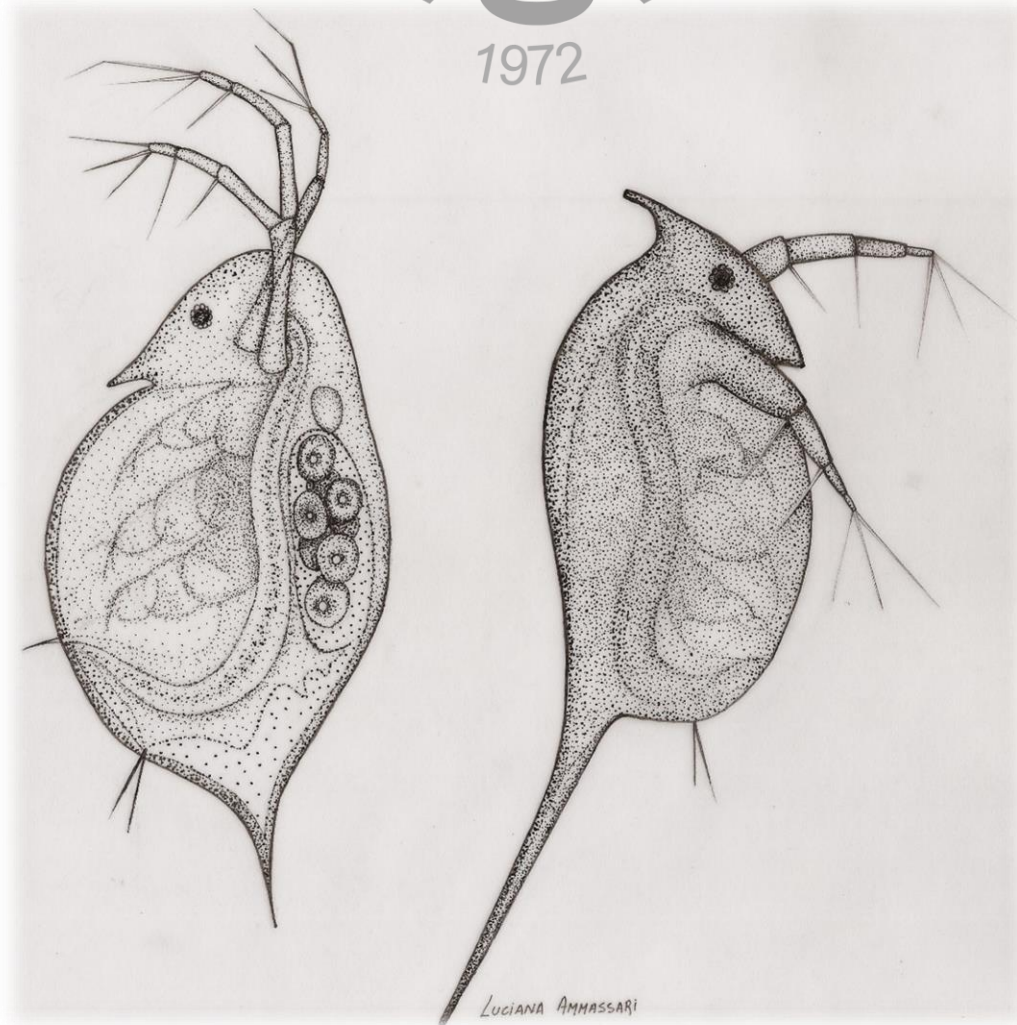


Universidad Nacional del Comahue
Centro Regional Universitario Bariloche

*Respuestas eco-fisiológicas de
Daphnia frente a la radiación
ultravioleta y variables ambientales*



Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor en Biología

Lic. Laura Wolinski

Directora: Dra. Beatriz Modenutti

Co-Director: Dr. Esteban Balseiro

2018

AGRADECIMIENTOS

A mis directores Beatriz, Esteban y Sol, que entre otras tantas cosas trabajaron a la par conmigo, dedicando tiempo, paciencia, ganas e interés. Sobre todo, por hacer el trabajo más ameno y enseñarme a tener un pensamiento crítico a lo largo de este período.

A mis compañerxs del Limnolab, Marce, Vero, Flor, Chili, Nico, Caro, Uara, Luca, Eve, Cande y Facu. Por ser parte de mi día a día y por acompañarnos y apoyarnos en nuestro trabajo y proyectos, tanto académicamente como personalmente.

A mis amigxs de Bariloche, que son mi segunda familia. Gracias por tanto, son lo mejor que me pasó en estos años. Particularmente a Lu, que aparece en la portada de esta Tesis. A Gon, Chini, Ani, Guada, Dani y Diego por acompañarme a muestrear.

Especialmente a mi familia y sobre todo a mis padres (Los abuelos Beto y Susy), que aunque la distancia nos separe siempre están cerca. A Nacho y Martincho, que también fueron parte de los muestreos. A Luján, que también es familia.

A la Universidad Nacional del Comahue por haberme dado la posibilidad recibirme de Bióloga y continuar mis estudios de posgrado.

A la educación pública en la Argentina, que esperemos no tener que seguir defendiendo.

Al INIBIOMA, CONICET y MINCyT por darme lugar de trabajo y las becas para poder realizar este doctorado.

Este trabajo se pudo llevar a cabo gracias a los subsidios otorgados por el FONCyT: PICT 2012-0929, 2011-2240, 2014-1002, 2015-0418.

ÍNDICE

Abreviaturas:	a
Resumen	i
Abstract	v
CAPITULO I.....	9
Introducción General	9
<i>Objetivo General:</i>	18
<i>Objetivos específicos:</i>	18
<i>Hipótesis:</i>	19
CAPITULO II.....	20
Efecto de la RUV en el proceso de muda de <i>Daphnia commutata</i> , utilizando la actividad de la Quitobiasa como indicador.	20
Introducción	20
<i>Objetivo:</i>	23
<i>Hipótesis:</i>	23
<i>Predicciones:</i>	23
Materiales y métodos	24
<i>Experimento de exposición a RUV</i>	24
<i>Experimento de recuperación</i>	25
<i>Características de la luz</i>	25
<i>Determinaciones bioquímicas</i>	26
<i>Análisis estadístico</i>	26
Resultados	28
<i>Experimento de exposición a RUV</i>	28
<i>Experimento de recuperación</i>	30
Discusión	31
CAPITULO III	34

Efectos interactivos entre calidad de alimento, temperatura y RUV en la actividad de la fosfatasa alcalina en <i>Daphnia commutata</i>	34
Introducción	34
<i>Objetivo:</i>	37
<i>Hipótesis:</i>	37
<i>Predicciones:</i>	37
Materiales y métodos	38
<i>Diseño experimental con RUV</i>	38
<i>Características de la luz</i>	40
<i>Cultivo de algas</i>	41
<i>Efecto de estrés oxidativo en AFA</i>	41
<i>Determinaciones bioquímicas</i>	42
<i>Análisis estadístico</i>	43
Resultados	44
<i>Crecimiento somático de <i>Daphnia commutata</i> bajo diferentes temperaturas y calidades de alimento</i>	44
<i>Experimento de exposición a RUV</i>	45
<i>Experimento de reparación de RUV</i>	47
<i>Efectos del estrés oxidativo en GST y AFA</i>	48
Discusión	50
CAPITULO IV	53
Análisis del nivel de estrés oxidativo generado por la exposición a RUV en dáfnidos con pigmentos foto-protectores (<i>Daphnia dadayana</i>)	53
Introducción:	53
<i>Objetivo:</i>	56
<i>Hipótesis:</i>	56
<i>Predicciones:</i>	56
Materiales y métodos	57

<i>Experimento exposición a RUV</i>	57
<i>Características de la luz</i>	58
<i>Análisis de imágenes</i>	58
<i>Determinaciones bioquímicas</i>	59
<i>Análisis estadístico</i>	59
Resultados	61
Discusión	64
CAPITULO V	66
Balance entre producción de defensas plásticas y defensas antioxidantes enzimáticas en <i>Daphnia dadayana</i>	66
Introducción	66
<i>Objetivo:</i>	69
<i>Hipótesis:</i>	69
<i>Predicción:</i>	69
Materiales y métodos	70
<i>Experimento</i>	70
<i>Determinaciones morfológicas</i>	72
<i>Características de la luz</i>	72
<i>Determinaciones bioquímicas</i>	73
<i>Análisis estadístico</i>	73
Resultados	74
Discusión	77
CAPITULO VI	79
Conclusiones generales.....	79
Bibliografía.....	83

Abreviaturas:

AFA = Actividad de fosfatasa alcalina

C:P = Relación Carbono: Fósforo atómico

CO₂ = Dióxido de carbono

EROs = Especies reactivas de oxígeno

GST = Glutathión S-Transferasa

H₂O₂ = Peróxido de hidrógeno

MOD = Materia orgánica disuelta

MOP = Materia orgánica particulada

N = Nitrógeno

P = Fósforo

RFA = Radiación fotosintéticamente activa

RUV = Radiación ultravioleta

QB = Quitobiasa

Resumen

Los grandes lagos del norte de la Patagonia Andina se caracterizan por ser muy profundos, ultraoligotróficos y albergar especies zooplanctónicas con estrategias para enfrentar a bajas calidades y cantidades de alimento y altas radiaciones de luz. Por otra parte, en la región también se pueden encontrar numerosos pequeños lagos someros con características diferentes; ya que poseen una mayor concentración de materia orgánica disuelta que disminuye la penetración de luz. A pesar de los contrastes entre estos ambientes, ambos son sensibles a los cambios climáticos globales vinculados a incrementos en la Radiación Ultravioleta (RUV); lo que produce que los organismos exhiban respuestas frente a estos cambios. El objetivo de esta Tesis fue analizar las estrategias fisiológicas que poseen dos especies planctónicas del género *Daphnia* (*D. commutata* y *D. dadayana*) frente a escenarios actuales y futuros de incremento en la RUV en interacción con otros factores. Estas dos especies habitan ambientes contrastantes, *D. commutata* es característica de lagos profundos y transparentes mientras que *D. dadayana* de lagos someros y con mayor concentración de materia orgánica disuelta.

Una vez que llega a la superficie de la Tierra y a un cuerpo de agua, una parte de la luz solar penetra la columna de agua atenuándose a medida que llega a mayor profundidad. Además de la propia molécula de agua, la materia orgánica disuelta y la particulada son los factores que mayor efecto ejercen en la atenuación de la luz. En particular, las longitudes de onda que comprenden entre los 280 y 380 nm se caracterizan por su gran reactividad con el agua y con moléculas orgánicas generando subproductos reactivos de oxígeno (EROs, “especies reactivas de oxígeno”) que causan daño celular afectando a los organismos. El estrés oxidativo resulta del desbalance entre la manifestación de EROs y la capacidad biológica del sistema de neutralizarlos. Para hacer frente a este estrés, los organismos pueden exhibir diferentes estrategias. Dentro de ellas pueden aumentar sus defensas, como por ejemplo las enzimas antioxidantes o los pigmentos fotoprotectores, con la finalidad de neutralizar la reactividad de las EROs y su potencial daño celular.

Esta Tesis fue organizada en 6 capítulos. En el primero se presentan e introducen los conceptos teóricos a analizar a lo largo del trabajo, las hipótesis planteadas y los objetivos generales y específicos. En el segundo capítulo se analiza en *Daphnia*

commutata el efecto de la RUV en la actividad de una enzima involucrada en el proceso de muda. En el tercer capítulo se analiza también en *D. commutata*, el efecto interactivo de la RUV con la calidad de alimento y la temperatura sobre una enzima antioxidante (Glutation S-Transferasa, GST) y otra encargada de hacer disponible un nutriente limitante como el fósforo (fosfatasa alcalina). En el cuarto capítulo se analiza la respuesta enzimática antioxidante de *Daphnia dadayana* frente a la exposición a RUV y se evalúa la importancia de la melanina como pigmento fotoprotector. En el quinto capítulo se analiza también en *D. dadayana* si la respuesta a la RUV se afecta por el desarrollo de estructuras anti-depredatorias (yelmo). Por último, en el sexto capítulo se incluyen las conclusiones finales de la Tesis.

La quitobiasa (QB) es una enzima encargada de degradar la quitina del exosqueleto en artrópodos para que pueda desprenderse adecuadamente de la nueva cutícula en el momento de la muda. En ese momento el zooplankton se encuentra expuesto y vulnerable. Por esta razón, en el segundo capítulo se evaluó el efecto de la RUV en la enzima QB y el consecuente efecto en el proceso de muda de *D. commutata*. Para llevar a cabo esto, se expuso a neonatos de *D. commutata* de la misma cohorte a 2 h de RUV por día durante 8 días y se extrajeron ejemplares a diario para las determinaciones de la actividad de la QB. Los resultados obtenidos indicaron que la RUV produce una desincronización, tanto para la actividad de QB como para la sincronización de la cohorte para mudar. También se observó una disminución en el crecimiento de los individuos expuestos a RUV en particular a los cuatro días de exposición. Este efecto de la RUV en la sincronización de la muda se podría ver reflejado, no sólo en el crecimiento, sino también en la reproducción, ya que los neonatos tendrían dificultades para poder salir del nuevo caparazón.

Mediante un experimento de laboratorio se analizó cómo *D. commutata* responde a la combinación de factores de estrés utilizando la actividad de la fosfatasa alcalina (AFA) como un proxy del requerimiento de fósforo y a la Glutation-S-Transferasa (GST) como un biomarcador del estrés oxidativo. Los experimentos de laboratorio consistieron en criar durante una semana individuos de *D. commutata* desde neonatos con tres calidades de alimento (baja, media y alta) y a dos temperaturas distintas (10 °C y 20 °C). El día siete fueron expuestos a RUV y luego medir la actividad enzimática antioxidante (GST) y la respuesta en la AFA. Se observó que la calidad del alimento afecta las respuestas frente a factores de estrés, como la RUV y la temperatura. Los resultados

mostraron que cuando *D. commutata* se encuentra con baja calidad de alimento y a una temperatura de 20 °C se ve limitada su actividad antioxidante. Bajo estas condiciones se registró una baja capacidad de respuesta frente al efecto de la radiación ultravioleta en comparación con el mismo tratamiento con media y buena calidad de alimento. Por otra parte, también disminuyó la capacidad de adquirir fósforo del alimento (AFA) y este efecto se vio incrementado aún más por la exposición a RUV. En cambio, a 10 °C, hubo una clara respuesta al incrementar la AFA en las calidades de alimento baja y media en comparación con alta calidad. La calidad del alimento resultó un factor muy importante para los escenarios futuros donde según las predicciones del cambio climático podría aumentar la temperatura y la incidencia de RUV en los ambientes acuáticos.

Los pigmentos fotoprotectores son la primera barrera contra el posible daño causado por la RUV. En la región se observaron individuos melánicos de *Daphnia*, por lo cual en el cuarto capítulo se planteó analizar la respuesta plástica de aumento de la concentración de melanina vs la actividad de antioxidantes frente a la exposición a RUV. Para ello se expusieron o no (tratamiento y control) individuos del cladócero melánico *D. dadayana* desde neonatos, a RUV por 2 horas todos los días, durante una semana. A través de fotografías laterales se midió la intensidad del pigmento del caparazón de *D. dadayana* día a día y al finalizar el experimento se midió la actividad de GST para determinar el nivel de estrés oxidativo de *D. dadayana*. Los resultados mostraron que hay un incremento de la concentración de melanina en el tiempo cuando *D. dadayana* está expuesta a RUV, indicando el carácter inducible de esta defensa. Por otro lado, la actividad de GST no presentó diferencias significativas entre control y tratamiento de RUV. Este resultado podría estar reflejando la efectividad de la melanina que sintetiza *D. dadayana* ya que no hubo diferencias en la actividad antioxidante por exposición a las dosis de RUV suministradas.

Las defensas frente a la depredación intra-zooplancónica significan una inversión de energía sobre todo cuando involucran estructuras morfológicas, siendo éstas inducidas por señales químicas (kairomonas) que los depredadores liberan al medio. *Daphnia dadayana* fue registrada en la región patagónica con formas con o sin yelmo. En el quinto capítulo se planteó analizar si la producción del yelmo afectaba a la respuesta frente a la RUV a través de la actividad de GST. Para llevar a cabo este objetivo se expusieron hembras con huevos partenogénicos a señal química del copépodo depredador *Parabroteas sarsi* para inducir la defensa morfológica en forma de yelmo en los neonatos.

En primer lugar, se logró verificar que la presencia de *P. sarsi* efectivamente induce la formación de yelmo, lo cual explicaría la existencia de los dos morfos de *D. dadayana* en la naturaleza. En presencia de *P. sarsi*, *D. dadayana* incrementó su tamaño en un 25% debido al yelmo. Sin embargo, el costo de producir esta defensa no reveló diferencias significativas en la respuesta de GST cuando es expuesta a RUV.

Las conclusiones generales de esta Tesis indican que la RUV condiciona numerosas respuestas en las poblaciones de *Daphnia* de Patagonia Norte sobre todo en aquellas especies no melánicas como *D. commutata*. Estos cladóceros habitan lagos profundos y transparentes y con presencia de depredadores visuales (peces), por lo tanto, el melanismo no es una estrategia posible frente a la RUV. A pesar que para evitar la exposición a la RUV permanecen durante el día en regiones profundas afóticas durante la noche también quedan expuestas a EROS generadas por la RUV durante el día. Por lo tanto, las respuestas frente al estrés de esta especie resultan vitales para el mantenimiento de las redes tróficas lacustres. En tal sentido, la RUV afecta el crecimiento de esta especie a través de la desincronización de la muda y las respuestas antioxidantes se vieron afectadas también por la temperatura y la calidad de alimento. En contraposición, las especies melánicas que habitan lagunas someras (*D. dadayana*) parecen exhibir un bajo grado de estrés frente a la exposición directa de RUV. Además, las estrategias morfológicas frente a la depredación intra-zooplancónica no afecta sus niveles de respuesta frente al estrés lumínico. Por último, las actividades enzimáticas resultan biomarcadores muy sensibles para visualizar efectos celulares en el zooplancton y son una herramienta muy eficaz a la hora de determinar efectos sub-letales como los generados por la RUV y otros factores ambientales como los estudiados en este trabajo.

Abstract

North-Andean Patagonian large and deep lakes are ultra-oligotrophic systems where zooplanktonic species develop different strategies to cope with low food quantity and quality and high exposure to Ultraviolet radiation (UVR). Additionally, the Patagonian region has many small and shallow lakes with high dissolved organic matter concentration and thus, low light penetration. However, both environments are sensitive to global climate change, particularly to increase in UVR that will affect their biota. The objective of this Thesis was to analyze the physiological responses of two planktonic species of the genus *Daphnia* (*D. commutata* and *D. dadayana*) under present and future scenarios of increasing UVR, interacting with other factors. These two species inhabit contrasting systems. *D. commutata* lives in deep and transparent lakes while *D. dadayana* inhabits small shallow lakes with high concentration of dissolved organic matter.

When sunlight reaches the surface of aquatic systems, part of it is reflected and part penetrates the water. Once in the water column, the light is absorbed by the molecule of water and by the dissolved and particulate organic matter. In particular, short wavelengths (280-380 nm) are characterized by its high reactivity with water and organic molecules, producing reactive oxygen species (ROS) that damage cells and affect the organisms. The oxidative stress results when the ambient ROS exceeds the biological capacity to neutralize them. Among the strategies to act against these ROS, organisms can increase different defense mechanisms, as photoprotective pigments, and antioxidant enzymes, in order to neutralize the ROS avoiding cell damage.

This Thesis was organized in six chapters. The first one presents the main theoretical concepts and topics of the study, the hypotheses, and the general and specific objectives. In the second chapter, we analyzed the effect of UVR on the enzymatic activity involved in the molting process of *D. commutata*. In the third chapter, we analyzed, in *D. commutata*, how two enzymatic systems (the antioxidant GST and the Alkaline Phosphate involve in P uptake) were affected by the interaction of UVR with food quality and temperature. In the fourth chapter, the enzymatic antioxidant response and the importance of melanin as a photo-protective pigment is analyzed when *D. dadayana* is exposed to UVR. In the fifth chapter, we determine if the develop of antipredator defenses (helmet) affects the response of *D. dadayana* to UVR. Finally, the last chapter we include the general conclusions of the Thesis.

During molting, the enzyme chitinase (CB) is responsible for the chitin degrading process, allowing the old shell to be properly detached from the new one. In addition, in cladoceran molting is synchronized with the detachment of parthenogenetic eggs. During this process, zooplankton is exposed and vulnerable to predation. Thus, in the second chapter, we analyzed UVR effect on the CB enzyme activity and the consequent effect on the molting process of *D. commutata*. We carried out an experiment in which *Daphnia* neonates from the same cohort grew for eight days with daily exposition of 2 h to UVR and a control (protected from UVR). Each day of experimentation CB activity was determined on individuals of each treatment. Results showed a decrease in the CB activity when *Daphnia* was exposed to UVR. In addition, a desynchronization was observed in the CB activity and in molt synchronization in the population. Consequently, a decrease in the growth of UVR exposed individuals was observed after the fourth day of UVR exposure. UVR effect on molt synchronization could imply a cost, not only in growth but also in reproduction, since neonates would have difficulties to leave the old shell.

In the next chapter, we analyzed how *D. commutata* responded to the combination of stress factors using the alkaline phosphatase activity (APA) as a proxy of the P requirement and Glutathione-S-Transferase (GST) as an oxidative stress biomarker. Laboratory experiments were conducted with *D. commutata* neonates growing for a week fed with three food qualities (low, medium and high) under two different temperatures (10 °C and 20 °C). On day seven, they were exposed to UVR and then antioxidant enzymatic activity (GST) and APA were determined. It was observed that food quality affects responses to stress factors, such as UVR and temperature. The results showed that when *Daphnia* is under low food quality at 20 °C, its antioxidant activity is limited. Under these conditions, there was a low response capacity against UVR effect compared to the same temperature with medium and high food quality. The ability to acquire P from the food (APA) also decreased under low food quality at 20 °C and this effect is further increased by UVR exposure. On the other hand, treatments at 10 °C showed an increase in APA under low and medium food qualities compared to high quality. The food quality represents an important factor under future scenarios where, according to climate change predictions, temperature and UVR incidence in aquatic environments could increase.

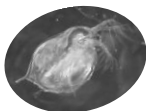
Photo-protective pigments are the first barrier against UVR damage. In Patagonia *Daphnia dadayana* was observed with melanic individuals. We analyzed the plastic

response of increasing melanin concentration in this species and the antioxidant activity when exposed to UVR. We carried out an experiment where neonates of *D. dadayana* were exposed to UVR for 2 hours every day, during a week with a control protected from short wavelength radiation. Pigment intensity in *Daphnia* carapace was measured daily through lateral images. At the end of the experiment, GST activity was measured to determine oxidative stress. The results showed that there was an increase in melanin concentration over time. On the other hand, GST activity did not show significant differences between control and UVR treatment. This result could enlighten the melanin effectiveness of *D. dadayana* carapace, as there was no measurable response in antioxidant activity when individuals were exposed to UVR.

Intra-zooplanktonic predation defenses are morphological structures inducible by chemical signals (kairomones) released by predators in the aquatic environment. These defenses involve an energy cost that has been related to a decrease in reproduction. In this chapter, we analyzed if this cost also affects antioxidant responses. *D. dadayana* was recorded with or without a helmet, thus we evaluated the helmet production cost, through the GST activity when *D. dadayana* with and without helmet is exposed to UVR. The predatory copepod *Parabroteas sarsi* was used to induce helmet production in neonates. In fact, kairomones release by *P. sarsi* effectively induced helmet formation in neonates, which would explain the existence of the two *D. dadayana* morphs in nature. Neonates with and without helmet were exposed to UVR or protected for 3 days in a factorial design. Results showed that *D. dadayana* with and without helmet did not show differences in the antioxidant response when exposed to UVR. Thus, this inducible defense did not affect the antioxidant response.

In summary, in this work we conclude that UVR is important for several population responses of *Daphnia* in North Patagonia. In particular, the non-melanic species *D. commutata* resulted more vulnerable to UVR. Unpigmented *Daphnia commutata* lives in transparent lakes with fish, thus melanism is not a suitable strategy against UVR. Although this species develops diel vertical migration to avoid predation and UVR during day, during night individuals move upwards and are exposed to remaining ROS generated by UVR. UVR interacts with other factors as temperature and food quality affecting the capacity of P assimilation. In addition, UVR may have important effect in the molting process through the negative effect on the enzyme chitinase. Therefore, UVR response in this species would be of particular importance

for the maintenance of the lacustrine trophic food web. On the other hand, the melanic species *D. dadayana*, inhabits shallow and fishless lakes. This species showed low antioxidant response to UVR due to the accumulation of the photoprotective pigment melanin during UVR exposure. Finally, the presence of helmet, an inducible antipredator morphological defense, seems not affect the enzymatic response to UVR. To conclude, enzymatic activities are sensitive biomarkers to determine different effect at the cellular level in zooplankton and this approach resulted in a very good tool for analyze sub lethal effects as those of UVR.



CAPITULO I

Introducción General

Durante el desarrollo del planeta Tierra, la radiación ultravioleta (RUV) ha estado presente con intensidades inicialmente muy altas y antes que cualquier organismo vivo existiera sobre el globo (Cockell y Horneck 2001). La atmósfera y, en particular la capa de ozono, ha sido crucial para el desarrollo de la vida ya que la protege absorbiendo la mayor parte de las longitudes de onda corta (radiación ultravioleta C = 100 a 280 nm y B = 280 a 320 nm). Sin embargo, una proporción de esta radiación (radiación ultravioleta B y A = 320 a 400 nm) entra y llega a la superficie del planeta afectando a la biosfera. La intensidad de la RUV que llega a la superficie terrestre puede tener notables variaciones ya que puede cambiar rápidamente durante semanas o incluso días debido a la elevación solar y a los cambios en la cobertura de nubes y cantidad de aerosoles (Smith et al. 1992, Madronich et al. 1998). Una vez que la luz llega a la superficie de un cuerpo de agua los fotones son en parte reflejados y otros absorbidos y dispersados por la columna de agua dónde pueden interactuar además con la materia orgánica disuelta y particulada (MOD y MOP) y con los organismos acuáticos. La radiación de onda corta (UV) es potencialmente dañina para la vida fundamentalmente porque genera daños en el ADN y en otras moléculas orgánicas (Harm 1980, Kielbassa et al. 1997, Ravanat et al. 2001) (Figura I.1). Por esta razón, se ha señalado que los organismos han desarrollado una larga serie de adaptaciones evolutivas para disminuir los efectos negativos de estas radiaciones (Rozema et al. 2002)

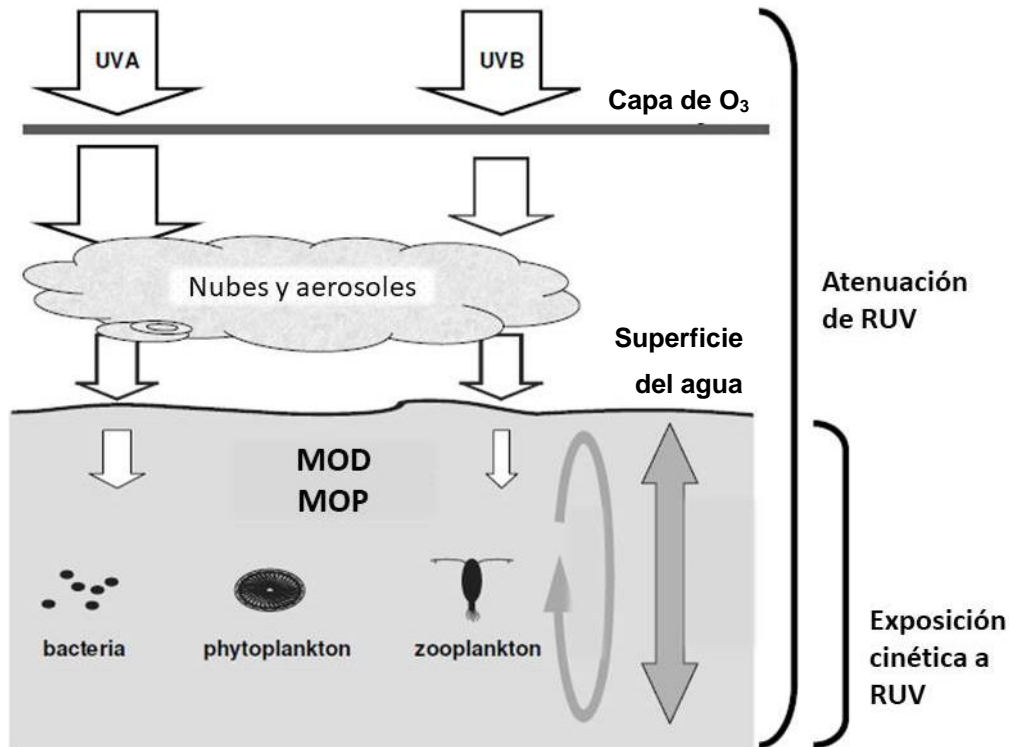
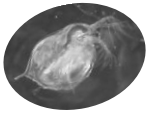
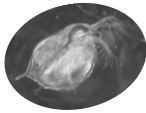


Fig. I.1: Esquema del ingreso de la Radiación Ultravioleta a la Tierra e interacción con el medio acuático. La RUV se atenúa al pasar a través de la capa de ozono, nubes y aerosoles de la atmósfera. Al llegar a la superficie de un cuerpo de agua disminuye aún más su incidencia por efecto de la propia molécula de agua pudiendo interactuar además con la materia orgánica disuelta y particulada (MOD y MOP) y con los organismos acuáticos (exposición cinética). Figura tomada y modificada de Gonçalves et al. (2010).

En los ambientes de agua dulce la penetración de la RUV puede llegar desde unos pocos centímetros a varios metros de profundidad (Morris et al. 1995) dependiendo sobre todo de la concentración de MOD (Leavitt et al. 2003). En ambientes acuáticos con concentraciones de MOD bajas (por debajo de 2 mg de C L^{-1}), pequeños cambios en la cantidad de MOD pueden causar grandes cambios en la penetración de la RUV en la columna de agua (Leavitt et al. 2003). Por otra parte, la exposición de la MOD y la MOP a RUV genera radicales libres, que afectan a la biota acuática, al ser moléculas altamente reactivas frente a otras moléculas orgánicas. La materia orgánica generada en el ecosistema terrestre y transportada por los ríos representa el porcentaje más importante de la MOD presente en los sistemas acuáticos (Cauwet 2002, Hansell et al. 2004, Zanardi-Lamardo et al. 2004). Sin embargo, tal como se señaló dentro del ambiente acuático esta



CAPITULO I: Introducción general

MOD sufre transformaciones que resultan en cambios en la absorción de RUV (Del Vecchio y Blough 2002, Twardowski y Donaghay 2002). En relación con los nutrientes, tanto el nitrógeno (N) como el fósforo (P) pueden limitar la productividad en ecosistemas acuáticos, y ambos ciclos pueden ser afectados por la RUV. Por ejemplo, la RUV puede afectar al ciclo del N a través de cambios en la composición de la materia orgánica en particular en el contenido de N y a través de efectos negativos en los organismos que fijan N (Helbling 2003). Además, las interacciones de la RUV con el N inorgánico como nitratos y nitritos resulta también en una importante fuente de especies reactivas de oxígeno, incluyendo radicales como el hidroxilo (*OH) (Zepp et al. 2007) (Ver figura I.2). También el ciclo del P se puede ver afectado, a través del efecto de la RUV sobre la actividad de la fosfatasa alcalina presente en diversos organismos (Boavida y Wetzel 1998, Korbee et al. 2012). Por último, los productores primarios se encuentran afectados directamente por la RUV al estar expuestos a ella e indirectamente a los radicales libres que se generan en el agua (Zepp et al. 2011).

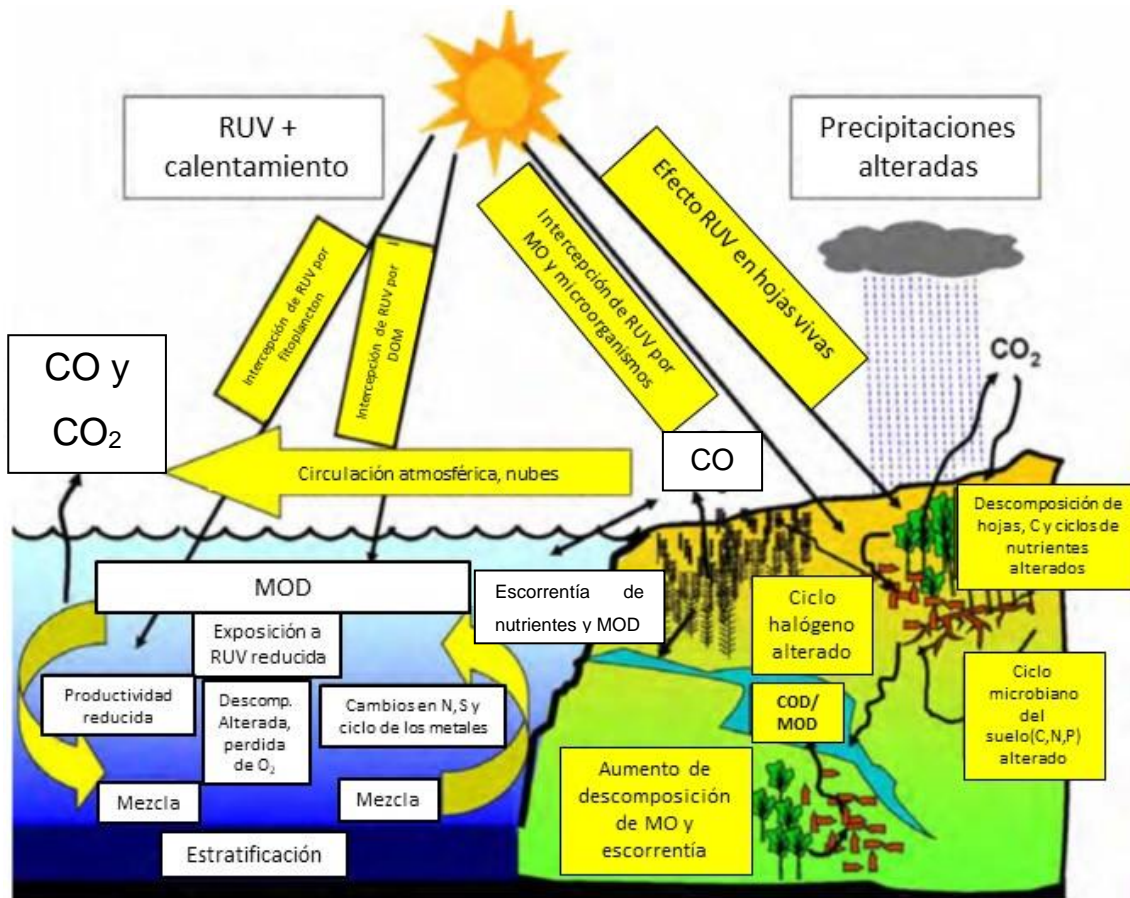
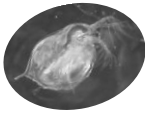
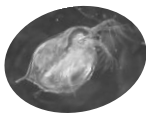


Fig. I.2: **Modelo conceptual ilustrando los potenciales efectos de la Radiación Ultravioleta y el cambio climático en los ciclos biogeoquímicos:** RUV (Radiación Ultravioleta), MO (materia orgánica), MOD (materia orgánica disuelta), CO₂ (dióxido de carbono), CO (monóxido de carbono), O₂ (Oxígeno), N (Nitrógeno), S (Azufre), C (Carbono), P (Fósforo). La imagen fue tomada y castellanzada del trabajo de Zepp et al. (2007)

Como ya mencionó, la RUV genera Especies Reactivas de Oxígeno (ROS, del inglés “Reactive Oxygen Species”, EROs en español) a partir de su interacción con la materia orgánica disuelta y particulada (Zepp et al. 2007). Las EROs son moléculas con electrones desapareados constituyendo radicales libres (O₂⁻, *OH, H₂O₂) característica que las hace altamente reactivas. El estrés oxidativo se produce por el mantenimiento de niveles altos de EROs por encima de las capacidades de defensa de un organismo (Lesser 2006). Estas EROs también pueden provenir de diversos procesos internos como la respiración (EROs endógenas) aunque pueden incrementarse de manera significativa por estresores externos como la RUV (Borgeraas y Hessen 2000, Balseiro et al. 2008) y cambios de temperatura (Bae et al. 2016). La acumulación intracelular de estas especies

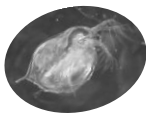


CAPITULO I: Introducción general

reactivas puede causar daños celulares graves y sus efectos pueden manifestarse de diversas formas y a diferentes escalas (menor tasa de reproducción, pérdida de movimiento, muerte celular) (Sørensen et al. 2003, Hessen et al. 2013). A nivel molecular, el aumento de EROs causa daños en diversas macromoléculas (lípidos, proteínas, ADN) y provoca alteraciones que pueden ser severas o letales para los organismos (Browman et al. 2000). Cuando esto ocurre es necesario “neutralizar” la reactividad de estas moléculas para que no interactúen con otras moléculas vitales para el funcionamiento celular. En tal sentido, los antioxidantes neutralizan los radicales libres, pero este mecanismo genera un costo energético extra y, por lo tanto, mientras mejor sea el estado nutricional de los organismos, mejor será su capacidad de respuesta (Balseiro et al. 2008).

Por otro lado, la RUV contribuyen a la disminución en las relaciones C:P (Carbono: Fósforo) en productores primarios, fundamentalmente debido al efecto negativo que la RUV tienen sobre el sistema fotosintético (Xenopoulos et al. 2002, Leu et al. 2006, Leu et al. 2007). Por lo tanto, un incremento de la exposición provoca una disminución en la fijación del carbono en los sistemas acuáticos lo que lleva a relaciones C:P más bajas. En consecuencia, la RUV modifican el ciclo del Carbono (C) a través de los efectos en la fijación del C inorgánico (Fotosíntesis), el contenido de C (biomasa y materia orgánica), y en su liberación al medio (respiración y descomposición fotoquímica) (Häder et al. 1998). Por otra parte, se han observado efectos indirectos causados por algas expuestas a RUV. En particular, se observó que en copépodos alimentados con algas expuestas a RUV se reduce la producción de huevos y se incrementa la proporción de larvas malformadas, debido a la deficiencia de componentes esenciales en las algas (Kouwenberg y Lantoiné 2007). Por lo tanto, la RUV afecta también al fitoplancton modificando la síntesis y estabilidad de compuestos esenciales para el zooplancton (por ejemplo, ácidos grasos polinsaturados) (Leu et al. 2006).

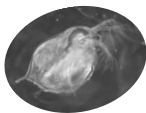
Al analizar la importancia de los nutrientes sobre los mecanismos fisiológicos de los organismos planctónicos, resulta imprescindible considerar los conceptos involucrados en la teoría de la estequiometría ecológica, que estudia el balance de múltiples elementos químicos en las interacciones ecológicas (Sterner y Elser 2002) Las diferentes especies animales poseen relaciones distintivas en las proporciones de los elementos: Carbono (C), Nitrógeno (N) y Fósforo (P). En los autótrofos estas relaciones son muy variables y dependen de la relación luz-nutrientes (Sterner et al. 1997). Por lo cual, los consumidores están sometidos a un alimento con relaciones elementales



CAPITULO I: Introducción general

variables y serán negativamente afectados si el alimento es de baja calidad (alto C:nutrientes) (Acharya et al. 2004b, Acharya et al. 2005, McCarthy et al. 2006, McCarthy y Irvine 2010). En particular, se ha demostrado que si la calidad del alimento es baja, la capacidad de respuesta enzimática frente al estrés oxidativo generado por la RUV también será baja (Balseiro et al. 2008). De esta manera, se genera un balance entre los costos de los mecanismos enzimáticos frente al aumento del estrés oxidativo y aquellos para mantener las actividades fisiológicas básicas funcionando (Monaghan et al. 2009). Por ejemplo, en la “economía fisiológica” de un determinado individuo, una disminución en la disponibilidad de P, no sólo afecta la síntesis de determinadas moléculas (ej. ADN, ARN, NADPH, fosfolípidos), sino también otras vías metabólicas básicas (Wojewodzic et al. 2011). La RUV pueden tener diferentes efectos con respecto al proceso por el cual el zooplancton obtiene, ingiere, digiere y asimila su alimento (Gonçalves et al. 2010). La disponibilidad de algunos nutrientes para la biota puede estimarse también a través de actividades enzimáticas, por ejemplo, para evaluar la adquisición del P se utiliza la Actividad de la Fosfatasa Alcalina (AFA), ya que esta enzima libera fosfatos permitiendo su transporte e incorporación celular. Diversos estudios indican que la AFA es un indicador de deficiencia de P en el zooplancton (Elser et al. 2010, McCarthy et al. 2010, Wojewodzic et al. 2011), presentando un aumento en su actividad, tanto por la deficiencia de P en el alimento como por la presencia de otros estresores nutricionales (Wagner y Frost 2012). También se ha determinado que la exposición a RUV afecta la AFA negativamente (Zepp et al. 2003, Tank et al. 2005).

En un contexto de cambio global, otra variable que cobra crucial importancia es la temperatura que puede ejercer efectos sinérgicos o antagonistas con la RUV (Borgeraas y Hessen 2000, Persaud y Williamson 2005, Gonçalves et al. 2010, Williamson et al. 2010, Helbling et al. 2011). La temperatura es un factor muy importante en ectotermos como son los organismos del zooplancton, en los que el metabolismo y la actividad celular incrementan con el aumento de la misma y, por lo tanto, el efecto del estrés oxidativo se incrementa también (Lesser 1996, Borgeraas y Hessen 2000). Cambios en la temperatura afectan los umbrales de limitación por elementos, por lo que a iguales relaciones C:nutrientes, el efecto sobre los organismos se verá acentuado con el incremento de la temperatura (Persson et al. 2011). Entonces, la resultante de la interacción de variables (RUV, temperatura, alimento, por ejemplo) es compleja de analizar (Araújo y Luoto 2007). Un aumento de temperatura corresponderá seguramente con una mayor necesidad

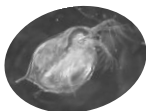


CAPITULO I: Introducción general

de adquirir nutrientes ya que un metabolismo más alto requiere de una alimentación de mejor calidad (Wojewodzic et al. 2011). Estos dos factores a su vez interactuando con la RUV podrían tener un efecto sinérgico y ser perjudiciales para los organismos que se encuentran bajo estas condiciones.

Para minimizar los daños de la RUV, el zooplancton utiliza diferentes estrategias de protección, incluyendo la migración vertical diaria (MVD) (Williamson et al. 2011), sistemas de reparación celular (ej. enzimas) (Macfadyen et al. 2004), y la acumulación de compuestos protectores de RUV (ej. pigmentos) (Hairston 1979, Rhode et al. 2001). Dentro de los compuestos fotoprotectores se encuentran la melanina, carotenoides y aminoácidos tipo micosporinas (MAAs: Mycosporin-Like-Aminoacids) (Hansson y Hylander 2009). La melanina es una molécula sintetizada por parte de los cladóceros, mientras que carotenoides y micosporinas son generados por las algas y algunas bacterias (alimento) y acumulados por los copépodos. Las defensas frente a la RUV son parte de la habilidad de los organismos zooplanctónicos para amortiguar el posible daño que ejercen las mismas (Hansson 2004, Tollrian y Heibl 2004) y dependen de la interacción con otros parámetros biológicos y físicos como la disponibilidad y calidad del alimento, la presión de depredación (Hansson et al. 2004, Moeller et al. 2005) y la temperatura del medio (Borgeraas y Hessen 2000, Connelly et al. 2009).

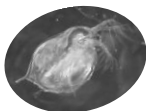
Frente al estrés oxidativo de origen lumínico, los organismos han desarrollado mecanismos celulares particulares entre los que se pueden mencionar a las enzimas de reparación de ADN, así como a las enzimas antioxidantes y detoxificantes (Sinha y Häder 2002, Souza et al. 2007, Balseiro et al. 2008, Rautio y Tartarotti 2010, Souza et al. 2010b). En particular, para biotransformar e hidrolizar las EROs las células poseen sistemas de defensa complejos que abarcan desde compuestos antioxidantes como el glutatión reducido (GSH) (Souza et al. 2010a, Arzate-Cárdenas y Martínez-Jerónimo 2011, Becker et al. 2011) hasta enzimas como Catalasa (CAT), Superóxido dismutasa (SOD), Glutatión S-transferasa (GST) y Glutatión Reductasa (GR) (Borgeraas y Hessen 2002, Souza et al. 2007, Souza et al. 2010b). CAT cataliza la degradación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno (O_2) y, por lo tanto, protege a la célula de los efectos detrimentales de las EROs de mayor vida media. GST por su parte, cataliza la conjugación del glutatión con distintas sustancias electrofílicas, cumpliendo un rol importante en la detoxificación de hidroperóxidos orgánicos formados en situaciones de estrés, de manera de eliminarlos o al menos dejarlos con menor actividad. Ambas enzimas son consideradas



CAPITULO I: Introducción general

biomarcadores sensibles de estrés oxidativo en el zooplancton (Barata et al. 2005). Sin embargo, se ha observado que CAT se ve muy afectada por otros factores como por ejemplo la interferencia en la alimentación por partículas inorgánicas que incrementan fuertemente la respiración (Laspoumaderes et al. 2017). Por último, la SOD actúa sobre los radicales de superóxido ($*O_2^-$) dismutándolos a H_2O_2 que luego es hidrolizado por la CAT y la Glutación Peroxidasa (GP) (Figura I.3). El mantenimiento de niveles adecuados de mecanismos antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) implica un gran consumo de energía (Balseiro et al. 2008, Souza et al. 2010b) por el costo de activar complejos enzimáticos para neutralizar las EROs (Ver Figura I.3). Por ejemplo, parte de los metabolitos generados durante la glucólisis deberían ser direccionados a vías de producción de antioxidantes, que a su vez implicaría una reducción de glucólisis derivada a la producción de energía.

Otras enzimas importantes para el zooplancton podrían también ser afectadas por la RUV. En particular, la Quitobiasa (QB) es una enzima que está involucrada en la degradación del exoesqueleto y el reciclado de quitina en el proceso de muda de caparazón en artrópodos (Duchet et al. 2011). La actividad de la QB incrementa cuando hay que degradar el caparazón viejo de quitina a monómeros de N-acetylglucosamina (NAG) para que puedan ser reutilizados para la formación del nuevo exoesqueleto. Además esta enzima tiene crucial importancia porque su actividad periódica está sincronizada con la formación y liberación de huevos partenogenéticos en *Daphnia*. Estudios previos han observado efectos en la actividad de QB por exposición a compuestos químicos como pesticidas (Song et al. 2017a). Sin embargo, no se conoce nada sobre la acción de la RUV sobre esta enzima, lo que podría tener consecuencias importantes en procesos vitales como la muda del caparazón en crustáceos planctónicos. Por las características de los lagos ultraoligotróficos patagónicos, el aumento de la RUV podría alterar la composición, el tamaño, la distribución y la productividad de la comunidad acuática (Helbling 2003, Häder et al. 2007). Por lo cual un efecto en la enzima QB sumaría además efectos negativos en los niveles intermedios de la cadena trófica pelágica.



CAPITULO I: Introducción general

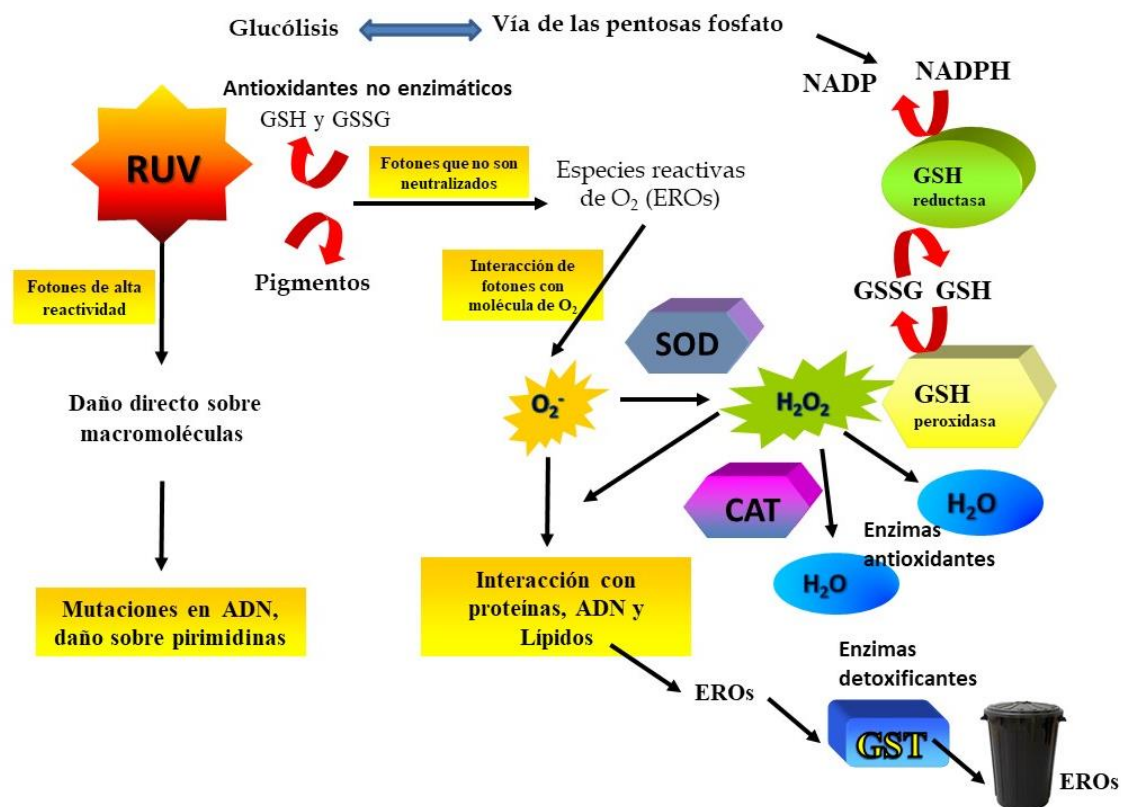
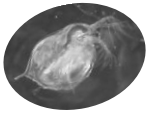


Fig. I.3: Esquema explicativo del efecto de la RUV a nivel celular y las posibles vías de defensa de los organismos acuáticos para neutralizar las EROs generadas. Puede existir un daño directo o indirecto a través de la formación de EROs. La protección a la RUV y a las EROs son los pigmentos y luego los antioxidantes.

Dentro de una perspectiva evolutiva, el zooplancton ha experimentado los efectos de la RUV y, por lo tanto, ha evolucionado con esta variable por millones de años. Hoy en día los cambios ambientales avanzan muy rápidamente debido al efecto antrópico (Zepp et al. 2011) y, por lo tanto, los organismos tienen que adaptarse con mucha rapidez a los potenciales peligros. En su ambiente natural, el zooplancton se ve afectado por múltiples factores ya que los ambientes presentan distintas condiciones de profundidad, viento, depredación, temperatura, incidencia de la RUV, calidad y cantidad de alimento, entre otros. Por esta razón, en esta tesis hemos enfocado dos especies del cladóceros *Daphnia* (*D. commutata* y *D. dadayana*) que habitan ambientes contrastantes de la Patagonia Norte. En consecuencia, ambas especies están sometidas a factores diferentes en su interacción con la RUV. Por ejemplo, *D. commutata* de lagos profundos ultraoligotróficos estará sometida a limitaciones de alimento mayores por lo cual este factor tendrá una mayor importancia en la capacidad de los organismos en generar y mantener estados fisiológicos adecuados y, por lo tanto, una mayor capacidad de



CAPITULO I: Introducción general

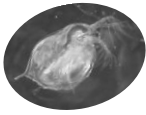
respuesta enzimática. En estos lagos la RUV puede penetrar a niveles profundos de la columna de agua (Morris et al. 1995, Alonso et al. 2004) sometiendo a un estrés constante a los organismos que los habitan (Balseiro et al. 2008). Por otra parte, *D. dadayana* habitante de ambientes someros libre de peces y con mayor concentración de materia orgánica disuelta, estará sometida a una fuerte depredación intrazooplancónica. Esto provocará el desarrollo de estructuras defensivas que podrían también interactuar en la respuesta enzimática frente a la RUV.

Objetivo General:

El objetivo de esta Tesis es analizar las estrategias fisiológicas que poseen los organismos planctónicos del género *Daphnia* frente a escenarios actuales y futuros de incremento en la RUV en interacción con otros factores como muda, calidad de alimento, temperatura, pigmentos y defensas inducibles.

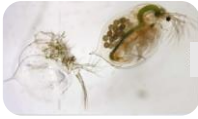
Objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto de la RUV en la enzima quitobiasa y el consecuente efecto en el proceso de muda de *Daphnia commutata*.
2. Analizar cómo *Daphnia commutata* responde a la combinación de factores (RUV, temperatura y calidad de alimento) de estrés utilizando la actividad de la fosfatasa alcalina (AFA) como un indicador del requerimiento de P y a la GST como un biomarcador de estrés oxidativo.
3. Analizar en *Daphnia dadayana* la respuesta de aumento de la concentración de melanina vs la actividad de antioxidantes (GST) frente a la exposición a RUV.
4. Analizar en *D. dadayana* el efecto de la inducción de estructuras anti-depredadoras (yelmo) sobre la capacidad de respuesta frente al estrés oxidativo (GST).



Hipótesis:

1. La actividad de la quitobiasa y los intervalos de muda serán afectados por la exposición de *D. commutata* a niveles sub-letales y crónicos de RUV.
2. Las relaciones elementales de C:P del alimento interactuarán con la temperatura y la RUV en la capacidad antioxidante (GST) y de obtener P (AFA) por parte de *D. commutata*.
3. En *Daphnia dadayana*, la concentración de melanina actuará como primera defensa a la RUV y por lo tanto no habrá cambios en la actividad antioxidante.
4. La generación de yelmo como estructuras anti-depredadoras afectará a la respuesta de la actividad antioxidante en *D. dadayana*.

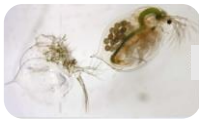


CAPITULO II

Efecto de la RUV en el proceso de muda de *Daphnia commutata*, utilizando la actividad de la Quitobiasa como indicador.

Introducción

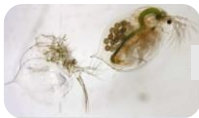
Los crustáceos, como el resto de los artrópodos, se caracterizan por crecer a través de mudas en las que cambian de exoesqueleto, pasando de un estadio al siguiente (Stevenson 1985). Este proceso se encuentra regulado por un complejo sistema neuroendocrino (Žitňan et al. 2007), y es conocido como muda. El proceso de muda está regulado por una serie de hormonas y mediado por enzimas que se encargan de desprender el caparazón (cutícula) viejo del nuevo, que aún blando, se agranda y luego endurece para servir de sostén y protección hasta el nuevo proceso de muda. Durante el ciclo de muda, ocurren una serie de cambios fisiológicos y comportamentales, tales como la formación de una nueva cutícula, la degradación y reabsorción de la vieja cutícula, su desprendimiento (ecdisis) y finalmente la post-ecdisis que corresponde al endurecimiento y pigmentación de la nueva cutícula (Reynolds 1987). El fluido que se encuentra en el espacio intersticial entre la nueva y vieja cutícula posee una combinación de enzimas e iones inorgánicos involucrados en la degradación y reciclaje de la vieja cutícula (Reynolds y Samuels 1996). Estas enzimas incluyen predominantemente enzimas quitinolíticas, correspondientes a quitinasas y quitobiasa, y varios tipos de proteasas (Reynolds y Samuels 1996). En este proceso, las proteasas catalizan la degradación de las proteínas cuticulares a péptidos y aminoácidos, mientras que las enzimas quitinolíticas son las responsables del proceso de degradación de la cutícula de quitina a monómeros de N-acetyl- β -glucosamina (NAG) (Reynolds y Samuels 1996, Merzendorfer y Zimoch 2003). El control de la expresión y secreción de estas enzimas es vital para lograr una muda exitosa.



CAPITULO II: RUV y muda

Dentro de las enzimas quitinolíticas, la quitinasa degrada la quitina a oligosacáridos (dímeros y trímeros de NAG) (Roff et al. 1994) mientras que la quitobiasa (QB) hidroliza estos oligosacáridos resultantes a monómeros (Muzzarelli 1977) los que son reabsorbidos para la nueva cutícula (Buchholz y Buchholz 1989). Estas enzimas se encuentran en el espacio que separa el caparazón viejo del nuevo y una vez que ocurre la ecdisis, la quitobiasa es liberada al medio (Vrba y Macháček 1994). Esto significa que en este momento la QB disminuye su concentración en el individuo, y vuelve a aumentar en el espacio intersticial cuando se encuentra cerca de la próxima muda. Por esta razón, el aumento de la actividad enzimática dentro del organismo ocurre en intervalos discretos a través del ciclo de vida y mientras más cerca se encuentre del momento de ecdisis mayor será su abundancia y actividad (Espie y Roff 1995a). La QB, ha sido ampliamente utilizada como biomarcador para estudiar la influencia de estresores ambientales en la muda, crecimiento, biomasa y dinámicas poblacionales en artrópodos (Espie y Roff 1995a, Sastri y Roff 2000, Zou 2005, Richards et al. 2008, Conley et al. 2009, Duchet et al. 2011, Qi et al. 2013). La expresión de la QB está positivamente regulada por una hormona de la muda endógena (20-hidroxiecdisona) a través de su unión con el receptor de ecdisona que activa la transcripción (Zou y Fingerman 1999, Merzendorfer y Zimoch 2003, Zheng et al. 2008). Esta hormona se secreta de a pulsos cuando es necesario comenzar el proceso de muda. Ambas actividades de la QB (interna y externa) sirven como indicadores de frecuencia y calidad de muda en crustáceos (Espie y Roff 1995a, Sastri y Roff 2000, Hanson y Lagadic 2005).

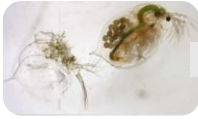
La actividad de QB fue señalada como un indicador eficiente de la activación del receptor de ecdisona por agonistas (fármacos) (Zou y Fingerman 1999). Algunos compuestos químicos agonistas o antagonistas de 20-hidroxiecdisona pueden interactuar con el receptor de ecdisona y modular la señal de la muda. La exposición del receptor de ecdisona a ciertos compuestos químicos generan una muda precoz, mayormente relacionado con la perturbación de la ecdisis (Song et al. 2017a). Varios pesticidas han sido desarrollados sobre esta base, para contrarrestar los efectos perjudiciales de los artrópodos en los cultivos (Nakagawa 2005). Sin embargo, en algunos casos pueden afectar otras especies como, por ejemplo, a crustáceos acuáticos cuando los compuestos químicos llegan al agua, generando cambios en el proceso de muda (De Wilde et al. 2013).



CAPITULO II: RUV y muda

En crustáceos como el cladóceros *Daphnia*, la cantidad de mudas durante su vida no es fija, sino que depende de distintos factores, como la temperatura y la disponibilidad de recursos (Threlkeld 1985, Ebert 1992, Espie y Roff 1995b). Existen evidencias de que algunos compuestos químicos pueden modificar el tiempo entre muda y muda (Overturf et al. 2015), además de las variables ambientales ya mencionadas. La exposición a radiación ultravioleta (RUV) genera un efecto negativo en el zooplancton (Leech y Williamson 2000, Hessen et al. 2003, Rautio y Tartarotti 2010) afectando sus actividades enzimáticas (Barata et al. 2005, Souza et al. 2010a, Souza et al. 2010b). Sin embargo, aún no hay evidencias sobre el efecto de la exposición a RUV en la muda de los zoopláncteres. La muda es un momento crucial en el ciclo del zooplancton ya que los individuos se encuentran en un estado vulnerable y mientras más se extienda el período de cambio de caparazón mayor es la probabilidad de no poder escapar de otros riesgos (ej. depredación) (Ohman 1988). El proceso de muda, además de tener un efecto directo en el crecimiento, también está involucrado en la liberación de neonatos partenogenéticos y en el desprendimiento de huevos de resistencia en cladóceros (Halcrow 1976, Skinner 1985). Por lo tanto, es un proceso crucial en el ciclo de vida del zooplancton y resulta muy interesante evaluar el posible efecto de la RUV al interactuar con la enzima QB.

En particular en la región andina nor-patagónica, *Daphnia commutata* es un cladóceros transparente que habita lagos profundos con depredadores visuales (peces) y bajo contenido de carbono orgánico disuelto (Balseiro et al. 2007). En estos lagos, la absorción de luz por parte de las sustancias disueltas es baja y la radiación solar llega a niveles profundos (Pérez et al. 2002). En consecuencia, el zooplancton está muy expuesto a los posibles efectos de la RUV y esto lo haría vulnerable a potenciales efectos sobre la muda. En este capítulo, se analiza el efecto de la RUV sobre la actividad de QB en *Daphnia commutata* para evaluar el impacto de estresores subletales como es la RUV (comparable a los efectos que producen algunos compuestos químicos) en un momento vulnerable del ciclo de vida de los crustáceos.



Objetivo:

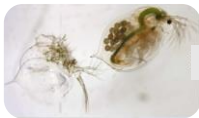
Evaluar el efecto de la RUV en la enzima QB y el consecuente efecto en el proceso de muda de *Daphnia commutata*.

Hipótesis:

La actividad de la QB y los intervalos de muda serán afectados por la exposición de *Daphnia commutata* a niveles subletales y crónicos de RUV.

Predicciones:

- a. La actividad de la QB antes de la ecdisis será menor en animales expuestos a RUV que en el control.
- b. La sincronización de la muda entre animales de la misma cohorte se verá afectada por los efectos negativos de la RUV.



Materiales y métodos

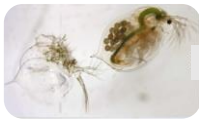
Daphnia commutata fue elegida para realizar este experimento ya que muda en intervalos frecuentes, es fácilmente cultivada bajo condiciones de laboratorio y representan una fracción importante de la biomasa zooplanctónica de los ambientes de agua dulce de la Patagonia andina. Los individuos de *D. commutata* utilizados en estos experimentos provienen de un cultivo de laboratorio, el que fue iniciado a partir de individuos del lago Mascardi (Parque Nacional Nahuel Huapi, en la Patagonia, Argentina, 41°20'54"S 71°33'49"O). Los especímenes utilizados se encuentran en cultivos de laboratorio en condiciones constantes de temperatura (15 °C), fotoperiodo (14:10 hs luz:oscuridad) y alimento (*Chlamydomonas reinhardtii* cultivadas en laboratorios con medio MBL).

Experimento de exposición a RUV

Se mantuvieron clones madres de *D. commutata*, correspondientes a la misma cohorte, bajo condiciones de laboratorio controladas (Temperatura: 15 °C y fotoperiodo 14:10 h luz:oscuridad) alimentadas *ad libitum* para que desarrollen la mayor cantidad de huevos posibles, de forma sincronizada. Los neonatos nacidos durante un periodo de 12 h (es decir que tuvieron la misma edad) fueron separados y colocados en nuevo medio con alimento (*Chlamydomonas reinhardtii*) en concentración de 1 mg L⁻¹ de C.

Los neonatos fueron distribuidos de a diez en frascos de cuarzo de 150 mL y se los expuso a RUV 2 h todos los días durante 7 días, con un respectivo control en frascos de vidrio y cubiertos con acetato de celulosa para evitar que la RUV incidiera en estos tratamientos (ver más abajo *Características de la luz*). Todos los días, después de la exposición a RUV se extrajeron 4 individuos de *Daphnia* de cada réplica (4 réplicas) los que se colocaron inmediatamente en freezer -80 para su posterior análisis enzimático.

Diariamente (8 días) se contabilizaron las mudas para verificar si el efecto de la RUV afectaba la muda de *Daphnia* y se tomaron fotos laterales de individuos al azar para determinar su crecimiento en cada tratamiento. Este procedimiento se llevó a cabo con un microscopio estereoscópico con una cámara adicionada al mismo. Las imágenes fueron procesadas a través del software Image-Pro Plus, (Media Cybernetics), siguiendo Acharya et al. (2004a) y Balseiro et al. (2007).



Experimento de recuperación

Adicionalmente se llevó a cabo un experimento donde se expuso a los neonatos a las mismas condiciones del tratamiento con RUV sólo que al 5to día se los dejó de irradiar para evaluar la capacidad de recuperación a los daños generados por la RUV durante los primeros 5 días de vida. Se extrajeron 3 individuos de *D. commutata* de cada réplica (4 réplicas) que se colocaron inmediatamente en freezer -80 para su posterior análisis enzimático de la QB del día 5 al 8 del experimento.

Características de la luz

La luz utilizada para llevar a cabo los experimentos fue emitida por dos lámparas fluorescentes UVA 340 (UVA 340 lámpara de Q-Panel Lab Products, con máxima emisión a 340 nm), dos lámparas fluorescentes de luz día y dos lámparas fluorescentes luz negra (Philips TL-D 30 W). Las lámparas luz día (“RFA” – Radiación Fotosintéticamente Activa) + la luz negra sin UV corresponden al tratamiento control. El espectro UV de la luz de las lámparas UVA340 se asemeja al espectro solar entre 280 nm y 350 nm (Shick et al. 1999). La luz negra se incluyó para cubrir la brecha entre el máximo de emisión de UVA340 (λ_{max} : 350 nm) y las lámparas fluorescentes de luz diurna (λ_{min} : 400 nm) (ver figura II.1). Durante la incubación, los animales recibieron $35 \mu\text{W cm}^{-2} \text{nm}^{-1}$ de 340 nm de longitud de onda, un nivel de radiación que es equivalente a la luz del sol que llega a la superficie de los lagos durante el verano (Modenutti et al. 2005). La dosis diaria de 340 nm fue de 2520 J m^{-2} . El tratamiento REC de la figura II.3 corresponde a los primeros 5 días con luz RUV+RFA y luego del día 6 al 8 con luz RFA solamente.

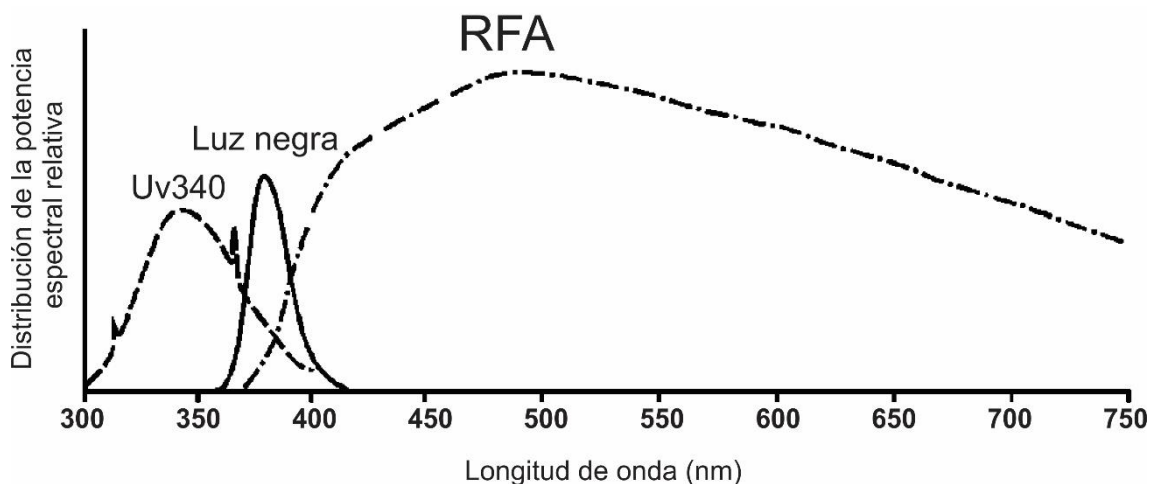
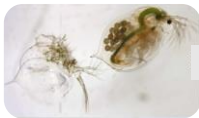


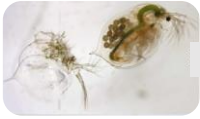
Fig. II.1. **Distribución de la potencia espectral relativa** del set de luces experimentales de acuerdo con la emisión de sus longitudes de onda en nanómetros (nm) y a las especificaciones del fabricante. La primera curva (de 300 a 400 nm) representa las dosis de RUV relativas, la segunda curva (de 350 a 410 nm) representa la dosis relativa de luz negra y la tercera curva (de 400 a 750 nm) representa la dosis de luz RFA relativa.

Determinaciones bioquímicas

La actividad de QB se determinó siguiendo a Oosterhuis et al. (2000) con 4 especímenes por medición. Cada réplica se homogeneizó con un homogeneizador ultrasónico (Sartorius, LABSONIC M, con 0,6 ciclos, 80% de la amplitud y punta de 2 mm Ø) en solución buffer 100 µL (Citrato-Fosfato pH = 6). La actividad de QB se determinó fluorométricamente (Perkin-Elmer LS45) con cinética enzimática con una excitación de 360 nm / 10 nm y una emisión de 420 nm / 10 nm y para cada muestra se utilizaron 50 µL de MUF-NAG 300 µM como sustrato. QB se expresó en nmoles de producto formado (MUF) min⁻¹* µg⁻¹ de peso seco de los animales.

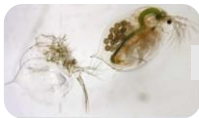
Análisis estadístico

Las diferencias en la actividad de la QB de *Daphnia commutata* expuesta a RUV y RFA se analizaron con un *test-t* pareado, con el fin de comparar día a día las diferencias entre cada tratamiento. El mismo test se aplicó para analizar el experimento de recuperación de RUV. Todos los gráficos y análisis de actividad enzimática se realizaron en Sigma Plot 12.5 (Systat Software Inc, San Jose, CA, EE.UU.). Para todos los datos se comprobó la normalidad.



CAPITULO II: RUV y muda

Para analizar el crecimiento de *D. commutata* se realizó una prueba de ANCOVA (factor: Luz y Co-variable: Tiempo) seguido de un test *a posteriori* Tukey de comparaciones múltiples. Este análisis se realizó con el programa RStudio (RStudio Team (2015). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA. URL: <http://www.rstudio.com/>). Para todos los datos se comprobó la normalidad y homocedasticidad.



Resultados

Experimento de exposición a RUV

La exposición a RUV de *Daphnia commutata* generó un efecto en la actividad de la enzima QB, con una significativa disminución en los individuos del tratamiento RUV con respecto al tiempo (*test-t* pareado; $t = 4.207$ $GL = 27$ $P < 0.001$; Figura II.2a). Esto significa que los organismos más grandes presentan mayor actividad coincidiendo con Vrba y Macháček (1994). Los individuos de *D. commutata* expuestos a RUV no presentan una muda sincronizada como lo hacen los del tratamiento control. Por otro lado, también se observó una disminución en el crecimiento de los individuos expuestos a RUV con respecto al control en interacción con el tiempo (ANCOVA luz*tiempo; $F_{6, 42} = 3.758$ $P = 0.004$; Figura II.2c). Además, hubo un aumento en la diferencia de tamaño en el tiempo entre los tratamientos (PAR y RFA) que se evidenció en los últimos días del experimento (Figura II.2c).

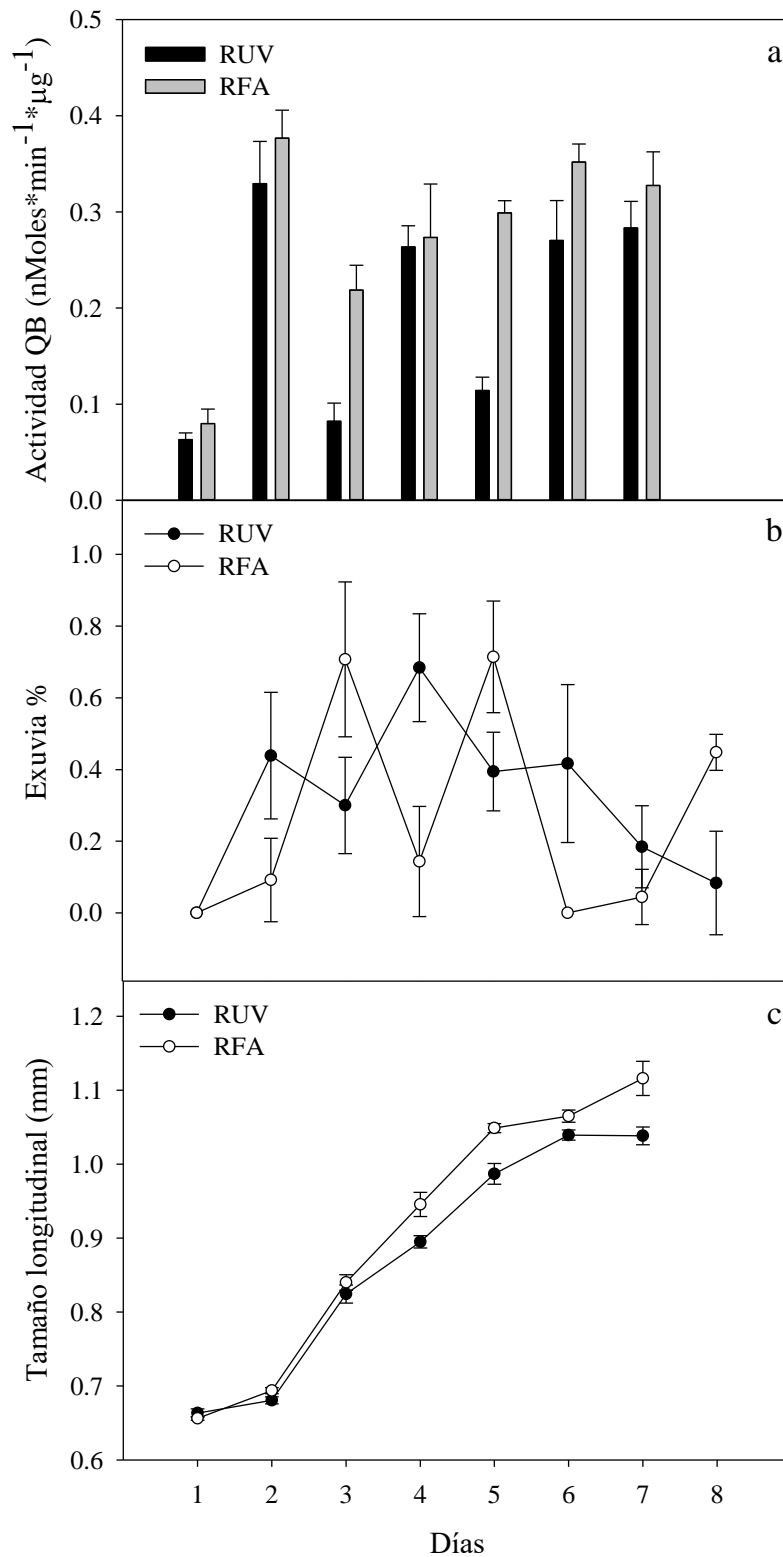
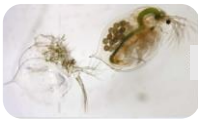
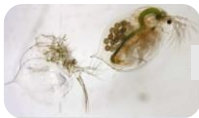


Fig II.2. **Resultados de exposición de *D. commutata* a RUV.** (a) Actividad de la QB bajo dos condiciones de luz (barras negras = RUV y barras blancas = RFA) en un período de 8 días. (b) Proporción de exuvias de la cohorte utilizada para el experimento durante 8 días bajo dos condiciones de luz (puntos negros = RUV y puntos blancos = RFA). (c) Crecimiento logitudinal de *D. commutata* durante 8 días bajo dos condiciones de luz (puntos negros = RUV y puntos blancos = RFA). Las barras de error representan el error estándar en todos los gráficos. Radiación ultravioleta (RUV) y radiación fotosintéticamente activa (RFA).



Experimento de recuperación

Los resultados del experimento de recuperación indican que *D. commutata* no pudo recuperar su actividad enzimática dañada por la exposición a RUV. No se encontraron diferencias significativas entre organismos expuestos y en recuperación a partir del 5to día de exposición a RUV (*test-t* pareado; $T = 0.109$ $GL = 11$ $P = 0.457$; Figura II.3). Por lo tanto, según los resultados obtenidos no habría una capacidad de recuperar la actividad enzimática dañada por la exposición a RUV en los primeros días de vida de *Daphnia*.

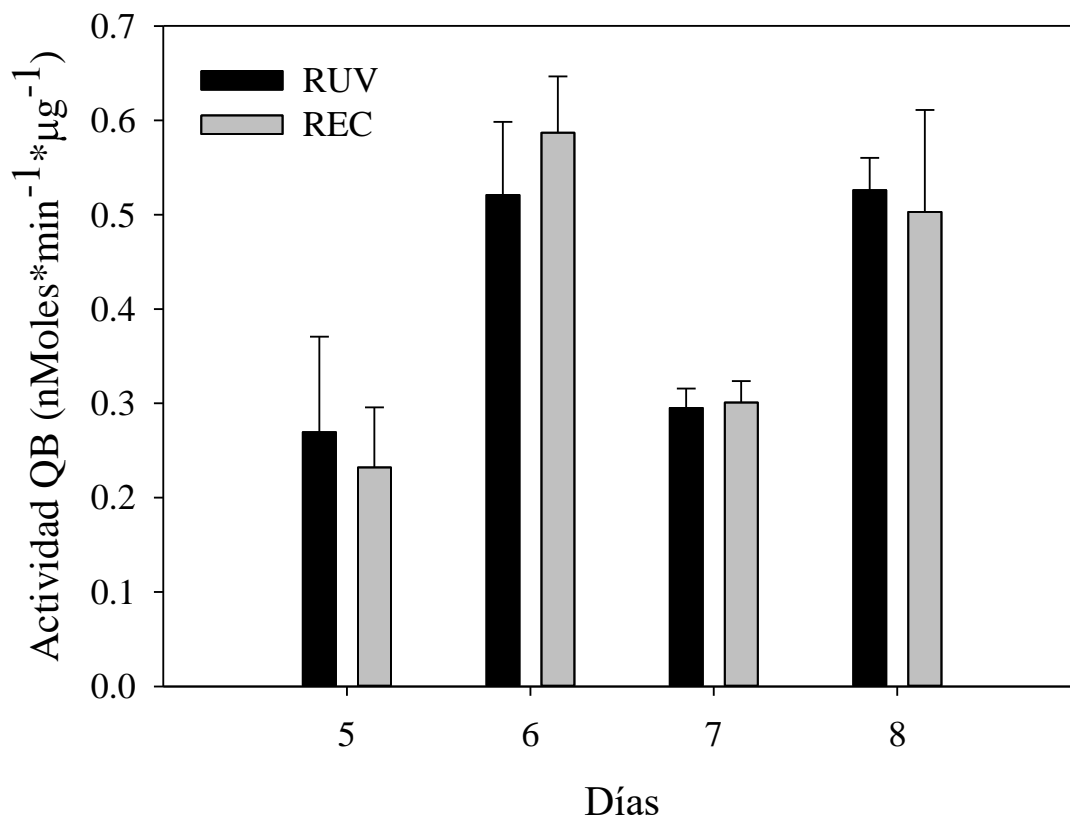
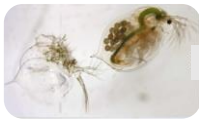


Fig II.3. **Experimento de recuperación en *D. commutata***. Actividad de QB en dos condiciones de luz (barras negras = RUV y barras grises = REC (RUV hasta el día 5 y luego luz RFA solamente) del día 5 al 8 de exposición. Las barras de error representan un error estándar. Recuperación (REC).



Discusión

En relación a la hipótesis planteada, se confirma que la actividad de la QB y los intervalos de muda fueron afectados por la RUV en *D. commutata*. El efecto de la RUV en la muda de caparazón de *D. commutata* resulta en una desincronización de los individuos pertenecientes a la misma cohorte, probablemente debido a la disminución en la actividad de QB. Este resultado se ve reflejado, además, en la disminución del crecimiento de los organismos expuestos a RUV. Como ya se mencionó, la actividad de QB es un indicador de la producción de biomasa del zooplancton (Oosterhuis et al. 2000). A pesar que en nuestros resultados, el grupo expuesto a RUV no presenta un número menor de mudas total, la desincronización observada puede afectar otros procesos importantes como el desprendimiento de huevos de resistencia, en el caso que no lleguen a formarse a tiempo, o el nacimiento de huevos partenogénicos (Halcrow 1976, Skinner 1985). Ambos procesos reproductivos están sincronizados con el momento de la ecdisis, así como la vitelogénesis, dónde las hembras requieren grandes cantidades de energía. En general, ninguno de los procesos tiende a ser exitoso si se encuentran desincronizados (Bodar et al. 1990), por lo cual la RUV tendría un efecto negativo en estos importantes mecanismos del desarrollo.

El momento de la ecdisis es crucial por varias razones, por un lado, cuando se está desprendiendo la muda hay un incremento virtual del tamaño, ya que el volumen efectivamente ocupado por ambos caparazones es mayor, y combinado con la reducción en la capacidad de escape, los individuos se vuelven más vulnerables a los depredadores. Por otro lado, la deposición de nuevos huevos en la cámara ocurre justo después de la ecdisis y son mantenidos por debajo del caparazón hasta el nuevo proceso de muda donde se liberan los neonatos al medio (Rinke y Vijverberg 2005), por lo tanto una desincronización en el proceso de muda, afecta directamente el éxito reproductivo de *Daphnia*. También se ha comprobado que en el momento de la ecdisis aumenta la vulnerabilidad de *Daphnia* a tóxicos (Lee y Buikema Jr 1979). Sumado a esto el efecto de la exposición a RUV también podría complicar el desprendimiento del caparazón viejo y dificultar la expansión del nuevo caparazón en caso que el viejo no llegue a desprenderse adecuadamente por la falta o deficiencia de QB. De manera similar se ha demostrado que algunos compuestos químicos interactúan con el receptor de ecdisona e impiden la liberación del caparazón viejo, causando la muerte de *Daphnia* por acumulación de exuvias que no han llegado a la ecdisis completa (Song et al. 2017b).



CAPITULO II: RUV y muda

Exposiciones a RUV más intensas o prolongadas en el tiempo, podrían tener efectos similares, y causar muerte como consecuencia de la alteración de un proceso complejo y vital como es la ecdisis.

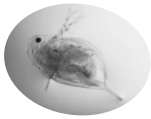
D. commutata es una especie de caparazón transparente que habita lagos profundos de la región Andina nor-patagónica. En estos ambientes, se encuentra expuesta a depredación por parte de peces planctívoros visuales y, por lo tanto, su estrategia efectiva para mitigar el riesgo de depredación es la migración vertical (Balseiro et al. 2007). La migración hacia niveles profundos en lagos (hipolimnion) permite que los depredadores visuales (peces) detecten menos a las presas (zooplancton) (Balseiro et al. 2007) y al mismo tiempo los cladóceros pueden refugiarse de los efectos negativos de la RUV del epilimnion. Sin embargo, el zooplancton realiza el proceso de muda y liberación de huevos partenogénicos en la zona del epilimnion (Rinke y Petzoldt 2008), debido a que la cantidad de alimento y la temperatura son más favorables para el proceso enzimático relacionado con la muda. El zooplancton de lagos con peces depredadores visuales migra a la zona del epilimnion mayormente por la noche (Williamson et al. 2011), así puede evitar los daños por la radiación del sol y a posibles depredadores. Un comportamiento similar fue descrito para *D. commutata* en lagos del norte de la Patagonia Andina (Balseiro et al. 2007). La desincronización que se observa experimentalmente en *Daphnia* bajo tratamiento RUV, podría modificar los horarios de muda y consecuentemente el riesgo de depredación si el proceso se demora y por ende la migración a zonas profundas durante el día. Por otra parte, la liberación de neonatos ocurre luego de la ecdisis (Rinke y Vijverberg 2005) y, por lo tanto, es muy importante conocer cómo se afectará el ciclo reproductivo de *Daphnia* cuando hay una desincronización en la muda. En tal sentido, sería importante determinar en su ambiente natural si será capaz de liberar neonatos en el tiempo que corresponde para su correcto desarrollo, ya que estos procesos se encuentran sincronizados y regulados por la disponibilidad de alimento y la temperatura (Espie y Roff 1995b). El resultado final podría afectar a la población de *Daphnia* con un aumento en la mortalidad por depredación, o el incremento de un efecto subletal por la exposición a RUV durante el proceso de ecdisis.

En nuestros experimentos sólo se midió la actividad de QB para entender mejor cómo es la dinámica del efecto de la RUV en la muda de *Daphnia*. Por otro lado, en este trabajo no se identificaron mecanismos por los cuales se produce el daño. Es posible que



CAPITULO II: RUV y muda

la RUV genere algún tipo de daño al receptor de ecdisona, que también puede ser la causa de la disminución de la actividad de QB con la consiguiente desincronización de la muda, tal como ha sido observado en este trabajo.



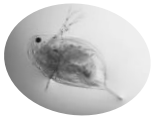
CAPITULO III

Efectos interactivos entre calidad de alimento, temperatura y RUV en la actividad de la fosfatasa alcalina en *Daphnia commutata*

Introducción

Los ecosistemas acuáticos están siendo afectados por el aumento de la temperatura y la radiación ultravioleta (RUV). Estos cambios modifican la intensidad de la luz y la entrada de nutrientes, afectando en consecuencia la relación C:P (carbono: fósforo) de los productores primarios (Sterner et al. 1997), y por lo tanto, la calidad del alimento para el zooplancton (Dobberfuhl y Elser 2000, Elser et al. 2000). En este contexto, los organismos que necesitan un alto contenido de nutrientes son más susceptibles al alimento de baja calidad (Sterner et al. 1993), consecuentemente, animales bien nutridos hacen frente a los factores de estrés de manera más eficiente que los que están empobrecidos nutricionalmente (Balseiro et al. 2008).

El zooplancton herbívoro constituye un eslabón muy importante en las redes tróficas acuáticas, ya que transfieren los nutrientes de los productores primarios (al consumirlos) a niveles tróficos más altos (al ser consumidos) (McQueen et al. 1989, Carpenter et al. 2001, Sterner y Elser 2002). La incorporación de nutrientes por parte del zooplancton puede vincularse a algunas actividades enzimáticas; por ejemplo, la adquisición de fósforo (P) está estrechamente relacionada con la fosfatasa alcalina (FA). La FA es una enzima frecuente en los organismos y se encuentra comúnmente unida a la superficie celular o en la fracción disuelta (Tank et al. 2005). Esta enzima libera fosfatos unidos a macromoléculas, permitiendo el transporte y la absorción celular de P proveniente de los alimentos (Elser et al. 2010, Wojewodzic et al. 2011). La actividad de FA (AFA) está considerada como un indicador de la deficiencia de P en el zooplancton y la actividad aumenta cuando el alimento es pobre en P (Elser et al. 2010, McCarthy et al.

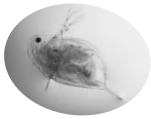


CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

2010, Wagner y Frost 2012). Otros factores como la temperatura modifican los requerimientos de P (Persson et al. 2011) y, por lo tanto, cambios térmicos podrían afectar a la AFA.

La RUV puede afectar las actividades enzimáticas de las poblaciones planctónicas a causa del aumento de las especies reactivas de oxígeno (EROs) (Hessen 1993, Barata et al. 2005, Souza et al. 2010b). Enzimas antioxidantes como Glutación S-Transferasa (GST) representan un importante mecanismo de defensa contra las EROs, mediante la inactivación de metabolitos secundarios durante el proceso de estrés oxidativo (Hayes et al. 2005). Además, la GST reduce hidroperóxidos lipídicos generados por estrés oxidativo de RUV (Hurst et al. 1998, Collinson y Grant 2003) que llevan a la destrucción de la membrana (Cho et al. 2000). Por otro lado, algunas enzimas fundamentales pueden verse afectadas de forma negativa por la RUV; se observó, por ejemplo, una disminución de la AFA extracelular en algas bajo exposición a RUV (Tank et al. 2005, Li et al. 2013). Es de esperar que la FA anclada a la membrana se encuentre “refugiada” de la RUV en el interior del cuerpo animal, pero animales que no poseen pigmentos de foto-protección, como *Daphnia commutata*, no tienen suficiente protección para las potencialmente peligrosas longitudes de onda corta de la RUV. Los cladóceros no acumulan fotoprotectores tales como aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) (Siebeck et al. 1994), y la incorporación de carotenoides está registrada en pocas especies (Rhode et al. 2001). Sin embargo, algunas especies pueden sintetizar el pigmento melanina y depositarlo en la cutícula como pigmento fotoprotector (Herbert y Emery 1990). Dado que un alto número de especies de *Daphnia* no son melánicas, otros mecanismos de defensa como la fotoreparación (Huebner et al. 2006, Connelly et al. 2009) se vuelven muy importantes y le permiten su éxito en colonizar ambientes transparentes donde hay una alta incidencia de RUV.

En la literatura se han citado dos mecanismos alternativos para hacer frente a los efectos de la RUV sobre el ADN: Reparación Foto-enzimática (PER) y Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER) (Essen y Klar 2006). La principal diferencia entre ambos es que PER no demanda de energía (ATP) para funcionar mientras que NER sí. La PER actúa en presencia de luz entre 380 y 400 nm, lo que produce la activación lumínica de la enzima fotoliasa, que revierte productos fotoquímicos del ADN inducidos por RUV (Sutherland 1981, Mitchell y Karentz 1993). La NER también revierte el daño del ADN pero actúa en condiciones de oscuridad y es una reacción enzimática múltiple que

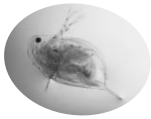


CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

depende de un suministro de ATP (Sancar 1996). Debido a las diferencias en la demanda de P entre ambos mecanismos se podrían esperar diferencias en la AFA en ambas condiciones.

Los grandes lagos del norte de la Patagonia Andina son ultra-oligotróficos, altamente transparentes y con muy bajas concentraciones de nutrientes, en particular P (Morris et al. 1995, Markert et al. 1997, Modenutti et al. 2000). Por otra parte, estos ambientes exhiben una alta penetración de RUV debido a su bajo contenido de materia orgánica disuelta (Morris et al. 1995, Modenutti et al. 2013); ausencia de contaminantes aéreos (Mladenov et al. 2011) y por su proximidad a la zona de adelgazamiento de la capa de ozono (Villafañe et al. 2001). Esta zona también es propensa a ser afectada por el aumento de temperatura en el próximo siglo (Barros et al. 2015). En esta área, organismos con altos requerimientos de P (como *Daphnia*) se distribuyen de acuerdo a la relación C:P del fitoplancton (Balseiro et al. 2007) y sus respuestas enzimáticas al estrés por RUV también se ven limitadas por la disponibilidad de nutrientes (Balseiro et al. 2008).

La temperatura, la exposición a la RUV y la calidad del alimento son posibles factores de estrés que afectan el éxito de *Daphnia* en ambientes acuáticos, sin embargo, el efecto combinado de estos factores ambientales da la posibilidad de respuestas sinérgicas o antagónicas en la AFA. Este capítulo tiene como objetivo analizar cómo *D. commutata* responde a la combinación de factores de estrés utilizando la AFA como un proxy del requerimiento de P y GST como un biomarcador de estrés oxidativo. Para este fin se realizó un diseño experimental de laboratorio en el que *Daphnia commutata* fue cultivada bajo diferentes condiciones controladas de calidad de alimento (relación C:P), temperatura y luz UV, simulando las condiciones de los lagos andinos. Basado en Balseiro et al. (2008) y Persson et al. (2011) que postulan que *Daphnia* creciendo con alimento de alta relación C:P y a alta temperatura se verá más afectada por la RUV, resultando en un aumento de la AFA y una disminución en la actividad de GST.



CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

Objetivo:

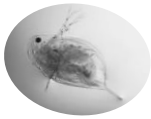
Analizar cómo *Daphnia commutata* responde a la combinación de factores (RUV, temperatura y calidad de alimento) de estrés utilizando la actividad de la fosfatasa alcalina (AFA) como un indicador del requerimiento de P y a la GST como un biomarcador de estrés oxidativo.

Hipótesis:

Las relaciones elementales de C:P del alimento interactuarán con la temperatura y la RUV en la capacidad antioxidante (GST) y de obtener P (AFA) por parte de *D. commutata*.

Predicciones:

- a. Individuos alimentados con altas relaciones C:P serán más susceptibles al aumento de la RUV y la temperatura.
- b. Una disminución de la calidad de alimento producirá un aumento en la actividad de FA. Por su parte, un incremento de la RUV implicará un aumento de las actividades de enzimas antioxidantes. y en consecuencia la AFA podría disminuir permitiendo una mayor síntesis e incremento de actividad de los sistemas antioxidantes enzimáticos.
- c. El incremento de la temperatura aumentará la limitación por P, por lo que se requerirá de mayor AFA. En consecuencia, la interacción con la RUV podría reducir las respuestas antioxidantes por mayor limitación de P. Es decir, habría un efecto sinérgico entre la RUV y la temperatura.



CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

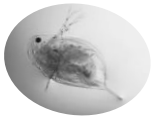
Materiales y métodos

Para llevar a cabo estos experimentos, se utilizó un cultivo de *D. commutata* generado a partir de un clon aislado del lago Mascaradi (Parque Nacional Nahuel Huapi, Patagonia, Argentina). El clon se mantuvo en condiciones de laboratorio por al menos 5 años antes de comenzar el experimento. A 15 °C de temperatura y alimentado “ad libitum” con un cultivo del alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Los neonatos nacidos de la misma cohorte fueron utilizados para llevar a cabo los experimentos.

Diseño experimental con RUV

Se llevó a cabo un experimento de exposición a RUV (RUV + RFA, 290-700 nm **RUV** en adelante vs. radiación fotosintéticamente activa + luz negra 380-700 nm, **RFA** en adelante) bajo dos tratamientos de temperatura (10 °C y 20 °C) y con tres calidades de alimento: **alta calidad**, con baja relación C:P = 550; **mediana calidad**, con relación C:P = 850 y **baja calidad**, con una alta relación C:P = 1150. Antes de iniciar la exposición a RUV, se realizó una aclimatación de *D. commutata* durante 6 días bajo las dos temperaturas y las tres calidades de alimento mencionadas. Esta aclimatación se estableció en base a estudios previos (Hessen et al. 2002). Para ello 20 neonatos de *D. commutata* (<24 h de edad) fueron dispuestos en frascos de cuarzo de 250 mL con medio de cultivo animal COMBO libre de P (Kilham et al. 1998) y cultivo de *C. reinhardtii* como alimento (0,5 mg L⁻¹ de C), con la calidad de alimento correspondiente (alta, media y baja, véase más arriba). El medio (COMBO-libre P) y la comida fueron reemplazados cada 48 h. Las concentraciones totales de P y C particulado también fueron monitoreados cada 48 h con un análisis estándar antes de añadir nuevo alimento a los frascos (véase más adelante "*Determinaciones bioquímicas*"). La aclimatación comprendió un total de 36 frascos (3 repeticiones para cada tratamiento calidad de alimento, temperatura y posterior dos condiciones de luz) y se llevó a cabo en una cámara de cultivo tipo Walk-in para ambas temperaturas y bajo RFA (longitud de onda 400-700 nm y la intensidad de 92 μmol m⁻² s⁻¹) con 14:10 horas de fotoperíodo (luz:oscuridad). Todo el material de vidrio y cuarzo fue cuidadosamente limpiado y esterilizado. Durante todo el experimento no se observó mortalidad de *D. commutata*.

Después de 6 días de aclimatación, la mitad de los frascos de cuarzo (seleccionados al azar) fueron expuestos a RUV, mientras que la otra mitad sólo a RFA



CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

(protegidos con una hoja nueva de filtros de acetato para eliminar longitudes de onda más cortas que 400 nm; Courtgard™, CPFilms (Doyle et al. 2005) durante 4 horas. Después de las 4 h de exposición a la RUV se retiraron las muestras para su posterior análisis y los individuos restantes fueron expuestos a 6 h de radiación RFA+Negra (380-700 nm) para que repararan el daño de la exposición a RUV con la enzima fotoliasa y realizaran la reparación PER. Una vez finalizado este período se retiraron muestras para su posterior medición y los restantes fueron dispuestos 6 h bajo condiciones de oscuridad, para que realizaran el proceso de NER.

Después de las 4 horas de exposición a la RUV y RFA se extrajeron con pipeta 8 individuos de cada réplica para su posterior análisis. Todos los individuos muestreados fueron inmediatamente congelados a -80 °C para determinar AFA y actividad de GST. Antes de realizar las determinaciones bioquímicas, cada individuo fue enjuagado con agua Milli-Q y medido a través de la toma de imágenes laterales para ser procesadas a través del software Image-Pro Plus, (Media Cybernetics), siguiendo Acharya et al. (2004a) y Balseiro et al. (2007). Las mediciones realizadas fueron convertidas a biomasa (peso seco en µg) basado en la regresión longitud-peso obtenida de Balseiro et al. (2008) y, finalmente, se determinó el crecimiento de los individuos expuestos a las tres calidades de alimento y las dos temperaturas. Después de cada período de reparación (PER y NER respectivamente), 4 individuos fueron extraídos de cada réplica para determinar la AFA (Ver Figura III.1).

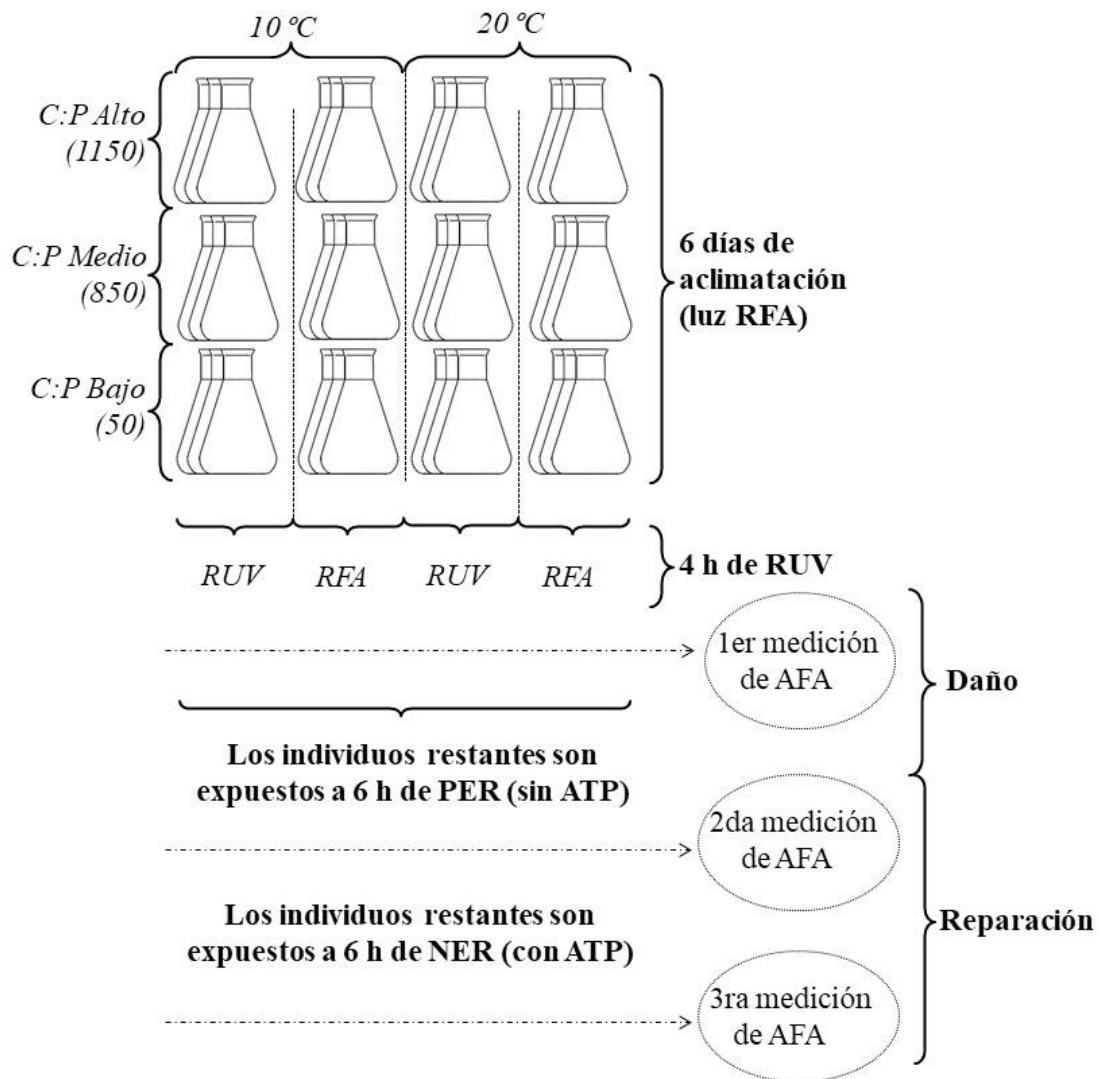
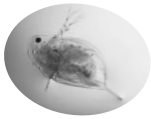
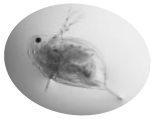


Fig. III.1. Esquema de diseño del experimento de exposición a RUV y de recuperación. En letra “negrita” se describen los tiempos y exposiciones del experimento. En “cursiva” las condiciones de cada cultivo en cuanto a calidad de alimento, temperatura y condición de RUV. Dentro de los globos punteados se marcan los momentos de extracción de individuos para su posterior análisis enzimático.

Características de la luz

La luz utilizada para llevar a cabo los experimentos fue emitida por dos lámparas fluorescentes UVA 340 (UVA 340 lámpara de Q-Panel Lab Products, con máxima emisión a 340 nm), dos lámparas fluorescentes de luz diurna (Philips TLT 40 W) y dos lámparas fluorescentes luz negra (Philips TL-D 30W). El espectro UV de la luz de las lámparas UVA340 se asemeja al espectro solar entre 280 nm y 350 nm (Shick et al. 1999).



CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

La luz negra se incluyó para llenar la brecha entre el máximo de emisión de UVA340 y las lámparas fluorescentes de luz diurna. Durante la incubación, los animales recibieron $35 \mu\text{W cm}^{-2}$ de 340 nm de longitud de onda, un nivel de radiación que es equivalente a la luz del sol que llega a la superficie de los lagos andinos durante el verano (Modenutti et al. 2005). La dosis total de 340 nm en las 4 horas de exposición fue de 5040 J m^{-2} .

Cultivo de algas

El alimento utilizado para los experimentos se obtuvo de un cultivo de algas de *C. reindhartii*. Para obtener diferentes relaciones C:P del cultivo, se utilizó medio de cultivo MBL (Guillard y Lorenzen 1972) pero con concentraciones de P más bajas (10 veces menor que la concentración original de P). La calidad de alimento baja (relación C:P = 1150) se obtuvo directamente a partir del MBL bajo en P mientras que las calidades media (relación C:P = 850) y alta (relación C:P = 550) se obtuvieron siguiendo a Persson et al. (2011) con la adición de diferentes cantidades de K_2HPO_4 a los cultivos de algas en MBL de bajo P permitiéndoles a las algas asimilar P durante una hora en oscuridad.

Después de estos procedimientos (con adición o sin adición de P), los cultivos de algas fueron centrifugados a 13000 g. Una vez centrifugados los cultivos, se descartó el sobrenadante para suspender el pellet (algas) en COMBO libre-P. Esta suspensión se utilizó tanto para alimentar *D. commutata* como para hacer el análisis de concentración de C y P particulado. Basado en la concentración de C, se añadió la suficiente cantidad de cultivo de algas para llegar a una concentración de $0,5 \text{ mg C L}^{-1}$ de *C. reindhartii* (concentración similar a la del lago Mascardi) a cada frasco de 250 mL, que contenía 20 individuos de *D. commutata* en COMBO libre-P.

Efecto de estrés oxidativo en AFA

Con el fin de determinar el efecto del estrés oxidativo sobre GST y AFA se realizó un experimento en el que *D. commutata* se expuso a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) durante 4 h. Un efecto directo resultaría en el daño de la FA por contacto directo con las longitudes de onda corta de RUV (Tank et al. 2005, Li et al. 2013), mientras que un daño indirecto en la FA sería causado por las EROs generadas por el contacto de la RUV con moléculas orgánicas. Para separar estos dos posibles efectos, se analizó la AFA en organismos expuestos a H_2O_2 en una concentración de $\sim 1000 \text{ nmol L}^{-1}$, basado en Rusak



CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

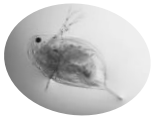
(2006) y Meinertz et al. (2008). Esta concentración es equivalente a la dosis de RUV del experimento con exposición a RUV (ver “*Características de la luz*”) que no es letal para *Daphnia* (Meinertz et al. 2008). La concentración de H₂O₂ al comienzo del experimento fue de 975 nmol L⁻¹ y después de 2 h disminuyó a 650 nmol L⁻¹ (en 4 h la mayor parte del H₂O₂ se redujo). Debido al decaimiento de la concentración de H₂O₂ luego de 4 h, sólo mostramos los resultados de 2 h de exposición. El experimento se realizó con dos calidades de alimento (media: C:P = 850 y baja C:P = 1150) y en dos escenarios: con y sin H₂O₂. Previo a iniciar la experimentación, se aclimataron a individuos de *D. commutata* bajo las dos calidades de alimento durante 6 días y posteriormente fueron dispuestos de a 10 en frascos de 100 mL bajo las mismas condiciones que el experimento de exposición a RUV. La mitad de los frascos recibieron un suministro de H₂O₂ y todas las réplicas se mantuvieron a 20 °C en oscuridad. Una vez transcurridas las 2 h se extrajeron los individuos de los frascos para ser congelados (freezer -80 °C) para su posterior determinación de AFA y actividad de GST.

Determinaciones bioquímicas

La concentración de C de los cultivos de *C. reindhartii* se analizó con un analizador elemental CHN (Thermo Finnigan EA1112, Thermo Fisher, Milán, Italia). El fósforo total de *C. reindhartii* se determinó con una digestión con persulfato seguida de una reacción con molibdato (APHA 2005). Todas las determinaciones se llevaron a cabo en al menos tres réplicas.

AFA se determinó siguiendo a Wagner y Frost (2012) con 1 espécimen por medición. Cada *D. commutata* se homogeneizó con un homogeneizador ultrasónico (Sartorius, LABSONIC M, con 0,6 ciclos, 80% de la amplitud y punta de 2 mm Ø) en solución buffer 120 µL (Tris pH = 8) y se centrifugó a 13.000 g durante 10 minutos a 4 °C para obtener el sobrenadante de enzima. En cada muestra se adicionó 100 µL de 4-Metilumbeliferona-fosfato (MUP) 0,05 µmolar como sustrato. La AFA se determinó fluorométricamente con un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS45, con una excitación de 360 nm y una emisión de 420 nm y se expresó en µmol de Metilumbeliferona (MU) min⁻¹ µg⁻¹ de peso seco de cada *D. commutata*.

La actividad de GST se determinó según Habig et al. (1974) en 0,1 mol L⁻¹ de buffer de fosfato (pH = 6,5), con 0,1 mg mL⁻¹ de 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno en



CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

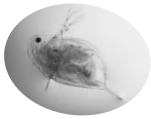
acetonitrilo (1% v/v) y $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$ de L-glutathión reducido como sustrato para registrar la absorbancia de GST a 340 nm, usando un espectrofotómetro Shimadzu UV 2450 a $23 \pm 0,5 \text{ }^\circ \text{C}$. La actividad de GST se expresó en μmol de producto formado $\text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de peso seco de los animales.

Análisis estadístico

El efecto del experimento de estrés oxidativo (con y sin exposición a H_2O_2) se analizó con una prueba de ANOVA de dos vías (factor A: exposición a H_2O_2 y el factor B: calidad de alimento).

Las diferencias en la actividad de la FA y GST de *D. commutata* expuestos a la RUV y RFA en diferentes temperaturas y tratamientos de alimento fueron analizadas con un ANOVA de tres vías (factor A: temperatura, factor B: calidad de alimento y factor C: luz). Para analizar las etapas de reparación posteriores (PER Y NER), se realizó una prueba de ANOVA de dos vías (factor A: temperatura y factor B: calidad de alimento) para cada fase de recuperación. Cuando se observaron diferencias significativas se aplicó un test *a posteriori* de comparaciones múltiples de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

El crecimiento somático se analizó también mediante un ensayo ANOVA de dos vías (factor A: temperatura y el factor B: calidad de alimento), seguido de un método de comparación múltiple *a posteriori* de Holm-Sidak ($\alpha = 0,05$). Todos los análisis estadísticos se realizaron en Sigma Plot 12.5 (Systat Software Inc, San Jose, CA, EE.UU.). Para todos los datos se comprobó la normalidad y la homocedasticidad. El crecimiento somático fue transformado logarítmicamente con el fin de cumplir con el requerimiento de normalidad.



CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

Resultados

Crecimiento somático de Daphnia commutata bajo diferentes temperaturas y calidades de alimento

El crecimiento somático se vio afectado por la interacción de la temperatura y la calidad de alimento (ANOVA; $F_{2, 192} = 6,027$ $P = 0,003$; Figura III.2). La biomasa de *Daphnia* fue mayor a 20 °C (*a posteriori* Holm-Sidak: $p < 0,001$) que a 10 °C para las 3 calidades alimento. A 20 °C se observaron diferencias significativas dentro de las 3 calidades de alimento, la baja calidad presentó valores de biomasa significativamente más bajos que la media y alta calidad (*a posteriori* Holm-Sidak: $p < 0,001$). Por el contrario, a 10 °C las biomásas fueron similares para las 3 de calidades de alimento y no se observaron diferencias significativas (Figura III.2).

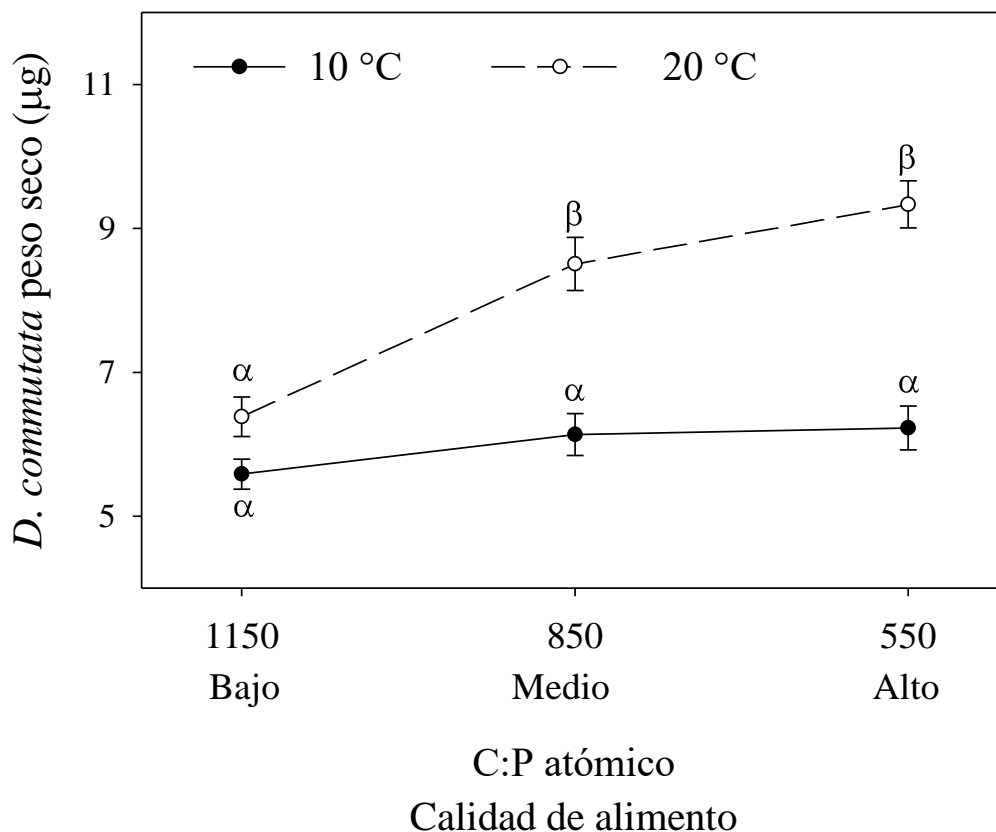
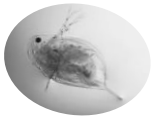


Fig. III.2. **Crecimiento somático** de *D. commutata* con tres calidades de alimento (Bajo: C:P 1150, Medio: C:P 850, Alto: C:P 550) y dos temperaturas (10 °C y 20 °C). Las barras de error representan un error estándar y las letras griegas las diferencias significativas.



CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

Experimento de exposición a RUV

La interacción entre los tres factores analizados (luz, temperatura y calidad de alimento) no fue significativa para el ANOVA de 3 vías ($F_{1,36} = 0,584$ $P = 0,564$; Figura III.3), pero si hubo efectos de interacción en temperatura vs. luz (ANOVA de tres vías $F_{1,36} = 13,836$ $P < 0,001$; Figura III.3) y en temperatura vs. calidad de alimento (ANOVA de tres vías $F_{1,36} = 4,266$ $P = 0,023$; Figura III.3). La actividad de GST exhibió diferencias significativas entre los tratamientos de luz sólo a 20 °C (*a posteriori* Tukey HSD, $p < 0,001$; Figura III.3b) resultando más alta en el tratamiento RUV. Además, a 20 °C se observó una tendencia a una mayor actividad de GST en animales que fueron alimentados con algas de un valor nutritivo más alto, con diferencias significativas entre la baja calidad de alimento y la media y alta calidad de alimento (Figura III.3b). Por último, la temperatura resultó con diferencias significativas en la exposición a la RUV (*a posteriori* Tukey HSD, $p < 0,001$; Figura III.3b), pero no así en el tratamiento sólo con luz RFA (*a posteriori* Tukey HSD, $p = 0,221$; Figura III.3b).

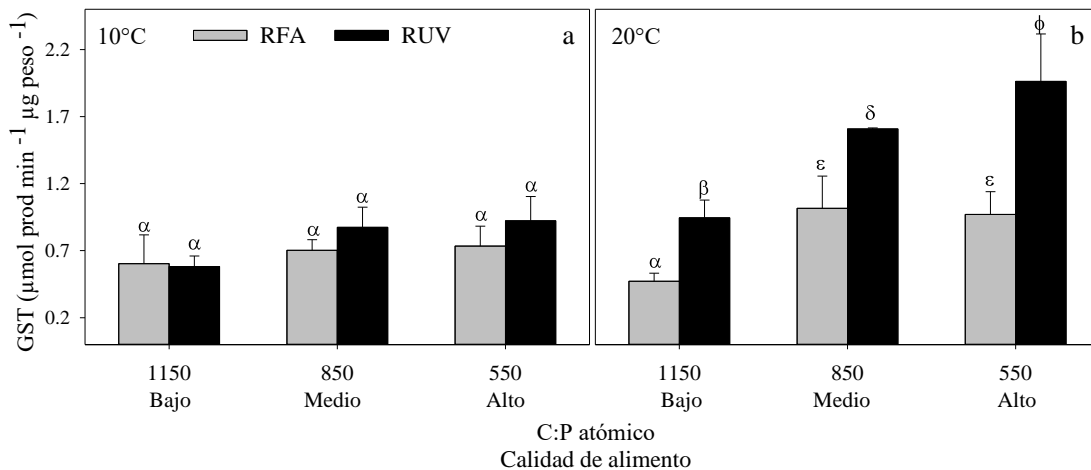
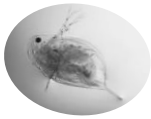


Fig. III.3. **Actividad de GST bajo exposición a RUV y a RFA.** Actividad de GST en *D. commutata* para las tres calidades de alimento utilizadas (Bajo: C:P 1150, Medio: C:P 850, Alto: C:P 550), después de la exposición a RUV vs. RFA, bajo dos temperaturas a 10 ° (a) y a 20 °C (b). Las barras de error representan un error estándar y las letras griegas las diferencias significativas.



CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

Al igual que en GST no hubo interacción significativa para los factores analizados en el experimento de exposición a RUV de la AFA (Interacción 3 factores ANOVA de tres vías $F_{1,62} = 1,181$ $P = 0,314$; Figura III.4). Igualmente, durante las 4 h de exposición a la RUV se observó una disminución significativa en la AFA en relación con el tratamiento RFA (ANOVA de tres vías para luz, $F_{1,62} = 43,462$ $P < 0,001$; Figura III.4). Por su parte, la temperatura también afectó negativamente la respuesta de AFA, siendo mayor en el tratamiento a 20 °C (ANOVA de tres vías para temperatura, $F_{1,62} = 26,806$ $P < 0,001$; Figura III.4). Por otro lado, aunque la calidad del alimento tuvo efectos significativos (ANOVA de tres vías para calidad de alimento, $F_{2,62} = 7,064$ $P = 0,002$; Figura III.4) no se registró una respuesta unívoca con la temperatura. A baja temperatura (10 °C) la AFA disminuyó a medida que la calidad del alimento aumentó, a 20 °C se observó la mayor respuesta de AFA a media calidad (*a posteriori* Tukey HSD $p < 0,001$), mientras que la calidad de alimento baja presentó la AFA más baja (*a posteriori* Tukey HSD, $p < 0,001$; Figura III.4b).

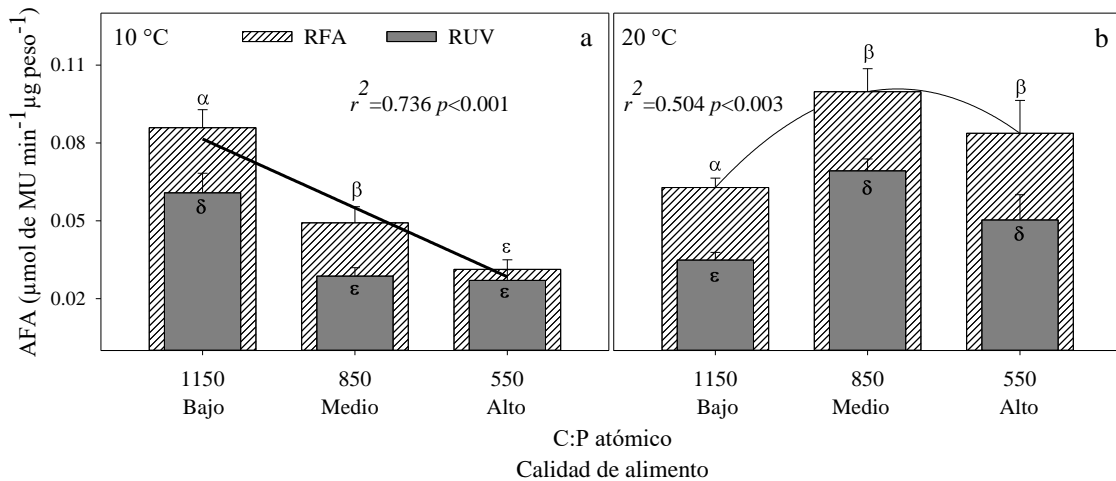
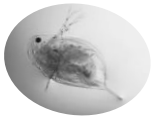


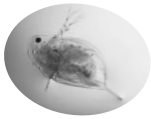
Fig. III.4. **AFA bajo exposición a RUV y RFA.** Respuesta de la AFA en *D. commutata* a la exposición a RUV vs. exposición a RFA para tres calidades de alimento (Bajo: C:P 1150, Medio: C:P 850, Alto: C:P 550), en dos temperaturas a 10 °C (a) y 20 °C (b). Las barras de error representan un error estándar y las letras griegas las diferencias significativas.



CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

Experimento de reparación de RUV

Después del primer período de recuperación (PER) de la exposición a RUV, la AFA se mantuvo similar a los valores obtenidos después de la exposición a RUV. La interacción de los factores luz vs. calidad de alimento analizadas en el ANOVA de dos vías fue significativa ($F_{2, 21} = 10,932 P < 0,001$; Figura III.5). A 20 °C no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a la calidad de alimento (*a posteriori* Tukey HSD calidad de alimento a 20 °C, $p_{(C:P 1150)} = 0,221$; $p_{(C:P 850)} = 0,862$; $p_{(C:P 550)} = 0,877$; Figura III.5b). En el tratamiento NER también hubo una interacción significativa entre los dos factores analizados (Temperatura y calidad de alimento) en el ANOVA de dos vías ($F_{2, 21} = 12,453 P < 0,001$; Figura III.5). En este tratamiento se observaron diferencias significativas, con un aumento de actividad para la temperatura de 20° C vs. 10 °C para responder al efecto de recuperación con consumo de energía (*a posteriori* Tukey HSD temperatura $p < 0,001$; Figura III.5). A 20 °C el tratamiento de la calidad de alimento media exhibió la mayor respuesta de AFA y la baja calidad de alimento la actividad enzimática más baja (Figura III.5d).



CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

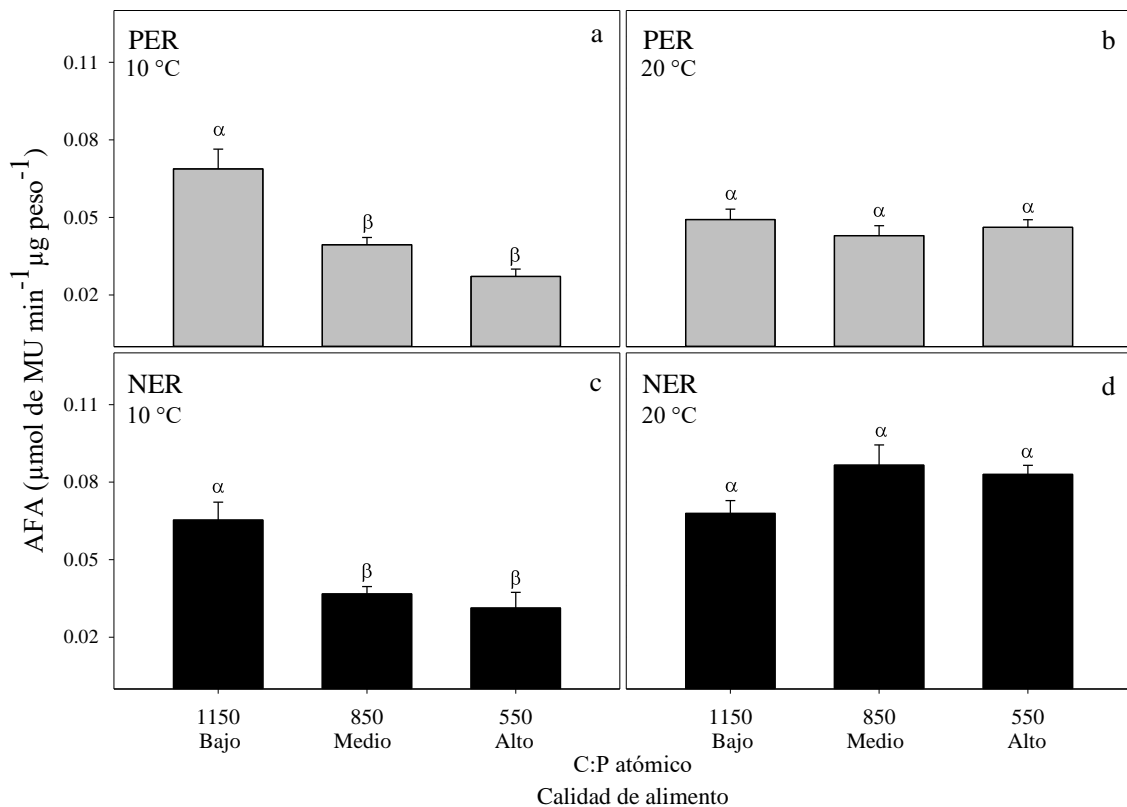
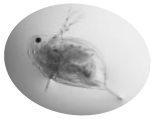


Fig. III.5. **AFA en la fase de recuperación de la exposición a RUV.** Respuesta de AFA de *D. commutata* para las fases de recuperación (PER y NER) con las tres calidades de alimento utilizadas (Bajo: C:P 1150, Medio: C:P 850, Alto: C:P 550). PER a 10 °C (a) y a 20 °C (b) y NER at 10 °C (c) y a 20 °C (d). Las barras de error representan un error estándar y las letras griegas las diferencias significativas.

Efectos del estrés oxidativo en GST y AFA

Los resultados de actividad de GST no mostraron interacción significativa entre el factor H₂O₂ vs. calidad de alimento (ANOVA de dos vías para interacción $F_{1,17} = 2,014$ $P = 0,174$; Figura: III.6a), pero sí hubo efecto de ambos factores por separado. Durante las 2 h de exposición a 20 °C se observó que la actividad de GST aumentó en cuando *D. commutata* fue expuesta a H₂O₂ (ANOVA de dos vías para temperatura $F_{1,17} = 47,026$ $P < 0,001$; Figura: III.6a). También hubo diferencias entre calidades de alimento, siendo mayor la actividad de GST con calidad de alimento media (C:P 850) (ANOVA de dos vías para calidad de alimento $F_{1,17} = 5,966$ $P = 0,026$; Figura: III.6a). Los resultados de AFA mostraron una interacción significativa entre ambos factores evaluados disminuyendo la AFA con menor calidad de alimento (C:P 1150) cuando se encontró



CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

expuesta a H_2O_2 (Interacción ANOVA de dos vías $F_{1,22} = 9,978$ $P = 0,005$; Figura III.6b). Sin embargo, la respuesta en AFA resultó mayor en el tratamiento de calidad de alimento media (C:P 850) (ANOVA de dos vías para calidad de alimento $F_{1,22} = 60,068$ $P < 0,001$; Figura III.6b).

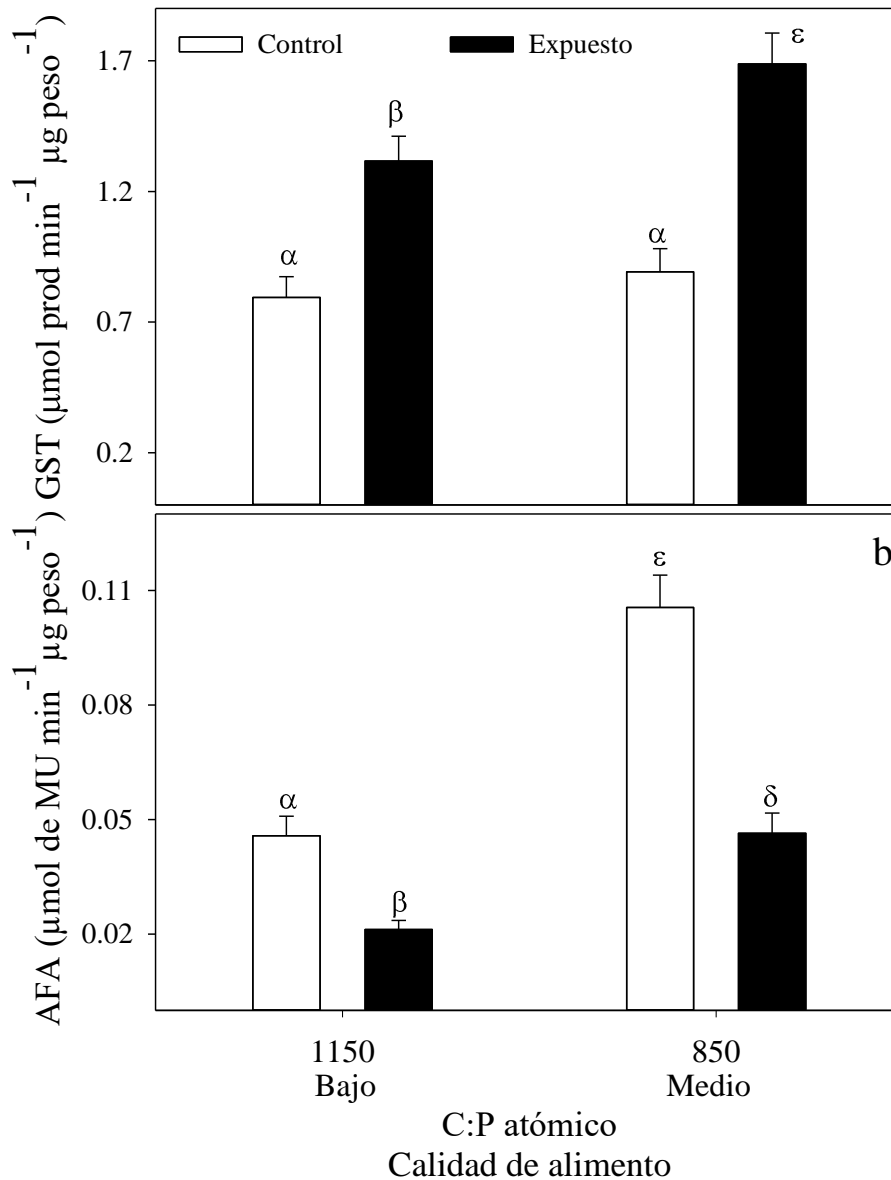
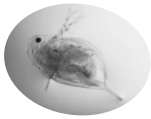


Fig. III.6. **Actividad de GST y AFA bajo exposición a H_2O_2 .** (a) Actividad de GST después de 2 h de exponer a *D. commutata* a H_2O_2 vs. control sin H_2O_2 con baja y media calidad de alimento, a 20 °C. (b) AFA después de 2 h de exponer a *D. commutata* a H_2O_2 vs. control sin H_2O_2 con baja y media calidad de alimento, a 20 °C. Las barras de error representan un error estándar y las letras griegas las diferencias significativas.

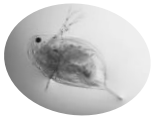


CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

Discusión

En los ecosistemas acuáticos, la RUV es reconocida como un importante factor de estrés biológico que causa daño celular a moléculas fundamentales (ADN, proteínas y lípidos), apoptosis y estrés oxidativo (Martindale y Holbrook 2002, Souza et al. 2012), alterando los niveles de glutatión reducido y aumentando la actividad de ciertas enzimas involucradas en el metabolismo de EROs como catalasa, glutatión reductasa y GST entre otras (Souza et al. 2007, Souza et al. 2010b). El aumento de estas defensas antioxidantes implica demandas extra de energía y requiere alta calidad de alimento para generar una respuesta adecuada (Balseiro et al. 2008, Souza et al. 2010b). Adicionalmente, la producción de EROs aumenta a temperaturas más altas (Lesser 1996). Nuestros resultados apoyaron las premisas mencionadas ya que se observó una mayor actividad de GST a 20 °C y con alta calidad de alimento en respuesta a la exposición a RUV (Figura III.4). Por el contrario, con baja calidad de alimento (C:P = 1150) GST exhibió valores de actividad comparativamente más bajos que indican que *D. commutata* fue fuertemente limitada por P, al no poder generar enzimas para neutralizar las EROs. Se observó la misma tendencia en el experimento con adición de H₂O₂ (Figura III.6) confirmando que GST respondió con baja actividad al estrés oxidativo cuando *Daphnia* fue alimentada con baja calidad.

La AFA respondió negativamente tanto a la exposición a H₂O₂ (Figura III.6) como a la RUV (Figura III.3). Aunque, los valores absolutos de actividad fueron muy diferentes en los dos escenarios (RUV y H₂O₂), la respuesta frente a la calidad de alimento en ambos experimentos a 20 °C da resultados similares. Esta diferencia puede deberse a que la exposición a RUV no sólo genera EROs (como el H₂O₂) sino que también hay un daño directo de la RUV a las enzimas. Se observó que la respuesta de AFA en *D. commutata* dependió de la relación C:P de la comida con un aumento significativo en el tratamiento a 20 °C en comparación con el de 10 °C (Figura III.3). Crecer a una alta temperatura aumenta la limitación de nutrientes (P) porque implica mayores necesidades de nutrientes para mantener el metabolismo y crecimiento adecuados (Persson et al. 2011) y además para proporcionar más energía para el incremento de ciertos procesos como locomoción, respiración y reproducción (Wojtal-Frankiewicz 2012). Por otro lado, a 10 °C se observó un aumento en AFA con baja calidad de alimento, lo que confirma que la AFA responde monótonamente a calidad del alimento; siendo que la AFA disminuye a medida que aumenta la calidad del alimento. A baja temperatura, se han observado bajos

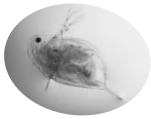


CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

requerimientos de nutrientes para el crecimiento somático como observaron Rhee y Gotham (1981) y no se han registrado cambios en la susceptibilidad a RUV para las 3 calidades de alimento, al igual que sugieren Borgeraas y Hessen (2000). Por lo tanto, la respuesta de la AFA en condiciones de baja calidad de alimento (C:P = 1150) parecería cumplir con los requerimientos de P a 10 °C, con una relación negativa entre la AFA y la concentración de P, tal como se esperaba. Sin embargo, a 20 °C AFA mostró una tendencia diferente, con valores más bajos para baja calidad de alimento. Además, se observó la misma tendencia en nuestro experimento de exposición a H₂O₂ que se llevó a cabo a 20 °C (Figura III.6). En un estudio con *D. magna*, Wojewodzic et al. (2011) indicaron que AFA fue mayor a temperaturas más bajas, sin embargo, en los resultados de este estudio la AFA fue mayor a 20 °C que a 10 °C. Por otro lado, Persson et al. (2011) demostraron que la limitación de P aumenta con la temperatura, por lo tanto, es probable que individuos creciendo a mayor temperatura estén más limitados por P y exhibieron mayor AFA, como se observó en este estudio.

El alimento algal empobrecido (bajo contenido de P) reduce la disponibilidad de P mineral dietario disponible para *Daphnia*, por lo tanto, la AFA puede ser utilizada como un indicador de estrés por P (McCarthy et al. 2010). La cantidad de P en la comida también regula la cantidad de FA que se libera al agua. McCarthy et al. (2010) demostraron que una reducción de la liberación de FA al medio es ventajosa para *Daphnia* cuando se encuentra limitada por falta de P. Así, bajo limitación por P la AFA extracelular se reduce y la concentración de FA anclada a la membrana es mayor que en animales bien alimentados (McCarthy et al. 2010). En nuestros experimentos la AFA somática más alta se observó para baja calidad de alimento a 10 °C, pero no así a 20 °C. Persson et al. (2011) demostraron que la limitación de P aumenta con la temperatura, por lo tanto a 20 °C *D. commutata* podría encontrarse tan limitada por este nutriente que ni siquiera tendría recursos para poder sintetizar FA. En este sentido, sugerimos que en virtud de la limitación de P severa (baja calidad de los alimento y alta temperatura) hay un equilibrio entre la producción de FA y otras proteínas constitutivas, por lo que la AFA no mostró una tendencia creciente al disminuir la calidad del alimento (Wojewodzic et al. 2011).

Durante la primera y segunda fase de recuperación (PER y NER) de productos fotoquímicos del ADN (no medidos en este estudio), observamos diferentes tendencias en la AFA. La primera fase (PER, 380-700nm) se caracterizó por no presentar cambios en AFA. Durante esta fase la enzima fotoliasa utiliza fotones de luz como fuente de



CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

energía, por lo tanto no requiere de energía extra (ATP) para reparar los daños generados por la RUV (Park y Rho 2002, Essen y Klar 2006). En la siguiente fase (oscuridad), se observaron cambios en la AFA que indican cambios en las demandas de P (Figura III.5c y 5d). Estudios previos observaron que se requiere ATP para la reparación del ADN en NER (Park y Rho 2002), por lo tanto los requerimientos de P deberían aumentar. Es probable que este aumento de la demanda de P para la reparación (el daño en el ADN no se midió en el presente estudio) implique mayor AFA. Curiosamente, de nuevo a 20 °C, AFA mostró una tendencia similar a la observada después de la exposición a RUV, con el máximo para media calidad de alimento. Del mismo modo, podemos suponer que, a alta temperatura, con baja calidad de alimento los organismos estarían tan limitados por P que incluso la síntesis de FA se vio afectada. El hecho de que en las tres exposiciones (UVR, H₂O₂ y NER) a 20 °C mostraron la misma tendencia en la AFA, refuerza la idea que no aumenta monótonamente con la disminución de la calidad de los alimentos.

Estos experimentos ponen de manifiesto la relación entre las variables como la RUV y la temperatura con el estado nutricional de *Daphnia*. Se ha demostrado que AFA somática, se ve afectada por el estrés oxidativo (tanto por H₂O₂ como por la exposición a RUV). Sin embargo, se observa que la respuesta de la AFA a la RUV también se ve afectada por la temperatura y la calidad del alimento. En este contexto, se determinó que a temperaturas más altas la RUV tiene un mayor efecto perjudicial sobre la AFA (Macfadyen et al. 2004), probablemente por un aumento en las tasas metabólicas y mayor reactividad a RUV. A 20 °C y con baja calidad de alimento (C:P = 1150) *D. commutata* estuvo tan desprovista de P que probablemente ni siquiera pudo sintetizar FA, debido al aumento de la limitación de P por encontrarse a una mayor temperatura. *D. commutata* creciendo con alta relación C:P y alta temperatura se ve más afectada por la RUV, por lo tanto, baja calidad de alimento y ambientes transparentes tales como lagos oligotróficos son un verdadero desafío para la aptitud de *Daphnia*. En un contexto de cambio global, es importante tener en cuenta todas estas variables interactivas, ya que la temperatura, la RUV y los nutrientes son variables que van a interactuar de manera diferencial en la respuesta de *Daphnia*.



CAPITULO IV

Análisis del nivel de estrés oxidativo generado por la exposición a RUV en dáfnidos con pigmentos foto-protectores (*Daphnia dadayana*).

Introducción:

La presencia de depredadores, la radiación ultravioleta y la disponibilidad de alimento, entre otros, son factores ecológicos importantes para el conocimiento de la dinámica poblacional y comunitaria del zooplancton. A través de la evolución, el zooplancton ha desarrollado estrategias fisiológicas, morfológicas y comportamentales para enfrentar exitosamente estas variables ambientales (Tollrian y Heibl 2004, Gabriel et al. 2005). Dentro de ellas las más conocidas son la capacidad de realizar migraciones verticales para evitar ondas de luz potencialmente dañinas y a los depredadores (Williamson et al. 2011) u obtener mejor calidad de alimento (Lampert 1989); otra se basa en la capacidad de acumular pigmentos fotoprotectores (Goodwin 1986, Herbert y Emery 1990, Shick y Dunlap 2002, Tollrian y Heibl 2004) para evitar el daño por exposición a RUV.

La exposición del zooplancton a RUV genera un daño en las estructuras celulares como el ADN y las proteínas. Estas longitudes de onda corta son potencial y efectivamente muy nocivas y aún niveles normales de RUV en latitudes templadas están asociados con un aumento en la mortalidad del zooplancton (Zagarese et al. 1994, Leech y Williamson 2000). Para evitar el daño de la RUV, el zooplancton utiliza variadas estrategias como por ejemplo: mecanismos comportamentales (migración vertical), acumular compuestos foto-protectores que funcionan como barreras de RUV y mecanismos enzimáticos que contrarrestan los radicales generados por la exposición (Hairston 1976, Vinebrooke y Leavitt 1999) (Ver Figura IV.1).



Fig. IV.1: **Esquema de interacción de RUV con sistema acuático.** Efectos sobre agua y materia orgánica y estrategias de defensa por parte de los organismos acuáticos.

Los compuestos fotoprotectores pueden ser obtenidos del alimento (algas fundamentalmente) y acumulado en el cuerpo del animal como es el caso de los aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) y carotenos en los copépodos (Hairston 1976, Moeller et al. 2005) y otros son sintetizados por el propio animal como es el caso de la melanina en cladóceros (Herbert y Emery 1990). Es interesante mencionar que los MAAs son efectivos foto-protectores (Shick y Dunlap 2002) pero no están presentes en los cladóceros (Tartarotti et al. 2001, 2004). Por lo tanto, la presencia de melanina resulta muy relevante en el estudio de la foto-protección de estos organismos.

La capacidad de sintetizar o adquirir pigmentos es una característica plástica, este tipo de plasticidad fenotípica es clave para el éxito de los organismos, especialmente cuando las variables ambientales varían temporal y espacialmente como lo es en las comunidades pelágicas (Hansson et al. 2007). La plasticidad fenotípica se refiere a la expresión de un fenotipo (carácter) que se da, como respuesta a una señal ambiental, que



CAPITULO IV: RUV y pigmentos

suele ser química y debe ser recibida en un momento particular del desarrollo del organismo para poder generarse la respuesta (Agrawal 2001).

Los cladóceros que sintetizan melanina, poseen una distribución corporal heterogénea del pigmento con una máxima concentración en la zona nugal del caparazón que protege el vulnerable tubo digestivo, debido a la posición en la que nadan (Herbert y Emery 1990). Las especies de *Daphnia* sintetizan melanina cuando se encuentran expuestas a RUV y, por lo tanto, la concentración de melanina en su cuerpo está directamente relacionada con la dosis que recibe de RUV (Hansson et al. 2007). Este mecanismo es plástico, ya que genera costos metabólicos en mantener la concentración de melanina cuando el organismo no está expuesto. Hansson y colaboradores (2007) mostraron que una especie de *Daphnia* del sub-ártico de Siberia reduce su pigmentación un 40% cuando se le excluye de la exposición a RUV. Por lo tanto la melanización del caparazón se pierde cuando los animales son criados sin la porción de longitudes de onda corta del espectro lumínico (RUV) (Luecke y O'Brien 1983, Hessen et al. 1999).

La exposición a RUV genera un aumento del estrés oxidativo (Bishop et al. 1980, Souza et al. 2010a, Souza et al. 2010b, Souza et al. 2012) y, en consecuencia, se activan los sistemas de defensa enzimática para neutralizar las EROs generadas que pueden dañar las estructuras celulares; pero al mismo tiempo en las especies de *Daphnia* melánicas hay un aumento de melanina producto de dicha exposición (Rautio y Korhola 2002, Tollrian y Heibl 2004). Estudios previos demostraron en copépodos que la pigmentación y las enzimas antioxidantes son sistemas de defensas flexibles que pueden ser inducidos cuando son necesarios (Hylander et al. 2012). En particular, en los copépodos se observó que las respuestas antioxidantes se aumentan cuando la pigmentación se reduce por efecto del riesgo de depredación por peces (Hylander et al. 2012).

En la región patagónica *Daphnia dadayana* es una especie endémica que habita cuerpos de agua someros y, en general, sin peces (Paggi 1999). Esta especie es melánica por lo cual resulta muy interesante analizar la capacidad de sintetizar melanina en relación con la exposición a RUV y, a su vez, comparar la concentración de melanina en relación con el aumento de actividad de sistemas enzimáticos antioxidantes como Glutathion S-transferasa (GST) que neutraliza las EROs.



CAPITULO IV: RUV y pigmentos

Objetivo:

Analizar la respuesta plástica de aumento de la concentración de melanina vs la actividad de antioxidantes (GST) frente a la exposición a RUV.

Hipótesis:

En *Daphnia dadayana*, la concentración de melanina actuará como primera defensa a la RUV y por lo tanto no habrá cambios en la actividad antioxidante.

Predicciones:

- a. Habrá un aumento de melanina en la zona nugal de *D. dadayana* a medida que aumente la exposición a RUV a través del tiempo.
- b. La actividad antioxidante no se incrementará en *D. dadayana* con mayor concentración de melanina.



CAPITULO IV: RUV y pigmentos

Materiales y métodos

Daphnia dadayana fue elegida para realizar este experimento por su capacidad de sintetizar melanina, pueden ser cultivados bajo condiciones de laboratorio, y representa una especie endémica patagónica. Los especímenes utilizados provienen de la laguna los Juncos (Bariloche, Patagonia, Argentina, 41°04'00"S 71°01'00"O) y estuvieron mantenidos en cultivos de laboratorio en condiciones constantes de temperatura, fotoperiodo y alimento.

La Laguna los Juncos (41° 04' S 71° W) es un ambiente temporario situado en la meseta patagónica a 911 msnm. Las precipitaciones son de 550 mm por año y constituyen el principal aporte de agua al ambiente. La laguna tiene un hidroperíodo entre junio y enero, sin embargo este período puede variar de manera notable debido a intervenciones antrópicas sobre el ambiente. La laguna posee una superficie de 2 ha y profundidad máxima de 1 m. El agua es levemente alcalina (pH= 7.8) y conductividad de 500 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (Modenutti et al. 1998).

Paggi (1999) describió esta especie en varias lagunas de la Patagonia argentina y chilena entre los 39° y 52° de latitud sur también incluyendo una descripción general de los ambientes que habita *D. dadayana*: “lagunas someras, mayormente temporarias, de zonas áridas y semiáridas. Estas lagunas son característicamente turbias, alcalinas (pH = 8.2 - 8.8) y con una conductividad que varía de 635 a 2700 $\mu\text{S cm}^{-1}$ ”. Los parámetros establecidos en el citado trabajo se reúnen de los datos de las lagunas dónde se encontró presencia de *D. dadayana*, por lo tanto podrían ampliarse con nuevos parámetros como los medidos en la laguna Los Juncos por (Modenutti et al. 1998).

Experimento exposición a RUV

Se mantuvieron clones madres de *D. dadayana*, correspondientes a la misma cohorte, bajo condiciones de laboratorio controladas (Temperatura: 15 °C y fotoperiodo 16:8 h luz:oscuridad) alimentadas *ad libitum* para que desarrollaran la mayor cantidad de huevos posibles, de forma sincronizada. Los neonatos nacidos durante un período de 12 h fueron separados y colocados en nuevo medio con alimento (*Chlamydomonas reinhardtii*) en concentración de 1 mg L⁻¹ de C.

Los neonatos fueron distribuidos de a diez en frascos de cuarzo de 150 mL y se los expuso a RUV 2 h todos los días durante 6 días (tratamiento RUV), con un control en



CAPITULO IV: RUV y pigmentos

frascos de vidrio y cubiertos con acetato de celulosa para evitar el efecto de la RUV (Tratamiento RFA). Al final de este experimento (6 días) los ejemplares fueron almacenados en micro tubos Eppendorff en ultrafreezer a -80°C para el posterior análisis enzimático.

Durante el experimento, se extrajeron 3 ejemplares de *D. dadayana* (por 3 réplicas) cada 3 días (inicial, 3 días y 6 días de exposición) que fueron almacenadas en micro tubos Eppendorff en ultrafreezer a -80°C para el posterior análisis de la melanina.

Características de la luz

La luz utilizada para llevar a cabo los experimentos fue emitida por dos lámparas fluorescentes UVA 340 (UVA 340 lámpara de Q-Panel Lab Products, con máxima emisión a 380 nm), dos lámparas fluorescentes de luz diurna (Philips TLT 40 W) y dos lámparas fluorescentes luz negra (Philips TL-D 30 W). El espectro UV de la luz de las lámparas UVA340 se asemeja al espectro solar entre 280 nm y 350 nm (Shick et al. 1999). La luz negra se incluyó para abarcar el rango entre el máximo de emisión de UVA340 (λ_{max} : 350 nm) y las lámparas fluorescentes de luz diurna (λ_{min} : 400 nm). Durante la incubación, los animales recibieron $35 \text{ mW cm}^{-2} \text{ nm}^{-1}$ de 340 nm de longitud de onda, un nivel de irradiación que es equivalente a la luz del sol que llega a la superficie de los lagos durante el verano (Modenutti et al. 2005). La dosis diaria de 340 nm fue de 2520 J m^{-2} .

Análisis de imágenes

De cada ejemplar extraído (inicial, día 3 y día 6) se tomaron fotografías laterales para evaluar si había diferencias de intensidad de color entre tratamiento RUV y control. Para realizar este procedimiento se utilizó un microscopio estereoscópico con una cámara fotográfica y las imágenes fueron procesadas con el software Image-Pro Plus, (Media Cybernetics). Posteriormente se midió la intensidad del color de un punto de la zona nugal (Figura IV.2) con el programa Image J/FIJI (Schindelin et al. 2012), utilizando imágenes formato TIFF en composición de colores RGB. Estas imágenes fueron normalizadas y transformadas en blanco y negro para que fueran comparables, utilizando la aplicación BaSic adaptada para utilizarse con ImageJ/FIJI. (Peng et al. 2017). La intensidad del color está expresada en valores numéricos para el formato de colores RGB transformados a imágenes en blanco y negro. El color negro corresponde al valor 0 y el blanco al 255, por



CAPITULO IV: RUV y pigmentos

lo tanto, los organismos que presentaron valores más altos en la medición son los que menor concentración de melanina tenían.

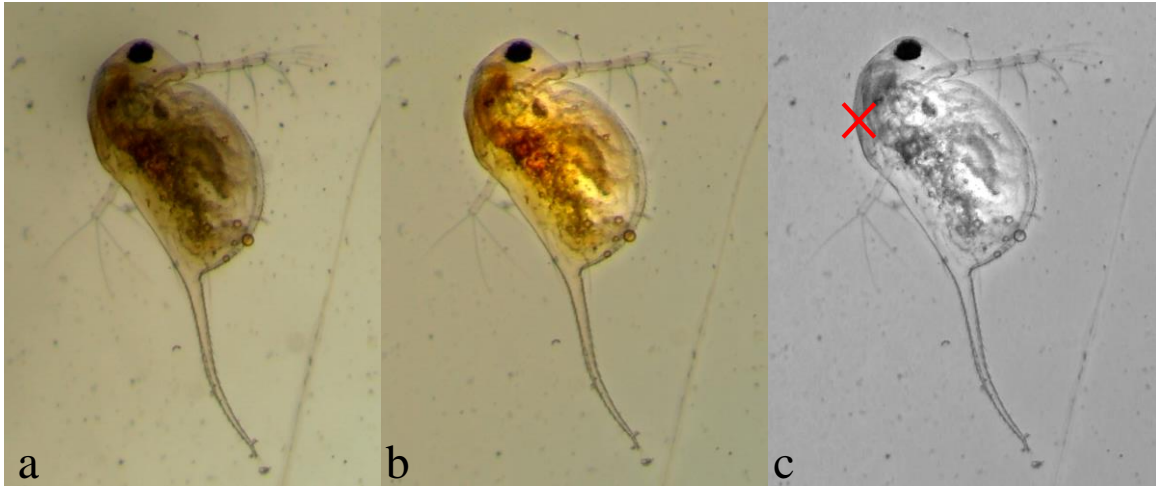


Fig IV.2. **Imagen de *Daphnia dadayana* en formato RGB** (a) original, (b) imagen normalizada y (c) imagen transformada a blanco y negro para realizar la medición. La cruz roja de la imagen c, ubicada en la nuca de *D. dadayana* indica el punto donde se midió la intensidad del color de las imágenes.

Determinaciones bioquímicas

La actividad de GST se determinó según Habig et al. (1974) en 0.1 mol L⁻¹ de buffer de fosfato (pH = 6.5), con 0.1 mg mL⁻¹ de 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu en acetonitrilo (1% v/v) y 0.75 mg mL⁻¹ de L-glutati3n reducido como sustratos para registrar la absorbancia de GST a 340 nm, usando un espectrof3tmetro Shimadzu 2450 a 23 ± 0.5 ° C. La actividad de GST se expres3 en μmol de producto formado min⁻¹ ind⁻¹.

Análisis estadístico

Para comparar la actividad de GST de *D. dadayana* en el último día del experimento se realizó un *test-t* para comparar diferencias significativas del grupo RUV vs. RFA. Este análisis estadístico se realizó en Sigma Plot 12.5 (Systat Software Inc, San Jose, CA, EE.UU.). Para todos los datos se comprobó la normalidad y homocedasticidad.

Las diferencias en la intensidad de la melanina de *D. dadayana* expuestas a RUV y RFA durante el tiempo inicial y los días, 3 y 6 fueron analizadas con un ANCOVA



CAPITULO IV: RUV y pigmentos

(factor: Luz y covariable: Tiempo) seguido de un método de comparación múltiple *a posteriori* de Tukey ($\alpha = 0.05$). Este análisis estadístico se realizó en RStudio (RStudio Team (2015). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA. URL: <http://www.rstudio.com/>). Para todos los datos se comprobó la normalidad y homocedasticidad.



Resultados

El análisis de las fotografías obtenidas nos permitió realizar exitosamente el análisis de la melanización en *D. dadayana*. En el tiempo inicial no se observan diferencias significativas lo que nos permite inferir que los cambios posteriores se deben al tratamiento lumínico diferencial (RUV vs RFA). En los tiempos sucesivos (T3 y T6) se observó un aumento significativo de la melanización en la zona nugal cuando *D. dadayana* es expuesta a RUV, reflejado en la disminución de brillo en las fotografías observadas (ANCOVA $F_{2,24} = 16,69$ $P < 0,001$; Figura IV.3), siendo mayor el grado de melanización cuanto mayor es la exposición a RUV (*a posteriori* Tukey Luz*día 1 $P = 0,841$; Luz*día 3 $P = 0,001$; Luz*día 6 $P < 0,001$; Figura IV.4)

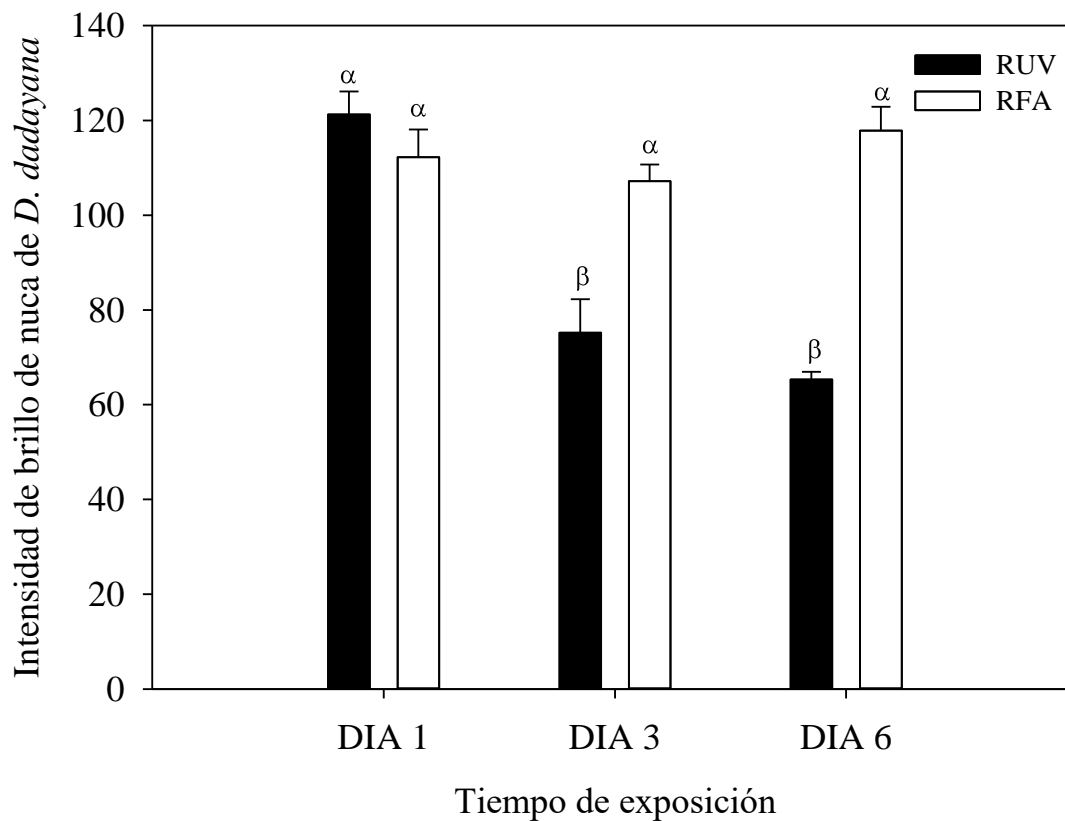


Fig IV.3. Resultados de intensidad de color en el caparazón de *D. dadayana* expuesta a RUV. Intensidad de brillo bajo dos condiciones de luz (barra negra = RFA y barra gris = RUV) en un período de 6 días. Las barras de error representan un error estándar y las letras griegas las diferencias significativas.



CAPITULO IV: RUV y pigmentos

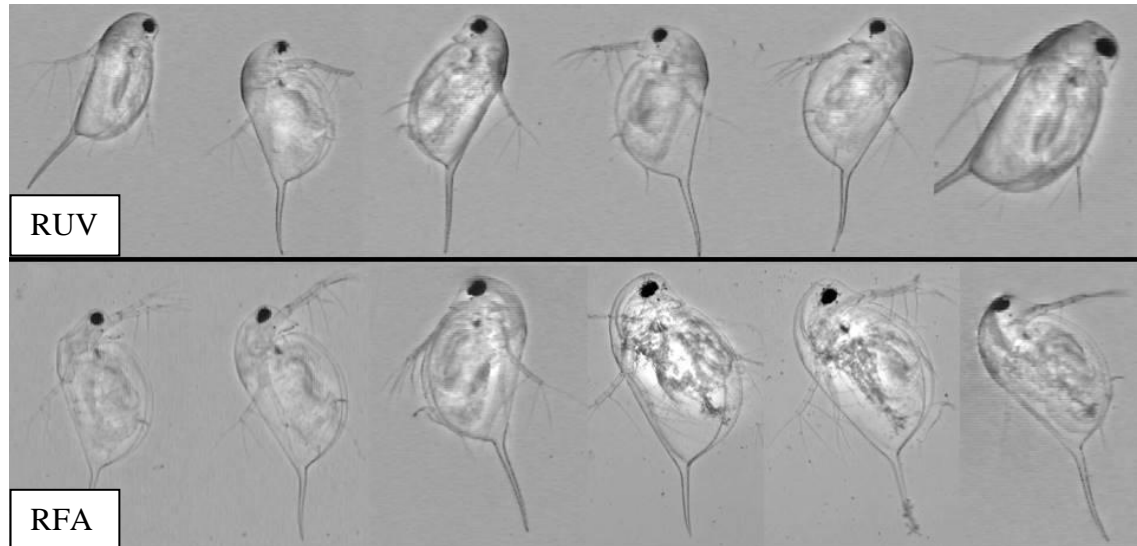


Fig IV.4. Esquema de fotos de *D. dadayana*, utilizadas para realizar gráfico y análisis de la figura IV.3 correspondientes al día 6 del experimento.

Al día 6 de exposición diferencial RUV vs. RFA se observa que la actividad antioxidante de GST no presenta diferencias entre ambos tratamientos (Figura IV.5). Si bien en el tratamiento RUV se observa una tendencia a aumentar la actividad antioxidante (Figura IV.5) la actividad de GST en *D. dadayana* expuesta RUV no muestra diferencias significativas comparada con el tratamiento con luz RFA ($test-t = -1,439$, $GL = 14$, $P = 0,086$).

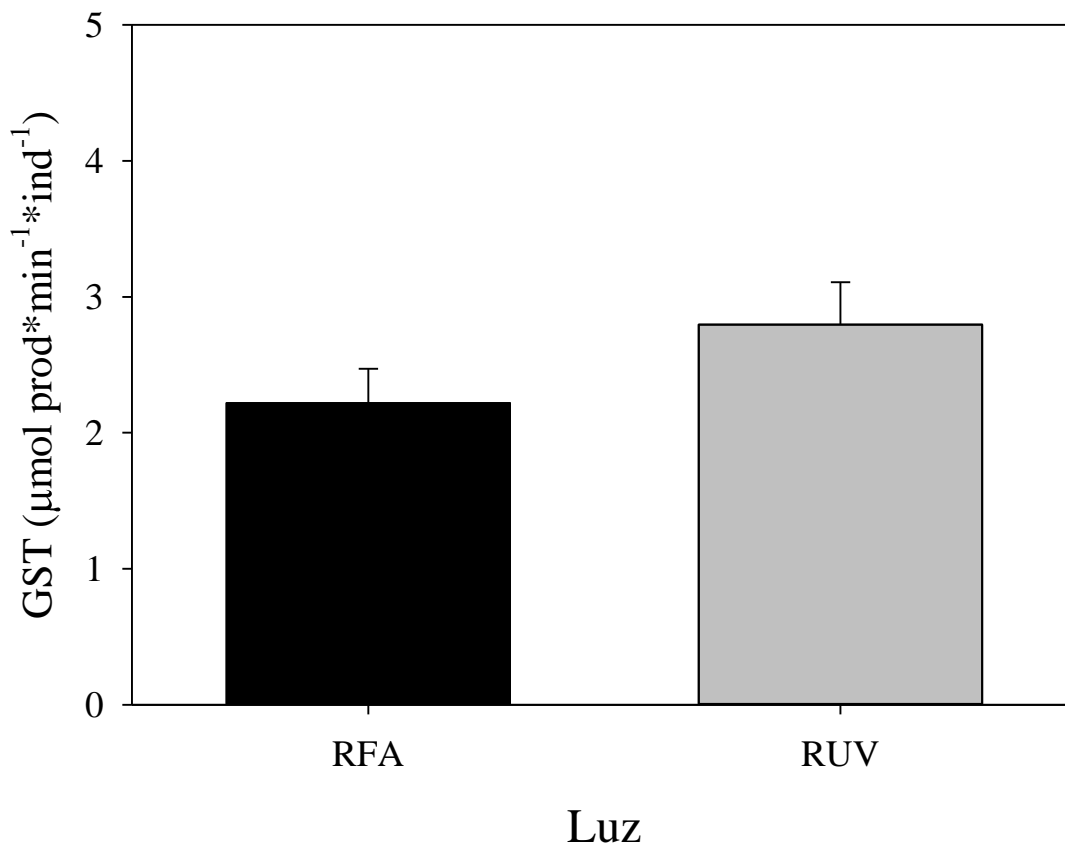


Fig IV.5. **Resultados de exposición de *D. dadayana* a RUV.** Actividad de GST bajo dos condiciones de luz (barra negra = RFA y barra gris = RUV) en un período de 6 días. Las barras de error representan un error estándar en todos los gráficos.



CAPITULO IV: RUV y pigmentos

Discusión

La metodología utilizada de análisis fotográfico nos permitió exitosamente analizar la variación melánica en esta *Daphnia* de Patagonia. Se decidió medir la intensidad del brillo del caparazón, debido a que la concentración de melanina en *Daphnia* es mayormente en la zona nucal de los organismos (Herbert y Emery 1990) y, por lo tanto, medir siempre en el mismo punto cuando las fotografías son normalizadas nos puede dar información muy acertada acerca de las diferencias de concentración de melanina de los individuos. En este trabajo se optó por la medición basada en las fotografías a pesar de no ser una medida absoluta, debido a que varios autores han mostrado que la determinación química de la melanina no logra la extracción total de la misma del caparazón (Herbert y Emery 1990, Flössner 1993). Por último, la medición química de la melanina requeriría utilizar más de un individuo por medición (Hobæk y Wolf 1991), lo que no permitiría una determinación individual.

D. dadayana no mostró incrementos significativos en la actividad antioxidante cuando es expuesta a RUV. El efecto de la melanización del caparazón parece ser una barrera muy importante para evitar el daño generado por la exposición a RUV, ya que otras especies de *Daphnia* no melánicas de la Patagonia norte muestran un aumento significativo de la actividad antioxidante cuando son expuestos a RUV (Souza et al. 2007, Balseiro et al. 2008). En otras especies de lagos andino-patagónicos profundos y transparentes se ha observado que la estrategia comportamental de evasión de los niveles superiores de la columna de agua durante el día resulta efectiva para evitar las potencialmente dañinas RUV (Balseiro et al. 2007, Laspoumaderes et al. 2017). Por el contrario, *D. dadayana* presenta un carácter fenotípico plástico de producción de melanina, ya que en los ambientes someros que frecuenta no puede migrar verticalmente como otras especies que utilizan la técnica de evasión en vez de acumular pigmentos. Esta característica le da ventajas en su ambiente, donde las formas melánicas de *Daphnia* sobreviven mejor en los estratos superiores del agua que especies de *Daphnia* sin pigmentos (Herbert y Emery 1990, Zellmer 1995, Hessen y Lydersen 1996, Hessen et al. 1999), y probablemente aprovechan esa situación para colectar alimento de las capas superiores del cuerpo de agua sin ser severamente afectadas por la RUV (Zellmer 1995). *D. dadayana* habita lagos someros sin peces y, por lo tanto, la producción de melanina es una estrategia posible de utilizar dado que la presencia de melanina no aumenta el riesgo de depredación visual. Por el contrario, en lagos profundos andinos donde generalmente



CAPITULO IV: RUV y pigmentos

hay depredadores visuales (peces), las especies de *Daphnia* no poseen pigmentos y la mejor estrategia para evitar el daño de la RUV y a los depredadores es migrar verticalmente durante el día a zonas profundas y con poca luminosidad. Esta situación disminuye el riesgo de depredación visual (Balseiro et al. 2007).

En ecosistemas acuáticos, los organismos tienen que hacer frente a múltiples factores detrimentales y, por lo tanto, los mecanismos de evasión a la RUV son muy importantes (Hansson et al. 2007). Sin embargo, también hay factores que podrían ser cruciales, como el tiempo de detección de un riesgo en relación con el tiempo que tarda en formarse la defensa, y el costo que implica generarla para luego revertirla cuando ya no hay riesgo (Tollrian y Heibl 2004, Gabriel et al. 2005). Estos costos fueron medidos en copépodos, donde se observó que la acumulación de pigmentos era utilizada alternativamente a la respuesta antioxidante en presencia o no de peces (Hylander et al. 2012). En el caso estudiado la melanización del caparazón aparecería como una protección muy efectiva para el éxito de *D. dadayana* en ambientes someros ya que no se observó un incremento significativo del estrés oxidativo frente a RUV. De manera interesante en copépodos de Laguna Los Juncos se ha demostrado que la exposición a RFA+RUV estimula la acumulación de compuestos fotoprotectores (MAAs) (Pérez et al. 2012). Por lo tanto, en estos ambientes someros la acumulación de pigmentos en el zooplancton representa una primera defensa efectiva frente a la RUV.

En un contexto de cambio climático, donde los organismos tengan que enfrentarse a un aumento de los factores de estrés, sus estrategias y mecanismos de defensa serán cruciales para la adaptación y supervivencia de cada especie. Acumular pigmentos en el caparazón aparece como una estrategia exitosa para *D. dadayana* en los ambientes someros que habita. Sin embargo, *D. dadayana* podría ser expuesta a otros factores como depredadores visuales y cambios estacionales en la calidad de alimento, en los que la melanización resultaría perjudicial (aumento del riesgo de depredación y costos energéticos en sintetizar pigmentos). Estos factores y la interacción con otros organismos, definirán el éxito de esta especie en la Patagonia frente a un ecosistema constantemente cambiante y afectado por la antropización.



CAPITULO V

Balance entre producción de defensas plásticas y defensas antioxidantes enzimáticas en *Daphnia dadayana*.

Introducción

En la naturaleza, la biota acuática está expuesta a muchos factores potencialmente perjudiciales, como por ejemplo depredadores, parásitos, baja calidad de alimento, y exposición a RUV (Häder et al. 2007). Estos factores actúan de forma diferente en cada especie, las que deben priorizar los riesgos y evadirlos aún con algún costo (energético fundamentalmente). Cuando esto sucede se generan relaciones de costo-beneficio que ocurren cuando un carácter beneficioso para un organismo está relacionado con otro que resulta un detrimento. Por ejemplo, producir defensas morfológicas para evitar la depredación es muy beneficioso, pero a su vez implica un alto costo energético y, por lo tanto, el zooplancton tiene que compensarlo obteniendo más alimento o bajando su rendimiento metabólico (Adler y Harvell 1990, Tollrian 1995, Tollrian y Harvell 1999).

Para evitar o disminuir la depredación por invertebrados acuáticos, el zooplancton ha desarrollado cambios morfológicos, como por ejemplo el aumento temprano de tamaño o estructuras espinosas (Dodson 1974, Tollrian 1995). Estas estructuras crean un mayor tamaño aparente en la presa que disminuye su mortalidad por incremento del tiempo de manipuleo por parte del depredador invertebrado (Balseiro y Vega 1994). El desarrollo de estas estructuras es una respuesta plástica y se expresa sólo en presencia de depredadores ya que existe un costo energético para producirlas que causa una disminución en las tasas reproductivas (Riessen et al. 1984). Estas defensas incluyen alteraciones morfológicas, como pueden ser espinas o protuberancias del caparazón, un exosqueleto endurecido, incremento o decrecimiento en el tamaño del cuerpo, así como también reducción en los niveles de actividad y modificaciones en los patrones de



CAPITULO V: Defensas plásticas

distribución y migración dentro del cuerpo de agua (Havel 1987, Tollrian y Harvell 1999, Relyea 2001, Laforsch y Tollrian 2004).

Dentro del género *Daphnia*, varias especies generan estructuras morfológicas de defensa como dientes nucales y crestas cuando se encuentran en presencia de insectos depredadores como *Chaoborus* o *Notonecta* (O'Brien et al. 1979, Hebert y Grewe 1985, Dodson y Havel 1988). La presión por depredación de *Chaoborus* sobre *Daphnia* es usualmente mayor en neonatos y juveniles que en adultos, quienes al tener un mayor tamaño son menos vulnerables a los ataques de *Chaoborus* (Repka y Walls 1998, Riessen 1999). En juveniles de *Daphnia* se ha observado también un crecimiento alométrico de la espina del caparazón (Balseiro y Vega 1994) y estas estructuras anti-depredación producen una reducción del fitness que se traduce en un costo demográfico de la población (Riessen y Sprules 1990). La inducción de defensas anti-depredación en *Daphnia* es generada a través de kairomonas, que son sustancias químicas liberadas al medio por los organismos depredadores que dan señal de alerta a las presas sobre su presencia en el ambiente (Tollrian y Dodson 1999). En *Daphnia*, la recepción de kairomonas inicia una serie de reacciones biológicas, señales neurales que se convierten a señales endócrinas que subsecuentemente inducen cambios en la expresión de factores morfo-genéticos resultando en la formación de una estructura de defensa en la progenie (Miyakawa et al. 2010).

La morfología de las presas y determinados patrones de comportamiento, así como el modo y la velocidad de natación son factores importantes que disminuyen su vulnerabilidad frente a copépodos depredadores. Vega (1995) estudió las estrategias de defensa de distintas especies del zooplankton andino-patagónico que son potenciales presas del copépodo calanoideo depredador *Parabroteas sarsi*. Dentro de las especies expuestas a *P. sarsi* (*Bosmina longirostris*, *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia ambigua* y *D. middendorffiana*) las más pequeñas (*B. longirostris* y *C. dubia*) y los estadios juveniles resultaron ser las más vulnerables, debido a la dificultad de manipular presas grandes por parte de los copépodos. Para atrapar las presas *P. sarsi* realiza movimientos espasmódicos típicos de copépodos calanoideos lo que hace que su efectividad de ataques sea muy alta (Vega 1995). El ataque se produce con los maxilípedios extendidos (Diéguez y Balseiro 1998), donde la presa es capturada al estrecharla contra el resto de las piezas bucales del depredador. Estos ataques se corresponden en más de un 70% de las veces con ataques dorsales en la zona de unión del caparazón, que corresponde a la zona engrosada por las



CAPITULO V: Defensas plásticas

estructuras anti-depredación morfológicas. Vega (1995) también observó que modificar la trayectoria de natación es un factor importante para evadir los ataques de *P.sarsi*, así también como la estrategia de “hombre muerto” por parte de algunas especies de cladóceros. Por último, el aumento de tamaño en juveniles de *D. middendorffiana* donde se alarga la espina caudal en presencia de *P. sarsi*, indicó que un aumento del tamaño aparente dificulta la manipulación de las presas por parte de *P. sarsi* (Balseiro y Vega 1994).

Daphnia dadayana es un cladóceros que habita ambientes acuáticos someros, donde la incidencia de la RUV es alta y a su vez hay una alta presión de depredación por invertebrados acuáticos como el copépodo calanoideo *P. sarsi*. Este copépodo alcanza en ambientes someros tamaños considerables (7 mm) (Vega 1999) y accede a una gran variedad de presas incluyendo al género *Daphnia* (Balseiro y Vega 1994, Vega 1995). Dentro de las defensas que exhibe *Daphnia* frente a *Parabroteas* se encuentra el mencionado crecimiento alométrico de la espina del caparazón (Balseiro y Vega 1994). Por su parte, *D. dadayana* desarrolla estructuras antidepredatorias generando yelmos (Paggi 1999) (Figura V.1). En este caso, el yelmo también contribuiría a la disminución efectiva de las tasas de depredación por el incremento aparente del tamaño situación observada en otras especies de *Daphnia* (Pijanowska 1992). La formación de yelmo ocurre si la recepción de mensajeros químicos (kairomonas) por parte del depredador hacia la presa ocurre durante los primeros días de desarrollo de los huevos partenogenéticos cuando los neonatos aún se encuentran bajo el caparazón materno (Miyakawa et al. 2010) y generan un costo energético (Riessen y Sprules 1990). En función de las relaciones costo-beneficio planteamos si la generación de una defensa antidepredatoria (yelmo) interactúa con la RUV en una relación de costo-beneficio y puede ser determinada a través de respuestas enzimáticas.



CAPITULO V: Defensas plásticas

Objetivo:

Analizar el efecto de la inducción de estructuras anti-depredadoras (yelmo) sobre la capacidad de respuesta frente al estrés oxidativo (GST) en *D. dadayana*

Hipótesis:

La inversión en defensas anti-depredación en *D. dadayana* afectará la actividad de complejos enzimáticos antioxidantes (GST).

Predicción:

La producción de defensas anti-depredación afectará negativamente la actividad de GST cuando *D. dadayana* sea expuesta a RUV.

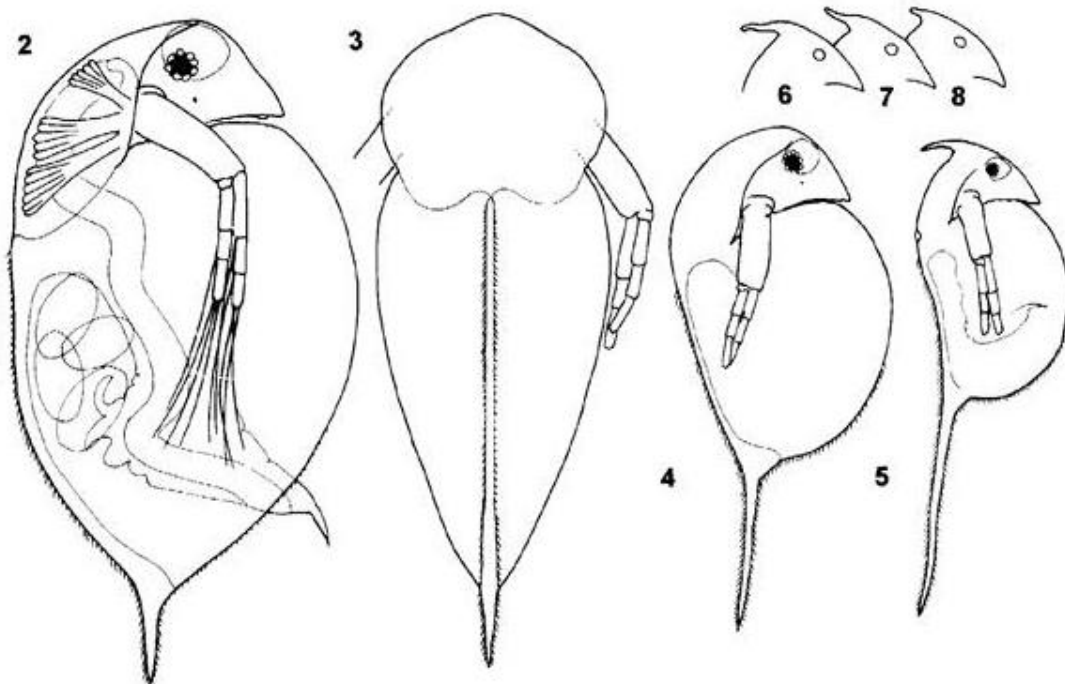


Fig. V.1. **Ilustración de *D. dadayana***. Tomado de Paggi (1999). (2 y 3) Hembra partenogenética madura, vista lateral y dorsal, (4) hembra partenogenética inmadura, (5 a 8) Segundo estadio de juvenil hembra con estructuras anti-depredación (yelmo).



CAPITULO V: Defensas plásticas

Materiales y métodos

Para realizar este estudio fue necesaria la obtención de organismos con y sin yelmo en condiciones experimentales similares. Los individuos de *D. dadayana* fueron colectados de laguna Los Juncos (Bariloche, Patagonia, Argentina) y transportados al laboratorio para ser cultivados bajo condiciones controladas de luz, temperatura y alimento (Fotoperíodo de 14:10 h, *C. reindhartii*). *D. dadayana* fue mantenida en medio COMBO con el correspondiente alimento durante 10 generaciones antes de comenzar el experimento. Estos individuos de *D. dadayana* de cultivo no tenían yelmo.

El copépodo depredador *Parabroteas sarsi* fue utilizado para inducir el yelmo en *D. dadayana*. Para este propósito, individuos de *P. sarsi* fueron colectados el día antes de comenzar el experimento y fueron mantenidos bajo las mismas condiciones que *D. dadayana*.

Experimento

Al comenzar el experimento se mantuvieron madres sin yelmo de *D. dadayana* bajo dos condiciones: a-sin señal de depredador (control) y b-con señal del depredador para inducir la formación de yelmo en los neonatos, exponiéndolos a señal de kairomonas del depredador *P. sarsi* (tratamiento). Las madres fueron dispuestas de a 15 individuos en frascos de 2 L con 3 réplicas para tratamiento y control. En el tratamiento se colocaron 10 individuos de *P. sarsi* aislados con una malla de 200 μm para evitar ataques directos a *D. dadayana* pero permitiendo el suficiente intercambio de agua para que pudiera llegar la señal de las kairomonas a los receptores de *D. dadayana*. *P. sarsi* fue alimentada con conespecíficos de *D. dadayana* para aumentar la señal de alarma, siguiendo trabajos que han utilizado la misma técnica con otros depredadores invertebrados (Laforsch et al. 2006).

Una vez que nacieron los neonatos, se seleccionaron bajo microscopio estereoscópico para asegurar uniformidad de tamaño y forma (tanto para individuos inducidos por kairomonas como para el control) y fueron mantenidos con 1,5 mg de C L^{-1} de alimento (*Chlamydomonas reindhartii*) durante 3 días. A los 3 días la mitad de las réplicas de ambos tratamientos (con inducción de yelmo y sin inducción) fueron transferidos a frascos de cuarzo para ser expuestos a 2 h de RUV, la mitad restante fue cubierta con acetato de celulosa que evita la entrada de longitudes de onda menores a 400 nm (RUV) para generar un control. Se realizaron 4 réplicas de 3 individuos por



CAPITULO V: Defensas plásticas

tratamiento. Una vez que fueron expuestos a las 2 h de RUV se pipetearon los individuos a tubos Eppendorff de 1.5 mL para ser almacenados a -80 °C en un ultra-freezer para las posteriores determinaciones enzimáticas (ver figura V.2).

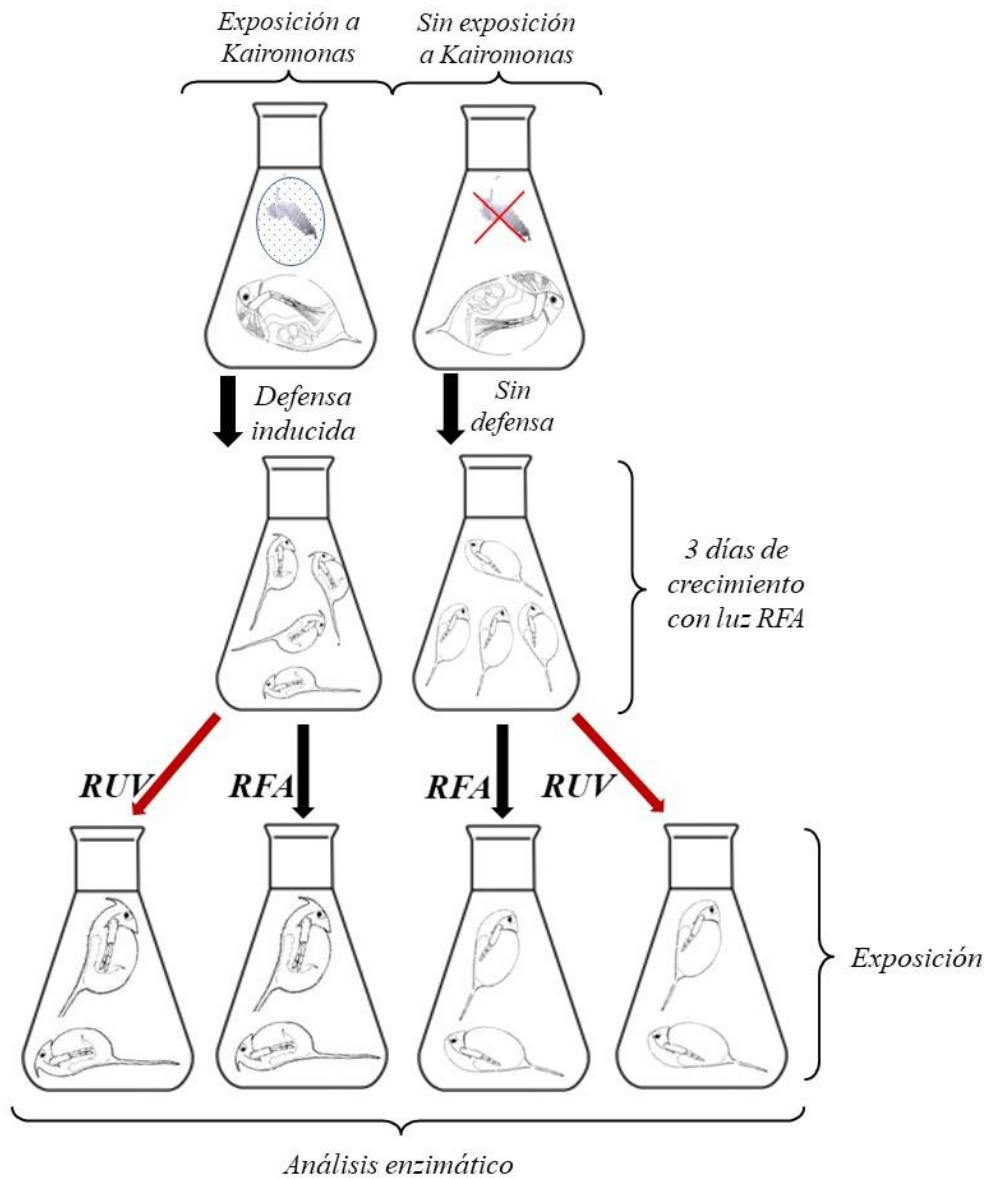


Fig. V.2: Esquema del experimento de exposición a RUV, luego de la inducción o no de las estructuras antipredatorias (yelmo y espinas).



CAPITULO V: Defensas plásticas

Determinaciones morfológicas

Se tomaron fotos laterales de neonatos de *D. dadayana* con inducción de yelmo y sin, para realizar comparaciones morfológicas. Este procedimiento se realizó con neonatos inducidos (señal de kairomonas) y sin inducción, bajo un microscopio estereoscópico y las imágenes fueron analizadas con el programa Image Pro Plus (Media Cybernetics). Se tomaron medidas longitudinales de los individuos teniendo en cuenta el largo total, largo del cuerpo, largo de defensa (que incluye a la espina caudal y al yelmo) (ver Figura V.3).

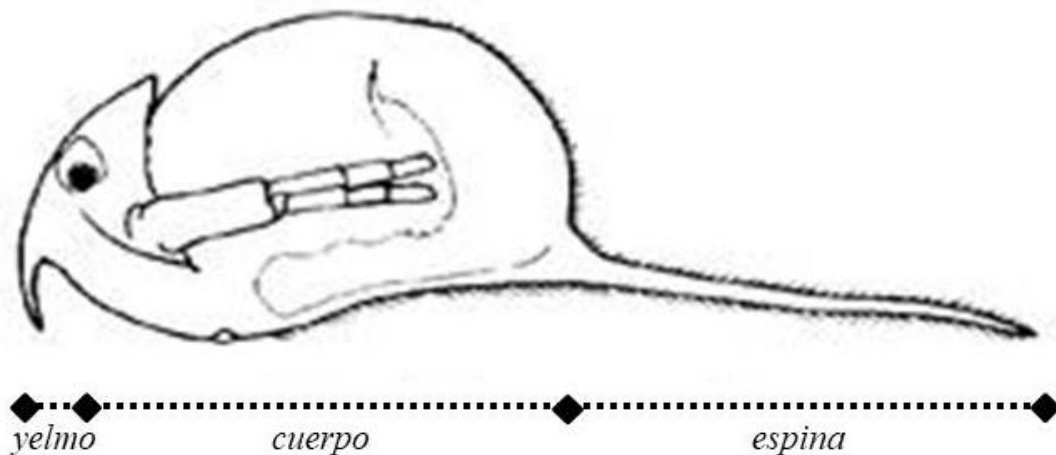


Fig. V.3: **Esquema de *D. dadayana*** para determinar el criterio tenido en cuenta para las mediciones morfológicas. Tomado y modificado de (Paggi 1999).

Características de la luz

La luz utilizada para llevar a cabo los experimentos fue emitida por dos lámparas fluorescentes UVA 340 (UVA 340 lámpara de Q-Panel Lab Products, con máxima emisión a 380 nm), dos lámparas fluorescentes de luz diurna (Philips TLT 40 W) y dos lámparas fluorescentes luz negra (Philips TL-D 30 W). El espectro UV de la luz de las lámparas UVA340 se asemeja al espectro solar entre 280 nm y 350 nm (Shick et al. 1999). La luz negra se incluyó para abarcar el rango entre el máximo de emisión de UVA340 (λ_{max} : 350 nm) y las lámparas fluorescentes de luz diurna (λ_{min} : 400 nm). Durante la incubación, los animales recibieron $35 \text{ mW cm}^{-2} \text{ nm}^{-1}$ de 340 nm de longitud de onda, un nivel de irradiación que es equivalente a la luz del sol que llega a la superficie de los lagos durante el verano (Modenutti et al. 2005). La dosis diaria de 340 nm fue de 2520 J m^{-2} .



Determinaciones bioquímicas

La actividad de GST se determinó igual que en los capítulos anteriores (Ver “*Determinaciones bioquímicas*”).

Análisis estadístico

Para comparar las diferencias de longitudes entre individuos con inducción de defensa y el control se realizó un *test-t* para cada una de las longitudes tenidas en cuenta (largo total, largo del cuerpo y largo de defensa). Para comparar la actividad de GST de *D. dadayana* expuesta a RUV, con o sin defensa morfológica (yelmo), se realizó un ANOVA de dos vías (Factor A: Defensa y factor B: Luz).

Todos los análisis estadísticos se realizaron en Sigma Plot 12.5 (Systat Software Inc, San Jose, CA, EE.UU.). Para todos los datos se comprobó la normalidad y homocedasticidad.



CAPITULO V: Defensas plásticas

Resultados

A partir de la exposición de madres partenogénicas de *D. dadayana* a la presencia del copépodo depredador *P. sarsi* se observó la formación de yelmo en neonatos (Figura V.4) que representa un aumento del 5% de la longitud total del cuerpo. También se observó un alargamiento significativo de la espina caudal en comparación con con-específicos que nacieron sin presencia de depredador (*test-t*; $t = 15.753$ $GL = 27$ $P < 0.001$, Figura V.5) presentando una media de 0.58 ± 0.02 mm para individuos expuestos a *P. sarsi* versus 0.43 ± 0.03 mm en el control.

Daphnia dadayana expuesta a kairomonas también es significativamente más grande que el control (*test-t*; $t = 14.867$ $GL = 27$ $P < 0.001$, Figura V.5), con una media de longitud total de 1.25 ± 0.04 mm versus 0.99 ± 0.05 mm del control, presentando un ~25% de aumento del largo total entre el alargamiento de la espina y la formación del yelmo en organismos que son expuestos a señales químicas del depredador (kairomonas).

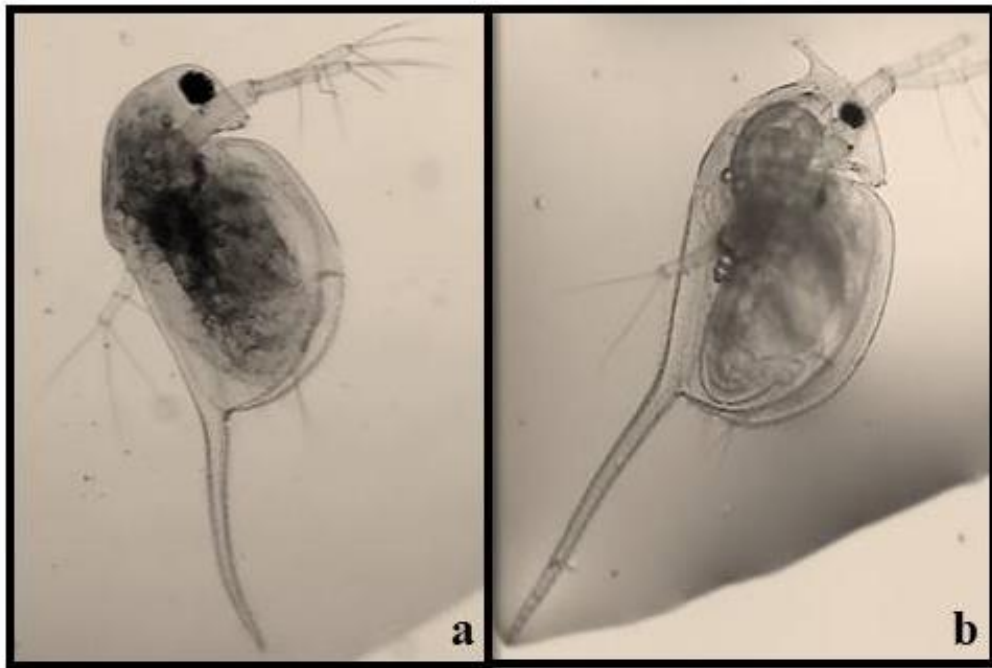


Fig. V.4: **Fotos de neonatos de *Daphnia dadayana*** (a) sin inducción de defensa y (b) con inducción de defensa.

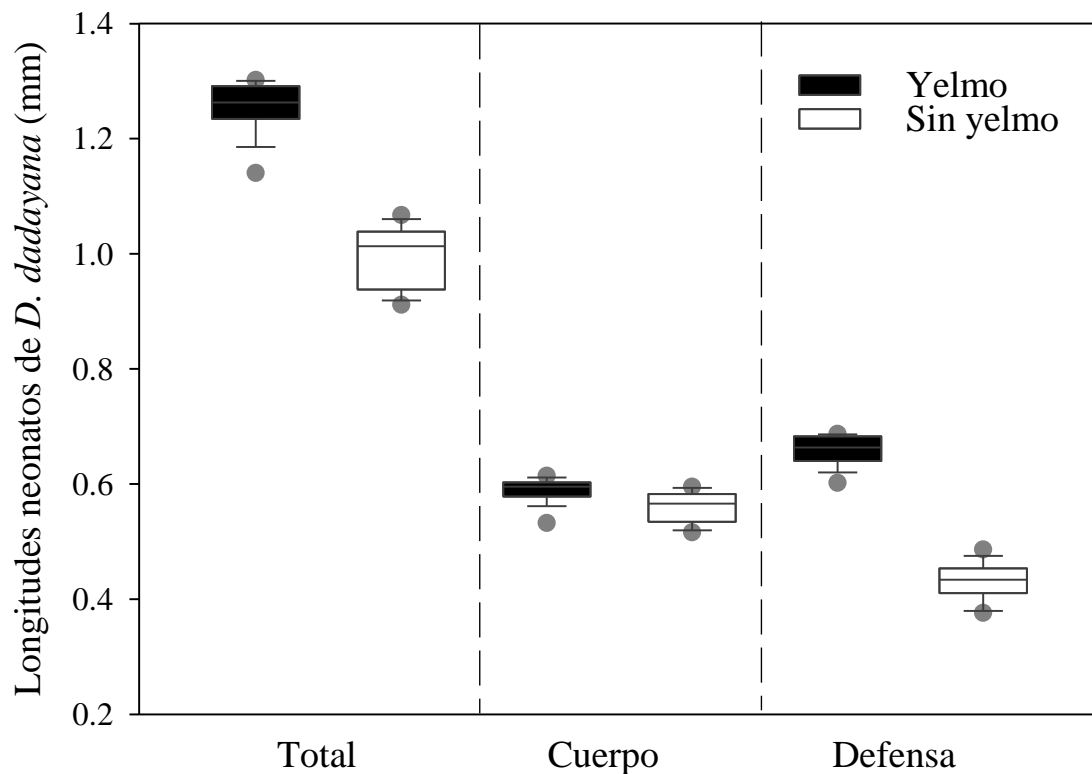


Fig. V.5: **Longitudes del cuerpo de *D. dadayana* en mm.** Diferencias de tamaño para organismos con inducción de yelmo (negros) y sin (blancos). Largo total, largo del cuerpo y largo defensa, incluyendo espina y yelmo en el caso que corresponda.

Con respecto al experimento de exposición a RUV de *D. dadayana* con o sin yelmo no se observaron efectos significativos en la actividad de la enzima GST. En particular, no se observó un efecto en la interacción defensa y luz en la actividad de GST (ANOVA de dos vías $F_{1,12} = 0.00656$; $P = 0.937$; Figura V.6). Tampoco hay diferencias entre tratamientos de luz ni entre tipos de defensa. Por lo tanto, no sólo no hay un efecto en la actividad de GST por la producción de defensas, sino que tampoco hay una



CAPITULO V: Defensas plásticas

diferencia significativa por exposición a RUV (2 horas) de *D. dadayana*.

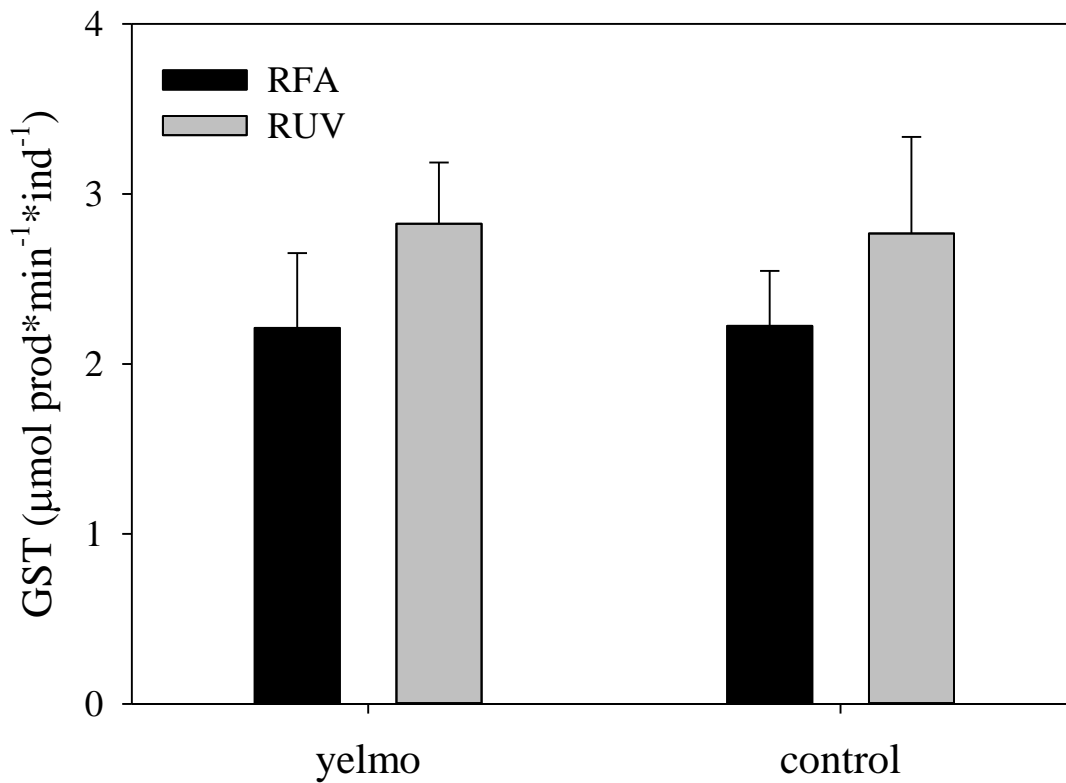


Fig. V.6: **Actividad de GST** frente a dos condiciones de luz (Barras negras = RFA y barras grises = RUV) y dos estados de defensa al 3er día de crecimiento. Las barras de error representan un error estándar en todos los gráficos.



CAPITULO V: Defensas plásticas

Discusión

Daphnia dadayana en presencia del depredador *P. sarsi* desarrolla una estructura morfológica de defensa (yelmo) y alarga su espina caudal en comparación con con-específicos que no son expuestos a señal de peligro por parte del depredador. Esto demuestra que *P. sarsi* es inductor de estas estructuras plásticas temporales que genera un aumento del 25% del largo total *Daphnia*. Esta respuesta es similar a la obtenida por Balseiro y Vega (1994) con otra especie de *Daphnia*, por lo que puede esperarse una análoga disminución en las tasas de depredación.

Aunque es evidente el cambio morfológico en *D. dadayana* cuando es expuesta a señales químicas del depredador, la actividad antioxidante de GST no fue afectada por la inversión realizada en generar defensas antidepredador. Asimismo, tampoco hubo un impacto significativo en la actividad enzimática cuando *D. dadayana* es expuesta a RUV, independientemente de haber generado defensa o no. Estos resultados pueden ser consecuencia de la provisión de una alta calidad de alimento y en concentración suficiente para que no haya un efecto perjudicial a la hora de reubicar nutrientes cuando son faltantes. Esta situación no necesariamente ocurre en la naturaleza donde los períodos de escasez de alimento pueden ser extendidos (Urabe et al. 2002).

Otra posibilidad que explique la ausencia de respuesta es que la GST no resulte una buena enzima indicadora para evidenciar los costos que implican la formación de una estructura anti-depredación. En tal sentido, las respuestas relacionadas con la reproducción resultaron buenos predictores del costo de generar defensas antidepredatorias (Riessen y Sprules 1990). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el daño en estrés oxidativo solamente medido como disminución en la actividad de GST no muestran diferencias significativas, a futuro podrían utilizarse otros métodos como estimación de actividad antioxidante total o medir la concentración de EROs generada, para obtener resultados más concretos sobre el estrés oxidativo generado.

Resumiendo, las distintas evidencias obtenidas en este trabajo indican que *D. dadayana* es un cladóceros exitoso en ambientes someros, donde estaría expuesto a depredación por parte de invertebrados (*P. sarsi*) y al efecto potencialmente deletéreo de la RUV. Bajo estas circunstancias, *D. dadayana* genera estructuras antidepredatorias (yelmo y crecimiento de espina posterior). Los resultados de los diferentes experimentos realizados indicaron que la generación de defensas plásticas no afectó la actividad de GST como respuesta antioxidante. A futuro podrían realizarse estudios que analicen la



CAPITULO V: Defensas plásticas

actividad de otras enzimas que actúan contra las EROs como Catalasa, SOD, GSH o concentración de EROs total, para poder evidenciar realmente si la generación de estructuras morfológicas antidepredatorias no modifica la respuesta frente a la RUV.



CAPITULO VI

Conclusiones generales

La incidencia de la RUV en la superficie de la Tierra tiene distintos efectos en cada organismo siendo en la mayoría de los casos negativos (Williamson 1995, Carrillo et al. 2008, Ballare et al. 2011). Debido al fuerte impacto antrópico en el cambio climático global, es difícil predecir como variará la incidencia de RUV en la superficie de la Tierra y las posibles consecuencias en todos los seres vivos, productores primarios o consumidores. La RUV es uno de los factores ambientales que está en constante cambio y su impacto puede incrementarse al interactuar con otras variables. Por lo tanto, resulta interesante comprender algunos de los efectos de la RUV en organismos del plancton que habitan ambientes contrastantes. En esta tesis se pretende comprender distintos efectos de la RUV en interacción con otras variables ambientales, en organismos planctónicos del género *Daphnia* de lagos andino-patagónicos. Se han estudiado dos especies: (1) *D. commutata* que habita los grandes lagos profundos, transparentes y ultraoligotróficos y (2) *D. dadayana* presente en cuerpos de agua pequeños, someros, sin peces y con alto contenido de materia orgánica disuelta. La respuesta antioxidante analizada fue la actividad de la Glutación S-Transferasa que resultó ser un biomarcador útil y sencillo de determinar para estimar el estrés oxidativo en estos organismos. Por otra parte, también se analizaron otras enzimas que resultaron afectadas por la RUV como la fosfatasa alcalina que estima la capacidad de adquirir fósforo por parte de los organismos y la enzima quitobiasa que es muy importante para procesos cruciales para el desarrollo y la reproducción como es la muda en cladóceros.

Tal como fuera señalado en trabajos previos, la RUV genera estrés oxidativo en el zooplancton y por lo tanto aumenta la actividad de antioxidantes (Borgeraas y Hessen 2002). Sin embargo, estas radiaciones también pueden ser potencialmente dañinas para otras enzimas importantes para el metabolismo y desarrollo. En tal sentido, en este trabajo se demostró que la RUV tiene un efecto negativo en la actividad de la enzima quitobiasa responsable, en parte, del proceso de muda en cladóceros. La muda en artrópodos es un



CAPITULO VI: Conclusiones generales

factor muy importante para el desarrollo individual y a nivel reproductivo en muchos casos, además de ser un momento muy vulnerable frente a posibles depredadores y daño químico (Lee y Buikema Jr 1979, Ohman 1988). A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se puede señalar que aumentos en la incidencia de RUV generarán una desincronización en la muda de cladóceros de la misma cohorte. Si bien en este trabajo se determinó que la RUV afecta el correcto funcionamiento de la enzima quitobiasa también podrían estar afectándose otras enzimas o señales químicas importantes durante un proceso vital y sincronizado con la vitelogénesis (Bodar et al. 1990). El efecto negativo de la RUV en la muda de *D. commutata* que habita lagos transparentes deberá necesariamente tenerse en cuenta en futuros estudios ya que este efecto podría implicar importantes desajustes en los niveles intermedios de la trama trófica.

Por otra parte, los ambientes donde *D. commutata* está presente son ultraoligotróficos y pobres en fósforo. En tal sentido, el estudio planteado sobre la actividad de fosfatasa alcalina tiende a comprender el desarrollo de estos cladóceros en ambientes fuertemente limitados en nutrientes. La actividad de la fosfatasa alcalina estima de manera indirecta la necesidad de fósforo de los organismos (McCarthy et al. 2010) y el hecho que resulte afectada por el estrés oxidativo de la exposición a RUV cobra particular importancia en estos ambientes. Asimismo, en este trabajo hemos demostrado que la respuesta de la AFA a la RUV también se ve afectada por la temperatura y la calidad del alimento. En este contexto, se determinó que a temperaturas más altas la RUV tiene un mayor efecto perjudicial sobre la AFA, probablemente debido a mayores tasas metabólicas y a más reactividad a RUV (Macfadyen et al. 2004). *D. commutata* creciendo con alta relación C:P de su alimento y alta temperatura se ve más afectada por la acción de la RUV. Por lo tanto, la baja calidad de alimento en ambientes transparentes como ocurre en los lagos oligotróficos constituye un desafío para *D. commutata*. Asimismo, hemos demostrado también en esta especie que los procesos de recuperación luego de una exposición a UVR difieren en relación con la calidad de alimento, en particular aquel que se desarrolla en la oscuridad. En un contexto de cambio climático global, es sumamente importante tener en cuenta todas estas variables interactivas. Resulta claro que a partir de los resultados obtenidos la temperatura, y la calidad de alimento son variables que deberán ser tenidas en cuenta, ya que van a interactuar de manera diferencial en la respuesta de *D. commutata* a la RUV.



CAPITULO VI: Conclusiones generales

D. dadayana es un cladóceros melánico exitoso en ambientes someros patagónicos sin peces y poco transparentes. Los pigmentos fotoprotectores como la melanina pueden ser beneficiosos frente a la exposición a la RUV en ambientes someros y en ausencia de depredadores visuales. En tal sentido, nuestros experimentos demostraron un incremento en la melanina cuando los individuos están expuestos a RUV y que en estos individuos no se afecta la actividad antioxidante por la exposición a RUV. La melanina en *Daphnia dadayana* genera entonces una protección muy eficiente más aún cuando su concentración aumenta con la exposición crónica a RUV. Esta estrategia del zooplancton para hacer frente a la RUV es muy efectiva en ambientes sin depredadores visuales (peces) ya que el acumular pigmentos en el caparazón genera una mayor vulnerabilidad frente a estos depredadores. Sin embargo, en estos ambientes *D. dadayana* estaría expuesta a una fuerte depredación intrazooplancónica (copépodos fundamentalmente). En relación con esta presión de depredación se verificó la existencia de formas protegidas (con y sin yelmo) en la naturaleza y se generaron en el laboratorio a partir de exposición indirecta de *D. dadayana* al copépodo depredador *Parabroteas sarsi*. Nuestros resultados experimentales indican que la generación de yelmo no afecta la respuesta antioxidante frente a RUV. Este resultado puede relacionarse con lo expuesto anteriormente sobre la capacidad que *D. dadayana* posee de sintetizar melanina y cuya función fotoprotectora no se vería afectada por el costo de generar defensas.

Para concluir, se muestran aquí dos estrategias importantes en cladóceros del género *Daphnia*. *D. commutata* habita lagos profundos, transparentes y con depredadores visuales (peces). Esta especie no melánica se ve afectada directamente por la RUV en el proceso de muda lo que puede provocar una desincronización del proceso con probables efectos poblacionales. Asimismo, en estos ambientes pobres en nutrientes la especie posee otras respuestas enzimáticas (fosfatasa alcalina) que se ven afectadas por la RUV y que interactúan con la temperatura y la calidad de alimento. Estas respuestas se complementarían además con mecanismos comportamentales como es la migración vertical diaria (Balseiro et al. 2007). Por otra parte, la otra estrategia analizada corresponde a *D. dadayana* que habita ambientes someros, pequeños y sin peces. Esta especie presenta la estrategia de sintetizar y acumular el pigmento melanina en su caparazón cuando se la expone a RUV. La presencia de este pigmento provoca el bajo estrés oxidativo observado en nuestros experimentos, aún bajo el costo energético de generar estructuras antidepredatorias. Sin embargo, destacamos que esta estrategia es



CAPITULO VI: Conclusiones generales

posible sólo en ausencia de peces, ya que la presencia de pigmentos generaría altas tasas de mortalidad por depredación visual.

Bibliografía

- Acharya, K., J. D. Jack, and P. A. Bukaveckas. 2005. Dietary effects on life history traits of riverine *Bosmina*. *Freshwater Biology* **50**:965-975.
- Acharya, K., M. Kyle, and J. J. Elser. 2004a. Biological stoichiometry of *Daphnia* growth: An ecophysiological test of the growth rate hypothesis. *Limnology and Oceanography* **49**:656-665.
- Acharya, K., M. Kyle, and J. J. Elser. 2004b. Effects of stoichiometric dietary mixing on *Daphnia* growth and reproduction. *Oecologia* **138**:333-340.
- Adler, F. R., and C. D. Harvell. 1990. Inducible defenses, phenotypic variability and biotic environments. *Trends in Ecology and Evolution* **5**:407-410.
- Agrawal, A. A. 2001. Phenotypic Plasticity in the Interactions and Evolution of Species. *Science* **294**:321-326.
- Alonso, C., V. Rocco, J. P. Barriga, M. A. Battini, and H. Zagarese. 2004. Surface avoidance by freshwater zooplankton: Field evidence on the role of ultraviolet radiation. *Limnology and Oceanography* **49**:225-232.
- APHA. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, AWWA, Washington, D.C.
- Araújo, M. B., and M. Luoto. 2007. The importance of biotic interactions for modelling species distributions under climate change. *Global Ecology and Biogeography* **16**:743-753.
- Arzate-Cárdenas, M. A., and F. Martínez-Jerónimo. 2011. Age-altered susceptibility in hexavalent chromium-exposed *Daphnia schodleri* (Anomopoda: Daphniidae): integrated biomarker response implementation. *Aquatic Toxicology* **105**:528-534.
- Bae, E., P. Samanta, J. Yoo, and J. Jung. 2016. Effects of multigenerational exposure to elevated temperature on reproduction, oxidative stress, and Cu toxicity in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **132**:366-371.
- Ballare, C. L., M. M. Caldwell, S. D. Flint, S. A. Robinson, and J. F. Bornman. 2011. Effects of solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. Patterns, mechanisms, and interactions with climate change. *Photochemical and Photobiological Sciences* **10**:226-241.
- Balseiro, E. G., B. E. Modenutti, C. Queimaliños, and M. Reissig. 2007. *Daphnia* distribution in Andean Patagonian lakes: effect of low food quality and fish predation. *Aquatic Ecology* **41**:599-609.
- Balseiro, E. G., M. S. Souza, B. E. Modenutti, and M. Reissig. 2008. Living in transparent lakes: Low food P:C ratio decreases antioxidant response to ultraviolet radiation in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* **53**:2383-2390.
- Balseiro, E. G., and M. Vega. 1994. Vulnerability of *Daphnia middendorffiana* to *Parabroteas sarsi* predation: the role of the tail spine. *Journal of Plankton Research* **16**:783-793.
- Barata, C., I. Varo, J. C. Navarro, S. Arun, and C. Porte. 2005. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **140**:175-186.
- Barros, V. R., J. A. Boninsegna, I. A. Camilloni, M. Chidiak, G. O. Magrín, and M. Rusticucci. 2015. Climate change in Argentina: trends, projections, impacts and adaptation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change* **6**:151-169.
- Becker, D., B. F. Brinkmann, B. Zeis, and R. J. Paul. 2011. Acute changes in temperature or oxygen availability induce ROS fluctuations in *Daphnia magna* linked with fluctuations of reduced and oxidized glutathione, catalase activity and gene (haemoglobin) expression. *Biology of the cell* **103**:351-363.
- Bishop, W. H., L. Henke, J. P. Christopher, and D. B. Millar. 1980. Photodestruction of acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **77**:1980-1982.
- Boavida, M. J., and R. G. Wetzel. 1998. Inhibition of phosphatase activity by dissolved humic substances and hydrolytic reactivation by natural ultraviolet light. *Freshwater Biology* **40**:285-293.

- Bodar, C. W. M., P. A. Voogt, and D. I. Zandee. 1990. Ecdysteroids in *Daphnia magna*: their role in moulting and reproduction and their levels upon exposure to cadmium. *Aquatic Toxicology* **17**:339-350.
- Borgeraas, J., and D. O. Hessen. 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.
- Borgeraas, J., and D. O. Hessen. 2002. Variations of antioxidant enzymes in *Daphnia* species and populations as related to ambient UV exposure. *Hydrobiologia* **477**:15-30.
- Browman, H. I., C. A. Rodriguez, F. Bélaud, J. J. Cullen, R. R. Davis, J. H. M. Kouwenberg, P. S. Kuhn, B. McArthur, J. A. Runge, J. F. St-Pierre, and R. D. Vetter. 2000. Impact of ultraviolet radiation on marine crustacean zooplankton and ichthyoplankton: A synthesis of results from the estuary and Gulf of St. Lawrence, Canada. *Marine Ecology Progress Series* **199**:293-311.
- Buchholz, C., and F. Buchholz. 1989. Ultrastructure of the integument of a pelagic Crustacean: moult cycle related studies on the Antarctic krill, *Euphausia superba*. *Marine Biology* **101**:355-365.
- Carpenter, S. R., J. J. Cole, J. R. Hodgson, J. E. Kitchell, M. L. Pace, D. Bade, K. L. Cottingham, T. E. Essington, J. N. Houser, and D. E. Schindler. 2001. Trophic cascades, nutrients, and lake productivity: Whole-lake experiments. *Ecological Monographs* **71**:163-186.
- Carrillo, P., J. Delgado-Molina, J. Medina-Sánchez, F. Ballejos, and M. Villar-Argaiz. 2008. Phosphorus inputs unmask negative effects of ultraviolet radiation on algae in a high mountain lake. *Global Change Biology* **14**:423-439.
- Cauwet, G. 2002. DOM in the coastal zone. Pages 579-609 *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*. Elsevier.
- Cho, G., S. Na, S. W. Suh, and G. Jung. 2000. Expression of Recombinant HBV Pol Proteins in HepG2 Cells. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **33**:440-447.
- Cockell, C. S., and G. Horneck. 2001. The history of the UV radiation climate of the earth— theoretical and space-based observations. *Photochemistry and Photobiology* **73**:447-451.
- Collinson, E. J., and C. M. Grant. 2003. Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry* **278**:22492-22497.
- Conley, J. M., M. S. Schorr, M. L. Hanson, S. J. Symes, and S. M. Richards. 2009. Is ambient chitinase activity a monitoring tool for impacts on secondary production in lotic systems? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **66**:1274-1281.
- Connelly, S. J., R. E. Moeller, G. Sanchez, and D. L. Mitchell. 2009. Temperature effects on survival and DNA repair in four freshwater cladoceran *Daphnia* species exposed to UV radiation. *Photochemistry and Photobiology* **85**:144-152.
- De Wilde, R., L. Swevers, T. Soin, O. Christiaens, P. Rougé, K. Cooreman, C. Janssen, and G. Smaghe. 2013. Cloning and functional analysis of the ecdysteroid receptor complex in the opossum shrimp *Neomysis integer* (Leach, 1814). *Aquatic Toxicology* **130**:31-40.
- Del Vecchio, R., and N. V. Blough. 2002. Photobleaching of chromophoric dissolved organic matter in natural waters: kinetics and modeling. *Marine Chemistry* **78**:231-253.
- Diéguez, M., and E. Balseiro. 1998. Colony size in *Conochilus hippocrepis*: defensive adaptation to predator size. *Hydrobiologia* **387**:421-425.
- Dobberfuhl, D. R., and J. J. Elser. 2000. Elemental stoichiometry of lower food web components in arctic and temperate lakes. *Journal of Plankton Research* **22**:1341-1354.
- Dodson, S. I. 1974. Adaptive change in plankton morphology in response to size-selection predation: A new hypothesis on cyclomorphosis. *Limnology and Oceanography* **19**:721-729.
- Dodson, S. I., and J. E. Havel. 1988. Indirect prey effects: Some morphological and life history response of *Daphnia pulex* exposed to *Notonecta undulata*. *Limnology and Oceanography* **33**:1274-1285.
- Doyle, S. A., J. E. Saros, and C. E. Williamson. 2005. Interactive effects of temperature and nutrient limitation on the response of alpine phytoplankton growth to ultraviolet radiation. *Limnology and Oceanography* **50**:1362-1367.

- Duchet, C., M. Mitie Inafuku, T. Caquet, M. Larroque, E. Franquet, C. Lagneau, and L. Lagadic. 2011. Chitobiase activity as an indicator of altered survival, growth and reproduction in *Daphnia pulex* and *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera) exposed to spinosad and diflubenzuron. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **74**:800-810.
- Ebert, D. 1992. A food-independent maturation threshold and size at maturity in *Daphnia magna*. *Limnology and Oceanography* **37**:878-881.
- Elser, J. J., A. L. Peace, M. Kyle, M. Wojewodzic, M. L. McCrackin, T. Andersen, and D. O. Hessen. 2010. Atmospheric nitrogen deposition is associated with elevated phosphorus limitation of lake zooplankton. *Ecology Letters* **13**:1256-1261.
- Elser, J. J., R. W. Sterner, E. Gorokhova, W. F. Fagan, T. A. Markow, J. B. Cotner, J. F. Harrison, S. E. Hobbie, G. M. Odell, and L. J. Weider. 2000. Biological stoichiometry from genes to ecosystems. *Ecology Letters* **3**:540-550.
- Espie, P. J., and J. C. Roff. 1995a. A biochemical index of duration of the molt cycle for planktonic Crustacea based on the chitin-degrading enzyme, chitobiase. *Limnology and Oceanography* **40**:1028-1034.
- Espie, P. J., and J. C. Roff. 1995b. Characterization of chitobiase from *Daphnia magna* and its relation to chitin flux. *Physiological Zoology* **68**:727-748.
- Essen, L. O., and T. Klar. 2006. Light-driven DNA repair by photolyases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**:1266-1277.
- Flössner, D. 1993. Biology of Cladocera. Proceedings of the Second International Symposium on Cladocera. Ed. by V. Korinek & DG Frey. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* **78**:20-20.
- Gabriel, W., B. Luttbeg, A. Sih, and R. Tollrian. 2005. Environmental tolerance, heterogeneity, and the evolution of reversible plastic responses. *American Naturalist* **166**:339-353.
- Gonçalves, R. J., M. Sol Souza, J. Aigo, B. E. Modenutti, E. G. Balseiro, V. E. Villafañe, V. Cussac, and E. W. Helbling. 2010. Responses of plankton and fish from temperate zones to UVR and temperature in a context of global change. *Ecología Austral* **20**:129-153.
- Goodwin, T. 1986. Metabolism, nutrition, and function of carotenoids. *Annual review of nutrition* **6**:273-297.
- Guillard, R. R. L., and C. J. Lorenzen. 1972. Yellow-green algae with chlorophyllide c. *J Phycol* **8**:10-14.
- Habig, W. H., M. J. Pabst, and W. B. Jakoby. 1974. Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* **249**:7130-7139.
- Häder, D. P., E. W. Helbling, C. E. Williamson, and R. C. Worrest. 2007. Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical and Photobiological Sciences* **10**:242-260.
- Häder, D. P., H. D. Kumar, R. C. Smith, and R. C. Worrest. 1998. Effects on aquatic ecosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **46**:53-58.
- Hairston, N. 1976. Photoprotection by carotenoid pigments in the copepod *Diaptomus nevadensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **73**:971-974.
- Hairston, N. G. 1979. The relationship between pigmentation and reproduction in two species of *Diaptomus* (Copepoda). *Limnology and Oceanography* **24**:38-44.
- Halcrow, K. 1976. The fine structure of the carapace integument of *Daphnia magna* Straus (Crustacea Branchiopoda). *Cell and tissue research* **169**:267-276.
- Hansell, D. A., H. W. Ducklow, A. M. Macdonald, and M. O. Baringer. 2004. Metabolic poise in the North Atlantic Ocean diagnosed from organic matter transports. *Limnology and Oceanography* **49**:1084-1094.
- Hanson, M., and L. Lagadic. 2005. Chitobiase activity as an indicator of aquatic ecosystem health. *Aquatic Ecosystem Health AND Management* **8**:441-450.
- Hansson, L.-A., M. Gyllstrom, A. Stahl-Delbanco, and M. Svensson. 2004. Responses to fish predation and nutrients by plankton at different levels of taxonomic resolution. *Freshwater Biology* **49**:1538-1550.
- 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.

- Hansson, L. A. 2004. Plasticity in pigmentation induced by conflicting threats from predation and UV radiation. *Ecology* **85**:1005-1016.
- Hansson, L. A., and S. Hylander. 2009. Effects of ultraviolet radiation on pigmentation, photoenzymatic repair, behavior, and community ecology of zooplankton. *Photochemical and Photobiological Sciences* **8**:1266-1275.
- Harm, W. 1980. Biological effects of ultraviolet radiation.
- Havel, J. E. 1987. Predator-induced defenses: A review. Pages 263-278 in W. C. Kerfoot and A. Sih, editors. *Predation: Direct and indirect impacts on aquatic communities*. University Press of New England, Hanover, N.Y.
- Hayes, J. D., J. U. Flanagan, and I. R. Jowsey. 2005. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **45**:51-88.
- Hebert, P. D. N., and P. M. Grewe. 1985. *Chaoborus* induced shifts in the morphology of *Daphnia ambigua*. *Limnology and Oceanography* **30**:1291-1297.
- Helbling, E. W., A. G. J. Buma, P. Boelen, H. J. v. d. Strate, M. V. F. Giordanino, and V. E. Villafaña. 2011. Increase in Rubisco activity and gene expression due to elevated temperature partially counteracts ultraviolet radiation-induced photoinhibition in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnology and Oceanography* **56**:1330-1342.
- Helbling, E. W. Z. H. 2003. UV effects in aquatic organisms and ecosystems. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Herbert, P., and C. Emery. 1990. The adaptive significance of cuticular pigmentation in *Daphnia*. *Functional Ecology*:703-710.
- Hessen, D. O. 1993. DNA-damage and pigmentation in Alpine and Arctic zooplankton as bioindicators of UV-radiation. *Verhandlungen Internationale Vereinigung Limnologie* **25**:482-486.
- Hessen, D. O., T. Andersen, P. Brettum, and B. A. Faafeng. 2003. Phytoplankton contribution to sestonic mass and elemental ratios in lakes: Implications for zooplankton nutrition. *Limnology and Oceanography* **48**:1289-1296.
- Hessen, D. O., J. Borgeraas, K. Kessler, and U. H. Refseth. 1999. UV-B susceptibility and photoprotection of Arctic *Daphnia* morphotypes. *Polar Research* **18**:345-352.
- Hessen, D. O., J. J. Elser, R. W. Sterner, and J. Urabe. 2013. Ecological stoichiometry: An elementary approach using basic principles. *Limnology and Oceanography* **58**:2219-2236.
- Hessen, D. O., P. J. Faerovig, and T. Andersen. 2002. Light, nutrients, and P : C ratios in algae: Grazer performance related to food quality and quantity. *Ecology* **83**:1886-1898.
- Hessen, D. O., and E. Lydersen. 1996. The zooplankton story of humic Lake Skjervatjern during whole catchment acidification. *Environment International* **22**:643-652.
- Hobæk, A., and H. G. Wolf. 1991. Ecological genetics of Norwegian *Daphnia*. II. Distribution of *Daphnia longispina* genotypes in relation to short-wave radiation and water colour. Pages 229-243 in V. Kořínek and D. G. Frey, editors. *Biology of Cladocera: Proceedings of the Second International Symposium on Cladocera, Tatranska Lomnica, Czechoslovakia, 13–20 September 1989*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Huebner, J. D., D. L. W. Young, N. L. Loadman, V. J. Lentz, and M. D. Wiegand. 2006. Age-dependent survival, reproduction and photorepair activity in *Daphnia magna* (Straus, 1820) after exposure to artificial ultraviolet radiation. *Photochemistry and Photobiology* **82**:1656-1661.
- Hurst, R., Y. Bao, P. Jemth, B. Mannervik, and G. Williamson. 1998. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases. *Biochem. J.* **332**:97.
- Hylander, S., M. S. Souza, E. G. Balseiro, B. E. Modenutti, and L. A. Hansson. 2012. Fish-mediated trait compensation in zooplankton. *Functional Ecology* **26**:608-615.
- Kielbassa, C., L. Roza, and B. Epe. 1997. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis* **18**:811-816.
- Kilham, S. S., D. A. Kreeger, S. G. Lynn, C. E. Goulden, and L. Herrera. 1998. COMBO - A defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia* **377**:147-159.

- Korbee, N., P. Carrillo, M. T. Mata, S. Rosillo, J. M. Medina-Sánchez, and F. L. Figueroa. 2012. Effects of ultraviolet radiation and nutrients on the structure–function of phytoplankton in a high mountain lake. *Photochemical and Photobiological Sciences* **11**:1087-1098.
- Kouwenberg, J. H. M., and F. Lantoine. 2007. Effects of ultraviolet-B stressed diatom food on the reproductive output in Mediterranean *Calanus helgolandicus* (Crustacea; Copepoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **341**:239-253.
- Laforsch, C., L. Beccara, and R. Tollrian. 2006. Inducible defenses: The relevance of chemical alarm cues in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* **51**:1466-1472 Abstract.
- Laforsch, C., and R. Tollrian. 2004. Embryological aspects of inducible morphological defenses in *Daphnia*. *Journal of Morphology* **262**:701-707.
- Lampert, W. 1989. The adaptive significance of diel vertical migration of zooplankton. *Functional Biology* **3**:21-27.
- Laspoumaderes, C., M. S. Souza, B. Modenutti, and E. Balseiro. 2017. Glacier melting and response of *Daphnia* oxidative stress. *Journal of Plankton Research* **39**:675-686.
- Leavitt, P. R., B. F. Cumming, J. P. Smol, M. Reasoner, R. Pienitz, and D. A. Hodgson. 2003. Climatic control of ultraviolet radiation effects on lakes. *Limnology and Oceanography* **48**:2062-2069.
- Lee, D. R., and A. L. Buikema Jr. 1979. Molt-Related Sensitivity of *Daphnia pulex* in Toxicity Testing. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **36**:1129-1133.
- Leech, D. M., and C. E. Williamson. 2000. Is tolerance to UV radiation in zooplankton related to body size, taxon, or lake transparency? *Ecological Applications* **10**:1530-1540.
- Lesser, M. P. 1996. Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnology and Oceanography* **41**:271-283.
- Lesser, M. P. 2006. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology* **68**:253-278.
- Leu, E., S. Falk-Petersen, and D. O. Hessen. 2007. Ultraviolet radiation negatively affects growth but not food quality of arctic diatoms. *Limnology and Oceanography* **52**:787-797.
- Leu, E., S.-A. Wangberg, A. Wulff, S. Falk-Petersen, J. B. ObeK, and D. O. Hessen. 2006. Effects of changes in ambient PAR and UV radiation on the nutritional quality of an Arctic diatom (*Thalassiosira antarctica* var. *borealis*). *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* **337**:65-81.
- Li, P., W. Liu, and K. Gao. 2013. Effects of temperature, pH, and UV radiation on alkaline phosphatase activity in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*. *Journal of Applied Phycology* **25**:1031-1038.
- Luecke, C., and W. J. O'Brien. 1983. The effect of *Heterocope* predation on zooplankton communities in arctic ponds. *Limnology and Oceanography* **28**:367-377.
- Macfadyen, E. J., C. E. Williamson, G. Grad, M. Lowery, W. H. Jeffrey, and D. L. Mitchell. 2004. Molecular response to Climate Change: Temperature dependence of UV-induced dna damage and repair in the freshwater crustacean *Daphnia pulicaria*. *Global Change Biology* **10**:408-416.
- Madronich, S., R. L. McKenzie, L. O. Björn, and M. M. Caldwell. 1998. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **46**:5-19.
- Markert, B., F. Pedrozo, W. Geller, K. Friese, S. Korhammer, G. Baffico, M. Diaz, and S. Wolf. 1997. A contribution to the study of the heavy-metal and nutritional element status of some lakes in the southern Andes of Patagonia (Argentina). *Science of the Total Environment* **206**:1-15.
- Martindale, J. L., and N. J. Holbrook. 2002. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology* **192**:1-15.
- McCarthy, S. D. S., S. R. Rafferty, and P. C. Frost. 2010. Responses of alkaline phosphatase activity to phosphorus stress in *Daphnia magna*. *Journal of Experimental Biology* **213**:256-261.

- McCarthy, V., I. Donohue, and K. Irvine. 2006. Field evidence for stoichiometric relationships between zooplankton and N and P availability in a shallow calcareous lake. *Freshwater Biology* **51**:1589-1604.
- McCarthy, V., and K. Irvine. 2010. A test of stoichiometry across six Irish lakes of low-moderate nutrient status and contrasting hardness. *Journal of Plankton Research* **32**:15-29.
- McQueen, D. J., M. R. Johannes, and J. R. Post. 1989. Bottom-up and top-down impacts on freshwater pelagic community structure. *Ecological Monographs* **59**:289-309.
- Meinertz, J. R., S. L. Greseth, M. P. Gaikowski, and L. J. Schmidt. 2008. Chronic toxicity of hydrogen peroxide to *Daphnia magna* in a continuous exposure, flow-through test system. *Science of the Total Environment* **392**:225-232.
- Merzendorfer, H., and L. Zimoch. 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology* **206**:4393-4412.
- Mitchell, D. L., and D. Karentz. 1993. The induction and repair of DNA photodamage in the environment. Pages 345-377 in A. R. Young, L. O. Bjorn, J. Moan, and W. Nultsch, editors. *Environmental UV photobiology*. Plenum Press, New York.
- Miyakawa, H., M. Imai, N. Sugimoto, Y. Ishikawa, A. Ishikawa, H. Ishigaki, Y. Okada, S. Miyazaki, S. Koshikawa, R. Cornette, and T. Miura. 2010. Gene up-regulation in response to predator kairomones in the water flea, *Daphnia pulex*. *BMC Developmental Biology* **10**:45.
- Mladenov, N., R. Sommaruga, R. Morales-Baquero, I. Laurion, L. Camarero, M. Diéguez, A. Camacho, A. Delgado, O. Torres, and Z. Chen. 2011. Dust inputs and bacteria influence dissolved organic matter in clear alpine lakes. *Nature communications* **2**:405.
- Modenutti, B. E., E. G. Balseiro, M. Bastidas Navarro, C. Laspoumaderes, M. S. Souza, and F. Cuassolo. 2013. Environmental changes affecting light climate in oligotrophic mountain lakes: The deep chlorophyll maxima as a sensitive variable. *Aquatic Sciences* **75**:361-371.
- Modenutti, B. E., E. G. Balseiro, C. Callieri, R. Bertoni, and C. P. Queimaliños. 2005. Effect of UV-B and different PAR intensities on the primary production of the mixotrophic planktonic ciliate *Stentor araucanus*. *Limnology and Oceanography* **50**:864-871.
- Modenutti, B. E., E. G. Balseiro, M. C. Dieguez, C. Queimalinos, and R. Albarino. 1998. Heterogeneity of fresh-water Patagonian ecosystems. *Ecología Austral* **8**:155-165.
- Modenutti, B. E., G. L. Perez, E. G. Balseiro, and C. P. Queimaliños. 2000. Relationship between light availability, chlorophyll a and total suspended solid in a glacial lake of South Andes. *Verhandlungen Internationale Vereinigung Limnologie* **27**:2648-2651.
- Moeller, R. E., S. Gilroy, C. E. Williamson, G. Grad, and R. Sommaruga. 2005. Dietary acquisition of photoprotective compounds (mycosporine-like amino acids, carotenoids) and acclimation to ultraviolet radiation in a freshwater copepod. *Limnology and Oceanography* **50**:427-439.
- Monaghan, P., N. B. Metcalfe, and R. Torres. 2009. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: Mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters* **12**:75-92.
- Morris, D. P., H. Zagarese, C. E. Williamson, E. G. Balseiro, B. R. Hargreaves, B. E. Modenutti, R. Moeller, and C. Queimaliños. 1995. The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnology and Oceanography* **40**:1381-1391.
- Muzzarelli, R. A. A. 1977. Chapter 4 - Chitinases and related enzymes. Pages 155-181 *Chitin*. Pergamon.
- Nakagawa, Y. 2005. Nonsteroidal ecdysone agonists. *Vitamins AND Hormones* **73**:131-173.
- O'Brien, W. J., D. Kettle, and H. Riessen. 1979. Helmets and invisible armor: structures reducing predation from tactile and visual planktivores. *Ecology* **60**:287-294.
- Ohman, M. D. 1988. Behavioral Responses of Zooplankton to Predation. *Bulletin of Marine Science* **43**:530-550.
- Oosterhuis, S. S., M. A. Baars, and W. C. M. Klein Breteler. 2000. Release of the enzyme chitinase by the copepod *Temora longicornis*: characteristics and potential tool for estimating crustacean biomass production in the sea. *Marine Ecology Progress Series* **196**:195-206.

- Overturf, C., A. Wormington, K. Blythe, N. Gohad, A. Mount, and A. Roberts. 2015. Toxicity of noradrenaline, a novel anti-biofouling component, to two non-target zooplankton species, *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology AND Pharmacology* **171**:49-54.
- Paggi, J. 1999. Status and phylogenetic relationships of *Daphnia sarsi* Daday, 1902 (Crustacea: Anomopoda). *Hydrobiologia* **403**:27-38.
- Park, E. Y., and H. M. Rho. 2002. The transcriptional activation of the human copper/zinc superoxide dismutase gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through two different regulator sites, the antioxidant responsive element and xenobiotic response element. *Molecular and Cellular Biochemistry* **24**:47.
- Peng, T., K. Thorn, T. Schroeder, L. Wang, F. J. Theis, C. Marr, and N. Navab. 2017. A BaSiC tool for background and shading correction of optical microscopy images. *Nature communications* **8**:14836.
- Pérez, A. P., M. A. Ferraro, and H. E. Zagarese. 2012. The relative contributions of diet and associated microbiota to the accumulation of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in the freshwater copepod *Boeckella antiqua*. *Freshwater Biology* **57**:993-1004.
- Pérez, G. L., C. P. Queimaliños, and B. E. Modenutti. 2002. Light climate and plankton in the deep chlorophyll maxima in North Patagonian Andean lakes. *Journal of Plankton Research* **24**:591-599.
- Persaud, A. D., and C. E. Williamson. 2005. Ultraviolet and temperature effects on planktonic rotifers and crustaceans in northern temperate lakes. *Freshwater Biology* **50**:467-476.
- Persson, J., M. W. Wojewodzic, D. O. Hessen, and T. Andersen. 2011. Increased risk of phosphorus limitation at higher temperatures for *Daphnia magna*. *Oecologia* **165**:123-129.
- Pijanowska, J. 1992. Anti-predator defense in three *Daphnia* species. *International Revue gesamten Hydrobiologie* **77**:153-163.
- Qi, S., C. Wang, X. Chen, Z. Qin, X. Li, and C. Wang. 2013. Toxicity assessments with *Daphnia magna* of Guadipyr, a new neonicotinoid insecticide and studies of its effect on acetylcholinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and chitobiase activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **98**:339-344.
- Rautio, M., and A. Korhola. 2002. UV-induced pigmentation in subarctic *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* **47**:295-299.
- Rautio, M., and B. Tartarotti. 2010. UV radiation and freshwater zooplankton: damage, protection and recovery. *Freshwater Reviews* **3**:105-131.
- Ravanat, J. L., T. Douki, and J. Cadet. 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **63**:88-102.
- Relyea, R. A. 2001. Morphological and behavioral plasticity of larval anurans in response to different predators. *Ecology* **82**:523-540.
- Repka, S., and M. Walls. 1998. Variation in the neonate size of *Daphnia pulex*: the effects of predator exposure and clonal origin. *Aquatic Ecology* **32**:203-209.
- Reynolds, S. E. 1987. The cuticle, growth and moulting in insects: the essential background to the action of acylurea insecticides. *Pest Management Science* **20**:131-146.
- Reynolds, S. E., and R. I. Samuels. 1996. Physiology and biochemistry of insect moulting fluid. Pages 157-232 *Advances in insect physiology*. Elsevier.
- Rhee, G. Y., and I. J. Gotham. 1981. The effect of environmental factors on phytoplankton growth: Temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation. *Limnology and Oceanography* **26**:635-648.
- 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.
- Richards, S., S. Kelly, and M. Hanson. 2008. Zooplankton chitobiase activity as an endpoint of pharmaceutical effect. *Archives of environmental contamination and toxicology* **54**:637-644.
- Riessen, H. P. 1999. Predator-induced life history shifts in *Daphnia*: a synthesis of studies using meta-analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **56**:2487-2494.

- Riessen, H. P., W. J. O'Brien, and B. Loveless. 1984. An analysis of the components of *Chaoborus* predation on zooplankton and the calculation of relative prey vulnerabilities. *Ecology* **65**:514-522.
- Riessen, H. P., and W. G. Sprules. 1990. Demographic costs of antipredator defenses in *Daphnia pulex*. *Ecology* **71**:1536-1546.
- Rinke, K., and T. Petzoldt. 2008. Individual-based simulation of diel vertical migration of *Daphnia*: A synthesis of proximate and ultimate factors. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters* **38**:269-285.
- Rinke, K., and J. Vijverberg. 2005. A model approach to evaluate the effect of temperature and food concentration on individual life-history and population dynamics of *Daphnia*. *Ecological Modelling* **186**:326-344.
- Roff, J., J. Kroetsch, and A. Clarke. 1994. A radiochemical method for secondary production in planktonic crustacea based on rate of chitin synthesis. *Journal of Plankton Research* **16**:961-976.
- Rozema, J., L. O. Bjorn, J. F. Bornman, A. Gaberscik, D. P. Häder, T. Trost, M. Germ, M. Klisch, A. Groniger, R. P. Sinha, M. Lebert, Y. Y. He, R. Buffoni-Hall, N. V. J. De Bakker, J. Van De Staaij, and B. B. Meijkamp. 2002. The Role of Uv-B Radiation in Aquatic and Terrestrial Ecosystems - an Experimental and Functional Analysis of the Evolution of Uv-Absorbing Compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **66**:2-12.
- Rusak, S. R., L. Peake, B. Cooper, W. 2006. Trends in hydrogen peroxide levels in relation to solar radiation in the water of Leith.
- Sancar, A. 1996. DNA excision repair. Pages 43-81 *Annual Review of Biochemistry*
- Sastri, A. R., and J. C. Roff. 2000. Rate of chitobiase degradation as a measure of development rate in planktonic Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **57**:1965-1968.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, and B. Schmid. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**:676.
- Shick, J. M., and W. C. Dunlap. 2002. Mycosporine-like amino acids and related gadusols: Biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annual Review of Physiology* **64**:223-262.
- Shick, J. M., S. Romaine-Lioud, C. Ferrier-Pagés, and J.-P. Gattuso. 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. *Limnology and Oceanography* **44**:1667-1682.
- Siebeck, O., T. Vail, C. E. Williamson, R. Vetter, D. Hessen, H. E. Zagarese, E. Little, E. G. Balseiro, B. E. Modenutti, J. Seva, and A. Shumate. 1994. Impact of UV-B radiation on zooplankton and fish in pelagic freshwater ecosystems *Archiv für Hydrobiologie Beihrage Ergebnisse der Limnologie* **43**:101-104.
- Sinha, R. P., and D. P. Häder. 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical and Photobiological Sciences* **1**:225-236.
- Skinner, D. M. 1985. Molting and regeneration. *The biology of Crustacea* **9**:43-146.
- Smith, R. C., B. Prezelin, K. Baker, R. Bidigare, N. Boucher, T. Coley, D. Karentz, S. MacIntyre, H. Matlick, and D. Menzies. 1992. Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science* **255**:952-959.
- Song, Y., L. M. Evenseth, T. Iguchi, and K. E. Tollefsen. 2017b. Release of chitobiase as an indicator of potential molting disruption in juvenile *Daphnia magna* exposed to the ecdysone receptor agonist 20-hydroxyecdysone. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **80**:954-962.
- Song, Y., D. L. Villeneuve, K. Toyota, T. Iguchi, and K. E. Tollefsen. 2017a. Ecdysone receptor agonism leading to lethal molting disruption in arthropods: Review and adverse outcome pathway development. *Environmental Science and Technology* **51**:4142-4157.
- Sørensen, J. G., T. N. Kristensen, and V. Loeschcke. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters* **6**:1025-1037.

- Souza, M. S., E. G. Balseiro, C. Laspoumaderes, and B. E. Modenutti. 2010a. Effect of ultraviolet radiation on Acetylcholinesterase activity in freshwater copepods. *Photochemistry and Photobiology* **86**:367-373.
- Souza, M. S., L.-A. Hansson, S. Hylander, B. E. Modenutti, and E. G. Balseiro. 2012. Rapid Enzymatic Response to Compensate UV Radiation in Copepods. *PLoS One* **7**:e32046.
- Souza, M. S., B. E. Modenutti, and E. G. Balseiro. 2007. Antioxidant defences in planktonic crustaceans exposed to different underwater light irradiances in Andean lakes. *Water, Air, and Soil Pollution* **183**:49-57.
- Souza, M. S., B. E. Modenutti, P. Carrillo, M. Villar-Argaiz, J. M. Medina-Sánchez, F. Bullejos, and E. G. Balseiro. 2010b. Stoichiometric dietary constraints influence the response of copepods to ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Limnology and Oceanography* **55**:1024-1032.
- Sterner, R. W., and J. J. Elser. 2002. *Ecological stoichiometry. The biology of elements from molecules to the biosphere.* Princeton University Press, Princeton, NJ USA.
- Sterner, R. W., J. J. Elser, E. J. Fee, S. J. Guildford, and T. H. Chrzanowski. 1997. The light:nutrient ratio in lakes: The balance of energy and materials affects ecosystem structure and process. *The American Naturalist* **150**:663-684.
- Sterner, R. W., D. D. Hagemeier, and W. L. Smith. 1993. Phytoplankton nutrient limitation and food quality for *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* **38**:857-871.
- Stevenson, J. 1985. Dynamics of the integument. *The biology of Crustacea* **9**:1-42.
- Sutherland, B. M. 1981. 24 Photoreactivating Enzymes. Pages 481-515 *Enzymes*.
- Tank, S., M. Xenopoulos, and L. Hendzel. 2005. Effect of ultraviolet radiation on alkaline phosphatase activity and planktonic phosphorus acquisition in Canadian boreal shield lakes. *Limnology and Oceanography* **50**:1345-1351.
- Tartarotti, B., G. Baffico, P. Temporetti, and H. E. Zagarese. 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., I. Laurion, and R. Sommaruga. 2001. Large variability in the concentration of mycosporine-like aminoacids among zooplankton from lakes located across an altitude gradient. *Limnology and Oceanography* **46**:1546-1552.
- Threlkeld, S. T. 1985. Resource variation and the initiation of midsummer declines of caldoceran populations. *Archiv fur Hydrobiologie Beih. Ergebn. Limnol.* **21**:333-340.
- Tollrian, R. 1995. Predator-induced morphological defenses: Costs, life history shifts, and maternal effects in *Daphnia pulex*. *Ecology* **76**:1691-1705.
- Tollrian, R., and S. Dodson. 1999. Inducible defenses in Cladocera: Constraints, costs, and multipredator environments. *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses*:177 - 202.
- Tollrian, R., and C. D. Harvell. 1999. *The ecology and evolution of inducible defenses.* Princeton University Press.
- Tollrian, R., and C. Heibl. 2004. Phenotypic plasticity in pigmentation in *Daphnia* induced by UV radiation and fish kairomones. *Functional Ecology* **18**:497-502.
- Twardowski, M. S., and P. L. Donaghay. 2002. Photobleaching of aquatic dissolved materials: Absorption removal, spectral alteration, and their interrelationship. *Journal of Geophysical Research: Oceans* **107**.
- Urabe, J., M. Kyle, W. Makino, T. Yoshida, T. Andersen, and J. J. Elser. 2002. Reduced light increases herbivore production due to stoichiometric effects of light/nutrient balance. *Ecology* **83**:619-627.
- Vega, M. 1995. *La depredación intrazooplancónica: un estudio sobre *Parabroteas sarsi*.* Doctoral Dissertation, University of Comahue:211 pp.
- Vega, P. M. 1999. Life-State Differences in the Diet of *Parabroteas sarsi* (Daday) (Copepoda, Calanoida): A Field Study. *Limnologica* **29**:186-190.
- Villafañe, V., E. W. Helbling, and H. E. Zagarese. 2001. Solar ultraviolet radiation and its impact on aquatic systems of Patagonia, South America. *Ambio* **30**:112-117.
- Vinebrooke, R. D., and P. R. Leavitt. 1999. Differential responses of littoral communities to ultraviolet radiation in an alpine lake. *Ecology* **80**:223-237.

- Vrba, J., and J. Macháček. 1994. Release of dissolved extracellular β -N-acetylglucosaminidase during crustacean moulting. *Limnology and Oceanography* **39**:712-716.
- Wagner, N. D., and P. C. Frost. 2012. Responses of alkaline phosphatase activity in *Daphnia* to poor nutrition. *Oecologia* **170**:1-10.
- Williamson, C. E. 1995. What role does UV-b radiation play in freshwater ecosystems? *Limnology and Oceanography* **40**:386-392.
- Williamson, C. E., J. M. Fischer, S. M. Bollens, E. P. Overholt, and J. K. Breckenridge. 2011. Towards a more comprehensive theory of zooplankton diel vertical migration: Integrating ultraviolet radiation and water transparency into the biotic paradigm. *Limnology and Oceanography* **56**:1603-1623.
- Williamson, C. E., C. Salm, S. L. Cooke, and J. E. Saros. 2010. How do UV radiation, temperature, and zooplankton influence the dynamics of alpine phytoplankton communities? *Hydrobiologia* **648**:73-81.
- Wojewodzic, M. W., M. Kyle, J. J. Elser, D. O. Hessen, and T. Andersen. 2011. Joint effect of phosphorus limitation and temperature on alkaline phosphatase activity and somatic growth in *Daphnia magna*. *Oecologia* **165**:837-846.
- Wojtal-Frankiewicz, A. 2012. The effects of global warming on *Daphnia* spp. population dynamics: A review. *Aquatic Ecology* **46**:37-53.
- Xenopoulos, M. A., P. C. Frost, and J. J. Elser. 2002. Joint effects of UV radiation and phosphorus supply on algal growth rate and elemental composition. *Ecology* **83**:423-435.
- Zagarese, H. E., C. E. Williamson, M. Mislivets, and P. Orr. 1994. The vulnerability of *Daphnia* to UV-B radiation in the Northeastern United States. *Archiv fur Hydrobiologie Beih. Ergebn. Limnol.* **43**:207-216.
- Zanardi-Lamardo, E., C. A. Moore, and R. G. Zika. 2004. Seasonal variation in molecular mass and optical properties of chromophoric dissolved organic material in coastal waters of southwest Florida. *Marine Chemistry* **89**:37-54.
- Zellmer, I. D. 1995. UV-B-tolerance of alpine and arctic *Daphnia*. *Hydrobiologia* **307**:153-159.
- Zepp, R. G., T. V. Callaghan, and D. J. Erickson Iii. 2003. Interactive effects of ozone depletion and climate change on biogeochemical cycles. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2**:51-61.
- Zepp, R. G., D. J. Erickson Iii, N. D. Paul, and B. Sulzberger. 2007. Interactive effects of solar UV radiation and climate change on biogeochemical cycling. *Photochemical and Photobiological Sciences* **6**:286-300.
- Zepp, R. G., D. J. Erickson Iii, N. D. Paul, and B. Sulzberger. 2011. Effects of solar UV radiation and climate change on biogeochemical cycling: interactions and feedbacks. *Photochemical and Photobiological Sciences* **10**:261-279.
- Zheng, J., T. Nakatsuji, R. D. Roer, and R. D. Watson. 2008. Studies of a receptor guanylyl cyclase cloned from Y-organs of the blue crab (*Callinectes sapidus*), and its possible functional link to ecdysteroidogenesis. *General and Comparative Endocrinology* **155**:780-788.
- Žitňan, D., Y. J. Kim, I. Žitňanová, L. Roller, and M. E. Adams. 2007. Complex steroid-peptide-receptor cascade controls insect ecdysis. *General and Comparative Endocrinology* **153**:88-96.
- Zou, E. 2005. Impacts of xenobiotics on crustacean molting: the invisible endocrine disruption. *Integrative and Comparative Biology* **45**:33-38.
- Zou, E., and M. Fingerman. 1999. Chitinase activity in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab *Uca pugilator* during the molting cycle. *Marine Biology* **133**:97-101.

Publicación de Respaldo:

**"Interactive effects of temperature,
ultraviolet radiation and food quality on zooplankton alkaline
phosphatase activity"**



Interactive effects of temperature, ultraviolet radiation and food quality on zooplankton alkaline phosphatase activity[☆]



Laura Wolinski^{*}, Beatriz Modenutti, Maria Sol Souza, Esteban Balseiro

Laboratorio de Limnología, INIBIOMA (CONICET-UNComahue), Quintral 1250, Bariloche, Río Negro R8400, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 December 2015
Received in revised form
5 February 2016
Accepted 6 February 2016
Available online xxx

Keywords:

Enzyme activity
Daphnia
Oxidative stress
GST
Stoichiometry
Phosphorus

ABSTRACT

Ultraviolet Radiation (UVR) is a stressor for aquatic organisms affecting enzyme activities in planktonic populations because of the increase in reactive oxygen species. In addition, UVR exposure combined with other environmental factors (i.e. temperature and food quality) could have even higher detrimental effects. In this work, we aimed to determine the effect of UVR on somatic Alkaline Phosphatase Activity (APA) and Glutathione S-Transferase (GST) activity on the cladoceran *Daphnia commutata* under two different temperatures (10 °C and 20 °C) and under three food qualities (carbon:phosphorus ratios: 1150, 850 and 550). APA is a biomarker that is considered as a P deficiency indicator in zooplankton. Since recovery from UVR damage under dark conditions is an ATP depending reaction we also measured APA during recovery phases. We carried out a laboratory experiment combining different temperatures and food qualities with exposition to UVR followed by luminic and dark phases for recovery. In addition, we exposed organisms to H₂O₂, to establish if the response on APA to UVR was a consequence of the reactive oxygen species produced these short wavelengths. Our results showed that somatic APA was negatively affected by UVR exposure and this effect was enhanced under high temperature and low food quality. Consistently, GST activity was higher when exposed to UVR under both temperatures. The H₂O₂ experiments showed the same trend as UVR exposure, indicating that APA is affected mainly by oxidative stress than by direct effect of UVR on the enzyme. Finally, APA was affected in the dark phase of recovery confirming the P demands. These results enlighten the importance of food quality in the interacting effect of UVR and temperature, showing that C:P food ratio could determine the success or failure of zooplanktonic populations in a context of global change.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Aquatic ecosystems are being affected by increasing temperature and ultraviolet radiation (UVR) (Häder et al., 2007, 2015; Zepp et al., 2003). These changes modify light intensity and nutrient inputs to aquatic ecosystems that consequently affect the C:P ratio (carbon:phosphorus) of primary producers (Sterner et al., 1997), hence, the food quality for zooplankton (Dobberfuhr and Elser, 2000; Elser et al., 2000). In that context, organisms with high nutrient content (like *Daphnia* needs high P food) are more

susceptible to low food qualities (Sterner et al., 1993), and well-nourished animals will cope with stressors more efficiently than those that are nutrient-depleted (Balseiro et al., 2008).

Herbivorous zooplankton constitutes an important link in aquatic food webs, because they transfer nutrients from primary producers to higher consumers (Carpenter et al., 2001; McQueen et al., 1989; Sterner and Elser, 2002). Nutrient uptake by zooplankton can be linked to some enzymatic activities, for example P acquisition is closely related to Alkaline Phosphatase (AP). AP is a prevalent enzyme in aquatic environments commonly found attached to cell surface or in the dissolved fraction (Tank et al., 2005). This enzyme releases phosphates from macromolecules allowing P transportation and sub-cellular uptake from digested food (Elser et al., 2010; Wojewodzic et al., 2011). AP activity (APA) may be considered as an indicator of P deficiency in zooplankton (Elser et al., 2010; McCarthy et al., 2010; Wagner and Frost, 2012) because its activity increases under P-depleted food

Abbreviations: APA, Alkaline Phosphatase Activity; GST, Glutathione S-Transferase; UVR, Ultraviolet Radiation; PAR, Photoenzymatic Active Radiation; PER, Photoenzymatic Recovery; NER, Nucleotide Excision Repair.

^{*} This paper has been recommended for acceptance by Maria Cristina Fossi.

^{*} Corresponding author.

E-mail address: lwolinski@comahue-conicet.gob.ar (L. Wolinski).

and in the presence of other stressors such as temperature that can affect the nutritional requirements (Persson et al., 2011).

UVR was observed to affect enzyme activities in planktonic populations because of the increase in reactive oxygen species (ROS) (Barata et al., 2005a; Hessen, 1993; Souza et al., 2010). Antioxidant enzymes as Glutathione S-transferase (GST) represent a major defense mechanism against ROS, inactivating secondary metabolites during oxidative stress (Hayes et al., 2005). In addition, GST reduces lipid hydroperoxides generated during UVR oxidative stress (Collinson and Grant, 2003; Hurst et al., 1998) that lead to membrane destruction (Cho et al., 2000). On the other hand, important enzymes may be negatively affected by UVR, i.e. extracellular APA was observed to diminish under UVR exposure in algae (Li et al., 2013; Tank et al., 2005). It would be expected that membrane-anchored AP has a refuge from UVR inside the animal body, but non photoprotected animals, like *Daphnia commutata*, may not exert enough protection to AP from hazardous short wavelength. Cladocerans cannot take advantage from photoprotective compounds such as microsporin-like aminoacids (Siebeck et al., 1994) thus other mechanisms such as photorepair become very important for animal success in transparent UVR environments. On the other hand, if the main effect of UVR on APA is through the generation of ROS, then photoprotective compounds would have a minor effect.

To deal with hazardous effects of UVR on DNA, organisms exhibit two alternative mechanisms: Photo-Enzymatic Repair (PER) and Nucleotide Excision Repair (NER) (Essen and Klar, 2006). The main difference between both mechanisms is that PER does not demand energy from the animal while NER does, requiring ATP. PER acts under light between 380 and 400 nm (Black light), activating the enzyme photolyase that reverses DNA photoproducts (Mitchell and Karentz, 1993; Sutherland, 1981). NER acts under dark conditions and is a multi-enzymatic reaction depending on ATP supply that also reverses UV-induced DNA damage (Sancar, 1996). Because of the differences in P demand between both mechanisms it could be expected differences in APA.

Andean lakes are ultra-oligotrophic, highly transparent and with very low nutrient concentrations, in particular P (Markert et al., 1997; Modenutti et al., 2000; Morris et al., 1995). Moreover, Northern Patagonian Andean lakes exhibit high UVR penetration due to their low dissolved organic matter content (Modenutti et al., 2013; Morris et al., 1995); lack of aerial pollutants (Mladenov et al., 2011) and proximity to the ozone layer depletion area (Villafañe et al., 2001). Furthermore, this area is also likely to be affected by increasing temperature in the next century (Barros et al., 2015). In this area, P-demanding organisms, like *Daphnia* are distributed according to the C:P ratio of their phytoplanktonic food (Balseiro et al., 2007) and their enzymatic responses to UVR stress are constrained by nutrient availability (Balseiro et al., 2008).

Temperature, UVR exposure and food quality are important stressors affecting *Daphnia* success, however the combined effect of these environmental factors would interact leading to the possibility of synergic or antagonistic responses in APA. In this sense here we aimed to analyze how *D. commutata* respond to different stressor combinations using APA as a proxy of their P requirement and GST as an oxidative stress biomarker. For this purpose we carried out an experimental laboratory design in which *D. commutata* was grown under different controlled conditions of food quality (C:P ratio), temperature and UV light simulating Andean lakes. Based on Balseiro et al. (2008) and Persson et al. (2011) we hypothesize that *Daphnia* growing under high C:P ratios and high temperature will be more affected by UVR, where APA should increase under these conditions and GST decrease. But at the same time, APA may not respond linearly to P requirements.

2. Methods

We used a clonal zooplankton population of *D. commutata*, started from a single female isolated from lake Mascardi (Nahuel Huapi National Park, Patagonia, Argentina). The clone was maintained under laboratory conditions, at 15 °C at least 5 years prior the experiment, and fed with *Chlamydomonas reinhardtii* culture.

2.1. Experimental design

We conducted a UVR exposure experiment (UVR + PAR, 290–700 nm hereon UVR vs. photosynthetically active radiation + black light, hereon PAR, 380–700 nm exposure) under two different temperature treatments (10 °C and 20 °C) and in three different food qualities: high, with low C:P ratio = 550; medium, with C:P ratio = 850 and low, with high C:P ratio = 1150. Previous to starting the experiment, we acclimated *D. commutata* for 6 days under the two temperatures and the three food qualities. We used six days of acclimation based on previous studies (Hessen et al., 2002). 20 *D. commutata* neonates (<24 h old) were arrayed in 250 mL experimental quartz flasks filled with 250 mL of P-free COMBO medium (Kilham et al., 1998) and *C. reinhardtii* as food (0.5 mg L⁻¹ of C), with the corresponding food quality (high, medium and low, see above). COMBO medium and food were replaced every 48 h. Concentrations of total particulate P and C of food were also monitored every 48 h with standard analyses before adding new food to flasks (see below “Biochemical determinations”). The acclimation comprised a total of 36 flasks (3 replicates for each treatment) and was conducted in a walk-in culture chamber for both temperatures and under PAR (400–700 nm wave band and intensity of 92 μmol m⁻² s⁻¹) with 14:10 (light:darkness) photoperiod. All glassware was carefully cleaned and sterilized. During the whole experiment no *Daphnia* mortality was observed.

After the 6 days of acclimation, half of the quartz flasks (randomly selected) were exposed to UVR while the other half to PAR protected with a new sheet of cut-off filters to remove wavelengths shorter than 400 nm (Courtgard™, CPFilms (Doyle et al., 2005)) during 4 h. After the 4 h of UVR exposure, we disposed the flasks to 6 h of photorecovery radiation (PER, 380–700 nm) and afterward 6 h under dark conditions (NER).

Temperatures and the levels of food quality used in our experiments are based on Balseiro et al. (2007) and Laspoumaderes et al. (2013) in particular in the epilimnion of Lake Mascardi where *Daphnia commutata* lives. Andean deep lakes are cold environments in which is very infrequent that temperatures exceed 16 °C in the warmest seasons. For that reason, we consider that an increase in the epilimnion to 20 °C is sufficiently higher and it is in accordance with global change predictions (IPCC, 2014).

2.2. Light features

Light source was provided by two UVA340 fluorescent lamps (Q-Panel Lab Products), two daylight fluorescent lamps (Philips TLT 40 W) and two black-light fluorescent lamps (UVA340 lamp from Q-Panel Lab Products, with maximum emission at 380 nm) The UV spectrum of the UVA340 light closely resembles the solar spectrum between 280 nm and 350 nm (Shick et al., 1999). The black light was included to fill the gap between maximum emission of UVA (340 nm) and the daylight fluorescent lamps (400 nm) (Fig. 1). During the incubation, animals received 35 μW cm⁻² nm⁻¹ of 340 nm wave band, an irradiance level of the wave band that is equivalent to surface sunlight in Andean lakes during summer (Modenutti et al., 2005). The total 340-nm wave-band dose was of 5040 J m² s⁻¹.

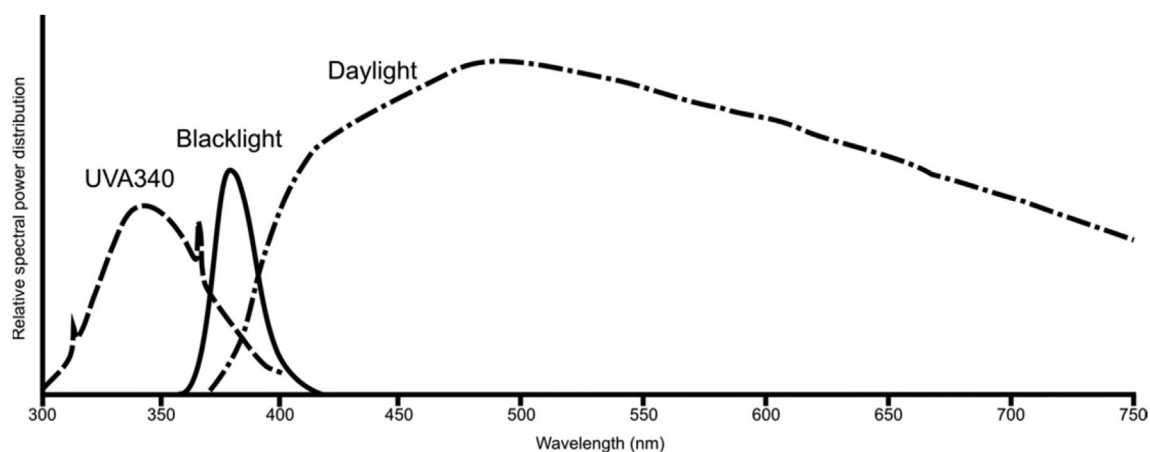


Fig. 1. Relative spectral power distribution of the experimental light panels according to their wavelength emission in nanometers and manufacture's specifications. The first curve (from 300 to 400 nm) represents UVR relative doses, the second curve (from 350 to 410 nm) represents black light relative doses and the third curve (from 400 to 750 nm) represents daylight (PAR) relative doses.

2.3. Algal culture

Food for *Daphnia* experiments was obtained from *Chlamydomonas reinhardtii* algal cultures. To obtain different C:P ratios we used low-P MBL culture medium (Guillard and Lorenzen, 1972) (10 folds less than the original P concentration). Low food quality (C:P ratio = 1150) was obtained directly from the low-P MBL medium. The other two food qualities (C:P medium and high) were obtained following Persson et al. (2011) with a P spike, adding two different amounts of K_2HPO_4 to the algal batches of P-depleted algae allowing the algae to assimilate the P during 1 h in the dark.

After this procedure (no P spike or P spike), algal cultures were centrifuged at 13,000 x g, and the supernatant was discharged. Then the pellet was re-suspend with P free COMBO and used to feed *Daphnia* and also for particulate C and P analyses. Based on C concentration we added sufficient algal culture to reach a concentration of 0.5 mg C L^{-1} of *C. reinhardtii* (similar concentration to that of Lake Mascardi) to each 250 mL experimental flasks containing *D. commutata* in P-free COMBO.

2.4. Treatments sampling

After the 4 h of UVR and PAR exposure we sampled 8 individuals from each replicate of the different treatments. All sampled individuals were immediately frozen at -80°C for further APA and GST determinations. Before biochemical determinations each individual was rinsed with Milli-Q water and measured by taking lateral images and then processing the image via Image-Pro Plus, (Media Cybernetics) software, following Acharya et al. (2004) and Balseiro et al. (2007). These measurements were converted to dry weight (dry wt) based on the length–weight regression obtained from Balseiro et al. (2008) and finally determined growth of individuals exposed to different food qualities and temperature. After each period of UVR recovery we sampled four animals from each replicate to determine APA.

2.5. Oxidative stress on APA

We conducted an experiment in which *D. commutata* was exposed to hydrogen peroxide (H_2O_2) for 4 h in order to determine the effect of oxidative stress on GST and APA. A direct effect would result from the damage on APA by the short wavelengths of UVR itself (Li et al., 2013; Tank et al., 2005), while the indirect one from

the damage on APA caused by UVR generated ROS. To disentangle these two possible effects, we analyzed APA in organisms exposed to H_2O_2 in a concentration of $\sim 1000 \text{ nM}$, based on Rusak et al. (2006) and Meinertz et al. (2008). This concentration was equivalent to the UVR doses of our previous experiment (see *Light features*) (Rusak et al., 2006) and was considered not lethal for *Daphnia* (Meinertz et al., 2008). The concentration of H_2O_2 at the beginning of the experiment was 975 nM and after 2 h 650 nM (in 4 h most of the H_2O_2 was reduced). Because of the decay of H_2O_2 , we only showed the results for 2 h of exposition. The experiment was run in two different food qualities (medium: C:P ratio = 850 and low: C:P ratio = 1150) and in two treatments with and without H_2O_2 . Previous to starting the experiment, we acclimated *D. commutata* under the two food qualities during 6 days. The experiment was run in darkness at 20°C . 10 *D. commutata* neonates (<24 h old) were arrayed in 50 mL experimental flasks in the same condition as the UVR exposure experiment. After the 2 h of experimentation (with and without H_2O_2) we collected the *Daphnia* with the same procedure as the UVR experiment.

2.6. Biochemical determinations

Carbon from *C. reinhardtii* was analyzed with a CHN elemental analyzer (Thermo Finnigan EA1112, Thermo Fisher, Milan, Italy). Total phosphorus from *C. reinhardtii* was analyzed with persulfate digestion followed by molybdate reaction (APHA, 2005). All determinations were carried out in at least three replicates.

APA was determined following Wagner and Frost (2012) with 1 specimen per measure. Each *D. commutata* was homogenized with an Ultrasonic Homogenizer (Sartorius, LABSONIC M, with 0.6 Cycles, 80% of amplitude and 2 mm \varnothing point) in 120 μL buffer solution (Tris pH = 8) and centrifuged at 13,000 x g for 10 min at 4°C to obtain the supernatant source of enzyme. APA was determined fluorometrically (Perkin–Elmer LS45) with the excitation 360 nm/10 nm and emission 420 nm/10 nm and for each sample 100 μL of 4-Methylumbelliferyl Phosphate (MUP) $0.05 \mu\text{M}$ as substrate. APA was expressed in μmol of Methylumbelliferone (MU) per minute per mg of animal dry wt.

GST activities were determined according to Habig et al. (1974) in 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer (pH 6.5), with 0.1 mg mL^{-1} 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in acetonitrile (1% v/v) and 0.75 mg mL^{-1} L-glutathione reduced as substrates recording the absorbance at 340 nm, using a Shimadzu 2450 spectrophotometer

at 23 ± 0.5 °C. GST activity was expressed in μ moles of product developed per minute per mg of animal dry wt.

2.7. Statistical analyses

Differences in APA and GST activity from *D. commutata* exposed to UVR and PAR in the different temperatures and food treatments were tested with a three way ANOVA (factor A: temperature, factor B: food quality, factor C: light). To analyze the subsequent recovery phases, we performed a two-way ANOVA test (factor A: temperature, factor B: food quality) for each recovery phase (PER and NER). When significant, after the ANOVA we run *a posteriori* multiple comparison Tukey's HSD test procedure ($= 0.05$). In order to evaluate the effect of the oxidative stress experiment (with and without H₂O₂ exposure) we run a two-way ANOVA test.

Somatic growth was analyzed also by a two way ANOVA test (factor A: temperature, factor B: food quality) followed by a Holm-Sidak method, *a posteriori* multiple comparison procedure ($= 0.05$). All statistical analyses were performed in Sigma Plot 12.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). All data were checked for normality and homocedasticity. Somatic growth was log-transformed in order to fit a normal distribution.

3. Results

3.1. Somatic growth

Somatic growth was affected by the interaction of temperature and food quality (ANOVA; $F_{2, 192} = 6.027$ $p = 0.003$; Fig. 2). *Daphnia* dry mass was higher at 20 °C (Holm-sidak method: $p < 0.001$) than at 10 °C for all food quality levels. At 20 °C we observed significant differences between food quality levels, low food quality had significantly lower biomass than medium and high ones (Holm-Sidak method: $p < 0.001$). In contrast, at 10 °C biomasses were similar for all levels of food quality (no significant differences were observed) (Fig. 2).

3.2. UVR experiment

During the 4 h of UVR exposure we observed a significant decrease in APA relative to APA in PAR treatment (control). In

addition, temperature also affected APA response being higher at 20 °C (three-way ANOVA, $F_{1, 62} = 26.806$ $p < 0.001$; Fig. 3). However, food quality though significant (three-way ANOVA, $F_{2, 62} = 7.064$ $p = 0.002$; Fig. 3) did not respond monotonically to temperature. At low temperature (10 °C) APA decreased as food quality increased, at 20 °C the highest response in APA was observed in medium food quality (*a posteriori* Tukey test $p < 0.001$), while low food quality showed the lowest response (*a posteriori* Tukey test $p < 0.001$; Fig. 3b).

GST activity exhibited significant differences between light treatments only at 20 °C (two-way ANOVA $F_{1, 36} = 6.507$ $p = 0.015$; Fig. 4) being higher under UVR in food quality treatments. In addition, at 20 °C we observed a trend of higher GST activity under higher food quality, with significant differences between low quality and medium and high food qualities (Fig. 4b). Interestingly, temperature resulted with significant differences in UVR exposure but not under PAR.

3.3. UVR recovery

After the first period of UVR recovery, APA did not change from the values obtained after UVR exposure (Fig. 5). In contrast, after the second period of UVR recovery we observed that the overall response of APA at 20 °C resulted higher than at 10 °C (two-way ANOVA $F_{1, 21} = 60.950$ $p < 0.001$; Fig. 5c and d). At 20 °C the treatment of medium food quality showed the highest response, and low food quality the lowest one (Fig. 5d), although the humped fit curve resulted not significant the interaction food quality X temperature was significant (two-way ANOVA $F_{2, 21} = 12.453$ $p < 0.001$).

3.4. Oxidative stress on APA

During the 2 h of exposure at 20 °C we observed that the activity of the biomarker GST increased in the two food treatments in the presence of H₂O₂ (two-way ANOVA $F_{1, 17} = 47.026$ $p < 0.001$; Fig. 6a), whereas APA was observed to decrease (two-way ANOVA $F_{1, 22} = 46.757$ $p < 0.001$; Fig. 6b). However, the response in APA resulted higher in the medium food quality treatment (C:P 850) (two-way ANOVA $F_{1, 22} = 60.068$ $p < 0.001$; Fig. 6b).

4. Discussion

In aquatic ecosystems, UVR is recognized as an important biological stressor that causes cell damage of important molecules (DNA, proteins, and lipids), apoptosis and oxidative stress (Martindale and Holbrook, 2002; Souza et al., 2012), altering reduced glutathione levels and increasing the activity of enzymes as Catalase, Glutathione Reductase and GST among others (Barata et al., 2005; Borgeraas and Hessen, 2000). The increase in these antioxidant defenses imply high energy demands and requires higher food quality for an adequate response (Balseiro et al., 2008; Souza et al., 2010). In addition, ROS production increases at higher temperatures (Lesser, 1996). Accordingly, our results showed that higher GST activity was observed at 20 °C and at high food quality (Fig. 4). In contrast, under low food quality (C:P 1150) GST exhibited comparatively lower values suggesting that *Daphnia* was highly P-limited. The same trend was observed in our experiment where *Daphnia* was exposed to H₂O₂ (Fig. 6) confirming that GST responded with low activity to oxidative stress under low food quality. Oxidative stress may affect other parameters as malondialdehyde or reduced glutathione levels however our study was limited to GST activity.

APA was observed to respond negatively under both H₂O₂ (Fig. 6) and UVR exposure (Fig. 3). Although, absolute values of APA

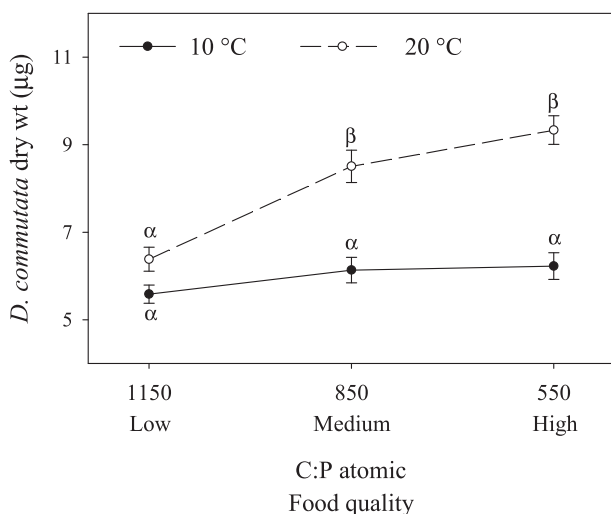


Fig. 2. Somatic growth. *D. commutata* somatic growth under the three food qualities (Low: C:P 1150, Medium: C:P 850, High: C:P 550) and two temperatures (10 °C and 20 °C). Error bars represent one standard error.

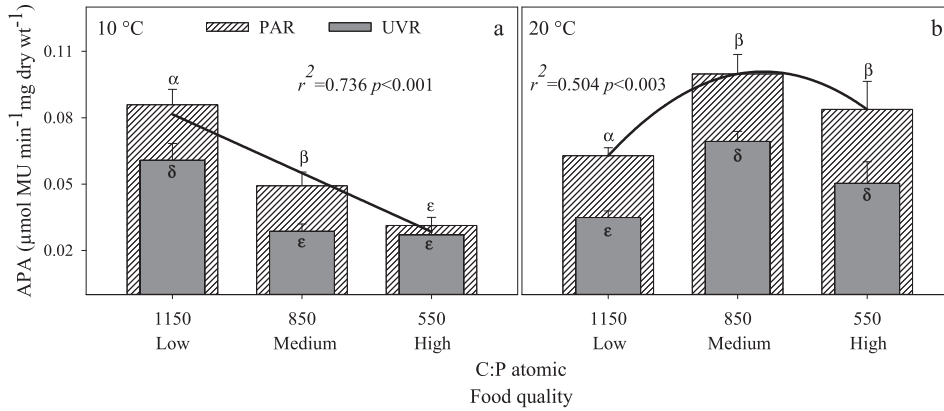


Fig. 3. APA under UVR exposure. D. commutata APA response to UVR exposure vs. PAR exposure in the three food qualities (Low: C:P 1150, Medium: C:P 850, High: C:P 550), under both temperatures at 10 °C (a) and 20 °C (b). Error bars represent one standard error.

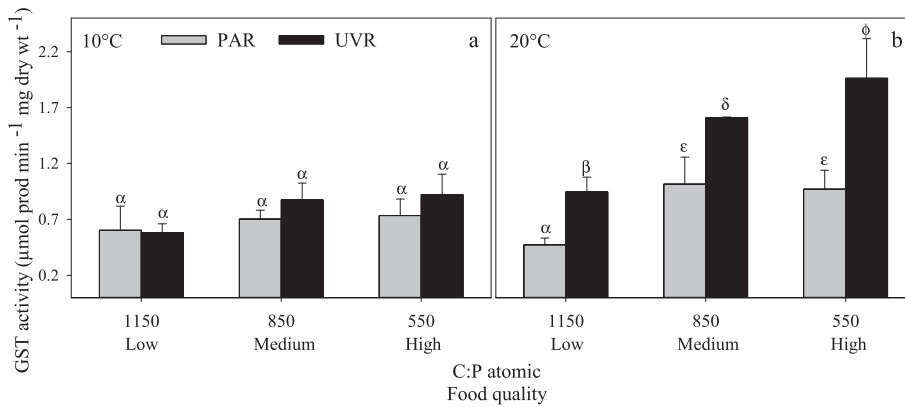


Fig. 4. GST activity under UVR exposure. GST activity from *D. commutata* in each food quality (Low: C:P 1150, Medium: C:P 850, High: C:P 550), after UVR and PAR exposures, under both temperatures at 10 °C (a) and 20 °C (b). Error bars represent one standard error.

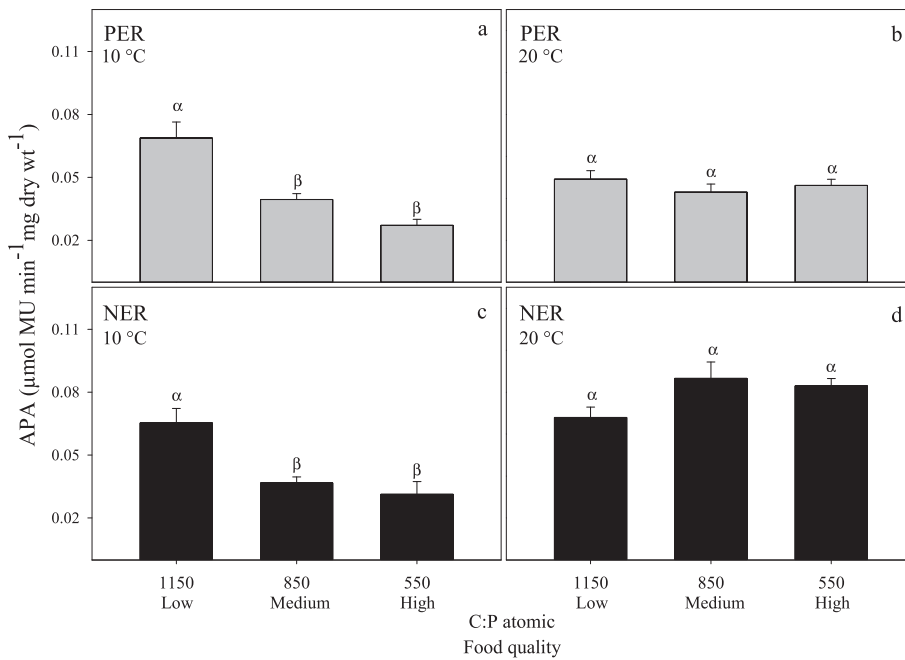


Fig. 5. APA under recovery phases. Response of *D. commutata* APA after recovery phases (PER and NER) in the three food qualities (Low: C:P 1150, Medium: C:P 850, High: C:P 550). PER phase at 10 °C (a) and 20 °C (b) and NER at 10 °C (c) and 20 °C (d). Error bars represent one standard error.

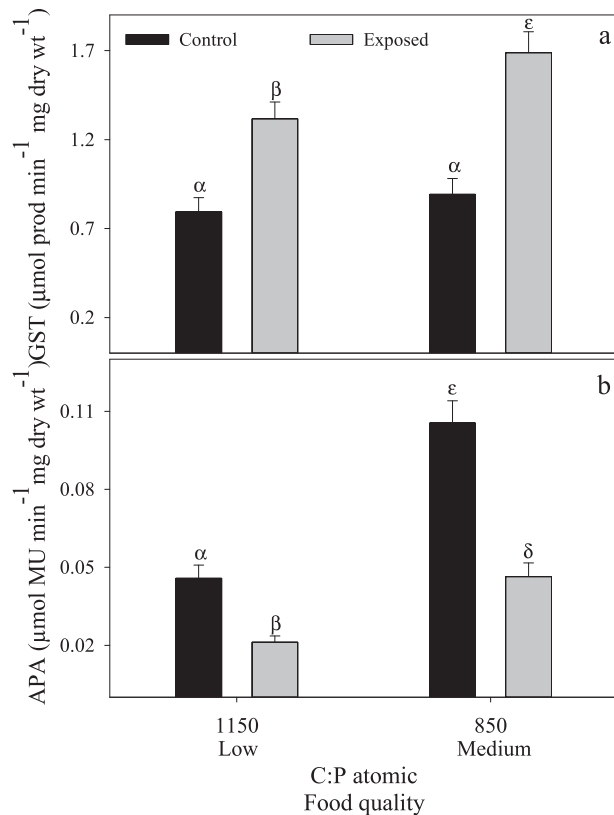


Fig. 6. GST and APA under H₂O₂ exposure. (a) GST activity after 2 h of H₂O₂ exposure vs. control without H₂O₂ in *D. commutata* under low and medium food quality, at 20 °C. (b) APA after 2 h of H₂O₂ exposure vs. control without H₂O₂ in *D. commutata* under low and medium food quality, at 20 °C. Error bars represent one standard error.

were quite different under UVR and H₂O₂, the response to food quality in both experiments at 20 °C resulted similar. We observed that the response of *D. commutata*'s APA depended on the C:P ratio of the food with a significant increase in the 20 °C treatment compared to the 10 °C (Fig. 4). High temperature increases nutrient (P) limitation because it would imply higher nutrient requirements to maintain metabolism and growth (Persson et al., 2011) and to provide more energy for increased locomotion, respiration and life history processes (Wojtal-Frankiewicz, 2012). On the other hand, at 10 °C we observed that APA increased under low food quality, confirming that APA responds monotonically to food quality since APA decreases as food quality increases. Under low temperatures, low nutrient requirements were observed for somatic growth (Rhee and Gotham, 1981) and no changes in UVR susceptibility (Borgeraas and Hessen, 2000). Therefore, the response of APA under low food quality (C:P 1150) seemed to be sufficient for the P requirements at 10 °C with a negative relationship between APA and P concentration, as expected. However, at 20 °C APA showed a different trend with lower values at low food quality than at medium or high food qualities. In addition, we observed the same trend in our experiment of H₂O₂ exposure that was run at 20 °C (Fig. 6). In a study with *Daphnia magna*, Wojewodziec et al. (2011) indicated that APA was higher at lower temperatures, however in our study APA resulted higher at the higher temperature. Persson et al. (2011) showed that P limitation increases with temperature so, it is likely to assume that individuals at higher temperature are more P limited and would exhibit higher APA, as it was observed in this study.

Poor algal food (low P content) reduces the dietary mineral P

available for *Daphnia*, thus, somatic APA can be used as a proxy of P-stress (McCarthy et al., 2010). P-nutrition also regulates the amount of AP that is released into the water and McCarthy et al. (2010) showed that reduced AP loss would be advantageous for P-limited *Daphnia*. So under P-starvation the extracellular APA is reduced and the concentration of membrane-anchored AP is higher than in well fed animals (McCarthy et al., 2010). In our experiments higher somatic APA was observed under low food quality at 10 °C, but not at 20 °C. Persson et al. (2011) showed that P limitation increases with temperature, so it could be assumed that under these conditions animals were so P-depleted that they probably couldn't even synthesize AP. In this sense, it can be suggested that under severe P limitation (low food quality and high temperature) there is a trade-off between the production of AP and other constitutive proteins, so APA did not show the expected increasing trend with decreasing food quality (Wojewodziec et al., 2011).

During the first and second phases of DNA photoproducts repair (not measured), we observed different trends in APA. The first phase (PER, 380–700 nm) was characterized by no changes in APA. During this phase the enzyme photolyase uses light photons as energy source, thereby does not require extra energy (ATP) to repair UVR damage (Essen and Klar, 2006; Park and Rho, 2002). In the following phase (darkness), we observed changes in APA indicating changes in P demands. Previous studies observed that ATP was required for DNA repair (Park and Rho, 2002), so P requirements should increase. Probably this increased P demands for repair (DNA damage was not measured in the present study) would imply higher APA. Interestingly, again at 20 °C, APA showed a similar trend to that observed after the UVR exposure, with the maximum in the medium food quality. Similarly, we can assume that at this high temperature, under low food quality the organisms were so P-limited that even the AP synthesis was affected. The fact that in the three exposures (UVR, H₂O₂ and NER) at 20 °C showed the same trend in APA reinforces that APA doesn't increase monotonically with decreasing food quality.

5. Conclusions

Our experiments highlight the relationship between variables as UVR and temperature with the nutritional status of *Daphnia* simulating predicted changes in Andean lakes. We demonstrated that somatic APA is affected by oxidative stress (both by H₂O₂ and UVR exposure). However, the response of APA to UVR is observed to be also affected by temperature and food quality. In this context we determined that at higher temperatures, UVR has a more detrimental effect on APA (Macfadyen et al., 2004) probably due to higher metabolic rates and more reactivity to UVR. At 20 °C and under low food quality (C:P = 1150) *D. commutata* was so P-depleted that they probably couldn't even synthesize AP because of the increase of P limitation due to higher temperature. *D. commutata* growing under high C:P ratios and high temperature will be more affected by UVR, therefore low food quality and transparent environments such as oligotrophic lakes are a real challenge for *Daphnia* fitness. In a global change context temperature, UVR and nutrients are variables that will interact differentially, thus, in *Daphnia* population response models to global change it is important to take into account all these interactive variables.

Acknowledgments

We thank Dr. Cecilia Laspomadere for her comments and two anonymous reviewers that greatly improved this manuscript This work was supported by Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica PICT 2012-0929, PICT 2014-1002, PICT 2012-1168,

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) and UNC B193.

References

- Acharya, K., Kyle, M., Elser, J.J., 2004. Biological stoichiometry of *Daphnia* growth: an ecophysiological test of the growth rate hypothesis. *Limnol. Oceanogr.* 49, 656–665.
- APHA, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, AWWA, Washington, D.C.
- Balseiro, E.G., Modenutti, B.E., Queimaliños, C., Reissig, M., 2007. *Daphnia* distribution in Andean Patagonian lakes: effect of low food quality and fish predation. *Aquat. Ecol.* 41, 599–609.
- Balseiro, E.G., Souza, M.S., Modenutti, B.E., Reissig, M., 2008. Living in transparent lakes: low food P:C ratio decreases antioxidant response to ultraviolet radiation in *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* 53, 2383–2390.
- Barata, C., Varo, I., Navarro, J.C., Arun, S., Porte, C., 2005. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 140, 175–186.
- Barros, V.R., Boninsegna, J.A., Camilloni, I.A., Chidiak, M., Magrín, G.O., Rusticucci, M., 2015. Climate change in Argentina: trends, projections, impacts and adaptation. *Wiley Interdiscip. Rev. Clim. Change* 6, 151–169.
- Borgeraas, J., 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.
- Carpenter, S.R., Cole, J.J., Hodgson, J.R., Kitchell, J.E., Pace, M.L., Bade, D., Cottingham, K.L., Essington, T.E., Houser, J.N., Schindler, D.E., 2001. Trophic cascades, nutrients, and lake productivity: whole-lake experiments. *Ecol. Monogr.* 71, 163–186.
- Cho, G., Na, S., Suh, S.W., Jung, G., 2000. Expression of recombinant HBV Pol Proteins in HepG2 cells. *J. Biochem. Mol. Biol.* 33, 440–447.
- Collinson, E.J., Grant, C.M., 2003. Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 278, 22492–22497.
- Dobberfuhl, D.R., Elser, J.J., 2000. Elemental stoichiometry of lower food web components in arctic and temperate lakes. *J. Plankton Res.* 22, 1341–1354.
- Doyle, S.A., Saros, J.E., Williamson, C.E., 2005. Interactive effects of temperature and nutrient limitation on the response of alpine phytoplankton growth to ultraviolet radiation. *Limnol. Oceanogr.* 50, 1362–1367.
- Elser, J.J., Peace, A.L., Kyle, M., Wojewodzic, M., McCrackin, M.L., Andersen, T., Hessen, D.O., 2010. Atmospheric nitrogen deposition is associated with elevated phosphorus limitation of lake zooplankton. *Ecol. Lett.* 13, 1256–1261.
- Elser, J.J., Sterner, R.W., Gorokhova, E., Fagan, W.F., Markow, T.A., Cotner, J.B., Harrison, J.F., Hobbie, S.E., Odell, G.M., Weider, L.J., 2000. Biological stoichiometry from genes to ecosystems. *Ecol. Lett.* 3, 540–550.
- Essen, L.O., Klar, T., 2006. Light-driven DNA repair by photolyases. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1266–1277.
- Guillard, R.R.L., Lorenzen, C.J., 1972. Yellow-green algae with chlorophyllide c. *J. Phycol.* 8, 10–14.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Häder, D.P., Helbling, E.W., Williamson, C.E., Worrest, R.C., 2007. Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem. Photobiol. Sci.* 10, 242–260.
- Häder, D.P., Williamson, C.E., Wängberg, S.A., Rautio, M., Rose, K.C., Gao, K., Helbling, E.W., Sinha, R.P., Worrest, R., 2015. Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with other environmental factors. *Photochem. Photobiol. Sci.* 14, 108–126.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51–88.
- Hessen, D.O., 1993. DNA-damage and pigmentation in Alpine and Arctic zooplankton as bioindicators of UV-radiation. *Verhandlungen Int. Ver. Limnol.* 25, 482–486.
- Hessen, D.O., Faerovig, P.J., Andersen, T., 2002. Light, nutrients, and P:C ratios in algae: Grazer performance related to food quality and quantity. *Ecology* 83, 1886–1898.
- Hurst, R., Bao, Y., Jemth, P., Mannervik, B., Williamson, G., 1998. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases. *Biochem. J.* 332, 97.
- IPCC, 2014. Climate change 2014: Impacts, adaptation, and vulnerability. Part A: global and sectoral aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on climate change. In: Field, C.B., Barros, V.R., Dokken, D.J., Mach, K.J., Mastrandrea, M.D., Bilir, T.E., Chatterjee, M., Ebi, K.L., Estrada, Y.O., Genova, R.C., Girma, B., Kissel, E.S., Levy, A.N., MacCracken, S., Mastrandrea, P.R., White, L.L. (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Kilham, S.S., Kreeger, D.A., Lynn, S.G., Goulden, C.E., Herrera, L., 1998. COMBO – a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia* 377, 147–159.
- Laspoumaderes, C., Modenutti, B.E., Souza, M.S., Bastidas Navarro, M., Cuassolo, F., Balseiro, E.G., 2013. Glacier melting and stoichiometric implications for lake community structure: zooplankton species distributions across a natural light gradient. *Glob. Change Biol.* 19, 316–326.
- Lesser, M.P., 1996. Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnol. Oceanogr.* 41, 271–283.
- Li, P., Liu, W., Gao, K., 2013. Effects of temperature, pH, and UV radiation on alkaline phosphatase activity in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*. *J. Appl. Phycol.* 25, 1031–1038.
- Macfadyen, E.J., Williamson, C.E., Grad, G., Lowery, M., Jeffrey, W.H., Mitchell, D.L., 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, 408–416.
- Markert, B., Pedrozo, F., Geller, W., Friese, K., Korhammer, S., Baffico, G., Diaz, M., Wolf, S., 1997. A contribution to the study of the heavy-metal and nutritional element status of some lakes in the southern Andes of Patagonia (Argentina). *Sci. Total Environ.* 206, 1–15.
- Martindale, J.L., Holbrook, N.J., 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* 192, 1–15.
- McCarthy, S.D.S., Rafferty, S.R., Frost, P.C., 2010. Responses of alkaline phosphatase activity to phosphorus stress in *Daphnia magna*. *J. Exp. Biol.* 213, 256–261.
- McQueen, D.J., Johannes, M.R., Post, J.R., 1989. Bottom-up and top-down impacts on freshwater pelagic community structure. *Ecol. Monogr.* 59, 289–309.
- Meinert, J.R., Greseth, S.L., Gaikowski, M.P., Schmidt, L.J., 2008. Chronic toxicity of hydrogen peroxide to *Daphnia magna* in a continuous exposure, flow-through test system. *Sci. Total Environ.* 392, 225–232.
- Mitchell, D.L., Karentz, D., 1993. The induction and repair of DNA photodamage in the environment. In: Young, A.R., Bjorn, L.O., Moan, J., Nultsch, W. (Eds.), *Environmental UV Photobiology*. Plenum Press, New York, pp. 345–377.
- Mladenov, N., Sommaruga, R., Morales-Baquero, R., Laurion, I., Camarero, L., Diéguez, M., Camacho, A., Delgado, A., Torres, O., Chen, Z., 2011. Dust inputs and bacteria influence dissolved organic matter in clear alpine lakes. *Nat. Commun.* 2, 405.
- Modenutti, B.E., Balseiro, E.G., Bastidas Navarro, M., Laspoumaderes, C., Souza, M.S., Cuassolo, F., 2013. Environmental changes affecting light climate in oligotrophic mountain lakes: the deep chlorophyll maxima as a sensitive variable. *Aquat. Sci.* 75, 361–371.
- Modenutti, B.E., Balseiro, E.G., Callieri, C., Bertoni, R., Queimaliños, C.P., 2005. Effect of UV-B and different PAR intensities on the primary production of the mixotrophic planktonic ciliate *Stentor araucanus*. *Limnol. Oceanogr.* 50, 864–871.
- Modenutti, B.E., Perez, G.L., Balseiro, E.G., Queimaliños, C.P., 2000. Relationship between light availability, chlorophyll a and total suspended solid in a glacial lake of South Andes. *Verhandlungen Int. Ver. Limnol.* 27, 2648–2651.
- Morris, D.P., Zagarese, H., Williamson, C.E., Balseiro, E.G., Hargreaves, B.R., Modenutti, B.E., Moeller, R., Queimaliños, C., 1995. The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnol. Oceanogr.* 40, 1381–1391.
- Park, E., Rho, H., 2002. The transcriptional activation of the human copper/zinc superoxide dismutase gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through two different regulator sites, the antioxidant responsive element and xenobiotic response element. *Mol. Cell. Biochem.* 24, 47.
- Persson, J., Wojewodzic, M.W., Hessen, D.O., Andersen, T., 2011. Increased risk of phosphorus limitation at higher temperatures for *Daphnia magna*. *Oecologia* 165, 123–129.
- Rhee, G.Y., Gotham, I.J., 1981. The effect of environmental factors on phytoplankton growth: temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.* 26, 635–648.
- Rusak, S., Richard, L., Peake, B., Cooper, W., 2006. Trends in hydrogen peroxide levels in relation to solar radiation in the water of Leith. In: 2006 UV Workshop. www.niwa.co.nz. https://www.niwa.co.nz/sites/niwa.co.nz/files/import/attachments/Rusak_1.pdf.
- Sancar, A., 1996. DNA Excision Repair, Annual Review of Biochemistry, pp. 43–81.
- Shick, J.M., Romaine-Lioud, S., Ferrier-Pagés, C., 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., Vail, T., Williamson, C.E., Vetter, R., Hessen, D., Zagarese, H.E., Little, E., Balseiro, E.G., Modenutti, B.E., Seva, J., Shumate, A., 1994. Impact of UV-B radiation on zooplankton and fish in pelagic freshwater ecosystems. *Arch. für Hydrobiol. Beihefte Ergeb. Limnol.* 43, 101–104.
- Souza, M.S., Hansson, L.-A., Hylander, S., Modenutti, B.E., Balseiro, E.G., 2012. Rapid enzymatic response to compensate UV radiation in copepods. *PLoS One* 7, e32046.
- Souza, M.S., Modenutti, B.E., Carrillo, P., Villar-Argaiz, M., Medina-Sánchez, J.M., Bullejos, F., Balseiro, E.G., 2010. Stoichiometric dietary constraints influence the response of copepods to ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Limnol. Oceanogr.* 55, 1024–1032.
- Sterner, R.W., Elser, J.J., 2002. Ecological Stoichiometry. The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere. Princeton University Press, Princeton, NJ USA.
- Sterner, R.W., Elser, J.J., Fee, E.J., Guildford, S.J., Chrzanowski, T.H., 1997. The light:nutrient ratio in lakes: the balance of energy and materials affects ecosystem structure and process. *Am. Nat.* 150, 663–684.
- Sterner, R.W., Hagemeyer, D.D., Smith, W.L., 1993. Phytoplankton nutrient limitation and food quality for *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* 38, 857–871.
- Sutherland, B.M., 1981. Photoreactivating enzymes. *Enzymes* 24, 481–515.
- Tank, S., Xenopoulos, M., Hendzel, L., 2005. Effect of ultraviolet radiation on alkaline phosphatase activity and planktonic phosphorus acquisition in Canadian boreal shield lakes. *Limnol. Oceanogr.* 50, 1345–1351.

- Villafañe, V., Helbling, E.W., Zagarese, H.E., 2001. Solar ultraviolet radiation and its impact on aquatic systems of Patagonia, South America. *Ambio* 30, 112–117.
- Wagner, N.D., Frost, P.C., 2012. Responses of alkaline phosphatase activity in *Daphnia* to poor nutrition. *Oecologia* 170, 1–10.
- Wojewodzic, M.W., Kyle, M., Elser, J.J., Hessen, D.O., Andersen, T., 2011. Joint effect of phosphorus limitation and temperature on alkaline phosphatase activity and somatic growth in *Daphnia magna*. *Oecologia* 165, 837–846.
- Wojtal-Frankiewicz, A., 2012. The effects of global warming on *Daphnia* spp. population dynamics: a review. *Aquat. Ecol.* 46, 37–53.
- Zepp, R.G., Callaghan, T.V., Erickson Iii, D.J., 2003. Interactive effects of ozone depletion and climate change on biogeochemical cycles. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2, 51–61.