorganismos (Shick et al, 1999; Banaszak et al, 2000; Banaszak et al, 2006) para la adquisición de compuestos foto-protectores.

Más allá del origen de los compuestos foto-protectores, existen otros factores con el potencial de regular los niveles de foto-protección química. Las reservas de estos compuestos o concentraciones basales podrían ser determinantes de la capacidad de acumulación. En este sentido, se conoce que la acumulación de MAAs en *Leptodiaptomus minutus* guarda relación con la concentración de MAAs presente en el dinoflagelado *Peridinium inconspicuum* utilizado en un dieta mixta con otras especies algales no productoras de MAAs (Moeller et al, 2005). Sin embargo, no existen evidencias de una regulación interna de la acumulación de estos compuestos dada por la concentración de los mismos en el propio organismo.

En el Capítulo 2 se presentaron evidencias que sugieren que en individuos de *Boeckella gracilipes* provenientes de la Laguna Verde, la presencia de una elevada concentración de compuestos foto-protectores determinaría un límite para el proceso de acumulación de estos compuestos, aún en un escenario variable de radiación y temperatura. En este caso una elevada concentración de compuestos foto-protectores brindaría estabilidad frente a condiciones ambientales caracterizadas por niveles elevados de radiación y amplitud térmica. Los resultados obtenidos en el Capítulo 2 sugieren que la concentración basal de los compuestos determina la capacidad de bio-acumulación en *B. gracilipes* de la Laguna Verde, debido probablemente a la existencia de un efecto de saturación. Esto permite hipotetizar que la concentración inicial actúa regulando el proceso de bio-acumulación y por lo tanto, las tasas cinéticas de bio-acumulación de compuestos foto-protectores (eliminación,

ganancia bruta y ganancia neta) estarán determinadas por la concentración inicial de compuestos foto-protectores en esta especie de *Boeckella*.

En este capítulo se analiza el efecto de la concentración basal de compuestos foto-protectores sobre la capacidad de incorporación de los mismos en dos especies de *Boeckella*. El análisis se abordó mediante ensayos de laboratorio a temperatura constante y manipulando las condiciones de radiación utilizando copépodos con diferentes niveles basales de compuestos foto-protectores.

3.2 Objetivos

1. Analizar experimentalmente el efecto de la concentración basal en la variación y bio-acumulación de compuestos foto-protectores en dos especies de *Boeckella* spp.
2. Determinar el efecto de la concentración basal de compuestos foto-protectores sobre las tasas cinéticas de bio-acumulación.

Hipotesis de Trabajo

1.- La concentración basal de los compuestos foto-protectores determina su bio-acumulación debido a la existencia de un límite o efecto de saturación.

2.- Las tasas cinéticas de bio-acumulación de compuestos foto-protectores (eliminación, ganancia bruta y neta) están determinadas por la concentración basal de compuestos foto-protectores en *Boeckella*.

3.3 Materiales y Métodos

Recolección de muestras

La recolección de *Boeckella antiqua* proveniente de la Laguna Los Juncos (Capítulo 1, Fig. 1.6a) se realizó durante los meses de octubre a noviembre del 2008; mientras que *B. gracilipes* provenientes de la Laguna Verde (Capítulo 1, Fig. 1.6e) se obtuvo durante los meses de enero a marzo del 2009. Las muestras de zooplancton vivo fueron colectadas mediante barridos horizontales con una red de arrastre de 200 μm de abertura de malla y luego fueron trasladados hasta el laboratorio para ser utilizados en los experimentos.

Para abordar el estudio del efecto de las concentraciones basales sobre la bio-acumulación de compuestos foto-protectores se realizó un experimento en dos fases. La fase 1 o de pre-tratamiento en oscuridad se diseñó a fin de estudiar la estabilidad de la concentración de compuestos foto-protectores de los copépodos. La fase 2 consistió en la incubación de los individuos provenientes de la fase 1 en dos condiciones de exposición a la radiación (PAR+UVA y oscuridad) a fin de estudiar el efecto de la concentración basal (o concentración al inicio del experimento) de compuestos foto-protectores en la bio-acumulación en los copépodos. En síntesis, el objetivo de la fase 1 fue inducir la pérdida de compuestos foto-protectores mientras que en la fase 2 se analizó la acumulación de estos compuestos en copépodos con distintos niveles basales de compuestos foto-protectores (Tabla 3.1).

Metodología experimental

Fase 1

En esta fase se incubó un lote de individuos proveniente del campo durante un mes, retirándose sublotos de copépodos a los días 1, 15 y 30 de incubación (Tabla 3.1). Esta incubación se llevó a cabo de manera diferente en las dos especies analizadas. En el caso de *Boeckella antiqua* la incubación se realizó en un tanque de 300 L emplazado en el predio exterior del Laboratorio de Fotobiología (Centro de Salmonicultura, INIBIOMA) y provisto de agua del Arroyo Gutiérrez con el agregado de *Chlamydomonas reinhardtii* de cultivos de laboratorio. Los copépodos traídos del campo, se colocaron en el tanque, cubriéndose la superficie del mismo con una lámina plástica negra de 5 mm de espesor para evitar la penetración de la radiación. En el caso de *B. gracilipes* la fase 1 se llevó a cabo en recipientes plásticos de 12 L. Se utilizó un medio compuesto por un 50% de agua de la Laguna Verde y otro 50% de agua del Arroyo Gutiérrez, con el agregado de *C. reinhardtii* y se cubrieron

los recipientes mediante una lámina plástica negra. En todos los casos se utilizó como alimento el *Chlamydomonas reinhardtii* proveniente de cultivos de laboratorio en un medio de cultivo MBL modificado y mantenida en un incubador con dos tubos fluorescentes de 40W a 20°C. Las algas se proveyeron *ad libitum* en los contenedores experimentales con una frecuencia de 1.5 días a fin de asegurar la condición adecuada del alimento dado que las incubaciones se desarrollaron en oscuridad.

Luego de un día y posteriormente a los 15 y 30 días de incubación, se realizó la colecta de sublotos de las dos especies de copépodos. Cada sublote fue utilizado luego de su tiempo de incubación en oscuridad (1, 15 y 30 días) en experimentos de acumulación de compuestos foto-protectores (fase 2).

En cada una de las colectas llevadas a cabo luego de 1, 15 y 30 días de incubación, se obtuvieron aproximadamente 2000 copépodos. Estos individuos fueron separados en grupos de 200 individuos para la determinación de concentraciones iniciales de compuestos foto-protectores y para las incubaciones de la fase 2.

Fase 2

Esta fase consistió en la incubación de los tres grupos de copépodos provenientes de la fase 1, los cuales fueron incubados en dos tratamientos de radiación (PAR+UVA y Oscuridad) con tres réplicas por tratamiento. La incubación se llevó a cabo durante 10 días en una cámara de cultivo SANYO MLR50, a 12°C, con un foto-período de 12 h luz: 12 h oscuridad y una dieta de *C. reinhardtii*. El diseño experimental fue similar al de los experimentos de bio-acumulación de compuestos foto-protectores presentados en el Capítulo 1. Una vez finalizada la incubación, los copépodos de cada unidad experimental fueron extraídos y preparados para la determinación de la concentración de compuestos foto-protectores utilizando la metodología detallada en la sección de metodología general. Cabe mencionar que en el caso de *B. antiqua* se estudiaron los MAAs y los pigmentos carotenoides mediante la técnica espectrofotométrica. Debido a que esta especie presenta altas concentraciones de ambos compuestos, la técnica de espectrofotometría fue apropiada para cuantificar la variación de compuestos. En el caso de *B. gracilipes* se analizaron los MAAs exclusivamente mediante la técnica de HPLC (ver metodología general), debido a la necesidad de una mayor resolución para registrar las variaciones menores que presenta este copépodo (Capítulo 1 y 2). La concentración inicial de compuestos en los copépodos en la fase 2, fue estimada en submuestras de copépodos incubados en la fase 1.

Tabla 3.1. Diseño experimental aplicado para estudiar la estabilidad de los compuestos foto-protectores en oscuridad (fase 1) y en diferentes tratamientos de radiación (fase 2) en *B. antiqua* y *B. gracilipes* y duración de cada fase experimental.

Experimento	Tratamiento	Especie
		<i>B. antiqua</i> <i>B. gracilipes</i>
Fase 1	Oscuridad	1 día
		15 días
		30 días
Fase 2	PAR+UVA	10 días
	Oscuridad	10 días

La comparación de los niveles de compuestos foto-protectores en *B. antiqua* y en *B. gracilipes* provenientes de la fase 1 del experimento se realizó mediante un análisis de la variancia de una vía, utilizando al tiempo de incubación como variable independiente. El análisis del efecto de la concentración basal de compuestos foto-protectores estudiado en la fase 2, se realizó examinando en primer lugar la variación de los compuestos foto-protectores y luego mediante el ajuste a modelos cinéticos de primer orden, calculando para cada compuesto la tasa cinética de ganancia bruta, ganancia neta y de eliminación de acuerdo con la metodología descrita en el Capítulo 2.

Análisis estadísticos

Para analizar los efectos de la concentración basal sobre la sobre la bio-acumulación de los compuestos foto-protectores (MAAs y carotenoides) se aplicó análisis de la varianza de dos vías (TWO-WAY ANOVA). El análisis de las tasas cinéticas de bio-acumulación se realizó mediante un análisis de la varianza de una vía (ONE-Way anova). En todos los casos y previamente al análisis de la varianza, se comprobó la normalidad y homocedasticidad de los datos. Se aplicó el análisis no-paramétrico de Kruskal-Wallis cuando los datos no se ajustaron a los supuestos de normalidad y homocedasticidad (Zar, 1999). El análisis de los datos fue realizado mediante el paquete estadístico SIGMAPLOT 9.0 integración SIGMASTAT 3.1.

3.4 Resultados

Efectos de la incubación en oscuridad (fase 1) sobre la concentración de compuestos foto-protectores

La incubación en oscuridad (fase 1) en tres niveles de duración (1, 15 y 30 días) resultó en una reducción significativa en la concentración de compuestos foto-protectores de *Boeckella antiqua*,, mientras que en *B. gracilipes* se observó una leve tendencia a disminuir la concentración de MAAs que no resultó significativa (Tabla 3.2).

En el caso de *B. antiqua* las concentraciones de MAAs en los copépodos incubados 1, 15 y 30 días fueron significativamente diferentes entre sí, observándose una reducción de concentración con el tiempo de incubación. En tal sentido, los copépodos incubados sólo 1 día en oscuridad presentaron mayor concentración de MAAs que los incubados por 15 y 30 días (ANOVA de una vía, $F= 18.27$, $p<0.05$; Tukey $p<0.05$). Entre los 15 y 30 días de incubación la concentración de MAAs no varió significativamente, sugiriendo que la pérdida de estos compuestos disminuyó a partir de las dos semanas de incubación en oscuridad. En el caso de los carotenoides, la incubación en oscuridad produjo el mismo efecto que en los MAAs, resultando en una reducción de la concentración de estos pigmentos. Las concentraciones de los copépodos incubados en oscuridad por un día resultaron mayores que las registradas luego de 15 y 30 días de incubación (ANOVA de una vía, $F= 12.25$, $p<0.05$; Tukey $p<0.05$; Tabla 3.2).

En el caso de *B. gracilipes* proveniente de la Laguna Verde, el efecto de la incubación en oscuridad por 1, 15 y 30 días (fase 1) no afectó la concentración de MAAs en los copépodos (Kruskal-Wallis $H=4.57$, $p= 0.067$; Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Concentraciones de los compuestos foto-protectores MAAs y carotenoides (promedio \pm 1DS) en *B. antiqua* y *B. gracilipes*, luego de las incubaciones de 1, 15 y 30 días (fase 1).

Fase 1 (días)	<i>B. antiqua</i>		<i>B. gracilipes</i>
	MAAs (AU mg ⁻¹ P.S.)	Carotenoides (μ g mg ⁻¹ P.S.)	MAAs (μ g mg ⁻¹ P.S.)
1	0.0378 \pm 0.007	1.29 \pm 0.44	9.0335 \pm 0.035
15	0.0221 \pm 0.001	0.845 \pm 0.04	8.7838 \pm 0.03
30	0.0124 \pm 0.0001	0.449 \pm 0.026	7.5107 \pm 0.4

Efectos de la concentración basal sobre la acumulación de compuestos foto-protectores (fase 2)

Boeckella antiqua

En *B. antiqua*, las concentraciones finales de MAAs y carotenoides obtenidas al término de la fase 2 del experimento, se vieron afectadas por la concentración basal de compuestos y la exposición a la radiación, existiendo además una interacción significativa entre estas variables (Tabla 3.3). En todos los casos las concentraciones finales de compuestos foto-protectores fueron más elevadas en el tratamiento PAR+UVA que en el tratamiento oscuro. En particular, las concentraciones finales más elevadas de MAAs en esta especie se detectaron en el tratamiento PAR+UVA y en los copépodos con niveles basales más altos, 0.0378 AU mg⁻¹ P.S (1 día de oscuridad) y 0.022 AU mg⁻¹ P.S (15 días de oscuridad). En el tratamiento oscuro se observó el mismo patrón, siendo los organismos cultivados durante 1 y 15 días los que mayor concentración final de MAAs presentaron (Fig. 3.1 panel izquierdo).

En *B. antiqua* la mayor concentración final de carotenoides en la fase 2 se observó en los copépodos pretratados durante un día en oscuridad, siendo esta concentración significativamente distinta de las obtenidas en los copépodos mantenidos durante 15 y 30 días de oscuridad, independientemente del tratamiento lumínico aplicado (Fig. 3.1 panel derecho).

Tabla 3.3: Análisis de la variancia de dos vías (Two-way ANOVA) para estudiar el efecto de la concentración inicial de MAAs y carotenoides sobre la acumulación de compuestos foto-protectores en *B. antiqua*.

Compuesto	Factor	gl	F	P
MAAs	Concentración basal	2	42.959	<0.05
	Radiación	1	246.07	<0.05
	Concentración basal*Radiación	2	17.996	<0.05
Carotenoides	Concentración basal	2	92.012	<0.05
	Radiación	1	104.472	<0.05
	Concentración basal*Radiación	2	4.71	<0.05

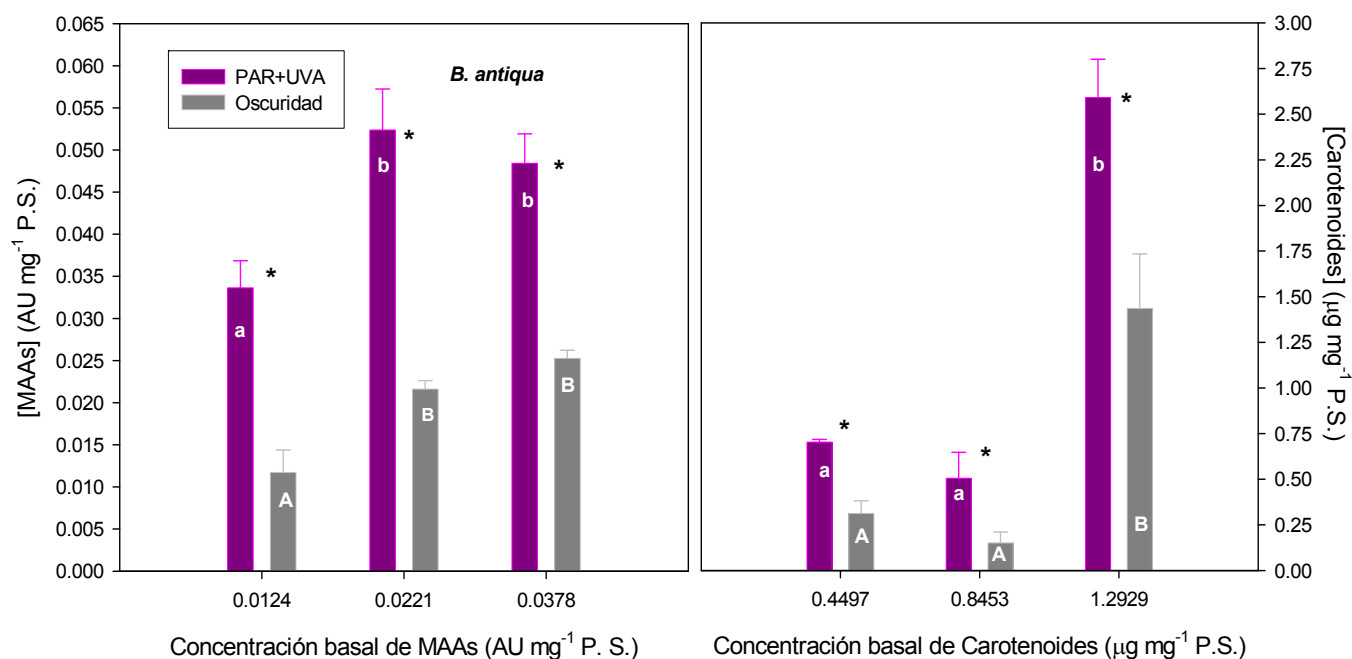


Figura 3.1: Variación experimental en la concentración de compuestos foto-protectores en *B. antiqua*, MAAs (panel izquierdo) y carotenoides (panel derecho) en tratamientos con PAR+UVA y en oscuridad. Barras violetas: concentración final de compuesto foto-protector en el tratamiento de PAR+UVA. Barras grises: concentración de compuesto foto-protector en el tratamiento de oscuridad. El asterisco (*) en la parte superior de las barras indica diferencias significativas entre las concentraciones finales de compuestos foto-protectores obtenidas en los tratamientos de radiación dentro de cada nivel de concentración basal; mientras que las letras minúsculas y mayúsculas, indican las respuestas homogéneas entre los diferentes niveles de concentración basal de compuestos (Prueba a posteriori de Tukey).

Boeckella gracilipes

Los experimentos utilizando tres concentraciones basales de MAAs en *B. gracilipes* obtenidas en la fase experimental 1 evidenciaron efectos significativos en la concentración basal de MAAs y del tratamiento de radiación PAR+UVA sobre la acumulación de estos compuestos. Sin embargo, la interacción entre ambas variables no fue significativa (Tabla 3.4). Las mayores concentraciones finales de MAAs se observaron en los copépodos con concentraciones basales más elevadas ($9.0335 \pm 0.035 \mu\text{g mg}^{-1}$ P.S.) y en ambos tratamientos de radiación (Fig. 3.2; Tabla 3.4). El tratamiento PAR+UVA presentó una mayor diferencia en la concentración final de MAAs con respecto al tratamiento oscuro (~17%) sólo en el nivel de concentración basal más bajo, logrado mediante la incubación previa de 30 días en oscuridad (Fig. 3.2).

Tabla 3.4: Análisis de la variancia de dos vías (Two-way ANOVA) para estudiar el efecto de la concentración basal de MAAs sobre la acumulación de estos compuestos en *B. gracilipes*.

Factor	gl	F	P
Concentración basal	2	5.502	<0.05
Radiación	1	7.573	<0.05
Concentración basal*Radiación	2	2.708	0.095

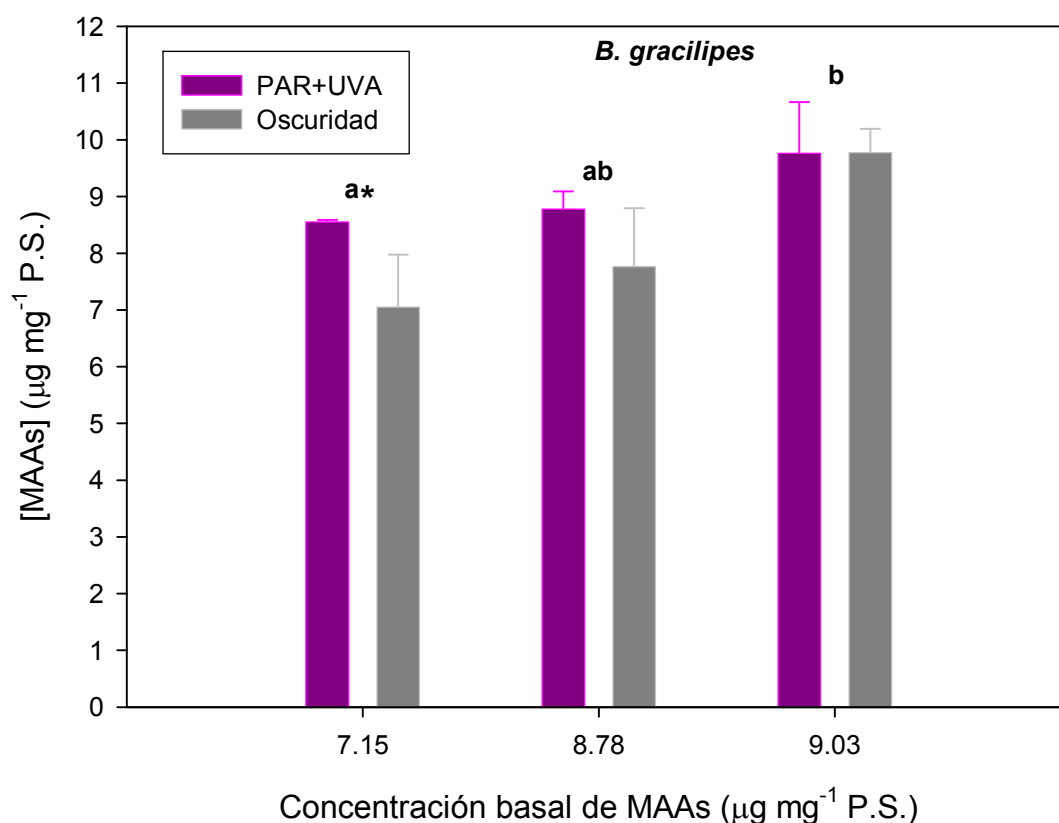


Figura 3.2: Acumulación de MAAs en *B. gracilipes* a distintas concentraciones iniciales de estos compuestos. Barras violetas: concentración final de MAAs en el tratamiento PAR+UVA; Barras grises: concentración de MAAs en el tratamiento oscuro. El asterisco (*) en la parte superior de las barras indica diferencias significativas entre las concentraciones finales de MAAs obtenidas en los tratamientos de radiación dentro de cada nivel de concentración basal. Las letras indican las respuestas homogéneas entre los diferentes niveles de concentración basal de MAAs (Prueba a posteriori de Tukey).

Por otra parte, los análisis mediante HPLC permitieron realizar algunas consideraciones sobre el efecto de la concentración basal de algunos MAAs particulares (fase 1) sobre las concentraciones finales de los mismos (fase 2). Este análisis se realizó teniendo en cuenta exclusivamente los MAAs

presentes en concentraciones mayores al 5% del total: Micosporina-Glicina (20.37%) y Porphyra-334 (75.31%) (Tabla 3.5). En el tratamiento PAR+UVA las concentraciones finales de Micosporina-Glicina fueron significativamente mayores que en el tratamiento oscuro. Se observó la mayor concentración final de Micosporina-Glicina en los copépodos incubados en oscuridad por 15 días (Fig. 3.3 panel superior). Por su parte, la concentración final de Porphyra-334 fue independiente del tratamiento de radiación (Tabla 3.5). Sin embargo, la concentración basal de este compuesto tuvo un efecto significativo siendo los organismos incubados durante 1 día los que presentaron mayores concentraciones finales independientemente del tratamiento lumínico (Tabla 3.5 y Fig. 3.3).

Tabla 3.5: Análisis de la variancia de dos vías (Two-way ANOVA) para estudiar el efecto concentración basal de MAAs sobre la acumulación de los distintos compuestos en *B. gracilipes*.

Compuestos	Factor	F	P
Micosporina-Glicina	Concentración basal	10.547	<0.05
	Radiación	124.459	<0.05
	Concentración basal*Radiación	1.279	0.304
Porphyra-334	Concentración basal	5.84	<0.05
	Radiación	0.006	0.98
	Concentración basal*Radiación	3.119	0.07

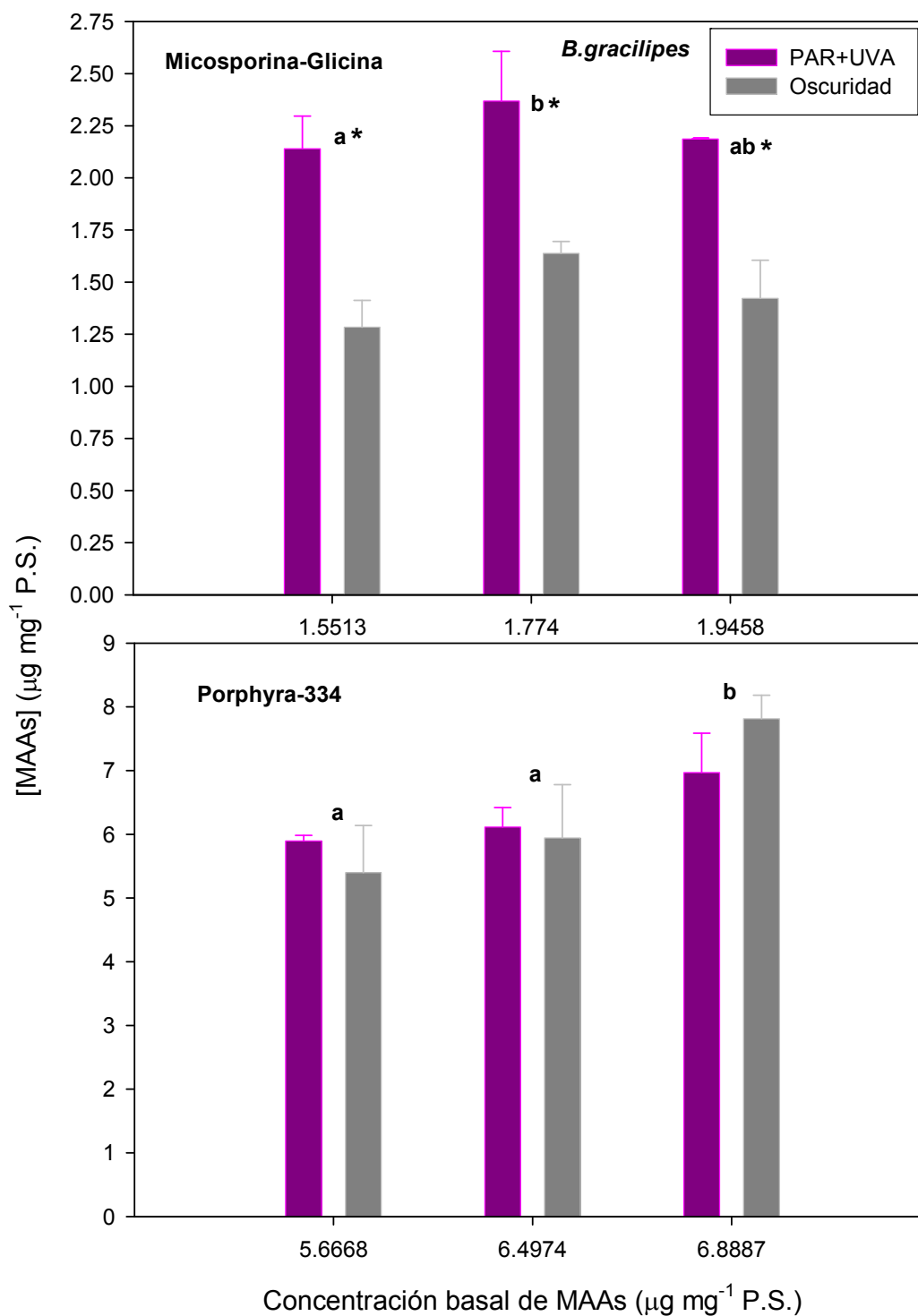


Figura 3.3: Concentración final de los compuestos MAAs en *B. gracilipes* en los diferentes niveles de concentración basal ensayados. En el panel superior se presenta la concentración del compuesto Micosporina-Glicina y en el panel inferior la concentración de Porphyra-334. Barras violetas: concentración final en el tratamiento PAR+UVA y barras grises: concentración final en el tratamiento oscuro. El asterisco (*) en la parte superior de las barras indica diferencias significativas entre la concentración de MAAs en los tratamientos de radiación dentro de cada nivel de concentración basal; mientras que las letras indican las respuestas homogéneas entre los diferentes niveles de concentración basal (Prueba a posteriori de Tukey).

Bio-acumulación de compuestos foto-protectores*Boeckella antiqua*

El análisis de las tasas cinéticas de bio-acumulación de compuestos foto-protectores en relación con la concentración basal obtenida en la fase 1, permitió detectar diferencias en el comportamiento de los MAAs y los carotenoides y también en el proceso de bio-acumulación (eliminación, ganancia neta y ganancia bruta). En el caso de los MAAs, se pudo observar que la tasa cinética de eliminación fue independiente de su concentración basal ($F= 3.85$, $p=0.084$) (Tabla 3.6). Sin embargo, las tasas cinéticas de ganancia neta y de ganancia bruta de MAAs se vieron afectadas significativamente por la concentración basal (Fig. 3.4 panel izquierdo). Las tasas de ganancia neta fueron elevadas y similares entre sí a las concentraciones basales obtenidas en la fase 1 en las incubaciones de 15 y 30 días, mientras que los menores niveles de ganancia neta se observaron en los copépodos incubados sólo un día en oscuridad (Fig. 3.4 panel izquierdo). La tasa de ganancia bruta de MAAs presentó el mismo patrón que la tasa de ganancia neta (Fig. 3.4 panel izquierdo). En síntesis, en *B. antiqua* la bio-acumulación de los MAAs fue mayor en los copépodos con concentraciones basales más bajas.

En el caso de los pigmentos carotenoides, la tasa de ganancia bruta fue independiente de la concentración basal de estos pigmentos. Por el contrario, las tasas de eliminación y de ganancia neta de carotenoides resultaron afectadas por la concentración basal de estos compuestos (Tabla 3.6). Paradójicamente, la tasa de ganancia neta presentó valores positivos y similares a las concentraciones basales más alta y más baja obtenidas mediante incubaciones de 1 y 30 días en oscuridad. Por el contrario, en los copépodos incubados previamente por 15 días en oscuridad, la tasa de ganancia neta fue negativa. La tasa de eliminación más elevada se registró en los copépodos incubados por 15 días en oscuridad, mientras que en los provenientes de incubaciones de 1 y 30 días las respuestas fueron semejantes en magnitud (Fig. 3.4 panel derecho).

Tabla 3.6: Análisis de la variancia de una vía (ONE-WAY ANOVA) para estudiar el efecto de la concentración basal de MAAs y carotenoides sobre las tasas de ganancia bruta, eliminación y ganancia neta en *B. antiqua*. *Para el análisis de la ganancia neta de carotenoides se aplicó el test no-paramétrico de Kruskal-Wallis (H).

Compuesto	Tasas cinéticas de bio-acumulación	gl	F	P
MAAs	Tasa de Ganancia bruta (k)	2	7.28	<0.05
	Tasa de Eliminación (q)	2	3.85	0.084
	Tasa de Ganancia Neta (k + q)	2	62.33	<0.05
Carotenoides	Tasa de Ganancia bruta (k)	2	2.277	0.184
	Tasa de Eliminación (q)	2	28.46	<0.05
	Tasa de Ganancia Neta (k + q)	2	H=7.2*	<0.05

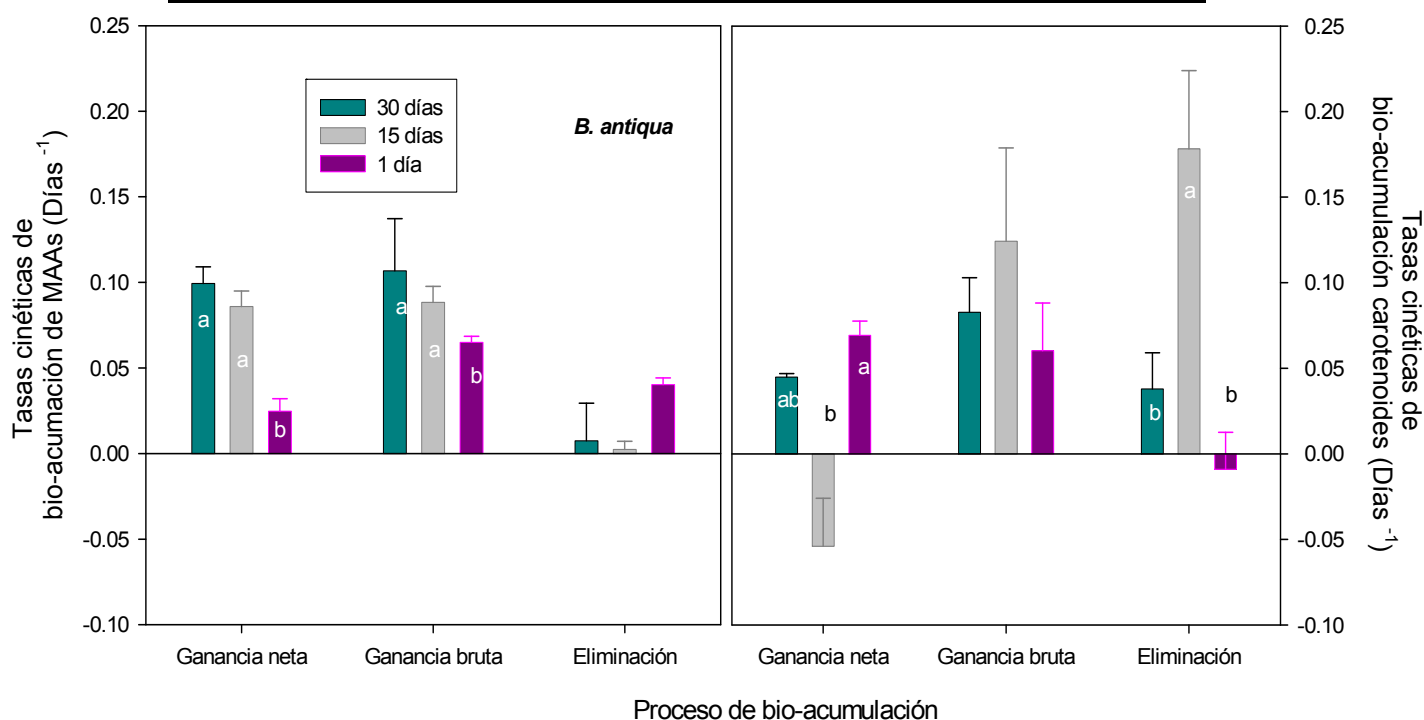


Figura 3.4: Tasas cinéticas de bio-acumulación de MAAs (panel izquierdo) y de carotenoides (panel derecho) en *B. antiqua* en los tres pre-tratamientos de la fase 1 (1, 15 y 30 días en oscuridad). Las letras sobre las barras indican respuestas similares de las distintas tasas (Prueba a posteriori de Tukey).

Boeckella gracilipes

Las tasas cinéticas de bio-acumulación de MAAs en *B. gracilipes* fueron muy bajas, en todos los casos menores a 0.025 día⁻¹. Se vieron afectadas de diversas formas por la concentración basal (fase 1; Tabla 3.7; Fig. 3.5). Los copépodos con menor concentración basal presentaron la mayor tasa de ganancia bruta (Fig. 3.5). La tasa de eliminación tuvo un comportamiento inesperado, presentando

valores más elevados en los copépodos incubados por 15 y 30 días, mientras que la menor tasa se registró en los copépodos con mayor concentración basal e incubados sólo 1 día en oscuridad (Fig. 3.5). La tasa de ganancia neta registró los mayores valores en los copépodos con mayor y menor concentración basal (incubados por 1 y 30 días en oscuridad en la fase 1 respectivamente), resultando casi nula en los copépodos incubados previamente por 15 días (Fig. 3.5).

Tabla 3.7: Análisis de la variancia de una vía (ONE-WAY ANOVA) del pre-tratamiento de oscuridad sobre las tasas de ganancia bruta, eliminación y ganancia neta en *B. gracilipes* de la Laguna Verde.

Tasas cinéticas de bio-acumulación de MAAs	gl	F	P
Tasa de Ganancia bruta (k)	2	5.561	<0.05
Tasa de Eliminación (q)	2	5.802	<0.05
Tasa de Ganancia Neta (k + q)	2	7.69	<0.05

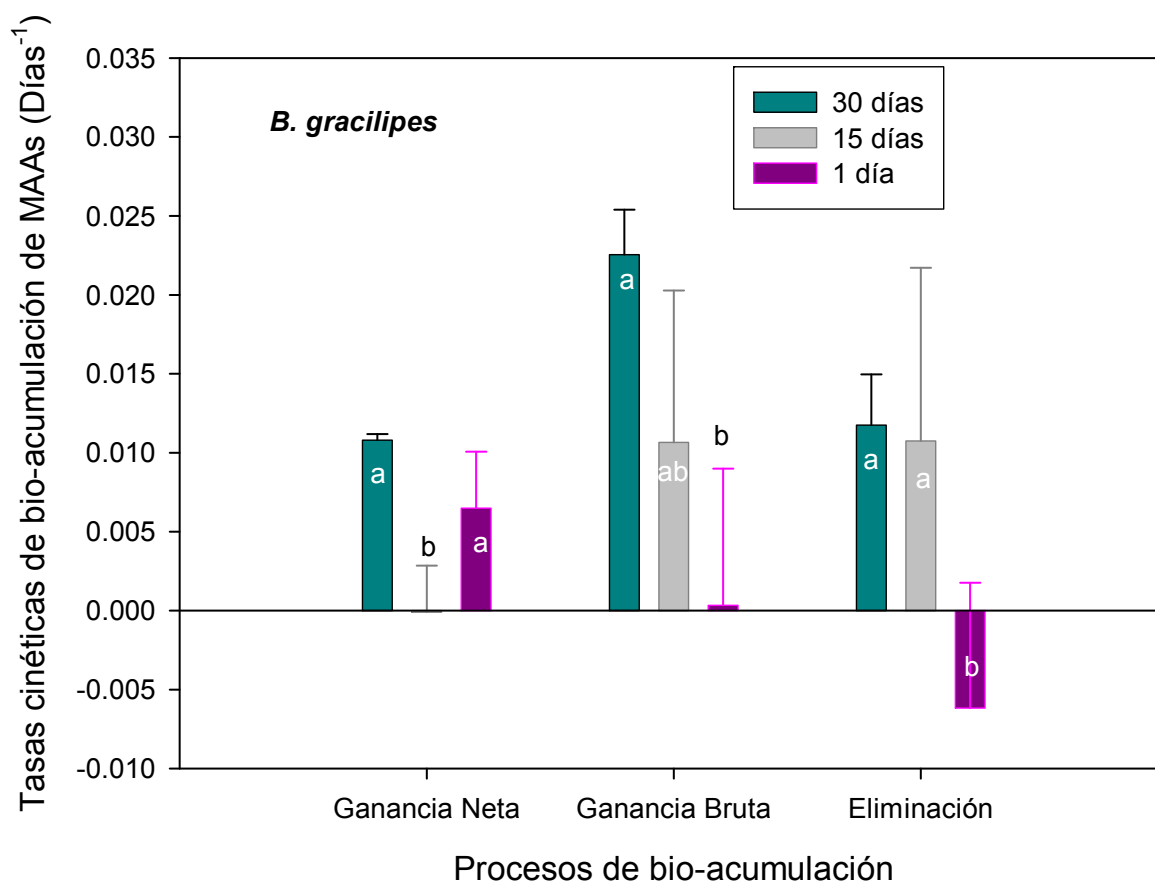


Figura 3.5: Tasas cinéticas de bio-acumulación de MAAs en *B. gracilipes* obtenidas a distintas concentraciones basales de MAAs. Las letras sobre las barras indican respuestas similares de cada una de las tasas entre niveles de concentración basal (Prueba a posteriori Tukey).

3.5 Discusión

De manera general se observó que *Boeckella antiqua* y *B. gracilipes* respondieron de manera distinta al pre-tratamiento en oscuridad aplicado en la fase 1 experimental. La incubación en oscuridad resultó en la reducción progresiva de la concentración de compuestos foto-protectores en *B. antiqua*; mientras que en *B. gracilipes* la concentración de compuestos fue prácticamente estable. Teniendo en cuenta el comportamiento de los MAAs, esto podría interpretarse como la existencia de dos estrategias diferentes de foto-protección en las dos especies estudiadas. Por un lado, una tendencia fuerte a mantener una elevada concentración de MAAs aún en condiciones de oscuridad manifiesta en *B. gracilipes*. Por otro lado, la capacidad de ajustar las concentraciones de estos compuestos a la falta del estímulo de la radiación como se observó en *B. antiqua*. Un patrón similar al observado en *B. gracilipes* se registró en otros crustáceos tales como el kril *Euphasia superba*, que luego de 40 días de hambreado no disminuyó su concentración de MAAs (Newman et al, 2000). La especie *B. titicacae* del Lago Titicaca, también mostró un decrecimiento en la concentración de MAAs cuando se la mantuvo durante más de un año en un tanque que recibía sólo el 10% de la radiación solar incidente en comparación con los organismos expuestos a niveles naturales de radiación solar (Helbling et al, 2002).

En la fase 2 de los experimentos se investigó la reacción de las dos especies de copépodos con diferentes niveles basales de compuestos foto-protectores a la exposición al PAR+UVA. En *B. antiqua*, se observó que los copépodos con niveles basales de MAAs alto y medio presentaron concentraciones finales similares y elevadas de estos compuestos, mientras que aquellos con menor concentración basal alcanzaron concentraciones finales menores (Fig. 3.1). Sin embargo, el análisis de la tasa cinética de ganancia neta de MAAs en esta especie, reflejó que la mayor acumulación se observó en los organismos con las menores concentraciones basales, incubados durante 15 y 30 días en oscuridad. Por lo tanto, la bio-acumulación de los MAAs parecería estar limitada por su concentración en los tejidos. Este fenómeno de “saturación” que conduce a una disminución de la bio-acumulación de MAAs también ha sido observado en corales del género *Stylophora* (Shick, 2004) y en el dinoflagelado *Alexandrium tamarense* (Callone et al, 2006).

En el caso de *Boeckella gracilipes* de la Laguna Verde la concentración de MAAs no varió significativamente durante la incubación de la fase 1. Por otra parte, en la fase 2, sólo los organismos con la menor concentración basal presentaron una respuesta significativa al estímulo de la radiación

PAR+UVA. En general el patrón de respuesta de los MAAs observado en la fase 1 y 2 en *B. gracilipes* indica que ni la incubación en oscuridad ni la exposición a los niveles de PAR+UVA aplicados resultan en un cambio importante en la concentración de estos compuestos. Con respecto a los MAAs individuales identificados en *Boeckella gracilipes*, se observó que la Micosporina-Glicina fue el compuesto que más reaccionó a la incubación bajo PAR+UVA. Por el contrario, la concentración del compuesto Porphyra-334 fue más estable entre tratamientos de radiación (Fig. 3.3). Esta estabilidad de los compuestos Micosporina-Glicina y Porphyra-334 respecto a sus concentraciones basales indicaría que la elevada concentración probablemente responde a la exposición a la radiación solar que experimenta la población de *B. gracilipes* de la Laguna Verde (Zagarese et al, 1999).

Algunas investigaciones han sugerido que la acumulación de los MAAs estaría regulada por factores como la intensidad de la luz y la disponibilidad de nitrógeno (Carreto y Carignan, 2011). En el dinoflagelado *Alexandrium catenella* se observó una relación directa entre el incremento de la concentración de MAAs y la intensidad lumínica, hasta alcanzar un límite de síntesis y acumulación a una intensidad de $400 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Carreto et al, 2002).

Los resultados obtenidos en este capítulo indicarían que el efecto de la radiación y de la concentración basal sobre la acumulación de compuestos foto-protectores estaría afectado por las adaptaciones locales. En *B. antiqua* la acumulación de MAAs fue proporcionalmente mayor en condiciones de radiación PAR+UVA y a los niveles basales más bajos de foto-protección, observándose un efecto de saturación a mayor concentración basal. Por otra parte, los pigmentos carotenoides mostraron un patrón diferente al de los MAAs. En este sentido, los copépodos con mayor concentración basal de carotenoides presentaron las mayores concentraciones finales tanto en el tratamiento con PAR+UVA como en oscuridad. Mientras que los copépodos mantenidos durante 15 y 30 días presentaron concentraciones finales más bajas y similares entre sí, independientemente del tratamiento de radiación. Estos resultados contrastantes reflejarían diferencias en el estado metabólico de los copépodos en los diferentes tratamientos de acondicionamiento de la fase 1. El acondicionamiento podría implicar una adaptación paulatina de la alimentación de los copépodos con el potencial de afectar las reservas de lípidos. En los crustáceos, los carotenoides se pueden encontrar libres, unidos a proteínas y esterificados (Maoka, 2011). Estos pigmentos se acumulan en las reservas lipídicas y por lo tanto, la disminución de las mismas conduce a su degradación (Lotocka et al, 2004). Se conoce que la acumulación excesiva de carotenoides puede perjudicar diversas funciones biológicas. Los carotenoides son precursores de moléculas bioactivas tales como la vitamina A y los retinoides y poseen funciones tipo hormona que inciden en el crecimiento, reproducción y desarrollo en diversos organismos acuáticos (Krinsky, 1993; Orbe-Rogel et al, 2010). El exceso de carotenoides promueve la acumulación de vitamina A y otros compuestos que son reservados en los lípidos y

metabolizados junto con estos, absorbiéndose en el tubo digestivo. Esto puede provocar efectos tóxicos por hipervitaminosis conduciendo en algunos casos a la despigmentación, deformaciones y problemas en el desarrollo como ha sido observado en peces (Orbe-Rogel et al, 2010). Por lo tanto, si bien los carotenoides tienen función antioxidante, protegen contra el daño foto-químico y resultan precursores de moléculas vitales para el desarrollo y la reproducción, su acumulación en exceso puede ser contraproducente. En este sentido, resultaría plausible plantear la existencia de una concentración límite que regule su acumulación.

La incorporación de carotenoides no sólo refleja los carotenoides disponibles en la dieta (Moeller et al, 2005; Hylander et al, 2009), sino que también depende de factores tales como la exposición a la radiación solar y la presencia de depredadores visuales (Hansson, 2000; Hansson 2004). Además, probablemente posee un umbral dado su potencial perjudicial a ciertos niveles y por las condiciones metabólicas de los organismos. Por otra parte, si bien se desconoce el costo de la adquisición de carotenoides esto podría limitar su acumulación (Hessen, 1996; Van der Veen, 2005).

En síntesis, en especies con niveles altos, de foto-protección como *B. gracilipes* de la Laguna Verde, el efecto de la concentración basal tiene poca incidencia en la bio-acumulación de compuestos foto-protectores, probablemente porque no se pudo modificar experimentalmente la concentración. Por el contrario, en casos como el de *B. antiqua*, que presenta una cierta plasticidad en la foto-protección, la concentración basal de compuestos foto-protectores debería ser considerada como una variable independiente e incorporada a los modelos de bio-acumulación.

Capítulo 4

Efectos de temperatura y de la exposición a la RUV sobre la mortalidad y fecundidad en *Boeckella* spp

4.1 Introducción

La radiación ultravioleta (280-400 nm) es una variable de estrés que puede afectar tanto a los ecosistemas como a los organismos en latitudes medias y altas de planeta. El impacto particular de la RUV sobre las comunidades acuáticas y sus organismos ha sido motivo de análisis durante las últimas décadas (Williamson, 1995; Grad et al, 2001; Williamson et al, 2001; Leech y Williamson, 2000; MacFadyen et al, 2004; Leech et al, 2005a; Rose et al, 2009).

La RUV afecta la motilidad, la reproducción y la supervivencia del zooplancton (Sawada et al, 1990; Siebeck y Böhm, 1991; Zagarese et al, 1997a; Zagarese et al, 1998a; Leech y Williamson, 2000; Grad et al, 2001; Buma et al, 2003; Williamson y Rose, 2010). El daño que causa la exposición a la RUV depende de la longitud de onda, resultando las longitudes de onda más cortas las más dañinas. Al respecto, la RUV-B (280-315 nm) tiene un efecto deletéreo sobre los organismos, causa lesiones en la molécula de ADN, en las proteínas y en los pigmentos (Mitchell y Nairn, 1989; Karentz et al, 1991b; Buma et al, 1995; Jeffrey et al, 1996; Williamson et al, 2001; Buma et al, 2003). La RUV-A (315-400 nm) es requerida para múltiples procesos biológicos como por ejemplo la visión en algunos animales, la fotosíntesis en las plantas y el mecanismo de fotoreparación enzimática (Williamson et al, 2001). Por otra parte, la magnitud del daño causado por la RUV está relacionada también con el tiempo de exposición y la dosis (Grad et al, 2001; Williamson et al, 2001).

Dentro de los productos más comunes de la exposición a la RUV-B, se pueden mencionar los dímeros de ciclobutano y pirimidina que bloquean mecanismos celulares básicos tales como la replicación y la transcripción del ADN con efectos mutagénicos que pueden ser letales (Sutherland, 1981; Siebeck et al, 1994; Zagarese y Williamson, 1994; Friedberg et al, 1995; Malloy et al, 1997). Sin embargo, en numerosos organismos existe un mecanismo específico para reparar los daños producidos por la exposición a la RUV en el que interviene la enzima “fotoliasa” que revierte las lesiones con la utilización de energía proveniente de longitudes de onda corta cercana a la RUV y de la radiación visible (Sancar y Sancar, 1988; Todo et al, 1993; Friedberg et al, 1995; Williamson et al, 2001; Rocco et al, 2002; Banaszak, 2003).

La tolerancia se define como la habilidad de resistir condiciones externas tales como las impuestas por la radiación ultravioleta (RUV). La tolerancia a la RUV depende de un balance entre procesos de daño y de reparación (Banaszak, 2003). Los organismos acuáticos poseen una variedad de mecanismos fisiológicos y bioquímicos para reducir la exposición a la RUV, entre los cuales se puede mencionar la acumulación de compuestos foto-protectores y la foto-reparación enzimática (Banaszak, 2003). Estudios previos han indicado diferencias notables en la tolerancia a la RUV en diferentes especies de *Boeckella* probablemente debidas a la presencia de compuestos foto-protectores (Rocco et al, 2002; Pérez 2007; García et al, 2008) y mecanismos de reparación (Zagarese et al, 1997a y b). Las evidencias disponibles sugieren la existencia de foto-reparación en *Boeckella antiqua* y *B. gibbosa* (Zagarese et al, 1997a y b; Pérez, 2007); mientras que en *B. gracilipes* y *B. poppei* no está clara la presencia de este mecanismo (Zagarese et al, 1997a; Tartarotti et al, 1999; Rocco et al, 2002).

La presencia de radiación ultravioleta afectaría también la reproducción de los organismos, ya sea mediante la disminución de la producción de huevos debido al costo de mantener mecanismos de foto-protección y foto-reparación y/o mediante la selección direccional a favor de un sexo durante el desarrollo embrionario (Karanas et al, 1979; Karanas et al, 1981; Chalker-Scott, 1995; Zagarese y Williamson, 2000). En el copépodo marino *Acartia clausii* se observó que la exposición experimental a niveles de RUV-B cercanos al máximo que experimentan en sus ambientes, produce una disminución de la supervivencia y una reducción en el número de huevos y de larvas nauplii vivas (Karanas, 1981). En peces se ha reportado la reducción por efecto de la RUV del número de huevos y de larvas (Hunter et al, 1979; 1982). En rotíferos la exposición a la RUV produce una disminución del número de huevos (Sawada y Enesco, 1984).

La temperatura juega un papel muy importante en la fisiología de los organismos, particularmente en la de los organismos poiquiloterms (McLaren, 1965; McLaren et al, 1969). Muchas de las funciones tales como la respiración, el peso corporal y la tasa de ingesta, entre otras variables, dependen de la temperatura (Ikeda, 1970; Huntley y Lopez, 1992). Además, la temperatura es un factor importante en la regulación de la bio-acumulación de compuestos foto-protectores (Capítulo 2) y también intervendría en la foto-reparación enzimática, afectando la tolerancia de los organismos a la RUV. Se conoce que el proceso de foto-reparación que involucra a la enzima fotoliasa, posee menor eficiencia a 5°C que a 37°C (Harm, 1969; Harm y Rupert, 1970), revelando una relación entre la eficiencia de este mecanismo y la temperatura. En numerosos organismos del plancton la temperatura es un factor determinante de la talla corporal, de la fecundidad y del tiempo de desarrollo de los huevos y embriones (McLaren, 1965; McLaren et al, 1969).

La magnitud de los efectos deletéreos de la RUV se relacionaría con la temperatura debido a su rol en los procesos de bio-acumulación y de foto-reparación enzimática, mecanismos que determinan la tolerancia a este factor.

En este capítulo se analiza el efecto de la RUV-B y de la temperatura sobre la mortalidad de *Boeckella* spp mediante exposiciones experimentales cortas. Por otra parte, se estudia el efecto de la exposición prolongada a la RUV (PAR+UVA) sobre la reproducción.

4.2 Objetivos

1. Analizar experimentalmente la tolerancia a la RUV-B en *Boeckella antiqua* y en *B. gracilis* en un gradiente térmico de 5 °C a 20 °C.
2. Analizar el efecto de la temperatura y de la exposición a la radiación PAR+UVA sobre la reproducción, medida como número de huevos por hembra en *Boeckella antiqua*.

Hipótesis de trabajo

- 1.- La tolerancia de *Boeckella* a la RUV-B disminuirá con el incremento de la temperatura dada su preferencia por las temperaturas frías y templado-frías.
- 2.- Los efectos de la exposición al PAR+UVA tendrán un costo que se traducirá a nivel reproductivo (número de huevos por hembra) y que será mayor a mayor temperatura.

4.3 Materiales y Métodos

Para la realización de los experimentos de tolerancia y reproducción se procedió a la recolección de dos especies del género *Boeckella*: *B. antiqua* proveniente de la Laguna Los Juncos (Capítulo 1, Fig. 1.6a) y *B. gracilis* proveniente de la Laguna Teleférico (Capítulo 1, Fig. 1.6b). Los copépodos para los experimentos de tolerancia se colectaron mediante una red de arrastre de 200 µm de abertura de malla, durante los meses de julio a noviembre de 2007 en la Laguna Los Juncos y durante los meses de septiembre a diciembre del 2010 en la Laguna Teleférico. En el caso de los experimentos de fecundidad los individuos fueron colectados con la misma metodología en la Laguna Los Juncos durante los meses de abril a julio del 2008.

Experimentos de tolerancia a la RUV-B

Para los experimentos de tolerancia se utilizaron individuos adultos de dos especies de *Boeckella*: *B. antiqua* y *B. gracilis*. Los ejemplares fueron colectados y aclimatados durante 24 h de acuerdo a lo detallado en la sección de materiales y métodos generales. Adicionalmente al inicio de cada experimento se procedió a colectar dos muestras de copépodos (200 individuos) para la determinación de los compuestos foto-protectores (MAAs y carotenoides) y del peso seco. Los ensayos consistieron en la exposición de 10 a 20 individuos, dependiendo de la especie, a 3 dosis de RUV-B (Tabla 4.1) y un control en oscuridad, a 5, 8, 12, 16 y 20 °C (Fig. 4.1). Las dosis de RUV-B fueron aplicadas desde arriba mediante una lámpara Spectroline XX15-B (máximo de emisión de las lámparas a 312 nm Fig. 4.2). Convencionalmente este tratamiento fue denominado “UV-B” aunque también recibió dosis baja de UV-A (Fig. 4.2). Para lograr las distintas dosis se cubrió la parte superior de los frascos mediante una tapa de cuarzo y filtros neutros de color gris con diferente densidad de entramado. Se establecieron cuatro niveles de exposición a la UV-B: 0% o control (cubierto en papel aluminio), 20% (con un filtro neutro), 60% (con tres filtros superpuestos) y 100% (sin filtro) (Tabla 4.1) (Fig. 4.1 y 4.2).

Tabla 4.1: Dosis de RUV-B aplicadas en los experimentos de tolerancia de *Boeckella* spp.

Tratamiento	Dosis de RUV-B ($J m^{-2}$)
0%	0
20%	61
60%	194
100%	324

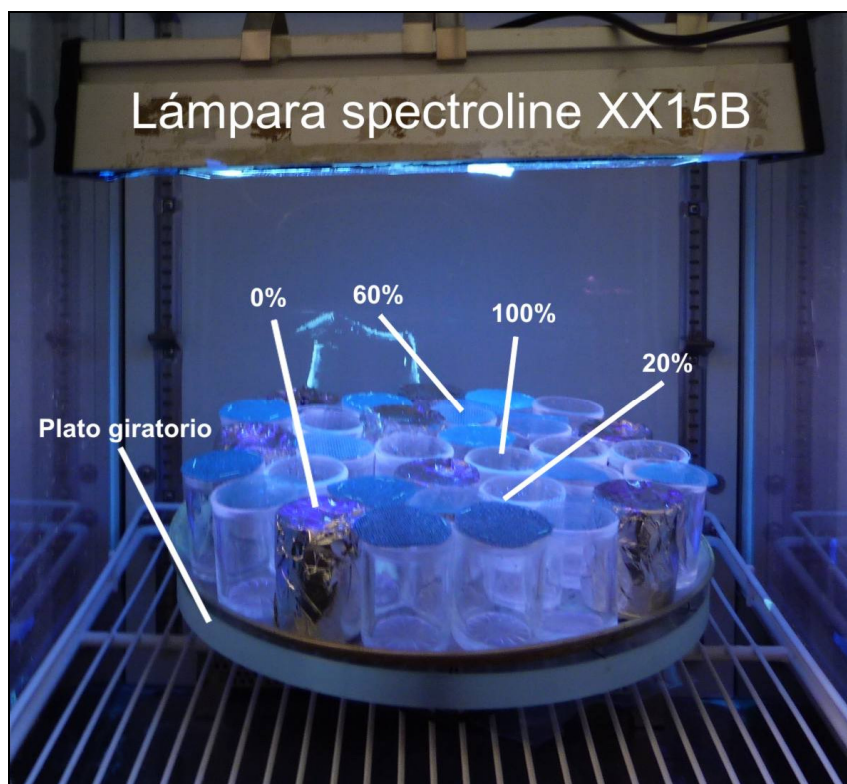


Figura 4.1: Experimentos de tolerancia a la UV-B. En la parte superior se observa la lámpara Spectroline XX15-B que emite en el rango de la RUV-B y las unidades experimentales expuestas a diferentes dosis.

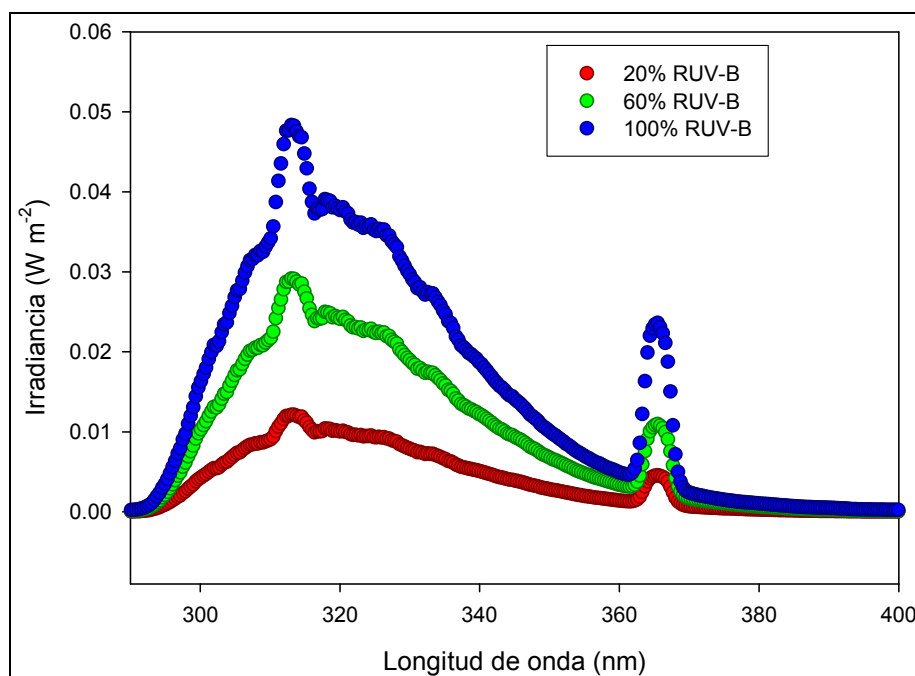


Figura 4.2: Espectros de radiación incidente correspondientes a las dosis ensayadas en los experimentos de tolerancia a la RUV-B, aplicadas mediante una lámpara Spectroline XX15-B y filtros neutros de diferente densidad.

Para el experimento de tolerancia se colocaron por unidad experimental 10 y 20 individuos de *B. antiqua* y *B. gracilis* respectivamente, en vasos de precipitado de 80 ml conteniendo agua natural filtrada con *Chlamydomonas reinhardtii*. Cada tratamiento contó con 8 réplicas (Fig. 4.1). Las unidades experimentales se expusieron durante dos días consecutivos a la siguiente secuencia de radiación: 4h oscuridad, 6 h PAR+UV-B, 8 h PAR, 6 h oscuridad. Todos los tratamientos recibieron 6.5 mW cm^{-2} de PAR (400-750 nm) provista por dos tubos fluorescentes Philips TLT 40W/54RS Y tres dosis de UV-B (Fig. 4.2). Cabe aclarar que las dosis de RUV-B experimentales se establecieron en un orden de magnitud menos que la presente al mediodía en el ambiente natural para contrarrestar la falta de refugio físico en los contenedores experimentales. Durante la incubación, se controló a diario cada unidad experimental, se eliminaron y se contabilizaron los individuos muertos.

Para el cálculo de la mortalidad por exposición a la UV-B se utilizó la fórmula de Abbot (Newman, 1995):

$$\text{Mortalidad} = \frac{\text{Mortalidad}_{(final)} - \text{Mortalidad}_{(control)}}{1 - \text{Mortalidad}_{(control)}}$$

Experimentos para medir los efectos de la radiación PAR+UVA y la temperatura sobre la reproducción en *Boeckella antiqua*

Los experimentos se llevaron a cabo mediante incubaciones tipo “batch” en recipientes de 2 L utilizando individuos de *Boeckella antiqua* provenientes de la Laguna Los Juncos (Capítulo 1, Fig. 1.7a). En estos experimentos se aplicaron dos tratamientos de radiación (PAR y PAR+UVA) y cinco niveles de temperatura (5, 8, 12, 16 y 20°C). Los copépodos fueron aclimatados a la temperatura de experimentación durante 24 h previo al experimento, de acuerdo a lo detallado en la sección de materiales y métodos generales.

Para el tratamiento PAR+UVA las incubaciones de los copépodos se realizaron en recipientes transparentes a la RUV (UVT Plasmatic, España, mientras en el caso del tratamiento PAR se utilizaron recipientes de vidrio para impedir la penetración de la radiación UV-A. Los experimentos fueron realizados en una cámara Sanyo MLR50, con un fotoperíodo de 12 h luz: 12 h oscuridad, provisto por 2 tubos Q-panel 340 (máximo de emisión a 340 nm) y 10 tubos de luz PAR, totalizando una dosis diaria de radiación visible de $7.2 \text{ mol de quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y de UV-A de $135 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$. Las incubaciones tuvieron una duración de 12 días. Diariamente, se retiraron las hembras ovígeras de los cultivos y a cada una de ellas se le contabilizó el número de huevos. Al finalizar el experimento se calculó el número total de hembras ovígeras y el número de huevos por hembra (huevos h^{-1}). Posteriormente se calcularon los promedios de estas variables en cada uno de los tratamientos de radiación y a cada temperatura ensayada.

Análisis estadísticos

Para analizar el efecto de la UV-B y de la temperatura sobre la mortalidad en *B. antiqua* y *B. gracilis* se aplicó análisis de la varianza de dos vías (TWO-WAY ANOVA). Asimismo, el análisis del efecto de la radiación experimental (PAR y PAR+UVA) y la temperatura (5, 8, 12, 16 y 20°C) sobre la fecundidad de *B. antiqua* se realizó mediante este mismo análisis estadístico. En ambos casos, se realizaron las comparaciones múltiples *a posteriori* entre los distintos niveles de los factores experimentales (Test de Tukey) (Zar, 1999).

En todos los casos y previamente al análisis de la varianza, se comprobó la normalidad y homocedasticidad de los datos. En aquellos casos en que los datos no se ajustaron a alguno de los supuestos anteriores, se aplicó una transformación logarítmica con el fin de normalizarlos y/o de

ecualizar su varianza. El análisis de los datos fue realizado mediante el paquete estadístico SIGMAPLOT 9.0 integración SIGMASTAT 3.1.

4.4 Resultados

Experimentos para estudiar el efecto de la temperatura sobre la tolerancia a la RUV-B

Compuestos foto-protectores en *Boeckella*

La concentración de MAAs en *B. antiqua* utilizada en los diferentes experimentos de tolerancia presentó un promedio de 0.029 ± 0.006 AU mg^{-1} P. S., mientras que los carotenoides registraron un promedio de 1.026 ± 0.387 μg mg^{-1} P. S. En el caso de *B. gracilis* los MAAs presentaron un promedio de 0.325 ± 0.071 AU mg^{-1} P. S y los carotenoides 0.99 ± 0.261 μg mg^{-1} P. S. (Tabla 4.2). La concentración de MAAs fue mayor en *B. gracilis* que en *B. antiqua* (Mann-Whitney T=15, $p < 0.05$), mientras que los carotenoides no presentaron diferencias significativas entre las especies ($t=0.14$, $p=0.892$).

Tabla 4.2: Concentraciones de compuestos foto-protectores y fechas de recolección al inicio de los experimentos de tolerancia a la RUV-B.

Especie	Temperatura experimental (°C)	MAAs (AU mg^{-1} P.S)	Carotenoides (μg mg^{-1} P.S)	Fecha de recolección
<i>B. antiqua</i>	5	0.0294181	1.06574704	16/07/2007
	8	0.03776754	1.46895972	25/08/2007
	12	0.02490278	0.89743467	28/09/2007
	16	0.03201974	1.251802	26/10/2007
	20	0.02212875	0.44617328	14/11/2007
<i>B. gracilis</i>	5	0.31891	1.21012154	17/09/2010
	8	0.40768	1.15963846	29/09/2010
	12	0.2246579	0.65837778	16/10/2010
	16	0.37749	1.18488923	24/11/2010
	20	0.29988947	0.77096667	09/12/2010

Boeckella antiqua

Los experimentos de tolerancia a la exposición a la RUV-B revelaron que la dosis de RUV-B afectó significativamente a la mortalidad de *B. antiqua*. Sin embargo, la mortalidad fue independiente de la temperatura y de la interacción entre la dosis y la temperatura (Tabla 4.3). El incremento de la dosis de RUV-B produjo un aumento consecuente en la mortalidad de *B.*

antiqua. Las dosis de RUV-B de 0%, 20% y 60% presentaron mortalidades similares y significativamente menores al tratamiento 100%. En esta última dosis se detectaron las mayores mortalidades independientemente de la temperatura (Fig. 4.3).

Tabla 4.3: Análisis de la variancia de dos vías (Two-way ANOVA) para estudiar el efecto de la temperatura y de la RUV-B sobre la mortalidad en *B. antiqua*.

Factor	gl	F	P
Temperatura	4	1.144	0.338
Dosis RUV-B	3	26.198	<0.05
Temperatura*Dosis RUV-B	12	0.644	0.802

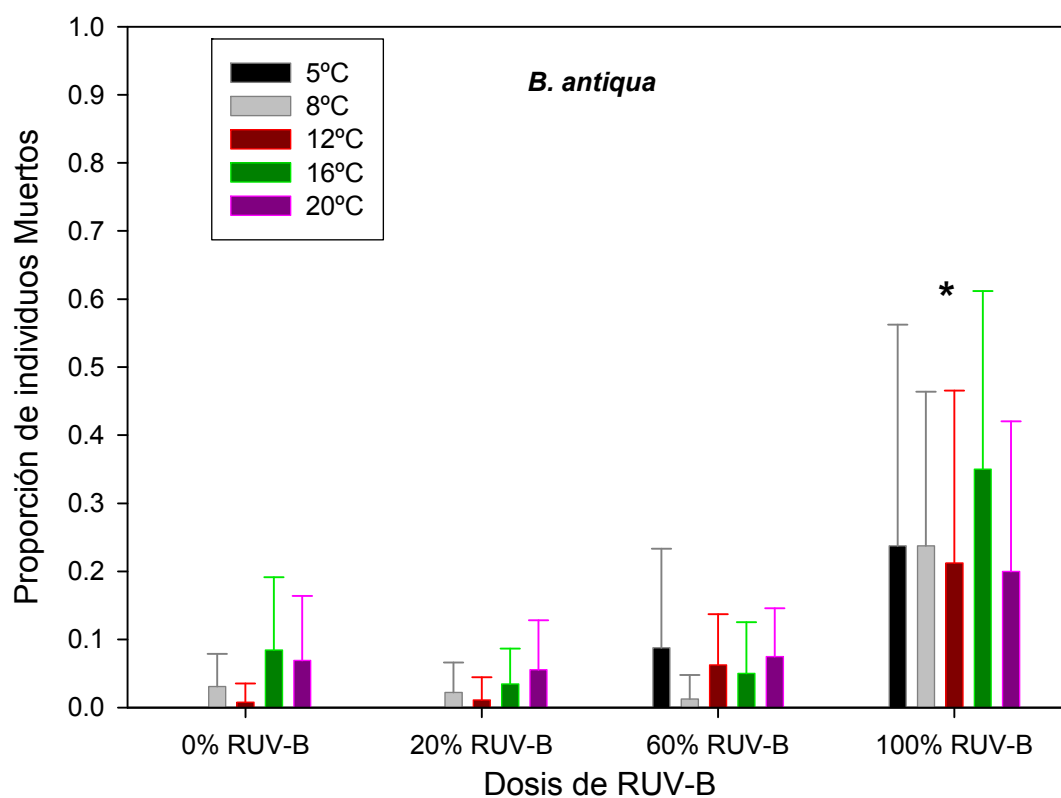


Figura 4.3: Proporción de la mortalidad en *B. antiqua* en relación con la temperatura y la dosis de RUV-B. El asterisco (*) indica diferencias significativas en la dosis de RUV-B (Prueba a posteriori de Tukey).

Boeckella gracilis

En *B. gracilis* los experimentos de tolerancia a la RUV-B revelaron que tanto la temperatura como la dosis de RUV-B afectaron significativamente a la mortalidad de *B. gracilis*. (Tabla 4.4). La mayor mortalidad en *B. gracilis*, se registró a 20°C independientemente del tratamiento de radiación (Fig. 4.4). La dosis de RUV-B también afectó a la mortalidad, observándose la mayor mortalidad a la dosis de 100% independientemente de la temperatura (Fig. 4.4).

Tabla 4.4: Análisis de la variancia de dos vías (Two-way ANOVA) para estudiar el efecto de la temperatura y de la UV-B sobre la mortalidad de *B. gracilis*.

Factor	gl	F	P
Temperatura	4	4.869	<0.05
Dosis RUV-B	3	2.842	<0.05
Temperatura*Dosis RUV-B	12	0.34	0.98

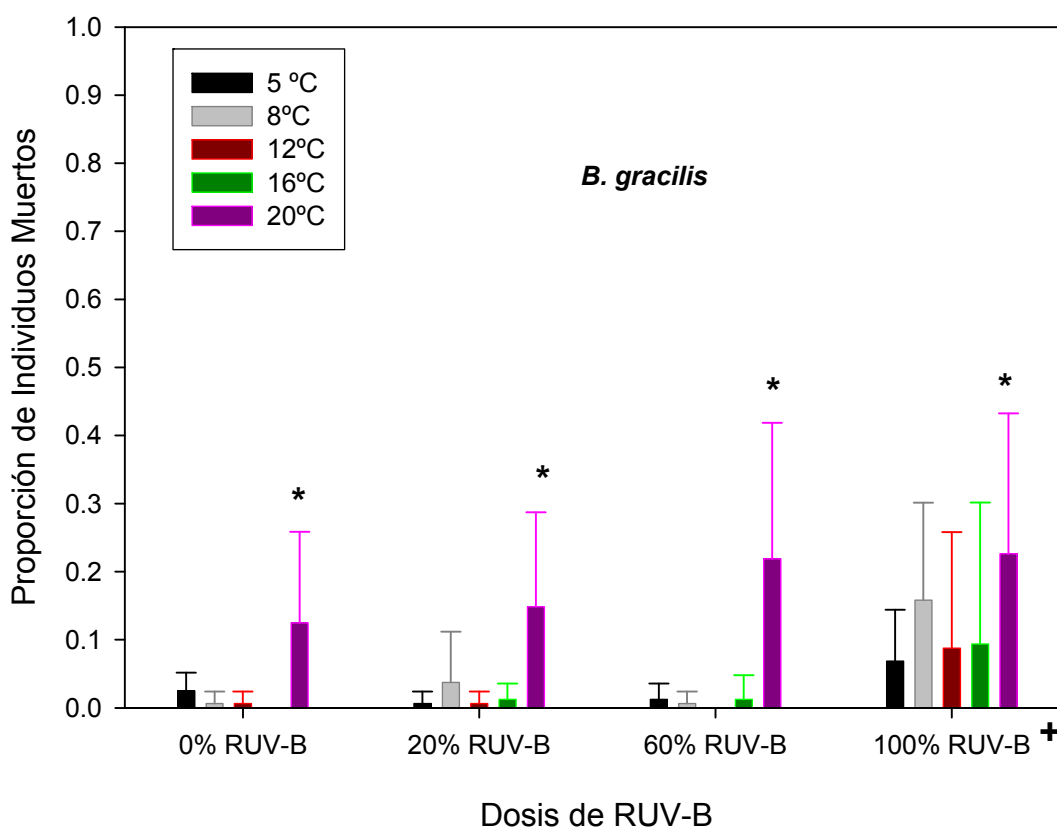


Figura 4.4: Proporción de la mortalidad en *B. gracilis* en relación con la temperatura y a la dosis de RUV-B. El asterisco (*) indica diferencias significativas en el factor temperatura, mientras que el símbolo (+) indica diferencias significativas en la dosis de RUV-B (Test de Tukey).

Efectos de la temperatura y de la radiación UV sobre el tamaño de la camada en *B. antiqua*

En esta sección se presentan los resultados correspondientes al efecto de la temperatura y de la exposición a la radiación PAR+UVA sobre el número de huevos por hembra en *B. antiqua*. El tratamiento de radiación y la temperatura afectaron significativamente el número de huevos por hembra (huevos h^{-1}), existiendo un efecto interactivo entre estas variables (Tabla 4.5). El tamaño de camada fue similar entre tratamientos de radiación excepto a 5°C, en el cual el mayor tamaño de camada se observó en el tratamiento PAR (Fig. 4.5). En el rango térmico ensayado se observó el mayor tamaño de camada a 12°C independientemente del tratamiento de radiación (Fig. 4.5).

Tabla 4.5: Análisis de la variancia de dos vías (Two-way ANOVA) para estudiar el efecto de la temperatura y de la radiación sobre el tamaño de la camada (huevos hembra $^{-1}$) de *B. antiqua*.

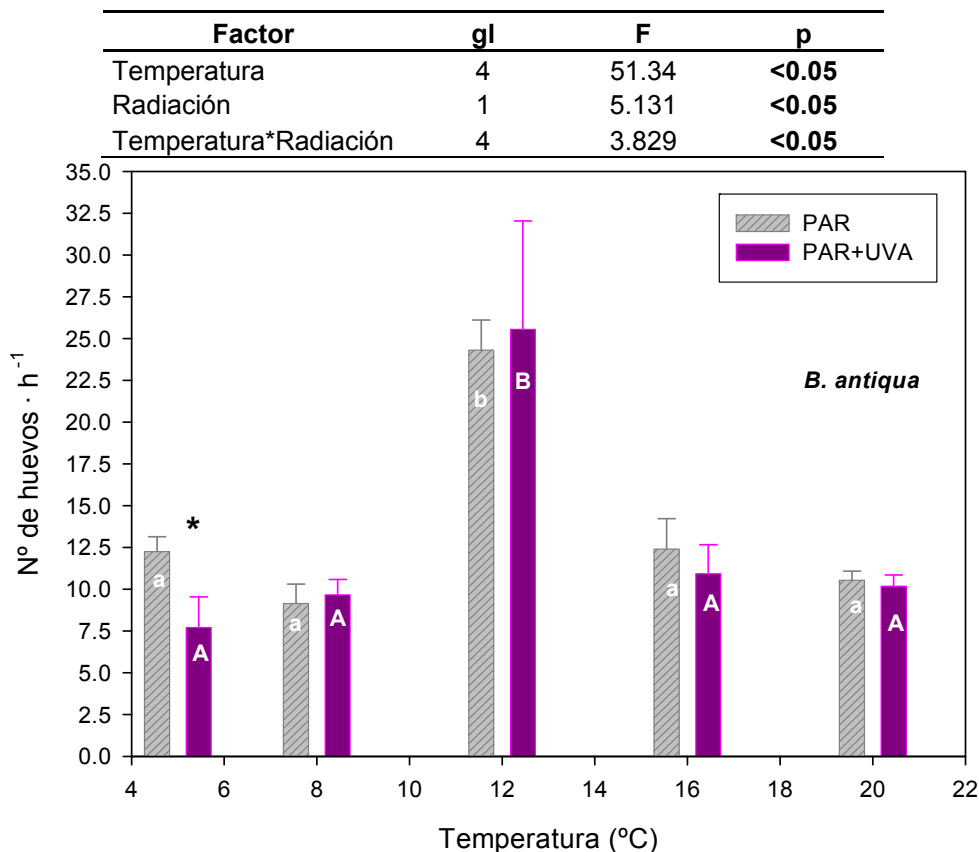


Figura 4.5: Tamaño de camada a diferentes temperaturas y condiciones de radiación. Barras grises: números de huevos por hembra (huevos h^{-1}) en el tratamiento con radiación PAR y barras violetas: huevos h^{-1} en el tratamiento con radiación PAR+UVA. El asterisco (*) en la parte superior de las barras indica las diferencias entre los tratamientos de radiación a cada temperatura. Las letras minúsculas y mayúsculas indican respuestas similares entre las temperaturas respecto del tratamiento de radiación (Prueba a posteriori Tukey).

4.5 Discusión

Los ensayos para estudiar la tolerancia a la UV-B en *B. antiqua* y *B. gracilis* en un rango de temperatura de 5 a 20°C evidenciaron que ambas especies son muy tolerantes a la UV-B independientemente de la temperatura. En cuanto al efecto de la temperatura, los resultados obtenidos indicarían que *B. antiqua* y *B. gracilis* están adaptadas a un rango térmico amplio, aunque se observó una mortalidad comparativamente mayor en *B. gracilis* a 20°C.

En el caso de *B. antiqua* la mortalidad sólo resultó afectada por la mayor dosis de RUV-B independientemente de la temperatura. En esta especie se registraron mortalidades menores al 40% a una dosis de 100% de UV-B. Este nivel de tolerancia se atribuiría a un conjunto de características entre las que se pueden mencionar, sus niveles de compuestos foto-protectores tanto MAAs como carotenoides (Tabla 4.2) que proveerían una combinación efectiva de filtros y anti-oxidantes (Pérez et al, 2006; Pérez, 2007). Se conoce además que *B. antiqua* presenta mecanismos de foto-reparación enzimática (Zagarese et al, 1997a; Pérez, 2007; García et al, 2008). Estas adaptaciones en conjunto permitirían a *B. antiqua* tolerar los elevados niveles de UV-B que prevalecen en los ambientes someros debido a la resuspensión y a las características ambientales altamente oxidativas dado el impacto particular de la RUV sobre el medio químico (Souza et al, 2010).

En el caso de *B. gracilis* la mortalidad estuvo afectada tanto por la dosis de UV-B como por la temperatura. A la dosis de UV-B del 100% la mortalidad fue cercana al 25%. Aunque hasta el momento se desconocen los mecanismos de foto-reparación en *B. gracilis*, la presencia de niveles altos de foto-protección por carotenoides y MAAs contribuiría a explicar su elevada tolerancia a la UV-B. *B. gracilis* es la especie de *Boeckella* con el rango latitudinal más amplio, habitando en latitudes bajas las zonas eufóticas de cuerpos de agua ultraoligotróficos altoandinos (>3000 m.s.n.m). Estos ambientes se caracterizan por su gran amplitud térmica y sus elevados niveles de RUV (González Angarita et al, 2008). En la Patagonia esta especie habita lagunas muy someras pericordilleranas en un amplio rango latitudinal (Menu-Marque et al, 2000; De los Rios et al, 2010), generalmente temporales y con concentraciones altas de MOD (Trochine et al, 2008; García, 2010).

En síntesis, estos resultados prueban parcialmente la hipótesis planteada acerca de la disminución de la tolerancia a la UV-B con el incremento de la temperatura, permitiendo inferir la existencia de respuestas específicas a la combinación de estas variables. Esto se vio reflejado en la menor vulnerabilidad a la UV-B observada en *B. gracilis*. Por otra parte, si bien el rol de la temperatura en la determinación de la tolerancia a la RUV-B no fue relevante, en ambas especies

existió una mayor mortalidad a la mayor dosis de UV-B a 20°C. Esto sugiere que también existe una plasticidad térmica importante, particularmente en especies como *B. gracilis* y *B. antiqua* que naturalmente pueden estar sometidas a rangos amplios de temperatura ambiental.

Los efectos dañinos de la dosis de la RUV-B, podrían relacionarse con una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de peroxidación lipídica en los organismos (Borgeraas y Hessen, 2000). En este contexto, una primera línea de defensa es la producción de compuestos que filtren la radiación, la cual también se ve afectada por la temperatura como se expuso en el capítulo 2. En este sentido se conoce que los carotenoides, antioxidantes muy comunes en organismos acuáticos pueden ver afectada su estructura molecular y función a temperaturas crecientes (Byron, 1981). En este estudio se observó una mayor mortalidad por UV-B a 20°C, lo cual podría tomarse como una evidencia que temperaturas mayores a ese valor por si solas condicionarían más fuertemente la supervivencia en *B. gracilis* frente a la UV-B. Por el contrario, en algunas especies zooplanctónicas como el copépodo *Leptodiptomus minutus* y el cladóceros *Daphnia cathawba*, se ha observado que la tolerancia a la UV-B se incrementa con la temperatura debido a que la foto-reparación enzimática resulta su estrategia principal de foto-protección (Gonçalves et al, 2002; Williamson et al, 2002; MacFadyen et al, 2004). Si bien se ha considerado que el mecanismo de foto-reparación enzimático es limitado a bajas temperaturas (Rocco et al, 2002), no se puede descartar la existencia de adaptaciones que permitan la reparación enzimática del daño por RUV en especies que habitan ambientes fríos. Los altos niveles de foto-protección química detectados en organismos planctónicos de lagos de montaña apoyarían esta hipótesis (Tartarotti et al, 2001; Persaud et al, 2007; Sommaruga 2010).

Algunas investigaciones han planteado que la RUV y la temperatura presentarían efectos sinérgicos sobre algunos parámetros poblacionales. Al respecto, Persaud y Williamson (2005) demostraron que la temperatura y la RUV interactúan afectando la abundancia y la reproducción en especies zooplanctónicas. Estudios previos han indicado que la RUV por si sola reduce la producción de huevos en copépodos, cladóceros y rotíferos (Sawada et al, 1990; Cabrera et al, 1997; Grad et al, 2001; Kane y Pomory, 2001; Persaud y Williamson, 2005). En este sentido, se puede hipotetizar que a ciertas temperaturas los mecanismos de foto-reparación estarían limitados, restringiéndose la foto-protección a la que confieren los compuestos foto-protectores. El estudio experimental del efecto de la UV-A y la temperatura sobre la producción de huevos en *B. antiqua* reveló una respuesta homogénea a la UV-A a temperaturas entre 8 y 20°C. Sin embargo, la producción de huevos resultó significativamente menor en el tratamiento con UV-A a

5°C. En este sentido la menor producción de huevos observada a 5°C en el tratamiento PAR+UVA respecto al tratamiento PAR podría relacionarse con una disminución de la eficiencia de la foto-reparación enzimática en los adultos que afectaría su reproducción. Entonces, el bajo impacto de la UV-A sobre la producción de huevos en *B. antiqua* reflejaría la adaptación de esta especie a la exposición, la contribución de los mecanismos de foto-protección química (presencia de elevadas concentraciones de pigmentos carotenoides y MAAs) y de foto-reparación enzimática en los adultos (Zagarese et al, 1997a; Pérez, 2007). Por otra parte, en el rango térmico estudiado se observó a 12°C la producción más elevada de huevos en *B. antiqua*. Esto es interesante ya que existen registros previos en especies de *Boeckella* de Nueva Zelanda que indican una mayor producción de huevos a temperaturas menores a 12°C (Jamieson y Burns, 1988; Hall y Burns, 2001).

Si bien no se evaluó la resistencia a la RUV de los huevos de *B. antiqua*, se observa a simple vista que los mismos poseen un elevado nivel de foto-protección por carotenoides al igual que los estadios de copepodito (Fig. 1.6). En el caso de los huevos, la presencia de pigmentación sería adaptativa para tolerar elevados niveles de exposición mientras permanecen adheridos a las hembras y también para resistir la permanencia en los sedimentos luego de la desecación del cuerpo de agua.

Tanto *B. antiqua* como *B. gracilis* toleran en la naturaleza niveles altos de radiación y amplios rangos térmicos. La presencia de diferentes estrategias de foto-protección en ambas especies resultaría una precondición para explotar los ambientes acuáticos patagónicos permitiendo además su desarrollo y reproducción. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren la existencia de una solución de compromiso que involucra el rango térmico fisiológico de los organismos como determinante de su capacidad de tolerar la exposición a la RUV. Por otra parte, se observó que al menos en *B. antiqua* existen temperaturas más favorables para la reproducción. En este sentido si bien la producción de huevos refleja diversas variables ecológicas, en las condiciones experimentales controladas de alimento, temperatura y radiación, se pudo determinar un estrés debido a la combinación de temperaturas bajas y presencia de RUV, contrariamente a lo planteado en la hipótesis inicial.

Conclusiones finales

- ✓ En las especies estudiadas del género *Boeckella*, *B. antiqua*, *B. brasiliensis*, *B. brevicaudata*, *B. gracilis*, *B. gracilipes* y *B. gibbosa*, se determinaron dos tipos de compuestos foto-protectores, los aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) y los pigmentos carotenoides.
- ✓ En *Boeckella* spp. se identificaron y cuantificaron mediante la técnica de HPLC cinco compuestos diferentes de MAAs: Micosporina-Glicina, Porphyrina-334, MAA-332, Palithene y Shinorina.
- ✓ La concentración de MAAs y de carotenoides fue muy variable entre las diferentes especies de *Boeckella* y también entre poblaciones de *B. gracilipes* sugiriendo la existencia de adaptaciones locales a la exposición a la radiación. *Boeckella gibbosa* resultó la especie con mayor concentración de compuestos foto-protectores, tanto MAAs como carotenoides, mientras que *B. brasiliensis* presentó la concentración más baja de ambos compuestos.
- ✓ La concentración de MAAs en *Boeckella* spp. decreció exponencialmente con la conductividad del ambiente. Sin embargo, dado que las mayores concentraciones de MAAs se hallaron en las especies que habitan lagos de altura y pedemontanos con conductividades extremadamente bajas, estos no intervendrían en la regulación osmótica como ha sido propuesto en la literatura, sino que responderían a la mayor exposición a la radiación solar de estos ambientes.
- ✓ La exposición a la radiación PAR+UVA induce a la acumulación de compuestos foto-protectores tanto MAAs como carotenoides en la mayoría de las especies del género *Boeckella* estudiadas, excepto en la población de *B. gracilipes* de la Laguna Verde y *B. gibbosa* de la Laguna Toncek. Esta respuesta evidencia la existencia de diferentes estrategias en cuanto a la foto-protección química en *Boeckella*. Por un lado, la plasticidad manifiesta por aquellas especies que adaptan la concentración de compuestos en presencia de radiación. Por otro lado, la estabilidad del nivel de foto-protección química en especies que poseen altas concentraciones de compuestos foto-protectores y que habitan ambientes muy expuestos a la radiación.
- ✓ La temperatura y la exposición a la radiación PAR+UVA actuaron interactivamente afectando la concentración de compuestos foto-protectores, resultando variable la magnitud de la interacción entre especies y entre poblaciones de la misma especie. Se pudieron determinar tres respuestas de este efecto interactivo: a) un incremento de la

concentración de compuestos foto-protectores a temperaturas mayores a 16°C evidenciado en *B. antiqua* y *B. gracilis*; b) un incremento de la concentración de estos compuestos a temperaturas menores a 8°C en *B. brevicaudata* y *B. gracilipes* del Lago Morenito y, por último, c) una respuesta contrastante respecto a la temperatura con mayor acumulación de compuestos a 5 y 16°C en la población de *B. gracilipes* de la Laguna Verde.

- ✓ El efecto de la temperatura y la radiación afectó diferencialmente la bio-acumulación de MAAs en poblaciones de *B. gracilipes* de ambientes contrastantes en términos de clima óptico y térmico. La población de *B. gracilipes* proveniente del Lago Morenito aumentó su nivel de MAAs en respuesta a la exposición al PAR+UVA particularmente a bajas temperaturas; mientras que la población de la Laguna Verde presentó una estabilidad marcada frente a la exposición a la radiación PAR+UVA en el gradiente térmico de 5 a 20°C.
- ✓ El modelo cinético de primer orden resultó una herramienta útil para describir el comportamiento de la bio-acumulación de compuestos foto-protectores en función de la temperatura y para comparar las respuestas entre diferentes especies y poblaciones de *Boeckella*. Sin embargo, este modelo tiene ciertas limitaciones: a- es una simplificación de las condiciones que operan en la naturaleza y que en conjunto regularían también la bio-acumulación de compuestos foto-protectores y, b- no permite describir la dinámica de bio-acumulación ya que se basa en sólo dos puntos de concentración, inicial y final.
- ✓ En *Boeckella* spp. la concentración basal de compuestos foto-protectores tiene el potencial de afectar la bio-acumulación de estos compuestos en escenarios variables de radiación. Se observaron dos patrones: a) una gran estabilidad de la concentración de estos compuestos en *B. gracilipes* de la Laguna Verde, especie con elevados niveles de concentración basal, y, b) una plasticidad notable para ajustar las concentraciones de compuestos frente a la radiación en especies cuyos niveles basales son naturalmente variables como por ejemplo en *B. antiqua*.
- ✓ La temperatura y la presencia de RUV-B afectaron diferencialmente la mortalidad de *Boeckella antiqua* y *B. gracilis* y no presentaron efectos interactivos. En las dos especies la mortalidad dependió fuertemente de la dosis de RUV-B aplicada, resultando máxima al 100% de exposición a la RUV-B. *B. gracilis*, presentó mayor mortalidad a 20°C mientras que la mortalidad en *B. antiqua* fue independiente de la temperatura.
- ✓ La radiación PAR+UVA y la temperatura afectaron interactivamente la reproducción en *Boeckella antiqua*. Esta especie produjo una mayor cantidad de huevos a 12°C

independientemente del tratamiento de radiación. Sin embargo, el tamaño de camada sólo resultó afectado en el tratamiento PAR+UVA a 5°C. Esto indicaría que la exposición al PAR+UVA representa un costo que se traduce en la disminución del potencial reproductivo especialmente a bajas temperaturas.

- ✓ La foto-protección química en las especies analizadas de *Boeckella* y su fluctuación respecto de los cambios en el clima óptico y térmico indicarían la existencia de al menos dos estrategias dentro del género que responden a condiciones ambientales. Por un lado, la estrategia de las especies que habitan lagos y lagunas de altura, con niveles elevados de exposición a la RUV y escenarios térmicos muy fluctuantes, que se caracterizan por poseer una elevada concentración basal de compuestos foto-protectores y una gran resiliencia de la concentración en escenarios térmicos y ópticos variables. Por otro lado, la estrategia de especies de *Boeckella* que habitan cuerpos de agua pedemontanos que poseen una mayor plasticidad en la concentración de compuestos foto-protectores y una capacidad notable de adaptarla a escenarios térmicos y ópticos fluctuantes.

Agradecimientos

Quisiera expresar mi profundo agradecimiento a mis dos directores de tesis. A **María** por haberme acompañado durante todos estos años, aconsejándome y estimulándome a seguir investigando siempre con mucha paciencia, cariño, dedicación y calidez humana. Acompañandome y aconsejandome durante todo el proceso de la tesis. Siempre abriéndome la puertas a nuevos temas y nuevos intereses...*Simplemente muchas gracias...*

A **Horacio** por estar siempre disponible a mis consultas, aconsejándome y aportando siempre un punto de vista diferente. Gracias por haberme abierto las puertas del INTECH donde siempre me trataron con gran amabilidad, mis estadías en Chascomús fueron excelentes!

A mi familia por acompañarme. **A mis padres**, Eduardo y Eliana que nos enseñaron que con trabajo y mucho esfuerzo uno logra sus objetivos. A mis queridos hermanos **Daniel y Laura** que me quieren y me sacan una sonrisa siempre. A **Sofía** mi sobrina, que su presencia iluminó mi vida!!

A **Daniela Dubini** que se banco todas mis charlas de copépodos y mis largos monólogos sobre la tesis; y durante estos años se interesó por el fascinante mundo de los organismos acuáticos, gracias!!

A mis compañeros del Laboratorio de Fotobiología que durante todos estos años me acompañaron a muestreos, me ayudaron con mis experimentos, me cebaron mates y me hicieron disfrutar la vida en el laboratorio y muchos de los cuales ya son considerados amigos: Negro, Pato, Lina, Caro, Marina, Fabix, Marcelo, Gustavo, Riqui, Corina, Dely, Gaby, Daniela, Daniel, Mariana P., Mariana R., Claudia y Félix.

A los chicos que me ayudaron con la edición de la tesis, **Marina, Dino y Caro**, que desinteresadamente o no tanto, leyeron mis capítulos y me hicieron valiosas sugerencias.

A los chicos del Laboratorio de ecología acuática y fotobiología del INTECH por la compañía, la calidez y los buenos mates compartidos: Roberto, Pepe, María, Paulina, Leo, Anita, Nadia, Fernando y Gonza. Especialmente quiero agradecer a *Marcela* que estuvo a mi disposición y me ayudó con la técnica de HPLC siempre con buena onda y de manera desinteresada. Me quedo un muy lindo recuerdo de esos días en Chascomús...

A *Martín* y a *Virginia* del Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología del CRUB por haberme liofilizado de manera desinteresada mis muestras de copépodos.

A Maria Elena Cuello y a Daniela Milano por el préstamo desinteresado de las fotografías de las lagunas.

A mis amigos que siempre me apoyaron y estuvieron conmigo durante todo este proceso: Naty, Viki, Vicky L, Ceci Conte-Grand, Romi, Ceci, Matias, Nachito, Juana y Flor.

A todos lo que alguna vez me acompañaron a los muestreos y me ayudaron a acarrear bidones de agua al laboratorio, redes, botes y demases; y a los que formaron parte de este proceso que fueron muchos... ***gracias por su apoyo.***

Bibliografía

- Acevedo, S., Iglesias, G, Pérez, A., Ramilo, E., Salguero, J. y C. Peralta (1995)** Evaluación de Impacto Ambiental realizada para el emprendimiento turístico Expreso Caravana, en el predio de la Estación Perito Moreno, Depto. Pilcamiyeu.
- Adams, N.L. y Shick, J.M. (1996)** Mycosporine-like Amino Acids Provide Protection Against Ultraviolet Radiation in Eggs of the Green Sea Urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Photochemistry and Photobiology*, 64, 149-158.
- Alonso, C., Rocco, V., Barriga, J.P., Battini, M.A. y Zagarese, H. (2004)** Surface avoidance by freshwater zooplankton: Field evidence on the role of ultraviolet radiation. *Limnology & Oceanography*, 49, 225–232.
- Andersson, M., Van Nieuwerburgh, L. y Snoeijs, P. (2003)** Pigment transfer from phytoplankton to zooplankton with emphasis on astaxanthin production in the Baltic Sea food web. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 254, 213–224.
- Balseiro, E. G. y Modenutti, E. B. (1990)** Zooplankton Dynamics of Lake Escondido (Río Negro, Argentina) with special reference to a population of *Boeckella gracilipes* (Copepoda, Calanoida). *Int. Rev. gesam. Hydrobiol.* 75(4): 475-491.
- Balseiro, E. G., Modenutti, B. E. y Queimaliños, C. P. (2001)** Feeding *Boeckella gracilipes* (Copepoda, Calanoidea) on ciliates and phytoflagellates in an ultraoligotrophic Andean lake. *Journal plankton Research*, 23, 849-857.
- Balseiro, E. y Zagarese, H. E. (1994)** Distribución vertical y resistencia de *Pseudoboeckella gibbosa* a la radiación solar. *Tankay*, 1, 91-92.
- Balskus, E. P. y T., W. C. (2010)** The Genetic and Molecular Basis for Sunscreen Biosynthesis in Cyanobacteria. *Science*, 329, 1653-1656.
- Banaszak, A. T. y R. K. Trench. (1995)** Effects of ultraviolet (UV) radiation on marine microalgal-invertebrate symbioses. II. The synthesis of mycosporine-like amino acids in response to exposure to UV in *Anthopleura elegantissima* and *Cassiopeia xamachana*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 194: 233–250.
- Banaszak, A. T., Barba Santos, M. G., Lajeunesse, T. C. y Lesser, M. P. (2006)** The distribution of mycosporine-like amino acids (MAAs) and the phylogenetic identity of symbiotic dinoflagellates in cnidarian hosts from the Mexican Caribbean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 337, 131–146.
- Banaszak, A. T., Lajeunesse, T. C. y Trench, R. K. (2000)** The synthesis of mycosporine-like amino acids (MAAs) by cultured, symbiotic dinoflagellates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 249, 219–233.

- Banaszak**, A.T. (2003) Photoprotective physiological and biochemical responses of aquatic organisms, p 329-356. En Helbling, W. y H. Zagarese [eds.], UV effects in aquatic organisms and ecosystems. Comprehensive Serie.
- Bandaranayake**, W. M. y Des Rocher, A. (1999) Role of secondary metabolites and pigments in the epidermal tissues, ripe ovaries, viscera, gut contents and diet of the sea cucumber *Holothuria atra*. Marine Biology, 133, 163-169.
- Bandaranayake**, W. M., Bourne, D. J. y Sim, R. G. (1997) Chemical Composition during Maturing and Spawning of the Sponge *Dysidea herbacea* (Porifera: Demospongiae). Comp. Biochem. Physiol. B, 118B, 851-859.
- Barry**, J. P.; Baxter, C.H.; Sagarin, R. D. y Gilman, S.E. (1995) Climate-Related, Long-Term Faunal Changes in a California Rocky Intertidal Community. Science, 267:672-675.
- Bartling**, D.; Radzio, R.; Steiner, U.; y Weiler, E. W. A. (1993) Glutathione S-transferase with Glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*: Molecular cloning and functional characterization. European Journal of Biochemistry, 216, 579-586.
- Blois**, M. S. (1978) The melanins: their synthesis and structure. Photochemical and Photobiological Reviews (ed. K.C.Smith), Vol. 3, pp. 115-134. Plenum Press, New York.
- Blumthaler**, M. y Webb, A. R. (2003) UV radiation climatology, p. 21-58. En Helbling, W. y H. Zagarese [eds.], UV effects in aquatic organisms and ecosystems. Comprehensive Serie.
- Bohne**, F. y Linden, H. (2002) Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochimica et Biophysica acta, 1579, 26-34.
- Boon**, C. S, McClements, D. J.; Weiss, J. y Decker, E. A. (2010) Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 50(6): 515-532.
- Borgeraas**, J. y Hessen, D. (2002) Variations of antioxidant enzymes in *Daphnia* species and populations as related to ambient UV exposure. Hydrobiologia, 477, 15-30.
- Borgeraas**, J. y Hessen, D. O. (2000) UV-B induced mortality and antioxidant enzyme activities in *Daphnia magna* at different oxygen concentrations and temperatures. Journal of Plankton Research, 22, 1167-1183.
- Browman**, H. I.; Alonso Rodriguez, C.; Beland, F.; Cullen, J. J.; Davis, R.F.; Kouwenberg, J. H. M.; Kuhn, P. S.; McArthur, B.; Runge, J. A.; St-Pierre, J.-F. y Vetter, R. D. (2000) Impact of ultraviolet radiation on marine crustacean zooplankton and ichthyoplankton: a synthesis of results from the estuary and Gulf of St. Lawrence, Canada. Mar. Ecol. Prog. Ser., 199, 293-311.

- Buma**, A. G. J.; Boelen, P. y Jeffrey, W. H. (2003) UVR-induced DNA damage in aquatic organisms, p. 291-328. En Helbling, W. y H. Zagarese [eds.], UV effects in aquatic organisms and ecosystems. Comprehensive Serie.
- Buma**, A. G. J.; Van Hannen, E. J.; Roza, L.; Vedhuis, M. J. W. y Gieskes, W. W. C. (1995) Monitoring ultraviolet-B-induced DNA damage in individual diatom cells by immunofluorescent Thymine dimer detection. *J. Phycol.*, 31, 314-321.
- Byron**, E. R. (1981) Metabolic Stimulation by Light in a Pigmented Freshwater Invertebrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 1765-1767.
- Byron**, E. R. (1982) The Adaptive Significance of calanoid copepod Pigmentation: A comparative and experimental analysis. *Ecology*, 63, 1871-1886.
- Cabrera**, A. y Willink, A. (1980) Biogeografía de América Latina, p. 122. In 13, M. N. [ed.], Serie Biología. Organización de los Estados Americanos.
- Cabrera**, S.; Lopez, M. y Tartarotti, B. (1997) Phytoplankton and zooplankton response to ultraviolet radiation in a high-altitude Andean lake: short- versus long-term effects. *Journal of Plankton Research*, 19, 1565-1582.
- Caldwell**, M. M.; Bornman, J. F.; L., B.C., Flint, S.D. y Kulandaivelu, G. (2007) Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochemical y Photobiological Sciences*, 6, 252-266.
- Callone**, A.I., Carignan, M., Montoya, N.G. y Carreto, J.I. (2006) Biotransformation of mycosporine like amino acids (MAAs) in the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 84, 204-212.
- Carefoot**, H.T., Karentz, D., Pennings, S.C. y Young, C. L. (2000) Distribution of mycosporine-like amino acids in the sea hare *Aplysia dactylomela*: effect of diet on amounts and types sequestered over time in tissues and spawn. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 126 C 91-104.
- Carreto**, J. I., Carignan, M. O. y N. G. Montoya (2002) Short-term effects of ultraviolet radiation on the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. Pigment bleaching and MAAs synthesis inhibition, en: G. Arzul, Aquaculture, Environment and Marine Phytoplankton. Brest Ed. IFREMER, Actes colloq. 34: 173-190.
- Carreto**, J.I. y Carignan, M.O. (2011) Mycosporine-Like Amino Acids: Relevant Secondary Metabolites. Chemical and Ecological Aspects. *Marine Drugs*, 9, 387-446.
- Carreto**, J.I., Carignan, M.O., Daleo, G. y De Marco, S.G. (1990) Occurrence of mycosporine-like amino acids in the red-tide dinoflagellate *Alexandrium excavatum*: UV-photoprotective compounds? *Journal of Plankton Research*, 12 909-921.

- Carroll**, A.K. y Shick, J.M. (1996) Dietary accumulation of UV-absorbing mycosporine-like amino acids (MAAs) by the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Marine Biology*, 124, 561-569.
- Chalker**, B. E., Dunlap, W. C., Banaszak, A. T., y P. J. Moran (1988) UV-absorbing pigments in *Acanthaster planci*: photoadaptation during the life history of reef invertebrates. In Proc. Sixth Int. Coral Reef Symp., p. 15
- Chalker-Scott**, L. (1995) Survival and sex ratios of the marine copepod, *Tigriopus californicus*, following ultraviolet-B (290-320 nm) radiation exposure. *Mar. Biol.* 123:799-804.
- Cheesman**, D. F.; Lee, W. L. y P. F. Zagalsky (1967) Carotenoproteins in invertebrates. *Biological Reviews*, 42: 131–160.
- Cockell**, C.S. y Knowland, J. (1999) Ultraviolet radiation screening compounds. *Biological Review*, 74, 311-345.
- Conde**, F.R., Churio, M.S. y Previtali, C.M. (2000) The photoprotector mechanism of mycosporine-like amino acids. Excited-state properties and photostability of porphyrin-334 in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 56, 139–144.
- Cooke**, S.I., Williamson, C.E. y Saros, J.E. (2006) How do temperature, dissolved organic matter and nutrients influence the response of *Leptodiatomus ashlandi* to UV radiation in a subalpine lake? *Freshwater Biology*, 51, 1827–1837.
- Cooke**, S.L., Williamson, C.E., Leech, D.M., Boeing, W.J. y Torres, L. (2008) Effects of temperature and ultraviolet radiation on diel vertical migration of freshwater crustacean zooplankton. *Canadian Journal of Fish aquatic sciences*, 65, 1144-1152.
- Correa**, M. N. (1998) Flora Patagónica. Parte I. Colección Científica del INTA. Buenos Aires. 391 pp.
- Curtis**, P. J. (1998) Climatic and Hydrologic Control of DOM concentration and quality in Lakes. En: Hessen y Tranvik (eds) Aquatic humic substances. Ecology and biogeochemistry. *Ecological Studies* 133, Springer, Berlin: 93-105.
- De Lange**, H. J., Verschoor, A. M., Gylstra, R., Cuppen, J.G.M. y Van Donk, E. (1999) Effects of artificial ultraviolet-B radiation on experimental aquatic microcosms. *Freshwater Biology*, 42, 545-560.
- De Lange**, H. J. y Van Reeuwijk, P.L. (2003) Negative effects of UVB-irradiated phytoplankton on life history traits and fitness of *Daphnia magna*. *Freshwater Biology*, 48, 678–686.
- De Los Rios**, P. (2005) Survival of pigmented freshwater zooplankton, exposed to artificial ultraviolet radiation and two levels of dissolved organic carbon. *Polish Journal of Ecology*, 53, 113–116.

- De Los Ríos, P.,** Rivera, R. y Morrone, J.J. (2010) Calanoids (Crustacea: Copepoda) reported for Chilean Inland waters. *Boletín de Biodiversidad de Chile*, 3, 3-23.
- De Vries, A.,** Vam Oostrom, C.T.M., Hofhuis, F.M.A., Dortant, P.M., Berg, R.J.W., De Gruijl, F.R., Wester, P.W., Van Kreijl, C.F., Capel, P.J.A., Van Steeg, H. y Verbeek, S.J. (1995) Increased susceptibility to ultraviolet-B and carcinogens of mice lacking the DNA excision repair gene XPA. *Nature*, 377, 169-173.
- Díaz, M. M.,** Pedrozo, F., Reynolds, C. y Temporetti, P.F. (2007) Chemical composition and the nitrogen-regulated trophic state of Patagonian lakes. *Limnologia*, 37 17–27.
- Díaz, M.,** Pedrozo, F. y Baccala, N. (2000) Summer classification of Southern Hemisphere temperate lakes (Patagonia, Argentina). *Lakes & Reservoirs: Research and Management*, 5, 213–229.
- Díaz, S. B.,** Booth, C.R. y Smolskaia, I. (1994) Effects of ozone depletion on irradiances and biological doses over Ushuaia. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 43, 115–122.
- Díaz, S. B.,** Camilión, C., Deferrari, G., Fuenzalida, H., Armstrong, R., Booth, C., Paladini, A., Cabrera, S., Casiccia, C., Lovengreen, C., Pedroni, J., Rosales, A., Zagarese, H.E. y Vernet, M. (2006) Ozone and UV Radiation over Southern South America: Climatology and Anomalies. *Photochemistry and Photobiology*, 82, 834–843.
- Dodson, S.I.** (1988) The ecological role of chemical stimuli for the zooplankton: Predator-avoidance behavior in *Daphnia*. *Limnology & Oceanography*, 33, 1431-1439.
- Dunlap, W.C. y** Chalker, B.E. (1986) Identification and quantitation of near-UV absorbing compounds (S-320) in a hermatypic scleractinian. *Coral Reefs*, 5, 155-159.
- Dunlap, W.C. y** Shick, J.M. (1998) Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in Coral Reef organisms: a biochemical and environmental perspective *Journal Phycology*, 34, 418–430.
- Dunlap, W.C. y** Yamamoto, Y. (1995) Small-molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comp. Biochem. Physiol.*, 112B, 105-114.
- Farman, J.C.** (1988) Ozone Depletion. *Nature*, 333, 390.
- Farman, J.C.,** Gardiner, B.C. y Shanklin, J.D. (1985) Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO_x/NO_x interaction. *Nature*, 315, 207-210.
- Favre-Bonvin, J.,** Arpin, N. y Brevard, C. (1987) Biosynthesis of mycosporine: mycosporine-glutaminol in *Trichothecium roseum*. *Phytochemistry*, 26, 2509-2514.
- Ferrier-Pagés, C.,** Richard, C., Forcioli, D., Allemand, D., Pichon, M. y Shick, J.M. (2007) Effects of Temperature and UV Radiation Increases on the Photosynthetic Efficiency in Four Scleractinian Coral Species. *Biological Bulletin*, 213, 76-87.

- Fischer**, J.M., Nicolai, J.L., Williamson, C.E., Persaud, A.D. y Lockwood, R.S. (2006) Effects of ultraviolet radiation on diel vertical migration of crustacean zooplankton: an in situ mesocosm experiment. *Hydrobiologia*, 563, 217–224.
- Friedberg**, E. C., Walker, G.C. y Siede, W. (1995) DNA repair and Mutagenesis. ASM Press, Washington D.C.
- Fundación Torcuato Di Tella** e Instituto Torcuato Di Tella. (2006) Comunicación nacional de cambio climático: vulnerabilidad de la Patagonia y sur de las provincias de Buenos Aires y La Pampa. Informe final. 369 pp.
- García**, P. E.; Pérez, A. P.; M. C. Dieguéz; Ferraro, M. A.; y H. E. Zagarese. (2011) The photo-protection strategy in aquatic environments: a facultative condition?. 21st I-APS Conference. 17-20 Mayo de 2011. Libro de Resúmenes pagina 78.
- García**, P.E., Diéguez, M.C., Ferraro, M.A., Zagarese, H.E. y Pérez, A.P. (2010) Mycosporine-like Amino Acids in Freshwater Copepods: Potential Sources and Some Factors That Affect Their Bioaccumulation. *Photochemistry and Photobiology*, 86, 353–359.
- García**, P.E., Pérez, A.P., Diéguez, M.C., Ferraro, M.A. y Zagarese, H.E. (2008) Dual control of the levels of photoprotective compounds by ultraviolet radiation and temperature in the freshwater copepod *Boeckella antiqua*. *Journal of Plankton Research*, 30, 817-827.
- García**, R. D. (2010) Historia de vida de la población del copépodo depredador *Parabroteas sarsi* (Calanoida, Centropagidae) en la laguna fantasma. Tesis de grado, Universidad Nacional del Comahue, 105 pp.
- García-Pichel**, F., Wingrad, C.E. y Castenholz, R.W. (1993) Evidence Regarding the UV Sunscreen Role of a Mycosporine-Like Compound in the Cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. *Applied and environmental microbiology*, 59, 170-176.
- Gaviria**, S. (1989) The calanoid fauna (Crustacea, Copepoda) of the Cordillera Oriental of the Colombian Andes. *Hydrobiologia*, 178, 113-134.
- Gonçalves**, R. J., Villafañe, V. E. y Helbling, E. W. (2002) Photorepair activity and protective compounds in two freshwater zooplankton species (*Daphnia menucoensis* and *Metacyclops mendocinus*) from Patagonia, Argentina. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1: 996–1000.
- Gonçalves**, R.J., Aigo, J., Modenutti, B., Balseiro, E., Villafañe, V.E., Cussac, V.E. y Helbling, E.W. (2010) Responses of plankton and fish from temperate zones to UVR and temperature in a context of global change. *Ecologia Austral*, 20, 129-153.
- González Angarita**, A.P., Aranguren Riaño, N.J. y Gaviria Melo, S. (2008) Cambios en la estructura de la población de *Boeckella gracilis* (CRUSTACEA, CENTROPAGIDAE) en el plancton del lago de Tota, BOYACÁ - COLOMBIA. *Acta Biologica Colombiana*, 13, 61-72.

- Goodwin**, T.W. (1986) Metabolism, Nutrition, and Function of Carotenoids. *Annual Review of Nutrition*, 6, 273-297.
- Gowing**, M. M. y Silver, M. W. (1983) Origins and microenvironments of bacteria mediating fecal pellet decomposition in the sea. *Mar. Biol.*, 73, 7–16.
- Gowing**, M. M. y Wishner, K. F. (1992) Feeding ecology of benthopelagic zooplankton on an eastern tropical Pacific seamount. *Mar. Biol.*, 112, 451–467.
- Grad**, G.; Williamson, C.E. y Karapelou, D. (2001) Zooplankton survival and reproduction responses to Damaging UV radiation: a test of reciprocity and Photoenzimatic repair. *Limnology & Oceanography*, 46, 584-591.
- Günzl**, H. (1991) The ultrastructure of the posterior gut and caecum in *Alona affinis* (Crustacea, Cladocera). *Zoomorphology*, 110, 139–144.
- Häder**, D.-P., Kumar, H.D., Smith, R.C. y Worrest, R.C. (2007b) Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical y Photobiological Sciences*, 6, 267–285.
- Häder**, D.-P., Lebert, M., Schuster, M., Del Ciampo, L., Helbling, E.W. y Mckenzie, R. (2007a) ELDONET—A Decade of Monitoring Solar Radiation on Five Continents. *Photochemistry and Photobiology*, 83, 1348–1357.
- Häder**, D.-P.; Helbling, E.W.; Williamson, C.E. y Worrest, R. C. (2011) Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 10, 242–260.
- Hairston**, N. G. J. (1976) Photoprotection by carotenoid pigments in copepod *Diaptomus nevadensis*. *Proceeding of the national Academy of Sciences of The United states of America*, 73, 971-974.
- Hairston**, N. G. J. (1979a) The Adaptative significance of Color polymorphism in two species of *Diaptomus* (Copepoda). *Limnology & Oceanography*, 24, 15-37.
- Hairston**, N. G. J. (1979b) The effect of temperature on carotenoid photoprotection in the copepod *Diaptomus nevadensis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A, 445-448.
- Hairston**, N.G.J. (1980) On the diel variation of Copepods Pigmentation. *Limnology & Oceanography*, 25, 742-747.
- Hall**, C. J. y Burns, C. W. (2001) Hatching of *Boeckella hamata* (Copepoda: Calanoida) resting eggs from sediments of a tidally influenced lake. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 35, 235-238.

- Hallegraeff**, G.M., Mous, I.J., Veeger, R., Flik, B.J.G. y Ringelberg, J. (1978) A comparative study on the carotenoid pigmentation of zooplankton of lake Maarsseveen (Netherlands) and of Lac Pavin (Auvergne, France)---II Diurnal variation in carotenoid content. *Comp. Biochem. Physiol.*, 60B, 59-62.
- Hansen**, J., Nazarenko, L., Ruedy, R., Sato, M., Willis, J., Del Genio, A., Koch, D., Lacis, A., Lo, K., Menon, S., Novakov, T., Perlwitz, J., Russell, G., Schmidt, G.A. y Tausnev, N. (2005) Earth's Energy Imbalance: Confirmation and Implications. *Science*, 308.
- Hansen**, J., Sato, M., Kharecha, P., Russell, G., Lea, D.W. y Siddall, M. (2007) Climate change and trace gases. *Phil. Trans. R. Soc. A*, 365, 1925–1954.
- Hansson**, L.-A. (2000) Induced pigmentation in zooplankton: a trade-off between threats from predation and ultraviolet radiation. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 267, 2327-2331.
- Hansson**, L.-A. (2004) Plasticity pigmentation induced by conflicting threats from predation and UV radiation. *Ecology*, 85, 1005-1016.
- Hansson**, L.-A. y Hylander, S. (2009a) Effects of ultraviolet radiation on pigmentation, photoenzymatic repair, behavior, and community ecology of zooplankton. *Photochemical y Photobiological Sciences*, 8, 1266–1275.
- Hansson**, L.-A. y Hylander, S. (2009b) Size-structured risk assessments govern *Daphnia* migration. *Proceeding of the Royal Society B*, 276, 331-336.
- Hansson**, L.-A., Hylander, S. y Sommaruga, R. (2007) Escape from UV threats in zooplankton: A cocktail of behavior and protective pigmentation. *Ecology*, 88, 1932-1939.
- Hargreaves**, B. R. (2003) Water column optics and penetration of UVR. p. 59-106. En Helbling, W. y H. Zagarese [eds.], *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. Comprehensive Serie.
- Harm**, H. (1969) Analysis of photoenzymatic repair of UV lesions in DNA by single light flashes III. Comparison of the repair effects at various temperatures between +37 ° and -196°. *Mutation research*, 7, 261-271.
- Harm**, H., y Rupert. C. S. (1970) Analysis of photoenzymatic repair of UV lesions in DNA by single light flashes VI. Rate constants for enzyme-substrate binding in vitro between yeast photoreactivating enzyme and ultraviolet lesions in Haemophilus transforming DNA. *Mutation Res.* 10: 291-306.
- Hebert**, P.D.N. y Emery, C.J. (1990) The adaptive significance of cuticular pigmentation in *Daphnia*. *Functional Ecology*, 4, 703-710.
- Helbling**, E.W., Barbieri, E.S., Sinha, R.P., Villafañe, V.E. y Häder, D.-P. (2004) Dynamics of potentially protective compounds in Rhodophyta species from Patagonia (Argentina) exposed to solar radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 75, 63–71.

- Helbling**, E.W., Villafañe, V.E. y Barbieri, E.S. (2001) Sensitivity of winter phytoplankton communities from Andean lakes to artificial ultraviolet-B radiation. *Revista Chilena de Historia Natural*, 74, 273-282.
- Helbling**, E.W., Zaratti, F., Sala, L.O., Palenque, E.R., Menchi, F. y Villafañe, V.E. (2002) Mycosporine-like amino acids protect the copepod *Boeckella titicacae* (Harding) against high levels of solar UVR. *Journal of Plankton Research*, 24, 225-234.
- Hernández Moresino**, R. D. y Helbling, E.W. (2010) Combined Effects of UVR and Temperature on the Survival of Crab Larvae (Zoea I) from Patagonia: The Role of UV-Absorbing Compounds. *Marine Drugs*, 8, 1681-1698.
- Hernández Moresino**, R. D. y Helbling, E.W. (2011) Sublethal effects of ultraviolet radiation on crab larvae of *Cryptograpsus altimanus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 407, 363-369.
- Hessen**, D. O. (1996) Competitive trade-off strategies in Arctic *Daphnia* linked to melanism and UV-B stress. *Polar Biology* 16: 573-579.
- Hessen**, D.O. (1993) DNA damage and pigmentation in alpine and arctic zooplankton as bioindicators of UV-radiation. *Verh. Int. Verein. Limnol.*, 25, 482-486.
- Hobaek**, A. y Wolf, H.G. (1991) Ecological genetics of Norwegian *Daphnia*. II. Distribution of *Daphnia longispina* genotypes in relation to short-wave radiation and water colour. *Hydrobiologia*, 225, 229-243.
- Holeton**, C., Lindell, K., Holmborn, T., Hogfors, H. y Gorokhova, E. (2009) Decreased astaxanthin at high feeding rates in the calanoid copepod *Acartia bifilosa*. *Journal of Plankton Research*, 31, 661–668.
- Hughes**, L. (2000) Biological consequences of global warming: is the signal already. *Tree*, 15, 56-61.
- Hunter**, J. R.; Kaupp, S. E.; y Taylor, J. H. (1982) Assessment of effects of UV radiation on marine fish larvae, p. 459–493. In J. Calkins (ed.), *The Role of Solar Ultraviolet Radiation in Marine Ecosystems*. Plenum Press, New York.
- Hunter**, J. R.; Taylor, J. H.; y H. G. Moser (1979) Effect of ultraviolet irradiation on eggs and larvae of the northern anchovy, *Engraulis mordax*, and the Pacific mackerel, *Scomber japonicus*, during the embryonic stage. *Photochemistry and Photobiology* 29:325–338.
- Huntley**, M.E. y Lopez, M.D.G. (1992) Temperature-Dependent Production of Marine Copepods: A Global Synthesis. *The American Naturalist*, 140, 201-242.
- Hylander**, S. y Jephson, T. (2010) UV protective compounds transferred from a marine dinoflagellate to its copepod predator. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.

- Hylander, S.,** Boeing, W.J., Graneli, W., Karlsson, J., Von Einem, J., Gutseit, K. y Hansson, L.-A. (2009) Complementary UV protective compounds in zooplankton. *Limnology & Oceanography*, 54, 1883–1893.
- Ikeda, T.** (1970) Relationship between respiration rate and body size in marine plankton animals as a function of temperature. *Bulletin of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University* 21:91-112.
- IPCC,** (2007) Summary for policy makers, In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of working group I to the fourth assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA
- Ito, S.** y Hirata Y. (1977) Isolation and structure of a mycosporine from the zoanthidial *Palythoa tuberculosa*. *Tetrahedron Lett.* 28:2429–30.
- Jamieson, C.** y Burns, C.W. (1988) The effects of temperature and food on copepodite development, growth and reproduction in three species of *Boeckella* (Copepoda; Calanoida). *Hydrobiologia*, 164, 235-257.
- Jeffrey, W.H.;** Aas, P.; Lyons, M. M.; Coffin, R. B. ; Pledger, R. J. y D. L. Mitchell (1996) Ambient solar radiation-induced photodamage in marine bacterioplankton. *Photo-chem. Photobiol.*, 64,419-427.
- Ji, R.,** Edward, M., Mackas, D.L., Runge, J.A. y Thomas, A.C. (2010) Marine plankton phenology and life history in a changing climate: current research and future directions. *Journal of Plankton Research*, 32, 1355–1368.
- Jönsson, M.,** Ranåker, L., Nicolle, A., Ljungberg, P., Fagerberg, T., Hylander, S., Jephson, T., Lebet, K., Von Einem, J., Hansson, L.-A., Nilsson, P.A., Balseiro, E. y Modenutti, B. (2011) Glacial clay affects foraging performance in a Patagonian fish and cladoceran. *Hydrobiologia*. 663: 101-108.
- Kane, K.** y Pomory C.M. (2001) The effects of UV-B radiation on the reproduction and mortality of *Tigriopus californicus* (Copepoda: Harpacticoida). *Hydrobiologia*, 444, 213–215.
- Karanas, J. J.,** Van Dyke, H. y Worrest, R.C. (1979) Midultraviolet (UV-B) sensitivity of *Acartia clausii* Giesbrecht (Copepoda). *Limnology & Oceanography*, 24, 1104-1116.
- Karanas, J.J.,** Worrest, R.C. y Van Dyke, H. (1981) Impact of UV-B Radiation on the Fecundity of the Copepod *Acartia clausii*. *Marine Biology*, 65, 125-133.
- Karentz, D.,** Cleaver, J.E. y Mitchell, D.L. (1991b) Cell survival characteristic and molecular responses of Antarctic phytoplankton to Ultraviolet-B radiation. *J. Phycol.*, 27, 326-341.
- Karentz, D.,** Mceuen, E.S., Land, M.C. y Dunlap, W.C. (1991a) Survey of mycosporine-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. *Marine Biology*, 108, 157-166.

- Karentz**, D.; Bothwell, M.L.; Coffin R.B.; Hanson, A; Herndl, G. J.; Kilham, S. S.; Lesser, M. P.; Lindel M.; Moeller, R. E.; Morris, D. P.; Neale P. J.; Sanders, R. W.; Weiler, C. S. y R.G. Wetzel (1994) Impact of UV-B radiation on pelagic freshwater ecosystems: report of working group on bacteria and phytoplankton. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol., A3,31-69.
- Karl**, T.R. y Trenberth, K.E. (2003) Modern Global Climate change. Science, 302, 1719-1723.
- Kessler**, K. (2004) Distribution of *Daphnia* in a trade-off between food and temperature: individual habitat choice and time allocation. Freshwater Biology, 49, 1220-1229.
- Kessler**, K. y Lampert, W. (2004) Depth distribution of *Daphnia* in response to a deep-water algal maximum: the effect of body size and temperature gradient. Freshwater Biology, 49, 392–401.
- Krebs**, C. J. (2001) Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance. Benjamin Cummings, Adison Wesley Longman, Inc., San Francisco.
- Krinsky**, N. I. (1993) Actions of Carotenoids in Biological systems. Ann. Rev. Nutr., 13, 561-587.
- LaBerge**, S. y Hann, B. J. (1990) Acute temperature and oxygen stress among genotypes of *Daphnia pulex* and *Simocephalus vetulus* (Cladocera, Daphniidae) in relation to environmental conditions. Canadian Journal of Zoology. Vol. 68(11): 2257-2263
- Labraga**, J.C. y Villalba, R. (2009) Climate in the Monte Desert: Past trends, present conditions, and future projections. Journal of Arid Environments, 73 154–163.
- Lampert**, W. y Sommer, U. (2007) Limnoecology. The ecology of lakes and Streams. Oxford Univ. Pr. 336p.
- Laspoumaderes**, C., Modenutti, B. y Balseiro, E. (2010) Herbivory versus omnivory: linking homeostasis and elemental imbalance in copepod development. Journal of Plankton Research, 32, 1573–1582.
- Le Houérou**, H.N. (1996) Climate change, drought and desertification. Journal of Arid Environments, 34, 133–185.
- Leech**, D. M. y Johnsen S. (2003) Behavioral responses - UVR avoidance and vision, p. 455-484. En Helbling, W. y H. Zagarese [eds.], UV effects in aquatic organisms and ecosystems. Comprehensive Series in Photochemistry and Photobiology. Royal Society of Chemistry.
- Leech**, D.M. y Williamson, C.E. (2000) Is Tolerance to UV radiation in Zooplankton related to Body size, taxon or lake transparency? Ecological Application, 10, 1530-1540.
- Leech**, D.M., Boeing, W.J., Cooke, S.L., Williamson, C.E. y Torres, L. (2009) UV-enhanced fish predation and the differential migration of zooplankton in response to UV radiation and fish. Limnology & Oceanography, 54, 1152–1161.

- Leech**, D.M., Padeletti, A. y Williamson, C.E. (2005b) Zooplankton behavioral responses to solar UV radiation vary within and among lakes. *Journal of Plankton Research*, 27, 461-471.
- Leech**, D.M., Williamson, C.E., Moeller, R.E. y Hargreaves, B.R. (2005a) Effects of ultraviolet radiation on the seasonal vertical distribution of zooplankton: a database analysis. *Arch. Hydrobiol.*, 162, 445-464.
- Leibold**, M.A. (1990) Resources and predators can affect the vertical distributions of zooplankton. *Limnology & Oceanography*, 35, 938-944.
- Lesser**, M.P. y Farrell, J.H. (2004) Exposure to solar radiation increases damage to both host tissues and algal symbionts of corals during thermal stress. *Coral Reefs*, 23, 367-377.
- Lesser**, M.P. y Shick, J.M. (1989) Effects of irradiance and ultraviolet radiation on photoadaptation in the zooxanthellae of *Aiptasia pallida*: primary production, photoinhibition, and enzymic defenses against oxygen toxicity. *Marine Biology*, 102, 243-255.
- Libkind**, D., Pérez, P., Sommaruga, R., Diéguez, M.C., Ferraro, M.A., Brizzio, S., Zagarese, H.E. y Van Broeck, M. (2004) Constitutive and UV-inducible synthesis of photoprotective compounds (carotenoids and mycosporines) by freshwater yeasts. *Photochemical y Photobiological Sciences*, 3, 281-286.
- Lima**, F.P., P.A. Ribeiro, N. Queiroz, S.J. Hawkins, and A.M. Santos (2007) Do distributional shifts of northern and southern species of algae match the warming pattern? *Global Change Biology*, 13: 2592-2604.
- Locascio De Mitrovich**, C. y Menu-Marque, S. (1997) Redescription and distribution of *Boeckella gibbosa* (Brehm, 1935) (Copepoda, Calanoida, Centropagidae). *Hydrobiologia*, 354, 157-163.
- Löffler**, H. (1963) Zur Ostracoden- und Copepodenfauna Ekuadors. *Archiv für Hydrobiologie*, 59, 196-234.
- Lohr**, M.; Im, C.-S. y Grossman, A.R. (2005) Genome-Based Examination of Chlorophyll and Carotenoid Biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 138, 490-515.
- Lotocka**, M. y Styczyńska-Jurewicz, E. (2001) Astaxanthin, canthaxanthin and astaxanthin esters in the copepod *Acartia bifilosa* (Copepoda, Calanoida) during ontogenetic development. *Oceanologia*, 43 487-497.
- Lotocka**, M.; Styczynska-Jurewicz, E. y Bledzki, L.A. (2004) Changes in carotenoid composition in different developmental stages of copepods: *Pseudocalanus acuspes* Giesbrecht and *Acartia* spp. *Journal of Plankton Research*, 26, 159-166.
- Macfadyen**, E.J., Williamson, C.E., Grad, G., Lowery, M., Jeffrey, W.H. y Mitchel, D.L. (2004) Molecular response to climate change: temperature dependence of UV-induced DNA damage and repair in the freshwater crustacean *Daphnia pulex*. *Global Change Biology*, 10, 408-416.

- Madronich, S., Mckenzie, R.L., Bjorn, L.O. y Caldwell, M.M. (1998)** Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 46, 5-19.
- Malloy, K.D., Holman, M.A., Mitchell, D. y Detrich iii, H.W. (1997)** Solar UVB-induced DNA damage and photoenzymatic DNA repair in antarctic zooplankton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 1258–1263.
- Maoka, T. (2011)** Carotenoids in Marine Animals. *Marine Drugs*, 9, 278-293.
- Marinone, M.C., Menu-Marque, S., Añón Suárez, D., Diéguez, M.C., Pérez, P., De Los Ríos, P., Soto, D. y Zagarese, H.E. (2006)** Symposium-in-Print: UV Effects on Aquatic and Coastal Ecosystems UV Radiation as a Potential Driving Force for Zooplankton Community Structure in Patagonian Lakes. *Photochemistry and Photobiology*, 82, 962–971.
- Mason, D.S., Schafer, F., Shick, J.M. y Dunlap, W.C. (1998)** Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids (MAAs) are acquired from their diet by medaka fish (*Oryzias latipes*) but not by SKH-1 hairless mice. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 120 587–598.
- Mckenzie, R.L., Aucamp, P.J., Bais, A.F., Björn, L.O. y Ilyas, M. (2007)** Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochemical y Photobiological Sciences*, 6, 218–231.
- Mckenzie, R.L., Aucamp, P.J., Bais, A.F., Björn, L.O., Ilyas, M. y Madronich, S. (2011)** Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 10, 182-198.
- Mckenzie, R.L., Björn, L.O., Bais, A. y Ilyasd, M. (2003)** Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochemical y Photobiological Sciences*, 2, 5–15.
- Mclaren, I.A. (1965)** Some relationships between temperature and egg size, body size, development rate, and Fecundity, of the copepod *Pseudocalanus*. *Limnology & Oceanography*, 10, 528-538.
- Mclaren, I.A., Corkett, C.J. y Zillioux, E.J. (1969)** Temperature adaptations of copepod eggs from the arctic to the tropics. *Biol. Bull.*, 137, 486-493.
- Menu-Marque, S., Morrone, J.J. y De Mitrovich, C.L. (2000)** Distributional patterns of the south american species of *Boeckella* (Copepoda: Centropagidae): a track analysis. *Journal of Crustacean Biology*, 20, 262–272.
- Michalek-Wagner, K. (2001)** Seasonal and sex-specific variation in levels of photo-protecting mycosporine-like amino acids (MAAs) in soft coral. *Marine Biology*, 139, 651-660.
- Mitchell, D. L. y R.S. Nairn (1989)** The biology of the (6-4) photoproduct, *Photochem. Photobiol.*, 49,805-819.
- Modenutti, B. E. (1993)** Summer population of *Hexarthra bulgarica* in a high elevation lake of south Andes. *Hydrobiologia*, 259, 33-31.

- Moeller**, R.E., Gilroy, S., Williamson, C.E., Grad, G. y Sommaruga, R. (2005) Dietary acquisition of photoprotective compounds (mycosporine-like amino acids, carotenoids) and acclimation to ultraviolet radiation in a freshwater copepod. *Limnology & Oceanography*, 50, 427-439.
- Molina**, M.J., Tso, T.-L., Molina, L.T. y Wang, F. C.-Y. (1987) Antarctic Stratospheric Chemistry of Chlorine Nitrate, Hydrogen Chloride, and Ice: Release of Active Chlorine. *Science*, 238, 1253-1257.
- Moore**, M.V., Folt, C.L. y Stemberger, R.S. (1996) Consequences of elevated temperatures for zooplankton assemblages in temperate lakes. *Archiv fur Hydrobiologie. Stuttgart*, 135, 289-319.
- Morris**, D.P., Zagarese, H.E., Williamson, C.E., Balseiro, E.G., Hargreaves, B.R., Modenutti, B., Moeller, R. y Queimaliños, C.P. (1995) The Attenuation of solar radiation in Lakes and the role of Dissolved Organic Carbon. *Limnology & Oceanography* 40, 1381-1391.
- Muskó**, I. B. (1988) Ultrastructural studies on the alimentary tract of *Eudiaptomus gracilis* (Copepoda, Calanoida). *Zool. Anz.*, 220, 152-162.
- Nagasawa**, S. (1988) Copepod-bacteria associations in Zielony Lake, Poland. *J. Plankton Res.*, 10, 551-554.
- Nagasawa**, S. y Nemoto, T. (1988) Presence of bacteria in guts of marine crustaceans and on their fecal pellets. *J. Plankton Res.*, 10, 559-564.
- Newman**, M. C. (1995) Quantitative methods in aquatic ecotoxicology. Lewis Publishers. 426 p.
- Newman**, S. J., Dunlap, W.C., Nicol, S. y Ritz, D. (2000) Antarctic krill (*Euphausia superba*) acquire a UV-absorbing mycosporine-like amino acid from dietary algae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 255 93-110.
- Obertegger**, U., Flaim, G. y Sommaruga, R. (2008) Multifactorial nature of rotifer water layer preferences in an oligotrophic lake. *Journal of Plankton Research*, 30, 633-643.
- Orbe-Rogel**, J. C.; Quintero-Gutierrez, A. G.; Lara-Flores, M.; Del Villar-Martínez, A. A.; Vanegas-Espinoza, P. E. y Pérez-Escalante, V. (2010) Efecto de carotenoides de *Cempaxúchil* (*Tagetes erecta*) en la pigmentación de la piel de *Carassius auratus*. V Congreso del Noroeste y I Congreso Nacional en Ciencias Alimentarias y Biotecnología. Hermosillo, Sonora, México del 11-13 de noviembre de 2010.
- Orce**, V.L. y Helbling, E.W. (1997) Latitudinal UVR-PAR measurements in Argentina: extent of the 'ozone hole'. *Global and Planetary Change*, 15, 113-121.
- Oren**, A. y Gunde-Cimerman, N. (2007) Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? *FEMS Microbiol*, 269, 1-10.

- Pace**, M.L., Cole, J.J., Carpenter, S.R., Kitchell, J.F., Hodgson, J.R., Van De Bogert, M.C., Bade, D.L., Kritzberg, E.S. y Bastviken, D. (2004) Whole-lake carbon-13 additions reveal terrestrial support of aquatic food webs. *Nature*, 427.
- Parnesan**, C. (2006) Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 37, 637–669.
- Parnesan**, C. y Yohe, G. (2003) A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*, 421, 37-42.
- Parnesan**, C., Gaines, S., Gonzalez, L., Kaufman, D.M., Kingsolver, J., Peterson, A.T. y Sagarin, R. (2005) Empirical perspectives on species borders: from traditional biogeography to global change. *Oikos*, 108, 58- 75.
- Paruelo**, J.M., Beltran, A., Jobbagy, E., Sala, O.E. y Golluscio, R.A. (1998) The Climate of Patagonia: general patterns and control on biotic processes. *Ecologia Austral*, 8, 85-101.
- Pérez Gálvez**, A. y Garrido Fernández, J. (1997) Termodegradación de carotenoides en el pimentón. *Grasas y Aceites*, 48, 290-296.
- Pérez**, A. P. (2007) Efectos directos e indirectos de la radiación ultravioleta en consumidores primarios de ambientes acuáticos patagónicos. Tesis Doctoral, CRUB-UNComa. San Carlos de Bariloche, Argentina, 134pp.
- Pérez**, A. P.; García, P. E.; Dieguéz, M. C.; Ferraro, M. A. y H. E. Zagarese. (2008) Acumulación de compuestos fotoprotectores en copépodos: rol de la flora endosimbiente. IV Congreso Argentino de Limnología. Bariloche. Rio Negro. Argentina.
- Pérez**, A.P., Libkind, D., Diéguez, M.C., Summerer, M., Sonntag, B., Sommaruga, R., Van Broock, M. y Zagarese, H.E. (2006) Mycosporines from freshwater yeasts: a trophic cul-de-sac? *Photochemical y Photobiological Sciences*, 5, 25-30.
- Pérez**, G. L.; Torremorell, A.; Bustingorry, J.; Escaray, R., Pérez, P.; Dieguéz, M. y Zagarese, H. E. (2010) Optical characteristics of shallow lakes from the Pampa and Patagonia region of Argentina. *Limnologica* 40, 30-39.
- Pérez**, G.L., Queimaliños, C.P. y Modenutti, B.E. (2002) Light Climate and plankton in the deep chlorophyll maxima in North Patagonian Andean lakes. *Journal of Plankton Research*, 24, 591-599.
- Pérez**, P.A., Diaz, M.M., Ferraro, M.A., Cusminsky, G.C. y Zagarese, H.E. (2003) Replicated mesocosm study on the role of natural ultraviolet radiation in high CDOM, shallow lakes. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2, 118–123.
- Perotti**, M.G., Diéguez, M.C. y Jara, F.G. (2005) Estado del conocimiento de humedales del norte patagónico (Argentina): aspectos relevantes e importancia para la conservación de la biodiversidad regional. *Revista Chilena de Historia Natural*, 78, 723-737.

-
- Perry, A.L., P.J. Low, J.R. Ellis, and J.D. Reynolds (2005)** Climate change and distribution shifts in marine fishes. *Science* 308, 1912.
- Persaud, A.D. y Williamson, C.E. (2005)** Ultraviolet and temperature effects on planktonic rotifers and crustaceans in northern temperate lakes.
- Persaud, A.D., Moeller, R.E., Williamson, C.E. y Burns, C.W. (2007)** Photoprotective compounds in weakly and strongly pigmented copepods and co-occurring cladocerans. *Freshwater Biology*, 52, 2121-2133.
- Peter, H. y Sommaruga, R. (2008)** An evaluation of methods to study the gut bacterial community composition of freshwater zooplankton. *Journal of Plankton Research*, 30, 997–1006.
- Plante, C. J., Jumars, P. A. y Baross, J. A. (1989)** Rapid bacterial growth in the hindgut of a marine deposit feeder. *Microb. Ecol.*, 18, 29–44.
- Rae, R. y Vincent, W.F. (1998)** Effects of temperature and ultraviolet radiation on microbial foodwebs structure: potential responses to global changes. *Freshwater Biology*, 40, 747-758.
- Rautio, M. y Korhola, A. (2002)** UV-induced pigmentation in subarctic *Daphnia*. *Limnology & Oceanography*, 47, 295–299.
- Rautio, M. y Tartarotti, B. (2010)** UV radiation and freshwater zooplankton: damage, protection and recovery. *Freshwater Reviews*, 3, 105-131.
- Rautio, M., Bonilla, S. y Vincent, W.F. (2009)** UV photoprotectants in arctic zooplankton. *Aquatic Biology*, 7, 93–105.
- Rhode, S.C., Pawlowski, M. y Tollrian, R. (2001)** The impact of ultraviolet radiation on the vertical distribution of zooplankton of the genus *Daphnia*. *Nature*, 412, 69-72.
- Rhodes, A. C. E. (2007)** Dietary effects on carotenoid composition in the marine harpacticoid copepod *Nitokra lacustris*. *Journal of Plankton Research*, 29, 73-83.
- Ringelberg, J. (1980)** Aspect of Red pigmentation in zooplankton especially Copepods. En Kerfoot, W. C (Ed.). *Evolution and Ecology of zooplankton communities*. pp 91-98. University Press of New England, Hanover, U.S.A.
- Ringelberg, J. (1981)** On the variation in Carotenoids Contents of Copepods. *Limnology & Oceanography* 26, 995-997.
- Ringelberg, J. y Hallegraeff, G.M. (1976)** Evidence for a diurnal variation in the carotenoid content of *Acanthodiptomus denticornis* (Crustacea, Copepoda) in Lac Pavin (Auvergne, France). *Hydrobiologia*, 5, 113-118.

- Ringelberg, J., Keyser, A.L. y Flik, B.J.G. (1984)** The mortality effect of ultraviolet radiation in a translucent and in a red morph of *Acanthodiptomus denticornis* (Crustacea, Copepoda) and its possible ecological relevance. *Hydrobiologia*, 112, 217-222.
- Rocco, V.E., Opezzo, O., Pizarro, R., Sommaruga, R., Ferraro, M. y Zagarese, H.E. (2002)** Ultraviolet Damage and Counteracting Mechanisms in the Freshwater Copepod *Boeckella poppei* from the Antarctic Peninsula. *Limnology & Oceanography*, 47, 829-836.
- Root, T.L., Price, J.T., Hall, K.R., Schneider, S.H., Rosenzweig, C. y Pounds J.A. (2003)** Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, 421: 57-60.
- Rose, K.C., Williamson, C.E., Saros, J.E., Sommaruga, R. y Fischer, J.M. (2009)** Differences in UV transparency and thermal structure between alpine and subalpine lakes: implications for organisms. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 8, 1244–1256.
- Rusticucci, M. y Barrucand, M. (2004)** Observed Trends and Changes in Temperature Extremes over Argentina. *Journal of climate*, 17, 4099-4107.
- Sancar, A. y Sancar, G.B. (1988)** DNA repair Enzymes. *Ann. Rev. Biochem.*, 57, 29-67.
- Sawada, M. y Enesco, H.E. (1984)** The effect of light, dark or altered Circadian cycle on the lifespan of the Rotifer *Asplanchna brightwelli*. *Experimental Gerontology*, 19 335-343.
- Sawada, M., Carlson, J.C. y Enesco, H.E. (1990)** The effects of UV radiation and antioxidants on life span and lipid peroxidation in the rotifer *Asplanchna brightwelli*. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 10 27-36.
- Schmidt, E.W. (2011)** An Enzymatic Route to Sunscreens. *ChemBioChem*, 12, 363–365.
- Scully, N.M., Tranvik, L.J. y Cooper, W.J. (2003)** Photochemical effects on the interaction of enzymes and dissolved organic matter in natural waters. *Limnology & Oceanography*, 48, 1818–1824.
- Shashar N., Hárosi, F.I., Banaszak, A.T., Hanlon R.T. (1998)** UV radiation blocking compounds in the eye of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Biol. Bull.* 195:187–88
- Shick, J.M. (2004)** The continuity and intensity of ultraviolet irradiation affect the kinetics of biosynthesis, accumulation, and conversion of mycosporine-like amino acids (MAAs) in the coral *Stylophora pistillata*. *Limnology & Oceanography*, 49, 442–458.
- Shick, J.M. y Dunlap, W.C. (2002)** Mycosporine-like amino acids and related Gadusols: Biosynthesis, Accumulation, and UV-Protective Functions in Aquatic Organisms. *Annu. Rev. Physiol.*, 64, 223–262.
- Shick, J.M., Dunlap, W.C., Chalker, B.E., Banaszak, A.T. y Rosenzweig, T.K. (1992)** Survey of ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in organs of coral reef holothuroids. *Marine Ecology Progress Series*, 90, 139-148.
- Shick, J.M., Romaine-Lioud, S., Ferrier-Pagès, C. y Gattuso, J.P. (1999)** Ultraviolet-B radiation stimulates shikimate pathway-dependent accumulation of mycosporine-like amino acids in the coral *Stylophora*

- pistillata* despite decreases in its population of symbiotic dinoflagellates. *Limnol. Oceanogr.*, 44, 1667–1682.
- Siebeck, O. y Bôhm, U.** (1991) UV-B effects on aquatic animals. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 24, 2773-2777.
- Siebeck, O., Vail, T.L., Williamson, C.E., Vetter, R., Hessen, D., Zagarese, H., Little, E., Balseiro, E.G., Modenutti, B., Seva, J. y Shumate, A.** (1994) Impact of UV-B radiation on zooplankton and fish in pelagic freshwater ecosystems. *Arch. Hydrobiol. Beith*, 43, 101-114.
- Sochard, M. R., Wilson, D. F., Austin, B. et al,** (1979) Bacteria associated with the surface and gut of marine copepods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 750–759.
- Solomon, S.** (2004) The hole truth. What's news (and what's not) about the ozone hole. *Nature*, 427, 289-291.
- Solomon, S., Daniel, J.S., Sanford, T.J., Murphy, D.M., Plattner, G.-K., Knutti, R. y Friedlingstein, P.** (2010) Persistence of climate changes due to a range of greenhouse gases. *PNAS*, 107, 18354-18359.
- Solomon, S., Garcia, R.R., Rowland, F.S. y Wuebbles, D.J.** (1986) On the depletion of Antarctic ozone. *Nature*, 312.
- Sommaruga, R.** (2010) Preferential accumulation of carotenoids rather than of mycosporine-like amino acids in copepods from high altitude Himalayan lakes. *Hydrobiologia*, 648, 143–156.
- Sommaruga, R. y Garcia-Pichel, F.** (1999) UV-absorbing mycosporine-like compounds in planktonic and benthic organisms from a high-mountain lake. *Arch. Hydrobiol.*, 144, 255-269.
- Sommaruga, R., Libkind, D., Van Broock, M. y Whitehead, K.** (2004) Mycosporine-glutaminol-glucoside, a UV-absorbing compound of two *Rhodotorula* yeast species. *Yeast*, 21, 1077–1081.
- Souza, M.S., Balseiro, E., Laspoumaderes, C. y Modenutti, B.** (2010) Effect of Ultraviolet Radiation on Acetylcholinesterase Activity in Freshwater Copepods. *Photochemistry and Photobiology*, 86, 367–373.
- Souza, M.S., Modenutti, B.E. y Balseiro, E.G.** (2007) Antioxidant Defences in Planktonic Crustaceans Exposed to Different Underwater Light Irradiances in Andean Lakes. *Water Air Soil Pollut*, 183, 49–57.
- Starcevic, A., Akhtar, S., Dunlap, W.C., Shick, J.M., Hranueli, D., Cullum, J. y Long, P.F.** (2008) Enzymes of the shikimic acid pathway encoded in the genome of a basal metazoan, *Nematostella vectensis*, have microbial origins. *PNAS*, 105, 2533-2537.
- Starcevic, A., Dunlap, W.C., Cullum, J., Shick, J.M., Hranueli, D. y Long, P.F.** (2010) Gene Expression in the Scleractinian *Acropora microphthalma* Exposed to High Solar Irradiance Reveals Elements of Photoprotection and Coral Bleaching. *PLoS ONE*, 5, 1-10.
- Steinberg, C. E. W.** (2003) Ecology of humic substances in freshwaters. Determinants from geochemistry to ecological niches. Springer, Berlin, 440 pp.

-
- Stochaj**, W. R. y Grossman, A. R. (1997) Differences in the protein profiles of cultured and endosymbiotic *Symbiodinium* sp. (Pyrrophyta) from the anemone *Aiptasia pallida* (Anthozoa). *J. Phycol.* 33:44–53.
- Stochaj**, W.R., Dunlap, W.C. y Shick, J.M. (1994) Two new UV-absorbing mycosporine-like amino acids from the sea anemone *Anthopleura elegantissima* and the effects of zooxanthellae and spectral irradiance on chemical composition and content. *Marine Biology*, 118, 149-156.
- Sugumaran**, M. (1991) Molecular mechanisms for mammalian melanogenesis: Comparison with insect cuticular sclerotization, *FEBS Letters*, 295 (1-3): 233-239.
- Suh**, H.-J., Lee, H.-W. y Jung, J. (2003) Mycosporine Glycine Protects Biological Systems Against Photodynamic Damage by Quenching Singlet Oxygen with a High Efficiency. *Photochemistry and Photobiology*, 78, 109–113.
- Sutherland**, B. M. (1981) Photoreactivation. *BioScience* 31: 439–444.
- Swanson**, K.L., Sugihara, G. y Tsonis, A. A. (2009) Long-term natural variability and 20th century climate change. *PNAS*, 1, 16120-16123.
- Takano**, S., Nakanishi, A., Uemura D, y Hirata. Y. (1979) Isolation and structure of a 334 nm UV-absorbing substance Porphyra-334 from the red alga *Porphyra tenera* Kjellman. *Chem. Lett.* 26:419–20.
- Tartarotti**, B. y Sommaruga, R. (2002) The effect of different methanol concentrations and temperatures on the extraction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in algae and zooplankton. *Arch. Hydrobiol.*, 154, 691-703.
- Tartarotti**, B. y Sommaruga, R. (2006) Seasonal and ontogenetic changes of mycosporine-like amino acids in planktonic organisms from an alpine lake. *Limnology & Oceanography*, 51, 1530–1541.
- Tartarotti**, B., Baffico, G., Temporetti, P. y Zagarese, H.E. (2004) Mycosporine-like amino acids in planktonic organisms living under different UV exposure conditions in Patagonian lakes. *Journal of Plankton Research*, 26, 753–762.
- Tartarotti**, B., Cabrera, S., Psenner, R. y Sommaruga, R. (1999) Survivorship of *Cyclops abyssorum taticus* (Cyclopoidea, Copepoda) and *Boeckella gracilipes* (Calanoidea, Copepoda) under ambient levels of solar UVB radiation in two high-mountain lakes. *Journal of Plankton Research*, 21, 549-560.
- Tartarotti**, B., Cravero, W. y Zagarese, H.E. (2000) Biological Weighting Function for the Mortality of *Boeckella gracilipes* (Copepoda, Crustacea) Derived from Experiments with Natural Solar Radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 72, 314–319.
- Tartarotti**, B., Laurion, I. y Sommaruga, R. (2001) Large variability in the concentration of mycosporine-like amino acids among zooplankton from lakes located across an altitude gradient. *Limnology & Oceanography*, 46, 1546–1552.

- Theurillat** J-P., Guisan A. (2001) Potential impact of climate change on vegetation in the European Alps: A review. *Climatic change*, 50, 7-109.
- Thomas**, C.D., Cameron, A., Green, R.E., Bakkenes, M., Beaumont, L.J., Collingham, Y.C., Erasmus, B.F.N., Ferreira De Siqueira, M., Grainger, A., Hannah, L., Hughes, L., Huntley, B., Van Jaarsveld, S.A., Midgley, G.F., Miles, L., Ortega-Huerta, M.A., Peterson, A.T., Phillips, O.L. y Williams, S.E. (2004) Extinction risk from climate change. *Nature*, 427, 145-148.
- Thrush**, B. (1988) Causes of Ozone depletion. *Nature*, 332, 784-785.
- Tirkey**, J. y Adhikary, S. P. (2005) Cyanobacteria in biological soilcrusts of India. *Curr Sci* 89: 515–521.
- Todo**, T., Takemori, H., Ryo, H., Ihara, M., Matsunaga, T., Nikaido, O., Sato, K. y Nomura, T. (1993) A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4) photoproducts. *Nature*, 361, 371-374.
- Trenberth**, K.E., Fasullo, J.T. y Kiehl, J. (2009) Earth's global energy budget. *Bulletin of American Meteorological Society*, 90, 311-323.
- Trochine**, C., Balseiro, E. y Modenutti, B. (2008) Zooplankton of Fishless Ponds of Northern Patagonia: Insights into Predation Effects of *Mesostoma ehrenbergii*. *Internat. Rev. Hydrobiol.*, 93, 312–327.
- Úbeda**, C., Zagarese, H.E., Diaz, M. y Pedrozo, F. (1999) First steps towards the conservation of the microendemic Patagonian frog *Atelognathus nitoi*. *Oryx*, 33, 59–66.
- Van Der Veen**, I.T. (2005) Costly carotenoids: a trade-off between predation and infection risk? *J. Evol. Biol.*, 18, 992–999.
- Van Gool**, E. y Ringelberg, J. (2003) What goes down must come up: symmetry in light-induced migration behaviour of *Daphnia*. *Hydrobiologia*, 491, 301–307.
- Vanderploeg** HA (1990) Feeding mechanisms and particle selection in suspension-feeding zooplankton In: Wotton, R. S (ed) *The biology of particles in aquatic systems*. CRC, Boca Raton, pp 183-211.
- Vernet**, M., Diaz, S.B., Fuenzalida, H.A., Camilion, C., Booth, C.R., Cabrera, S., Casiccia, C., Deferrari, G., Lovengreen, C., Paladini, A., Pedroni, J., Rosalesi, A. y Zagarese, H.E. (2009) Quality of UVR exposure for different biological systems along a latitudinal gradient. *Photochemical y Photobiological Sciences*, 8, 1329–1345.
- Villafañe**, V.E., Helbling, E.W. y Zagarese, H.E. (2001) Solar Ultraviolet Radiation and Its Impact on Aquatic Systems of Patagonia, South America. *Ambio*, 30, 112-117.
- Vinebrooke**, R.D. y Leavitt, P.R. (1998) Direct and interactive effects of allochthonous dissolved organic matter, inorganic nutrients, and ultraviolet radiation on an alpine littoral food web. *Limnology & Oceanography*, 43, 1065-1081.

- Wetzel**, R. (2001) *Limnology Lake and River Ecosystems*. Academic Press, London. 1006 pp.
- Wetzel**, R. (2003) Solar Radiation as an Ecosystem Modulator, p. 3-18. En Helbling, W. y H. Zagarese [eds.], *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. Comprehensive Series in Photochemistry and Photobiology. Royal Society of Chemistry.
- Williamson**, C. E. y Zagarese, H. E. (2003) UVR effects on aquatic ecosystems: a changing climate perspective, p. 547-568. En Helbling, W. y H. Zagarese [eds.], *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. Comprehensive Series in Photochemistry and Photobiology. Royal Society of Chemistry.
- Williamson**, C.E. (1995) What Role Does UV-B Radiation Play in Freshwater Ecosystems? *Limnology & Oceanography*, 40, 386-392.
- Williamson**, C.E. y Rose, K.C. (2010) When UV Meets Fresh Water. *Science*, 329, 637-639.
- Williamson**, C.E., Grad, G., De Lange, H.J., Gilroy, S. y Karapelou, D.M. (2002) Temperature-dependent ultraviolet responses in zooplankton: Implications of climate change. *Limnology & Oceanography*, 47, 1844–1848.
- Williamson**, C.E., Neale, P.J., Grad, G., De Lange, H.J. y Hargreaves, B.R. (2001) Beneficial and detrimental effects of UV on aquatic organisms: implications of spectral variation. *Ecological Applications*, 11, 1843-1857.
- Williamson**, C.E., Salm, C., Cooke, S.L. y Saros, J.E. (2010) How do UV radiation, temperature, and zooplankton influence the dynamics of alpine phytoplankton communities? *Hydrobiologia*, 648, 73–81
- Williamson**, C.E., Sanders, R.W., Moeller, R.E. y Stutzman, P.L. (1996) Utilization of Subsurface Food Resources for Zooplankton Reproduction: Implications for Diel Vertical Migration Theory. *Limnology & Oceanography*, 41, 224-233.
- Williamson**, C.E., Zagarese, H.E., Schulze, P.C., Hargreaves, B.R. y Seva, J. (1994) The impact of short-term exposure to UV-B radiation on zooplankton communities in north temperate lakes. *Journal of Plankton Research*, 16, 205-218.
- Wilson**, S.R., Solomon, K.R. y Tang, X. (2007) Changes in tropospheric composition and air quality due to stratospheric ozone depletion and climate change. *Photochemical y Photobiological Sciences*, 6, 301–310.
- Wong**, J.C.Y. y Williams, D.D. (2010) Sources and seasonal patterns of dissolved organic matter (DOM) in the hyporheic zone. *Hydrobiologia*, 647, 99-111.
- Wright**, D.J., Smith, S.C., Joardar, V., Scherer, S., Jervis, J., Warren, A., Helm, R. F., y Potts, M. (2005) UV irradiation and desiccation modulate the three-dimensional extracellular matrix of *Nostoc commune* (cyanobacteria). *J Biol Chem* 280: 40271–40281.

-
- Yakovleva**, I.M. y Baird, A.H. (2005) Ontogenetic change in the abundance of mycosporine-like amino acids in non-zooxanthellate coral larvae. *Coral Reef*, 24, 443–452.
- Zagarese**, H. E. y Williamson, C. E. (1994) Modeling the impacts of UV-B radiation on ecological interactions in freshwater and marine ecosystems. In Biggs, R.H. and Joyner, M.B.E. (eds), *Stratospheric Ozone Depletion/UV-B Radiation in the Biosphere*. Springer-Verlag, New York.
- Zagarese**, H. E. y Williamson, C.E. (2000) Impact of solar UV radiation on zooplankton and fish. In: de Mora, S.; Demers, S.; y Vernet, M. (Eds). *The Effects of UV Radiation in the Marine Environment* (pp. 279-309). Cambridge University Press, Cambridge.
- Zagarese**, H. E., Feldman, M. y Williamson, C.E. (1997a) UV-B-induced damage and photoreactivation in three species of *Boeckella* (Copepoda: Calanoida). *Journal of Plankton Research*, 19, 357-367.
- Zagarese**, H. E., Williamson, C.E., Vail, T.L., Olsen, O. y Queimaliños, C.P. (1997b) Long term exposure of *Boeckella gibbosa* (Copepoda, Calanoida) to in situ levels of solar UV-B radiation. *Freshwater Biology*, 37, 99-106.
- Zagarese**, H.E., Cravero, W., Gonzalez, P. y Pedrozo, F. (1998a) Copepod mortality induced by fluctuating levels of natural ultraviolet radiation simulating vertical water mixing. *Limnology & Oceanography*, 43, 169-174.
- Zagarese**, H.E., Diaz, M., Pedrozo, F., Ferraro, M., Cravero, W. y Tartarotti, B. (2001) Photodegradation of natural organic matter exposed to fluctuating levels of solar radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 61, 35–45.
- Zagarese**, H.E., Diaz, M., Pedrozo, F. y Úbeda, C. (1999) Mountain Lakes in northwestern Patagonia. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 27, 533-538.
- Zagarese**, H.E., Tartarotti, B., Cravero, W. y Gonzalez, P. (1998b) UV damage in shallow lakes: the implications of water mixing. *Journal of Plankton Research*, 20, 1423-1433.
- Zar**, J. (1999) *Biostatistical analysis*, 4ta edición. Prentice Hall, Inc.
- Zepp**, R.G., Erickson, D.J., Paul, N.D. y Sulzberger, B. (2007) Interactive effects of solar UV radiation and climate change on biogeochemical cycling. *Photochemical y Photobiological Sciences*, 6, 286–300.
- Zepp**, R.G., Erickson, D.J., Paul, N.D. y Sulzberger, B. (2011) Effects of solar UV radiation and climate change on biogeochemical cycling: interactions and feedbacks. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 10, 261–279.

Publicaciones

Los resultados de esta tesis fueron parcialmente publicados en los siguientes trabajos:

-**García, P. E.**; Pérez, A. P.; Diéguez, M. C.; Ferraro, M. A. y H. E. Zagarese. **2008**. Dual control of the levels of photoprotective compounds by ultraviolet radiation and temperature in the freshwater copepod *Boeckella antiqua*. *Journal of Plankton Research* 30 (7): 817-827. (***Trabajo de respaldo***).

-**García, P. E.**; Diéguez, M. C.; Ferraro, M. A.; Zagarese, H. E. y Pérez, A. P. **2010**. Mycosporine-like amino acids in freshwater copepods: potential sources and some factors that affect their bioaccumulation. *Photochemistry and Photobiology* 86(2):353-359.

Dual control of the levels of photoprotective compounds by ultraviolet radiation and temperature in the freshwater copepod *Boeckella antiqua*

PATRICIA ELIZABETH GARCÍA¹, ALEJANDRA PATRICIA PÉREZ¹, MARÍA DEL CARMEN DIÉGUEZ^{1*}, MARCELA ANDREA FERRARO² AND HORACIO ERNESTO ZAGARESE²

¹LABORATORIO DE FOTOBIOLOGÍA, CENTRO REGIONAL UNIVERSITARIO BARILOCHE, UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE, QUINTRAL 1250, (8400) SAN CARLOS DE BARILOCHE, RÍO NEGRO, ARGENTINA AND ²LABORATORIO DE ECOLOGÍA Y FOTOBIOLOGÍA ACUÁTICA, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOTECNOLÓGICAS, INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CHASCOMÚS (IB-INTECH), CC 164 (B7130IWA) CHASCOMÚS, BUENOS AIRES, ARGENTINA

*CORRESPONDING AUTHOR: dieguezmc@gmail.com

Received January 18, 2008; accepted in principle March 7, 2008; accepted for publication March 17, 2008; published online March 27, 2008

Corresponding editor: John Dolan

Photoprotective compounds (PPCs), such as carotenoids and mycosporine-like amino acids (MAAs), confer photoprotection to aquatic organisms against harmful ultraviolet-B (UVB) radiation. The natural variability of these compounds in zooplankton has been related to temperature, radiation and diet, but the ultimate mechanisms regulating the observed patterns in the field are still unclear. In this study, we analysed the variability of carotenoids and MAAs in a population of the calanoid copepod Boeckella antiqua in a shallow pond located in Northern Patagonia (Argentina). During our field survey, carotenoids and MAAs in B. antiqua varied without a clear seasonal pattern. Nevertheless, both groups of PPCs reached their maxima during spring and minima during summer. Inverse relationships were found between carotenoid concentrations versus temperature and irradiance. For MAAs, the same relationships were not significant. Tolerance experiments showed that mortality of B. antiqua was significantly influenced both by temperature and UVB dose, being more vulnerable at high temperature. We further investigated the effect of radiation regime and temperature on the bioaccumulation of PPCs in controlled laboratory experiments. We found that the concentrations of PPCs could be experimentally modified by manipulating radiation exposure and temperature. In addition, by breaking down the bioaccumulation processes into uptake and elimination, we were able to show that (i) the uptake rate was stimulated by photosynthetically active radiation (PAR)+UVA exposure and (ii) both uptake and elimination rates increased with temperature. Thus, the net accumulation (i.e. the balance between uptake and elimination), which ultimately dictates the concentration observed in an animal, could be either positive or negative depending on the specific combination of radiation exposure and temperature. The dual regulation of PPCs by radiation exposure and temperature should be considered in future efforts to reconstruct or predict the photoprotective responses of aquatic organisms to the past or future climate scenarios.

INTRODUCTION

Photoprotective compounds (PPCs) are ubiquitous chemicals in aquatic organisms. On an evolutionary time scale, the acquisition of PPCs is regarded as a

precondition for the colonization of ultraviolet (UV) exposed habitats (Cockell and Blaustein, 2001). On the basis of the premise that PPCs are produced in response to UV radiation, several authors have attempted

reconstructions of recent (past 10^3 years) UV radiation environments from analyses of fossil PPCs in sediment cores (Leavitt *et al.*, 1997). However, at shorter time scales, the mechanism capable of explaining the natural variation of PPCs concentration in planktonic animals has remained elusive for nearly a century.

It has long been known that carotenoid compounds contribute to enhance the survival of copepods experimentally exposed to high irradiances (Hairston, 1976; 1979a). Although carotenoid pigments have the potential of screening out blue light (Hairston, 1976), they are better known for their function as antioxidants that provide protection against detrimental photoproducts (Edge *et al.*, 1997). More recently, another family of compounds, the so-called mycosporine-like amino acids (MAAs), has been proposed to confer photoprotection for aquatic organisms against harmful UVB radiation (Carreto *et al.*, 1990; Karentz *et al.*, 1991; Shick and Dunlap, 2002). MAAs seem well suited for a sunscreen function due to their high molar extinction coefficients and their absorbance spectra peaking within the UVB and lower UVA regions (308–360 nm) (Shick and Dunlap, 2002). The photoprotective function of MAAs in several freshwater organisms can be inferred from correlations between MAAs content and geographical as well as depth-related UV exposure, UV-stimulated production in algae and dietary and/or symbiosis-mediated accumulation in several species of aquatic organisms (Moeller *et al.*, 2005; Persaud *et al.*, 2007; Sonntag *et al.*, 2007). There is also empirical evidence supporting the fact that higher MAAs concentration enhances survivorship following UV exposure in copepods (Helbling *et al.*, 2002; Moeller *et al.*, 2005).

Despite the fact that higher PPCs concentrations enhance the survival of zooplankton exposed to high irradiances, field studies often show maximum PPCs concentrations in winter, lack of significant relationships with irradiance, and strong inverse relationships with temperature (Hairston, 1979b; Byron, 1982).

In order to reconcile the observations on the photoprotective role of carotenoids inferred from laboratory experiments with the seemingly contradictory evidence from field studies, Hairston (Hairston, 1979b) suggested that “if the copepod pigment were less effective at low temperature than at high, it would stand to reason that more pigment might be needed in winter than in summer”. Following a similar rationale, Rocco *et al.* (Rocco *et al.*, 2002) suggested that the accumulation of PPCs could be triggered by low temperatures as a compensatory mechanism to counterbalance for the lower efficiency of enzymatic defenses against radiation injury (e.g. photo-repair, nucleotide excision repair, etc.). The rationale behind these arguments may be summarized as

follows: the concentrations of PPCs should track the variations in UV exposure; but when they do not, it might be because the organisms accumulate more PPCs at lower temperature to compensate for the lower efficiency of PPCs and/or enzymatic repair at lower temperatures.

Interestingly, the logical extension of the above arguments should be that the copepods must be less tolerant to UV exposure at low temperature than at high. In fact, it has been proposed that climate warming may alleviate the adverse biological impacts of UVB by enhancing photoprotective processes (Vinebrooke and Leavitt, 2005). However, the evidence supporting a positive relationship between UV tolerance and temperature is inconclusive (Williamson and Zagarese, 2003). Although in some cases UV tolerance does indeed increase at higher temperatures (Roos and Vincent, 1998; Pakker *et al.*, 2000), in other cases UV tolerance shows either little change with temperature (Rae and Vincent, 1998), or even decreases at higher temperatures (Hairston, 1979b; Borgeraas and Hessen, 2000; Mac Fadyen *et al.*, 2004).

Here, we present an account of our investigations of the factors controlling the concentration of PPCs in the calanoid copepod *Boeckella antiqua*. Our study was conducted at several levels with different particular objectives. First, we present the results of a field survey aimed at describing the seasonal pattern of PPCs (carotenoid and MAAs) concentration in a population of *B. antiqua* from a small, shallow lake, Laguna Los Juncos. Second, we report the results of a series of laboratory assays designed to evaluate the temperature dependence of *B. antiqua*'s susceptibility to UVB radiation. Third, we describe the results of bioaccumulation experiments intended to investigate the factors that control the concentration of PPCs in this calanoid copepod. Finally, we propose an alternative interpretation of PPCs patterns in freshwater zooplankton based on a kinetics model of PPCs uptake and elimination.

METHOD

Study area and sampling description

The field study was carried out in Lake Los Juncos, a small (2 ha) and shallow (ca. 1.2 m) system, located at 41°03'38"S, 71°00'38"W in Northwestern Patagonia (Río Negro Province, Argentina). This lake was chosen for the study because it meets several conditions that were expected to facilitate the interpretation of PPCs dynamics: it is shallow and well mixed due to exposure to winds, which prevents copepods from avoiding exposure to solar radiation; and it lacks visual predators (e.g. fish), which could otherwise inhibit the accumulation of carotenoids (Hansson, 2000, 2004). In addition,

a previous study showed that *B. antiqua* from Lake Los Juncos had relatively high MAAs levels (Pérez *et al.*, 2006) when compared with other *Boeckella* species (Tartarotti *et al.*, 2004).

The lake was visited on 24 occasions, from June 2002 to October 2003. On each sampling date, pH, conductivity, dissolved oxygen and temperature were measured, and water samples were collected using a van Dorn bottle for chlorophyll *a*, total solids (TS), and absorbance of dissolved fraction. Zooplanktons were collected by horizontal tows with a 45 µm mesh net. The dominant calanoid in Lake Los Juncos is *B. antiqua*. This copepod was selected as model organism for our study because it was found to be the only copepod species present throughout the year, and it can be maintained for several months in laboratory cultures for experimentation (Zagarese *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 2006). In addition, this copepod has moderate to high levels of carotenoids and MAAs and the accumulation of both compounds can be experimentally induced upon exposure with UVA (Pérez *et al.*, 2006).

Collections of *B. antiqua* for the analysis of PPCs were made on 18 occasions during the study period. In the laboratory, 150 adult copepods were sorted in three Eppendorf vials and kept at -20°C. Each batch was subsequently analysed for MAAs, carotenoids and dry weight.

Diffuse attenuation coefficients (k_d) were calculated using the optical density at 320 and 440 nm of filtered (GF/F, Whatman®) water samples using the equations of Morris *et al.* (Morris *et al.*, 1995). The incident solar radiation was measured continuously using a GUV-511 radiometer (Biospherical Instruments, Inc.) located at a nearby site. The measurements were integrated over time for UV and PAR wavelengths and averaged to obtain mean daily fluences. Mean downwelling fluences (H_λ) for the water column were calculated following Ferrero *et al.* (Ferrero *et al.*, 2006) as follows:

$$H_{\text{mean}(320)} = \frac{H_{0(320)}(1 - \exp(-K_{d320} \times z))}{K_{d320} \times z}$$

where $H_{0(320)}$ is the average daily fluence (320 nm) for the period between the corresponding and the previous sampling date, k_{d320} the diffuse attenuation coefficient for 320 nm and z the maximum water depth.

Laboratory experiments

Two different experimental setups were designed to analyse (i) the effect of temperature on UVB tolerance and (ii) the bioaccumulation of MAAs and carotenoids.

These two groups of experiments were repeated with minor modifications in different years (2004 and 2006). In the 2004 experiments, we tested the tolerance to UVB and the bioaccumulation of PPCs at two different temperatures (10°C and 18°C). In the 2006 experiments, we extended the temperature range and added intermediate temperatures. In these experiments, both the tolerance to UVB and bioaccumulation of PPCs were assessed at 5°C, 8°C, 12°C, 16°C and 20°C. Collectively, the whole series of experiments virtually covered all the ecophysiological temperature range of the species.

UVB tolerance experiments

In the 2004 experiments, adult copepods were exposed to different UVB doses at two temperatures (10°C and 18°C). *B. antiqua* females were collected from laguna Los Juncos within <24 h before the beginning of the experiments. The copepods were placed in Petri dishes (diameter: 6 cm, height: 3 cm) filled with filtered (45 µm) water plus additions of 3×10^3 cells ml⁻¹ of *Chlamydomonas reinhardtii*. A total of 720 individuals were sorted in 72 experimental units of 10 individuals each. Thirty-six experimental units were incubated at 10°C and the remaining 36 units at 18°C. For each temperature, three UVB levels were assayed: 0, 194 and 324 J m⁻². The different dosages were attained by wrapping the dishes in aluminum foil (controls), or covering the dishes below the UVB lamp with quartz lids and neutral density filters. After exposure to UVB, the copepods were maintained for two additional days at a constant temperature, under a 14:10 h PAR: dark photoperiod. The number of dead individuals was counted at the end of the post-exposure incubation period.

In the 2006 experiments, the copepods were exposed to four different UVB doses (0, 61, 194 and 324 J m⁻²) using neutral density filters or wrapping the dishes with aluminum foil (controls). These experiments were run at five temperatures (5, 8, 12, 16, 20°C). A total of 1600 adults were sorted into 160 experimental units of 10 individuals each, placed in Petri dishes under identical culture conditions as explained above. Thirty-two experimental units were assayed at each temperature. The animals were exposed for 2 consecutive days to the following radiation exposure sequence: 4 h dark, 6 h UVB+PAR, 8 h PAR+6 h dark. For these experiments, the number of dead individuals was counted immediately after the exposure to UVB.

In all these experiments, UVB radiation was provided by a Spectroline XX15-B fluorescent lamp (Spectronics Corp.). In addition, all treatments received 65 W m⁻² of visible radiation (PAR, 400–750 nm) provided by two daylight TLT 40W/54RS fluorescent tubes

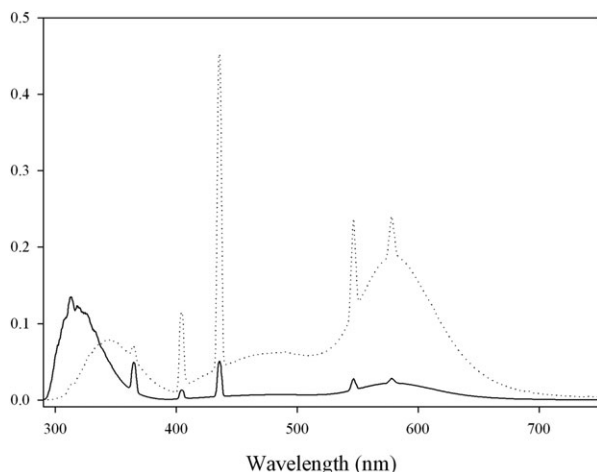


Fig. 1. Radiation conditions in the UVB tolerance and bioaccumulation experiments performed in 2004 and 2006 with *B. antiqua*.

(Philips), in order to provide favorable conditions for photoreactivation (Fig. 1). In all cases, mortality proportions were adjusted by the Abbott formula (Newman, 1995) to account for the differences in control mortality between temperatures.

Bioaccumulation experiments

The bioaccumulation of MAAs and carotenoids in *B. antiqua* was studied in longer-term incubations. In the 2004 experiments, batch cultures of 150 *B. antiqua* individuals were incubated for 10 days at two temperatures (10°C and 18°C), and either exposed to PAR+UVA or maintained in the dark. Each of these four treatments (two temperatures \times 2 radiation conditions) was run on six replicates. In the 2006 experiments, batches of 200 *B. antiqua* individuals were incubated for 10 days at five temperatures (5°C, 8°C, 12°C, 16°C and 20°C) and either exposed to PAR+UVA or maintained in the dark. Each of these 10 treatments (five temperatures \times two radiation conditions) was run on three replicates.

The *B. antiqua* individuals used in the experiments were collected from Laguna Los Juncos on the same day of the experiments. In both years, the dark treatments were wrapped with aluminum foil, whereas the exposed treatments were irradiated with 1.75 W m⁻² of UVA plus 110 μ mol quanta m⁻² s⁻¹ of PAR, under a photoperiod of 14 h light: 10 h dark (Fig. 1). The animals were maintained in 2 L UV transparent acrylic containers (Plasmatic, Spain) filled with filtered (GF/F) water containing about 1 \times 10⁴ cells mL⁻¹ of *C. reinhardtii*. The culture medium was replaced by half every 2 days. At the end of the experiments, all individuals were counted, sorted into separate Eppendorf vials and

stored for 1 day at -20°C until PPCs extraction. The experiments were run in a test chamber Sanyo MLR5. The assessment of dry weight and initial MAAs and carotenoid concentrations in *B. antiqua* was carried out on triplicate samples preserved at -20°C. Each initial sample consisted of 150 (2004 experiments) or 200 individuals (2006 experiments).

Analytical procedures

Copepod dry weights were measured on samples dried for 2 days at 70°C and weighed on an analytical balance (OHAUS AP 310). MAAs and carotenoids were sequentially extracted from copepod samples. Extraction of MAAs was performed in 3 mL of 20% aqueous methanol according to Sommaruga and García Pichel (Sommaruga and García Pichel, 1999) and Laurion *et al.* (Laurion *et al.*, 2000). After centrifugation and filtration (Whatmann GF/F) the extracts were scanned in a UV-visible spectrophotometer (Hewlett Packard P 8453-E, 1 cm path-length quartz cuvette). MAAs concentration was normalized and expressed as optical density per unit of copepod mass (i.e. OD mg DW⁻¹ of *B. antiqua*). The pellets obtained after centrifugation were re-suspended using 3 mL of 96% ethanol to extract carotenoids, following Byron (Byron, 1982) and Hessen (Hessen, 1993). When necessary, the pellet was re-extracted in fresh solvent. The loss of *Boeckella's* carotenoids by applying the sequential extraction technique was estimated by comparing the carotenoid concentration of *Boeckella* obtained by direct ethanol 96% extraction and by sequential extraction using 20% methanol followed by 96% ethanol. The mean loss of carotenoids in the sequential extractions was estimated as 20% (\pm 10%) assuming 100% as the carotenoid concentration obtained by direct extraction in separate samples. Initial and final batch samples of *Boeckella* from the different treatments of the bioaccumulation experiments were treated similarly.

Finally, the extracts obtained were scanned in a UV-visible spectrophotometer (1 cm path-length quartz cuvette). Carotenoid concentrations were calculated as in Hessen (Hessen, 1993) and expressed as μ g mg DW⁻¹:

$$C = \frac{D \times V \times 10^4}{E \times W},$$

where *D* is the absorbance at 474 nm (corrected by chlorophyll *a*), *V* the extract volume, *E* the extinction coefficient (2500) and *W* the sample dry weight.

Carotenoid concentrations in seston samples were determined after Wetzel and Likens (Wetzel and Likens,

2000), whereas MAAs concentrations were determined from methanolic extracts as explained above.

The uptake and elimination rates for carotenoids and MAAs were estimated from the results of the bioaccumulation experiments performed in 2004 and 2006. As a first approximation, we assumed (i) that both processes (i.e. uptake and elimination) obey first-order kinetics and (ii) that uptake is induced only when the copepods are exposed to visible and/or UV radiation. The second assumption (i.e. null uptake in the dark) was adopted for simplicity, but it could be easily relaxed by incorporating a baseline uptake level in the dark. More specifically, for each assayed temperature, we derived the elimination constants using data from the dark treatments, and the net-gain constants from the radiation-exposed treatments. Finally, the uptake constants were calculated as the sum of net-gain plus elimination constants, as follows:

$$\text{Elimination rate}(q) = \frac{\text{Ln}([\text{PPC}]_i) - \text{Ln}([\text{PPC}]_{\text{dark},f})}{\Delta t}$$

$$\text{Net-gain rate}(k - q) = \frac{\text{Ln}([\text{PPC}]_{\text{exposed},f}) - \text{Ln}([\text{PPC}]_i)}{\Delta t}$$

$$\begin{aligned} \text{Uptake rate}(k) &= \text{Net-gain rate} \\ &+ \text{Elimination rate} = (k - q) + q \end{aligned}$$

where $[\text{PPC}]_i$ is the initial concentration of PPC (either carotenoids or MAAs) at the beginning of the experiment, $[\text{PPC}]_{\text{dark},f}$ the final PPC concentration in copepods kept in dark, $[\text{PPC}]_{\text{exposed},f}$ the final PPC concentration in copepods exposed to PAR+UVA and Δt the duration of bioaccumulation trials, i.e. 10 days.

The relationships between fluences, temperature, sestonic carotenoids and MAAs in *B. antiqua* in seasonal samples were analysed using simple regression analyses. Two-way analysis of variance was applied to analyse single and combined effects of temperature and radiation for both UVB tolerance and bioaccumulation of PPCs. The relationships between bioaccumulation rates (for both MAAs and carotenoids) and temperature from the 2006 experiments were fitted to simple linear models using regression analysis (Zar, 1999).

RESULTS

Seasonal variation of environmental conditions and patterns of PPCs in *B. antiqua*

During the study period, the depth at the centre of Laguna Los Juncos averaged (± 1 SD) 0.8 ± 0.3 m. Mean temperature (± 1 SD) was $10.3 \pm 5.4^\circ\text{C}$, and the

ice-cover period lasted about 20 days from late June to early July. The temperature pattern recorded during the study is shown in Fig. 2a. Mean pH and conductivity were 9.8 ± 0.66 and $462 \pm 109 \mu\text{S cm}^{-1}$, respectively. Dissolved oxygen concentration was always high averaging $10.5 \pm 1.84 \text{ mg L}^{-1}$. Total phosphorus (P) and total nitrogen (N) concentrations measured on selected sampling dates were high: ~ 900 and $3000 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Mean chlorophyll *a* concentration was $4.97 \pm 4.34 \text{ mg L}^{-1}$. Water transparency was low, due to high mean levels of TS ($4.2 \pm 1.6 \text{ mg L}^{-1}$) and high DOC concentrations ($30.29 \pm 18.07 \text{ mg L}^{-1}$). K_{d320} averaged $66.21 \pm 35 \text{ m}^{-1}$, whereas that at 440 nm k_{d440} was $7.63 \pm 5 \text{ m}^{-1}$. The seasonal pattern of the mean daily fluence at 320 nm in the water column is shown in Fig. 2a. Higher fluence levels were recorded during spring and summer (i.e. October–February). The fluence at 320 nm varied between 14 and 180 J m^{-2} and that of PAR between 2 and $13 \text{ mol photons m}^{-2}$.

The seasonal patterns of carotenoids and MAAs in *B. antiqua* of Laguna Los Juncos are shown in Fig. 2b. The concentrations of both types of compounds varied greatly between sampling dates, even within the same season. The MAAs present in *B. antiqua* have been identified by HPLC, using appropriate standards as mycosporine-glycine, porphyra-334, shinorine and

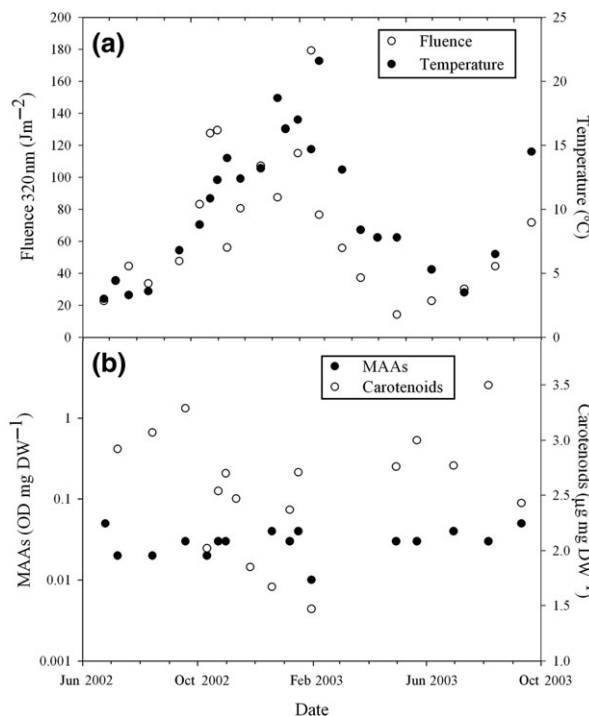


Fig. 2. Seasonal patterns of variation in: (a) temperature and mean daily fluence (H_{320}) in the water column of Laguna Los Juncos and (b) concentrations of PPCs in *B. antiqua* from Laguna Los Juncos.

MAA-332 (Pérez *et al.*, 2006). Carotenoids in *B. antiqua* ranged between 1.4 µg mg DW⁻¹ (October) and 3.5 µg mg DW⁻¹ (August) and the mean concentration of these compounds was 2.52 ± 0.6 µg mg DW⁻¹ (mean + 1 SD) (Fig. 2b). During the study period, MAAs concentration in *B. antiqua* varied between 0.01 OD mg DW⁻¹ in January and 0.05 OD mg DW⁻¹ in September, whereas the mean content of these compounds was 0.03 ± 0.009 OD mg DW⁻¹ (Fig. 2b).

The concentration of carotenoids in *B. antiqua* was inversely related to water temperature ($r^2 = 0.42$, $F = 10.98$, $p = 0.005$), as well as to the mean daily fluence at 320 nm ($r^2 = 0.44$, $F = 11.12$, $p = 0.005$). Conversely, MAAs concentration did not show any obvious relationship with fluence or temperature ($P > 0.05$).

The carotenoid content in *B. antiqua* was unrelated to the concentration of carotenoids in its food (i.e. bioeston) ($P = 0.32$). On the other hand, the concentrations of MAAs in seston samples were always below the detection limit of the spectrophotometric method and therefore did not relate to MAAs content in the copepod.

Assessment of *B. antiqua* tolerance to UVB at different temperatures

In the first tolerance experiments (2004) the mortality of *B. antiqua* was significantly influenced by both UVB dose and temperature. In this case, mortality was higher at 18°C than at 10°C ($F = 22.4$, $P < 0.001$, $n = 48$) at both levels of UVB radiation. Mortality increased at higher UVB doses ($F = 7.59$, $P < 0.01$, $n = 48$), but the interaction between dose and temperature was not statistically significant ($F = 1.4$, $P = 0.24$, $n = 48$) (Fig. 3a).

In the second tolerance experiments (2006), the copepod mortality was influenced significantly by UVB exposure ($F = 24.2$, $P < 0.001$, $n = 120$), but not by temperature ($F = 0.50$, $P = 0.73$, $n = 120$). The mortality of *B. antiqua* increased with UVB dosage ($F = 7$, $p < 0.0001$) and was negligible at the lowest assayed doses ($t = 0.95$, $P = 0.35$, $n = 80$; Fig. 3b).

Bioaccumulation of PPCs as affected by radiation exposure and temperature

The results from the first bioaccumulation experiment (2004) showed that both radiation and temperature affected the concentrations of PPCs in *B. antiqua*. MAAs concentration was significantly influenced by both the radiation and temperature treatment ($F = 117.68$, $P = 0.001$ and $F = 5.75$, $P = 0.027$, $n = 24$, respectively). Overall, the concentration of MAAs was higher in PAR+UVA than in the dark treatment ($t = 10.85$,

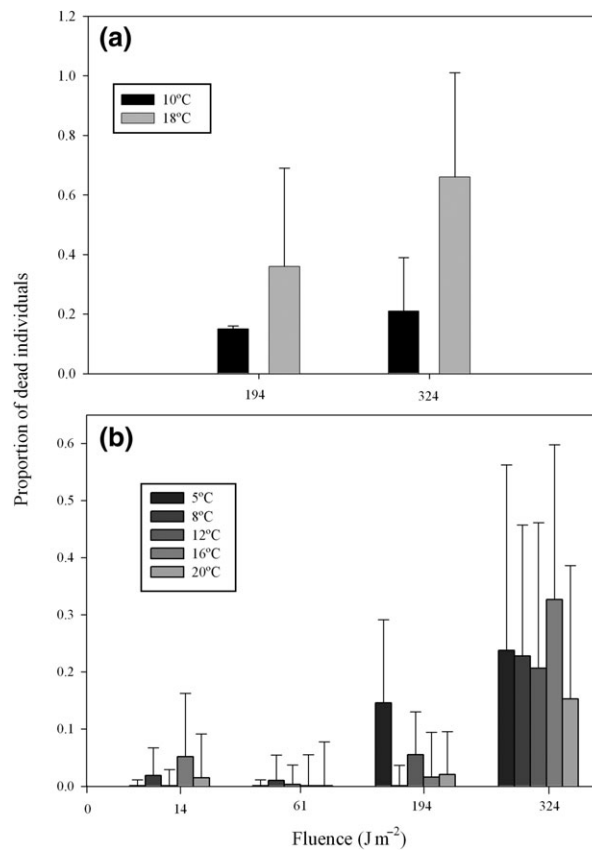


Fig. 3. Proportions of dead individuals of *B. antiqua* exposed experimentally to different levels of UVB radiation: (a) Experiment 2004 at 10°C and 18°C and (b) Experiment 2006 at 5°C, 8°C, 12°C, 16°C and 20°C (mean ± 1 SD). In all cases, mortality proportions were adjusted by the Abbott formula (see text) to account for the differences in control mortality between temperatures.

$P < 0.0001$, $n = 24$) and at 10°C versus at 18°C ($t = 2.4$, $P = 0.027$) (Fig. 4a). Within the same radiation treatment, MAAs concentrations were similar at 10°C and 18°C ($P > 0.105$). Within each temperature treatment, the concentration of MAAs was higher in PAR+UVA than in the dark ($t = 7.9$, $P < 0.001$, $n = 12$ at 10°C and $t = 7.5$, $P < 0.001$, $n = 12$ at 18°C). The concentration of carotenoids in *B. antiqua* was significantly affected by the radiation regime ($F = 47.24$, $P < 0.001$, $n = 24$), whereas the effect of temperature was not significant ($F = 0.38$, $P = 0.55$, $n = 24$). However, the interaction of main factors resulted significant, suggesting that the effect of radiation depends on the temperature at which the copepods were maintained. In this case, *post hoc* contrasts showed that the concentration of carotenoids was significantly higher at 18°C than at 10°C within the PAR+UVA treatment ($t = 3.85$, $P = 0.001$, $n = 12$), whereas the pattern was inverse in the dark treatment ($t = 2.98$, $P = 0.007$, $n = 12$). At 10°C carotenoid concentrations were similar in PAR+UVA and dark

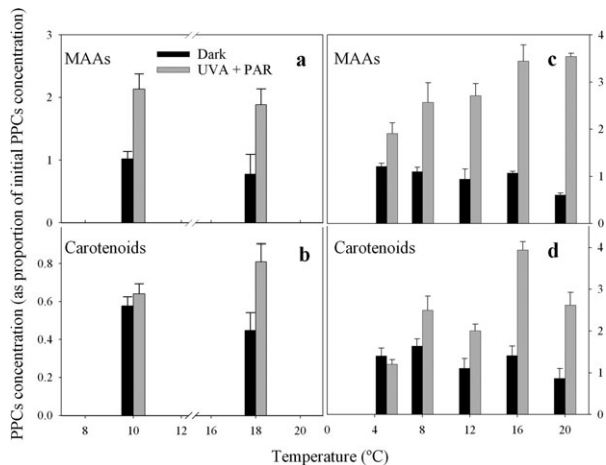


Fig. 4. Variation in PPCs concentration in *B. antiqua* in the bioaccumulation experiments at different temperatures and radiation regimes (PAR+UVA and dark). (a) Final MAAs and (b) carotenoid concentrations resulting from the 2004 experimental set-up and (c) final MAAs and (d) final carotenoid concentrations resulting from the 2006 experimental set-up.

treatments ($t = 1.44$, $P = 0.16$, $n = 12$), whereas at 18°C the concentration of carotenoids was significantly higher in the PAR+UVA treatment ($t = 8.27$, $P < 0.001$, $n = 12$) (Fig. 4b).

In the second series of experiments (2006), the accumulation of PPCs in *B. antiqua* were both influenced by temperature and radiation (Fig. 4c and d). In the case of the MAAs, the concentration was affected significantly by temperature ($F = 8.9$, $P < 0.001$, $n = 30$) and radiation ($F = 539.3$, $P < 0.001$, $n = 30$). The interaction between main factors was also significant, revealing that the effects of radiation were influenced by the temperature at which the copepods were maintained ($F = 23.1$, $P < 0.001$, $n = 30$). Within each temperature level, the concentration of MAAs was significantly higher in PAR+UVA compared to the dark treatment ($P < 0.001$). Within the PAR+UVA treatment significant differences were found between most temperatures levels ($0.005 < P < 0.02$) excluding the pairs 8°C and 12°C and 16°C and 20°C. In the dark treatment, however, MAAs concentrations were significantly different at 5 and 20°C ($t = 3.4$, $P = 0.003$; Fig. 4c).

The concentration of carotenoids in *B. antiqua* was related to temperature ($F = 33.1$, $P < 0.001$, $n = 30$) and radiation ($F = 200.9$, $P < 0.001$, $n = 30$). The interaction between temperature and radiation was also significant ($F = 31.3$, $P < 0.001$, $n = 30$), once again suggesting that the effect of radiation under the influence of temperature (Fig. 4d). The concentration of carotenoids was significantly higher in the PAR+UVA compared with the dark treatment at four out of the five temperature levels

tested ($P < 0.0001$), i.e. except at 5°C ($P = 0.29$). Within the PAR+UVA treatment, the comparisons between carotenoid concentration of *B. antiqua* at 8–20°C, 5–12°C and 12–20°C were not significant ($P > 0.05$). Within the dark treatment, the carotenoid levels were similar at most temperatures tested, although a significant difference in the amounts of pigments in *B. antiqua* was found between incubations at 8°C and 20°C.

The uptake (k), elimination rate (q) and net gain of MAAs and carotenoids calculated from the results of the previous experiments are shown in Table I. The uptake rates of PPCs calculated for both series of experiments were positive (except for one case in which it was near zero) and were usually higher than elimination rates. In the 2004 experiments, however, the elimination rates of carotenoids exceeded the uptake rate. Elimination rates were negative at lower temperatures and positive at the mid and higher temperatures of the range (Table I). Negative values of the elimination rates in complete darkness indicate that there was a basal uptake of MAAs and carotenoids, even in the absence of induction by radiation exposure.

The uptake, elimination and net gain rates of MAAs increased linearly with temperature (Fig. 5a). On the other hand, the uptake and elimination rates of carotenoids also increased with temperature; however, the net gain rate was not significantly related to this variable (Fig. 5b).

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Laguna Los Juncos is a small, shallow lake located in the cold temperate region of Northern Patagonia. The

Table I: Bioaccumulation rates of MAAs and carotenoids in B. antiqua obtained from the 2004 experiments (bold) and 2006 experiments

Temperature (°C)	Bioaccumulation rates					
	MAAs (day ⁻¹)			Carotenoids (day ⁻¹)		
	<i>k</i>	<i>q</i>	<i>k</i> - <i>q</i>	<i>k</i>	<i>q</i>	<i>k</i> - <i>q</i>
5	0.046	-0.019	0.065	-0.015	-0.034	0.018
8	0.085	-0.010	0.094	0.042	-0.049	0.091
10	0.074	-0.002	0.076	0.010	0.055	-0.045
12	0.105	0.006	0.100	0.059	-0.011	0.070
16	0.117	-0.007	0.124	0.103	-0.034	0.137
18	0.089	0.025	0.063	0.059	0.080	-0.021
20	0.177	0.051	0.126	0.111	0.014	0.096

k (uptake), *q* (elimination) and *k* - *q* (net gain).

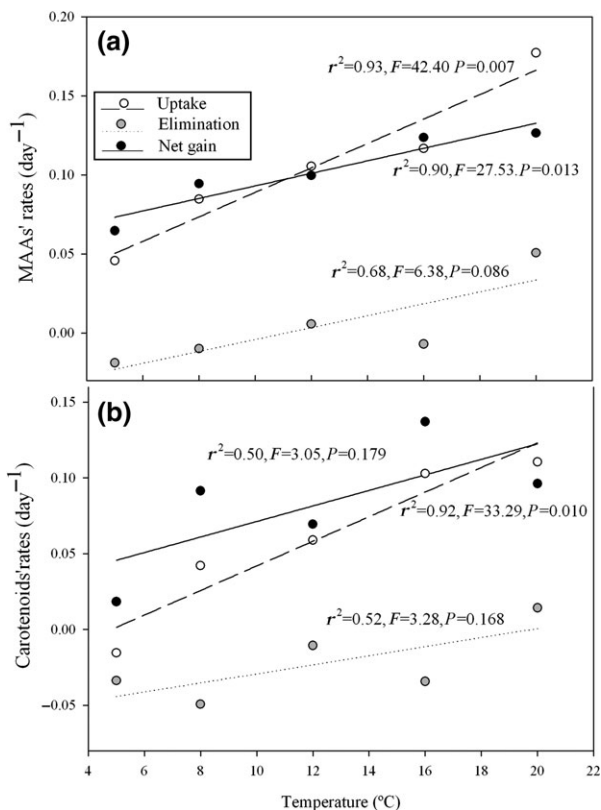


Fig. 5. Relationship between *B. antiqua*'s PPCs bioaccumulation rates (uptake, elimination and net gain) and temperature estimated for the 2006 bioaccumulation experiment: (a) MAAs rates versus temperature and (b) carotenoids rates versus temperature.

lake is subject to large seasonal variations in temperature and fluences (Fig. 2a). In addition, it is affected by the hydrological cycle resulting in appreciable fluctuations of water depth.

During our field survey, the concentrations of MAAs in *B. antiqua* did not show a distinct seasonal pattern (Fig. 2a) and no significant relationship could be established between the levels of these compounds, water temperature and mean fluence in the water column. Also, the MAAs content of *B. antiqua* could not be related to the bioestonic MAAs, the potential source in Laguna Los Juncos, since they were undetectable by means of the spectrophotometric method applied.

On the other hand, carotenoid concentrations tended to be higher in spring and lower by late summer, but this trend displayed a great deal of variability within short periods of time (Fig. 2b). Nevertheless, the concentration of carotenoids did, however, show significant negative relationships with temperature and mean fluence. Similar inverse relationships between carotenoid concentration and temperature have been reported in earlier studies. Based on such evidence, Ringelberg

(Ringelberg, 1980) and Byron (Byron, 1982) raised doubts about the actual significance of carotenoids in photoprotection. However, several experimental studies have demonstrated that higher carotenoid concentrations alleviate the potential damage induced by exposure to solar or artificial radiation (Hairston, 1976; Hansson, 2000). On the other hand, although the natural patterns of MAAs concentration with temperature or fluence have been less studied, there is a broader consensus within the scientific community regarding their photoprotective function (Shick and Dunlap, 2002; Sommaruga and Augustin, 2006; Tartarotti and Sommaruga, 2006). Tartarotti and Sommaruga (Tartarotti and Sommaruga, 2006) reported higher levels of MAAs in phytoplankton and also in the copepod *Cyclops abyssorum* in summer compared to the ice-cover period in an Alpine Lake. These authors found that phytoplanktonic MAAs correlated significantly with the incident solar radiation, the water transparency to UV and also with water temperature. Furthermore, they observed that MAAs content of *C. abyssorum* was correlated with phytoplanktonic MAAs.

From a photoprotection perspective, one may expect that the levels of PPCs would track the variations in radiation exposure experienced by the zooplankton (Moeller *et al.*, 2005; Sommaruga and Augustin, 2006; Tartarotti and Sommaruga, 2006). As mentioned above, this is not always the case. Particularly, in our study, we found no support for a direct relationship between PPCs concentration and mean water column radiation. It has been argued that the efficiency of PPCs may decrease with decreasing temperature or that the efficiency of other mechanisms that alleviate the effects of radiation, such as enzymatic repair, may be lower at lower temperatures. Either alone or in combination, the two previous phenomena could account for the lack of a direct relationship between PPCs concentration and the radiation exposure conditions. We have already pointed out that a logical extension of these arguments must be that the organisms should be less tolerant to UVB radiation at low than at high temperature. Previous studies suggest that this is not always the case (Hairston, 1979b) and in fact, our tolerance experiments demonstrated that the vulnerability of *B. antiqua* to UVB exposure either increased (2004) with or was unaffected (2006) by temperature. It must be emphasized that the temperature range used in our experiments (5°C or 20°C) encompasses virtually the whole ecophysiological range of the species (Fig. 2a).

In the bioaccumulation experiments, the concentration of carotenoids either decreased (2004) or increased (2006) over time. This may be related to differences in the initial levels of these compounds at

the start of the experiments, as demonstrated for yeasts (Libkind *et al.*, 2004), but this possibility is one that remains to be explored in future work with *B. antiqua*. On the other hand, the concentration of MAAs increased, particularly in the treatment exposed to PAR+UVA, confirming the findings reported by Pérez *et al.* (Pérez *et al.*, 2006). These results were unexpected, as the levels of MAAs in the alga *C. reinhardtii* used as food are nil, or at least below HPLC detection limits (Pérez *et al.*, 2006). Besides, animals are thought to be unable to *de novo* synthesize MAAs because they supposedly lack the shikimate pathway. The latter statement, however, should be taken with caution. As Shick and Dunlap (Shick and Dunlap, 2002) has put it “the oft-repeated dogma that animals lack this pathway apparently stems from the inability of vertebrates (variously given as animals, vertebrates, fish, mammals and humans in literature accounts) to synthesize essential aromatic amino acids, which they must obtain from their diets [. . .], and is not based on empirical evidence such as failures to detect activities of enzymes of the shikimate pathway or DNA sequences encoding these enzymes”. Alternatively, the source of MAAs in *B. antiqua* may be the various endosymbionts and parasites that often infest free-living copepods (Harris, 1993; Carman and Dobbs, 1997). The latter explanation appears more likely. For example, Yakovleva and Baird (Yakovleva and Baird, 2005) found that accumulation of MAAs in the coral *Goniastrea retiformis* occurs in the absence of zooxanthellae and other dietary input, but is inhibited when the larvae were treated with the antibiotic rifampicin, indicating a possible contribution of prokaryotes associated with the animal tissue. In fact, our recent experiments (unpublished data) suggest that accumulation of MAAs in *B. antiqua* is inhibited when the copepods are treated with antibiotics. A similar pattern of uncoupling between diet and MAAs content has been reported in the coral *Stylophora pistillata* in which the levels of these compounds were related to the symbiotic zooxanthellae *Symbiodinium* while dietary MAAs were of little quantitative importance (Shick *et al.*, 2005). More recently, Starcevic *et al.* (Starcevic *et al.*, 2008) found molecular evidence establishing horizontal transfer of ancestral genes of the shikimic acid pathway into the sea anemone, *Nematostella vectensis*, genome from both bacterial and eukaryotic (dinoflagellate) donors. Nevertheless, regardless of the actual origin of the MAAs present in *B. antiqua*, it seems clear that the irradiance and thermal conditions induced their net accumulation in our experiments, although the effects were less evident in the field survey.

In designing the bioaccumulation experiments, we departed from the traditional concept according to which

the concentrations of PPCs must be fine-tuned to the recent history of environmental conditions experienced by the organisms. This concept places the accent on “PPCs concentrations” and implicitly assumes that they are (almost) instantly adjusted to the prevailing environmental conditions. In contrast, we focused on what factors affected the “uptake and elimination rates of PPCs”. We found that, for both carotenoids and MAAs, the uptake and elimination rates increased with temperature. These findings are in agreement with predictions based on metabolic kinetics (i.e. that metabolic rates increase with temperature), but are neutral as regards to the adaptive significance of PPCs. According to our view, the concentration of PPCs reflects the balance between uptake and elimination over a certain period of time. Both process rates are influenced by environmental conditions, but the actual concentrations do not necessarily correspond with the present requirements of the organisms. However, as a deficiency in PPCs may be disadvantageous to organisms that may be suddenly exposed to harmful levels of solar radiation, we suggest that certain threshold concentration is probably maintained. In other words, we believe that, in the absence of inhibitory factors (i.e. visual hunters), PPCs may be accumulated in excess [i.e. luxury consumption (Sterner and Elser, 2002)] at places or periods in which net accumulation is favored.

The negative values of the elimination rates at the lower end of the temperature range assayed (Table I) falsify our initial assumption that uptake is induced only when the copepods are exposed to visible and/or UV radiation. Our results actually show that a certain amount of PPCs uptake can be achieved in the absence of any source of radiation. Moreover, this basal “dark-uptake” appears to increase as the temperature decreases. This is a very interesting observation that deserves to be explored in more detail. Here, we only want to point out that this observation reconciles a number of seemingly paradoxical observations reporting that copepods display their strongest red coloration right before ice melt in spring or early summer, i.e. after several months of living under conditions of low temperature and dim light (Hansson, 2004; Tartarotti and Sommaruga, 2006).

The demonstration of a dual regulation of PPCs by radiation exposure and temperature has significant implications for reconstructing (Leavitt *et al.*, 2003) or predicting the photoprotective responses of aquatic organisms to the past or future climate scenarios. The general trend showing that PPCs concentrations are expected to decrease with temperature tacitly implies that global warming may jeopardize the effectiveness of PPCs to counteract the damaging effects of increased UV exposure due to stratospheric ozone depletion.

Moreover, an increase in temperature may, by itself, generate photo-toxicity stress in cold adapted populations, as has been suggested for tropical corals (Lesser and Farrell, 2004; Ferrier-Pagès *et al.*, 2007).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the staff of Estancia San Ramón for allowing us to work in Laguna Los Juncos. P. Fasoli, A. Busto, G. Perotti, D. Milano, D. Añón Suarez and J. Lancelotti are specially acknowledged for their cooperation in the logistics and field assistance.

FUNDING

Funding was provided by ANPCyT (PICT 13550), CONICET (PIP 6451) and UNC (B001).

REFERENCES

- Borgeraas, J. and Hessen, D. O. (2000) UV-B induced mortality and antioxidant enzyme activities in *Daphnia magna* at different oxygen concentrations and temperatures. *J. Plankton Res.*, **22**, 1167–1183.
- Byron, E. R. (1982) The adaptive significance of calanoid copepod pigmentation: A comparative and experimental analysis. *Ecology*, **63**, 1871–1886.
- Carman, K. R. and Dobbs, F. C. (1997) Epibiotic microorganisms on copepods and other marine crustaceans. *Microsc. Res. Tech.*, **37**, 116–135.
- Carreto, J. I., Carignan, M. O., Daleo, G. *et al.* (1990) Occurrence of mycosporine-like amino acids in the red-tide dinoflagellate *Alexandrium excavatum*: UV-photoprotective compounds? *J. Plankton Res.*, **12**, 909–921.
- Cockell, C. S. and Blaustein, A. R. (2001) *Ecosystems, evolution, and ultraviolet radiation*. Springer, New York.
- Edge, R., Mcgarvey, D. J. and Truscott, T. G. (1997) The carotenoids as anti-oxidants—a review. *Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **41**, 189–200.
- Ferrero, E., Eöry, M., Ferreyra, G. *et al.* (2006) Vertical mixing and ecological effects of ultraviolet radiation in planktonic communities. *Photochem. Photobiol.*, **82**, 898–902.
- Ferrier-Pagès, C., Richard, C., Forcioli, D. *et al.* (2007) Effects of temperature and UV radiation increases on the photosynthetic efficiency in four scleractinian coral species. *Biol. Bull.*, **213**, 76–87.
- Hairston, N. G. (1976) Photoprotection by carotenoid pigments in the copepod *Diaptomus nevadensis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **73**, 971–974.
- Hairston, N. G. (1979a) The adaptive significance of color polymorphism in two species of *Diaptomus* (Copepoda). *Limnol. Oceanogr.*, **24**, 15–37.
- Hairston, N. G. (1979b) The effect of temperature on carotenoid photoprotection in the copepod *Diaptomus nevadensis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **62A**, 445–448.
- Hansson, A. (2000) Induced pigmentation in zooplankton: a trade-off between threats from predation and ultraviolet radiation. *Proc. R. Soc. London, B*, **267**, 2327–2331.
- Hansson, A. (2004) Plasticity in pigmentation induced by conflicting threats from predation and UV radiation. *Ecology*, **85**, 1005–1016.
- Harris, J. (1993) The presence, nature and role of gut microflora in aquatic invertebrates: A synthesis. *Microb. Ecol.*, **25**, 195–231.
- Helbling, E. W., Zaratti, E., Sala, L. O. *et al.* (2002) Mycosporine like aminoacids protect the copepod *Boeckella titicacae* (Harding) against high levels of solar UVR. *J. Plankton Res.*, **24**, 225–234.
- Hessen, D. O. (1993) DNA-damage and pigmentation in Alpine and Arctic zooplankton as bioindicators of UV-radiation. *Vérh. Internat. Verein. Limnol.*, **25**, 482–486.
- Karentz, D., Mc Euen, F. S. and Dunlap, W. C. (1991) Survey of mycosporine-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. *Mar. Biol. (Berlin)*, **108**, 157–166.
- Laurion, I., Ventura, M., Catalan, J. *et al.* (2000) Attenuation of ultraviolet radiation in mountain lakes: Factors controlling the among- and within-lake variability. *Limnol. Oceanogr.*, **45**, 1274–1288.
- Leavitt, P. R., Vinebrooke, R. D., Donald, D. B. *et al.* (1997) Past ultraviolet radiation environments in lakes derived from fossil pigments. *Nature*, **388**, 457–459.
- Leavitt, P. R., Hodgson, D. A. and Pienitz, R. (2003) Past UVR environments and impacts on lakes. In Helbling, W. E. and Zagarese, H. E. (eds), *UV Effects in Aquatic Organisms and Ecosystems*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 511–545.
- Lesser, M. P. and Farrell, J. H. (2004) Exposure to solar radiation increases damage to both host tissues and algal symbionts of corals during thermal stress. *Coral Reefs*, **23**, 367–377.
- Libkind, D., Pérez, P., Sommaruga, R. *et al.* (2004) Constitutive and UV-inducible synthesis of photoprotective compounds (carotenoids and mycosporines) by freshwater yeasts. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **3**, 281–286.
- Mac Fadyen, E., Williamson, C., Grad, G. *et al.* (2004) Molecular response to climate change: temperature dependence of UV-induced DNA damage and repair in the freshwater crustacean *Daphnia pulex*. *Glob. Change Biol.*, **10**, 1–9.
- Moeller, R., Gilroy, S., Williamson, C. *et al.* (2005) Dietary acquisition of photoprotective compounds (mycosporine-like amino acids, carotenoids) and acclimation to ultraviolet radiation in a freshwater copepod. *Limnol. Oceanogr.*, **50**, 437–493.
- Morris, D. P., Zagarese, H. E., Williamson, C. E. *et al.* (1995) The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnol. Oceanogr.*, **40**, 1381–1391.
- Newman, M. C. (1995) *Quantitative Methods in Aquatic Ecotoxicology*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Pakker, H., Martins, R. S. T., Boelen, P. *et al.* (2000) Effects of temperature on the photoreactivation of ultraviolet-B-induced DNA damage in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *J. Phycol.*, **36**, 334–341.
- Pérez, A. P., Libkind, D., Diéguez, M. D. C. *et al.* (2006) Mycosporines from freshwater yeasts: a trophic cul-de-sac? *Photochem. Photobiol. Sci.*, **5**, 25–30.
- Persaud, A. D., Moeller, R. E., Williamson, C. E. *et al.* (2007) Photoprotective compounds in weakly and strongly pigmented copepods and co-occurring cladocerans. *Freshwater Biol.*, **52**, 2121–2133.
- Rae, R. and Vincent, W. F. (1998) Effects of temperature and ultraviolet radiation on microbial foodweb structure: potential responses to global change. *Freshwater Biol.*, **40**, 747–758.
- Ringelberg, J. (1980) Aspects of red pigmentation in zooplankton, especially copepods. In Kerfoot, W. C. (ed.), *Evolution and Ecology of Zooplankton Communities*. University Press of New England, pp. 91–98.

- Rocco, V. E., Oppezzo, O., Pizarro, R. *et al.* (2002) Ultraviolet damage and counteracting mechanisms in the freshwater copepod *Boeckella poppei* from the Antarctic Peninsula. *Limnol. Oceanogr.*, **47**, 829–836.
- Roos, J. C. and Vincent, W. F. (1998) Temperature dependence of UV radiation effects on Antarctic cyanobacteria. *J. Phycol.*, **34**, 118–125.
- Shick, M. and Dunlap, W. (2002) Mycosporine-like Amino Acids and related Gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annu. Rev. Physiol.*, **64**, 223–262.
- Shick, M., Ferrier-Pagès, C., Grover, R. *et al.* (2005) Effects of starvation, ammonium concentration, and photosynthesis on the UV-dependent accumulation of mycosporine-like amino acids (MAAs) in the coral *Stylophora pistillata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **295**, 135–156.
- Sommaruga, R. and García Pichel, F. (1999) UV-absorbing mycosporine-like compounds in planktonic and benthic organisms from a high-mountain lake. *Arch. Hydrobiol.*, **144**, 255–269.
- Sommaruga, R. and Augustin, G. (2006) Seasonality in UV transparency of an alpine lake is associated to changes in phytoplankton biomass. *Aquat. Sci.*, **68**, 129–141.
- Sonntag, B., Summerer, M. and Sommaruga, R. (2007) Sources of mycosporine-like amino acids in planktonic *Chlorella*-bearing ciliates (Ciliophora). *Freshwater Biol.*, **52**, 1476–1485.
- Starcevic, A., Akthar, S., Dunlap, W. C. *et al.* (2008) Enzymes of the shikimic acid pathway encoded in the genome of a basal metazoan, *Nematostella vectensis*, have microbial origins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105**, 2533–2537.
- Sterner, R. W. and Elser, J. J. (2002) *Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere*. Princeton University Press, New Jersey.
- Tartarotti, B. and Sommaruga, R. (2006) Seasonal and ontogenetic changes of mycosporine-like amino acids in planktonic organisms from an alpine lake. *Limnol. Oceanogr.*, **51**, 1530–1541.
- Tartarotti, B., Baffico, G., Temporetti, P. *et al.* (2004) Mycosporine-like amino acids in planktonic organisms living under different UV exposure conditions in Patagonian lakes. *J. Plankton Res.*, **26**, 753–762.
- Vinebrooke, R. D. and Leavitt, P. R. (2005) Mountain lakes as indicators of the cumulative impacts of ultraviolet radiation and other environmental stressors. In Huber, U. M., Bugmann, K. M. and Reasoner, M. A. (eds), *Global Change and Mountain Regions—A State of Knowledge Overview*. Springer, Dordrecht, pp. 437–448.
- Wetzel, R. G. and Likens, G. E. (2000) *Limnological Analyses*, 3rd edn. Springer-Verlag, New York.
- Williamson, C. E. and Zagarese, H. E. (2003) UV effects on aquatic ecosystems: A changing climate perspective. In Helbling, W. E. and Zagarese, H. E. (eds), *UV Effects on Aquatic Organisms and Ecosystems. Comprehensive Series in Photosciences*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 547–567.
- Yakovleva, I. M. and Baird, A. H. (2005) Ontogenetic change in the abundance of mycosporine-like amino acids in non-zooxanthellate coral larvae. *Coral Reefs*, **24**, 443–452.
- Zagarese, H. E., Feldman, M. and Williamson, C. E. (1997) UV-B induced damage and photoreactivation in three species of *Boeckella* (Copepoda, Calanoida). *J. Plankton Res.*, **19**, 357–367.
- Zar, J. (1999) *Biostatistical Analysis*, 4th edn. Prentice-Hall, Inc., New Jersey.

Mycosporine-like Amino Acids in Freshwater Copepods: Potential Sources and Some Factors That Affect Their Bioaccumulation

Patricia E. García¹, María C. Diéguez¹, Marcela A. Ferraro², Horacio E. Zagarese² and Alejandra P. Pérez*¹

¹Laboratorio de Fotobiología, Instituto en Investigaciones de Biodiversidad y Medioambiente (INIBIOMA), Universidad Nacional del Comahue, Río Negro, Argentina

²Laboratorio de Ecología y Fotobiología Acuática, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH), Buenos Aires, Argentina

Received 20 August 2009, accepted 14 October 2009, DOI: 10.1111/j.1751-1097.2009.00670.x

ABSTRACT

Mycosporine-like amino acids (MAAs) are ubiquitous photoprotective compounds in aquatic environments. MAAs are synthesized by a wide variety of organisms (*i.e.* bacteria, fungi and algae) and their production is photoinducible by ultraviolet radiation (UVR) (280–400 nm) and/or photosynthetically active radiation (400–750 nm). Most animals however, are unable to synthesize MAAs and must acquire these compounds through their diet or from symbiotic organisms. In this paper, we investigate the possible sources of MAAs and factors (temperature and initial MAA concentration) that may affect their bioaccumulation in freshwater copepods. We found that MAA accumulation may occur even if the copepods are cultured on a MAA-free diet. In addition, we found that the bacteriostatic antibiotic, chloramphenicol, inhibits the bioaccumulation of MAAs. These two pieces of evidence suggest that the source of MAAs in these copepods may be prokaryotic organisms in close association with the animals. The two factors investigated in this study, temperature and initial MAA concentrations, were found to affect the rates at which MAAs are accumulated. Temperature had positive effects on both uptake and elimination rates. On the other hand, the rate of uptake decreased at the highest assayed initial MAA concentration, probably because the concentration of MAAs was already close to saturation.

INTRODUCTION

Mycosporine-like amino acids (MAAs) are ubiquitous compounds in aquatic environments. They are present in most major taxonomic groups and types of habitats (1,2). The main putative function of MAAs is photoprotection, acting either as sunscreens or as antioxidants (3,4). The presence of MAAs in freshwater animals has been generally interpreted as an adaptation to counteract the damaging effects of UV radiation (UVR) (5–7). Moreover, the bioaccumulation of MAAs is photoinducible by UVR (280–400 nm) and/or photosynthetically active radiation (PAR: 400–750 nm); therefore MAA concentrations are affected by previous exposure as suggested by correlation analyses (5,6,8) and *in situ* and laboratory experiments (7,9–11).

MAAs may be synthesized by a wide variety of organisms, including bacteria, fungi and algae (12,13). However, most animals are unable to *de novo* synthesize MAAs, due to their lack of the shikimic acid pathway (13,14, but see 15). Consequently, there is a general consensus that aquatic animals acquire MAAs from either of two sources: food (16–19) or symbiotic organisms (8,20,21). Freshwater copepods in particular are most commonly assumed to acquire MAAs from their diet (7), but we have recently shown that the calanoid copepod *Boeckella antiqua* is able to accumulate these compounds even when maintained on a MAA-free diet (9,11). Owing to their photoprotective role, the concentration of MAAs is expected to track the fluctuations in UVR exposure experienced by the organisms (5,22,23). But how precise is the match between current MAA concentration and present UVR exposure is a matter of controversy (24–27). For example, the annual patterns of MAA concentrations in *B. antiqua* cannot be explained by seasonal changes in radiation exposure. Moreover, subsequent experiments show that additional environmental factors (*e.g.* temperature) may also affect the bioaccumulation of MAAs (11).

Here, we report the results of experiments aimed at increasing our understanding of the sources of MAAs in freshwater copepods and the factors that control their bioaccumulation. To assess the generality of previous results obtained with *B. antiqua*, we tested four different species of freshwater centropagid copepods to investigate if they are able to accumulate MAAs in the absence of a dietary source. We also investigated the potential prokaryotic origin of MAAs in *B. antiqua* using the antibiotic chloramphenicol as a bacteriostatic agent. Finally, we analyzed the effect of temperature and initial MAA concentration on the bioaccumulation of these compounds.

MATERIALS AND METHODS

Sampling. The copepods *B. antiqua* (Menu-Marque & Balseiro 2000), *B. gracilis* (Daday 1902), *B. gibbosa* (Brehm 1935) and *Parabroteas sarsi* (Daday) were collected during September 2007 to January 2008, from four shallow lakes (depth ranging from 1 to 5 m) located in northwestern Patagonia (Argentina) (Table 1). These lakes occur at elevations ranging from 740 to 1950 m a.s.l. Vertical profiles of downward spectral irradiance (280–750 nm) were measured with a spectroradiometer (USB 2000; Ocean Optics, Inc.). The attenuation coefficients at 320 nm (K_{d320}), roughly the limit between UVA and UVB, were estimated from the irradiance vs depth plots. Chlorophyll *a* was measured according to Nusch (28).

*Corresponding author email: perezfotolab@gmail.com (Alejandra P. Pérez)
© 2009 The Authors. Journal Compilation, The American Society of Photobiology 0031-8655/10

Table 1. Copepod species and characteristics of source lakes.

Species	Source lake	Location	Elevation (m a.s.l.)	Z _{max} (m)	Chl <i>a</i> ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Kd ₃₂₀ (m ⁻¹)
<i>Boeckella antiqua</i>	Los Juncos	41°03'S, 71°00'W	907	1.5	4.9	35.95
<i>Boeckella gracilis</i>	Teleférico	41°07'S, 71° 22'W	816	1	6.36	56
<i>Boeckella gibbosa</i>	Schmoll	41°12'S, 71°29'W	1950	5	0.14	0.14*
<i>Parabroteas sarsi</i>	Fantasma	41°07'S, 71°27'W	740	1.8	1.9†	18

*From Morris *et al.* (33). †From Pérez *et al.* (9).

In the shallowest lakes, zooplankton samples were obtained by horizontal tows using a 45 μm mesh net. In Lake Schmoll, zooplankton was sampled by vertical tows below 1.5 m depth. The samples were placed in 5 L plastic containers and transported to the laboratory, where the copepods were manually sorted into glass beakers filled with the filtered water from the source lake. Before starting the experiments, the copepods were starved for 3–4 h in filtered (GF/F) lake water in order to empty the gut content. To estimate the initial MAA concentration and copepod dry weight (DW) for each experiment, two replicates of a prescribed number of individuals (see Table 2) were sorted under a dissecting scope, placed in Eppendorf vials and immediately stored at -20°C .

The presence and identification of MAAs was performed by HPLC (see below) on freshly collected copepods. Three replicated samples of *B. antiqua* ($n = 50$ individuals per replicate), *B. gracilis* ($n = 200$) and *P. sarsi* ($n = 15$) were analyzed. The MAA concentration and composition in *B. gibbosa* were obtained from the literature (6). The presence of MAAs was also assessed in the organisms used as food in laboratory experiments: *Daphnia obtusa* ($n = 200$) and filtrates (200 mL) of *Chlamydomonas reinhardtii*.

Experiments. Four different experiments were performed in order to assess: (i) the potential induction of MAA bioaccumulation by UVR exposure in the four species of copepods; (ii) the potential inhibitory effect of antibiotics on MAA bioaccumulation in *B. antiqua*; (iii) the temperature dependence of MAA bioaccumulation rates in *B. gracilis*; and (iv) the effect of initial MAA concentration on bioaccumulation rates in *B. antiqua*.

Unless stated otherwise, all experiments were performed under the following conditions. The copepods were collected the day before starting each experiment. They were sorted in the laboratory and

maintained with filtered lake water (GF/F) in 10 L plastic containers. Each replicate consisted of a prescribed number of copepods (see Table 2) placed in 2 L acrylic cylinders (15 cm diameter) filled with filtered water (GF/F) and additions of the algae *C. reinhardtii* (1×10^4 cells mL⁻¹) as food.

The experiments were run in an environmental test chamber (Sanyo, MLR5) under a 12 h light:12 h dark photoperiod and controlled temperature (Table 2). The radiation sources were Sanyo 40 W (PAR) and Q-panel 340 (UVR) fluorescent tubes, located vertically on three sides of the test chamber. The assayed radiation doses are given in Table 2. Radiation was measured inside the environment chamber with a spectroradiometer (USB 2000; Ocean Optics). PAR + UVR treatments were run in UVR transparent acrylic cylinders (UVT Plasmatic, Spain), while in the PAR and Dark treatments acrylic cylinders were wrapped with Ultraphan film (Digefra, UV Opak, 50% transmission at 395 nm) or aluminum foil, respectively.

The copepod cultures were cleaned every other day. For this operation the cultures were filtered through a 250 μm mesh and rinsed with filtered water. By this procedure, immature stages (nauplii), fecal pellets and other debris were removed from the cultures. Dead adults were removed manually using a Pasteur pipette. The copepods were subsequently placed in clean acrylic cylinders filled with filtered water and additions of *C. reinhardtii* as described above. At the end of each experiment, the adults from each replicate were sorted into Eppendorf vials and stored for 1 day at -20°C until MAA extraction (11). Immature stages were discarded and excluded from the subsequent analyses. The initial and final MAA concentrations of copepods were estimated either spectrophotometrically or by HPLC and expressed as optical density or concentration per unit of DW.

Table 2. Summary of the four experimental setups.

Experiment	Tested species	Assayed temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Duration (days)	First factor: radiation (daily dose)	Second factor	Replicates per treatment	Individuals per replicate
1. Induction of MAA bioaccumulation by radiation exposure	<i>Boeckella antiqua</i> <i>Boeckella gracilis</i> <i>Boeckella gibbosa</i> <i>Parabroteas sarsi</i>	12	10	Dark vs PAR (7.5 E m^{-2}) + UVR (135 kJ m^{-2})	None	<i>Boeckella</i> spp. = 3 <i>P. sarsi</i> = 6	<i>Boeckella</i> spp. = 200* <i>P. sarsi</i> = 30†
2. Effect of antibiotics on MAA bioaccumulation	<i>B. antiqua</i>	16	14	PAR (10.8 E m^{-2}) vs PAR (10.8 E m^{-2}) + UVR (172 kJ m^{-2})	Antibiotics: + AB vs -AB	4	300*
3. Effect of temperature on MAA bioaccumulation	<i>B. gracilis</i>	Variable	14	PAR (7.5 E m^{-2}) vs PAR (7.5 E m^{-2}) + UVR (135 kJ m^{-2})	Temperature: 5, 8, 12, 16 and 20°C	3	200*
4. Effect of basal MAA concentration on MAA bioaccumulation	<i>B. antiqua</i>	12	10	PAR (7.5 E m^{-2}) vs PAR (7.5 E m^{-2}) + UVR (135 kJ m^{-2})	Initial MAA concentration: Low, medium and high	3	200*

Dark treatment (wrapped with aluminum foil), PAR treatment (wrapped with Ultraphan film) and PAR + UVR treatment (UVR transparent flasks). AB+ (chloramphenicol added) and -AB (no antibiotic added). MAA = mycosporine-like amino acid; PAR = photosynthetically active radiation; UVR = UV radiation. *Females and males. †Males.

Experiment 1: induction of MAA bioaccumulation by radiation exposure. This experiment had two objectives. On the one hand, it was intended to confirm the stimulatory role of UVR exposure in the bioaccumulation of MAAs in copepods. The second objective was to validate a result already reported for *B. antiqua*, namely that the bioaccumulation of MAAs in freshwater centropagid copepods may proceed even in the absence of a dietary source of MAAs. Four copepod species were evaluated: *B. antiqua*, *B. gracilis*, *B. gibbosa* and *P. sarsi* (Table 2). For the three *Boeckella* species, the copepods were cultured under the conditions described above. The duration and exposure conditions are given in Table 2. The experiment using the carnivore copepod, *P. sarsi*, was essentially similar, except that the copepods were also offered 100 individuals L⁻¹ of *D. obtusa* as food. At the end of the experiment, the copepods were collected and processed as described in the general experimental conditions section. MAAs were quantified by spectrophotometry and expressed as optical density (OD) per unit of DW.

Experiment 2: effect of antibiotic on the bioaccumulation of MAAs in copepods. The effects of antibiotic and UVR exposure on MAA bioaccumulation were studied in *B. antiqua* using batch cultures arrayed in a factorial design (Table 2). Two light treatments (PAR and PAR + UVR) were crossed with two bacteriostatic treatments (with and without antibiotic). The bacteriostatic antibiotic chloramphenicol (29) was added at a dosage of 10 mg L⁻¹ in order to inhibit bacterial growth in +AB labeled treatments. The -AB labeled treatments correspond to the untreated controls. In this experiment, MAAs were identified and quantified by HPLC.

Experiment 3: temperature effects on bioaccumulation of MAAs. This experiment assessed the effect of temperature on the rates of MAA bioaccumulation in *Boeckella gracilis* adults. The experiment had a factorial design consisting of five different temperatures (5, 8, 12, 16 and 20°C) crossed with two different radiation exposure conditions (exposure to PAR + UVR or maintained in the dark) (Table 2). This design allowed us to estimate the net gain, elimination and uptake rates of MAAs following the methods described by García *et al.* (11). This procedure assumes that MAA bioaccumulation represents the balance between uptake and elimination rates, it also assumes (i) that both processes (*i.e.* uptake and elimination) obey first-order kinetics and (ii) that uptake is induced exclusively when the copepods are exposed to PAR + UVR. For each temperature, the elimination constant was derived using data from the dark treatments, and the net-gain constants from the exposed treatments. Finally, the uptake constants were calculated as the sum of net-gain plus elimination constants. The formulae are as follows:

$$q = \frac{\ln([\text{MAAs}]_i) - \ln([\text{MAAs}]_{\text{dark}})}{\Delta t} \quad (1)$$

$$k - q = \frac{\ln([\text{MAAs}]_{\text{PAR+UVR}}) - \ln([\text{MAAs}]_i)}{\Delta t} \quad (2)$$

where q and k are the elimination and uptake rates, respectively, $k - q$ is the net gain rate of MAAs, $[\text{MAAs}]_i$ is the initial MAA concentration, $[\text{MAAs}]_{\text{dark}}$ and $[\text{MAAs}]_{\text{PAR+UVR}}$ are the final MAA concentration in the dark and PAR + UVR exposed treatments, and Δt is the experiment duration (see Table 2).

Experiment 4: effect of basal MAA concentration on MAA accumulation. To investigate the effect of the initial MAA concentration on the bioaccumulation rates of MAAs, batch cultures of *B. antiqua* differing in their levels of MAAs were assigned to two radiation treatments: exposed to PAR + UVR or maintained in the dark. Individuals with high, medium and low initial MAA concentrations were obtained from samples collected in September, October and November 2007, respectively. Copepods collected in November were incubated for 2 weeks in the dark before the experiment in an attempt to further reduce their initial MAA concentration. During this pre-experimental incubation, the copepods were maintained under similar conditions (temperature, feeding regime) to those used in the subsequent experiment (Table 2). The net gain, elimination and uptake rates of MAAs were calculated as described above.

Analytical procedures. Initial and final MAA concentrations of adult copepods in each experiment were estimated either by HPLC or, more frequently, by spectrophotometric scanning of aqueous methanolic extracts. For spectrophotometric determinations, frozen samples were macerated and MAAs were extracted in 3 mL of 25% aqueous MeOH for 2 h at 45°C (30). After centrifugation and filtration (GF/F), the extracts were scanned every 1 nm from 250 to 750 nm in a UV-visible spectrophotometer (Hewlett Packard P 8453-E, 1 cm path length quartz cuvette). MAA concentration was assumed proportional to the peak height at 334 nm corrected for baseline. MAAs were expressed as OD normalized by the copepod DW (OD mg⁻¹ DW).

The HPLC analyses of MAAs were performed following Tartarotti and Sommaruga (30). Lyophilized copepod samples were extracted in 25% aqueous methanol. Samples were sonicated (1 min at 0.5 cycles and 20% amplitude; Sonics Vibra cell) and the extracts were cleared by filtration (GF/F). Then, 300 μ L aliquots were injected in a chromatographer (Äktabasic; Amersham®) equipped with a Phenosphere of 5 mm pore size C-8 column (250 \times 4.6 mm internal diameter; Phenomenex®), protected with a RP-8 guard column (Brownlee®). Samples were run with a mobile phase of 0.1% acetic acid in 25% aqueous MeOH (vol:vol) and a flow rate of 0.79 mL min⁻¹. Measurements were carried out at 310, 332 and 334 nm and individual peaks were identified by relative retention time and maximum absorption wavelength (*i.e.* 310, 332 and 334). The total content of MAAs in each sample was calculated from HPLC peak areas, using published molar extinction coefficients (5). The MAA content was normalized to the DW of the sample and expressed as μ g mg⁻¹ DW.

Statistical analysis. The statistical significance of the results of experiments 1 and 4 was evaluated by one-way ANOVA, followed by the Bonferroni test of means comparisons. Experiment 2 was initially analyzed using a two-way ANOVA design, but subsequently the two radiation treatments were pooled and the final analysis was performed using one-way ANOVA, followed by the Dunnett test of means comparisons. The relationship between MAA bioaccumulation rates and temperature (experiment 3) was assessed by linear regression (31). Homoscedasticity and normality were tested before the analyses.

RESULTS

Presence of MAAs in copepods and food organisms

Table 3 summarizes the qualitative composition of MAAs in the four copepod species included in this study. The three

Table 3. MAA composition in the four copepod species and in the organisms used as food.

Species	MAA composition	Source
<i>Boeckella antiqua</i>	MAA332, MG, SH, PR	9, 11, this study
<i>Boeckella gracilis</i>	MAA332, MG, SH, PR	This study
<i>Boeckella gibbosa</i>	MAA332, MG, SH, PR, PI, AS, PL, US, PE.	6
<i>Parabroteas sarsi</i>	MAA332, MG, SH, PR	6, this study
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Not detectable	9, this study
<i>Daphnia obtusa</i>	Not detectable	This study

MAA 332 = mycosporine-like amino acid; MG = mycosporine glycine; SH = shinorine; PR = porphyra 334; PI = palythine; AS = asterina-330; PL = palythanol; US = usujirene; PE = palythene.

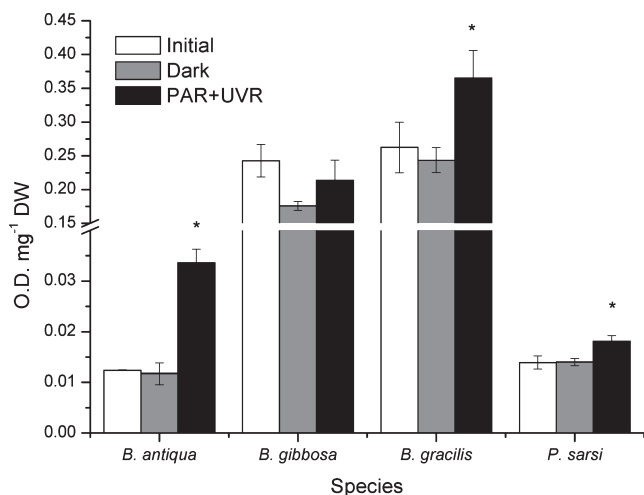


Figure 1. Effect of PAR + UVR exposure on the concentration of MAAs. For each species, the figure shows the (i) initial concentration, and the concentrations by the end of the experiment of individuals (ii) maintained in darkness or (iii) exposed to PAR + UVR. Within each species the treatment labeled with a star is significantly different from the other two treatments (one-way ANOVA followed by Bonferroni test of means comparisons, $P < 0.05$). Notice the scale break in the y-axis. PAR = photosynthetically active radiation; UVR = UV radiation.

species occurring in piedmont lakes share the same set of four MAAs, while *B. gibbosa*, which occurs in lakes above the tree line, has a more diverse assembly of MAA compounds. The total amount of MAAs (estimated as OD mg⁻¹ DW) present in individuals collected in the field was higher in *B. gibbosa* and *B. gracilis* than in *B. antiqua* and *P. sarsi* (see initial values in Fig. 1). HPLC analysis confirmed the lack of MAAs in the two organisms used as food in the experiments, *C. reinhardtii* and *D. obtusa*.

Experiment 1: induction of MAA bioaccumulation by radiation exposure

By the end of the experiment, the concentration of MAAs in *B. antiqua*, *B. gracilis* and *P. sarsi* was significantly higher in individuals exposed to PAR + UVR than in the organisms maintained in the dark. Although the trend in *B. gibbosa* looks similar, the differences in this case were not statistically significant (Fig. 1). In addition, the copepods maintained in the dark presented MAA concentrations that did not differ statistically from the values measured at the beginning of the experiment. The concentrations of MAAs in *B. antiqua*, *B. gracilis* and *P. sarsi* after being exposed to PAR + UVR were significantly higher than the corresponding initial concentrations. On the other hand, the difference between PAR + UVR and initials was not statistically significant for *B. gibbosa* (Fig. 1).

Experiment 2: effect of antibiotic on copepod bioaccumulation of MAAs

In this experiment, *B. antiqua* individuals were exposed to two different radiation conditions, namely PAR or PAR + UVR in the presence or absence of antibiotics in the culture media. Neither the different exposure conditions nor the addition of

the antibiotic affected the qualitative composition of MAAs, which consisted of mycosporine glycine, MAA-332, shinorine and porphyra-334. Quantitatively however, the two-way ANOVA analysis (radiation conditions × antibiotics) detected significant differences due to the presence *vs* absence of antibiotics, but did not detect differences due to the two radiation exposure assayed ($P > 0.1$ for all comparisons). Consequently, the two radiation treatments were pooled for completing the analysis of the effect of the addition of antibiotics.

In the absence of antibiotic, the exposure to radiation (either PAR alone or PAR + UVR) resulted in a significant increase in total MAA concentration compared to the initial values (Fig. 2). This increase was mostly due to increases in the concentration of shinorine and porphyra-334. In contrast, the individuals treated with antibiotic did not display increases in their total MAA concentration nor in the concentration of individual compounds. Regardless of the presence or absence of antibiotic, the copepods displayed a decrease in the concentration of mycosporine glycine compared to the initial concentration (Fig. 2). The mortality was slightly, but significantly higher (13.9%) in the treatments that received antibiotics ($F = 9.276$; $P = 0.010$; $n = 16$).

Experiment 3: temperature effects on bioaccumulation of MAAs

Uptake and elimination rates of MAAs, as estimated by a first-order kinetics model, were assessed for five different temperatures and their potential dependence with temperature was analyzed by means of linear regression models. Both rates were directly related to temperature: uptake ($r = 0.63$, $P = 0.01$), elimination ($r = 0.67$, $P = 0.006$) (Fig. 3).

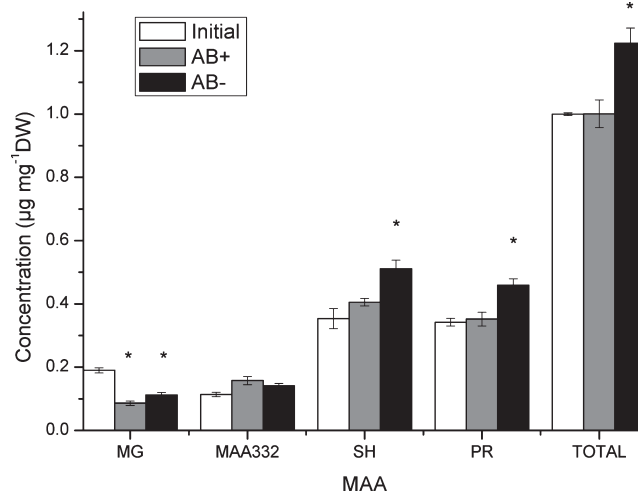


Figure 2. Effect of radiation exposure (PAR and PAR + UVR were pooled) and the addition of the bacteriostatic antibiotic, chloramphenicol, on the accumulation of MAAs in *Boeckella antiqua*. Within each individual compound, the treatments labeled with a star are significantly different from the initials (one-way ANOVA followed by Dunnett test of means comparisons, $P < 0.05$). PAR = photosynthetically active radiation; UVR = UV radiation; MAA = mycosporine-like amino acid; MG = mycosporine glycine; SH = shinorine; PR = porphyra 334.

Experiment 4: effect of basal concentration of MAAs on MAA accumulation

The initial concentration of MAAs in *B. antiqua* affected the net rate at which these compounds are accumulated upon UVR exposure. The final concentrations of MAAs achieved by *B. antiqua* bearing high, medium and low initial concentrations of MAAs increased by $28 \pm 9\%$, $137 \pm 22\%$ and $171 \pm 26\%$, respectively. The uptake and net gain rates were significantly lower when the initial concentration of MAA was high ($0.038 \mu\text{g mg}^{-1} \text{ DW}$) than when the initial concentrations were medium ($0.022 \mu\text{g mg}^{-1} \text{ DW}$) or low ($0.012 \mu\text{g mg}^{-1} \text{ DW}$) (Fig. 4). On the other hand, the elimination rate was higher (although not statistically significantly) for individuals starting with high initial concentration of MAAs.

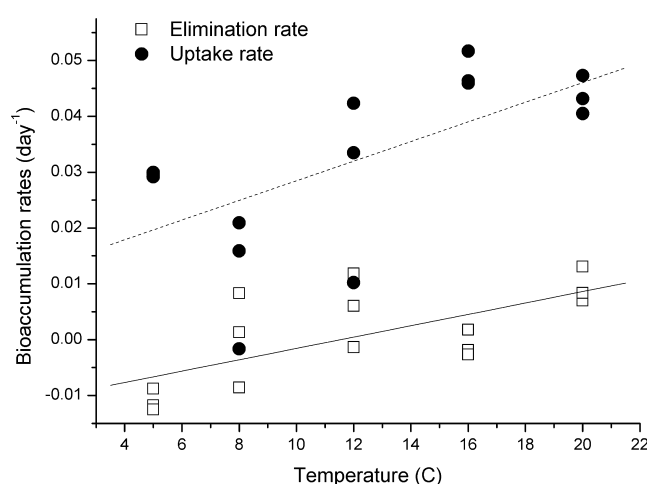


Figure 3. Scatter plot of total mycosporine-like amino acid elimination and uptake rates vs the incubation temperature in *Boeckella gracilis*. The lines correspond to the linear regression fit. Both relationships are statistically significant—elimination: $r = 0.67$, $n = 15$, $P = 0.006$; uptake: $r = 0.63$, $n = 15$, $P = 0.01$.

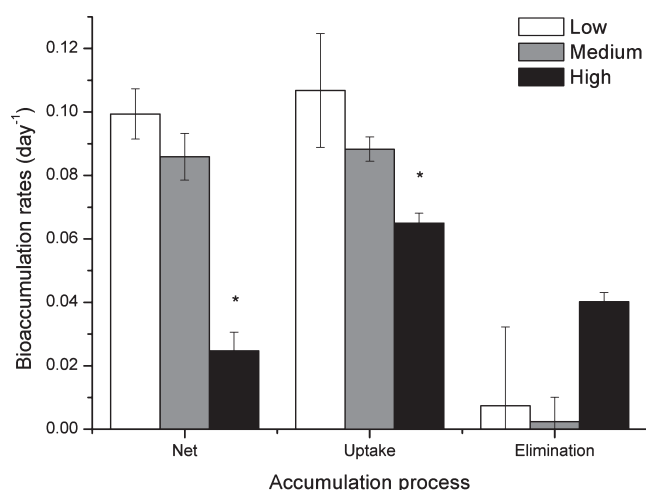


Figure 4. Effect of the initial concentration of mycosporine-like amino acid on the subsequent accumulation of these compounds in *Boeckella antiqua*. Within each rate, the treatment labeled with a star is significantly different from the other two treatments (one-way ANOVA followed by Bonferroni test of means comparisons, $P < 0.05$).

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The four copepod species included in this study share a suite of four MAAs, namely mycosporine glycine, MAA-332, shinorine and porphyra 334. In addition, *B. gibbosa* has been reported to include palythine, asterine-330, palythanol, usujirene and palythene. The levels of total MAAs (estimated as $\text{OD mg}^{-1} \text{ DW}$) present in individuals freshly collected from the field were higher in *B. gibbosa* and *B. gracilis* than in *B. antiqua* and *P. sarsi*. These estimations are compatible with the concentrations measured by HPLC either in this study or in previous reports, *i.e.* MAAs are higher in *B. gibbosa* (0.37–0.86% of DW [6]) and *B. gracilis* (0.45% of DW, this study) than in *B. antiqua* (0.13% of DW [9]) and *P. sarsi* (0.13% of DW [6]).

The copepods were able to adjust their MAA levels in response to the radiation conditions assayed in experiment 1. As a general rule, exposure to PAR + UVR resulted in comparatively higher concentration of MAAs than when incubated in the dark. After exposure to PAR + UVR, the MAA concentration increased by about 175% in *B. antiqua*, 40% in *B. gracilis* and 30% in *P. sarsi* (Fig. 1). The apparent increase in *B. gibbosa* was not statistically significant. It is interesting to note that *B. gibbosa* inhabits exclusively high elevation lakes in the Andean region of Argentina and Chile from 32° to 42°S (32). Particularly, the lake from which this species was collected, Lake Schmolli, is so transparent that nearly 50% of the incident solar UVR reaches the bottom (33). The fact that the levels of radiation assayed in the experiments were lower than those typically experienced by *B. gibbosa* in their natural habitat may explain the failure to further increase the concentration of MAAs experimentally.

The induction of photoprotective compound bioaccumulation by UVR is well established in zooplankton. Several authors have reported that organisms from highly exposed habitats contain high amounts of melanins (34–36), carotenoids (26,37) and MAAs (6,26,38). In freshwater copepods the photoinduction of MAAs has been documented in field (5,6,25,38), as well as in experimental studies (7,9–11,39).

The source of MAAs may differ for different taxonomic groups. Some organisms, *e.g.* the sea urchin *Strongylocentrotus deobrachiensis* (40), the sea hare *Aplysia dactylomela* (16), the crustaceans *Amphitoe valida*, *Idothea baltica* (22), the larvae of the phantom midge *Chaoborus* (19) and *Euphausia superba* (18), have been reported to acquire MAAs from the diet. Other potential sources of MAAs have also been proposed. For example, the symbiotic zooxanthellae *Symbiodinium* is thought to provide MAAs to its host, the coral *Stylophora pistillata* (41). MAAs may also be acquired from prokaryotic microflora as has been proposed for the scleractinian coral *Goniastrea retiformis* (42). The opinion that food organisms are the source of MAAs in freshwater copepods is widespread in the literature, but to our knowledge the only study that specifically addressed this issue in copepods is the one by Moeller *et al.* (7). These authors presented convincing evidence suggesting that a diet including the MAA-rich dinoflagellate, *Peridinium inconspicuum*, induced the accumulation of MAAs in *Leptodiaptomus minutus*. In contrast, in the experiments reported here, none of the organisms used as food (*C. reinhardtii* and *D. obtusa*) had measurable amounts of MAAs, but we could nevertheless observe increases in MAA concentration in three

out of four species (*i.e.* *B. antiqua*, *B. gracilis* and *P. sarsi*). These findings are consistent with previous reports by García *et al.* (11) who found that *B. antiqua* accumulates MAAs in the absence of a dietary source of MAAs.

The nondietary origin of MAAs in centropagid copepods is also supported by the results of the experiment in which the copepods were treated with the bacteriostatic antibiotic chloramphenicol. In the absence of the antibiotic, exposure to PAR or PAR + UVR resulted in higher shinorine, porphyrin-334 and total MAA concentrations. However, the accumulation of shinorine, porphyrin-334 and total MAAs was inhibited in those individuals treated with chloramphenicol. In contrast, the observed decrease in mycosporine glycine cannot be attributed to the antibiotic, given that it occurred regardless of the presence or absence of chloramphenicol. Yakovleva and Baird (42) also reported that the decreases in mycosporine glycine in the coral *G. retiformis* were unrelated to the treatment with the antibiotic rifampicin.

Chloramphenicol inhibits protein synthesis in prokaryotic cells, and to a lesser extent, in the mitochondria of eukaryotic cells (43). Although bacteria are present in the copepod culture media, filtrates of this media do not contain measurable amounts of MAAs. Therefore, we suspect that the accumulation of MAAs is not related to free-living bacteria, but to microorganisms living in close association with the copepods. Similarly, Yakovleva and Baird (42) observed that the overall accumulation of MAAs in *G. retiformis* was inhibited by the antibiotic rifampicin. These authors suggested a potential contribution of prokaryotes associated with the animal tissue. Several studies have reported the presence of microorganisms in close association with marine and freshwater zooplankton and discussed the relevance of microbial products for their host invertebrates (44,45). Microbes may be either ingested transients or residents (46) and particularly in marine copepods, they are associated with the surface and the gut (47).

There is no doubt that exposure to solar radiation stimulates the accumulation of MAAs in copepods. But we believe that the frequent assumption that the present concentration of these compounds must match current UVR exposure conditions is not always valid, and that additional variables are likely to affect the rate at which these compounds are acquired. In fact, there is strong evidence that the bioaccumulation of MAAs depends not only on radiation exposure but also on temperature. As already reported for *B. antiqua* (11), here we observed that both the uptake and elimination rates of MAAs in *B. gracilis* increased with temperature (Fig. 3).

An important caveat of these results is related to the assumptions implicit in the set of equations used to estimate the bioaccumulation rates. Clearly, the adoption of a first-order kinetics is a crude approximation of the actual metabolic process of MAA accumulation. The inadequacy of the first-order kinetics model is further demonstrated by the dependence of the bioaccumulation rates on the initial MAA concentration (Fig. 4), which points to the saturability of MAA uptake, as suggested by Mason *et al.* (17) for the *in vitro* uptake of shinorine by human skin carcinoma (A431) cells. The use of this approximation obeyed two major methodological constraints: firstly, the difficulties inherent in the manipulation of the initial MAA concentration, as for the copepods assayed here, as well as for other animal groups (18,19,40), it takes a long time to significantly reduce their

MAA concentration even if maintained under darkness; and secondly, the increase in copepod mortality as the duration of the experiments increases.

Although the accumulation of MAAs is certainly stimulated by UVR and PAR, we are far from understanding if there are "optimal MAA concentrations" corresponding to different degrees of radiation exposure. MAAs may be involved in additional metabolic functions, such as reproduction, osmotic control (reviewed by Shick and Dunlap [8]) and nitrogen storage (48), which may also influence the requirement of MAAs of an organism. It is also conceivable that MAAs are accumulated in excess under propitious environmental conditions and stored until needed. In this case, the measured MAA concentrations may be higher than those actually required by the organism. Reciprocally, there may be a time lag (days to months) between the environmental signal that stimulates the accumulation of MAAs and the actual acquisition of these compounds (18,25,27,49). Moreover, if the source of MAAs were confirmed to have a symbiotic origin, would the MAA concentration correspond to the requirements of the host or that of its guest organisms? The previous discussion suggests that there is little support for assuming that the MAA concentrations of wild animals should be exclusively defined by recently experienced radiation conditions. The approach that we took here, as well as in our previous work (11), does not rely on *a priori* assumptions on the potential functions of MAAs; instead we limited ourselves to investigate factors that are likely to affect the "rates" at which MAAs are accumulated. We believe that despite the methodological shortcomings mentioned above, the approach is still useful to identify additional factors, such as temperature and basal MAA concentration, which play important roles in the process of MAA bioaccumulation in copepods.

Acknowledgements—We thank G. Pérez for providing assistance with HPLC analysis and D. Añón Suárez, M. Serra, J. López-Ramos, L. Mercado, F. Jara and L. Fasoli for field assistance. This work was supported by ANPCyT (PICT-2007 02035 and 01205) and CONICET (PIP 6451). We thank two anonymous reviewers for their comments and suggestions on an earlier version of this manuscript.

REFERENCES

- Sommaruga, R. and F. García Pichel (1999) UV-absorbing mycosporine-like compounds in planktonic and benthic organisms from a high-mountain lake. *Arch. Hydrobiol.* **144**, 255–269.
- Sinha, R. P., S. P. Singh and D.-P. Häder (2007) Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **89**, 29–35.
- Dunlap, W. C. and Y. Yamamoto (1995) Small-molecule antioxidants in marine organisms: Antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comp. Biochem. Physiol.* **112B**, 105–114.
- Adams, N. L. and J. M. Shick (1996) Mycosporine-like amino acids provide protection against ultraviolet radiation in eggs of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Photochem. Photobiol.* **64**, 149–158.
- Tartarotti, B., I. Laurion and R. Sommaruga (2001) Large variability in the concentration of mycosporine-like amino acids among zooplankton from lakes located across an altitude gradient. *Limnol. Oceanogr.* **46**, 1546–1552.
- Tartarotti, B., G. Baffico, P. Temporetti and H. Zagarese (2004) Mycosporine-like amino acids in planktonic organisms living under different UV exposure conditions in Patagonian lakes. *J. Plankton Res.* **26**, 753–762.

7. Moeller, R., S. Gilroy, C. Williamson and G. Grad (2005) Dietary acquisition of photoprotective compounds (mycosporine-like amino acids, carotenoids) and acclimation to ultraviolet radiation in a freshwater copepod. *Limnol. Oceanogr.* **50**, 437–493.
8. Shick, M. and W. Dunlap (2002) Mycosporine-like amino acids and related gadusols: Biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 223–262.
9. Pérez, A. P., D. Libkind, M. C. Diéguez, M. Summerer, B. Sonntag, R. Sommaruga, M. van Broock and H. E. Zagarese (2006) Mycosporines from freshwater yeasts: A trophic cul-de-sac? *Photochem. Photobiol. Sci.* **5**, 25–30.
10. Hansson, L.-A., S. Hylander and R. Sommaruga (2007) Escape from UV threats in zooplankton: A cocktail of behavior and protective pigmentation. *Ecology* **88**, 1932–1939.
11. García, P. E., A. P. Pérez, M. d. C. Diéguez, M. A. Ferraro and H. E. Zagarese (2008) Dual control of the levels of photoprotective compounds by ultraviolet radiation and temperature in the freshwater copepod *Boeckella antiqua*. *J. Plankton Res.* **30**, 817–827.
12. Favre-Bonvin, J., J. Bernillon, N. Salin and N. Arpin (1987) Biosynthesis of mycosporines: Mycosporine-glutaminol in *Trichothecium roseum*. *Phytochemistry* **26**, 2509–2514.
13. Bentley, R. and E. Haslam (1990) The shikimate pathway: A metabolic tree with many branches. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**, 307–384.
14. Herrmann, K. M. and L. M. Weaver (1999) The shikimate pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 473–503.
15. Starcevic, A., S. Akhtar, W. C. Dunlap, J. M. Shick, D. Hranueli, J. Cullum and P. F. Long (2008) Enzymes of the shikimic acid pathway encoded in the genome of a basal metazoan, *Nematostella vectensis*, have microbial origins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 2533–2537.
16. Carefoot, T. H., M. Harris, B. E. Taylor, D. Donovan and D. Karentz (1998) Mycosporine-like amino acids: Possible UV protection in eggs of the sea hare *Aplysia dactylomela*. *Mar. Biol.* **130**, 389–396.
17. Mason, D. S., F. Schafer, J. M. Shick and W. C. Dunlap (1998) Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids (MAAs) are acquired from their diet by medaka fish (*Oryzias latipes*) but not by SKH-1 hairless mice. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **120**, 587–598.
18. Newman, S. J., W. C. Dunlap, S. Nicol and D. Ritz (2000) Antarctic krill (*Euphausia superba*) acquire a UV-absorbing mycosporine-like amino acid from dietary algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **255**, 93–110.
19. Nagiller, K. and R. Sommaruga (2009) Differential tolerance of UV radiation between *Chaoborus* species and role of photoprotective compounds. *J. Plankton Res.* **31**, 503–513.
20. Banaszak, A. T. and R. K. Trench (1995) Effects of ultraviolet (UV) radiation on marine microalgal-invertebrate symbioses. 2. The synthesis of mycosporine-like amino acids in response to exposure to UV in *Anthopleura elegantissima* and *Cassiopsea xamachana*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **194**, 233–250.
21. Sonntag, B., M. Summerer and R. Sommaruga (2007) Sources of mycosporine-like amino acids in planktonic *Chlorella*-bearing ciliates (Ciliophora). *Freshw. Biol.* **52**, 1476–1485.
22. Helbling, E. W., C. F. Menchi and V. E. Villafañe (2002) Bioaccumulation and role of UV-absorbing compounds in two marine crustacean species from Patagonia, Argentina. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**, 820–825.
23. Yakovleva, I. and M. Hidaka (2004) Diel fluctuations of mycosporine-like amino acids in shallow-water scleractinian corals. *Mar. Biol.* **145**, 863–873.
24. Kuffner, I. B. (2005) Temporal variation in photosynthetic pigments and UV-absorbing compounds in shallow populations of two Hawaiian reef corals. *Pac. Sci.* **59**, 561–580.
25. Tartarotti, B. and R. Sommaruga (2006) Seasonal and ontogenetic changes of mycosporine-like amino acids in planktonic organisms from an alpine lake. *Limnol. Oceanogr.* **51**, 1530–1541.
26. Persaud, A. D., R. E. Moeller, C. E. Williamson and C. W. Burns (2007) Photoprotective compounds in weakly and strongly pigmented copepods and co-occurring cladocerans. *Freshw. Biol.* **52**, 2121–2133.
27. Riemer, U., M. D. Lamare and B. M. Peake (2007) Temporal concentrations of sunscreen compounds (mycosporine-like amino acids) in phytoplankton and in the New Zealand krill, *Nyctiphanes australis* G.O. Sars. *J. Plankton Res.* **29**, 1077–1086.
28. Nusch, E. A. (1980) Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* **14**, 14–36.
29. Chambers, H. F. (1998) Chloramphenicol, tetracyclines, macrolides, clindamycin and streptogramins. In *Basic and Clinical Pharmacology* (Edited by B. G. Katzung), pp. 749–750. Appleton-Lange, Norwalk, CT.
30. Tartarotti, B. and R. Sommaruga (2002) The effect of different methanol concentrations and temperatures on the extraction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in algae and zooplankton. *Arch. Hydrobiol.* **154**, 691–703.
31. Zar, J. (1999) *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ.
32. Menu Marque, S., J. J. Morrone and C. Locascio de Mitrovich (2000) Distributional patterns of the South American species of *Boeckella* (Crustacea: Copepoda: Centropagidae): A track analysis. *J. Crust. Biol.* **20**, 262–272.
33. Morris, D. P., H. E. Zagarese, C. E. Williamson, E. G. Balseiro, B. R. Hargreaves, B. Modenutti, R. Moeller and C. Queimaliños (1995) The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnol. Oceanogr.* **40**, 1381–1391.
34. Hebert, P. D. N. and C. J. Emery (1990) The adaptive significance of cuticular pigmentation in *Daphnia*. *Funct. Ecol.* **4**, 703–710.
35. Rhode, S. C., M. Pawlowski and R. Tollrian (2001) The impact of ultraviolet radiation on the vertical distribution of zooplankton of the genus *Daphnia*. *Nature* **412**, 69–72.
36. Rautio, M. and A. Korhola (2002) UV-induced pigmentation in subarctic *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* **47**, 295–299.
37. Hairston, N. G. (1976) Photoprotection by carotenoid pigments in the copepod *Diaptomus nevadensis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **73**, 971–974.
38. Rocco, V. E., O. Oppezzo, R. Pizarro, R. Sommaruga, M. A. Ferraro and H. E. Zagarese (2002) Ultraviolet damage and counteracting mechanisms in the freshwater copepod *Boeckella poppei* from the Antarctic Peninsula. *Limnol. Oceanogr.* **47**, 829–836.
39. Helbling, E. W., F. Zaratti, L. O. Sala, E. R. Palenque, C. F. Menchi and V. E. Villafañe (2002) Mycosporine like amino acids protect the copepod *Boeckella titicacae* (Harding) against high levels of solar UVR. *J. Plankton Res.* **24**, 225–234.
40. Carroll, A. K. and J. M. Shick (1996) Dietary accumulation of UV-absorbing mycosporine-like amino acids (MAAs) by the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Mar. Biol.* **124**, 561–569.
41. Shick, M., C. Ferrier-Pagès, R. Grover and D. Allemand (2005) Effects of starvation, ammonium concentration, and photosynthesis on the UV-dependent accumulation of mycosporine-like amino acids (MAAs) in the coral *Stylophora pistillata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **295**, 135–156.
42. Yakovleva, I. M. and A. H. Baird (2005) Ontogenetic change in the abundance of mycosporine-like amino acids in non-zooxanthellate coral larvae. *Coral Reefs*. **24**, 443–452.
43. Goodman, L. and A. Gilman (1996) *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. McGraw-Hill Interamericana, New York.
44. Peter, H. and R. Sommaruga (2008) An evaluation of methods to study the gut bacterial community composition of freshwater zooplankton. *J. Plankton Res.* **30**, 997–1006.
45. Tang, K., C. Dziallas, K. Hutalle-Schmelzer and H.-P. Grossart (2009) Effects of food on bacterial community composition associated with the copepod *Acartia tonsa* Dana. *Mar. Biol. Lett.* **5**(4), 549–553.
46. Harris, J. (1993) The presence, nature and role of gut microflora in aquatic invertebrates: A synthesis. *Microb. Ecol.* **25**, 195–231.
47. Sochard, M. R., D. F. Wilson, B. Austin and R. R. Colwell (1979) Bacteria associated with the surface and gut of marine copepods. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 750–759.
48. Oren, A. and N. Gunde-Cimerman (2007) Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? *FEMS Microbiol. Lett.* **269**, 1–10.
49. Villafañe, V. E., E. W. Helbling, O. Holm-Hansen and B. E. Chalker (1995) Acclimatization of Antarctic natural phytoplankton assemblages when exposed to solar ultraviolet radiation. *J. Plankton Res.* **17**, 2295–2306.