



Facultat de Ciències Biològiques  
Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva

# Análisis demográfico de bancos de huevos diapáusicos de rotíferos

Eduardo Moisés García Roger

2006



Tesis presentada por EDUARDO MOISÉS GARCÍA ROGER para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la *Universitat de València*.

Fdo.: Eduardo Moisés García Roger

Tesis dirigida por los Doctores en Ciencias Biológicas por la *Universitat de València*, MANUEL SERRA GALINDO y MARÍA JOSÉ CARMONA NAVARRO.

Fdo.: Manuel Serra Galindo  
Catedrático de Ecología,  
*Universitat de València*

Fdo.: María José Carmona Navarro  
Profesora titular de Ecología,  
*Universitat de València*

Este trabajo ha sido financiado por una Beca del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario concedida a EDUARDO MOISÉS GARCÍA ROGER (AP2000-3550) por el Ministerio de Educación y Ciencia, y por los proyectos de investigación BOS2000-1451 y BOS2003-00755 del Ministerio de Ciencia y Tecnología.



*A mis padres*



## Agradecimientos

Son muchas las personas que, de una forma u otra, me han apoyado a lo largo de estos años de tesis. En todo. En lo profesional y en lo personal. No obstante, no pretendo hacer aquí un listado de todos mis amigos (vosotros, ya sabéis quiénes sois y por qué; me lo demostráis con tanta frecuencia que nunca se me olvida que os tengo ahí). Mi intención, al menos ahora que empiezo a urdir estos renglones, es mencionar a aquellas personas que han hecho posible, de manera más o menos directa, la realización de esta tesis. En este sentido, trataré de que al menos sea cierto aquello de que 'son todos los que están'. En todo caso, pido disculpas a quien no se vea reflejado en estas líneas. Como he leído en alguna parte: no se venguen tantos olvidados.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis, Manuel Serra y María José Carmona, la confianza que depositaron en mí hace ya cinco años para que llevara a cabo todo un proyecto de tesis doctoral. Gracias Manuel, no sólo por reclutarme y ofrecerme la posibilidad, impagable hoy por hoy, de trabajar en lo que uno quiere, sino también por enseñarme, por guiarme y, al mismo tiempo, por ser mi amigo. Gracias María José por el cariño con que me has tratado desde el primer día que entré al laboratorio. Has trabajado tanto conmigo, y tan cerca, que a veces se me olvida que es un privilegio haber contado contigo como directora. De nuevo, gracias a ambos: han sido tantas cosas, y tantas veces...

Igualmente quiero expresar mi agradecimiento a mis compañeros del laboratorio de Ecología Evolutiva. Ha sido mucho tiempo y trabajo compartido, aunque a veces sienta que estos cinco años han pasado en un suspiro. Miro atrás y se me hace difícil ver sólo que compañeros de trabajo, pues siempre me he encontrado entre amigos. En primer lugar quiero mencionar a Raquel Ortells, que me enseñó a aislar e identificar los huevos diapáusicos de rotíferos con los que he trabajado, de manera que sin su ayuda difícilmente podría haber llevado a cabo esta tesis. Siempre interesándose por mis progresos, me ha ayudado y orientado en muchos de los trabajos que aquí se presentan. Casi recién llegado al laboratorio, Sara Lapesa, una de las personas más buenas que conozco, me llevó de muestreo y me enseñó todas las lagunas que después he estudiado. A Jorge Ciro le agradezco todos los consejos que en múltiples ocasiones le requerí y que tan amablemente me ofreció aun cuando se hallaba en plena fase de redacción de su propia tesis doctoral.

Con Sergi Campillo es con quien, sin lugar a dudas, más momentos he compartido en el laboratorio, y es que casi empezamos a la vez con esto. Han sido muchos experimentos en conjunto, muchos congresos y muestreos (algunos casi suicidas, ¿verdad?). Su espíritu emprendedor y buen talante han hecho que todo este camino sea más fácil. Ana Tortajada, que empezó ayudándome con mis muestras y ha acabado enrolada en un proyecto tan apasionante como es una tesis doctoral, siempre se ha mostrado dispuesta a ayudarme. De Pau, también conocido por su verdadero nombre, Javier Montero, sólo puedo decir cosas buenas. De su buen carácter y continua disponibilidad también se ha beneficiado este trabajo,

sobre todo en los momentos finales cuando sentía que todo me desbordaba. Mención aparte merece la humanidad entrañable de Eloísa Ramos. Ante todo ha sido una buena amiga. Amparo Martínez también ha colaborado en parte de esta tesis. Le agradezco el haberme echado una mano con los experimentos de tabla de vida incluso cuando ello requería venir al laboratorio a horas intempestivas. Una parte muy importante para que todos los experimentos que se hacen en el laboratorio salgan adelante se debe a Marta de Moya. Sin ella el trabajo de laboratorio nos desbordaría. Parece casi infatigable, y todo lo hace con la mejor de las sonrisas. Gracias también a los colaboradores que me han ayudado en diversas tareas a lo largo de estos años, en particular a Lucía, Miriam, Raquel Calatayud, María, Mabel y Araceli por su agradable compañía. A los antiguos miembros del laboratorio, África Gómez y Eduardo Aparici, que se marcharon prácticamente con mi llegada, sólo lamento no haberlos podido conocer mejor. Eso sí, siempre que los he necesitado he contado con su ayuda y cuando hemos coincidido me han hecho sentir como un miembro más de la 'familia'. El Dr. Terry W. Snell (*Georgia Tech*), con sus frecuentes visitas a Valencia, también se ha convertido en un miembro más de nuestro laboratorio. Sus comentarios y sugerencias sobre mi trabajo han sido muy enriquecedores.

El Dr. Gabe Benoit (*Yale University*) se prestó amablemente a realizar la datación radiométrica presentada en esta tesis. Lisa Suatoni intercedió para ello.

Al profesor Mario Sendra, del Departamento de Estadística e Investigación Operativa de la *Universitat de València*, le agradezco su paciente asistencia en el manejo del *software* estadístico R. Gracias también a Miguel Verdú (Centro de Investigaciones sobre Desertificación) por su ayuda con los modelos lineales generalizados.

Gracias a todos los miembros del Área de Ecología de la *Universitat de València* por vuestra acogida, en especial a Antonio Sanz, que me brindó la oportunidad de colaborar en su laboratorio cuando todavía estaba estudiando en la facultad, Paco Mezquita, Javier Armengol, Karmen Rojo, Toñi Rodrigo, Juan Monrós y Emilio Barba por su ayuda y buenas recomendaciones. A Lidia y Sara, tan becarias como yo pero en el edificio 'blanco' del campus de Burjassot, les deseo que consigan llevar a buen puerto sus respectivas tesis. Les agradezco su ayuda con las prácticas de ecología así como su interés por mi trabajo y la valiosísima información que, sobre certificados y papeleos varios, muchas veces me han prestado. También quiero guardar unos renglones para el resto de la gente que trabaja o ha trabajado en otros laboratorios del *Institut Cavanilles*, en especial a Rafa, Paco, Jose, Benja, Laura, ... Les agradezco a Rosa Marín y Amparo Muñoz, de la secretaría de la Facultad de Biología, que me hayan sacado de más de un apuro durante los muestreos cuando, por mi propia temeridad o por fallo mecánico del 'todoterreno', me he quedado tirado en la carretera o el barro.

A Vicent, Sara, Víctor, Rafa y Esteban les debo una bonita amistad fruto de los años de carrera. El apoyo y ánimo que siempre me han brindado me ayudó a decidirme por hacer el doctorado. También a Rosa, María, Rafa G., Rocío, Olga y

Paqui les agradezco su apoyo y el interés que siempre han mostrado por mí aunque desgraciadamente nuestros encuentros sean menos frecuentes.

Cuando todavía no han pasado mis días de confusión y de preguntarme el porqué de las cosas (creo que nunca se pasarán y ahí está la gracia de todo) cuento a mi lado con los de siempre: Jesu (mi hermano, que se merece todo lo bueno que él mismo da), Edu, Juan, y María (ya sabéis lo mucho que me ayudáis en todo). A mis amigos de Chelva: J. Tomás, Rafa, Alberto, Alós, Pepe (¡que vamos a ver a los Rolling!), Juanjo, V. Esteban, Roger, J. Antonio, Martínez, Manuel, Maikel... Gracias... por más de cien motivos. No podía tampoco olvidarme de 'mis más amigos': Raúl, Arantxa y Mar, por los días de vino y rosas pero con final feliz.

Mis amigos del barrio: Sami, Santi, Juanma, Migue, Mamen, Ester, Alicia, Javi, Jordi, Berto... que me han sufrido en los últimos momentos de redacción y edición, y que me han ayudado a que todo sea más llevadero. Ya sé que la pasión que ahora profesáis a los rotíferos no es casual.

A mis padres, que han sido calor y cielo, y yo espero algún día ser todas esas cosas.

Edu.  
Valencia, marzo de 2006.



# Análisis demográfico de bancos de huevos diapáusicos de rotíferos

*Consider a zygote that is about to begin its life and imagine all the possibilities open to it. At what age and size should it start to reproduce? How many times in its life should it attempt reproduction; once, more than once, continuously, seasonally? When it does reproduce, how much energy and time should it allocate to reproduction as opposed to growth and maintenance? Given a certain allocation, how should it divide up those resources among the offspring? Should they be few in number but high in quality and large in size, or should they be small and numerous but less likely to survive?*

Stearns (1992)



# Índice

|          |   |     |
|----------|---|-----|
| <b>1</b> | Introducción  | 1   |
| <b>2</b> | Patrones en bancos de huevos diapásicos de rotíferos: abundancia y viabilidad   | 19  |
| <b>3</b> | Un modelo simple para estudiar la relación entre características del hábitat y propiedades de los bancos de huevos diapásicos de rotíferos                        | 45  |
| <b>4</b> | Relaciones entre características del hábitat y propiedades cuantitativas de los bancos de huevos diapásicos del complejo de especies <i>Brachionus plicatilis</i> | 65  |
| <b>5</b> | Patrones de deterioro en bancos de huevos diapásicos de rotíferos del complejo <i>Brachionus plicatilis</i> : efecto sobre la viabilidad                          | 79  |
| <b>6</b> | Resistencia a la privación de alimento en rotíferos obtenidos a partir de huevos diapásicos y huevos partenogenéticos   | 111 |
| <b>7</b> | Variación intra e interpoblacional en la producción de huevos diapásicos de rotíferos   | 135 |
| <b>8</b> | Consideraciones finales, perspectivas y conclusiones  | 159 |
|          | <b>Referencias</b>  | 171 |
|          | <b>Apéndices</b>  |     |
| <b>A</b> | Revisión bibliográfica sobre bancos de huevos diapásicos de organismos zooplanctónicos  | 193 |
| <b>B</b> | Informe sobre la datación con $^{210}\text{Pb}$ y $^{137}\text{Cs}$ de cores de sedimento de varias lagunas de la Península Ibérica                               | 195 |
| <b>C</b> | Composición estable en clases de profundidad del sedimento y clases de estado de huevos diapásicos  | 201 |
|          | <b>Publicaciones</b>  | 209 |



# 1

## Introducción

### Ciclos vitales y latencia

Se dice comúnmente de los seres vivos que nacen, crecen y se reproducen, y con ello se caracteriza a éstos con el denominador común de poseer un ciclo vital. Pero esta generalización deja de lado una vasta diversidad: unos organismos viven más tiempo que otros, los hay que se reproducen una única vez en toda su vida y otros que producen descendientes varias veces a lo largo de su existencia, algunos organismos cesan en su actividad vital en algún momento de su vida, mientras otros se mantienen activos desde el nacimiento hasta su muerte. Esa diversidad ha atraído poderosamente la atención de ecólogos y evolucionistas, ya que se espera que el ciclo vital esté relacionado con las características del ambiente de los organismos – de cada especie o población – y que tenga consecuencias en la dinámica y las interacciones poblacionales. Así, solo los ciclos vitales con mayor éxito prevalecerán y ese éxito dependerá de las características ecológicas del ambiente.

Los rasgos del ciclo vital de un organismo (es decir, el número de descendientes que produce, cuánto tiempo vive, si presenta o no una fase de latencia, etc.) son características cuantitativas o, al menos, fácilmente cuantificables, que pueden ser analizadas mediante técnicas matemáticas bien desarrolladas como la demografía. Son además 'componentes de eficacia biológica' (*fitness*), en el sentido de que afectan a ésta de manera directa. Por otro lado, se espera que estos rasgos sean, al menos en parte, la

expresión fenotípica de sus genes. Todo ello permite un análisis evolutivo en el cual una noción central es la del compromiso (*trade-off*) entre rasgos del ciclo vital. El compromiso se establece porque el incremento de un rasgo que tiene efectos positivos directos sobre la eficacia biológica puede afectar a otro rasgo, y tener como consecuencia efectos negativos indirectos sobre la eficacia biológica (Robertson, 1968; Lande, 1982). Así ocurrirá, por ejemplo, cuando se inviertan recursos, que son limitados, en la reproducción, detrayéndolos de la inversión en supervivencia del adulto. Al final, en cada ambiente evolucionará un ciclo vital: aquel que en el conjunto de sus diferentes etapas permita a un individuo dejar el mayor número de descendientes. La selección natural modela las propiedades individuales, y esas propiedades repercuten en las características de las poblaciones. Así, el ciclo vital que presenten los individuos de una población afectará a la dinámica, las tasas de crecimiento, la fenología, etc., de dicha población, lo que a su vez tendrá implicaciones a otros niveles ecológicos suprapoblacionales.

Los organismos no viven en ambientes constantes y deben, por tanto, adaptarse a su variación. Con frecuencia esa variación es de tal importancia que implica periodos severamente adversos, en los cuales la supervivencia se ve muy amenazada. Una de las respuestas posibles es la huida del lugar con condiciones desfavorables. No obstante, esta estrategia de dispersión espacial o de emigración no está exenta de riesgos, sobre todo porque no todos los organismos tienen la misma capacidad de migrar y dispersarse espacialmente (Bohonak y Jenkins, 2003). Otra respuesta posible que permite a los organismos sobrevivir hasta que se restablezcan las condiciones favorables sin abandonar el hábitat es la latencia. Se trata de la entrada del organismo en un estado fisiológico de reposo o inactividad, lo que asociado a otros rasgos de defensa, conlleva la tolerancia frente a las condiciones ambientales adversas. Es, en definitiva, un mecanismo de dispersión en el tiempo (Templeton y Levin, 1979; Hairston, 1996). Obviamente, como ocurre con otros rasgos del ciclo vital, el estado de

latencia no opera sin costes efectivos o potenciales. Basta citar aquí que un periodo de latencia que se prolongue más allá del periodo de adversidad ambiental representa una pérdida de oportunidades reproductivas.

El fenómeno de la latencia se produce mediante una gran diversidad de mecanismos. Entre los vegetales, la latencia de las semillas es un fenómeno extraordinariamente difundido y estudiado (Toole y Brown, 1946; Koller, 1969; Harrington, 1972; Venable y Lawlor, 1980), si bien existen otras formas de latencia basadas, por ejemplo, en la formación de yemas latentes. Entre los animales, en los que el fenómeno ha recibido menos atención desde una perspectiva ecológica y evolucionista, la latencia ocurre en numerosos invertebrados. Ésta ha sido estudiada sobre todo en insectos desde un punto de vista fundamentalmente fisiológico (Lees, 1955; Tauber *et al.*, 1986; Tanaka, 1992). En el contexto de los organismos zooplanctónicos, los aspectos ecológicos y evolutivos sólo han empezado a estudiarse en las últimas décadas (Hairston y Munns, 1984; Hairston y Olds, 1984; Brendonck, 1996; Fryer, 1996; Cáceres, 1997a; Belmonte y Rossi, 1998).

La forma, inducción, y duración de la latencia en el zooplancton varía enormemente entre taxones (Hand, 1991; Cáceres, 1997a). En primer lugar, el estado latente puede darse en distintos momentos a lo largo del ciclo vital: desde embriones en estado latente envueltos en estructuras protectoras (p.ej., los epiplas de los cladóceros o los huevos de resistencia de los copépodos y de los rotíferos monogonontes) hasta modificaciones del estado adulto (p.ej., rotíferos bdelloides, nematodos y tardígrados, capaces de sobrevivir a las condiciones adversas en estado de anhidrobiosis). Además, en lo que se refiere a la inducción y duración de la latencia se diferencian dos tipos básicos: diapausa y quiescencia.

La diapausa es un tipo de latencia que se ha caracterizado típicamente como 'profética' (Müller, 1970; citado en Begon *et al.*, 1995), aunque obviamente no lo es. La diapausa se inicia antes de que se

presenten las condiciones adversas y se debe a factores endógenos de regulación del desarrollo. Se trata, como otros rasgos de comportamiento cíclico en los seres vivos, de una característica seleccionada en los antecesores por supervivencia diferencial, y no por la anticipación del futuro por parte del organismo. Dado que la diapausa responde a un control endógeno y que puede implicar un periodo refractario o de 'diapausa obligada', su duración puede exceder, a veces incluso mucho, la duración del periodo adverso (Hairston *et al.*, 1995; Ricci, 2001). Por su parte, la quiescencia consiste también en una detención del ciclo vital debida a condiciones ambientales desfavorables. No obstante, a diferencia de la diapausa, la quiescencia se inicia en respuesta a las propias condiciones adversas y se extiende sólo mientras éstas duran (Hand, 1998). Las formas quiescentes incluyen los estados de hibernación, estivación, anhidrobiosis y criptobiosis (Clegg, 2001; Ricci, 2001; Tunnacliffe y Lapinski, 2002).

De nuevo, como ocurre con otros rasgos del ciclo vital, el fenómeno de la latencia abre numerosas cuestiones evolutivas y ecológicas. Por ejemplo, plantea qué factores del ambiente selectivo determinan una mayor o menor inversión en formas latentes, así como en el tiempo de permanencia en latencia, y por tanto qué patrones de latencia deben esperarse según qué hábitats; o, por otra parte, llama a averiguar con qué otras características (genéticas, de sexo, de modos reproductivos, etc.) se encuentra relacionada la latencia, y por qué; o suscita la cuestión sobre qué consecuencias tiene la existencia de formas latentes para la dinámica poblacional, para la persistencia de las poblaciones y su evolución. La contestación a estas cuestiones necesita de estudios detallados de casos, a partir de los cuales aparecerán las generalizaciones.

### **La interrelación entre la fase activa y la fase latente en el zooplancton**

Las poblaciones zooplanctónicas que habitan cuerpos de agua

continentales (p.ej., lagos, charcas) pueden atravesar periodos adversos que impidan su supervivencia en la columna de agua (p.ej., desecación, caída de niveles de oxígeno, presencia estacional de depredadores, etc.) y que requieren de la latencia para su supervivencia. Mientras que en su fase activa una población zooplanctónica ocupa la columna de agua, en la fase latente la población – típicamente en forma de huevos diapáusicos – se acumula en el sedimento de lagos y charcas formando densos bancos, en donde es capaz de resistir las condiciones ambientales adversas. Cuando las condiciones favorables retornan, una parte de los huevos diapáusicos que han completado el periodo refractario de diapausa obligada se reactivan y completan el desarrollo del embrión hasta su eclosión. Pero otra fracción de los huevos permanece, todavía viable, enterrada en el sedimento formando un banco de huevos diapáusicos similar a los bancos de semillas en vegetales (Carvalho y Wolf, 1989; De Stasio, 1989; Hairston *et al.*, 1995; Cáceres, 1998).

### *El compromiso entre continuar activo o entrar en latencia*

Cuando la producción de huevos diapáusicos es imprescindible para la supervivencia de las poblaciones zooplanctónicas que viven en ambientes variables, esa producción es una medida de eficacia biológica y debe estar maximizada por selección natural (Serra y Carmona, 1993; Serra y King, 1999). Esta maximización debe responder a un compromiso (*trade-off*) entre la asignación de recursos al crecimiento poblacional o a la inversión en diapausa (Hairston y Munns, 1984; Schröder, 2005). Nótese que una mayor inversión en crecimiento poblacional podrá reportar a más largo plazo una mayor producción de huevos diapáusicos (Snell, 1987; Serra y Carmona, 1993; Serra y King, 1999; Gilbert, 2002). No obstante, la mejor estrategia respecto al momento de inversión en diapausa va a depender de las condiciones específicas del hábitat (Hairston y Munns, 1984; Serra y King, 1999; Spencer *et al.*, 2001; Schröder, 2005). Así, en ambientes predecibles

donde los organismos pueden de alguna forma 'anticipar' el final de la estación óptima para el crecimiento, se espera la evolución de estrategias del tipo 'todo o nada' (también conocidas como estrategias 'bang-bang'). La mejor estrategia – la que permite la producción de un mayor número de huevos diapáusicos – consiste en que la producción de huevos tenga lugar de forma sincrónica en la población inmediatamente antes de que se produzca el cambio en las condiciones ambientales. Por el contrario, en ambientes impredecibles, donde la duración de la estación de crecimiento es incierta, será óptima una iniciación temprana de la inversión en diapausa, si bien con tasas continuadas y no muy altas para no comprometer demasiado el crecimiento poblacional (Carmona *et al.*, 1995; Serra y King, 1999; Spencer *et al.*, 2001). Obsérvese que si la inversión en diapausa es muy elevada, la población activa crecerá lentamente y, en casos extremos, podría incluso declinar. Esta estrategia intermedia o de apuestas múltiples (*bet-hedging*) permite que, si la estación de crecimiento es breve, al menos se hayan podido producir algunos huevos diapáusicos que resistan en el sedimento hasta que se restablezcan las condiciones adecuadas para la población en la columna de agua.

#### *El compromiso entre continuar en latencia o entrar en actividad*

Como ha quedado esbozado más arriba, otra forma de enfrentarse a las vicisitudes de la impredecibilidad ambiental consiste en que no todos los huevos diapáusicos del sedimento eclosionen simultáneamente. El mantenimiento de huevos viables en el sedimento con una eclosión dispersa en el tiempo también tiene gran interés en ecología evolutiva pues se considera, al igual que en el caso de la estrategia intermedia de producción de huevos diapáusicos, una estrategia de apuestas múltiples que disminuye el riesgo de extinción local en ambientes impredecibles (Hairston y Munns, 1984; Stearns, 1992; Belmonte y Rossi, 1998). Este tipo de estrategia ha sido estudiada desde un punto de vista teórico por Cohen (1966) para determinar

la fracción óptima de germinación de semillas de plantas anuales en ambientes variables según la frecuencia de años buenos y malos para el crecimiento y la reproducción. Aplicando los resultados de Cohen a las poblaciones del zooplancton, se postula que las tasas de eclosión de los huevos diapáusicos del sedimento deben ser menores en ambientes más impredecibles. Más aún, la fracción de huevos diapáusicos que eclosiona al principio de una nueva estación de crecimiento coincidirá con la probabilidad de que el año sea bueno. Se ha propuesto que el mecanismo subyacente a esta estrategia está basado en la respuesta diferencial de los huevos diapáusicos, y que podría ser causado por polimorfismo genético (Seger y Brockmann, 1987; Schröder, 2005).

Cuando hay incertidumbre sobre el ambiente al que se enfrentarán los individuos que eclosionan a partir de huevos diapáusicos, la eclosión dispersa en el tiempo reduce el riesgo de extinción de esta característica y del genotipo que la determina (Venable y Lawlor, 1980; King y Roughgarden, 1982). Esto propicia la persistencia de la población, aunque algunos individuos eclosionarán en un momento inapropiado y ellos o sus descendientes no sobrevivirán. En ambientes temporalmente variables, bajo condiciones de independencia de la densidad y de las frecuencias fenotípicas, la selección natural opera sobre la media geométrica de las medidas finitas de eficacia en cada momento (Gillespie, 1974; 1977), media que tenderá a ser maximizada. Así, un periodo con eficacia cero da una eficacia total cero, por muy alta eficacia que se tenga en cualquier otro periodo. Efectivamente, una eficacia cero implica la extinción. También se sabe que esta media geométrica se aproxima por la media aritmética menos un medio de la varianza de la eficacia (Gillespie, 1977; Real y Ellner, 1992). De ahí que aparezcan adaptaciones para la minimización de esa varianza. Por supuesto, se espera que una población de un organismo del zooplancton que habite un ambiente estacional sin incertidumbre (esto es, predecible) obtendrá la máxima eficacia cuando todos los huevos diapáusicos del sedimento eclosionen simultáneamente al comienzo de la

estación óptima para el crecimiento (King y Roughgarden, 1982; Benton y Grant, 1999; Spencer *et al.*, 2001).

### *Consecuencias demográficas y evolutivas de la formación de bancos de huevos diapáusicos*

La acumulación de huevos diapáusicos en el sedimento puede generar la formación de bancos muy densos, que constituyen auténticos reservorios demográficos para las poblaciones (Ito, 1958; Nipkow, 1961; Kasahara *et al.*, 1975; Katajisto, 1996; Marcus *et al.*, 1994; Hairston, 1996). Los valores típicos de densidad oscilan entre 1 y 1000 huevos cm<sup>-2</sup> (Hairston, 1996). Además, los huevos diapáusicos enterrados pueden permanecer viables durante largos periodos de tiempo, del orden de décadas en el caso de rotíferos (Marcus *et al.*, 1994; Kotani *et al.*, 2001), e incluso siglos en copépodos y cladóceros (Hairston *et al.*, 1995; Cáceres, 1998), lo que puede permitir la persistencia de las poblaciones del zooplancton a largo plazo. La eclosión de los huevos diapáusicos está restringida a los dos primeros centímetros del sedimento (Herzig, 1985), que se considera el banco 'activo' del sedimento de acuerdo con el modelo conceptual para la dinámica de los bancos de huevos propuesto por Cáceres y Hairston (1998). No obstante, a menudo se considera que los huevos diapáusicos de los diez primeros centímetros del sedimento tienen cierta capacidad de quedar expuestos a los estímulos que inducen la eclosión (Hairston *et al.*, 2000; Hairston y Kearns, 2002; Brendonck y De Meester, 2003) como consecuencia de procesos de mezcla del sedimento. De hecho, la mayor parte de huevos viables se encuentra generalmente en los primeros 4-6 cm del sedimento (Herzig, 1985; Carvalho y Wolf, 1989; Hairston y Van Brunt, 1994; Cáceres, 1998).

Los bancos de huevos diapáusicos constituyen además un reservorio de diversidad genética intrapoblacional (Templeton y Levin, 1979), lo que hace posible la recuperación de genotipos almacenados en el sedimento y

que han podido ser eliminados de la población activa por selección natural. De darse, este fenómeno implicaría una demora en los procesos microevolutivos guiados por acción de la selección natural o la deriva genética (Templeton y Levin, 1979; Hairston, 1998). En términos más generales, la eclosión dispersa en el tiempo consiste en el incremento del tiempo de generación y el solapamiento de generaciones, lo que se predice que contribuya al mantenimiento de diversidad genética en ambientes temporalmente variables (Ellner y Hairston, 1994; Hedrick, 1996).

La formación de bancos de huevos diapáusicos con estrategias intermedias de eclosión tiene también consecuencias en la dinámica y estructura de la comunidad planctónica, en relación con la forma en que procesos como la competencia y la depredación la modelan (Warner y Chesson, 1985; Pake y Venable, 1996; Cáceres, 1997b). Desde un punto de vista teórico, el reclutamiento disperso en el tiempo se considera un mecanismo para el mantenimiento de la diversidad entre especies competidoras por medio del denominado 'efecto de almacenamiento' (*storage effect*), que consiste básicamente en fluctuaciones temporales en el reclutamiento de diferentes especies que permiten la coexistencia estable entre competidores que, de otra manera, no podrían coexistir (Chesson y Warner, 1981; Chesson, 1983; Warner y Chesson, 1985; Cáceres, 1997b).

Por último, cabe señalar que los huevos diapáusicos de los organismos zooplanctónicos constituyen también un mecanismo de dispersión espacial para sus poblaciones, lo que, por otra parte, también es un componente de eficacia biológica (Gadgil, 1971; Levin *et al.*, 1984; McPeck y Holt, 1992; Bohonak y Jenkins, 2003; Panov *et al.*, 2004). Las características de resistencia de los huevos diapáusicos facilitan su transporte en condiciones que no serían toleradas por individuos activos o por otros tipos de huevos. Así, al tolerar la ingestión por aves (Jarnagin *et al.*, 2000, Charalambidou y Santamaría, 2002; Figuerola y Green, 2002), pueden migrar entre masas de agua. Además, aparte de la dispersión por endozoocoria, los

huevos diapáusicos también pueden ser arrastrados por el viento (especialmente, en lagunas que se secan completamente), por corrientes de agua, o transportados externamente por animales (Darwin, 1859; Brendonck y Riddoch, 1999; Langley *et al.*, 2001; Cáceres y Soluk, 2002; Bohonak y Jenkins, 2003). En este sentido, es de destacar la amplia variedad de rasgos morfológicos que presentan los huevos diapáusicos (presencia de espinas, cámaras de aire, etc.) y que se han relacionado con la facilitación de su dispersión (Gilbert, 1974; Belmonte *et al.*, 1997).

A pesar de sus importantes implicaciones ecológicas y evolutivas, los bancos de huevos diapáusicos han recibido mucha menos atención que sus respectivas fases activas. Como consecuencia, la interacción entre ambas fases permanece todavía hoy en gran parte inexplorada (Cáceres, 1998). Como ya se ha avanzado, esta situación ha empezado a corregirse en los últimos años, en los que el estudio de la demografía de los bancos de huevos diapáusicos del zooplancton, aunque centrado en copépodos y cladóceros, ha recibido un gran ímpetu convirtiéndose en un campo emergente de investigación (De Stasio, 1989; Cáceres y Hairston, 1998; Marcus y Boero, 1998; Hairston *et al.*, 2000).

No obstante, y a pesar de los esfuerzos recientes, los estudios de distribución de los bancos de huevos diapáusicos del zooplancton están típicamente sesgados a favor de cuerpos de agua permanentes y relativamente profundos; básicamente, se han estudiado grandes lagos de agua dulce y ambientes marinos (véase el apéndice A). Existe pues un defecto de información sobre el banco de huevos en lagunas y charcas someras, que presentan con frecuencia un marcado carácter temporal. Dado que los patrones de diapausa deben estar correlacionados con (1) el régimen ecológico bajo el cual habitan las poblaciones de rotíferos y (2) otros rasgos del ciclo vital, es necesario el estudio de diferentes tipos de hábitats, así como la comparación con los otros grupos principales de

organismos del zooplancton, para obtener una visión no sesgada de los patrones de diapausa en la naturaleza.

### **Los rotíferos como componentes del plancton**

Hasta la fecha existen muy pocos estudios cuantitativos de los bancos de huevos diapáusicos de rotíferos, sobre todo si se comparan con los de los otros grupos taxonómicos mayoritarios del zooplancton (véase el apéndice A). La revisión de la literatura científica pre-existente acerca de bancos de huevos diapáusicos en organismos del zooplancton revela que los estudios cuantitativos de los bancos de huevos diapáusicos de rotíferos representan únicamente un 12 % del total, y que este porcentaje corresponde a tan sólo ocho artículos científicos publicados en 50 años. Todavía hoy se desconocen los aspectos más importantes de la demografía de los bancos de huevos de rotíferos, tales como las densidades típicas de huevos diapáusicos en el sedimento, la fracción de huevos que permanece viable enterrada en el sedimento, la capa de sedimento cuyos huevos contribuyen efectivamente a la refundación de las poblaciones, el tiempo de supervivencia de los huevos enterrados en el sedimento, los procesos de deterioro que les afectan y sus consecuencias, etc. El conocimiento actual de la dinámica entre huevos diapáusicos y las poblaciones activas de rotíferos de la columna de agua, así como la evolución conjunta de los patrones de reproducción sexual y eclosión de huevos diapáusicos es insuficiente. Todo ello es sorprendente si se piensa en la importancia de los rotíferos dentro del plancton.

#### *Importancia ecológica de los rotíferos*

Los rotíferos constituyen uno de los grupos mayoritarios del zooplancton de las aguas epicontinentales (Pourriot, 1965; Ruttner-Kolisko, 1974), donde

desempeñan una importante función ecológica como intermediarios en el flujo de energía entre niveles tróficos y elemento estructural de sus comunidades (Dumont, 1977; Starkweather, 2000). Debido a que el ambiente donde habitan estos organismos es típicamente fluctuante (p.ej., lagos y pequeñas charcas que pueden atravesar alguna época adversa que limita la persistencia de las poblaciones), entre sus representantes los hay que presentan una u otra de las dos formas de latencia indicadas antes: diapausa o quiescencia (Gilbert, 1974; Ricci, 2001). Además, debido a la facilidad con que pueden ser cultivados en el laboratorio y a otras características propias de su ciclo vital (véanse más abajo), los rotíferos se han convertido en organismos experimentales que sirven como modelo en estudios de ecología y evolución (Wallace y Snell, 1991; Ricci *et al.*, 2000; Wallace y Ricci, 2002).

### *Características generales*

Los rotíferos constituyen un filo de pseudocelomados. Su nombre (del latín *rota*, que significa rueda, y *fera*, que puede traducirse por portadores) se debe a la presencia de un aparato 'rotador' – corona o disco trocal - característico del grupo (Clément y Wurdak, 1991). Son animales de pequeño tamaño, que oscilan entre 40  $\mu\text{m}$  y 3 mm, si bien la mayoría de ellos miden entre 100 y 500  $\mu\text{m}$  (Hickman *et al.*, 1997). Los rotíferos son un filo cosmopolita que comprende aproximadamente unas 2000 especies conocidas, algunas de ellas con una amplia distribución biogeográfica, y que se encuentran prácticamente en todo tipo de ambientes acuáticos (Koste, 1978). Aproximadamente el 80 % de las especies pertenecen a la clase Monogononta (las otras dos clases – Seisonoidea y Bdelloidea – están mucho menos estudiadas).

## Ciclo reproductivo

El modo de reproducción de los rotíferos monogonontes es la partenogénesis cíclica (Figura 1.1).

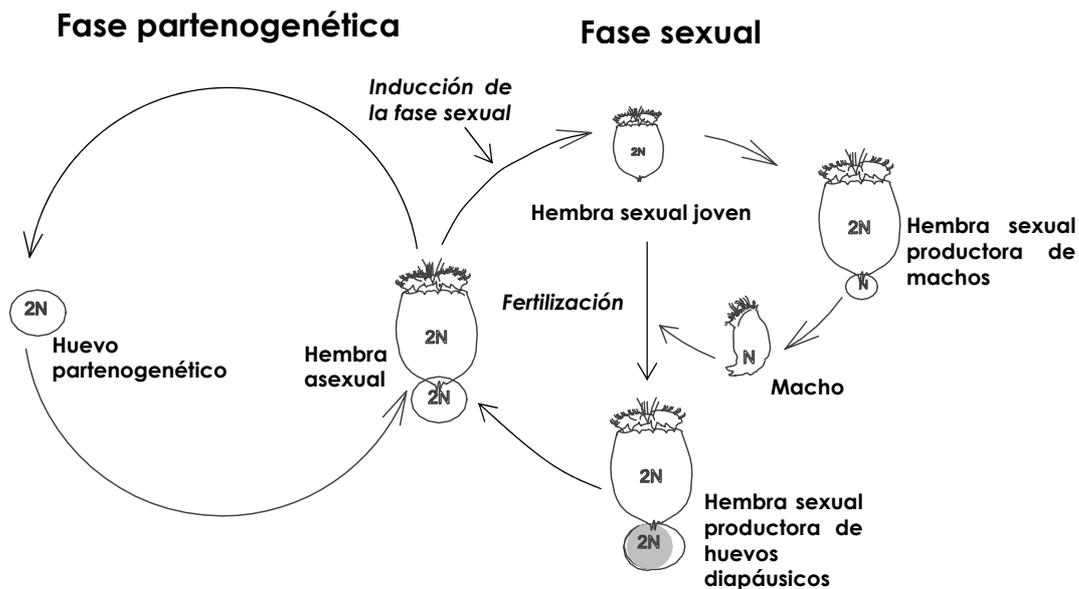


Figura 1.1. Ciclo vital típico de los rotíferos monogonontes. Figura modificada a partir de Ortells (2002).

Este ciclo vital, prácticamente restringido a tres grupos animales: áfidos (insectos), cladóceros (crustáceos) y rotíferos monogonontes, combina las ventajas de la reproducción partenogenética con las de la reproducción sexual (Young, 1983; Aparici *et al.*, 2002; Simon *et al.*, 2002). Una estación de crecimiento típica para estos organismos comienza con la eclosión de huevos diapásicos en el sedimento que dan lugar a hembras asexuales (amícticas). Estas hembras asexuales son diploides, y se reproducen por partenogénesis ameiótica para dar lugar a hijas que son genéticamente idénticas a sus progenitoras salvo en el caso de que se produzca mutación. Durante esta fase de propagación clonal, en la que no hay machos y que

suele comprender un número elevado de generaciones, las poblaciones de rotíferos presentan altas tasas de crecimiento poblacional lo que les permite colonizar rápidamente el hábitat. No obstante, como respuesta a determinadas condiciones ambientales (p.ej., fotoperiodo, temperatura, dieta, o hacinamiento), se induce la fase sexual (Gilbert, 1977; 1980; Pourriot y Clément, 1981; Pourriot y Snell, 1983; Carmona, 1992). Esta fase comienza cuando algunos huevos partenogenéticos diploides (producidos por las hembras asexuales) se desarrollan en hembras sexuales (mícticas) diploides que producirán huevos haploides. Si estos huevos no son fecundados, se desarrollarán en machos haploides. Pero si, una vez ya haya machos en la población, son fecundados, producirán huevos diploides que entran en estado de diapausa. Una vez producidos, los huevos diapáusicos se acumulan en los sedimentos donde son capaces de permanecer viables durante largos periodos de tiempo (hasta un máximo de 100 años; Fu e Hirayama citado en King y Serra (1998)). Como ya se ha comentado anteriormente, la diapausa que implican estos huevos es crucial para la supervivencia de las poblaciones durante periodos adversos (Gilbert, 1974; Schröder, 2005). Posteriormente, cuando estos huevos eclosionen, una vez cumplido el periodo refractario de diapausa obligada, se reanuda el ciclo liberándose la variabilidad genotípica debida a los procesos de recombinación genética y singamia asociados al proceso de reproducción sexual por el que se generaron los huevos diapáusicos, y que permitirá a la población afrontar futuros retos adaptativos. Además, dado que los huevos dipáusicos almacenan reservas lipídicas (Wurdak *et al.*, 1978), se ha sugerido que las hembras asexuales que eclosionan de estos huevos, al disponer de más recursos, presentarán ventajas para iniciar la recolonización del medio. Recientemente, se ha destacado que las hembras que eclosionan a partir de huevos diapáusicos presentarían ésta y otras características fenotípicas peculiares, condicionadas por efectos maternos, que las prepararían para unas condiciones también peculiares: aquellas en las que eclosiona el huevo diapáusico (Gilbert, 2004). Así pues, en su conjunto, el ciclo vital de los

rotíferos monogonontes se considera una adaptación a los ambientes estacionales, temporales o efímeros que habitan (Serra y King, 1999).

Basándose en el ciclo vital de estos organismos, se ha intentado modelizar la dinámica interanual de sus poblaciones – por ejemplo en estudios de viabilidad de poblaciones (Snell *et al.*, 1999). Si bien existen estimaciones fiables para los parámetros que describen la fase zooplanctónica en esos modelos, la parametrización es altamente conjetural con respecto a los procesos que afectan a la dinámica en el sedimento, o entre el sedimento y la columna de agua. La validez de estos modelos queda cuestionada a la espera de una mejor información sobre los bancos de huevos diapáusicos.

#### *El sistema Brachionus plicatilis (Müller 1786) en la Península Ibérica*

De entre todos los rotíferos monogonontes quizás el mejor conocido sea *Brachionus plicatilis*. Debido a la facilidad con que este organismo puede cultivarse en laboratorio y sus cortos tiempos de generación, esta especie se ha utilizado frecuentemente como modelo de estudio en ecología. También se ha utilizado extensamente en acuicultura y ecotoxicología (Lubzens, 1987; Snell y Janssen, 1995; Snell *et al.*, 1999).

*B. plicatilis* se ha considerado tradicionalmente como un organismo cosmopolita que habita preferentemente masas de agua epicontinentales salobres y salinas. Se ha descrito también en zonas costeras, pero no en mar abierto (Walker, 1981; Hammer, 1986; Marcus, 1990). Hoy se sabe que el taxón *B. plicatilis* no es una única especie, sino un complejo de especies crípticas cuyo número e identificación taxonómica está todavía por determinar (Gómez *et al.*, 1995; 2002; Ortells *et al.*, 2000; Suatoni, 2003; Campillo *et al.*, 2005). Hasta la fecha sólo se han descrito formalmente tres especies del complejo, coincidiendo con tres tipos morfológicos básicos (*Brachionus*

*plicatilis sensu stricto*, asignada al morfotipo L – de *large*, grande en inglés; *B. rotundiformis*, asignada al morfotipo SS – de *small-small*, pequeño-pequeño en inglés; y *B. ibericus*, asignada al morfotipo SM – de *small-medium*, pequeño-mediano; Ciro-Pérez *et al.*, 2001). No obstante, se puede afirmar que al menos seis especies del complejo (Gómez *et al.*, 2002; Gómez, 2005) habitan en charcas y lagunas de la Península Ibérica, y constituyen – individualmente o en conjunto (véase el apartado de Objetivos en este mismo capítulo) – el organismo de estudio de esta tesis.

Los hábitats donde se han encontrado las especies del complejo *B. plicatilis* en la Península Ibérica poseen una marcada heterogeneidad temporal. Por lo que se sabe hasta el momento (Ortells *et al.*, 2003; Lapesa, 2004), las poblaciones de rotíferos del complejo *B. plicatilis* de la Península Ibérica son temporales y, por tanto, requieren de la formación de bancos de huevos diapáusicos para su persistencia. Sus hábitats en la Península representan una amplia gama de tamaño, profundidad, salinidad, grado de aislamiento, duración del hidropериodo e impredecibilidad. Por otro lado, el aislamiento físico entre lagunas ha hecho posible la divergencia intraespecífica entre las poblaciones peninsulares (Gómez *et al.*, 2000). En correspondencia con la diversidad de hábitats que ocupan, cabe pues esperar la existencia de divergencias adaptativas en rasgos asociados a la diapausa entre las distintas poblaciones.

### **Objetivos generales y organización de la tesis**

En los apartados anteriores se ha identificado una serie de cuestiones relevantes desde el punto de vista ecológico y evolutivo en relación con la diapausa en rotíferos, cuestiones para las que se carece de respuesta. También se ha presentado un taxón (*B. plicatilis*) como adecuado para estudios de diapausa en rotíferos. En función de todo ello, se formulan los objetivos de esta tesis doctoral.

El propósito de la presente tesis es caracterizar los bancos de huevos diapáusicos del rotífero *B. plicatilis* e inferir los procesos que determinan sus características en relación con las propiedades específicas del hábitat y en el contexto general de la teoría de la evolución de rasgos vitales.

De acuerdo con estos objetivos generales, esta tesis se estructura de la siguiente manera:

En el capítulo 2 se describen exhaustivamente los bancos de huevos diapáusicos del complejo de especies del rotífero *B. plicatilis*. Se estudia la abundancia, edad y viabilidad de los huevos diapáusicos de este rotífero a distintas profundidades en los sedimentos de 15 charcas y lagunas de la región oriental de la Península Ibérica.

En el capítulo 3 se presenta la formulación de un modelo matemático basado en ecuaciones en diferencias que relaciona patrones del banco de huevos con los procesos que los determinan. Así mismo, se proponen relaciones entre estos procesos y características específicas del hábitat. La validez – y aplicabilidad – de este modelo no se circunscribe exclusivamente a rotíferos sino que puede extenderse a otros organismos del zooplancton que habitan ambientes variables.

En el capítulo 4 se usa el esquema teórico del capítulo 3 para inferir propiedades a partir de la base de datos que se describe en capítulo 2. Los resultados se discuten en términos de las características de los ambientes en los que se encuentran las poblaciones de rotíferos estudiadas.

El capítulo 5 consiste en un estudio detallado sobre el deterioro, capacidad para eclosionar y viabilidad de los huevos diapáusicos de rotíferos del complejo *B. plicatilis*. Se presenta una clasificación exhaustiva en diferentes estados de deterioro de los huevos diapáusicos de dicho complejo

de especies que se encuentran en el sedimento del conjunto de lagunas estudiadas, y se analiza experimentalmente su relación con la viabilidad.

En el capítulo 6 se utiliza la técnica de la tabla de vida para analizar la respuesta a la privación de alimento de las hembras del rotífero *B. plicatilis* s.s. procedentes de huevos partenogenéticos diploides y de huevos diapáusicos.

En el capítulo 7 se investiga la variación intraespecífica, interpoblacional e intrapoblacional, en la producción de huevos diapáusicos, con el objeto de determinar la existencia de diferenciación genética entre poblaciones de *B. plicatilis* s.s. en este rasgo ecológico, así como la existencia de variabilidad heredable dentro de población. Se estudia también la respuesta diferencial a la temperatura y la salinidad, y se discute la existencia de adaptación local.

Por último, en el capítulo 8 se presenta el conjunto de la tesis en el contexto global de los estudios sobre diapausa en organismos zooplanctónicos incidiendo en el tipo de aproximación llevada a cabo y los principales aspectos novedosos presentados. Finalmente se exponen las conclusiones más relevantes de este estudio.

# 2

## Patrones en bancos de huevos diapáusicos de rotíferos: abundancia y viabilidad

### Introducción

La producción de huevos diapáusicos se reconoce como una etapa fundamental dentro del ciclo vital de los rotíferos monogonontes debido a su impacto sobre la dinámica y evolución de sus poblaciones. En primer lugar, la acumulación de estos huevos permite la formación de bancos que actúan como reservorio demográfico y genético para las poblaciones (Marcus *et al.*, 1994; Hairston, 1996; Hairston *et al.*, 1996). Además, contribuye al mantenimiento de diversidad de la comunidad planctónica (Cáceres, 1997b). Sin embargo, y a pesar de su importancia, los bancos de huevos diapáusicos de rotíferos se han estudiado mucho menos que las poblaciones activas. Los escasos estudios cuantitativos de los bancos de huevos diapáusicos de rotíferos (Ito, 1958; Nipkow, 1961; Snell *et al.*, 1983; Marcus *et al.*, 1994) señalan que las densidades que pueden alcanzar estos huevos en el sedimento son elevadas (hasta 4000 huevos cm<sup>-2</sup> en el caso de *Synchaeta* sp.; Nipkow, 1961). La información disponible acerca de la distribución en profundidad de los huevos en el sedimento, la proporción de huevos viables y sus tiempos de supervivencia, es aún más escasa. Como consecuencia, la mayor parte del conocimiento sobre formas de resistencia y dinámica de bancos de huevos diapáusicos proviene de otros grupos de invertebrados planctónicos (*i.e.*, copépodos y cladóceros; véase el apéndice A para una

lista detallada de referencias), y estos estudios están típicamente sesgados hacia grandes lagos de agua dulce y de carácter permanente.

La concentración del esfuerzo investigador en los organismos de mayor tamaño del zooplancton y en grandes masas de agua plantea el problema de la generalidad en la visión que de los bancos de huevos diapáusicos del zooplancton se tiene hasta el momento. Debe observarse que los patrones de diapausa (p.ej., producción de huevos diapáusicos, fracción de huevos viables, etc.) deben estar correlacionados con el régimen ecológico bajo el cual se producen los huevos diapáusicos, y que ese régimen se espera que difiera, al menos parcialmente, entre masas de agua pequeñas y grandes, y entre rotíferos y otros invertebrados planctónicos. Por ello, es necesario ampliar el estudio de dichos patrones a una mayor diversidad de hábitats y a todos los grupos de organismos zooplanctónicos.

El objetivo de este capítulo consiste en caracterizar los patrones de abundancia de los huevos diapáusicos pertenecientes al complejo de especies del rotífero *Brachionus plicatilis* en los sedimentos de un total de 15 lagunas de la región oriental de la Península Ibérica, en relación con la localización geográfica de las lagunas estudiadas, su patrón hídrico, y la edad y profundidad del sedimento.

## **Material y métodos**

### *Localidades de estudio*

Se estudió un conjunto de 15 charcas y lagunas salobres de la región oriental de la Península Ibérica, distribuidas en cinco áreas diferentes (Área Costera de Alicante, Área Costera de Castellón, Área Endorreica del Ebro, Área Endorreica del Guadiana y Área Endorreica del Júcar-Segura) cuya

localización se muestra en la figura 2.1. Los cuerpos de agua estudiados se seleccionaron basándose en estudios previos sobre la distribución y presencia de bancos de huevos diapáusicos del complejo de especies *B. plicatilis* en la Península Ibérica (Ortells *et al.*, 2000).

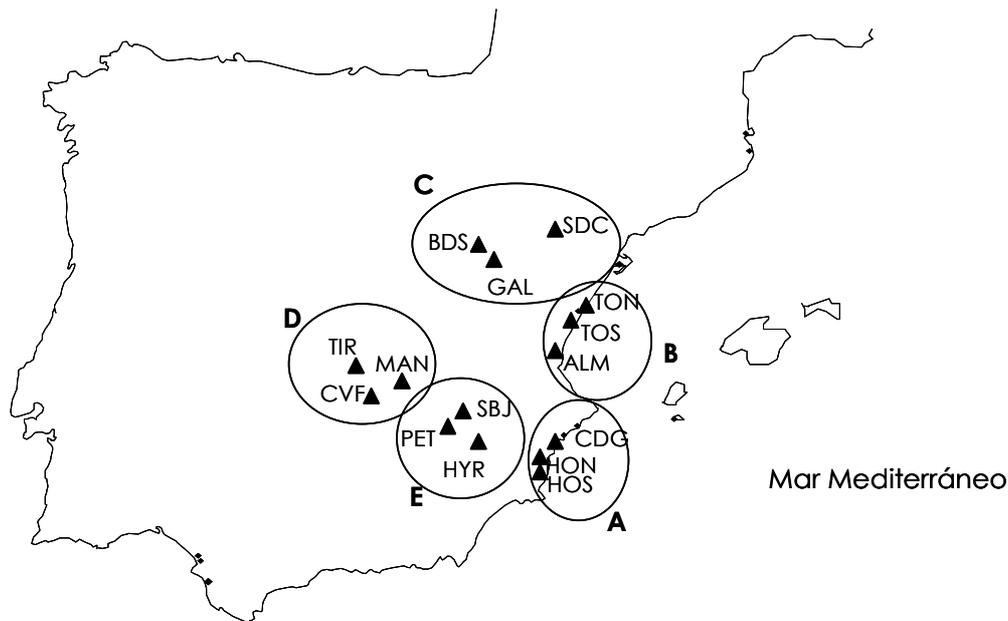


Figura 2.1. Localización de las 15 charcas y lagunas estudiadas en la Península Ibérica. **A:** Área Costera de Alicante: CDG, Clot de Galvany; HON, Charca Norte, Parque Natural de 'El Hondo de Elche' (abrev. Hondo Norte); HOS, Charca Sur, Parque Natural de 'El Hondo de Elche' (abrev. Hondo Sur). **B:** Área Costera de Castellón: ALM, Laguna de Almenara (abrev. Almenara); TON, Poza Norte, Prat de Cabanes-Torreblanca (abrev. Poza Norte); TOS, Poza Sur, Prat de Cabanes-Torreblanca (abrev. Poza Sur). **C:** Área Endorreica del río Ebro: BDS, Balsa de Santed (abrev. Santed); GAL, Laguna de Gallocanta (abrev. Gallocanta); SDC, Salada de Chiprana. **D:** Área Endorreica del río Guadiana: CVF, Laguna del Camino de Villafranca (abrev. Camino Villafranca); MAN, Laguna de Manjavacas (abrev. Manjavacas); TIR, Laguna de Tírez (abrev. Tírez). **E:** Área Endorreica de los ríos Júcar y Segura: HYR, Hoya Rasa; PET, Laguna de Pétrola (abrev. Pétrola); SBJ, Laguna del Salobrejo (abrev. Salobrejo).

Tal y como se ha indicado previamente (véase el capítulo 1), todas las poblaciones de rotíferos del complejo de especies *B. plicatilis* en estas charcas y lagunas, incluso aquellas poblaciones que habitan lagunas

permanentes, son temporales (Lapesa, 2004). Este hecho implica que la supervivencia de dichas poblaciones depende de la producción de huevos diapáusicos y que éstos son, por tanto, una medida de eficacia biológica (Serra *et al.*, 2003; 2005).

Las charcas y lagunas estudiadas difieren en tamaño, profundidad, salinidad y patrón hídrico (Tabla 2.1), de manera que representan un amplio rango eco-geográfico (*sensu* Kratz y Frost, 2000) de los hábitats en donde se encuentran las diferentes especies del complejo *B. plicatilis*. Estas charcas y lagunas se clasificaron según su patrón hídrico de acuerdo con Brock *et al.* (2003). Así, según su permanencia, se establecieron cinco tipos de cuerpos de agua: (1) permanentes, para cuerpos de agua que nunca se desecan; (2) semipermanentes, que contienen agua durante la mayor parte del tiempo pero pueden secarse durante periodos de extrema sequía; (3) estacionales, que se inundan y desecan cíclicamente cada año; (4) intermitentes, que alternan los periodos de desecación con los de inundación, pero siendo éstos menos frecuentes y regulares que en las lagunas estacionales; y (5) episódicos, en el caso de pequeñas charcas que permanecen secas durante la mayor parte del tiempo y sólo se rellenan tras periodos de precipitaciones de difícil predicción. La asignación de las charcas y lagunas estudiadas a estas categorías se basó en las observaciones de Lapesa (2004) y en las realizadas durante el desarrollo de los muestreos correspondientes a este estudio. Es importante señalar que a esta clasificación subyace una variable continua. Para aumentar el tamaño muestral donde esto pudiera ser un problema, en los posteriores análisis estadísticos sólo se consideraron tres regímenes hídricos: (1) hidroperiodo de larga duración, que incluye cuerpos de agua permanentes y semipermanentes; (2) hidroperiodo de duración media, adscrito a las lagunas y charcas estacionales; y (3) hidroperiodo de corta duración, para las charcas intermitentes y episódicas.

Tabla 2.1. Caracterización de las charcas y lagunas estudiadas. Fuentes de datos para área y profundidad media de las lagunas: a, López (1983); b, Rodrigo *et al.* (2001); c, Gómez (1996); d, Gracia (1993); e, Pérez *et al.* (2002); f, Montes y Martino (1987); g, Martí y Del Moral (2002). Los datos de salinidad corresponden a valores promedio de visitas trimestrales a las lagunas durante el periodo 2001-2002. La clasificación del patrón hídrico sigue la nomenclatura de Brock *et al.* (2003).

| Área hidrológica                 | Laguna                  | Coordenadas geográficas     | Área (km <sup>2</sup> ) | Profundidad (m)   | Salinidad (g L <sup>-1</sup> ) | Patrón hídrico |
|----------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------|--------------------------------|----------------|
| Área Costera de Alicante         | CDG, Clot de Galvany    | 38° 14.999' N, 0° 32.228' O | -                       | < 1               | 15.6                           | Semipermanente |
|                                  | HON, Hondo Norte        | 38° 11.384' N, 0° 45.140' O | 0.13 <sup>a</sup>       | 0.9 <sup>a</sup>  | 10.4                           | Semipermanente |
|                                  | HOS, Hondo Sur          | 38° 10.004' N, 0° 44.007' O | 0.20 <sup>a</sup>       | 0.8 <sup>b</sup>  | 12.9                           | Semipermanente |
| Área Costera de Castellón        | ALM, Almenara           | 39° 45.164' N, 0° 11.597' O | 0.10 <sup>a</sup>       | 7.5 <sup>a</sup>  | 1.4                            | Semipermanente |
|                                  | TON, Poza Norte         | 40° 08.917' N, 0° 10.148' E | 0.01 <sup>c</sup>       | 0.8 <sup>c</sup>  | 23.8                           | Estacional     |
|                                  | TOS, Poza Sur           | 40° 08.715' N, 0° 10.059' E | 0.01 <sup>c</sup>       | 1.0 <sup>c</sup>  | 33.0                           | Estacional     |
| Área Endorreica del Ebro         | BDS, Balsa de Santed    | 41° 00.975' N, 1° 32.477' O | 0.02 <sup>d</sup>       | < 1               | 16.5 <sup>1</sup>              | Episódica      |
|                                  | GAL, Gallocanta         | 40° 58.158' N, 1° 31.163' O | 14.14 <sup>e</sup>      | 0.5 <sup>e</sup>  | 61.5 <sup>1</sup>              | Intermitente   |
|                                  | SDC, Salada de Chiprana | 41° 14.417' N, 0° 10.874' O | 0.23 <sup>f</sup>       | 5 <sup>f</sup>    | 39.3                           | Permanente     |
| Área Endorreica del Guadiana     | CVF, Camino Villafranca | 39° 25.009' N, 3° 16.324' O | 1.85 <sup>g</sup>       | < 1               | 55.5 <sup>2</sup>              | Intermitente   |
|                                  | MAN, Manjavacas         | 39° 24.615' N, 2° 51.899' O | 1.06 <sup>f</sup>       | 0.2 <sup>f</sup>  | 22.9                           | Semipermanente |
|                                  | TIR, Tírez              | 39° 32.631' N, 3° 21.114' O | 0.62 <sup>f</sup>       | 0.2 <sup>f</sup>  | 77.7                           | Estacional     |
| Área Endorreica del Júcar-Segura | HYR, Hoya Rasa          | 38° 47.075' N, 1° 25.620' O | 0.08 <sup>f</sup>       | < 1               | 27.7 <sup>1</sup>              | Estacional     |
|                                  | PET, Pétrola            | 38° 50.555' N, 1° 34.448' O | 1.74 <sup>f</sup>       | 0.7 <sup>f</sup>  | 46.0                           | Semipermanente |
|                                  | SBJ, Salobrejo          | 38° 54.765' N, 1° 28.275' O | 0.36 <sup>f</sup>       | 0.8 <sup>f*</sup> | 17.4                           | Semipermanente |

1. Salinidad medida en una única visita (invierno), dado que no se encontró agua en el resto de visitas.

2. Salinidad promedio de dos visitas (invierno y primavera).

3. La máxima profundidad en esta laguna excede de 4 m.

Muestreo del sedimento

Los muestreos de las lagunas se llevaron a cabo durante los meses de julio y agosto de 2001. Las muestras de sedimento consistieron en cores obtenidos de tres puntos seleccionados al azar en cada una de las charcas y lagunas estudiadas. La localización en el campo de los puntos de muestreo se realizó por medio de un navegador electrónico y sistema de posicionamiento global (GPS Garmin®). Los cores de sedimento se obtuvieron mediante el empleo de un muestreador de pistón de tipo *Beeker* (57 mm de diámetro interno del cilindro, 60 cm de longitud, diseñado y fabricado por Ejkelpkamp Agrisearch Equipment; véase la figura 2.2.A). Una vez extraído, cada core de sedimento se dividió en secciones de 2 cm de espesor hasta una profundidad máxima de 10 cm. Para ello se utilizó un sistema de descarga hidroneumática (Ejkelpkamp Agrisearch Equipment; véase la figura 2.2.B) que permitió el control de la descarga del sedimento y la partición precisa de las muestras.

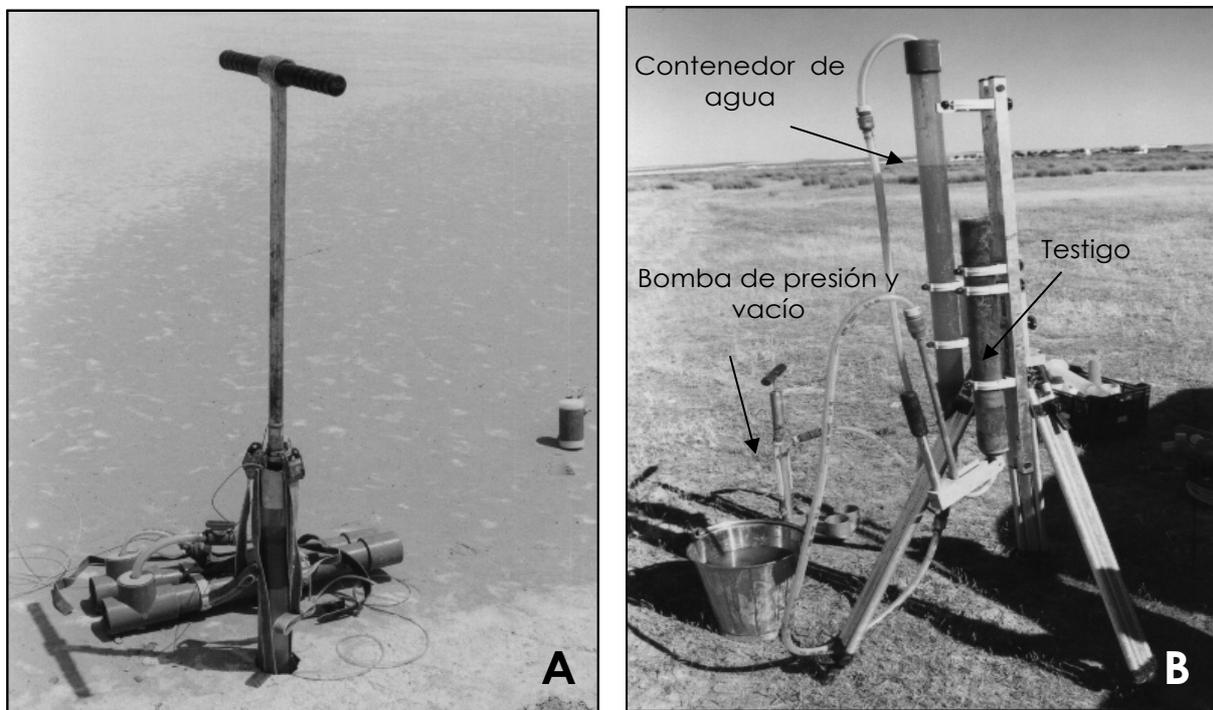


Figura 2.2. **A:** Muestreador de sedimento de pistón tipo *Beeker*. **B:** Sistema de descarga hidroneumática para partición de la muestra.

Cada sección de 2 cm de espesor se pesó en el laboratorio y posteriormente se almacenó en un recipiente de plástico de 100 mL a 4° C de temperatura y en condiciones de oscuridad para preservar los huevos hasta el momento del procesado de las muestras y el posterior análisis (Hagiwara e Hino, 1989).

#### *Estimación de la densidad de huevos diapáusicos*

De la zona central de cada sección de 2 cm de espesor se tomaron submuestras de sedimento de 2 g (en peso húmedo). El objetivo de este procedimiento es evitar la contaminación de la muestra por huevos diapáusicos de capas superiores del sedimento, que podrían haberse transferido durante la fase de descarga hidroneumática del core. Las submuestras de 2 g de sedimento se depositaron individualmente en placas Petri, donde se resuspendieron y desflocularon en medio de 6 g L<sup>-1</sup> preparado con sales comerciales (Instant Ocean®; Aquarium Systems). Posteriormente, las submuestras se filtraron consecutivamente a través de mallas de Nylal de 200 y 30 µm de diámetro de poro. Los huevos diapáusicos de las especies del complejo *B. plicatilis*, cuya longitud y anchura varían respectivamente entre 113-137 µm y 75-100 µm (Ciros-Pérez *et al.*, 2001), quedan retenidos en la malla de 30 µm. No se encontraron huevos diapáusicos en el material retenido por la malla de 200 µm, si bien ésta permitió la eliminación de gran cantidad de material grosero (restos de insectos, semillas de vegetales, restos de hojas y raíces, etc.). El material retenido por la malla de 30 µm de diámetro de poro se transfirió a una placa de recuento de zooplancton donde, con ayuda de una lupa binocular a 6 aumentos, se identificaron y contaron los huevos diapáusicos pertenecientes al complejo *B. plicatilis*. Debe señalarse que no fue posible asignar los huevos diapáusicos aislados del sedimento a cada una de las especies del complejo basándose en su morfología o tamaño (véase el capítulo 5).

Para la estimación de las densidades de huevos diapáusicos se contaron todos los huevos y restos de los mismos en cada submuestra. Se observó que los restos de huevos diapáusicos (p.ej. cáscaras vacías) persisten en el sedimento y se pueden identificar. Por tanto, el número total de huevos diapáusicos en una submuestra incluye huevos diapáusicos en varios estados de conservación, así como también cáscaras vacías de huevos que eclosionaron en el pasado. Este número total de huevos en una capa de sedimento se considera una medida de la producción de huevos diapáusicos en el intervalo de tiempo que llevó la acumulación de esa capa. Nótese que la producción así estimada es una producción neta, de la que se han deducido las posibles pérdidas debidas a la depredación de los huevos o a su exportación (Langley *et al.*, 2001; Cáceres y Soluk, 2002). Los huevos recontados en las muestras de sedimento así como las cáscaras de huevos, que en su conjunto de aquí en adelante se denominan huevos diapáusicos totales, se clasificaron en los siguientes tipos:

- (1) *Huevos diapáusicos con aspecto saludable (healthy-looking eggs)*, similares a los huevos diapáusicos recién producidos en muestras de laboratorio (Figura 2.3.A). Típicamente se considera que estos huevos representan el banco viable (Cáceres, 1998).
- (2) *Huevos eclosionados*, que corresponden a las cáscaras o envueltas vacías abiertas por el denominado opérculo; esto es, por la apertura por donde las neonatas salen del huevo diapáusico (Figura 2.3.B). El recuento de estos huevos permite estimar el número de rotíferos reclutados desde el sedimento en cada estación de crecimiento.
- (3) *Huevos deteriorados*, corresponden a aquellos huevos vacíos, huevos que presentan embriones altamente deteriorados, o huevos que exhiben fracturas diferentes a la provocada por la apertura del huevo durante la eclosión del huevo (Figura 2.3.C). Se considera que estos huevos son inviables.

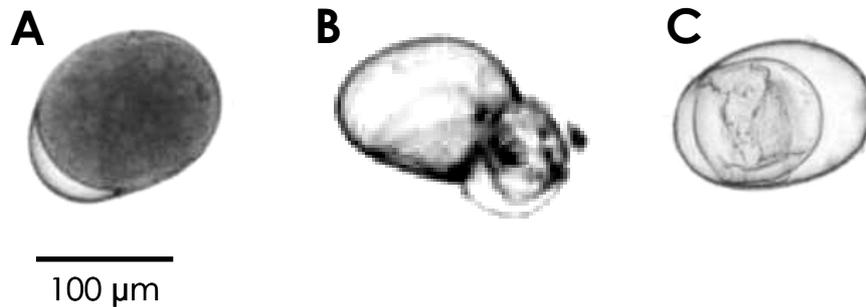


Figura 2.3. Ejemplos de los tipos de huevos diapásicos del complejo *B. plicatilis* reconocibles en muestras de sedimento. **A:** *Huevo diapásico con aspecto saludable.* **B:** *Huevo diapásico eclosionado.* **C:** *Huevo diapásico deteriorado.* Todos los huevos en las fotografías están orientados de manera que el opérculo queda situado a la derecha.

A partir de los recuentos de cada tipo de huevo por submuestra de 2 g se calcularon los valores de densidad, expresada ésta como el número de huevos diapásicos de cada tipo por unidad de volumen de sedimento ( $\text{cm}^{-3}$ ). Estas densidades se utilizaron a su vez para estimar la densidad de huevos diapásicos por unidad de superficie ( $\text{cm}^{-2}$ ) mediante la integración de los valores de densidad de huevos diapásicos por  $\text{cm}^{-3}$  para los primeros diez centímetros de espesor del sedimento.

#### *Datación del sedimento y estimación de la edad de los huevos diapásicos*

Los diez primeros centímetros de sedimento de los cores pertenecientes a seis de las lagunas estudiadas se dataron radiométricamente con  $^{210}\text{Pb}$  y  $^{137}\text{Cs}$  (Krishnaswami *et al.*, 1971; Ritchie y McHenry, 1990). Estas dataciones fueron realizadas por el grupo del Dr. Gaboury Benoit (*Yale School of Forestry and Environmental Studies, Yale University, New Haven, CT, USA*), cuyo informe se presenta en el apéndice B.

Las seis lagunas datadas (Clot de Galvany, Hondo Sur, Poza Sur, Salada de Chiprana, Camino de Villafranca y Salobrejo) se seleccionaron como representantes de cada área geográfica y de determinados perfiles de distribución vertical de huevos diapáusicos en el sedimento (véase la sección de Resultados). Además, la tasa de sedimentación de la laguna de Gallocanta ( $0.31 \pm 0.04$  cm año<sup>-1</sup>) se conoce a partir de un estudio de Rodó *et al.* (2002). La datación en este último estudio se llevó a cabo con <sup>210</sup>Pb, y se validó con los métodos radiométricos basados en <sup>226</sup>Ra y <sup>137</sup>Cs. El conocimiento de las tasas de sedimentación permitió convertir la profundidad del sedimento en unidades de tiempo y, de esta manera, estimar la edad de los *huevos de aspecto saludable* (*a priori* considerados como viables) en las diferentes capas de sedimento estudiadas. A partir de estos datos se calculó la edad media y los tiempos máximos de supervivencia de los huevos diapáusicos del complejo de especies *B. plicatilis* enterrados en el sedimento de las lagunas estudiadas.

### *Análisis estadístico*

Se estudiaron las diferencias en el tamaño del banco de huevos diapáusicos totales (como indicador de producción) y huevos *con aspecto saludable* (como indicador de reserva de huevos viables) de cada laguna por medio de sendos modelos lineales generalizados (Nelder y Wedderburn, 1972) basados en los recuentos de cada tipo de huevo. Dado que en ambos casos los datos analizados son recuentos, se supuso que los datos siguen la distribución de Poisson.

Ambos modelos se utilizaron para estudiar los efectos debidos a la localización geográfica de las lagunas (lagunas costeras *versus* lagunas del interior), diferencias debidas a las lagunas *per se* (diferencias entre lagunas dentro de área geográfica), y a la profundidad en el sedimento (esto es, diferencias entre las diferentes capas de sedimento de dos centímetros de

espesor estudiadas). La bondad de ajuste de los dos modelos estudiados se basó en el cambio relativo de desviación (*i.e.*, *deviance*, que mide cuánto se desvía el modelo de los datos) con respecto a sus respectivos modelos nulos (*i.e.*, modelo con la misma forma que el ajustado, pero con tantos parámetros como observaciones, que también recibe el nombre de modelo saturado). Los términos de interacción entre los factores del modelo sólo se incluyeron cuando mejoraron sensiblemente el ajuste a los modelos nulos (Johnson y Omland, 2004). Todos los análisis se implementaron con la función *glm* del paquete estadístico R 2.1.0 (R Development Core Team 2005; Ihaka y Gentleman, 1996).

## Resultados

La densidad de huevos totales (esto es, del conjunto de *huevos con aspecto saludable, eclosionados y deteriorados*) integrada para los diez primeros centímetros de profundidad del sedimento y promediada para los tres puntos de muestreo de cada una de las lagunas, varió desde 4.70 huevos  $\text{cm}^{-2}$  en el Hondo Norte hasta 26000 huevos  $\text{cm}^{-2}$  en la laguna del Camino de Villafranca. La máxima densidad para un punto de muestreo se encontró también en la laguna del Camino de Villafranca donde alcanzó un valor de 36400 huevos  $\text{cm}^{-2}$ .

La distribución vertical de abundancia de los huevos diapásicos totales en el sedimento de cada una de las lagunas estudiadas se muestra en la figura 2.4. Se encontraron huevos diapásicos o restos de ellos en todos los puntos de muestreo de todas las lagunas estudiadas, aunque no en todas las capas del sedimento de todas las lagunas. Los huevos diapásicos del complejo *B. plicatilis* se distribuyeron, al menos, hasta 8 cm de profundidad en el sedimento de las lagunas estudiadas.

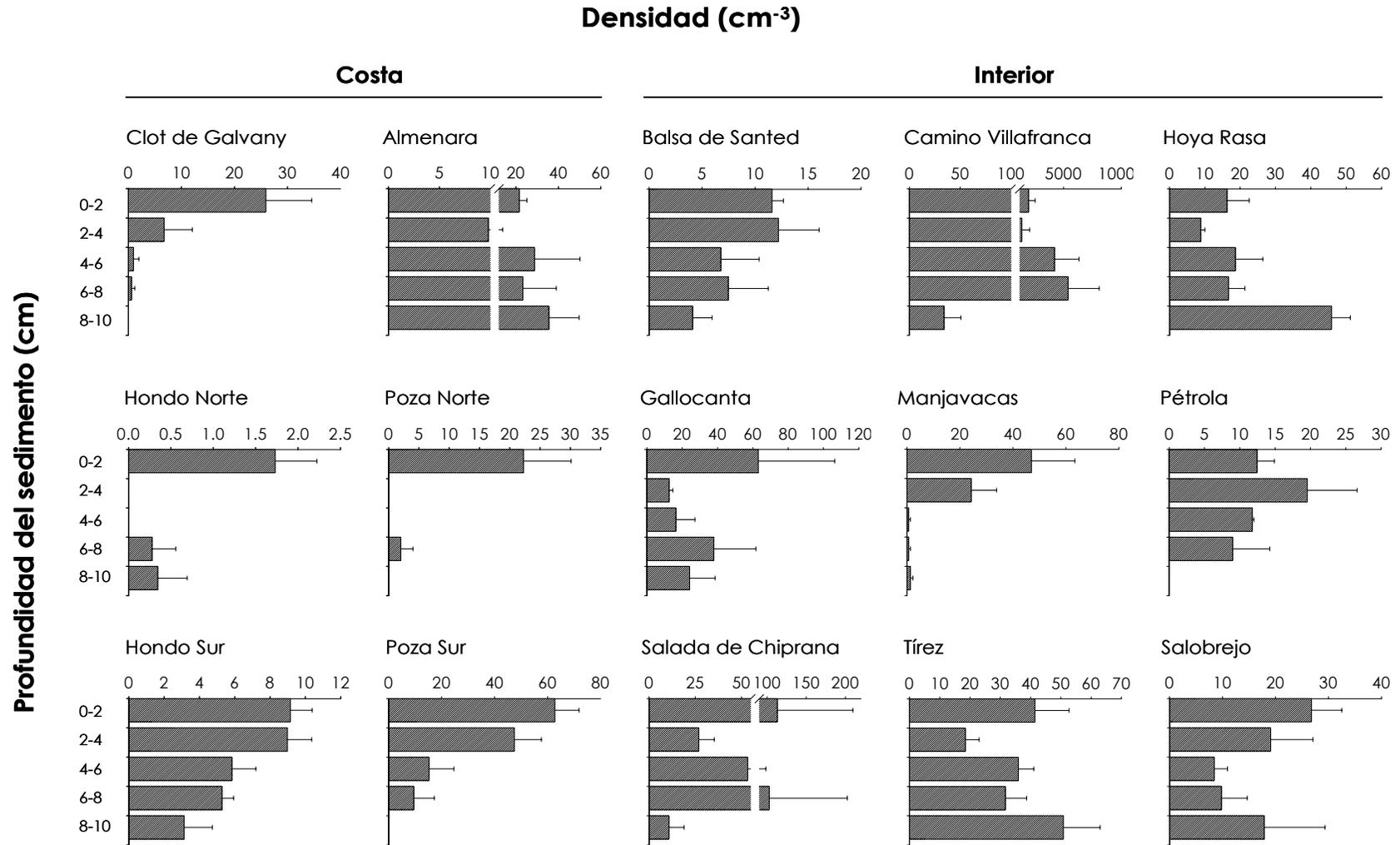


Figura 2.4. Densidad de huevos diapásicos totales del complejo *B. plicatilis* a diferente profundidad en el sedimento de las lagunas estudiadas, ordenadas en costeras y de interior. Los valores para cada capa del sedimento son el promedio de tres puntos de muestreo más el error típico.

Se observaron grandes diferencias en la densidad de huevos diapáusicos totales entre las charcas y lagunas estudiadas, así como también entre las diferentes capas de sedimento dentro de una misma laguna (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Análisis estadístico mediante un modelo lineal generalizado del número de huevos diapáusicos totales.

| <b>Fuente de variación</b>                   | <b>g.l.</b> | <b>Desviación</b> | <b>p</b> |
|--|-------------|-------------------|----------|
| Región                                       | 1           | 10968             | 0.01     |
| Hidroperiodo                                 | 2           | 17566             | < 0.001  |
| Profundidad                                  | 4           | 8697              | < 0.001  |
| Región x Hidroperiodo                        | 1           | 128               | < 0.001  |
| Región x Profundidad                         | 4           | 806               | < 0.001  |
| Hidroperiodo x Profundidad                   | 8           | 1889              | < 0.001  |
| Laguna (Región x Hidroperiodo)               | 10          | 27508             | < 0.001  |
| Región x Hidroperiodo x Profundidad          | 4           | 683               | < 0.001  |
| Laguna (Región x Hidroperiodo) x Profundidad | 39          | 1776              | < 0.001  |

Modelo: Poisson, función vínculo: log, % Desviación: 84.2

Con respecto a la profundidad, pueden distinguirse dos patrones básicos. En primer lugar se ha encontrado un conjunto de lagunas (siete de las 15 lagunas estudiadas) que presentan un perfil vertical típicamente decreciente en la abundancia de huevos diapáusicos con la profundidad en el sedimento, llegando en ocasiones incluso a la extinción del banco. Por el contrario, otras lagunas (ocho de las 15 lagunas estudiadas) se caracterizan por la presencia de un pico subsuperficial de máxima abundancia de huevos diapáusicos totales. Como puede observarse en la figura 2.4, ambos tipos de patrón en profundidad se dan indistintamente en las charcas y lagunas costeras y del interior.

Como puede observarse en la figura 2.5 (véase también la tabla 2.2), los bancos de huevos de las lagunas del interior albergan, en promedio, más huevos diapáusicos totales que los de las lagunas costeras ( $3107.34 \pm 1836.27$  huevos  $\text{cm}^{-2}$  en las lagunas de interior frente a  $114.63 \pm 29.79$  huevos  $\text{cm}^{-2}$  en las costeras). Nótese la gran variación observada entre las lagunas del interior y que entre ellas existe una laguna con una producción muy alta de huevos diapáusicos (Camino de Villafranca). No obstante, incluso anulando esta laguna del análisis, las lagunas del interior presentan más huevos diapáusicos totales que las lagunas costeras.

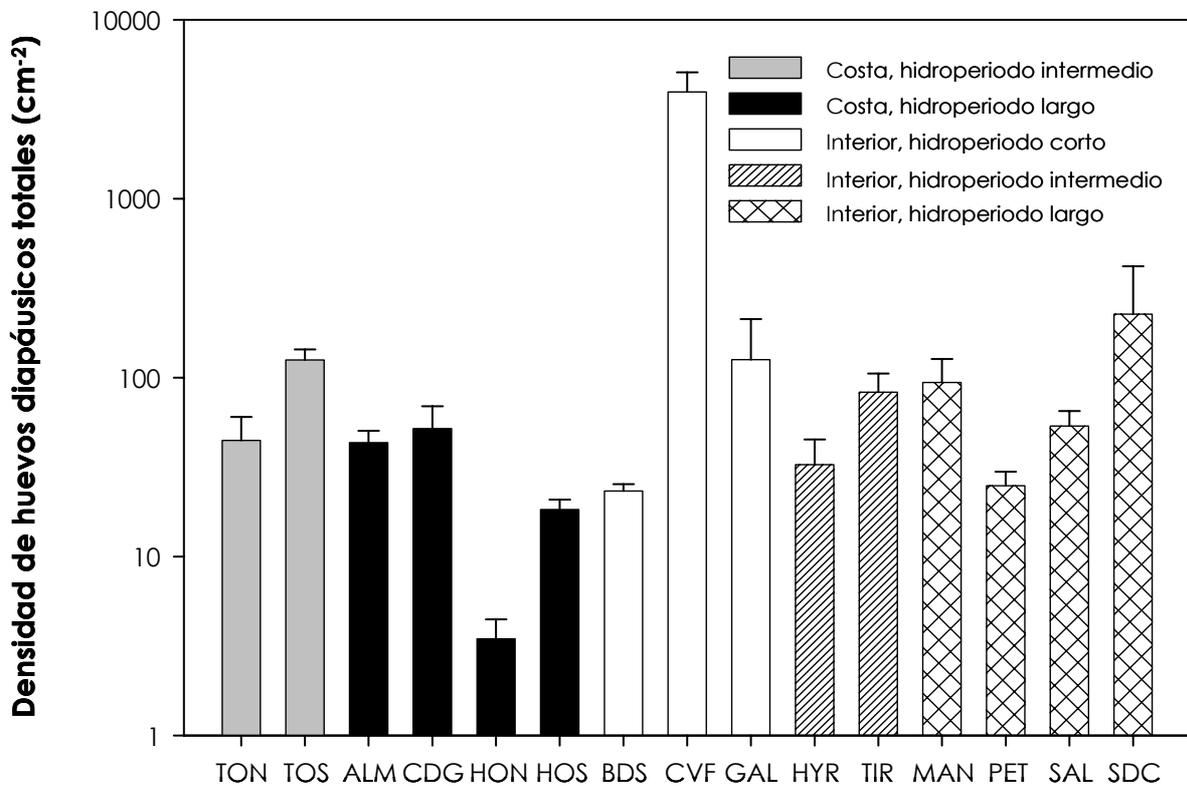


Figura 2.5. Abundancia de huevos diapáusicos totales en los diez primeros centímetros de profundidad del sedimento de las lagunas estudiadas. Los valores presentados son medias de tres puntos de muestreo por laguna más el error típico. Para los acrónimos de las lagunas, véase la figura 2.1.

El patrón hídrico de las lagunas también mostró efectos significativos sobre el tamaño del banco de huevos diapáusicos (Tabla 2.2). Las charcas y

lagunas con hidroperiodos de corta duración (*i.e.*, charcas intermitentes y episódicas) mostraron bancos más densos ( $8793.28 \pm 5176.71$  huevos  $\text{cm}^{-2}$ ) que las lagunas con hidroperiodos de duración media (*i.e.*, lagunas estacionales:  $220.25 \pm 38.47$  huevos  $\text{cm}^{-2}$ ) y larga (*i.e.*, lagunas permanentes y semipermanentes:  $174.13 \pm 50.26$  huevos  $\text{cm}^{-2}$ ). Sin embargo, no puede descartarse que este patrón sea consecuencia de que una de las lagunas con hidroperiodo de corta duración presenta la mayor densidad de huevos diapáusicos de todo el estudio (Camino de Villafranca).

Los *huevos diapáusicos con aspecto saludable* y los *huevos eclosionados* representan una fracción muy pequeña del banco de huevos diapáusicos totales; esto es, de los huevos inicialmente producidos en la columna de agua. Así, la mayor parte de los huevos diapáusicos encontrados en los sedimentos de las charcas y lagunas estudiadas fueron *huevos deteriorados*, tal y como se muestra en la figura 2.6.

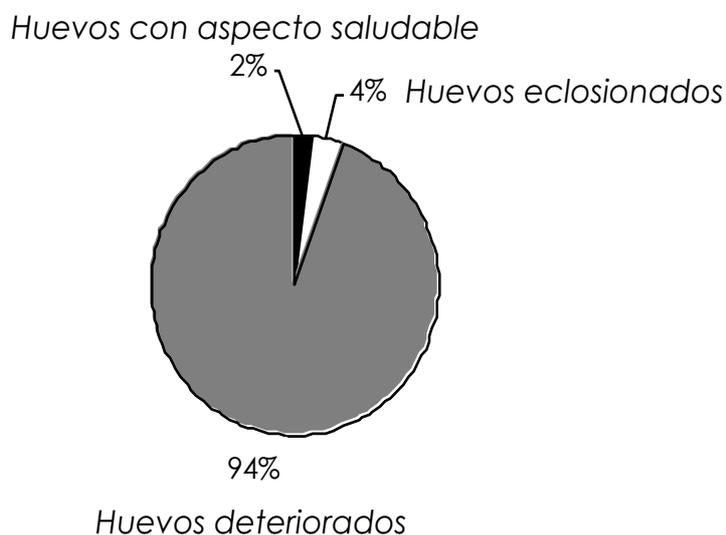


Figura 2.6. Porcentaje de los distintos tipos de huevos diapáusicos del complejo *B. plicatilis* en el conjunto de lagunas estudiadas.

El porcentaje de *huevos diapáusicos deteriorados* varió entre un valor mínimo de 74.6 %, hallado en Poza Sur, y un valor máximo de 98.5 %, en Salada de Chiprana. El valor medio del porcentaje de *huevos diapáusicos deteriorados* para el conjunto de lagunas estudiadas resultó ser  $89.1 \pm 1.7$  %. Los *huevos diapáusicos con aspecto saludable* representaron el  $5.9 \pm 1.4$  % del total de huevos del banco. El máximo porcentaje de *huevos diapáusicos con aspecto saludable* fue 19.1 %, correspondiente a la Poza Sur. En cuanto a los *huevos diapáusicos eclosionados*, éstos representaron el  $5.0 \pm 0.8$  % del total de huevos. Estos *huevos eclosionados* se encontraron en los sedimentos de todas las lagunas estudiadas, e incluso en la máxima profundidad estudiada (8-10 cm) en algunas de ellas.

En aquellas lagunas donde se encontraron *huevos diapáusicos con aspecto saludable*, la densidad para los diez primeros centímetros de profundidad del sedimento osciló entre un valor mínimo de 2.74 huevos  $\text{cm}^{-2}$  en Salada de Chiprana hasta aproximadamente 200 huevos  $\text{cm}^{-2}$  de máxima abundancia en la laguna del Camino de Villafranca. No se encontraron *huevos diapáusicos con aspecto saludable* en ninguno de los puntos de muestreo de Hondo Norte y Balsa de Santed.

El modelo lineal generalizado aplicado sobre el recuento de *huevos diapáusicos con aspecto saludable* (Tabla 2.3) mostró la existencia de efectos significativos debidos a la localización geográfica, duración del hidroperiodo y profundidad en el sedimento. Así mismo, también se encontraron diferencias en la abundancia de estos huevos entre lagunas dentro de una determinada región geográfica e hidroperiodo (fila 'Laguna (Región x Hidroperiodo)' en tabla 2.3). Nótese que estos resultados son dependientes de las diferencias observadas en la producción de huevos totales (Tabla 2.2). Las diferencias en el tamaño del banco de *huevos con aspecto saludable* entre lagunas puede observarse gráficamente en la figura 2.7.

Tabla 2.3. Análisis estadístico mediante un modelo lineal generalizado del número de *huevos diapásicos con aspecto saludable*.

| Fuente de variación                          | g.l. | Desviación | p       |
|--|------|------------|---------|
| Región                                       | 1    | 6.84       | 0.01    |
| Hidroperiodo                                 | 2    | 147.33     | < 0.001 |
| Profundidad                                  | 4    | 322.40     | < 0.001 |
| Región x Hidroperiodo                        | 1    | 44.22      | < 0.001 |
| Región x Profundidad                         | 4    | 54.24      | < 0.001 |
| Hidroperiodo x Profundidad                   | 8    | 70.87      | < 0.001 |
| Laguna (Región x Hidroperiodo)               | 10   | 297.06     | < 0.001 |
| Región x Hidroperiodo x Profundidad          | 4    | 44.03      | < 0.001 |
| Laguna (Región x Hidroperiodo) x Profundidad | 39   | 116.15     | < 0.001 |

Modelo: Poisson, función vínculo: log, % Desviación: 75.1

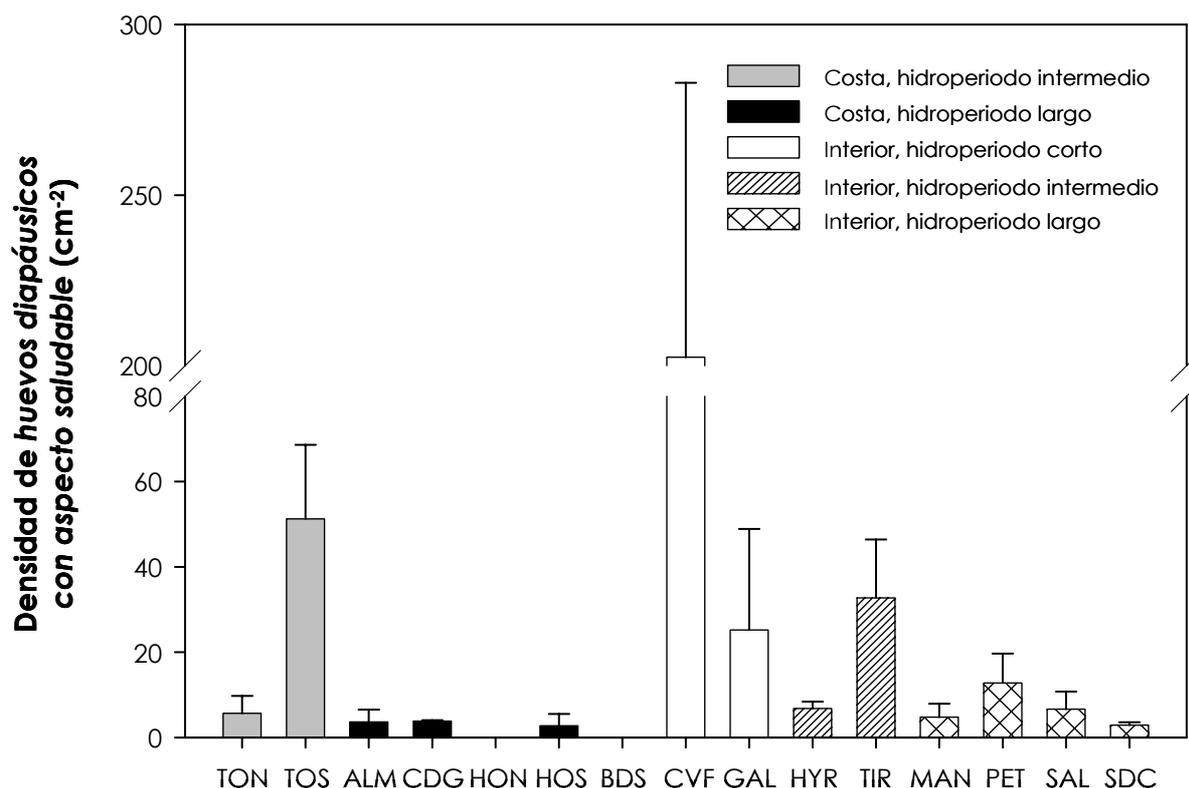


Figura 2.7. Abundancia de *huevos diapásicos con aspecto saludable* en los diez primeros centímetros de profundidad del sedimento de las lagunas estudiadas. Los valores son medias de tres puntos de muestreo por laguna más el error típico. Para los acrónimos de las lagunas, véase la figura 2.1.

Aunque las lagunas del interior albergan, en promedio, más *huevos diapáusicos con aspecto saludable* que las costeras ( $32.69 \pm 14.31$  huevos  $\text{cm}^{-2}$  en las lagunas de interior frente a  $11.17 \pm 5.06$  huevos  $\text{cm}^{-2}$  en las lagunas costeras), los resultados encontrados indican que la proporción de este tipo de huevo con respecto a los huevos diapáusicos totales fue típicamente mayor en las lagunas costeras que en las del interior ( $6.8 \pm 2.0$  % en las lagunas costeras frente a  $4.6 \pm 1.1$  % en las del interior).

Los perfiles verticales de abundancia de los *huevos diapáusicos con aspecto saludable* y los de los *huevos eclosionados* en cada una de las lagunas estudiadas se presentan en la figura 2.8. Como puede apreciarse, la mayoría de los *huevos diapáusicos con aspecto saludable* ( $62.4 \pm 9.6$  %) se encuentra restringida a los dos primeros centímetros de profundidad en el sedimento. No obstante debe señalarse el hecho de que se encontraron también *huevos diapáusicos con aspecto saludable* incluso en la máxima profundidad del sedimento estudiada (8-10 cm) en varias de las lagunas consideradas en este estudio (Almenara, Hoya Rasa y Tírez). Este hecho apoya la hipótesis de que, una vez producidos, los huevos diapáusicos pueden permanecer viables durante largos periodos de tiempo enterrados en el sedimento. Como se verá más adelante, este hecho queda confirmado por los resultados del análisis de datación radiométrica de los sedimentos.

Por otra parte, no se encontró un patrón vertical bien definido con respecto a la abundancia de los *huevos diapáusicos eclosionados* en los sedimentos de las lagunas estudiadas. La abundancia de estos huevos varió desde 0.17 huevos  $\text{cm}^{-2}$  en Hondo Norte hasta 308.95 huevos  $\text{cm}^{-2}$  en Camino de Villafranca. Las lagunas del interior presentaron más *huevos eclosionados* que las costeras ( $37.76 \pm 19.97$  huevos  $\text{cm}^{-2}$  en las lagunas de interior frente a  $3.79 \pm 0.97$  huevos  $\text{cm}^{-2}$  en las costeras), si bien este hecho está relacionado con la mayor producción observada en las primeras.

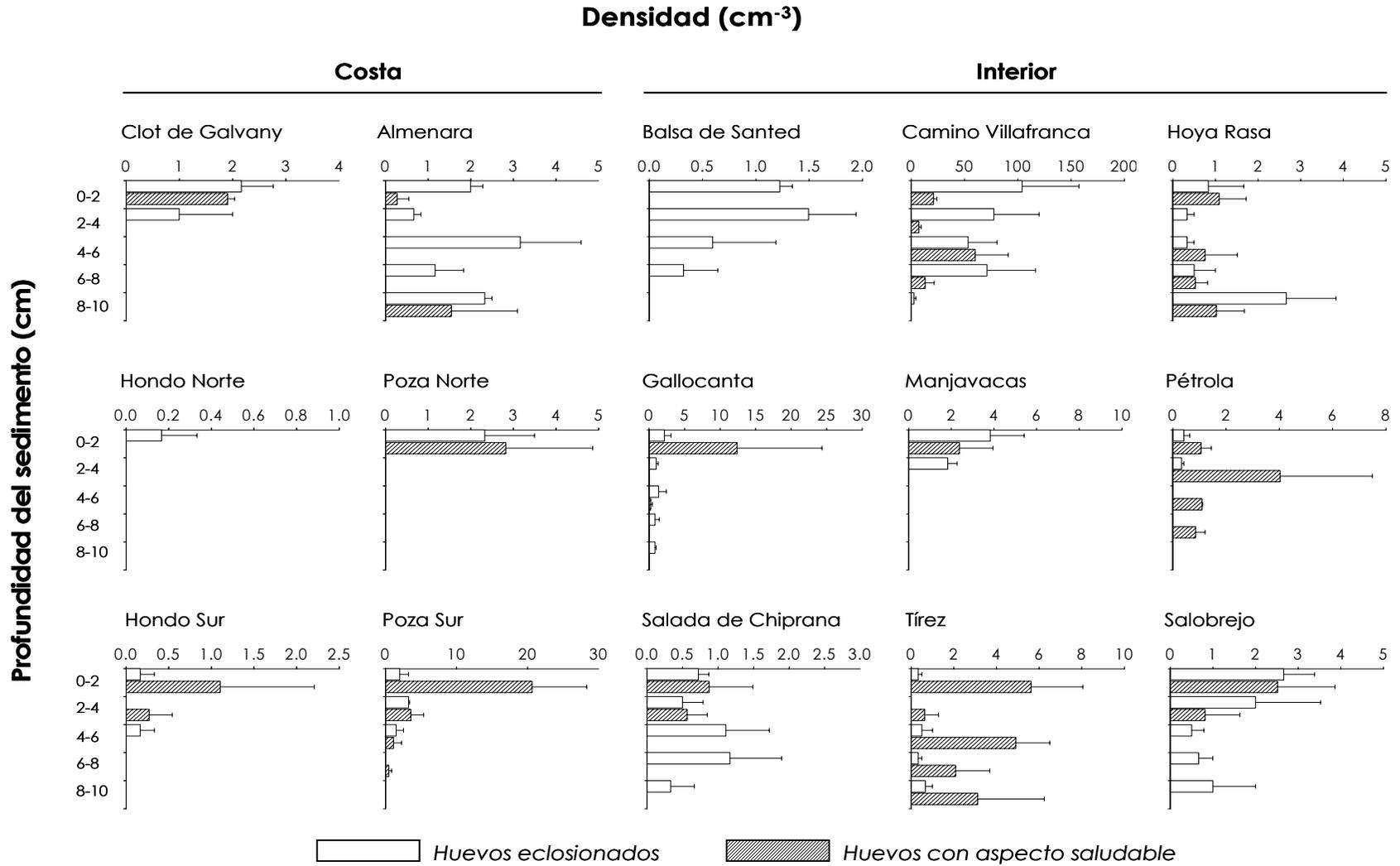


Figura 2.8. Densidad de *huevos eclosionados* y de *huevos con aspecto saludable* del complejo *B. plicatilis* a diferente profundidad en los sedimentos de las lagunas estudiadas. Los datos para cada capa del sedimento son las medias de tres puntos de muestreo más el error típico.

En tres de los seis cores de sedimento en los que se realizó el análisis de datación los datos no se ajustaron a los perfiles ideales de  $^{210}\text{Pb}$  y  $^{137}\text{Cs}$  (Salada de Chiprana, Poza Sur y Hondo Sur), de manera que no resultaron útiles para la datación (véase el apéndice B). Por su parte, los cores obtenidos de Clot de Galvany, Camino de Villafranca y Salobrejo sí se ajustaron a dichos perfiles. Las tasas de sedimentación obtenidas mediante los métodos basados en  $^{210}\text{Pb}$  y  $^{137}\text{Cs}$  dieron resultados consistentes pero con ligeras diferencias en la estima (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Tasas de sedimentación ( $\text{cm año}^{-1}$ ) basadas en los métodos radiométricos del  $^{210}\text{Pb}$  and  $^{137}\text{Cs}$ . Se indica también el intervalo de edad máxima y la mediana de la edad de los *huevos diapáusicos con aspecto saludable*. Para el cálculo de la edad de los *huevos con aspecto saludable* (que son en definitiva los que podrían eclosionar) se utilizó el valor de la estima de la tasa de sedimentación más preciso (con menor error típico) o el valor central del solapamiento entre los intervalos obtenidos por ambos métodos.

| Laguna                | Tasa de sedimentación ( $\text{cm año}^{-1}$ ) |                   | Valor asumido | Intervalo de edad máxima (años) | Mediana de edad (años) |
|-----------------------|--|-------------------|---------------|---------------------------------|------------------------|
|                       | $^{210}\text{Pb}$                              | $^{137}\text{Cs}$ |               |                                 |                        |
| Clot de Galvany       | 0.04 - 0.08                                    | ~ 0.07            | 0.06          | 0-33.3                          | 16.7                   |
| Camino de Villafranca | 0.09 - 0.13                                    | 0.05-0.10         | 0.10          | 60-80                           | 30                     |
| Salobrejo             | 0.15 - 0.17                                    | 0.10-0.15         | 0.15          | 13.3-26.7                       | 6.7                    |
| Gallocanta*           | 0.27 - 0.35                                    | -                 | 0.31          | 12.9-19.4                       | 3.2                    |

\* La tasa de sedimentación de Gallocanta se obtuvo a partir de Rodó *et al.* (2002).

La mediana de las edades de los *huevos con aspecto saludable* indica que la mayoría de estos huevos son relativamente jóvenes, si bien los valores máximos de supervivencia en el sedimento pueden ser mucho más elevados. Cuando se comparan las edades de los *huevos con aspecto saludable* entre las lagunas datadas, se encuentran diferencias importantes. Así, mientras que la edad máxima estimada en Gallocanta es de 13-20 años, ésta alcanza los 60-80 años en la laguna del Camino de Villafranca.

Consistentemente con la acumulación de *huevos con aspecto saludable* en las capas superficiales, la distribución promedio de éstos en el conjunto de lagunas muestra una tendencia decreciente con la profundidad (Figura 2.9). Sin embargo, no se encontró ningún patrón claro con la profundidad para la fracción de *huevos eclosionados*, si bien éstos fueron típicamente menos frecuentes en las capas más profundas del sedimento.

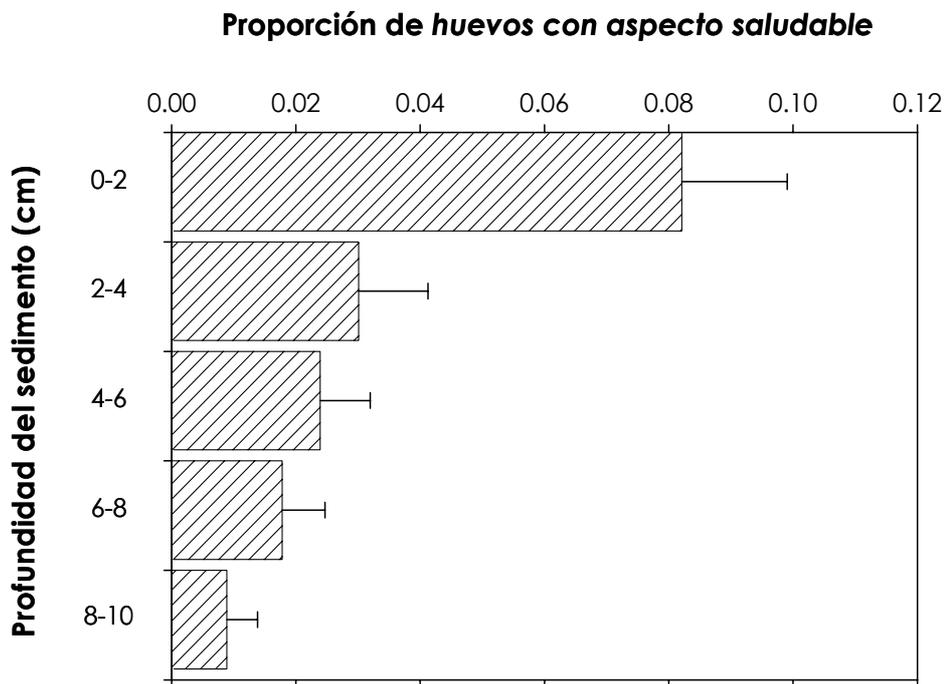


Figura 2.9. Distribución en profundidad en el sedimento de la proporción de *huevos diapásicos con aspecto saludable*. Los valores para cada capa de sedimento son medias para el conjunto de lagunas estudiadas más el error típico.

## Discusión

Cuando se comparan con otros invertebrados acuáticos – básicamente copépodos y cladóceros –, los rotíferos presentan características ecológicas particulares. En primer lugar, los rotíferos tienen tiempos de generación más cortos que los de estos otros organismos, así como también tasas de

crecimiento mayores. Además, las poblaciones de rotíferos suelen ser temporales y se considera que son relativamente vulnerables a las interacciones bióticas (*i.e.*, competencia y depredación). Dado que estas características pueden tener implicaciones importantes para la evolución de los patrones de diapausa, es necesario preguntarse si los patrones observados en los bancos de huevos diapáusicos de otros organismos zooplanctónicos, hasta la fecha mucho mejor estudiados, pueden generalizarse a los bancos de huevos diapáusicos de los rotíferos monogonontes. El presente estudio proporciona información a este respecto y aporta, por primera vez, abundantes datos cuantitativos para el análisis demográfico de los bancos de huevos diapáusicos de rotíferos.

Hasta la fecha, los estudios acerca de los bancos de huevos diapáusicos de organismos zooplanctónicos se han centrado exclusivamente en la descripción y el análisis de huevos aparentemente sanos (Marcus, 1990; Hairston *et al.*, 1995; Cáceres, 1998), que, se supone, representan la fracción de huevos viables en el sedimento. Cuando se comparan con otros organismos del zooplancton, los bancos de huevos diapáusicos de rotíferos muestran propiedades globales similares. Los resultados del presente trabajo indican la presencia de *huevos con aspecto saludable* en densidades elevadas en los bancos del complejo de especies. Así, con la excepción de dos lagunas en las que no se encontraron huevos diapáusicos de este tipo, la densidad de estos huevos osciló entre 2 y 200 huevos  $\text{cm}^{-2}$ , que está dentro del mismo rango de valores de densidad encontrados para otros organismos zooplanctónicos (1-1000 huevos  $\text{cm}^{-2}$ ; véase Hairston, 1996).

Coincidiendo con lo que ocurre en cladóceros y copépodos (Herzig, 1985; De Stasio, 1989; Viitasalo y Katajisto, 1994; Weider *et al.*, 1997; Cáceres, 1998; Cousyn y De Meester, 1998; Faustová *et al.*, 2004), los *huevos diapáusicos con aspecto saludable* de los rotíferos no presentan un patrón de abundancia uniforme en relación con la profundidad del sedimento. Su distribución vertical en las lagunas estudiadas es compleja, y no

necesariamente decreciente, lo que señala que los factores que afectan a la distribución de los huevos diapáusicos en rotíferos fluctúan temporalmente y de manera diferente entre lagunas incluso a escala regional. Por ejemplo, la detección de patrones verticales no decrecientes sugiere variación interanual en la producción de huevos diapáusicos. Este hecho no debe resultar sorprendente en lagunas someras en la región mediterránea dado que las poblaciones de rotíferos que habitan estas charcas pueden verse ampliamente afectadas por la fluctuación climática típica de esta zona, así como por efectos climáticos locales. La existencia de esta variación interanual también se ve apoyada por los patrones verticales de densidad de huevos diapáusicos totales, una variable relacionada más directamente con la producción de huevos diapáusicos.

Recuérdese que la abundancia de huevos diapáusicos totales es una estima de la producción neta de huevos diapáusicos – es decir, de las pérdidas debidas a la depredación o a la exportación (*i.e.*, dispersión). Nótese también que la pérdida por exportación podría ser particularmente importante en aquellas charcas y lagunas que se desecan durante largos periodos de tiempo (*i.e.*, charcas efímeras), pues los huevos diapáusicos podrían ser arrastrados y dispersados por medio de vectores tales como corrientes de viento (Langley *et al.*, 2001; Cáceres y Soluk, 2002). El hecho de que algunas charcas y lagunas no presenten *huevos diapáusicos con aspecto saludable* y que otras apenas presenten banco, sugiere que la pérdida de huevos podría ser un fenómeno importante en algunos casos.

Por otra parte, a pesar de la complejidad de algunos perfiles verticales, los *huevos diapáusicos con aspecto saludable* son notablemente menos frecuentes en capas profundas del sedimento. En ocasiones, se han encontrado incluso patrones estrictamente decrecientes en la abundancia de dichos huevos. Este hecho sugiere la existencia de un efecto de envejecimiento de los huevos diapáusicos, que se aprecia más claramente

cuando se analiza el patrón vertical de la proporción de *huevos con aspecto saludable* con respecto a los huevos diapáusicos totales (Figura 2.9).

La mayoría de los *huevos con aspecto saludable* se encuentra en las capas superficiales de sedimento lo que, unido a la información obtenida a partir de la datación de los sedimentos, sugiere que los bancos de huevos diapáusicos con potencial para el restablecimiento de la población activa son relativamente jóvenes. La edad máxima de los *huevos con aspecto saludable* fue de 60-80 años, que es un valor próximo a los encontrados en estudios previos en rotíferos (65 años en *B. rotundiformis*; Kotani *et al.*, 2001; 100 años también en *B. rotundiformis* en un estudio de Hyrayama y Fu, citado por King y Serra (1998)), aunque mucho menor que los tiempos máximos de supervivencia encontrados en cladóceros (125 años; Cáceres, 1998) o copépodos (hasta 300 años; Hairston *et al.*, 1995). No obstante, la edad de los bancos de huevos diapáusicos en nuestro estudio puede ser dependiente de las propiedades del hábitat (p.ej., charcas someras temporales) más que constituir una característica diferencial de los rotíferos.

Como se ha dicho, los estudios de bancos de huevos diapáusicos del zooplancton no han considerado *huevos eclosionados* ni *huevos deteriorados*. Por una parte, como ya se ha avanzado, la utilidad de cuantificar los *huevos eclosionados* consiste en que puede estimarse el número de individuos obtenidos a partir de la eclosión de estos huevos. Nótese que si las tasas de sedimentación son conocidas podría estimarse la contribución o reclutamiento anual desde el sedimento a la población activa. Por otra parte, un resultado sorprendente del presente estudio, y que ha podido obtenerse por la cuantificación completa del banco de huevos, es que los *huevos deteriorados* pueden llegar a representar el 90 % del total de huevos producidos inicialmente, de manera que podemos concluir que el destino más probable para un huevo en el sedimento es el deterioro. Este hecho apunta a que el sedimento no es un refugio tan seguro para las poblaciones de rotíferos como se había sugerido anteriormente. Además,

dado que los *huevos deteriorados* se encontraron en todas las capas de sedimento estudiadas, incluso en las más jóvenes, el deterioro de los huevos en nuestras lagunas parece ser un proceso relativamente rápido.

Los datos aquí presentados muestran la existencia de grandes diferencias entre lagunas en la abundancia de huevos totales. Estas diferencias podrían ser en parte una consecuencia de las diferentes tasas de sedimentación de las lagunas estudiadas, de manera que estaríamos comparando sedimentos que integran un número diferente de años. No obstante, las grandes diferencias observadas en la abundancia de huevos diapáusicos (véase, por ejemplo Hondo Norte y Camino de Villafranca) son difíciles de explicar basándose únicamente en estas diferencias de las tasas de sedimentación. Nótese que si, por ejemplo, en Hondo Norte se asume una tasa de sedimentación elevada, de  $1 \text{ cm año}^{-1}$ , harían falta 57 años para igualar la producción anual de la laguna del Camino de Villafranca (con una tasa de sedimentación conocida de  $0.10 \text{ cm año}^{-1}$ ). Este razonamiento, extraordinariamente conservativo, muestra que, efectivamente, existen diferencias en la producción anual de huevos diapáusicos entre las lagunas estudiadas.

Las lagunas del interior presentan, en promedio, más huevos diapáusicos que las lagunas costeras. Dado que no existen evidencias a favor de que las lagunas del interior tengan tasas de sedimentación mayores que las costeras, las diferencias en la producción de huevos diapáusicos totales entre lagunas costeras y del interior no parecen atribuibles a dicha causa. Las lagunas del interior son endorreicas, altamente salinas – una condición que favorece a las especies del complejo *B. plicatilis* – y ricas en nutrientes (Vicente *et al.*, 1998), lo que debe implicar una alta producción de huevos diapaúsicos. Se sabe además que las especies pertenecientes al complejo *B. plicatilis* dominan la comunidad de rotíferos en las lagunas del interior que aquí se estudian, mientras que éste no es el caso en las lagunas

costeras, que también son, por otra parte, altamente productivas (Lapesa, 2004).

Nuestros resultados también indican la existencia de diferencias en la producción de huevos diapáusicos entre lagunas asociadas a la duración del hidroperiodo. Sin embargo, esta relación parece depender críticamente del hecho de que una de las lagunas con corta duración del hidroperiodo presenta un banco de huevos diapáusicos extraordinariamente abundante (*i.e.*, la laguna del Camino de Villafranca).

En resumen, los datos aportados en este capítulo contribuyen a subsanar el defecto de información sobre los bancos de huevos diapáusicos de rotíferos. Los resultados muestran que los valores de densidad de *huevos con aspecto saludable* son similares a los de otros grupos de organismos del zooplancton, si bien existen diferencias en sus tiempos máximos de supervivencia. Este estudio demuestra además que otras categorías de huevos (*i.e.*, *huevos eclosionados* y *deteriorados*) son útiles en el estudio de los patrones y procesos demográficos asociados a los bancos de huevos diapáusicos (véanse los capítulos 3 y 4).

# 3

## **Un modelo simple para estudiar la relación entre características del hábitat y propiedades de los bancos de huevos diapáusicos de rotíferos**

### **Introducción**

Se espera que las propiedades que exhiben los bancos de huevos diapáusicos sean, al menos parcialmente, el resultado de la selección natural. La producción y eclosión de los huevos diapáusicos son componentes de eficacia biológica, y su evolución puede estudiarse bajo el enfoque de la teoría general de rasgos de la historia vital. De esta forma, se espera que las características de los hábitats donde se encuentran las poblaciones de rotíferos (p.ej., temporalidad, adversidad, predecibilidad, etc.) estén correlacionadas con sus patrones de diapausa. Estos patrones se pueden expresar básicamente en términos de producción y fracción de eclosión (Cohen, 1966; 1970; Cáceres y Tessier, 2003; 2004a; 2004b; véase también el capítulo 1 de esta tesis).

En este capítulo se pone de manifiesto cómo la magnitud de determinados procesos demográficos que afectan a los huevos diapáusicos (p.ej., producción, degradación o mortalidad, eclosión), y que dependen de las características del hábitat, puede ser inferida a partir de propiedades observables de los bancos de huevos diapáusicos (*i.e.*, las abundancias de

las diferentes categorías de huevos diapáusicos que pueden identificarse en el sedimento). Con este propósito se desarrolla un modelo dinámico simple, basado en diferentes categorías de huevos diapáusicos según su estado de deterioro (véase el capítulo 2).

### **Un modelo simple para la dinámica de los huevos diapáusicos en el sedimento**

Como variables del modelo se han utilizado tres categorías de huevos diapáusicos, ya presentadas en el capítulo anterior (véase el capítulo 2 para más detalles):

- (1) *Huevos diapáusicos con aspecto saludable*, considerados como viables. La densidad de este tipo de huevos se representa como  $V$  en el modelo.
- (2) *Huevos eclosionados*, envueltas vacías que presentan la típica apertura por donde las hembras neonatas salen del huevo. Esta categoría, cuya densidad se representa como  $E$  en el modelo, es indicativa de los huevos diapáusicos que eclosionaron, y por lo tanto fueron viables, en el pasado.
- (3) *Huevos deteriorados*, considerados inviables. La densidad de estos huevos se representa como  $D$  en el modelo.

Las dinámicas de estas tres categorías de huevos están controladas por varios procesos, entre los que se incluyen: (1) la producción de huevos diapáusicos, que tiene lugar en la columna de agua, (2) el deterioro de los huevos diapáusicos, que ocurre mientras están enterrados en el sedimento, (3) la eclosión de huevos diapáusicos desde el sedimento e incorporación de las formas activas a la columna de agua, y (4) la pérdida de huevos

diapáusicos, debida al enterramiento en capas profundas del sedimento o a la fragmentación mecánica de los huevos, y que en principio se supone que es diferente para las diferentes categorías de huevos.

El modelo conceptual que relaciona estas variables y procesos se presenta gráficamente en la figura 3.1.

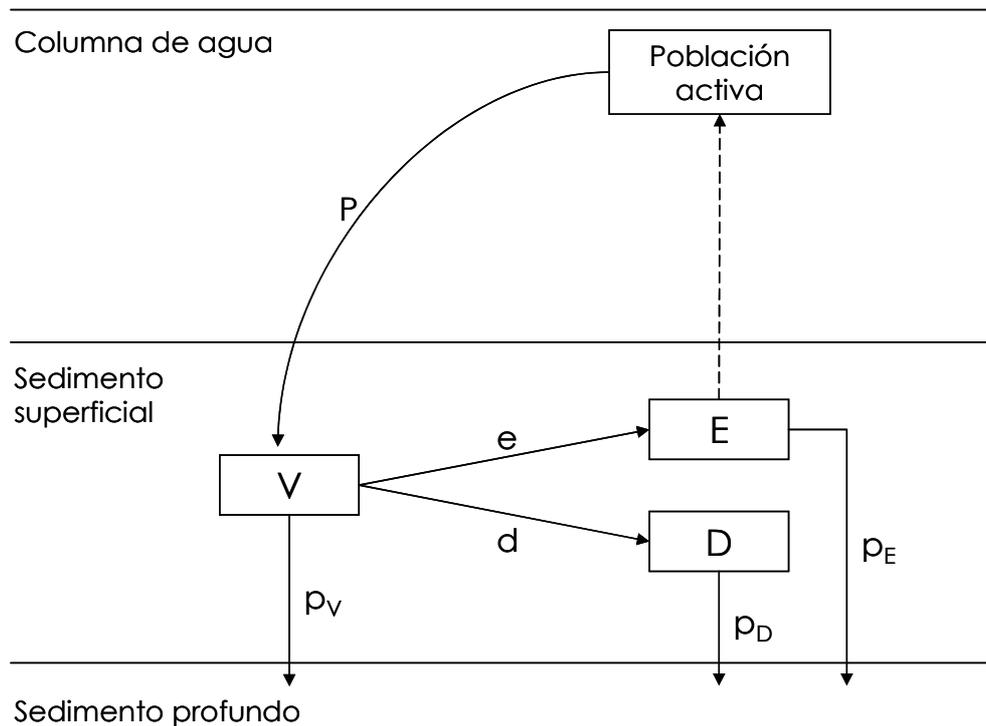


Figura 3.1. Diagrama de la dinámica de bancos de huevos diapáusicos. Las flechas indican flujos entre tipos de huevos diapáusicos y entre los compartimentos del sistema *columna de agua-sedimento*. La flecha con línea discontinua representa la emergencia de neonatas a partir de la eclosión de huevos diapáusicos del sedimento. Variables: *Huevos con aspecto saludable* ( $V$ ), *huevos eclosionados* ( $E$ ), *huevos deteriorados* ( $D$ ). Parámetros: tasa de producción de huevos diapáusicos ( $P$ ) ( $\text{tiempo}^{-1}$ ), tasa de eclosión *per capita* ( $e$ ), tasa de deterioro *per capita* ( $d$ ), tasa de pérdida *per capita* de huevos con aspecto saludable ( $p_V$ ), tasa de pérdida *per capita* de huevos eclosionados ( $p_E$ ), tasa de pérdida *per capita* de huevos deteriorados ( $p_D$ ). Nótese que aunque en el modelo sólo se consideran dos compartimentos en el sedimento (superficial y profundo), las tasas de los procesos implicados podrían representar los valores promedio para un sedimento superficial estructurado en capas (véase el texto).

Se proponen las siguientes ecuaciones para describir las dinámicas de las tres categorías de huevos consideradas:

$$\Delta V / \Delta t = P - eV - dV - p_V V$$

$$\Delta E / \Delta t = eV - p_E E$$

$$\Delta D / \Delta t = dV - p_D D$$

donde  $P$  es la tasa de producción de huevos diapáusicos en la columna de agua,  $e$  es la tasa de eclosión *per capita*,  $d$  es la tasa de deterioro de huevos diapáusicos *per capita*, y los parámetros  $p$  son las tasas de pérdida *per capita* de cada una de las categorías de huevos diapáusicos consideradas.

A pesar de que la edad de los huevos puede afectar al deterioro y a la eclosión, y que la situación de los huevos diapáusicos en diferentes capas del sedimento podría afectar a las tasas, el modelo propuesto no incluye de forma explícita la estructura en clases de edad del banco de huevos o su distribución en profundidad. El modelo es consistente con el supuesto de que se está describiendo una capa superficial del sedimento, bien mezclada y lo suficientemente delgada como para que la eclosión no se vea afectada por diferencias en la profundidad a la que se encuentran los huevos. Bajo este supuesto, se puede alcanzar, de manera asintótica, una situación de equilibrio si se considera que la producción ( $P$ ) y las tasas de pérdida de huevos *per capita* ( $p_V$ ,  $p_E$ ,  $p_D$ ) son constantes.

Además de lo anterior, el modelo también sería consistente con un escenario ecológico en el que la eclosión, el deterioro y las pérdidas sean dependientes de la edad de los huevos diapáusicos. Así mismo, el modelo podría describir un sedimento en el que (1) la profundidad a la que se encuentran los huevos afecta a los procesos que sufren éstos, y (2) los huevos pueden desplazarse arriba y abajo en el sedimento; esto es, puede haber mezcla entre las capas del sedimento. Si las tasas que describen los diferentes procesos que afectan a la dinámica del banco de huevos

diapáusicos no varían con el tiempo, entonces la composición del banco de huevos en lo que se refiere a (1) la edad de los huevos, (2) la profundidad a la que se encuentran los huevos, y (3) las diferentes categorías de huevos, convergerá a un estado estable, tal y como predice la teoría general de poblaciones estructuradas en clases de estado (Caswell, 2001). Más aún, si la entrada de huevos en el sedimento tras cada estación de crecimiento ( $P$ ) es constante, la composición del banco converge a un estado estacionario (véase el apéndice C). De esta manera, incluso en un banco de estructura compleja, se espera alcanzar una situación asintótica de equilibrio. En este equilibrio, las tasas del modelo serían el promedio de las tasas dependientes de edad y profundidad. Por ejemplo, la tasa de deterioro sería  $d = \sum_{ij} d_{ij} (V_{ij} / [\sum_{ij} V_{ij}])$ , donde  $i$  se refiere a la edad de los huevos,  $j$  designa la capa del sedimento en la que un huevo se encuentra, y  $(V_{ij} / [\sum_{ij} V_{ij}])$  es la fracción de los huevos con aspecto saludable, supuestamente viables, de edad  $i$  en la profundidad  $j$ . Este procedimiento es análogo a la práctica, por otra parte bien conocida, de calcular una tasa de natalidad en una población estructurada en clases de edad a partir de la composición estable en clases de edad y de las tasas de fecundidad específicas de cada edad (Begon *et al.*, 1995).

La variación en las tres categorías de huevos diapáusicos consideradas se describe mediante ecuaciones en diferencias, pues se supone que algunos de los procesos que afectan a los huevos diapáusicos actúan en pulsos. Este supuesto implica que los valores de equilibrio se refieren a observaciones periódicas con la misma frecuencia que la de los pulsos. También implica que los valores observados en el equilibrio pueden ser diferentes según el momento del ciclo poblacional en que se realiza el censo.

Contrariamente al supuesto de constancia en los parámetros del modelo, se admite que éstos pueden presentar variación temporal en la naturaleza. De hecho, el modelo se aplicará a escenarios ecológicos donde

la producción de huevos diapáusicos ( $P$ ) puede variar de año a año. No obstante, esta variación no se ha considerado aquí ya que los parámetros del modelo pueden estudiarse como valores promedio sobre una escala apropiada de tiempo. Debido a que el sedimento integra la producción de varios años – o estaciones de crecimiento – es razonable suponer que las abundancias de las diferentes categorías de huevos observadas serán próximas a los valores promedio de las variables del modelo.

Bajo estos supuestos, simplemente igualando las tres ecuaciones anteriores a cero ( $\Delta V/\Delta t = \Delta E/\Delta t = \Delta D/\Delta t = 0$ ), es posible encontrar los valores de equilibrio para las abundancias de las tres categorías de huevos diapáusicos consideradas:

$$V = P/(e + d + p_v)$$

$$E = (e/p_e) [P/(e + d + p_v)]$$

$$D = (d/p_d) [P/(e + d + p_v)]$$

A partir de los valores de equilibrio de los distintos tipos de huevos diapáusicos se encuentran las siguientes relaciones entre los procesos demográficos que afectan al banco de huevos y a las densidades de los diferentes tipos de huevos diapáusicos:

$$E/V = e/p_v$$

$$D/V = d/p_d$$

$$B = P [1 + (e/p_v) + (d/p_d)]/(e + d + p_v)$$

donde  $B$  representa el tamaño del banco de huevos diapáusicos en el equilibrio ( $B = V + E + D$ ). Se considera aquí que el banco de huevos diapáusicos incluye tanto *huevos con aspecto saludable* como *huevos deteriorados y eclosionados*, y que todos los huevos diapáusicos son viables en el momento en que son producidos, aunque posteriormente alcancen diferentes destinos.

Las ecuaciones anteriores pueden simplificarse en gran medida si se supone que las tasas de pérdida son iguales para las diferentes categorías de huevos diapáusicos ( $p_V = p_E = p_D = p$ ), dando lugar a las siguientes expresiones:

$$E/V = e/p$$

$$D/V = d/p$$

$$B = P/p$$

El supuesto anterior es válido si las tasas de pérdida se deben a procesos físicos independientes del tipo o categoría de huevo (p.ej., enterramiento, fragmentación mecánica, etc.). La depredación, que podría ocurrir preferentemente sobre los *huevos con aspecto saludable*, no se considera aquí como un mecanismo de pérdida sino como un proceso de deterioro. Aunque el conocimiento actual sobre depredación de formas de resistencia es todavía escaso, se ha sugerido que los depredadores potenciales de huevos diapáusicos (nematodos y tardígrados) no ingieren los huevos sino que los perforan y succionan sus contenidos celulares (Marcus y Boero, 1998). En consecuencia, cabe esperar que los huevos vacíos por depredación permanezcan en el sedimento donde se pueden reconocer y clasificar como *huevos deteriorados*.

Las ecuaciones del modelo, aunque sencillas, señalan un hecho importante: la abundancia de las categorías de huevos consideradas se ve afectada por varios procesos (véase, por ejemplo, la abundancia de los *huevos con aspecto saludable*,  $V$ ). En consecuencia, inferir la intensidad de un proceso es difícil cuando se estudia exclusivamente la abundancia de una única categoría de huevo diapáusico, como ha sido la norma general en la mayoría de estudios previos sobre bancos de huevos diapáusicos en organismos zooplanctónicos.

De manera similar, el modelo presentado pone de manifiesto que las proporciones de los diferentes tipos de huevos diapáusicos en el sedimento tampoco son buenos indicadores de los procesos que ocurren y afectan al banco. De hecho, algunas razones entre tipos de huevos, como por ejemplo la proporción de *huevos diapáusicos con aspecto saludable* con respecto al total de huevos diapáusicos del banco ( $V/B$ ), tienen una determinación compleja [p.ej.,  $V/B = p/(e + d + p)$ ] y no permiten extraer conclusiones fácilmente.

Finalmente, hay que señalar que, dado que se han modelizado tres variables y cuatro procesos, no se pueden estimar las tasas a las que ocurren los procesos directamente a partir de las abundancias de los distintos tipos de huevos diapáusicos. No obstante, sí se pueden formular expectativas sobre las intensidades relativas de los procesos en diferentes ambientes mediante el estudio de los valores relativos de las densidades de los diferentes tipos de huevos diapáusicos en dichos ambientes.

### **Características del hábitat, procesos asociados a la diapausa, y patrones de las categorías de huevos diapáusicos**

Las tasas de los procesos que se han presentado en el modelo deben ser el resultado de la imposición de las características del hábitat sobre los organismos, y la respuesta evolutiva de éstos. Algunas de estas tasas serán maximizadas o minimizadas por selección natural, mientras que otras serán optimizadas. Aquí se propone una clasificación comparativa de los hábitats, que relaciona las principales características ambientales, las tasas de los procesos que afectan a la dinámica del banco de huevos, y las abundancias de las diferentes categorías de huevos diapáusicos reconocidas (Figura 3.2).

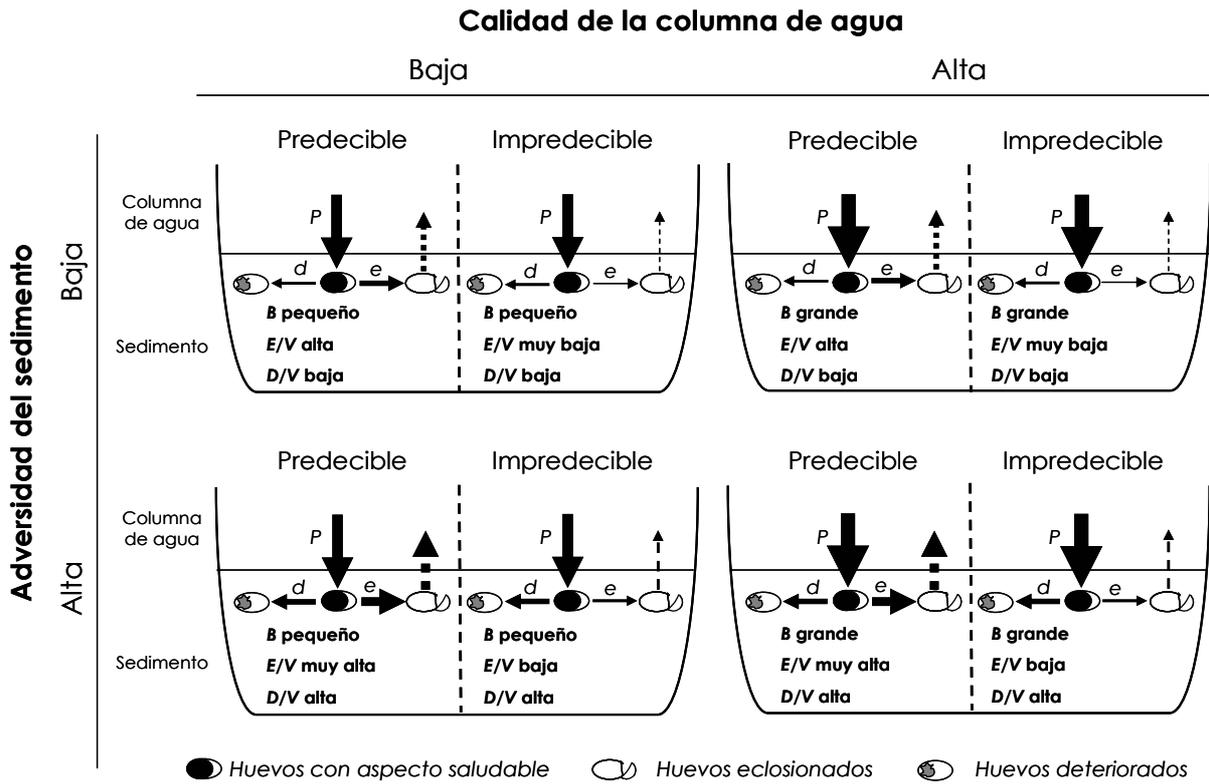


Figura 3.2. Intensidad de los procesos (baja, media y alta; indicada por flechas de menor a mayor grosor) que afectan a los bancos de huevos diapáusicos en relación con las características del hábitat (calidad de la columna de agua, predecibilidad de la columna de agua, y adversidad del sedimento).  $P$ : tasa de producción de huevos ( $\text{tiempo}^{-1}$ );  $e$ : tasa de eclosión *per capita*;  $d$ : tasa de deterioro *per capita*. Las flechas discontinuas indican la emergencia de hembras neonatas a partir de la eclosión de huevos diapáusicos. Nótese que cuando la adversidad del sedimento y la predecibilidad de la columna de agua tienen efectos opuestos sobre la tasa de eclosión se supone que impera la segunda (véase el texto). Se incluye también la composición esperada del banco de huevos ( $E/V$ , razón de huevos eclosionados frente a huevos con aspecto saludable;  $D/V$ , razón de huevos deteriorados frente a huevos con aspecto saludable;  $B$ , abundancia de todos los tipos de huevos (*i.e.*, tamaño del banco). Las figuras de los diferentes tipos de huevos diapáusicos están inspiradas en el rotífero monogononte *Brachionus plicatilis*.

Muchas poblaciones zooplanctónicas son temporales (poblaciones efímeras, estacionales, y poblaciones que, en general, no pueden persistir en la columna de agua durante todo el ciclo anual), aún cuando habitan charcas, lagunas o lagos permanentes. Es por ello que la producción de

huevos diapáusicos debe estar fuertemente correlacionada con la eficacia biológica de estas poblaciones. De otra forma, si no se producen huevos diapáusicos, las poblaciones no serían capaces de sobrevivir. Cuando se toma la producción de huevos diapáusicos como una medida de eficacia interanual, se desprecian las posibles diferencias que pueden darse en la calidad de los huevos diapáusicos producidos debidas a cuestiones genéticas o fisiológicas (por ejemplo, diferencias en la supervivencia de los huevos diapáusicos debido a diferencias en la disponibilidad de alimento en el medio en el momento de su producción). Como ya se ha avanzado, la producción a la que se refiere este análisis es la producción neta, una vez deducida la pérdida de huevos por exportación (que, por otro lado, contribuye a la eficacia biológica) y pérdidas en la columna de agua por depredación.

Bajo estos supuestos simplificadores, en poblaciones temporales como las estudiadas en esta tesis, la tasa de producción de huevos diapáusicos ( $P$ ) debería ser maximizada por selección natural (Serra *et al.*, 2005), y limitada por la calidad de la columna de agua, un concepto que aglutina tanto factores bióticos como abióticos (p.ej., concentración de recursos alimenticios, competencia, densidades de depredadores, etc.). Una calidad elevada permitirá alcanzar altas densidades poblacionales en la columna de agua durante periodos prolongados (entre dos periodos adversos; recuérdese la temporalidad de las poblaciones), y ello determinará una alta producción de huevos diapáusicos. Así pues, como se aprecia en la figura 3.2, una alta producción de huevos diapáusicos es indicativa de alta calidad de la columna de agua.

La tasa de deterioro de los huevos diapáusicos en el sedimento ( $d$ ) debe, por el contrario, ser minimizada por selección natural. Una alta resistencia al deterioro podría estar comprometida por una alta producción de huevos diapáusicos (menor producción de huevos más resistentes al deterioro *versus* mayor producción de huevos menos resistentes), si bien este

aspecto no se ha considerado aquí. De esta forma, se presume que la tasa de deterioro está controlada exclusivamente por las condiciones del sedimento, que incluirían tanto factores bióticos (p.ej., depredación no 'ingestiva' de huevos diapáusicos) como abióticos (p.ej., desecación de la laguna, temperaturas extremas, toxicidad, etc.). En otras palabras, la tasa de deterioro es el efecto demográfico de la adversidad del sedimento.

La tasa de eclosión ( $e$ ) evoluciona bajo selección optimizadora, donde las características del sedimento y de la columna de agua actúan como presiones de selección. Por una parte, los huevos diapáusicos tenderán a eclosionar cuando las condiciones en la columna de agua 'parezcan' favorables. Eclosionar es ventajoso porque el destino último de un huevo diapáusico enterrado en el sedimento es el deterioro y la muerte. Así, debería haber una tendencia hacia tasas de eclosión altas como parte de una estrategia evolutiva para la explotación de la parte productiva del hábitat (*i.e.*, la columna de agua). Esta tendencia será tanto mayor, cuanto mayor sea la tasa de deterioro en el sedimento. No obstante, a pesar de los costes asociados a la permanencia en el sedimento, las tasas de eclosión pueden ser menores cuando el riesgo en la columna de agua es alto. Esto puede ocurrir cuando las señales que anuncian el regreso de las buenas condiciones ambientales no están perfectamente correlacionadas con dichas condiciones, y entonces eclosionar es arriesgado porque algunos años pueden no ser buenos para el crecimiento de la población y la producción de nuevos huevos diapáusicos (Cohen, 1970; Spencer *et al.*, 2001). En definitiva, se esperan tasas de eclosión bajas en hábitats con alta impredecibilidad de la columna de agua. La impredecibilidad hace referencia a la varianza asociada a la estación de crecimiento. Las tasas de eclosión serán más o menos altas según que la probabilidad de producir nuevos huevos diapáusicos en una nueva estación de crecimiento exceda, o no, la probabilidad de un huevo diapáusico de sobrevivir enterrado en el sedimento.

## Discusión

Si bien los patrones de abundancia en bancos de huevos diapáusicos de organismos zooplanctónicos se pueden interpretar, de manera efectiva, mediante argumentos verbales o modelos conceptuales no formales (De Stasio, 1989; Cáceres, 1998; Cáceres y Hairston, 1998), el uso de modelos matemáticos formales puede aportar nuevas perspectivas al conocimiento de los bancos de huevos diapáusicos. En este capítulo se presenta un modelo simple que permite comparar diferentes hábitats mediante las abundancias de los huevos diapáusicos presentes en el sedimento. Este modelo aclara las relaciones existentes entre los procesos que actúan sobre los huevos diapáusicos (deterioro, eclosión, pérdida) y las abundancias observables de determinados tipos de huevos diapáusicos. Además, el modelo hace explícitos algunos supuestos que son necesarios para poder extraer las conclusiones.

El modelo matemático aquí presentado señala la dificultad que existe para extraer conclusiones sobre los procesos que afectan a los bancos de huevos diapáusicos si sólo se cuantifica la abundancia de los huevos diapáusicos aparentemente sanos (*huevos con aspecto saludable*), lo que típicamente se ha denominado tamaño del banco de huevos (en contraste con la terminología empleada aquí, donde ésta expresión significa número total de huevos diapáusicos independientemente de cuál sea su estado de deterioro). Siendo conscientes de la dificultad arriba señalada, algunos autores han medido directamente algunas de las tasas de la dinámica de los bancos de huevos diapáusicos (básicamente las tasas de producción y de eclosión; De Stasio, 1989; Wolf y Carvalho, 1989; Cáceres, 1998; Hairston *et al.*, 2000; Cáceres y Tessier, 2003). No obstante, la estima directa de las tasas plantea dificultades técnicas, e incluso podría estar sesgada por el propio método de medición, debido a su carácter manipulativo. El modelo que aquí se plantea permite estimar la importancia relativa entre las tasas

mediante la estima de las abundancias de distintas categorías de huevos diapáusicos.

Todavía queda por determinar si estos tres tipos de huevos diapáusicos pueden reconocerse de manera general para otros organismos del zooplancton, con lo que el modelo ganaría en generalidad. Actualmente se sabe que estas tres categorías de huevos pueden estimarse en muestras de sedimento para poblaciones de rotíferos del género *Brachionus* (Arndt, 1991; véase también el capítulo 2 de esta tesis) y *Hexarthra* (E. M. García-Roger, observación personal). Además, en muchos otros géneros de rotíferos (p.ej., *Notholca*, *Filinia*, *Conochilus*) los huevos diapáusicos se abren también vía un opérculo o a través de líneas de sutura visibles (Gilbert, 1974), por lo que probablemente la identificación de huevos eclosionados sea posible. En lo referente a otros grupos taxonómicos, se sabe que la eclosión de huevos diapáusicos en el copépodo *Hesperodiptomus* resulta en dos valvas hemisféricas que han sido utilizadas para inferir la presencia histórica y la eclosión de este copépodo en varios estudios paleolimnológicos (Parker *et al.*, 1996; Knapp *et al.*, 2001). Los huevos diapáusicos de cladóceros del género *Daphnia* se abren por una zona poco quitinosa del huevo que suele generar también dos mitades iguales tras la eclosión (R. Ortells, comunicación personal). Teniendo en cuenta el poco esfuerzo invertido en la investigación en este campo, estas evidencias, aunque escasas, son prometedoras. Por otra parte, cabe destacar que el modelo desarrollado aquí permite conocer cuáles son las consecuencias de no poder identificar y cuantificar los huevos eclosionados. Nótese que si sólo se disponen de los datos de abundancia para huevos con aspecto saludable y huevos deteriorados, las predicciones acerca de los procesos que afectan a la dinámica del banco de huevos diapáusicos serán muy pobres.

Los rasgos de la historia vital favorecidos por la selección natural dependen de los hábitats en los que se encuentran los organismos

estudiados. Son las características del hábitat las que acaban moldeando los ciclos vitales tal y como los observamos. Así, si se quieren establecer relaciones entre las propiedades de los hábitats y los rasgos de la historia vital, es necesario recurrir a una clasificación precisa de los hábitats, clasificación que debe atender al punto de vista de los organismos estudiados (Begon *et al.*, 1995). El modelo que se presenta aquí permite establecer una clasificación de los hábitats basada en las propiedades demográficas de las poblaciones de rotíferos. Esta clasificación hace énfasis en la asociación entre las fases activa y diapáusica de las poblaciones, y tiene en consideración tanto las propiedades de la columna de agua como las del sedimento. Además, esta clasificación de los hábitats permite comprobar predicciones sobre los patrones de diapausa en organismos del zooplancton en el contexto general de la teoría de la evolución de rasgos de la historia vital. Éstos se estudian típicamente bajo un enfoque puramente cualitativo, mediante la ordenación de los valores del rasgo estudiado (p.ej., la asignación reproductiva) cuando se comparan diferentes hábitats (Begon *et al.*, 1995). La teoría *r/K* es un ejemplo clásico de este tipo de clasificación demográfica de los hábitats (MacArthur y Wilson, 1967). Según esta teoría, se predice la asociación de individuos (poblaciones o especies) con unas determinadas características de tamaño, longevidad y fecundidad con tipos de ambientes determinados (Pianka, 1970). Aquí se propone un enfoque similar para estudiar los patrones de diapausa (*i.e.*, producción y eclosión de huevos diapáusicos). La pregunta que aquí se formula es: ¿cómo varían los patrones de diapausa de las poblaciones de rotíferos según las características del ambiente en que habitan?

En el caso particular de esta tesis, los hábitats donde se encuentran las poblaciones de rotíferos estudiadas se han clasificado según tres propiedades – calidad de la columna de agua, predecibilidad de la columna de agua y adversidad del sedimento – con efectos sobre los principales procesos demográficos de los huevos diapáusicos – producción, deterioro y eclosión – relacionados con la eficacia biológica. La producción

de huevos diapáusicos y el deterioro de los mismos están directamente relacionados con las características del hábitat (*i.e.*, calidad de la columna de agua y adversidad del sedimento, respectivamente). Sin embargo la tasa de eclosión de huevos diapáusicos en el sedimento, al menos en el caso de poblaciones temporales como las que en el contexto de esta tesis nos ocupan, debe ser el resultado del balance (*i.e.*, optimización) entre la calidad del sedimento como refugio y la incertidumbre asociada a la eclosión (Cohen, 1966; 1970).

La clasificación demográfica de los hábitats que aquí se presenta permite establecer predicciones sobre los principales procesos que afectan a los huevos diapáusicos cuando se estudian distintas poblaciones, simplemente mediante la comparación de las abundancias y de las razones entre los distintos tipos de huevos diapáusicos enterrados en el sedimento. Así por ejemplo, se espera que los hábitats de alta calidad de la columna de agua (p.ej., ricos en niveles de recursos y que permiten, en general, altas tasas de crecimiento poblacional) produzcan gran cantidad de huevos diapáusicos. Las condiciones en el sedimento también pueden inferirse a partir de la composición del banco de huevos diapáusicos. Por ejemplo, se espera encontrar valores altos de la razón entre *huevos deteriorados* frente a *huevos con aspecto saludable* ( $D/V$ ) en aquellos hábitats donde la adversidad del sedimento sea alta. Precisamente, en el análisis de las muestras de sedimento del conjunto de charcas someras y lagunas salobres de la región oriental de la Península Ibérica realizado en esta tesis (véase el capítulo 2), se han encontrado porcentajes altos de *huevos diapáusicos deteriorados* del rotífero *B. plicatilis* ( $85.7 \pm 8.7 \%$ ). Este hallazgo, en concordancia con las predicciones teóricas, apunta al hecho ya señalado en el capítulo 2 de que el sedimento no es, al menos en estos sistemas, un refugio tan seguro como se pensaba previamente, y sugiere que la adversidad del sedimento puede actuar como factor de presión selectiva modelando los patrones de diapausa.

El análisis realizado muestra que la predecibilidad del hábitat está relacionada con la razón entre *huevos diapáusicos eclosionados* y *huevos con aspecto saludable* ( $E/V$ ). Si la predecibilidad de la columna de agua es baja, como puede ser el caso de una charca efímera, se espera que la razón  $E/V$  sea también baja. Esto es, se espera que eclosionen muy pocos huevos diapáusicos con respecto a los que quedan todavía viables enterrados en el sedimento. Por el contrario, en un hábitat predecible, aún siendo temporal (p.ej., una charca estacional), cabría esperar que la razón  $E/V$  tome valores mayores debido a la expectativa de tasas de eclosión más altas (Cohen, 1966; Ellner *et al.*, 1998). De acuerdo con el análisis presentado, la razón  $E/V$  está afectada también por las condiciones en el sedimento, que reforzarían la tendencia de los huevos diapáusicos a escapar de sedimentos adversos o, por el contrario, a permanecer allí refugiados si la adversidad del sedimento es baja. No obstante, consideramos que la predecibilidad de la columna de agua debe tener un efecto dominante en el patrón de eclosión de los huevos diapáusicos, si se compara con el factor adversidad del sedimento. La razón es que si, en promedio, la columna de agua es peor hábitat que el sedimento – donde la probabilidad de supervivencia de los huevos diapáusicos es menor que 1 – entonces no es posible el mantenimiento a largo plazo de una población.

En estudios recientes se ha sugerido que las tasas de eclosión de huevos diapáusicos son mayores en lagos someros que en lagos profundos (Gilbert y Schröder, 2004). El argumento es que las condiciones en los sedimentos de lagos profundos inhiben la eclosión de los huevos diapáusicos (p.ej., bajas temperaturas, anoxia, oscuridad). Si bien las condiciones del sedimento en lagos profundos pueden imponer constricciones a la optimización de las tasas de eclosión de los huevos diapáusicos (p.ej., debido a la ausencia de señales inductoras de la salida de diapausa, o condiciones físico-químicas que bloquean el desarrollo de los embriones en diapausa), la clasificación que se ha presentado en este capítulo ofrece una explicación alternativa para las menores tasas de eclosión en lagos

profundos en términos de gran producción de huevos diapáusicos y baja adversidad del sedimento.

En la aplicación práctica del modelo propuesto se presupone que todos los *huevos con aspecto saludable* son viables. No obstante, podría ocurrir que algunos huevos dejen de ser viables sin presentar signos externos de deterioro. Además, existe evidencia de que los huevos diapáusicos pierden la capacidad de responder a los estímulos de eclosión con la edad, aún cuando algunos de ellos están aparentemente sanos (Cousyn y De Meester, 1998). Esta ocasional falta de relación entre aspecto y viabilidad podría causar una sobreestima de las abundancias de huevos efectivamente viables. En este caso, las razones  $D/V$  y  $E/V$  estimadas a partir de las abundancias de huevos diapáusicos observadas en el banco subestimarían las razones entre las tasas de los procesos  $d/p$  y  $e/p$ , respectivamente. Aún en el caso de que este tipo de sesgo pudiera afectar a los datos, la comparación entre hábitats, tal y como se muestra en la figura 3.2, seguirá siendo útil si la correlación entre *huevos con aspecto saludable* y huevos efectivamente viables no es dependiente del hábitat.

Una dificultad con implicaciones más importantes en la interpretación de la dinámica del banco radica en la posibilidad de que las tasas de sedimentación, y en definitiva de pérdida de huevos, pudieran variar significativamente entre hábitats. Por ejemplo, si en dos hábitats con diferente tasa de sedimentación se exploran las mismas profundidades en el sedimento, la tasa de pérdida, tal y como se indica en el modelo, sería mayor en el hábitat con mayor tasa de sedimentación ya que los huevos quedarían más rápidamente enterrados en capas profundas del sedimento. Este hecho implica que la producción real de huevos (indicador de la calidad de la columna de agua) estaría relativamente subestimada por el parámetro  $B$  en el hábitat con mayor tasa de sedimentación. Además, las tasas de deterioro ( $D/V$ ) y eclosión ( $E/V$ ) también subestimarán las razones entre las tasas de los procesos  $d/p$  y  $e/p$ , respectivamente. La complicación

radica en el hecho de que altas tasas de sedimentación van a seleccionar a favor altas tasas de eclosión, de manera análoga a como ocurre cuando la adversidad del sedimento es alta, ya que un huevo en capas profundas del sedimento es prácticamente equivalente a un huevo inviable. Esta complicación hace aconsejable restringir el análisis a hábitats con tasas de sedimentación similares. De manera alternativa, si las tasas de sedimentación medidas en algunos de los hábitats que se comparan son altas, o se tiene una evidencia indirecta de este fenómeno (p.ej., cuando se encuentra una alta densidad poblacional en la columna de agua pero valores bajos de abundancia total de huevos en el sedimento), cabría esperar una subestima de las tasas de producción, deterioro y eclosión de huevos diapáusicos. Así, la predicción adecuada para este tipo de hábitat sería que la calidad de la columna de agua y la adversidad del sedimento son en realidad mayores que las esperadas a partir de las abundancias y razones entre huevos diapáusicos observadas.

Nuestro análisis establece varios supuestos necesarios para la interpretación del modelo. No obstante, el hecho de hacer explícitos dichos supuestos es una virtud del modelo ya que permite, como se ha demostrado arriba, detectar de manera sencilla anomalías en las predicciones de las tasas de los procesos que afectan al banco de huevos diapáusicos y que, por tanto, afectarían a la clasificación de los hábitats aquí propuesta. Finalmente, hay que resaltar que esta clasificación puede ser utilizada para comparar diferentes especies que habitan un mismo hábitat. En este caso, dado que todas las poblaciones comparten las mismas condiciones del sedimento, se requieren muchos menos supuestos para la aplicación del modelo.

En resumen, en este capítulo se muestra cómo, mediante el uso de la teoría estándar de la evolución de rasgos vitales, se pueden formular expectativas de carácter cualitativo para las propiedades de los bancos de huevos diapáusicos en relación con el tipo de hábitat. A través del estudio

de la abundancia de determinadas categorías de huevos se puede obtener información relevante acerca de la dinámica de los bancos de huevos diapáusicos. Finalmente, se concluye que la abundancia de los distintos tipos de huevos diapáusicos, o sus restos, en el sedimento de charcas y lagunas es el resultado de procesos que actúan como factores de selección sobre las poblaciones de rotíferos y que operan tanto en la columna de agua como en el sedimento, de manera que estos dos compartimentos quedan íntimamente ligados. Finalmente, el modelo matemático que aquí se ha presentado pone de manifiesto cómo las abundancias y las razones entre los distintos tipos de huevos diapáusicos encontradas en los sedimentos pueden proporcionar información sobre la importancia relativa de dichas fuerzas selectivas.



# 4

## **Relaciones entre características del hábitat y propiedades cuantitativas de los bancos de huevos diapáusicos del complejo de especies *Brachionus plicatilis***

### **Introducción**

En el capítulo anterior se ha identificado una serie de variables – abundancia de determinados tipos de huevos diapáusicos y razones entre ellos – que aportan información relevante acerca de la dinámica de los bancos de huevos diapáusicos en organismos del zooplancton. El análisis realizado en dicho capítulo indica qué valores de dichas variables, caracterizadoras del banco de huevos, son esperables en relación con las características del ambiente. Así, se ha establecido una clasificación de los hábitats según sus efectos demográficos sobre los bancos de huevos diapáusicos (p.ej., mayor o menor mortalidad, tasas de eclosión más o menos altas, etc.).

En este capítulo se trata de aplicar las ideas elaboradas en el capítulo 3 a los datos de campo presentados en el capítulo 2. El objetivo que aquí se persigue es caracterizar los hábitats estudiados – conjunto de 15 charcas y lagunas de la región oriental de la Península Ibérica – según sus efectos demográficos sobre la diapausa en las poblaciones de rotíferos del complejo *Brachionus plicatilis*. Además, se investigan las relaciones que puedan existir entre distintas propiedades del banco de huevos diapáusicos,

y entre éstas y propiedades ambientales, para inferir qué procesos ecológicos afectan a la dinámica de los bancos de huevos diapáusicos.

## Métodos

### *Caracterización demográfica de los bancos de huevos diapáusicos*

Una característica de los bancos de huevos diapáusicos formados por las especies de rotíferos del complejo *B. plicatilis* es que en ellos es posible la identificación de huevos diapáusicos en distinto estado de conservación, así como también de los huevos que eclosionaron en el pasado. Como ya se ha indicado en los capítulos anteriores, los huevos diapáusicos pueden clasificarse en tres categorías: (1) *huevos con aspecto saludable*, que se considera que son viables ( $V$ , en el modelo presentado en el capítulo anterior), (2) *huevos eclosionados* ( $E$ ), y (3) *huevos deteriorados* ( $D$ ). La abundancia de estas tres categorías de huevos se ha cuantificado en cada una de las 15 lagunas estudiadas (véase el capítulo 2) y por lo tanto es posible calcular, de acuerdo con el modelo matemático del capítulo 3, una serie de índices, que explican procesos y patrones de diapausa en relación con las condiciones del sedimento y de la columna de agua. Dichos índices son:

- (1) El tamaño del banco de huevos diapáusicos ( $B$ ), que se corresponde con la suma de las tres categorías de huevos diapáusicos consideradas ( $B = V + E + D$ ) y es indicativo de la producción de huevos.
- (2) La razón entre *huevos eclosionados* y *huevos con aspecto saludable* ( $E/V$ ), que indica la importancia de los procesos de eclosión de huevos diapáusicos en el sedimento.

- (3) La razón entre *huevos deteriorados* y *huevos con aspecto saludable* ( $D/V$ ), como medida de la importancia de los procesos de deterioro de los huevos diapáusicos en el sedimento.

En este capítulo se han utilizado las inversas de las razones propuestas en el modelo dinámico del capítulo 3 ( $V/E$  y  $V/D$ , en lugar de  $E/V$  y  $D/V$  respectivamente) debido a que en algunas de las lagunas estudiadas no se encontraron *huevos con aspecto saludable*. En consecuencia, las dos nuevas razones estudiadas ( $V/E$  y  $V/D$ ) estarán, pues, inversa y respectivamente relacionadas con los procesos de eclosión y deterioro.

El cálculo de las tres medidas arriba indicadas se restringió a los dos primeros centímetros del sedimento de las lagunas estudiadas, donde se supone que la composición del banco de huevos diapáusicos describe mejor los procesos que afectan a los huevos (véase el capítulo 3).

### *Caracterización del hábitat*

Para la caracterización de cada laguna se utilizaron las medidas realizadas en el campo durante los meses de julio y agosto de 2001, así como observaciones anteriores realizadas por otros miembros del grupo de investigación de Ecología Evolutiva (*Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva, Universitat de València*) y búsquedas documentales para determinar la superficie, profundidad media, carácter temporal, y salinidad de los hábitats estudiados. Todas estas características, determinadas independientemente de las propiedades cuantitativas de los bancos de huevos diapáusicos que albergan, se han presentado en detalle en la tabla 2.1.

*Análisis de los datos*

Para la determinación de los índices de los procesos que afectan a los bancos de huevos diapáusicos estudiados se utilizaron los valores de abundancia de los diferentes tipos de huevos reconocidos correspondientes a los dos primeros centímetros del sedimento de manera consistente con las especificaciones del modelo matemático presentado en el capítulo 3.

Como se ha indicado anteriormente, el tamaño del banco de huevos ( $B$ ) se considera una medida de la producción neta de huevos diapáusicos. Esta variable se analizó igual que en el capítulo 2 – esto es, mediante un modelo lineal generalizado basado en una distribución de Poisson – pero restringido a los dos primeros centímetros de profundidad en el sedimento.

Las diferencias en las razones entre *huevos con aspecto saludable* y *huevos eclosionados* ( $V/E$ ), y *huevos deteriorados* ( $V/D$ ) se analizaron mediante sendos modelos lineales generalizados para datos binarios (*i.e.*, la variable respuesta es el número de *huevos con aspecto saludable* versus el número de *huevos eclosionados*, o el número de *huevos con aspecto saludable* versus el número de *huevos deteriorados*, según la razón que se estudie). Para la implementación de estos dos modelos se usó una distribución binomial de los datos y se utilizó la función *logit* como vínculo. Ambos modelos sirvieron para estudiar la variación debida a (1) la localización geográfica de las lagunas (lagunas del interior versus costeras), (2) al régimen hídrico (*i.e.*, distinta duración del hidroperiodo) de las lagunas estudiadas, y (3) la existencia de diferencias entre lagunas dentro de una región geográfica y de un régimen hídrico. Todos los análisis se realizaron utilizando la función *glm* del software estadístico R 2.1.0 (R Development Core Team 2005; Ihaka y Gentleman, 1996).

Por último, la relación entre las propiedades de los bancos de huevos diapáusicos (tamaño y composición del banco) y las características de las

lagunas estudiadas se exploró mediante un Análisis de Componentes Principales (ACP) mediante el paquete estadístico SPSS v. 12.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Las variables utilizadas en el ACP pertenecen a dos categorías: (1) características del hábitat (*i.e.*, localización geográfica, duración del hidroperiodo y la transformación logarítmica del área, profundidad y salinidad de cada una de las lagunas estudiadas), y (2) abundancias de las diferentes categorías de huevos diapáusicos estudiados (*i.e.*, los valores de  $V$ ,  $E$  y  $D$ , todos transformados logarítmicamente). Nótese que no se han estudiado las razones  $V/E$  y  $V/D$  como variables del ACP porque no son independientes entre sí (*i.e.*, comparten el mismo numerador). No obstante, es posible inferir la relación de estas dos razones con los factores obtenidos por el ACP a partir de las asociaciones positivas y negativas entre las abundancias transformadas logarítmicamente de los distintos tipos de huevos diapáusicos. Por ejemplo, una componente principal correlacionada positivamente con  $\log(E)$  y negativamente con  $\log(V)$  localizaría en su extremo positivo casos con valores altos de  $\log(E/V)$ , y por tanto de  $E/V$ . Consistentemente con el modelo presentado en el capítulo anterior, este análisis se restringió a los valores de abundancia de huevos diapáusicos de los dos primeros centímetros del sedimento.

## Resultados

El modelo lineal generalizado aplicado sobre el tamaño del banco de huevos ( $B$ ) dio resultados similares a los ya presentados en el capítulo 2 para los diez primeros centímetros del sedimento de manera que no se presentarán aquí de forma detallada, si bien se discutirán en la sección correspondiente.

Por su parte, los modelos lineales generalizados aplicados sobre la razón  $V/E$  – relacionada inversamente con las tasas de eclosión – y la razón  $V/D$  – relacionada inversamente con el deterioro – revelaron la existencia de

diferencias significativas debidas a la localización geográfica de las lagunas y al patrón de duración del hidropериодо, así como también entre lagunas con distinto hidropериодо dentro de una región geográfica (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Análisis estadístico mediante modelos lineales generalizados sobre V/E y V/D en

| Fuente de variación            | g.l. | Razón V/E <sup>a</sup> |         | Razón V/D <sup>b</sup> |         |
|--------------------------------|------|------------------------|---------|------------------------|---------|
|                                |      | Desviación             | p       | Desviación             | p       |
| Región                         | 1    | 207.29                 | < 0.001 | 93.42                  | < 0.001 |
| Hidropериодо                   | 2    | 77.48                  | < 0.001 | 69.36                  | < 0.001 |
| Región x Hidropериодо          | 1    | 1.16                   | 0.28    | 0.49                   | 0.48    |
| Laguna (Región x Hidropериодо) | 10   | 202.01                 | < 0.001 | 156.54                 | < 0.001 |

los dos primeros centímetros del sedimento de las lagunas estudiadas.

<sup>a</sup> Modelo: binomial, función vínculo: *logit*, % Desviación: 81.4

<sup>b</sup> Modelo: binomial, función vínculo: *logit*, % Desviación: 81.9

Las lagunas costeras mostraron en promedio valores significativamente más altos de V/E que las lagunas del interior (costeras:  $7.38 \pm 3.89$ ; interior:  $4.44 \pm 1.96$ ). No obstante, existe una fuerte variación dentro de cada categoría, y la laguna con el segundo valor más alto fue una laguna del interior (Tírez; véase la figura 4.1). En lo que se refiere a los efectos debidos a la duración del hidropериодо, se encontró que las lagunas caracterizadas por hidropериодos de duración intermedia exhibieron los valores más altos de V/E tanto en la costa como en el interior ( $16.36 \pm 6.32$ ). La exploración visual de los datos revela que este resultado está fuertemente asociado a dos lagunas en particular: Poza Sur y Tírez, localizadas, respectivamente, en la costa y el interior, y que presentan los índices de eclosión más bajos de todo el estudio (Figura 4.1). El valor V/E en las charcas y lagunas con hidropериодos de corta y larga duración tomó valores menores (hidropериодо de corta duración:  $2.69 \pm 2.22$ ; hidropериодо de larga duración:  $1.69 \pm 0.41$ ), indicando, de manera consistente, mayores tasas de eclosión.

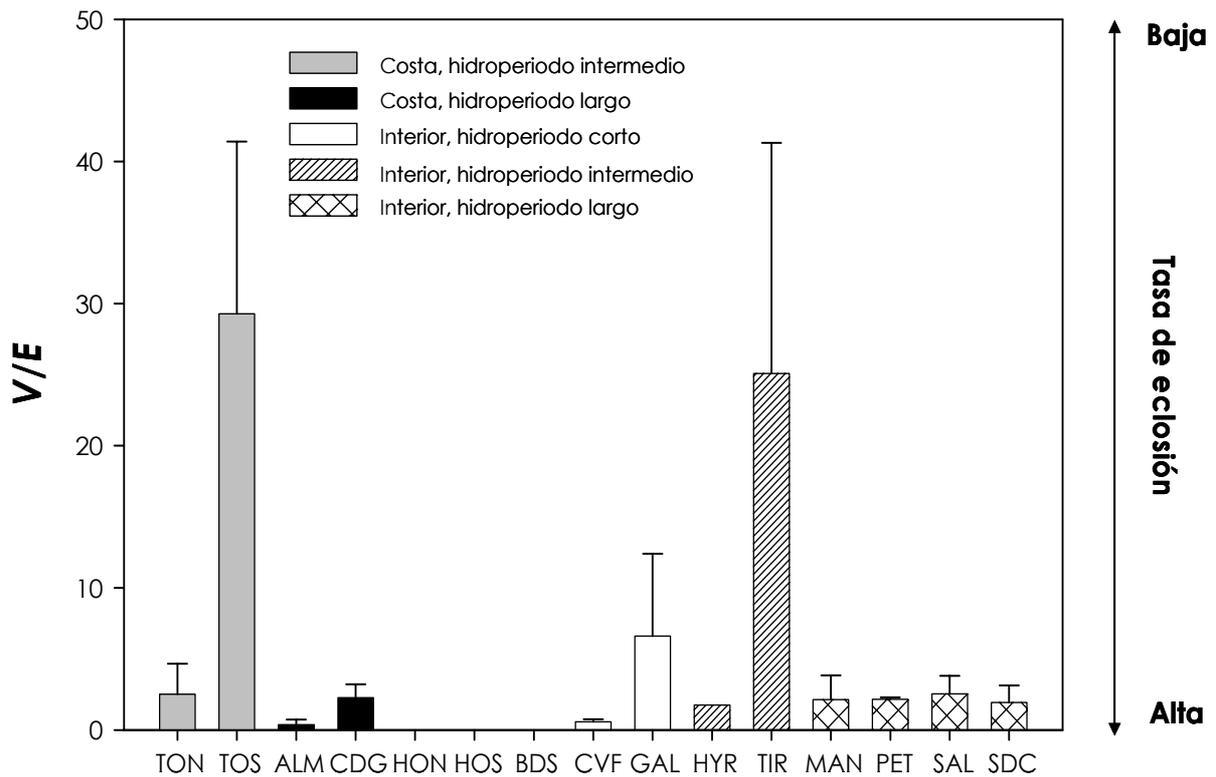


Figura 4.1. Valores V/E (*huevos diapáusicos con aspecto saludable versus huevos eclosionados*) en los dos primeros centímetros de profundidad del sedimento de las lagunas estudiadas. Los valores presentados son los valores medios de tres puntos de muestreo por laguna más el error típico. Se han incluido las lagunas donde la razón V/E es cero: HON y HOS (lagunas costeras con hidroperíodo largo), y BDS (laguna de interior con hidroperíodo corto). Para los acrónimos de las lagunas, véase la figura 2.1.

El modelo lineal generalizado aplicado sobre la razón entre *huevos diapáusicos con aspecto saludable* y *huevos deteriorados* (V/D) mostró la existencia de efectos significativos debidos a la localización geográfica, la duración del hidroperíodo, y a las propias lagunas (Tabla 4.1; Figura 4.2). Los valores V/D fueron mayores en las lagunas costeras ( $0.17 \pm 0.07$ ) que en las del interior ( $0.08 \pm 0.02$ ), independientemente de la duración del hidroperíodo. Nótese sin embargo que el rango de variación de esta variable para el conjunto de lagunas costeras solapa con el de las lagunas del interior (Figura 4.2). Por otra parte, tanto en las lagunas costeras como en las del interior, V/D fue mucho mayor en las lagunas caracterizadas por

hidroperiodos de duración intermedia ( $0.24 \pm 0.09$ ), que en las de hidroperiodo corto y largo (hidroperiodo de corta duración:  $0.04 \pm 0.04$ ; hidroperiodo de larga duración:  $0.08 \pm 0.02$ ). De nuevo, este efecto está asociado a una laguna en concreto que presenta la menor tasa de deterioro de todo el estudio (Poza Sur).

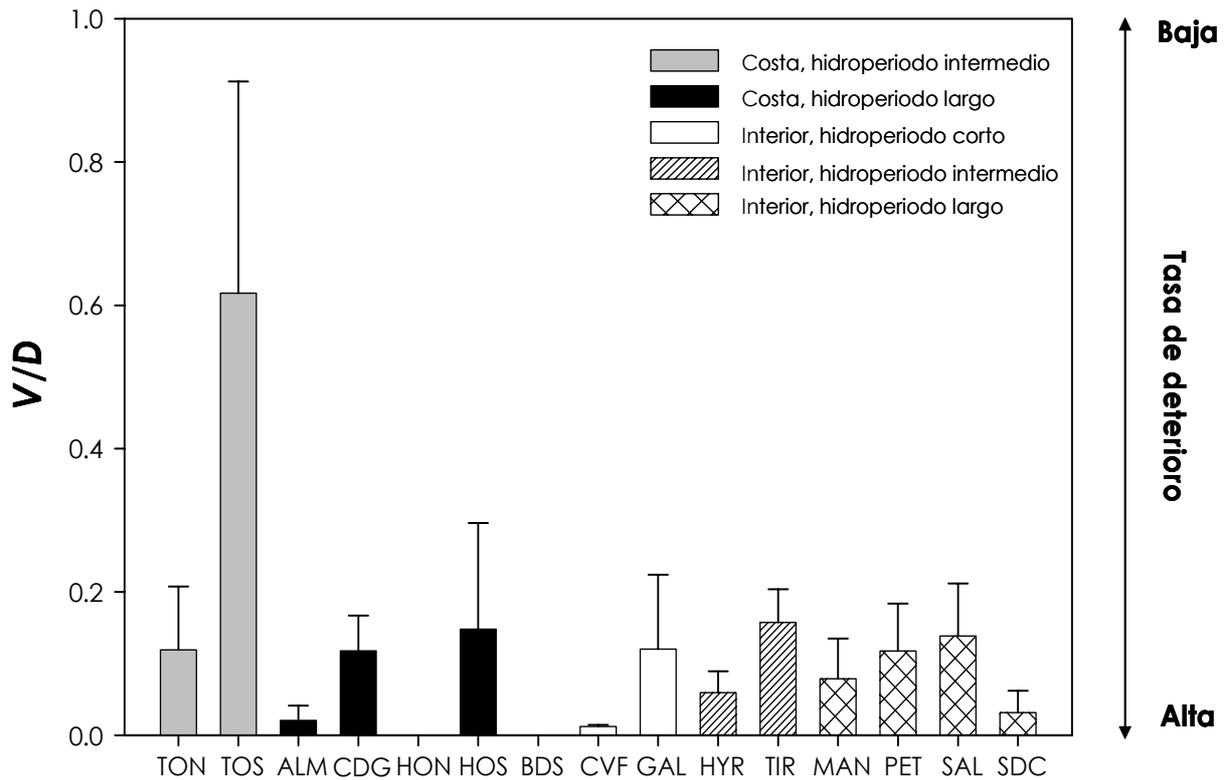


Figura 4.2. Valores *V/D* (huevos diapásicos con aspecto saludable versus huevos eclosionados) en los dos primeros centímetros de profundidad del sedimento de las lagunas estudiadas. Los valores presentados son los valores medios de tres puntos de muestreo por laguna más el error típico. Se han incluido las lagunas donde la razón *V/D* es cero: HON (laguna costera con hidroperiodo largo) y BDS (laguna de interior con hidroperiodo corto). Para los acrónimos de las lagunas, véase la figura 2.1.

El análisis de componentes principales (ACP) llevado a cabo para explorar las relaciones entre las propiedades de los bancos de huevos diapásicos y las condiciones de los hábitats estudiados, extrajo dos factores

principales que conjuntamente explicaron el 63.6 % de la varianza total (Figura 4.3).

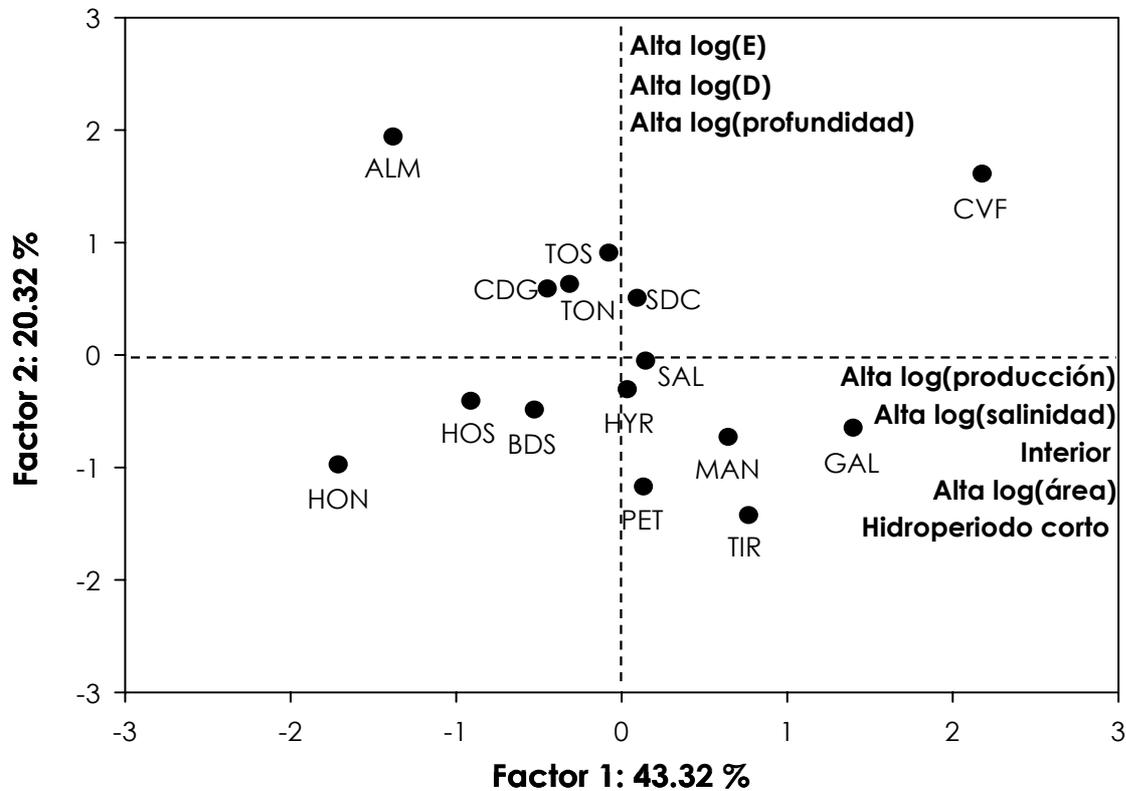


Figura 4.3. Localización de las lagunas estudiadas en el espacio definido por los dos factores del Análisis de Componentes Principales. Los porcentajes sobre los ejes indican la varianza explicada por cada factor. Sobre los extremos positivos de los ejes, se indican las variables primitivas del análisis que se correlacionan con cada factor (véase el texto).

El primer eje explica el 43.3 % de la varianza y se correlaciona positivamente con las log-abundancias de los huevos diapáusicos transformadas (*i.e.*, las densidades de los diferentes tipos de huevos diapáusicos;  $r_{\log(V)} = 0.660$ ,  $r_{\log(E)} = 0.658$ ,  $r_{\log(D)} = 0.821$ ). Este eje también muestra una correlación positiva importante con las variables resultantes de la transformación logarítmica de la salinidad y el área de las lagunas estudiadas ( $r_{\log(\text{salinidad})} = 0.762$ ,  $r_{\log(\text{área})} = 0.616$ ). Además, este primer eje se relaciona positivamente con las lagunas del interior ( $r_{\text{localización}} = 0.684$ ), y negativamente con la duración del hidroperiodo ( $r_{\text{hidroperiodo}} = -0.568$ ). Sólo la

correlación de este eje con la transformación logarítmica de la profundidad resultó menor de 0.5.

El segundo eje, que explica el 20.3 % de la varianza total, se correlaciona positivamente con las abundancias de *huevos eclosionados* ( $r_{\log(E)} = 0.639$ ) y *huevos deteriorados* ( $r_{\log(D)} = 0.508$ ), mientras que su correlación es débil con la abundancia de *huevos con aspecto saludable* ( $r_{\log(V)} = 0.271$ ). La profundidad es la única de las variables del hábitat que se correlaciona con este eje ( $r_{\log(\text{profundidad})} = 0.681$ ). El resto de variables presentaron valores de correlación inferiores a 0.5.

## Discusión

En este capítulo se han aplicado por primera vez índices del banco de huevos diapáusicos, relacionados con procesos dinámicos que operan en ese banco (capítulo 3), a las abundancias de los distintos tipos de huevos diapáusicos observadas en los bancos del complejo de especies del rotífero *B. plicatilis* (capítulo 2). Ello ha permitido demostrar la existencia de una extensa variación en las tasas de producción, eclosión y deterioro de los huevos diapáusicos en un conjunto de lagunas dentro de una misma área biogeográfica. Se han obtenido indicios de que esta variación está además relacionada con características específicas de los hábitats.

Como ya se ha comentado en el capítulo 3, la abundancia del total de huevos diapáusicos (*B*) refleja, más que la abundancia de cualquier tipo de huevo (p.ej., *huevos con aspecto saludable*), la capacidad de las poblaciones activas de rotíferos para producir huevos diapáusicos en un determinado hábitat y es un indicador de la calidad de la columna de agua. Además, se espera que esta medida de producción tienda a ser maximizada por selección natural dado que se trata de la medida de eficacia a largo plazo (interanual) de dichas poblaciones (Serra *et al.*, 2003;

2005). Dicho de otra forma: la consecuencia de la mejor o peor adaptación de las poblaciones de rotíferos a las condiciones en la columna de agua será, respectivamente, una mayor o menor producción de huevos diapáusicos.

Nuestro análisis de la abundancia de huevos diapáusicos totales en los dos centímetros superiores de sedimento aporta conclusiones cualitativamente similares a las ya obtenidas mediante el estudio de los diez centímetros superiores (capítulo 2), una similitud metodológicamente interesante. Así pues, las poblaciones estudiadas difieren en la producción de huevos diapáusicos, siendo ésta mayor en las lagunas del interior que en las costeras. Como ya se ha sugerido en el capítulo 2, las condiciones que se dan en las lagunas de interior (*i.e.*, alta productividad y baja competencia y depredación) podrían explicar una alta producción de huevos diapáusicos en comparación con las lagunas costeras. La asociación encontrada por el análisis de componentes principales entre la producción de huevos y la salinidad, un factor ambiental que toma los valores más altos en las lagunas del interior, son consistentes con la adaptación del complejo *B. plicatilis* a condiciones salinas (Epp y Winston, 1977; Miracle y Serra, 1989; Lowe *et al.*, 2005), aunque la salinidad podría estar actuando como predictor de diferencias generales de la calidad del hábitat cuando se comparan lagunas costeras y del interior.

Los resultados obtenidos muestran que la producción de huevos diapáusicos está relacionada con la duración del hidropериодо. Las dos aproximaciones estadísticas empleadas – modelo lineal generalizado y análisis de componentes principales – indican que la producción de huevos diapáusicos es mayor en poblaciones que habitan lagunas con hidropериодos cortos. Una explicación hipotética para este resultado podría ser que la presión de selección sobre la tasa de producción de huevos diapáusicos sea mayor cuando menor es el hidropериодо, ya que la producción de huevos sería crítica en este caso. Alternativamente, es posible

que las especies del complejo *B. plicatilis* expandan sus nichos en las lagunas con hidroperiodos cortos en ausencia de especies competidoras en el hábitat, lo que se traduciría en una distribución temporal paradójicamente más amplia, con densidades altas y con mayor producción de huevos diapáusicos. La explicación definitiva depende de datos no disponibles en este momento.

También se ha encontrado una asociación positiva de la producción con el área de las lagunas. Esta asociación es difícil de explicar, pero podría estar relacionada con una mayor tasa de evaporación del agua de la laguna y una mayor salinidad, una condición que ya se ha discutido y que favorece a las especies del complejo *B. plicatilis*. Se da la circunstancia de que en el conjunto de lagunas estudiadas, las más extensas no son las más profundas; si acaso, ocurre lo contrario.

En relación con las tasas de eclosión, indicadas por la inversa de  $V/E$ , se ha detectado un efecto significativo de la localización geográfica y la duración del hidroperiodo. Es muy posible que este efecto sea debido a lagunas concretas con tasas de eclosión excepcionalmente bajas, si bien es destacable la homogeneidad de las altas tasas de eclosión estimadas para las lagunas de interior con hidroperiodos largos. No obstante, las regularidades sobre las tasas de eclosión más llamativas son las que aparecen en relación con las tasas de deterioro, como se discutirá más adelante.

Ya se ha indicado anteriormente, que el deterioro de los huevos en el sedimento es muy importante en las lagunas estudiadas (p.ej., la fracción de *huevos deteriorados* oscila entre el 74.6 y el 98.5 %; véase el capítulo 2). Nuestro análisis ha mostrado que las tasas de deterioro, estimadas inversamente por los valores de  $V/D$ , son significativamente mayores en las lagunas del interior que en las costeras, lo que implica que los sedimentos de las lagunas del interior son, en general, más adversos para la conservación

de huevos diapáusicos que los de las lagunas costeras. No obstante, a pesar de la tendencia observada, no puede descartarse que este hallazgo sea debido al valor extraordinariamente bajo de la tasa de deterioro encontrada en una laguna costera en concreto (Poza Sur). Otra relación, aunque por el momento difícil de explicar, es que las lagunas con hidroperiodos de duración intermedia presentan las tasas de deterioro más bajas. En cualquier caso, la variabilidad e importancia del deterioro que se ha encontrado debe implicar que el banco de huevos diapáusicos está sometido a un factor de selección por dicho deterioro, y que ese factor varía entre lagunas.

Un resultado muy interesante es la asociación detectada por el segundo factor del análisis de componentes principales – que explica el 20.3 % de la varianza – entre las densidades de *huevos deteriorados* y *eclosionados*, sin que esa asociación se vea acompañada de la de *huevos con aspecto saludable*. La asociación observada indica, pues, situaciones en las que hay un exceso de deterioro y de eclosión con respecto a lo que sería esperable por las densidades de *huevos con aspecto saludable*, lo que también es apuntado por la similitud de los patrones de las tasas de eclosión y las tasas de deterioro en relación con el hidroperiodo (*i.e.*, las tasas menores de eclosión y deterioro se encuentran en las lagunas con hidroperiodo de duración intermedia). Para explicar esta asociación entre deterioro y eclosión hay que recordar lo postulado en el capítulo 3. Aunque las tasas óptimas de eclosión dependerán en parte de las condiciones de predecibilidad de la columna de agua, nuestros resultados son consistentes con la idea de que una mayor tasa de eclosión es óptima en sedimentos con una mayor tasa de deterioro, y apoyan la hipótesis de la importante implicación de la adversidad del sedimento en la dinámica de los huevos del sedimento, implicación que no había sido tomada en cuenta en los estudios anteriores sobre bancos de huevos diapáusicos.



# 5

## **Patrones de deterioro en bancos de huevos diapáusicos de rotíferos del complejo *Brachionus plicatilis*: efecto sobre la viabilidad**

### **Introducción**

Los huevos diapáusicos de rotíferos se conocen también con el nombre de huevos de resistencia, ya que son capaces de resistir condiciones muy adversas, en ocasiones extremas (p.ej., desecación, extremos de salinidad y temperatura, anoxia, etc.; Gilbert, 1974; Pourriot y Snell, 1983; Bailey *et al.*, 2004). Como es lógico, esta resistencia a la adversidad tiene un límite, y con el tiempo los huevos diapáusicos acaban deteriorándose.

En el capítulo 2 de esta tesis se ha puesto de manifiesto que, al menos en el sistema estudiado, la tasa con la que se deterioran los huevos diapáusicos en el sedimento es elevada. De hecho, la fracción de huevos deteriorados alcanza hasta un 90 % del total de huevos diapáusicos depositados en el sedimento. El criterio de clasificación de un huevo diapáusico como viable o inviable se basa, como se ha detallado en capítulos previos, en la apariencia del huevo, y el uso de este criterio es una práctica común en los estudios de bancos de huevos diapáusicos de organismos zooplanctónicos (Marcus, 1990; Hairston *et al.*, 1995; Cáceres, 1998; Keller y Spaak, 2004). De manera similar, en esta tesis se han considerado los *huevos diapáusicos con aspecto saludable* como viables (véanse los capítulos 2, 3 y 4). Sin embargo, esta práctica plantea la cuestión

de hasta qué punto la viabilidad del banco de huevos diapáusicos está bien representada por los huevos aparentemente sanos. Además, también es posible que algunos huevos catalogados inicialmente como deteriorados sean todavía viables. Así, surgen cuestiones adicionales tales como ¿hasta qué punto los indicios visuales de deterioro predicen la viabilidad? O, ¿a partir de qué grado de deterioro un huevo deja de ser viable? Para poder responder a todas estas cuestiones es necesario un estudio detallado del grado de deterioro, con una caracterización precisa de las categorías que puedan distinguirse visualmente, para luego analizar la viabilidad de los diferentes tipos de huevos diapáusicos presentes en el banco de huevos en relación con su grado de deterioro.

Los objetivos de este capítulo son: (1) describir detalladamente los patrones de deterioro de los huevos diapáusicos de rotíferos del complejo *Brachionus plicatilis* aislados de los sedimentos de las charcas y lagunas que han sido estudiados en los capítulos anteriores, y (2) estimar la viabilidad asociada a los diferentes estados de deterioro, en relación con la profundidad (i.e., edad) del sedimento. La hipótesis de partida es que el aspecto de los huevos diapáusicos puede ser un buen predictor de su viabilidad. El interés del estudio se ha centrado particularmente en el éxito de eclosión de los *huevos diapáusicos con aspecto saludable* ya que es importante para evaluar el supuesto generalmente aceptado de que las densidades de huevos de aspecto saludable indican densidades de huevos viables (véanse los capítulos 2, 3 y 4), así como para poder estimar los tamaños efectivos mínimos de los bancos y su potencial para el reclutamiento de individuos para la población activa cuando las condiciones ambientales favorables se restablecen.

## **Material y métodos**

### *Muestreo del sedimento*

Este estudio se realizó a partir de las mismas secciones de cores de sedimento utilizadas en el capítulo 2 (para la metodología de la toma de muestras, véase pues ese capítulo). Como dichas secciones se conservaron (en las condiciones descritas en el capítulo 2) por un tiempo mínimo de 2 meses, se garantiza la superación del periodo de diapausa obligada en aquellos huevos diapáusicos que pudieran haber sido producidos recientemente en el momento en que se tomaron los cores (Hagiwara e Hino, 1989). Se considera que de esta forma ninguno de los huevos diapáusicos viables utilizados en los experimentos tiene bloqueada la eclosión por mecanismos internos (Grice y Marcus, 1981; Schwartz y Hebert, 1987; Hagiwara *et al.*, 1989; Bailey *et al.*, 2003; 2004).

#### *Extracción de huevos diapáusicos del sedimento*

Para aislar los huevos diapáusicos se siguió el procedimiento de extracción por flotación en sacarosa descrito por Onbé (1978), tal y como se detalla más abajo. Con pequeñas variaciones, esta técnica ha sido utilizada con éxito para la extracción y aislamiento de formas de resistencia de multitud de organismos zooplanctónicos (Snell *et al.*, 1983; Marcus, 1989; Katajisto, 1996; Næss, 1996; Gómez y Carvalho, 2000; Ortells *et al.*, 2000; Vandekerkhove *et al.*, 2004; 2005). Las especies de rotíferos del complejo *B. plicatilis* habitan ambientes caracterizados por un alto potencial osmótico (*i.e.*, alta concentración de sales disueltas en el agua), por lo que cabe esperar que su viabilidad no se vea afectada por la técnica de aislamiento por flotación en sacarosa.

Para el aislamiento de los huevos, se tomaron 10 g de sedimento (en peso húmedo) de la zona central de cada sección de 2 cm para evitar el riesgo de contaminación de huevos diapáusicos provenientes de capas superiores. Esta cantidad de sedimento se resuspendió en un pequeño volumen de solución de sacarosa 1.75 M y se homogeneizó con ayuda de

una espátula. El sedimento resuspendido se depositó en tubos de centrífuga que se rellenaron con la misma solución de sacarosa hasta un volumen final de 45 mL. Posteriormente, los tubos que contenían la mezcla de sedimento y sacarosa se centrifugaron a 12.6 G durante 5 minutos. Tras el centrifugado, el material de baja densidad que permanece en suspensión se decantó y filtró a través de una malla de Nyltal con diámetro de poro de 30  $\mu\text{m}$ . Con este procedimiento se eliminaron los componentes más finos del sedimento. El material retenido en el filtro, entre el que se encontraban los huevos diapáusicos de rotíferos, se lavó con agua abundante para eliminar restos de sacarosa y se transfirió a una placa de recuento de zooplancton donde se procedió a la identificación y aislamiento de los huevos pertenecientes a las especies del complejo *B. plicatilis* cualquiera que fuera su estado de conservación. De manera análoga al estudio de la abundancia de huevos diapáusicos (véase el capítulo 2), cuando las muestras de sedimento contenían grandes cantidades de material de gran tamaño (p.ej., restos de insectos, hojas, bulbos y raíces de macrófitos, semillas, etc.), se realizó un pre-filtrado a través de una malla con diámetro de poro de 200  $\mu\text{m}$  para eliminar dicho material. El material retenido por esta malla se revisó con lupa binocular a 6 aumentos y en ningún caso se encontraron huevos diapáusicos.

El método de aislamiento de huevos diapáusicos mediante flotación en sacarosa no es eficiente al 100 %. Son necesarias varias extracciones sobre la misma muestra (2-4 veces) para reducir a cero el número de huevos diapáusicos aislados. No es, por tanto, un método adecuado para la cuantificación de la abundancia de huevos diapáusicos. Sin embargo, si se compara con el método de exploración exhaustiva del sedimento (véase el capítulo 2), la extracción por flotación en sacarosa permite procesar cantidades mayores de sedimento con menor esfuerzo, y aislar por tanto un mayor número de huevos diapáusicos. Además, las muestras procesadas por este método son mucho más limpias con lo que se facilita el aislamiento de los huevos diapáusicos.

### Caracterización de los huevos diapáusicos

Cada huevo diapáusico aislado se caracterizó según tres propiedades que *a priori*, pero razonadamente, se presumió debían estar relacionadas con su deterioro:

- (1) La integridad de las cubiertas del embrión, ya que se considera que las dos capas que recubren al embrión en el huevo diapáusico tienen función protectora y de aislamiento frente a condiciones adversas como el estrés ambiental o el daño mecánico durante la diapausa (Figura 5.1).
- (2) El tamaño del embrión, relativo al máximo volumen que éste puede ocupar. Este volumen máximo es el espacio delimitado por la capa interna S2 según la nomenclatura de Wurdak *et al.* (1978; véase la figura 5.1). Cabe esperar que el tamaño del embrión se reduzca por deterioro y/o consumo parcial de sus reservas. El tamaño relativo del embrión se estimó una vez los huevos diapáusicos se rehidrataron en medio de 6 g L<sup>-1</sup> de salinidad (Instant Ocean®, Aquarium Systems). En base al grado de reducción del tamaño del embrión se establecieron cinco categorías.
- (3) El color del embrión, que típicamente se observa más claro y brillante en los huevos diapáusicos recién producidos en cultivos de laboratorio (observación personal). Así, el oscurecimiento y la pérdida de brillo se consideran signos externos del envejecimiento y del deterioro de los huevos diapáusicos. En cuanto al color del embrión, se reconocieron tres colores diferentes: naranja, marrón y gris.

Como se verá en la sección de Resultados, estos criterios combinados permitieron distinguir 15 categorías de huevos diapáusicos, más tres

categorías adicionales que pueden denominarse 'restos', entre ellas la categoría de *huevos eclosionados* (capítulo 2).

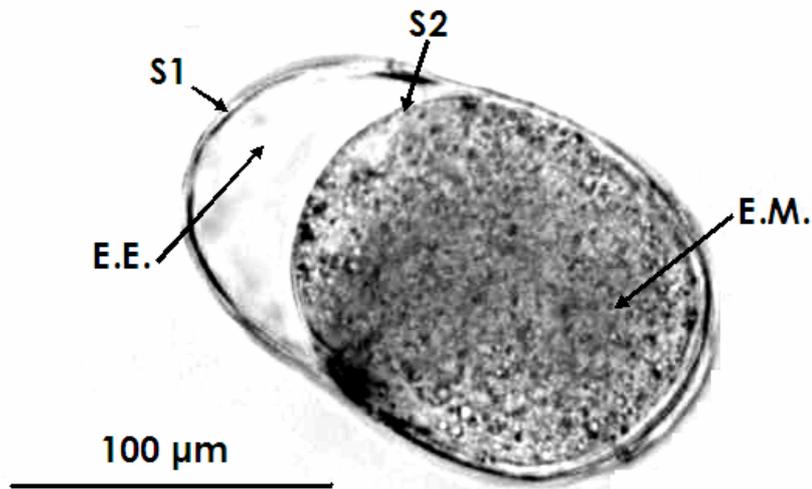


Figura 5.1. Estructura básica de un huevo diapáusico de *B. plicatilis*. **S1**: Doble capa externa. **S2**: Capa interna sencilla que envuelve al embrión. **E.M.**: Embrión multinuclear. **E.E.**: Espacio extraembrionario. Terminología a partir de Wurdak *et al.* (1978).

### Ensayos de eclosión

Sólo aquellos huevos diapáusicos que presentaron (1) las cubiertas protectoras intactas y (2) evidencia de contenido embrionario, fueron sometidos a ensayos de eclosión para determinar su viabilidad. Estos huevos incluyen los *huevos con aspecto saludable*, según la terminología usada en capítulos anteriores, pero también huevos con mayor grado de deterioro que todavía conservan parte del contenido embrionario y que, por tanto, forman parte de la categoría de *huevos deteriorados* también según la terminología usada en capítulos anteriores.

Cada huevo se aisló individualmente en placas multipocillo (Nunc™) que contenían 200 µL de medio 6 g L<sup>-1</sup> de salinidad, y fue incubado a 25° C

de temperatura en condiciones de iluminación constante (150-170  $\mu\text{mol}$  quanta  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Estas condiciones se mantuvieron durante 14 días. En estudios previos se ha demostrado que la salinidad experimental seleccionada es adecuada para la inducción de la eclosión de los huevos diapáusicos del complejo *B. plicatilis* (Gómez *et al.*, 2002; Ortells, 2002).

Al cabo de los 14 días de incubación todavía se observaron algunos huevos sin indicios de degradación durante los ensayos pero que no habían eclosionado. Estos huevos se transfirieron a medio de 2 g  $\text{L}^{-1}$  de salinidad y se incubaron durante 7 días más, manteniendo inalteradas las condiciones restantes. Durante el periodo total de 21 días de incubación, los cultivos se revisaron a intervalos de 12 horas para la detección de las eclosiones y de la aparición de hembras neonatas. El medio se renovó cada dos días para prevenir el crecimiento de hongos y bacterias sobre la superficie de los huevos que podría afectar a la eclosión de los mismos (Balompapueng *et al.*, 1997).

#### *Asignación de las hembras obtenidas de la eclosión de huevos diapáusicos a las especies del complejo B. plicatilis*

Tras la eclosión, las hembras neonatas se transfirieron a nuevo medio de cultivo de 6 g  $\text{L}^{-1}$  de salinidad con la microalga *Tetraselmis suecica*, y se dejaron proliferar partenogenéticamente bajo las mismas condiciones de iluminación y temperatura utilizadas en los ensayos de eclosión hasta que fue posible observar descendientes al microscopio y asignar el clon a un determinado morfotipo del complejo de especies *B. plicatilis*. Dado que en el complejo *B. plicatilis* no es posible la asignación específica basándose exclusivamente en la morfología, para estimar la proporción de eclosiones pertenecientes a las diferentes especies del complejo dentro de cada morfotipo se utilizaron los datos disponibles de otros trabajos realizados en el mismo conjunto de lagunas aquí estudiadas. Estos datos están basados en

estudios aloenzimáticos (Ortells, 2002) y estudios con técnicas moleculares basadas en DNA (análisis de restricción del gen *COI*; S. Campillo, comunicación personal) realizados en huevos diapáusicos aislados de los sedimentos de las lagunas aquí estudiadas.

### *Análisis de los datos*

La existencia de una asociación entre la profundidad en el sedimento y la frecuencia de los tipos de huevos establecidos según el tamaño del embrión se evaluó estadísticamente mediante una Prueba Exacta de Fisher de independencia para una tabla de contingencia de F filas x C columnas (*i.e.*, F tipos de huevos diapáusicos x C profundidades). El cálculo intensivo necesario para este análisis se realizó mediante el paquete estadístico R 2.1.0 (R Development Core Team 2005; Ihaka y Gentleman, 1996).

Para determinar si el tiempo de incubación necesario para la eclosión es dependiente del tipo de huevo diapáusico se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, ya que los datos para el análisis no cumplen los supuestos de normalidad y homocedasticidad para la prueba paramétrica ANOVA de un factor (Ruiz-Maya, 1986). Para este análisis sólo se utilizaron los datos de aquellos tipos de huevo diapáusico para los que se habían obtenido más de 50 eclosiones. De acuerdo con este criterio, el análisis se restringió al subconjunto de *huevos diapáusicos con aspecto saludable*. Adicionalmente, se realizaron varias pruebas de Kruskal-Wallis para evaluar la existencia de diferencias significativas en los tiempos de eclosión de los huevos entre áreas geográficas (lagunas costeras versus lagunas de interior), entre lagunas dentro de área geográfica, y entre las distintas profundidades del sedimento. Por confianza en los análisis, sólo se incluyeron aquellas lagunas con tamaños muestrales superiores a 20 eclosiones (8 lagunas). En el caso del análisis de las diferencias en el tiempo de eclosión con la profundidad, los datos fueron convenientemente

agrupados para permitir la comparación entre grupos con tamaños muestrales de cierta confianza (0-2 cm, 2-4 cm y 4-10 cm de profundidad en el sedimento).

El éxito en la eclosión en el subconjunto de *huevos con aspecto saludable* se utilizó para estudiar la medida en que estos huevos representan la viabilidad del banco. El éxito en la eclosión de los *huevos diapáusicos con aspecto saludable* se comparó entre regiones (costa versus interior), así como entre las diferentes lagunas estudiadas y las diferentes profundidades en el sedimento. Para ello se ajustó un modelo lineal generalizado con errores binomiales (Nelder y Wedderburn, 1972). Todas las pruebas estadísticas se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico R 2.1.0 citado anteriormente.

## Resultados

### *Tipos de huevos diapáusicos y viabilidad*

De acuerdo con los criterios de (1) integridad de las cubiertas protectoras, (2) tamaño del embrión, y (3) color del mismo, se creó un sistema de clasificación que incluyó 18 tipos básicos de huevos diapáusicos, cualquiera que fuera su estado de conservación (Figura 5.2). La equivalencia entre las tres categorías de huevos utilizadas en capítulos anteriores y la clasificación mostrada en la figura 5.2 es la siguiente: (1) *huevos con aspecto saludable*, que se corresponden con los tipos I y II, con color marrón o naranja, de la nueva clasificación, (2) *huevos eclosionados*, que siguen reconociéndose como tales (huevos eclosionados), y (3) *huevos deteriorados* que se desglosan aquí en el resto de categorías presentadas.

Se aisló un total de 4321 huevos diapáusicos que cumplían los criterios establecidos (*i.e.*, integridad de las cubiertas y evidencia de contenido

embrionario; véase la sección de Material y métodos) para su uso en los experimentos de viabilidad. El éxito de eclosión, como indicador de viabilidad, de cada tipo de huevo diapáusico en estos experimentos se presenta en la figura 5.2.

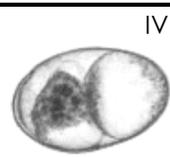
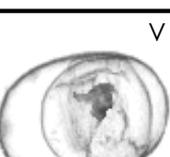
| <b>Categoría</b>   | <b>Descripción</b>  | <b>Color embr.</b> | <b>Fracción eclosión (n)</b> |
|--|---|--------------------|------------------------------|
| <br>I     | Doble capa externa (S1) y capa interna (S2) intactas. El embrión multinuclear rellena completamente el espacio delimitado por la capa S2  | Naranja            | 0.631 (339)                  |
|  |   | Marrón             | 0.511 (407)                  |
|  |   | Gris               | 0.029 (34)                   |
| <br>II    | El embrión multinuclear rellena más del 75%, pero no completamente, el espacio delimitado por la capa S2  | Naranja            | 0.556 (99)                   |
|  |   | Marrón             | 0.201 (274)                  |
|  |   | Gris               | 0.000 (50)                   |
| <br>III | El embrión multinuclear rellena entre 50-75% del espacio delimitado por la capa S2  | Naranja            | 0.026 (114)                  |
|  |   | Marrón             | 0.007 (424)                  |
|  |   | Gris               | 0.000 (57)                   |
| <br>IV  | El embrión multinuclear rellena 25-50% del espacio delimitado por la capa S2  | Naranja            | 0.000 (203)                  |
|  |   | Marrón             | 0.000 (708)                  |
|  |   | Gris               | 0.000 (107)                  |
| <br>V   | El embrión multinuclear rellena menos del 25% del espacio delimitado por la capa S2   | Naranja            | 0.000 (179)                  |
|  |   | Marrón             | 0.000 (1178)                 |
|  |   | Gris               | 0.000 (148)                  |
| <b>Huevos dañados</b>  | No se observan daños en la doble capa externa S1. Se observa, al menos, una de las siguientes características: (1) Ausencia de capa S2. (2) Ausencia de trazas del embrión multinuclear |                    |                              |
| <b>Eclosionados</b>  | Doble capa externa (S1) abierta por el opérculo   |                    |                              |
| <b>Rotos</b>   | Doble capa externa (S1) muestra otro tipo de fractura o discontinuidad, diferente de la apertura opercular  |                    |                              |

Figura 5.2. Clasificación morfológica de los huevos diapáusicos del complejo *B. plicatilis*, y su relación con la fracción de eclosión. La terminología asociada a los aspectos morfológicos es la de Wurdak *et al.* (1978; véase también la figura 5.1).

Atendiendo únicamente al criterio de clasificación del tamaño relativo del embrión, se identificaron cinco (I-V) tipos básicos de huevos diapáusicos (Figura 5.2). En conjunto, sólo una pequeña fracción (12.5 %) de estos huevos eclosionó tras el periodo completo de incubación. Sólo un huevo eclosionó tras la transferencia de 6 a 2 g L<sup>-1</sup> de salinidad. La mayoría de eclosiones (78.5 %) se obtuvieron a partir de huevos diapáusicos del tipo I. En el resto de categorías (II a V), correspondientes a valores decrecientes del tamaño relativo del embrión, se encontraron también valores decrecientes del éxito de eclosión. Las eclosiones obtenidas a partir de huevos del tipo II representaron un 20.4 % del total, y las provenientes de huevos del tipo III sólo un 1.1 %. No se obtuvieron eclosiones a partir de huevos de los tipos IV y V.

En los tipos de huevos diapáusicos donde se observaron eclosiones (*i.e.*, tipos I-III), aquellos cuyos embriones eran de color naranja mostraron siempre fracciones de eclosión más altas que los huevos en los que el embrión era de color marrón y/o gris. Nótese que tan sólo uno de 396 huevos con embrión de color gris eclosionó durante el experimento.

#### *Relación entre el estado de deterioro de los huevos diapáusicos y la profundidad*

La distribución vertical de las proporciones de los cinco (I-V) tipos principales de huevos diapáusicos en los diez primeros centímetros del sedimento de las charcas y lagunas estudiadas se muestra en la figura 5.3. Tan sólo en una de las lagunas estudiadas, Hondo Norte, no se encontró ningún huevo que cumpliera los criterios establecidos para estudiar su viabilidad. Todos los huevos que se encontraron en Hondo Norte estaban rotos o vacíos. Salvo por esta excepción, las lagunas costeras mostraron consistentemente proporciones mayores de los tipos de huevo diapáusico mejor conservados que las del interior en prácticamente todas las profundidades.

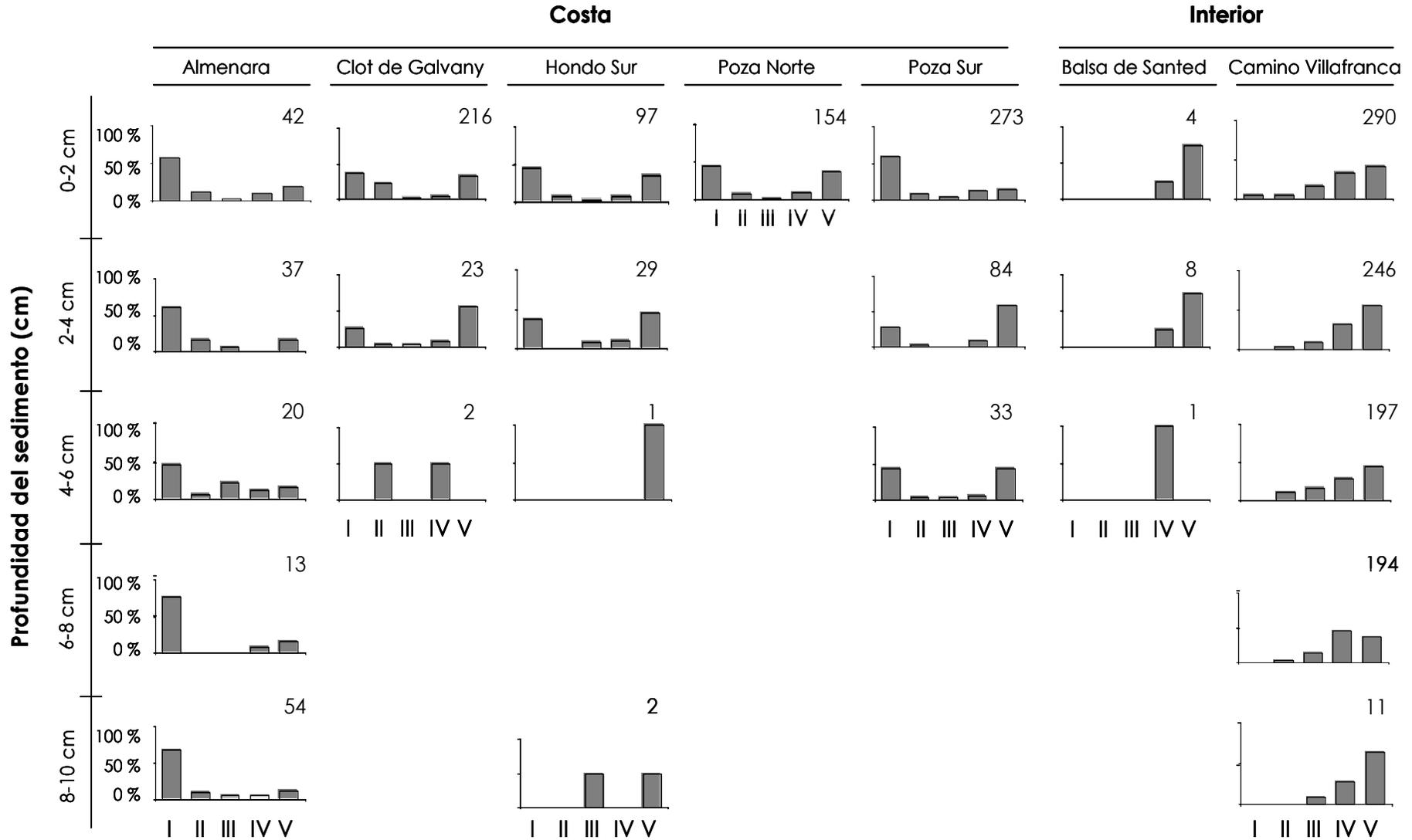


Figura 5.3. Proporción de los distintos tipos de huevo diapáusico (I-V) del complejo *B. plicatilis* a diferente profundidad en el sedimento de cada una de las lagunas estudiadas. Los números árabes indican los tamaños muestrales totales de cada profundidad.

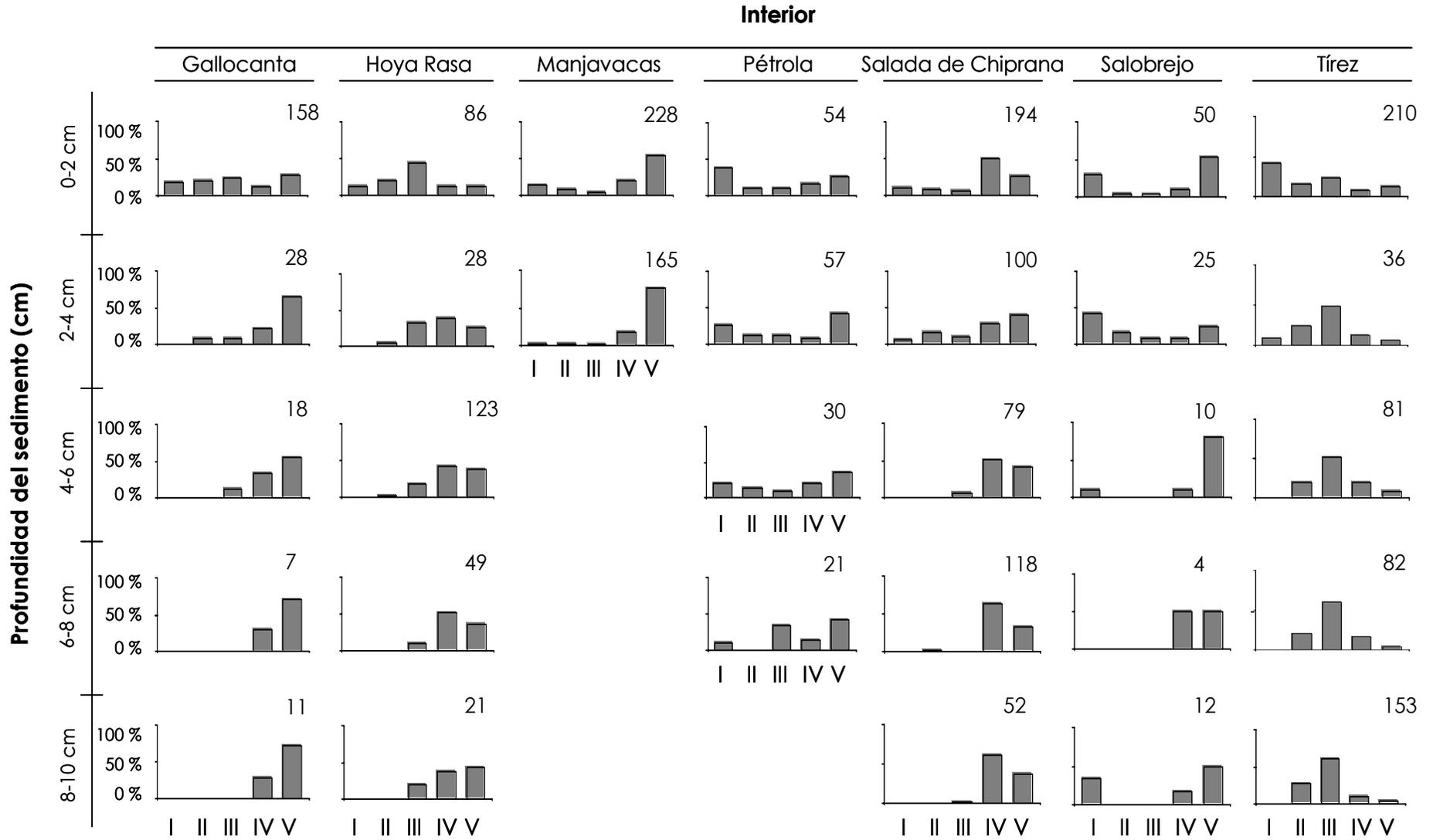


Figura 5.3. Continuación.

En la mayor parte de las lagunas estudiadas, la proporción de los huevos mejor conservados (tipos I y II) disminuyó con la profundidad en el sedimento. La Prueba Exacta de Fisher mostró que la proporción de cada tipo de huevo diapáusico depende de la profundidad en el sedimento (Tabla 5.1) en 10 de las 15 lagunas estudiadas (las excepciones son Almenara, Hondo Norte, Hondo Sur, Balsa de Santed y Salobrejo).

Tabla 5.1. Prueba Exacta de Fisher para la asociación entre la profundidad del sedimento y el tipo de huevo diapáusico en cada laguna estudiada. Se indican las clases de las dos variables utilizadas en el análisis; estas clases a veces resultan de agrupaciones realizadas por requerimientos computacionales. El valor *p* indica la probabilidad de la independencia entre tipos morfológicos y la profundidad del sedimento.

| Laguna                  | Clases                      |  | Prueba Exacta de Fisher |
|-------------------------|-----------------------------|--|-------------------------|
|                         | Rango de profundidades (cm) | Tipos morfológicos de huevo diapáusico | <i>p</i>                |
| Almenara                | 0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-10    | (I + II), III, IV, V                   | 0.324                   |
| Clot de Galvany         | 0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-10    | I, II, III, IV, V                      | 0.018*                  |
| Hondo Sur               | 0-2, 2-4, 4-6, 8-10         | I, II, III, IV, V                      | 0.159                   |
| Poza Norte <sup>a</sup> |                             |  |                         |
| Poza Sur                | 0-2, 2-4, 4-6               | (I + II), III, IV, V                   | 0.000**                 |
| Balsa de Santed         | 0-2, 2-4, 4-6               | I, II, III, IV, V                      | 0.452                   |
| Camino de Villafranca   | 0-2, 2-4, 4-6, 6-10         | (I + II), III, (IV + V)                | 0.000**                 |
| Gallocanta              | 0-2, (2-6), (6-10)          | (I + II), III, (IV + V)                | 0.000**                 |
| Hoya Rasa               | 0-2, (2-6), (6-10)          | (I + II), III, (IV + V)                | 0.000**                 |
| Manjavacas              | 0-2, 2-4                    | I, II, III, IV, V                      | 0.000**                 |
| Pétrola                 | 0-2, 2-4, 4-6, 6-8          | (I + II), III, (IV + V)                | 0.023*                  |
| Salada de Chiprana      | 0-2, 2-6, 6-10              | (I + II), III, (IV + V)                | 0.000**                 |
| Salobrejo               | 0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-10    | I, II, III, IV, V                      | 0.220                   |
| Tírez                   | 0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-10    | I, II, III, IV, V                      | 0.000**                 |

a. No se realizó ninguna prueba de independencia en Poza Norte porque el criterio de profundidad generó una sola clase.

\* Significativo ( $p < 0.05$ ) sin corrección de Dunn-Šidák para pruebas múltiples.

\*\* Significativo ( $p < 0.05$ ) con corrección de Dunn-Šidák para pruebas múltiples ( $p' < 0.004$ ; Sokal y Rohlf, 1995).

### Éxito en la eclosión de huevos diapáusicos con aspecto saludable

Un total de 1119 *huevos diapáusicos con aspecto saludable*, esto es pertenecientes a los tipos I y II con color marrón o naranja, se aislaron de las muestras de sedimento de 13 de las 15 lagunas estudiadas. No se encontraron *huevos con aspecto saludable* en Hondo Norte ni en Balsa de Santed, de manera que estas dos lagunas se excluyeron de análisis posteriores. El 47.5 % de estos huevos eclosionó tras su incubación en las condiciones experimentales. La supervivencia de las neonatas obtenidas fue alta (el 99.4 % sobrevivió durante al menos 48 horas, tiempo suficiente para alcanzar la madurez reproductiva en *B. plicatilis*; Temprano *et al.*, 1994).

El éxito en la eclosión de estos huevos varió considerablemente entre lagunas. El éxito promedio en las 13 lagunas estudiadas fue del  $38.8 \pm 7.3$  %. El máximo valor se obtuvo en Poza Norte, donde alcanzó un 72.7 %, mientras que ninguno de los huevos aislados de los sedimentos de Gallocanta y Hoya Rasa eclosionó. La aplicación de un modelo lineal generalizado (Tabla 5.2) mostró la existencia de diferencias significativas en el éxito de eclosión de los *huevos con aspecto saludable* debidas a la localización geográfica de las lagunas, así como también entre lagunas dentro de una misma región geográfica.

Tabla 5.2. Análisis estadístico mediante un modelo lineal generalizado ajustado a los datos de eclosión de *huevos diapáusicos con aspecto saludable*.

| Fuente de variación           | g.l. | Desviación | p       |
|-------------------------------|------|------------|---------|
| Región                        | 1    | 55.86      | < 0.001 |
| Profundidad                   | 4    | 126.69     | < 0.001 |
| Laguna (Región)               | 11   | 229.32     | < 0.001 |
| Región x Profundidad          | 4    | 13.26      | 0.01    |
| Laguna (Región) x Profundidad | 20   | 93.24      | < 0.001 |

Modelo: binomial, función vínculo: *logit*, % Desviación: 74.5

El éxito de eclosión promedio en las lagunas costeras fue del  $49.9 \pm 12.8 \%$ , mientras que en las del interior fue del  $31.8 \pm 7.8 \%$ . Las diferencias en el éxito de eclosión entre *huevos con aspecto saludable* de lagunas costeras y del interior mostraron un patrón consistente y no son resultado del efecto de determinadas lagunas. Dado que existen diferencias importantes en la salinidad entre regiones geográficas y entre lagunas dentro de región, se exploró si el éxito en la eclosión se relaciona con la salinidad de las lagunas. El valor de correlación ( $r$  de Pearson = 0.112,  $n = 13$ ,  $p = 0.715$ ) indicó que la relación no es significativa.

El análisis estadístico también reveló un efecto significativo de la profundidad del sedimento sobre el éxito en la eclosión de estos huevos (Tabla 5.2). La figura 5.4 muestra cómo el éxito en la eclosión disminuye conforme aumenta la profundidad del sedimento del que fueron aislados los huevos.

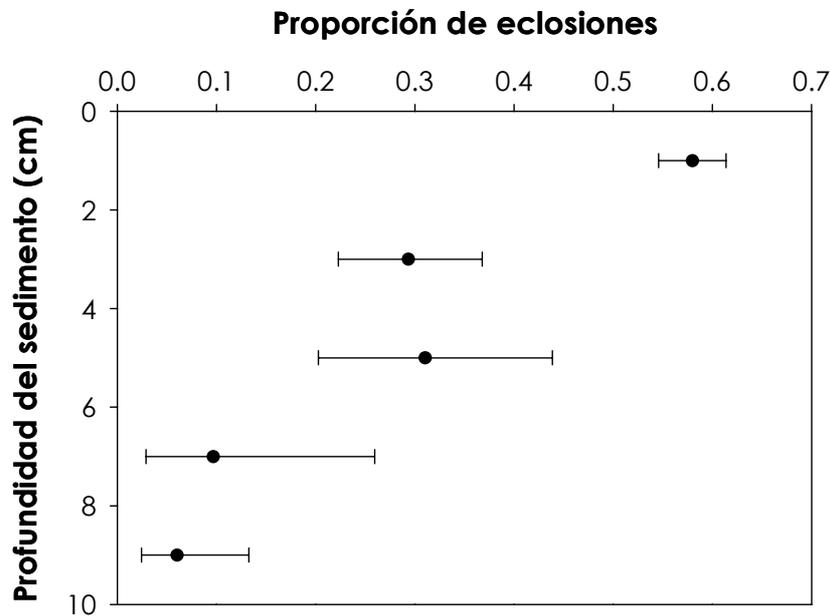


Figura 5.4. Proporción de eclosiones de *huevos diapásicos con aspecto saludable* del complejo *B. plicatilis* en función de la profundidad del sedimento. Los valores para cada profundidad se obtuvieron tras agrupar para el conjunto total de lagunas estudiadas. Las barras asimétricas corresponden a los intervalos de confianza al 95 % para datos binarios (Rohlf y Sokal; 1995).

El porcentaje de eclosión varió entre el 57.8 % en la capa más superficial del sedimento (0-2 cm) y el 6 % en la capa de sedimento estudiada más profunda (8-10 cm). La mayoría de las eclosiones ( $88.0 \pm 6.4$  %, tras promediar para las 11 lagunas del estudio donde se encontraron eclosiones a partir de *huevos diapáusicos con aspecto saludable*) se obtuvieron a partir de huevos aislados de los dos primeros centímetros de profundidad del sedimento de las lagunas estudiadas.

La figura 5.5 muestra la relación existente entre el número de *huevos diapáusicos con aspecto saludable* y el número de eclosiones obtenidas a partir de ellos en los dos primeros centímetros del sedimento para cada una de las lagunas estudiadas. Nótese que sólo se estudiaron las 13 lagunas donde se encontraron *huevos con aspecto saludable*.

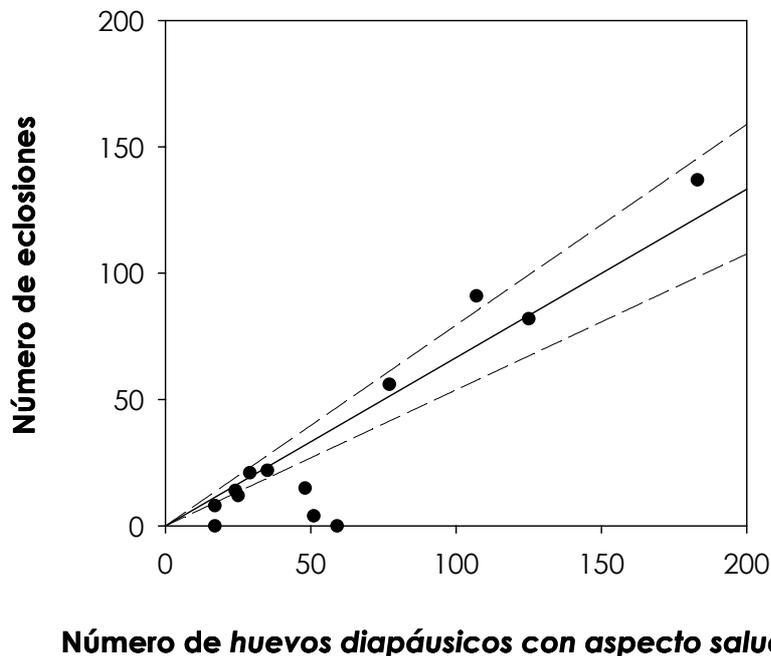


Figura 5.5. Relación entre el número de *huevos diapáusicos con aspecto saludable* y el número de eclosiones obtenidas a partir de ellos para los dos primeros centímetros del sedimento de cada una de las lagunas estudiadas. La línea continua es la regresión restringida para que pase por el origen (pendiente = 0.666,  $r$  de Pearson = 0.924). Las líneas discontinuas indican los límites de confianza al 95 % del ajuste lineal.

Aunque no todos los huevos con *aspecto saludable* fueron capaces de eclosionar bajo nuestras condiciones experimentales, se encontró una fuerte correlación entre ambas variables ( $r$  de Pearson = 0.924,  $n = 13$ ). Debe observarse que estas dos variables no son medidas independientes (*i.e.*, guardan una relación de 'parte-todo'). Por otro lado, la correlación entre el número de eclosiones y el número de huevos no eclosionados resultó no significativa ( $r$  de Pearson = 0.229,  $n = 13$ ,  $p = 0.453$ ), lo que indica que la fracción de eclosión es independiente del número de *huevos con aspecto saludable* aislados.

#### *Análisis de la dinámica temporal de las eclosiones*

El análisis de la dinámica temporal de las eclosiones se llevó a cabo a varios niveles. En primer lugar, se atendió a la localización geográfica de las lagunas. A este respecto, no se encontraron diferencias significativas en el momento de la eclosión entre huevos aislados de los sedimentos de lagunas costeras y de lagunas del interior (Kruskal-Wallis:  $\chi^2 = 0.178$ , g.l. = 1,  $p = 0.674$ ). Los tiempos promedio de eclosión para los huevos aislados de estos dos grupos de lagunas fueron de 39.91 y 41.35 horas respectivamente. Por el contrario, sí se encontraron diferencias significativas en los tiempos de eclosión cuando las lagunas se compararon individualmente (Kruskal-Wallis:  $\chi^2 = 44.68$ , g.l. = 7,  $p \ll 0.001$ ).

La figura 5.6 muestra la dinámica de las eclosiones de *huevos con aspecto saludable* aislados de diferentes capas del sedimento. La prueba de Kruskal-Wallis reveló la existencia de diferencias significativas en los tiempos de eclosión en relación con la profundidad en el sedimento (Kruskal-Wallis:  $\chi^2 = 22.29$ , g.l. = 2,  $p \ll 0.001$ ).

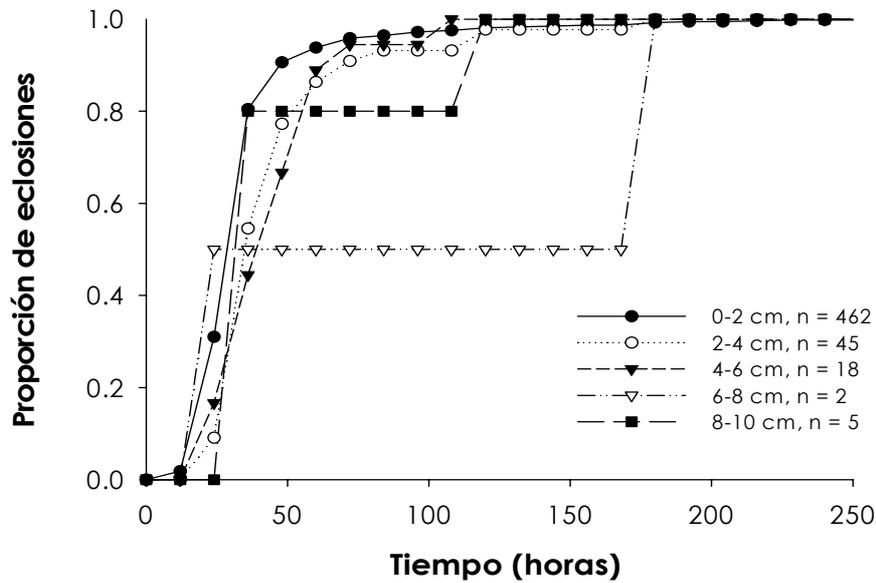


Figura 5.6. Dinámica de eclosión de huevos diapáusicos del complejo *B. plicatilis*, aislados en distinta profundidad en el sedimento. Los valores de huevos eclosionados (*n*) para cada capa del sedimento se obtuvieron tras agrupar los datos para el conjunto total de lagunas estudiadas.

El tiempo promedio necesario para la eclosión de los *huevos con aspecto saludable* disminuyó conforme aumentó la profundidad en el sedimento, desde  $39.47 \pm 1.16$  horas en la capa de 0-2 cm de profundidad, a  $49.85 \pm 4.82$  horas para la capa de 2-4 cm de profundidad, y hasta  $53.28 \pm 5.07$  horas en la capa agrupada de 4-10 cm de profundidad (véase la sección de Material y métodos).

Por último, la figura 5.7 muestra las dinámicas de eclosión dentro de la categoría de *huevos diapáusicos con aspecto saludable*. Esto es, se presenta la dinámica temporal de eclosiones obtenidas a partir de los huevos de tipo I y II, desglosados a su vez según el color de sus embriones (naranja o marrón).

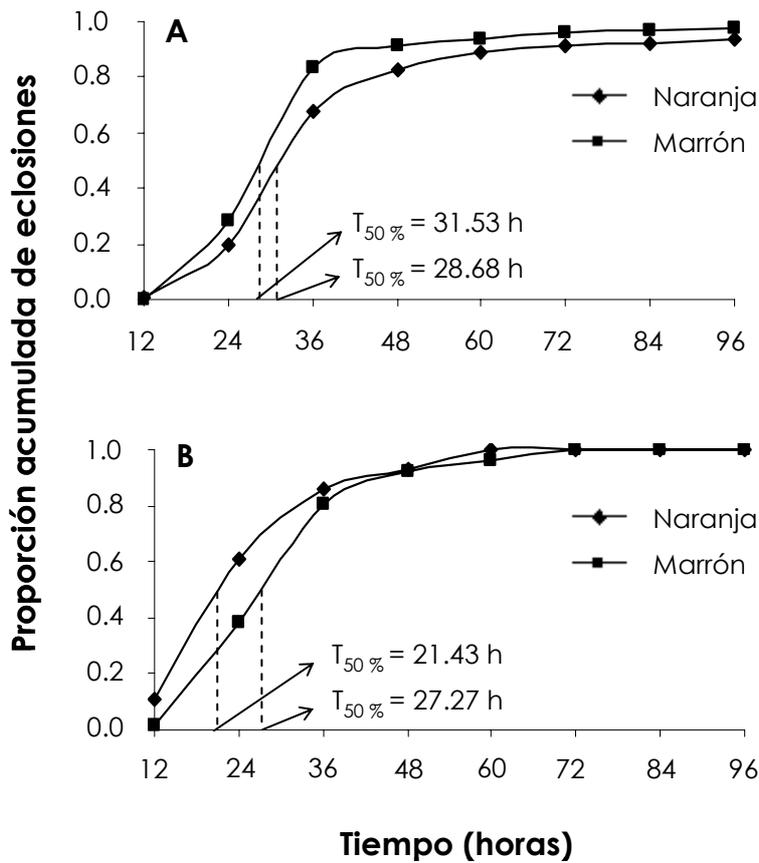


Figura 5.7. Dinámica de eclosión de huevos diapásicos de tipo I (A) y tipo II (B) del complejo *B. plicatilis* con distinta coloración del embrión (naranja o marrón) durante las 96 primeras horas de incubación.  $T_{50\%}$ : tiempo en el que ocurre el 50 % de las eclosiones.

Independientemente del color del embrión, los huevos diapásicos pertenecientes al tipo I necesitaron más tiempo para alcanzar el 50 % del total de eclosiones que los huevos diapásicos del tipo II. Obsérvese que a las 96 horas de incubación prácticamente se ha alcanzado la saturación en todos los tipos de huevos analizados.

Los huevos pertenecientes al tipo II mostraron un patrón de eclosión sincrónico, alcanzando la saturación a las 72 horas de incubación, mientras que los huevos diapásicos del tipo I, tanto de color naranja como marrón, presentaron eclosiones tardías hasta 228 y 216 horas, respectivamente,

después del inicio de la incubación. Estas diferencias en el momento de la eclosión entre los tipos de huevos diapáusicos resultaron ser estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis:  $\chi^2 = 38.65$ , g.l. = 3,  $p \ll 0.001$ ).

#### *Abundancia de huevos viables del complejo B. plicatilis en el sedimento*

Los resultados de los ensayos de eclosión en laboratorio se aplicaron retrospectivamente a los valores de abundancia de *huevos diapáusicos con aspecto saludable* en el campo (véase el capítulo 2) para estimar el reservorio mínimo de huevos diapáusicos viables de las diferentes especies del complejo *B. plicatilis* en los dos primeros centímetros del sedimento de las lagunas estudiadas (Tabla 5.3). Nótese que para el cálculo del reservorio de huevos diapáusicos viables (*i.e.*, eclosionables) en cada una de las lagunas estudiadas se consideró la superficie máxima de inundación de cada una de ellas (véase la tabla 2.1 del capítulo correspondiente).

La laguna del Camino de Villafranca presentó el valor máximo de abundancia de huevos diapáusicos viables en la capa más superficial del sedimento ( $2.83 \times 10^{11}$  huevos viables). Este número de huevos corresponde a tres especies diferentes del complejo *B. plicatilis*, a saber: *B. plicatilis s.s.*, *B. 'Manjavacas'* y *B. 'Tíscar'*. La mínima abundancia se encontró en Hondo Sur, que albergó sólo  $2.76 \times 10^8$  huevos con potencialidad para eclosionar pertenecientes a cuatro de las especies del complejo: *B. plicatilis s.s.*, *B. 'Manjavacas'*, *B. ibericus*, y *B. 'Tíscar'*. La máxima abundancia de huevos diapáusicos viables en el sedimento para una especie particular se encontró también en la laguna del Camino de Villafranca para *B. 'Manjavacas'* ( $1.86 \times 10^{11}$  huevos viables). Por su parte, la mínima abundancia de huevos diapáusicos viables para una especie en concreto del complejo de especies *B. plicatilis* se encontró en Clot de Galvany para *B. ibericus* ( $7.02 \times 10^6$  huevos viables).

Tabla 5.3. Abundancia de huevos diapáusicos viables de las especies del complejo *B. plicatilis* en los dos primeros centímetros del sedimento de cada una de las lagunas estudiadas. Los números totales se calcularon utilizando el área de inundación de cada laguna y las proporciones específicas para las especies reconocidas del complejo *B. plicatilis* (véase el texto). Las especies del complejo se han agrupado por morfotipos.

| Laguna                 | Morfotipo L             |                         |                         | Morfotipo SM           |                        |                         | Morfotipo SS            |                         |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                        | <i>B. plicatilis</i>    | <i>B. Manjavacas</i>    | Total                   | <i>B. ibericus</i>     | <i>B. 'Almenara'</i>   | <i>B. 'Tiscar'</i>      | Total                   | <i>B. rotundiformis</i> |
| CDG <sup>1, 4</sup>    | 2.30 x 10 <sup>8</sup>  | 0.00                    | 2.30 x 10 <sup>8</sup>  | 7.02 x 10 <sup>6</sup> | 0.00                   | 1.10 x 10 <sup>8</sup>  | 1.17 x 10 <sup>8</sup>  | 0.00                    |
| HON                    | -                       | -                       | -                       | -                      | -                      | -                       | -                       | -                       |
| HOS <sup>2, 3</sup>    | 1.27 x 10 <sup>7</sup>  | 0.97 x 10 <sup>7</sup>  | 2.24 x 10 <sup>7</sup>  | 3.17 x 10 <sup>7</sup> | 0.00                   | 2.22 x 10 <sup>8</sup>  | 2.54 x 10 <sup>8</sup>  | 0.00                    |
| ALM <sup>2</sup>       | 0.00                    | 0.00                    | 0.00                    | 3.36 x 10 <sup>7</sup> | 4.48 x 10 <sup>8</sup> | 0.00                    | 4.82 x 10 <sup>8</sup>  | 0.00                    |
| TON <sup>2</sup>       | 3.90 x 10 <sup>8</sup>  | 0.00                    | 3.90 x 10 <sup>8</sup>  | 1.40 x 10 <sup>8</sup> | 0.00                   | 0.00                    | 1.40 x 10 <sup>8</sup>  | 0.00                    |
| TOS <sup>1</sup>       | 1.09 x 10 <sup>9</sup>  | 0.00                    | 1.09 x 10 <sup>9</sup>  | 3.10 x 10 <sup>8</sup> | 0.00                   | 0.00                    | 3.10 x 10 <sup>8</sup>  | 1.04 x 10 <sup>9</sup>  |
| BDS                    | -                       | -                       | -                       | -                      | -                      | -                       | -                       | -                       |
| GAL                    | -                       | -                       | -                       | -                      | -                      | -                       | -                       | -                       |
| SDC <sup>2</sup>       | 1.27 x 10 <sup>9</sup>  | 0.00                    | 1.27 x 10 <sup>9</sup>  | 0.00                   | 0.00                   | 0.00                    | 0.00                    | 0.00                    |
| CVF <sup>2</sup>       | 2.95 x 10 <sup>9</sup>  | 1.86 x 10 <sup>11</sup> | 1.89 x 10 <sup>11</sup> | 0.00                   | 0.00                   | 9.45 x 10 <sup>10</sup> | 9.45 x 10 <sup>10</sup> | 0.00                    |
| MAN <sup>3</sup>       | 1.01 x 10 <sup>10</sup> | 2.02 x 10 <sup>10</sup> | 3.03 x 10 <sup>10</sup> | 0.00                   | 0.00                   | 0.00                    | 0.00                    | 0.00                    |
| TIR <sup>1, 3, 4</sup> | 0.00                    | 2.70 x 10 <sup>10</sup> | 2.70 x 10 <sup>10</sup> | 0.00                   | 0.00                   | 6.33 x 10 <sup>9</sup>  | 6.33 x 10 <sup>9</sup>  | 0.00                    |
| HYR                    | -                       | -                       | -                       | -                      | -                      | -                       | -                       | -                       |
| PET <sup>1, 3</sup>    | 0.00                    | 2.05 x 10 <sup>10</sup> | 2.05 x 10 <sup>10</sup> | 0.00                   | 0.00                   | 0.00                    | 0.00                    | 0.00                    |
| SBJ <sup>3</sup>       | 6.57 x 10 <sup>9</sup>  | 3.94 x 10 <sup>9</sup>  | 1.05 x 10 <sup>10</sup> | 0.00                   | 0.00                   | 0.00                    | 0.00                    | 0.00                    |

1. Proporciones de cada morfotipo estimadas directamente de las eclosiones obtenidas en esta tesis.
2. Composición y proporción de especies a partir del análisis de aloenzimas de bancos de huevos diapáusicos (Ortells, 2002).
3. Identificación específica de las eclosiones del morfotipo L basada en el análisis de restricción de *COI* realizada por Sergi Campillo (comunicación personal).
4. Morfotipo SM hallado por primera vez en estas lagunas. La identificación específica dentro de este morfotipo es aún desconocida en estas lagunas por lo que las proporciones se extrapolaron de otras lagunas próximas ecológica o geográficamente (Ortells, 2002).

## Discusión

### *Importancia de los estudios de viabilidad de huevos diapáusicos*

En este capítulo se ha presentado el primer estudio que relaciona el aspecto de los huevos diapáusicos de rotíferos procedentes de poblaciones naturales con su viabilidad. Hasta la fecha, la mayoría de estudios de viabilidad con huevos diapáusicos de rotíferos se habían realizado con huevos aparentemente sanos, intactos, y producidos por cepas de rotíferos cultivadas en laboratorio (Pourriot *et al.*, 1980; Minkoff *et al.*, 1983; Hagiwara e Hino, 1989; 1990; Hagiwara *et al.*, 1989; 1995). El conocimiento del estado fisiológico de los huevos diapáusicos acumulados en los sedimentos es importante porque determinados procesos fisiológicos y bioquímicos pueden afectar a su supervivencia y longevidad, y en consecuencia al potencial para el reclutamiento futuro y la restauración de poblaciones desde el banco de huevos diapáusicos (Marcus y Boero, 1998; Tunnacliffe y Lapinski, 2003).

Como ya se ha señalado con anterioridad, una práctica común en los estudios de campo sobre bancos de huevos diapáusicos consiste en considerar como viables los huevos aparentemente sanos (Hairston *et al.*, 1995; Weider *et al.*, 1997; Cáceres, 1998; Keller y Spaak, 2004; véanse también los capítulos 2, 3 y 4 de esta tesis). Esta práctica está justificada pues, si bien la viabilidad de un huevo diapáusico sólo puede probarse con su eclosión, el uso del aspecto como criterio de viabilidad facilita enormemente la exploración de los bancos de huevos diapáusicos. Los experimentos de eclosión en el laboratorio consumen mucho tiempo y la falta de conocimiento sobre los estímulos que propician la eclosión de los huevos diapáusicos en algunos taxa dificulta la elección de condiciones apropiadas para inducir la eclosión (Schwartz y Hebert, 1987; Tsitsilas y Barry, 2002). Además, la existencia de variación intraespecífica en la respuesta de eclosión (De Meester y De Jager, 1993; De Stasio, 2004) ha sido a menudo

utilizada como una razón para criticar la fiabilidad de los experimentos de eclosión en laboratorio (Cáceres, 1998; Cáceres y Schwalbach, 2001).

El éxito en la eclosión de huevos diapáusicos en el laboratorio va a depender de (1) que hayan completado el periodo obligado de diapausa, (2) la idoneidad de las condiciones experimentales utilizadas para inducir la eclosión, y (3) la propia viabilidad de los huevos diapáusicos. El experimento de laboratorio aquí presentado se diseñó para maximizar la eclosión de los huevos diapáusicos. En primer lugar, se tomaron medidas para asegurar que todos los huevos diapáusicos hubieran completado el periodo obligado de diapausa. En segundo lugar, el conjunto de condiciones utilizadas en los experimentos de eclosión ha sido probado con éxito en estudios previos para inducir la eclosión de huevos diapáusicos en el complejo *B. plicatilis*. Estas condiciones incluyen: (1) la extracción de los huevos diapáusicos del sedimento, lo que probablemente favorece la eclosión pues los huevos están en mejores condiciones y pueden recibir más directamente los estímulos para la eclosión que si están enterrados (Vandekerkhove *et al.*, 2004), (2) la iluminación constante (Minkoff *et al.*, 1983; Hagiwara *et al.*, 1985; 1995; Hagiwara e Hino, 1989), y (3) una temperatura de 25° C, que se considera óptima de acuerdo con Hagiwara *et al.* (1985). El diseño experimental también incluyó la incubación secuencial de los huevos diapáusicos a 6 y 2 g L<sup>-1</sup> de salinidad que, como ya se ha comentado, se ha probado que son dos salinidades adecuadas para la eclosión de huevos diapáusicos del complejo *B. plicatilis* (Gomez *et al.*, 2002; Ortells, 2002). De esta manera, cabe esperar que un alto porcentaje de los huevos viables eclosionen durante los experimentos. Aunque no puede descartarse que una fracción de los huevos diapáusicos no sea capaz de eclosionar bajo estas condiciones, parece poco probable que esto pueda explicar completamente el fallo en la eclosión de la alfísima fracción de huevos observada (87.7 %), un fallo que es aún elevado cuando se consideran únicamente los *huevos con aspecto saludable* (52.5 % de fracaso en la eclosión).

### Características de los huevos diapáusicos y su relación con la viabilidad

Los resultados muestran que el éxito en la eclosión disminuye drásticamente con la reducción en el tamaño relativo del embrión. La gran mayoría de las eclosiones (98.9 %) se obtuvieron a partir de *huevos diapáusicos con aspecto saludable* (tipos I y II según la clasificación en tipos morfológicos aquí presentada, y excluyendo aquellos con embrión de color gris). No obstante, se obtuvo también un pequeño número de eclosiones a partir de huevos diapáusicos que presentaron reducciones del 25-50 % en el tamaño del embrión relativo a su máximo volumen (tipo III). Aunque las eclosiones obtenidas a partir de huevos diapáusicos de tipo III representaron un pequeño porcentaje del total de eclosiones, los resultados muestran que hay casos en los que una pérdida importante de masa embrionaria no afecta a la supervivencia.

El color del embrión es otra característica para la que se ha demostrado su relación con la viabilidad de los huevos diapáusicos de las especies de rotíferos del complejo *B. plicatilis*. Dentro de cada tipo de huevo (I, II ó III), los huevos diapáusicos con embriones de color naranja mostraron tasas de eclosión mayores que los huevos con embriones de color marrón. Sólo un huevo con embrión de color gris eclosionó durante el experimento. Este resultado es consistente con el estudio de Minkoff *et al.* (1983), en el que se concluyó que los huevos diapáusicos de *B. plicatilis* que exhibían embriones de color gris podían considerarse muertos. El oscurecimiento y la pérdida de brillo se han considerado tradicionalmente síntomas indicativos del deterioro o degradación de los huevos diapáusicos. De hecho, en un estudio previo llevado a cabo por Hagiwara e Hino (1990) se observó una reducción en el porcentaje de eclosión, desde el 91 % hasta el 60 %, asociada al oscurecimiento de los huevos diapáusicos recién producidos en el laboratorio por un clon del rotífero *B. plicatilis*. Estos autores sugieren que las diferencias de color de los embriones en estado de diapausa podrían estar relacionadas con la dieta de sus madres. Así, por ejemplo, se sabe que

los huevos diapáusicos de rotíferos del género *Brachionus* acumulan carotenoides que pueden haber sido asimilados a partir de las algas que ingieren las madres (Gilchrist y Green, 1962). Pero además de la dieta, el contenido en carotenoides puede estar condicionado por la edad de los huevos diapáusicos y las condiciones de conservación. Como han sugerido Hagiwara e Hino (1990), un bajo contenido en carotenoides podría causar una disminución en las tasas de eclosión. Este último aspecto se discutirá más adelante con más detalle.

#### *Relación entre el estado de deterioro de los huevos diapáusicos y la profundidad del sedimento*

Los resultados muestran que la frecuencia de los diferentes tipos de huevos diapáusicos varía con la profundidad en el sedimento en la mayoría de las lagunas estudiadas. En 9 de las 15 lagunas estudiadas, los huevos mejor conservados (tipos I y II), que es lo mismo que decir los *huevos diapáusicos con aspecto saludable*, se encuentran preferentemente en las capas superiores del sedimento, y su frecuencia disminuye con la profundidad en el sedimento, probablemente debido a un efecto de envejecimiento (véase también el capítulo 2). Las capas más profundas del sedimento deben ser más antiguas si se supone que no existe mezcla del sedimento por bioturbación u otros procesos (*i.e.*, tormentas, corrientes; Kerfoot *et al.*, 2004a). Este supuesto es razonable para el caso de algunas de las lagunas estudiadas donde, de acuerdo con los datos disponibles (véase el capítulo 2), los sedimentos están estructurados cronológicamente.

El envejecimiento de los huevos diapáusicos puede ocurrir si los huevos no son completamente ametabólicos, lo que conllevaría el consumo de, al menos, parte de las reservas energéticas del embrión. Estudios de laboratorio con cladóceros han demostrado que los huevos diapáusicos mantienen un metabolismo basal mínimo, y que la tasa metabólica del

embrión en diapausa se relaciona con las condiciones de oxigenación, aunque de manera compleja (Andrew, 1993; Lutz *et al.*, 1994; Clegg, 1997; Hand, 1998). Hasta la fecha, no existen datos sobre la tasa metabólica de huevos diapáusicos de rotíferos, aunque se sabe de la presencia de vacuolas líficas en embriones diapáusicos de *Brachionus* que podrían estar relacionadas con cierta actividad metabólica (Wurdak *et al.*, 1978). Nuestra observación de que la reducción en el tamaño relativo del embrión está asociada a una pérdida progresiva de viabilidad es compatible con la idea de que los huevos diapáusicos de rotíferos son metabólicamente activos, y que este hecho puede constituir un factor de senescencia.

#### *Éxito y dinámica de eclosión de huevos diapáusicos con aspecto saludable*

La casi totalidad de las eclosiones de huevos diapáusicos observadas (98.9 %) corresponden a *huevos con aspecto saludable*. El resto de tipos de huevos considerados, salvo por muy escasas excepciones pueden considerarse huevos no viables. Pero como ya se ha dicho, no todos los *huevos con aspecto saludable* eclosionaron bajo nuestras condiciones experimentales, lo que se discute a continuación.

El éxito en la eclosión de *huevos diapáusicos con aspecto saludable* disminuye con la profundidad del sedimento de donde los huevos son extraídos, lo que apoya la idea de que la edad de los huevos puede tener implicaciones importantes en la pérdida de viabilidad. El éxito en la eclosión de estos huevos disminuyó desde un 60 % en la capa superior del sedimento (0-2 cm) hasta un 6 % en la última capa estudiada (8-10 cm). Nuestra hipótesis consiste en que, a pesar de su aspecto aparentemente sano, los huevos más viejos tienen menor capacidad para responder a los estímulos de la eclosión y pasan a ser inviables. Este tipo de patrón también se ha observado en cladóceros y copépodos (Carvalho y Wolf, 1989; Weider *et al.*, 1997; Cousyn y De Meester, 1998; Hairston *et al.*, 1995). En el caso de

cladóceros, Cousyn y De Meester (1998) han sugerido que la disminución en el éxito de eclosión podría ser debida al deterioro progresivo con la edad de compuestos fotosensibles que se almacenan en los huevos diapáusicos (Davison, 1969; Van der Linden *et al.*, 1991). El deterioro de estos compuestos fotosensibles supondría una pérdida de la capacidad de respuesta de los huevos diapáusicos a un estímulo típicamente considerado básico para la eclosión como es la luz. Esta hipótesis parece plausible para explicar nuestra observación pues, como ya se ha indicado, los huevos de rotíferos del género *Brachionus* también parecen almacenar compuestos fotosensibles (p.ej., carotenoides; Gilchrist y Green, 1962; Hagiwara e Hino, 1990) y precisar de un estímulo de tipo lumínico para eclosionar (Pourriot y Snell, 1983; Hagiwara *et al.*, 1985; 1995). A este respecto, es interesante la observación de que los *huevos diapáusicos con aspecto saludable* aislados de la capa más superficial del sedimento (0-2 cm) necesitan mucho menos tiempo de incubación para eclosionar que los huevos, también clasificados como *huevos con aspecto saludable*, pero aislados de capas más profundas. Esta regularidad también se ha observado en huevos diapáusicos del copépodo *Diaptomus sanguineus* (Hairston *et al.*, 1995).

Los resultados de este estudio sugieren que los huevos diapáusicos pueden perder viabilidad aun manteniendo su aspecto sano. Este hecho podría comprometer la práctica común de utilizar la apariencia de los huevos diapáusicos como criterio de viabilidad en los estudios de campo de bancos de huevos diapáusicos, ya que el número de *huevos diapáusicos con aspecto saludable* sobreestimaría el número de huevos viables en el sedimento. No obstante, la correlación hallada entre el número de *huevos diapáusicos con aspecto saludable* y su éxito de eclosión indica que la abundancia de *huevos con aspecto saludable* es un buen índice para la caracterización del tamaño del banco de huevos viables en los sedimentos de charcas y lagunas.

El éxito en la eclosión de los *huevos con aspecto saludable* varía entre áreas geográficas, y entre lagunas dentro de área geográfica. Los huevos aislados de lagunas costeras presentaron mayor éxito de eclosión que los de las lagunas del interior. Esta observación apunta a que los *huevos con aspecto saludable* en las lagunas del interior presentan en promedio una mayor reducción en viabilidad. No obstante, también se encontraron bajas fracciones de eclosión de *huevos con aspecto saludable* en algunas lagunas costeras. Además, las diferencias halladas en los tiempos de eclosión entre lagunas sugieren que la tasa con la que se deterioran los *huevos con aspecto saludable* sin mostrar cambios en su apariencia puede ser dependiente de la laguna. Estas diferencias pueden ser debidas a diferencias en las tasas de sedimentación – y por tanto, en la edad de los huevos situados en una misma capa en lagunas diferentes – o también a las condiciones particulares del sedimento que afectan a la preservación de los huevos como se ha sugerido para el caso de bancos de huevos diapáusicos de copépodos y cladóceros (p.ej., bajos niveles de oxígeno (Uye, 1980; Uye *et al.*, 1984; Lutz *et al.*, 1994), concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>S (Carvalho y Wolf, 1989)).

Por otra parte, no puede descartarse completamente que las condiciones empleadas en el diseño experimental sean mejores para la eclosión de los huevos diapáusicos procedentes de unas lagunas que para los de otras. La salinidad empleada en el experimento – un factor reconocido como crítico para la eclosión (Minkoff *et al.*, 1983) – está más próxima a la salinidad promedio de las lagunas costeras ( $16.2 \pm 4.5 \text{ g L}^{-1}$ , véase el capítulo 2) que a las del interior ( $40.5 \pm 7.1 \text{ g L}^{-1}$ , véase el capítulo 2), y las lagunas costeras presentaron tasas de eclosión más altas. Esta hipótesis parece improbable ya que no se encontró una correlación significativa entre la salinidad de las lagunas estudiadas y el éxito de eclosión de huevos con aspecto saludable aislados de cada una de ellas.

Los huevos diapáusicos con aspecto saludable tienen tiempos de eclosión más o menos largos según el tipo al que pertenecen. Los huevos diapáusicos del tipo II eclosionan antes y más sincrónicamente que los del tipo I, mientras que lo esperable es una demora en la respuesta de eclosión a medida que avanza el grado de deterioro del huevo diapáusico. Por el momento, no existen datos disponibles para explicar por qué las eclosiones tienen lugar antes en huevos diapáusicos con mayor grado de deterioro. Cabe especular que la permeabilidad del huevo podría aumentar con un ligero deterioro, de tal manera que la respuesta del embrión a las señales que inducen la eclosión podría verse acelerada en aquellos huevos diapáusicos que, aunque ligeramente deteriorados, son todavía capaces de eclosionar.

#### *Tamaño del banco de huevos viable y restauración de las poblaciones en la columna de agua*

En este estudio se ha demostrado que el sedimento de la mayor parte de las lagunas estudiadas alberga huevos diapáusicos viables, capaces de eclosionar y desarrollarse en rotíferos adultos aunque en cuatro lagunas no se encontraron huevos diapáusicos viables (Hondo Norte, Balsa de Santed, Gallocanta y Hoya Rasa). El éxito en la eclosión en la capa superficial del sedimento y la elevada supervivencia de las hembras neonatas eclosionadas sugieren que la restauración de las poblaciones activas de rotíferos está garantizada, aunque existe una duda sobre cómo se restablecen las poblaciones en las tres lagunas en las que no se han detectado huevos viables.

Los rotíferos poseen un tipo de proliferación muy efectivo y pueden alcanzar tamaños poblacionales elevados en un periodo de tiempo corto tras la eclosión de uno o unos pocos huevos diapáusicos, por lo que podría pensarse que el tamaño del banco de huevos no tiene mucha importancia

ecológica ni evolutiva: un banco pequeño determinaría propiedades poblacionales semejantes a un banco grande. No obstante, se conocen ampliamente los efectos asociados a cuellos de botella poblacionales, efectos que afectan a la probabilidad de persistencia poblacional (extinción por estocasticidad demográfica) y a la evolución (deriva genética e inercia genética frente al flujo génico, pérdida de diversidad, etc.). A priori, se podría postular que, bien en la fase de diapausa, bien en la fase inicial de recolonización de la columna de agua, las probabilidades de que las poblaciones de rotíferos atravesasen por un cuello de botella son altas. Nuestros resultados aportan evidencia en contra de que tal fenómeno sea común. Efectivamente, cuando se han detectado huevos viables, las estimas de abundancia arrojan valores muy elevados. El número total de huevos viables que pueden emerger de la capa superior (0-2 cm) del sedimento puede ser lo suficientemente grande – desde  $7.02 \times 10^6$  huevos viables de *B. ibericus* en Clot de Galvany hasta  $1.86 \times 10^{11}$  huevos viables de la especie *B. 'Manjavacas'* en la laguna del Camino de Villafranca. Con esas abundancias, los procesos de estocasticidad demográfica y genética son prácticamente despreciables.

En conclusión, el proceso de deterioro de los huevos diapásicos se presenta como un complejo sistema de cambios fisiológicos, que causa daños a sistemas y funciones vitales, y que resulta en último término en la pérdida de viabilidad y la reducción del tamaño del banco de huevos diapásicos viables. Se ha demostrado que el deterioro detectable visualmente causa pérdida de viabilidad, pero que existen otros factores que la ocasionan. La identificación de los huevos diapásicos con potencial de eclosionar es crítica para la estimación precisa del tamaño efectivo del banco de huevos diapásicos, si bien, la buena correlación entre huevos viables y huevos de aspecto saludable permite un uso de las abundancias de estos últimos en estudios comparativos. Por su lado, las estimas del banco de huevos viables, aunque puedan ser estimas mínimas, ofrecen información

sobre las probabilidades de supervivencia a largo plazo de las poblaciones de rotíferos, así como para saber si son despreciables los procesos evolutivos basados en bajos tamaños poblacionales.

# 6

## **Resistencia a la privación de alimento en rotíferos obtenidos a partir de huevos diapáusicos y huevos partenogenéticos**

### **Introducción**

Muchos organismos del zooplancton, y entre ellos los rotíferos, habitan ambientes aislados y temporalmente variables de manera que se espera que inviertan gran parte de sus recursos en adaptaciones específicas para la dispersión espacial y/o temporal (Hairston y Cáceres, 1996; McPeck y Kalisz, 1998). Los huevos diapáusicos de los rotíferos monogonontes constituyen un claro ejemplo de estas dos modalidades de dispersión. En el ciclo vital de estos partenogenéticos cíclicos la producción de los huevos diapáusicos está asociada a la reproducción sexual (véase la descripción detallada del ciclo vital en el capítulo 1). Los huevos diapáusicos son producidos por las hembras sexuales (míticas) fertilizadas durante la fase sexual del ciclo y, tras el periodo de latencia, eclosionan dando lugar a hembras asexuales (amíticas) que se reproducen partenogenéticamente para dar lugar a nuevas hembras. Así, las hembras asexuales de los rotíferos pueden proceder de dos tipos de huevos: (1) huevos partenogenéticos diploides (de aquí en adelante, simplemente huevos partenogenéticos) producidos por las hembras asexuales partenogenéticamente, y (2) huevos diapáusicos producidos por las hembras sexuales mediante reproducción sexual. Existen diferencias entre los dos tipos de huevos. En primer lugar, los huevos diapáusicos de algunos rotíferos monogonontes de ambientes templados

presentan mayor cantidad de reservas de lípidos que los huevos partenogenéticos (Wurdak *et al.*, 1978; Gilbert, 1983). Esto, junto con el hecho de que las hembras productoras de huevos diapáusicos tienen menor fecundidad que las partenogenéticas, sugiere que la asignación de recursos por huevo, y por tanto el coste de producción, es mayor en los huevos diapáusicos que en los partenogenéticos (Snell y Garman, 1986; Serra, 1987; Serra *et al.*, 2005). En segundo lugar, los huevos partenogenéticos eclosionan al poco tiempo de haber sido producidos (*i.e.*, son huevos subitáneos) y con frecuencia cuando todavía son transportados por las madres. Así, las hembras descendientes de los huevos partenogenéticos típicamente experimentan las mismas condiciones ambientales que sus progenitoras. Por el contrario, los huevos diapáusicos no eclosionan tras la ovoposición, sino que permanecen en diapausa en el sedimento de lagos y charcas durante algún tiempo (*i.e.*, periodo de diapausa obligada), aun cuando las condiciones ambientales sean óptimas para el crecimiento y la reproducción. De esta forma, se espera que la descendencia partenogenética y la descendencia post-diapausa se enfrenten con diferentes ambientes, lo que debe reflejarse en sus respectivos rasgos de la historia vital (Gilbert y Schröder, 2004).

Un estudio reciente ha mostrado que las hembras provenientes de huevos diapáusicos del rotífero monogononte *Brachionus calyciflorus*, presentan una mayor tolerancia a la privación de alimento que las hembras provenientes de huevos partenogenéticos (Gilbert, 2004). Este resultado sugiere que la mayor tolerancia observada es el resultado de la mayor asignación de recursos al huevo diapáusico, y que la supervivencia es la presión selectiva para la evolución del rasgo 'asignación de recursos'. Las diferencias en los ambientes que experimentan las hembras neonatas procedentes de ambos tipos de huevos, diapáusico y partenogenético, en el momento de la eclosión serán las que, en última instancia, condicionarán la evolución de las diferencias en la asignación de recursos. Por otro lado, también es posible que los huevos diapáusicos consuman parte de los

recursos durante la diapausa debido al mantenimiento de un nivel basal de metabolismo y respiración (véase el capítulo 5). Se espera que la importancia relativa de estos y otros factores sobre la demanda de recursos sea dependiente de las condiciones ecológicas que prevalecen en el ambiente cuando (1) se forma el huevo diapáusico, (2) durante la etapa en la que el embrión permanece en diapausa, y (3) en el momento de la eclosión. Además de los efectos del tipo de hábitat, es también interesante conocer si en otras especies de rotíferos diferentes a *B. calyciflorus* (Gilbert, 2004), hasta ahora el único referente, se encuentra una mayor resistencia a la privación de alimento en las neonatas provenientes de huevos diapáusicos.

En este capítulo se presenta un estudio comparativo de la supervivencia y reproducción en condiciones de privación de alimento entre dos cohortes de hembras del rotífero *Brachionus plicatilis sensu stricto* obtenidas a partir de huevos diapáusicos (de aquí en adelante, cohorte post-diapausa) y de huevos partenogenéticos (de aquí en adelante, cohorte post-partenogénesis) producidos bajo las mismas condiciones ambientales.

## Material y métodos

### *Obtención y mantenimiento de la población experimental*

Se aislaron 4000 hembras de *B. plicatilis* s.s. de una muestra de plancton obtenida en enero de 2004 en el Hondo Sur, una pequeña laguna localizada en un humedal de la región oriental de la Península Ibérica (véase el capítulo 2). Estas hembras, que muy probablemente representaban una variedad de genotipos, se utilizaron para fundar la población experimental de rotíferos. La población se mantuvo en cultivos en masa de 2 L a 25° C ( $\pm 1^\circ$  C), 12 g L<sup>-1</sup> de salinidad, con iluminación constante (35  $\mu$ mol quanta m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y la microalga prasinofícea *Tetraselmis suecica* como alimento. El medio de cultivo salino se

preparó a partir de sales marinas comerciales (Instant Ocean®, Aquarium Systems) y se fertilizó con la fórmula f/2 de Guillard y Ryther (1962) antes de la inoculación de la microalga. Los cultivos de *T. suecica* crecieron en las condiciones indicadas arriba y se utilizaron como medio de crecimiento de la población experimental de rotíferos cuando se alcanzó una concentración superior a  $2 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> (exceso de alimento para los rotíferos; Serra, 1987). Semanalmente, se eliminaba una fracción del cultivo de rotíferos y se reemplazaba con nuevo medio de cultivo (i.e., cultivo de *T. suecica*). La tasa de dilución (*D*) empleada fue de 0.7 semana<sup>-1</sup> (Boraas, 1993).

#### *Producción de huevos partenogenéticos y huevos diapáusicos*

Se aislaron 600 hembras del cultivo experimental de mantenimiento, y se transfirieron a un nuevo recipiente de cultivo con 6 L de medio fresco. Este cultivo se mantuvo en las mismas condiciones que el de mantenimiento, pero la densidad de alimento se controló diariamente y ajustó para que fuese, como mínimo, de  $2 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> (26 mg C L<sup>-1</sup>) de *T. suecica*. La densidad de la microalga se estimó a partir de muestras del cultivo de rotíferos, sin éstos, midiendo la absorbancia a 750 nm mediante un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1603). El valor de absorbancia se transformó en densidad de células del alga y concentración de carbono mediante el establecimiento de curvas patrón, de manera análoga a la descrita por Ciroso-Pérez *et al.* (2004). Cuando fue necesario mantener los niveles de alimento en la población de rotíferos, se añadieron volúmenes muy pequeños de cultivos de la microalga altamente concentrados. Los volúmenes de las muestras tomadas para estimar la densidad de microalgas también fueron lo suficientemente pequeños como para no alterar significativamente el volumen original del cultivo. Bajo estas condiciones, los rotíferos fueron capaces de crecer hasta alcanzar una alta densidad poblacional (por encima de 100 hembras mL<sup>-1</sup>) y produjeron números

elevados de huevos partenogenéticos y diapáusicos. De esta forma, la reproducción sexual fue inducida por efecto de la densidad poblacional (Snell y Boyer, 1988; Carmona *et al.*, 1993; 1995; Stelzer y Snell, 2003).

Cada día se tomaron muestras de 2-200 mL de la población experimental y se estimó la densidad poblacional mediante el recuento de las muestras. Tras los recuentos, las muestras se devolvieron al cultivo. Durante los recuentos, las hembras ovígeras presentes en las muestras se clasificaron como sexuales o asexuales según el tipo de huevos que portaban (Carmona *et al.*, 1995). A partir de estos datos se calculó, como estima del nivel de reproducción sexual en la población, la razón de mixis (*i.e.*, la proporción de hembras sexuales, fertilizadas o no, sobre el total de hembras). Tras diez días de cultivo, se observaron, como ya se ha indicado más arriba, números elevados de huevos partenogenéticos y diapáusicos. En este momento, se aislaron del cultivo hembras portadoras de cada tipo de huevo y se depositaron en sendos tubos de plástico de 45 mL (uno para cada tipo de hembra) con medio de 12 g L<sup>-1</sup> de salinidad (preparado a partir de sales marinas comerciales) y sin alimento. Una vez introducidas las hembras en estos tubos, los huevos fueron separados de las madres mediante agitación. Posteriormente, huevos y hembras (ya separados) se filtraron a través de una malla de Nyltal de diámetro de poro de 30 µm, que permitió concentrar los huevos y eliminar las microalgas. La malla se lavó con medio de 12 g L<sup>-1</sup> de salinidad sobre una placa Petri de manera que los huevos se concentraron en un pequeño volumen (< 5 mL). Finalmente, se aislaron 430 huevos partenogenéticos y 640 huevos diapáusicos producidos bajo las mismas condiciones ambientales.

#### *Experimento de tabla de vida*

Inmediatamente después de su recolección, los huevos partenogenéticos se aislaron individualmente en placas multipocillo estériles (Nunc™) con 200 µL

de medio de 12 g L<sup>-1</sup> de salinidad, e incubados a 25° C bajo condiciones de iluminación constante (150-170  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y se esperó hasta su eclosión. Por su parte, los huevos diapáusicos se desecaron y, posteriormente, se almacenaron a 4° C y en oscuridad durante dos meses para asegurar que se completase el periodo de diapausa obligada y optimizar así el número de eclosiones (Hagiwara e Hino, 1989). Tras el periodo de almacenamiento, los huevos diapáusicos se rehidrataron en medio de 12 g L<sup>-1</sup> de salinidad y se sometieron a las mismas condiciones de eclosión que los huevos partenogenéticos.

Las hembras neonatas que eclosionaron de cada uno de los dos grupos de huevos se utilizaron para establecer dos cohortes experimentales de 72 hembras (*i.e.*, cohorte post-partenogénesis y cohorte post-diapausa). Las hembras neonatas se aislaron individualmente en placas multipocillo estériles (Iwaki, Asahi Techno Glass Co.) con 1 mL de medio de 12 g L<sup>-1</sup> de salinidad, y se incubaron a 22.5° C bajo condiciones de iluminación constante, en ausencia de alimento. No se observó ninguna célula de *T. suecica* durante el experimento de tabla de vida, lo que indica que el protocolo utilizado (véanse más arriba los procesos de filtrado y transferencia de huevos y neonatas) elimina cualquier microalga residual procedente del cultivo de la población experimental. Las neonatas se siguieron desde su nacimiento hasta su muerte mediante observaciones periódicas a intervalos de 12 horas. En cada una de las observaciones se tomaron los siguientes datos: (1) si la hembra estaba viva o muerta, lo que permite calcular el tiempo de supervivencia, definido como el momento central del intervalo de tiempo en el que tuvo lugar la muerte de la hembra, (2) número de descendientes y (3) su tipo (descendencia masculina o femenina). Dos neonatas procedentes de huevos diapáusicos murieron antes de las 12 primeras horas de vida debido a su incapacidad para emerger del huevo; estos dos casos no se consideraron en el análisis de los datos.

### Análisis de los datos

Se realizó de un análisis de tabla de vida con datos censurados debido a que existían casos de datos perdidos – tres neonatas se perdieron durante su manipulación en el periodo de estudio. Para la realización de los cálculos de tabla de vida relativos a la fecundidad sólo se consideraron las hembras de la cohorte que resultaron ser hembras asexuales (*i.e.*, que produjeron descendencia femenina). Las hembras sexuales (hembras productoras de machos) se excluyeron de los análisis de fecundidad ya que no contribuyen al crecimiento inmediato de la población. Para estimar la asociación entre los tiempos de supervivencia de las hembras y el número de descendientes producidos se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre ambas variables. Posteriormente, se aplicó una prueba *t* de significación sobre este coeficiente.

En el análisis de tabla de vida se calcularon los siguientes parámetros demográficos para ambas cohortes: la tasa neta de reproducción ( $R_0$ ), el tiempo medio de generación ( $G_c$ ), la función de supervivencia ( $l_x$ , siendo  $x$  la edad de la hembra), la función de riesgo (también llamada tasa de mortalidad instantánea,  $h_x$ ), la fecundidad específica de edad ( $m_x$ ), y la esperanza de vida en el momento del nacimiento ( $e_0$ ). La función de supervivencia ( $l_x$ ) y la función de riesgo asociada ( $h_x$ ) se estimaron para cada cohorte mediante el método Berkson-Gage corregido para datos censurados (Lee, 1992). El tiempo de vida media de cada cohorte ( $S_{50}$ : la edad ( $x$ ) a la que  $l_x$  es 0.5) se estimó mediante interpolación lineal. Todos los parámetros temporales se expresaron en días.

Se utilizaron dos pruebas estadísticas diferentes para comparar las funciones de supervivencia de ambas cohortes: (1) la prueba Gehan-Wilcoxon, y (2) la prueba *log-rank*. Ambas son pruebas no paramétricas, pero están basadas en supuestos diferentes. La prueba Gehan-Wilcoxon asigna mayor peso a las observaciones tempranas dado que están basadas en un

mayor número de individuos que las observaciones tardías y tienen más confianza. Por el contrario, la prueba *log-rank* asigna el mismo peso a todas las observaciones. Ambas pruebas se realizaron con el paquete informático STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc.).

Las funciones de riesgo ( $h_x$ ) de cada cohorte, previamente estimadas por el método Berkson-Gage, trataron de ajustarse a funciones teóricas específicas (exponencial, Weibull, Gompertz y lineal-exponencial). El ajuste se realizó mediante el método de mínimos cuadrados ponderados (Gehan y Siddiqui, 1973). De acuerdo con Gehan y Siddiqui, se pueden utilizar tres métodos de ponderación según el valor que se le da al peso ( $w_x$ ): (1)  $w_x = 1$  (no ponderación), (2)  $w_x = 1/\text{VAR}(h_x)$ , esto es la inversa de la varianza estimada de la función de riesgo a la edad  $x$ , y (3)  $w_x = b_x n_x$ , el resultado del producto entre el periodo de tiempo transcurrido entre observaciones ( $b_x$ ) y el número de animales expuestos al riesgo a la edad  $x$  ( $n_x$ , un número relacionado con el número de animales observados con vida a la edad  $x$ , pero modificado según el procedimiento específico para datos censurados). El criterio para el mejor ajuste a una de las cuatro funciones teóricas consideradas fue el de máxima log-verosimilitud. Este último análisis se realizó también con STATISTICA 6.0, y en él se utilizaron los criterios adicionales implementados por este paquete estadístico.

## Resultados

### *Producción de huevos y dinámica del cultivo de rotíferos*

En la figura 6.1 se muestran las dinámicas de la densidad de hembras totales de *B. plicatilis* s.s., razón de mixis, y abundancias de huevos diapáusicos y partenogenéticos en los cultivos previos a la realización de los ensayos de tablas de vida.

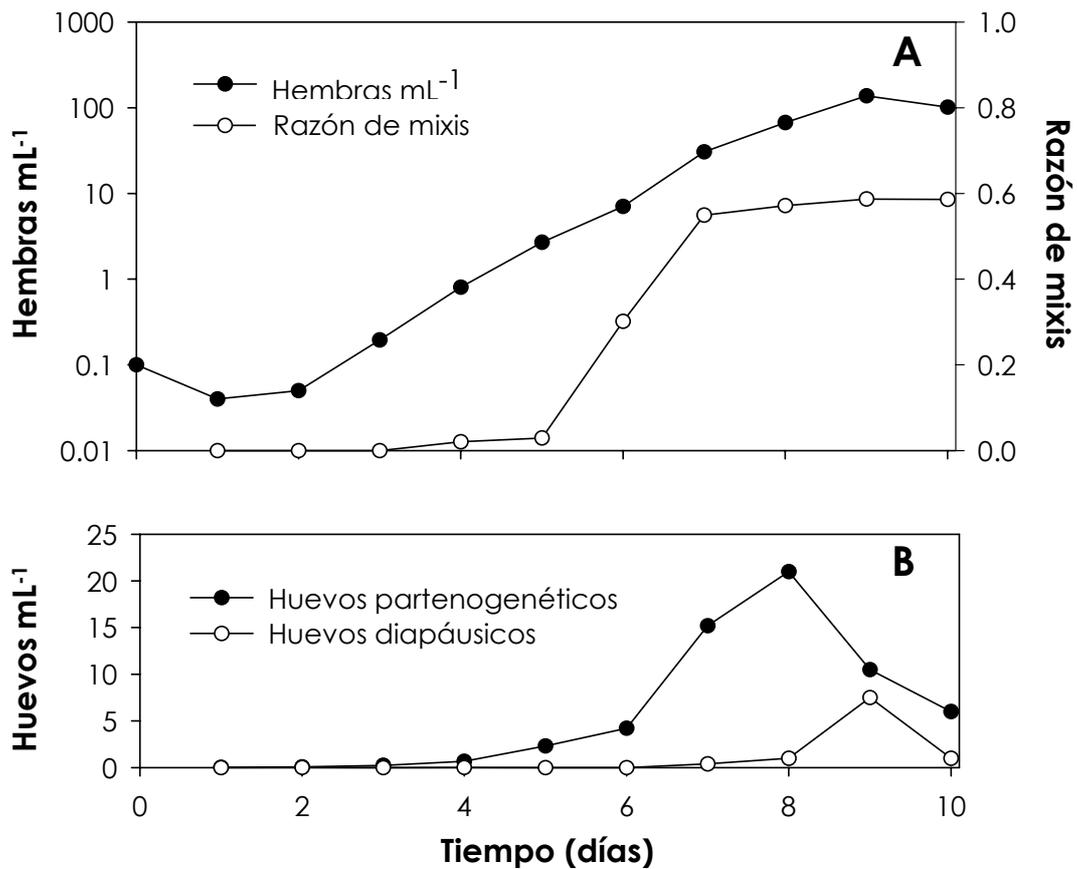


Figura 6.1. Dinámica poblacional del cultivo de 10 días del rotífero *B. plicatilis* s.s. a partir del que se aislaron los huevos diapásicos y partenogénéticos utilizados en el experimento. **A:** Dinámica de la densidad de hembras totales y de la razón de mixis. **B:** Dinámicas de los dos tipos de huevos considerados.

El crecimiento exponencial comenzó a partir del segundo día y se mantuvo hasta el noveno. La razón de mixis experimentó un rápido incremento entre el quinto y séptimo día, manteniéndose desde entonces en torno a un valor de 0.6 hasta el final del cultivo. La densidad de ambos tipos de huevos se incrementó con el tiempo, pero alcanzó sus máximos respectivos en momentos diferentes. Los huevos partenogénéticos alcanzaron su máxima densidad el octavo día de cultivo, mientras que la densidad de huevos diapásicos alcanzó su máximo al noveno día de cultivo. El décimo día de cultivo, los números de ambos tipos de huevos en el

cultivo eran lo suficientemente altos (se estimó que había 6000 huevos diapáusicos y 36000 partenogenéticos) para llevar a cabo los experimentos de tabla de vida y se procedió a su recolección del cultivo.

*Eclosión de huevos partenogenéticos y huevos diapáusicos*

La eclosión de los huevos partenogenéticos y diapáusicos siguió patrones diferentes. La dinámica para las 72 primeras eclosiones de cada uno de los dos tipos de huevos se muestra en la figura 6.2.

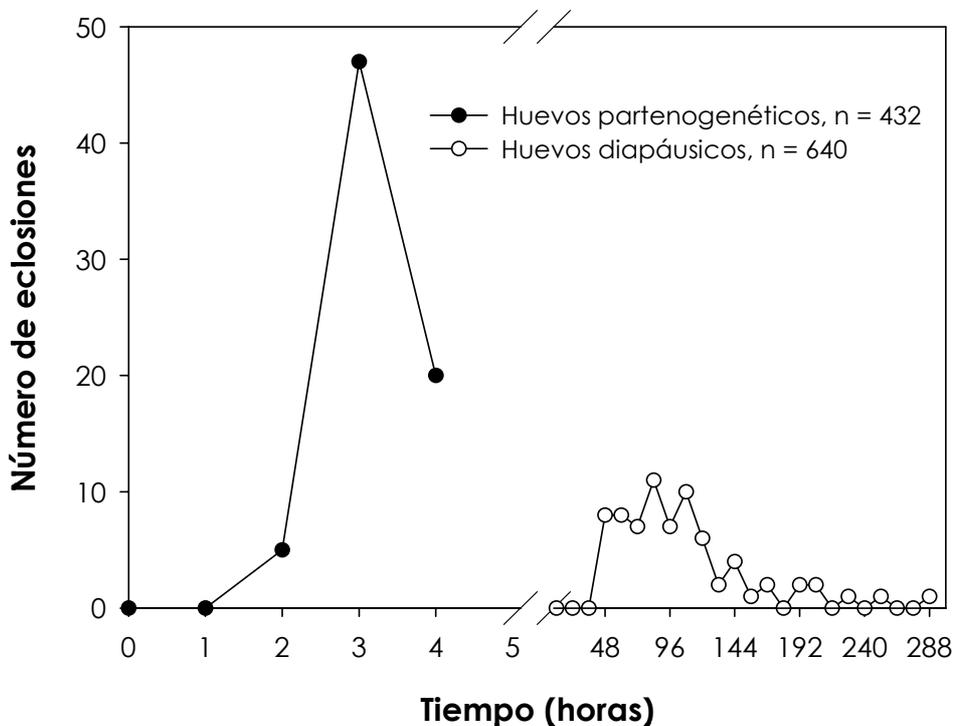


Figura 6.2. Dinámica de eclosiones de los huevos partenogenéticos y diapáusicos utilizados en el experimento. Se indica el número (n) de huevos de cada tipo inicialmente expuestos a las condiciones de eclosión.

El número de huevos partenogenéticos necesario para conseguir las 72 hembras de la cohorte post-partenogénesis fue menor que el de huevos diapáusicos para establecer la cohorte post-diapausa. Además, la eclosión

de los huevos partenogenéticos fue bastante sincrónica, teniendo lugar en un intervalo de 4 horas. En cambio, la eclosión de los huevos diapáusicos comenzó 48 horas después del inicio de la incubación y se extendió hasta 288 horas, momento en el que se completó la cifra de 72 neonatas.

*Supervivencia de las neonatas procedentes de huevos partenogenéticos y huevos diapáusicos en condiciones de privación de alimento*

Las curvas de supervivencia de las hembras de *B. plicatilis* s.s. sometidas a condiciones de privación de alimento provenientes de huevos partenogenéticos y huevos diapáusicos se muestran en la figura 6.3.

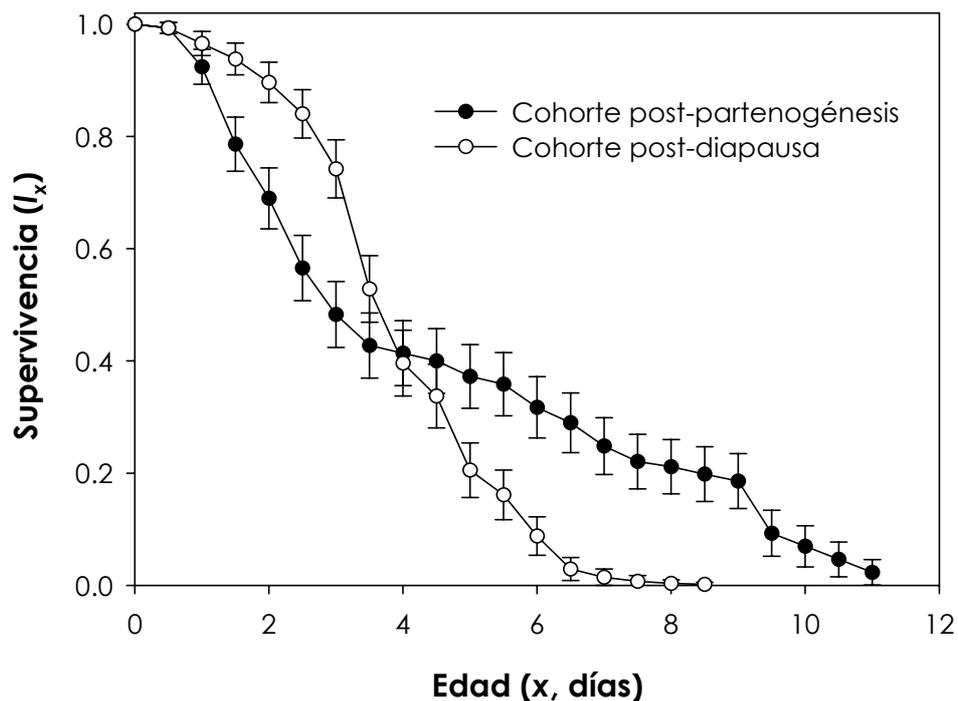


Figura 6.3. Supervivencia específica de edad ( $l_x$ ) de las neonatas provenientes de huevos partenogenéticos y diapáusicos sometidas a condiciones de privación de alimento. Las barras verticales indican  $\pm$  el error típico.

Las curvas de supervivencia se cruzaron el cuarto día debido a que algunas hembras pertenecientes a la cohorte post-partenogénesis murieron antes que las de la cohorte post-diapausa, y a la rápida disminución de la supervivencia de la cohorte post-diapausa a partir del segundo día. El tiempo de vida media ( $S_{50}$ ) fue mayor para las hembras de la cohorte post-diapausa que para las de la cohorte post-partenogénesis, mientras que la esperanza de vida en el momento del nacimiento siguió el patrón opuesto (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Parámetros de supervivencia de las dos cohortes de hembras de *B. plicatilis* s.s. sometidas a condiciones de privación de alimento estimados por el método Berkson-Gage para datos censurados.  $S_{50}$ : edad a la que sólo sobrevive el 50 % de los individuos que iniciaron la cohorte;  $e_0$ : esperanza de vida en el momento del nacimiento (duración promedio de la vida). La significación estadística para la diferencia entre las funciones de supervivencia de ambas cohortes se muestra para las pruebas no paramétricas de Gehan-Wilcoxon y *log-rank*.

| <b>Cohorte</b>               | <b>N</b>           | <b><math>S_{50}</math> (días)</b> | <b><math>e_0</math> (días)</b> |
|------------------------------|--------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| Post-parthenogénesis         | 72                 | 2.89                              | 4.40                           |
| Post-diapausa                | 72                 | 3.61                              | 3.80                           |
| <b>Prueba estadística</b>    | <b>Estadístico</b> | <b>p</b>                          |                                |
| Gehan-Wilcoxon <sup>a</sup>  | -0.823             | 0.410                             |                                |
| <i>Log-rank</i> <sup>b</sup> | -1.762             | 0.078                             |                                |

- a. La prueba de Gehan-Wilcoxon da más peso a las observaciones iniciales. Esta prueba es más sensible para detectar diferencias en la supervivencia al comienzo de la vida.
- b. La prueba *log-rank* asigna igual peso a todas las observaciones.

Ninguna de las pruebas no paramétricas realizadas (*i.e.*, Gehan-Wilcoxon y *log-rank*) mostró diferencias estadísticas significativas entre las funciones de supervivencia de ambas cohortes, independientemente de los diferentes pesos asignados a la supervivencia en edad temprana en cada una de dichas pruebas.

Una prueba de Levene para la homogeneidad de varianzas mostró que la varianza de la distribución de muertes en la cohorte post-partenogénesis era significativamente mayor que para la cohorte post-diapausa (estadístico  $W$  de Levene = 63.73, g.l. = 1, 142,  $p < 0.001$ ). Este resultado confirma la mayor sincronía en las muertes de la cohorte post-diapausa. No se encontró correlación entre los tiempos de supervivencia de las hembras de la cohorte post-diapausa y el tiempo necesario para la eclosión del huevo diapáusico del cual procedían ( $r$  de Pearson = 0.212,  $n = 69$ ,  $p = 0.081$ ).

Cuando se aplicaron los métodos paramétricos de análisis de supervivencia a nuestros dos conjuntos de datos, se encontró que la supervivencia de la cohorte post-partenogénesis no se ajustó a ninguna de las funciones teóricas ensayadas (exponencial, Weibull, Gompertz, y lineal-exponencial;  $p < 0.001$ , en todos los casos). En el caso de la cohorte post-diapausa, los datos observados no se ajustaron a tres de las funciones teóricas probadas (exponencial, lineal-exponencial, y Gompertz;  $p < 0.05$ ), y no se encontraron diferencias significativas entre la función de riesgo de la cohorte post-diapausa y una distribución de tipo Weibull ( $p = 0.532$ ). Los valores de log-verosimilitud obtenidos bajo este modelo para los tres métodos de ponderación utilizados resultaron ser muy próximos, si bien el valor máximo de log-verosimilitud se encontró cuando no se aplicó ningún peso a la tasa de riesgo ( $w_x = 1$ ).

#### *Reproducción bajo condiciones de privación de alimento*

Mientras que ninguna hembra de la cohorte post-diapausa tuvo descendientes, el 40 % de las hembras de la cohorte post-partenogénesis produjo algún descendiente a lo largo de su vida. En la figura 6.4 se muestra la distribución del éxito reproductivo (expresado como el número de descendientes producidos por una hembra a lo largo de su vida) de las

hembras asexuales en la cohorte post-partenogénesis. Del total de hembras reproductivas, el 82.7 % fueron asexuales, mientras que el 13.3 % restante produjo descendencia masculina.

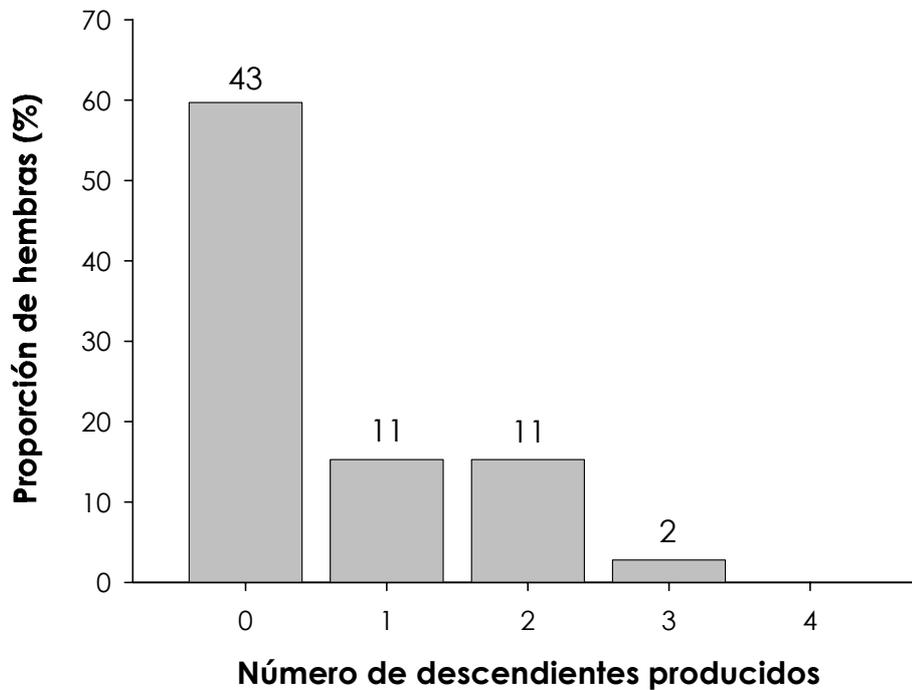


Figura 6.4. Distribución de la proporción de hembras de la cohorte post-partenogénesis según su éxito reproductivo. Los números sobre las barras indican el número de hembras que produjo cada número de descendientes.

Un 91 % de las hembras asexuales reproductivas produjeron uno o dos huevos. Ninguna hembra produjo más de tres huevos partenogenéticos. Todos los huevos se desarrollaron en neonatas. La tasa neta de reproducción ( $R_0$ ) de la cohorte post-partenogénesis fue 0.722, y el tiempo medio de generación ( $G_c$ ) de 6.23 días. El valor de la tasa de crecimiento ( $r$ ) calculada a partir de estos dos parámetros fue de  $-0.05 \text{ días}^{-1}$ , lo que implica que en condiciones de privación de alimento, la cohorte post-partenogénesis tiene una tasa de reproducción indicativa de una población en extinción.

En la figura 6.5 se muestra la asociación entre el tiempo de supervivencia y la inversión en reproducción (número de descendientes producidos por una hembra a lo largo de su vida) en la cohorte post-partenogénesis. La correlación entre ambas variables resultó significativa ( $r$  de Pearson = 0.795,  $n = 24$ ,  $p < 0.001$ ).

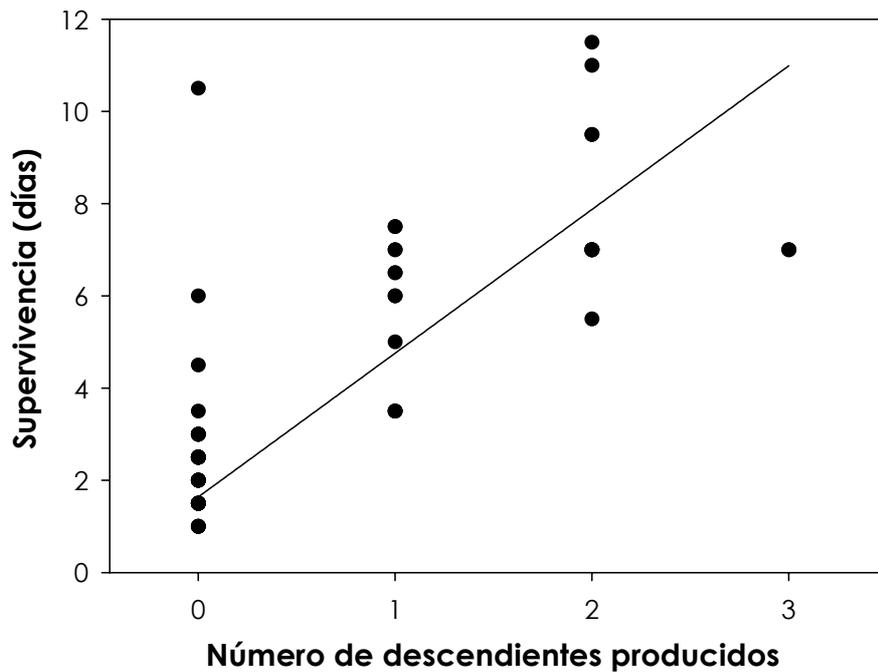


Figura 6.5. Relación entre la supervivencia y el éxito reproductivo de las hembras de la cohorte post-partenogénesis sometidas a condiciones de privación de alimento.

## Discusión

Se ha propuesto recientemente que las hembras provenientes de huevos diapáusicos en el rotífero *B. calyciflorus* son más resistentes a la privación de alimento que las que proceden de huevos partenogénéticos (Gilbert, 2004). Uno de los mecanismos propuestos para esta mayor tolerancia está basado en la mayor cantidad de reservas energéticas (almacenadas en forma de lípidos) que contienen los huevos diapáusicos, tal y como se ha observado en los huevos diapáusicos de los rotíferos monogonontes *B. calyciflorus* y

*Asplanchna sieboldi* (Wurdak *et al.*, 1978; Gilbert, 1983). Esta mayor cantidad de reservas, y en consecuencia mayor inversión energética, implicaría un mayor coste de producción de los huevos diapáusicos frente a los partenogenéticos, lo cual es consistente con las diferencias entre el número de huevos de uno y otro tipo producidos por las hembras a lo largo de su vida (Gilbert, 1983; Snell y Garman, 1986). Recientemente se ha encontrado que las hembras de *B. calyciflorus* procedentes de huevos diapáusicos poseen también una gran cantidad de reservas en forma de lípidos (Gilbert, 2004). Por otra parte, en varias especies de cladóceros del género *Daphnia* se ha demostrado que el contenido en lípidos está correlacionado positivamente con las reservas energéticas y la resistencia a condiciones de privación de alimento (Tessier *et al.*, 1983).

Una mayor resistencia a las condiciones de privación de alimento en el caso de la descendencia post-diapausa con respecto a la descendencia partenogenética podría tener implicaciones adaptativas, pues los huevos diapáusicos eclosionan en los sedimentos de lagos y charcas, probablemente a cierta distancia de la zona donde se concentra el alimento. Por su parte, los huevos partenogenéticos son transportados por las hembras de muchas especies de rotíferos prácticamente hasta el momento de su eclosión, lo que probablemente implica cierto coste energético (Yúfera *et al.*, 2005). Todo esto sugiere que el hecho de eclosionar en las proximidades de la madre, por ejemplo, donde la madre ha encontrado alimento abundante para poder reproducirse, sería ventajoso también para sus descendientes (Gilbert, 1983). Las condiciones ambientales a las que se enfrentarían las neonatas provenientes de los huevos partenogenéticos requerirían un menor acopio de reservas. No obstante, los resultados obtenidos en este estudio para la especie *B. plicatilis* s.s. no apoyan la hipótesis de una mayor tolerancia a las condiciones de privación de alimento en hembras provenientes de huevos diapáusicos con respecto a hembras obtenidas a partir de la eclosión de huevos partenogenéticos. Estas últimas, en el caso de *B. plicatilis* s.s., exhibieron tiempos de supervivencia

mayores que las primeras, aunque las diferencias entre ambos tiempos de supervivencia no resultó significativa. Más aún, algunas hembras provenientes de huevo partenogenético incluso produjeron descendientes en estas condiciones. Por el contrario, ninguna hembra de la cohorte post-diapausa produjo descendencia, lo que apoya la hipótesis de que las hembras obtenidas a partir de la eclosión de huevos diapáusicos en *B. plicatilis* s.s. podrían tener niveles menores de reservas que las procedentes de huevos partenogenéticos. A pesar de esto, los datos obtenidos sugieren que la resistencia a las condiciones de privación de alimento de la cohorte post-diapausa es bastante uniforme. Como resultado, una alta proporción de las hembras obtenidas a partir de huevos diapáusicos (60 %) sobrevivió durante más tiempo en estas condiciones que la correspondiente proporción de hembras obtenidas a partir de huevos partenogenéticos.

Los resultados obtenidos en este capítulo contrastan con el único estudio previo en rotíferos en el que se ha comparado el tiempo de supervivencia en condiciones de privación de alimento entre hembras obtenidas de huevos partenogenéticos y diapáusicos (Gilbert, 2004). En dicho estudio se encontró que en dos cepas de *B. calyciflorus*, las hembras obtenidas de huevos diapáusicos sobrevivían durante más tiempo (1.2 veces más; aprox. 12 horas) en condiciones de privación de alimento que las obtenidas de huevos partenogenéticos. A pesar de que nuestro diseño experimental es similar al realizado por Gilbert, existen algunas diferencias entre ambos estudios que pueden ayudar en la interpretación de los resultados dispares encontrados. En primer lugar, la especie utilizada no es la misma en ambos estudios. Aunque ambas son con-genéricas, muy probablemente estas dos especies están adaptadas a ambientes diferentes con respecto a su temporalidad y salinidad (*B. plicatilis* s.s. ocupa ambientes salobres mientras que *B. calyciflorus* es una especie de agua dulce). En segundo lugar, nuestro diseño experimental, para reproducir en mayor grado las condiciones naturales, introduce una mayor variación genética en la población experimental. Nótese, sin embargo, que en el presente estudio,

como en el de Gilbert, los huevos partenogenéticos y diapáusicos se produjeron en las mismas condiciones ambientales y los niveles de alimento nunca fueron limitantes para el crecimiento de la población experimental a partir de la cual se obtuvieron los huevos. En tercer y último lugar, los huevos diapáusicos en nuestro estudio se almacenaron durante dos meses en condiciones de baja temperatura y oscuridad para obtener tasas de eclosión mayores (Hagiwara e Hino, 1989), mientras que en el estudio realizado por Gilbert no se indica nada a este respecto, lo que hace presuponer que los huevos diapáusicos se incubaron en las condiciones de eclosión inmediatamente tras su recolección. Si, efectivamente, éste fue el procedimiento seguido en el citado estudio, ello conllevaría la obtención de menores tasas de eclosión.

Independientemente de las causas que puedan explicar la disparidad de resultados entre ambos estudios, nuestros resultados muestran que la secuencia lógica: '(1) si un huevo es diapáusico, (2) muestra mayor acopio de recursos, y entonces (3) se espera una mayor resistencia a las condiciones de privación de alimento' no siempre se cumple. Es posible que esto se deba a que también se destinen niveles altos de recursos energéticos a algunos huevos partenogenéticos. Esto ocurriría si la asignación de recursos en el caso de los huevos partenogenéticos siguiese un patrón oportunista. Esto es, algunos huevos partenogenéticos harían mayor acopio de reservas que otros en función de las condiciones en que se hubiesen producido. De esta forma, los huevos partenogenéticos con mayor acopio de recursos podrían generar descendientes más resistentes a las condiciones de privación de alimento. Es importante hacer notar aquí que si la función que relaciona el tiempo de supervivencia en condiciones de privación de alimento con la asignación de recursos es cóncava (Figura 6.6), entonces la varianza en la asignación podría resultar en un incremento de la media del tiempo de supervivencia de las hembras procedentes de huevos partenogenéticos (Horn y Rubenstein, 1984; Real y Ellner, 1992).

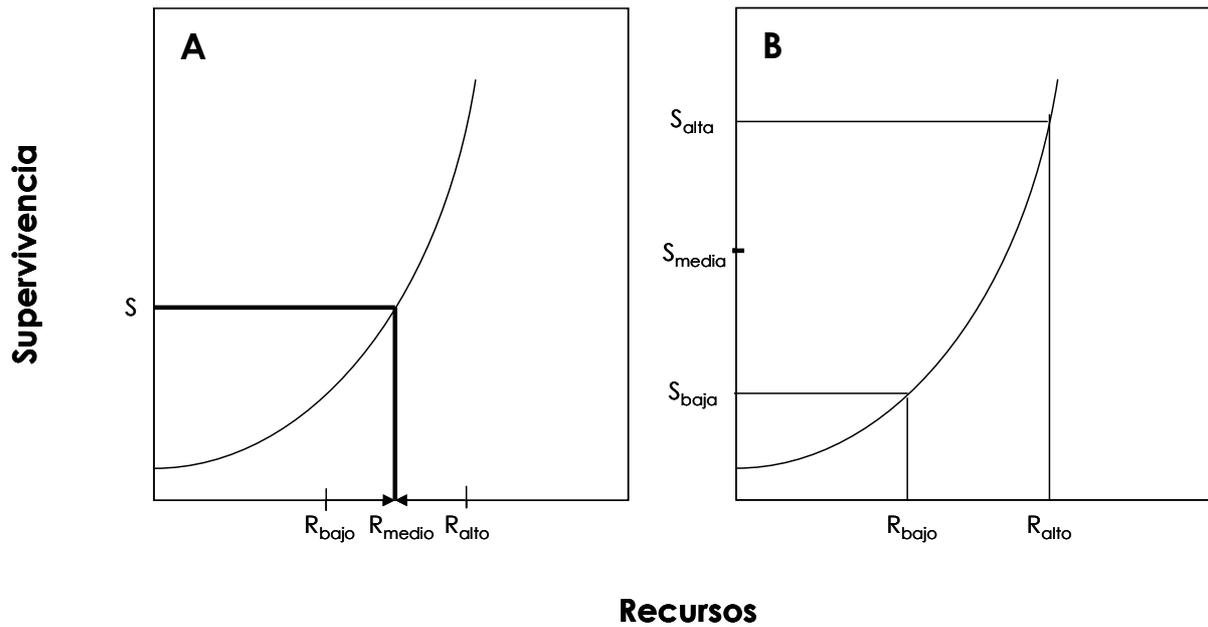


Figura 6.6. Función de tipo cóncavo entre niveles de recursos disponibles y supervivencia. **A:** Estrategia conservativa; haya muchos recursos ( $R_{alto}$ ) o pocos ( $R_{bajo}$ ), se invierte siempre el valor medio de recursos ( $R_{medio}$ ) en el huevo, lo que resulta en un tiempo de supervivencia fijo ( $S$ ). Cuando los niveles de recursos son altos, una parte se almacena para complementar los momentos con niveles de recursos bajos. **B:** Estrategia oportunista, donde se explota la varianza. Cuando hay niveles altos de recursos se invierten más en los huevos resultando en una supervivencia mayor ( $S_{alta}$ ), y cuando los niveles de recursos son bajos se invierte menos ( $S_{baja}$ ). Debido a la forma cóncava hipotetizada para la relación entre supervivencia y la asignación de recursos, la estrategia B resulta en una supervivencia promedio ( $S_{media}$ ) mayor que en el caso anterior. Por simplicidad, se ha supuesto que sólo hay dos situaciones (niveles alto y bajo de recursos), y que éstas son equifrecuentes, aunque las conclusiones no dependen de estos detalles.

Los resultados de nuestro estudio muestran que las hembras descendientes de huevos partenogenéticos presentan una mayor varianza en sus tiempos de supervivencia que las procedentes de huevos diapáusicos. En relación con este hecho, la función de supervivencia de la cohorte post-diapausa queda bien descrita mediante una función teórica conocida (*i.e.*, el modelo Weibull), mientras que esto no ocurre en el caso de la cohorte post-partenogénesis, lo que es consistente con la mayor heterogeneidad en

la supervivencia de esta cohorte. La cohorte post-diapausa presentó una mayor homogeneidad en la supervivencia pese a que los huevos diapáusicos son el producto final de la reproducción sexual y se espera que sean más diversos debido a la recombinación en una población ya de por sí genéticamente diversa. Si la varianza en la resistencia a las condiciones de privación de alimento observada en la cohorte post-partenogénesis es el resultado de la varianza en los niveles de recursos almacenados en cada huevo, esto último podría reflejar la variación ambiental experimentada por las madres, o el estado fisiológico de las mismas (p.ej., diferencias de edad). Debido al solapamiento de generaciones en la población experimental, es posible que en la producción de los huevos partenogenéticos que se recolectaron para el experimento hubieran contribuido hembras de diferente edad. Este efecto de la edad, que mimetiza lo que ocurriría en condiciones naturales, podría tener influencia en los procesos de envejecimiento de la progenie tal y como ha observado en los rotíferos bdelloides (Lansing, 1954). Según el llamado 'efecto Lansing' la descendencia de hembras de edad avanzada presenta tiempos de supervivencia menores que la descendencia de hembras más jóvenes. Por otra parte, la correlación positiva observada en nuestro estudio entre fecundidad y longevidad de las hembras de la cohorte post-partenogénesis, en lugar de apuntar a un compromiso (*trade-off*) entre ambos parámetros, sugiere también una mayor varianza en la asignación de recursos en los huevos partenogenéticos. El tamaño de los huevos partenogenéticos también podría tener influencia en la longevidad de las neonatas (Kirk, 1997). Sin embargo, si bien no se realizó un análisis biométrico, no se apreciaron diferencias notables en el tamaño de los huevos partenogenéticos aislados para el experimento. El efecto del estado de las hembras y del ambiente en la asignación de recursos a los huevos, se espera que sea menor en el caso de los diapáusicos. Esto se debe a que estos huevos tardan más tiempo en ser producidos, de manera que la variación intrínseca (p.ej., la edad de las madres) y extrínseca (p.ej., la disponibilidad puntual de alimento) podrían promediarse.

Permanece abierta la cuestión sobre si los altos costes de producción de los huevos diapáusicos en *B. plicatilis*, sugeridos por sus bajas tasas de producción en comparación con los partenogenéticos, están asociados a una mayor asignación de recursos (*i.e.*, contenido en lípidos) como ocurre en otras especies de rotíferos. Una explicación alternativa podría basarse en los costes de producir las envueltas protectoras de los huevos diapaúsicos. No obstante, aunque un huevo diapáusico tuviera más reservas energéticas que un huevo partenogenético (ambos producidos por la misma población), los recursos del primero podrían destinarse a otros procesos, no necesariamente a la supervivencia de la neonata bajo condiciones de privación de alimento. Algunos estudios previos sugieren que las reservas de un huevo diapáusico podrían agotarse parcialmente durante la diapausa debido al mantenimiento de un cierto metabolismo basal (Perona y Vallejo, 1989; Williams-Howze *et al.*, 1998; véase también el capítulo 5). También es posible que las hembras neonatas que emergen de un huevo diapáusico consuman gran parte de sus reservas energéticas en el propio evento de la eclosión. Hay que tener en cuenta que es necesario romper la cubierta protectora del huevo y esto podría implicar el consumo de gran cantidad de energía. De hecho, y en relación con esto último, Santer y Boldt (1998) han observado un descenso súbito en el contenido en lípidos tras la emergencia de larvas nauplio de copépodo a partir de huevos diapáusicos. En este sentido resulta interesante la observación en nuestros experimentos de algunos huevos diapáusicos en los que la neonata no fue capaz de romper completamente la cubierta y salir del huevo, de manera que la eclosión no progresó y la neonata murió en unas pocas horas. Tampoco debe obviarse la posibilidad de que las neonatas obtenidas a partir de huevos diapáusicos difieran fisiológicamente de las obtenidas a partir de huevos partenogenéticos. Si esto es así, sería posible que las tasas metabólicas de uno y otro tipo de hembra difirieran, pudiendo ser mayores en el caso de las hembras procedentes de huevo diapáusico, tal y como han encontrado Arbačiauskas y Lampert (2003) en el caso del cladócero *Daphnia magna*. Si este es el caso, en condiciones de privación de alimento, las hembras de la cohorte

post-diapausa agotarían sus reservas energéticas y morirían antes que las hembras procedentes de huevos partenogenéticos. Una mayor actividad metabólica en las hembras post-diapausa implicaría la necesidad de una mayor cantidad de recursos alimenticios para el desarrollo y el crecimiento.

Cabe esperar que los huevos diapáusicos en rotíferos, como se ha observado en especies de cladóceros del género *Daphnia* (Arbačiauskas, 1998), eclosionen en respuesta a estímulos ambientales correlacionados con condiciones favorables del hábitat para el crecimiento y la reproducción. Las poblaciones de *B. plicatilis* s.s. típicamente habitan charcas temporales muy someras donde la exposición a la luz, la temperatura y la oxigenación de la columna de agua, al comienzo de una estación de crecimiento, pueden promover el desarrollo de algas y también la eclosión de los huevos diapáusicos. En el caso de esas poblaciones, los estímulos para la eclosión de los huevos diapáusicos podrían estar particularmente bien correlacionados con la disponibilidad de alimento en el ambiente próximo, inmediato a las neonatas. Esta situación contrasta claramente con el escenario hipotetizado para las poblaciones de rotíferos que habitan lagos profundos (por ejemplo, algunas poblaciones de *B. calyciflorus*), donde las neonatas tendrían que migrar verticalmente largas distancias sin alimento, desde el sedimento profundo donde eclosionan hasta la zona superior de la columna de agua donde se concentra el alimento. En este caso, la resistencia a la privación de alimento, y el acopio de reservas de lípidos, podrían ser adaptaciones críticas.

Como resultado del estudio descrito en este capítulo, se presenta la hipótesis de que la asignación de recursos en la producción de huevos diapáusicos podría seguir un patrón conservativo, mientras que en el caso de los huevos partenogenéticos sería más oportunista. Se concluye que los recursos asignados a los huevos diapáusicos no siempre resultan en una mayor supervivencia promedio de las hembras en condiciones de privación de alimento, si se comparan con hembras obtenidas a partir de huevos

partenogenéticos. Este hecho podría explicarse como una consecuencia de la diversificación de las funciones a las que se destinan las reservas energéticas del huevo diapaúsico, o también como un resultado de la varianza en la asignación de recursos a los huevos partenogenéticos.



# 7

## Variación intra e interpoblacional en la producción de huevos diapáusicos de rotíferos

### Introducción

Como ya se ha visto en capítulos anteriores (p.ej., 1 y 6), en el ciclo vital de los rotíferos monogonontes se combinan dos modos de reproducción: (1) partenogenética, que permite obtener altas tasas de crecimiento poblacional y la rápida colonización del hábitat, y (2) sexual, que da lugar a la producción de huevos diapáusicos. La fase de reproducción sexual en el ciclo vital de los rotíferos implica varias etapas (Snell, 1986; Preston *et al.*, 2000), que incluyen (1) la inducción de la reproducción sexual y la aparición de hembras sexuales en la población, (2) la fertilización de dichas hembras, y (3) la producción de los huevos diapáusicos. El número de huevos diapáusicos producidos se ha reconocido como la medida última de eficacia biológica en poblaciones temporales que habitan ambientes variables, ya que estos huevos constituyen la única vía para sobrevivir a las condiciones adversas y recolonizar la población cuando las condiciones ambientales adecuadas para el crecimiento y la reproducción se restablecen (Serra y King, 1999; Serra *et al.*, 2005). En el caso de las especies de rotíferos monogonontes del género *Brachionus*, la inducción de la reproducción sexual es dependiente de la densidad poblacional (Gilbert, 1977; Pourriot y Snell, 1983; Snell y Boyer, 1988; Carmona, 1992; Carmona *et al.*, 1993; 1995; Stelzer y Snell, 2003). A este respecto, existe evidencia reciente

de que *Brachionus plicatilis* puede condicionar el medio mediante la secreción de una proteína que actúa como señal, en función de su concentración en el medio, para la inducción de la reproducción sexual (*mixis inducing protein*; Snell et al., enviado).

Las hembras sexuales no contribuyen al crecimiento inmediato de la población, ya que si no son fecundadas producen machos y si lo son producen huevos diapáusicos. Así, la reproducción sexual (*mixis*), aunque constituye una inversión en supervivencia futura a través de la producción de huevos diapáusicos, representa un freno al crecimiento inmediato de la población. Por otra parte, para una misma razón de *mixis* (*i.e.*, proporción de hembras sexuales en la población), cuanto mayor es el tamaño poblacional causado por la tasa de crecimiento partenogenético, mayor será la producción de huevos diapáusicos. Por tanto, ambos factores (*i.e.*, el crecimiento poblacional y la inversión en reproducción sexual) son considerados componentes de la eficacia. Las relaciones entre estos dos parámetros demográficos y la producción final de huevos diapáusicos se presentan gráficamente en la figura 7.1.

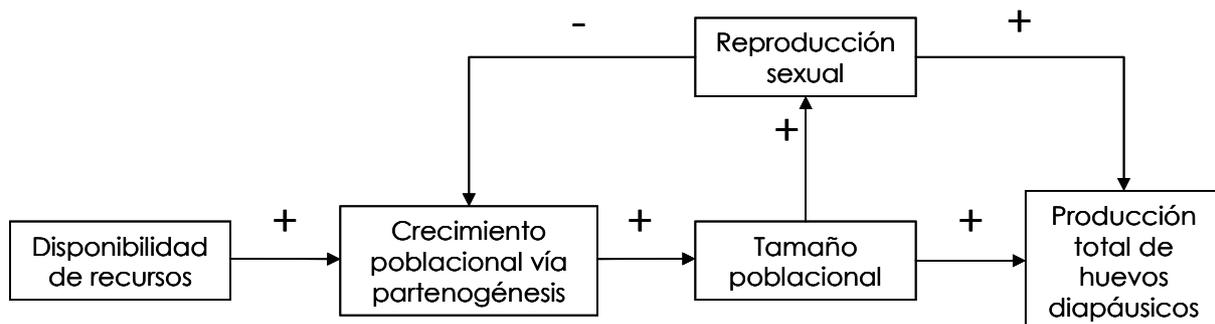


Figura 7.1. Relaciones entre los parámetros demográficos del ciclo vital de los rotíferos monogonontes y la producción total de huevos diapáusicos.

Debido a que la reproducción sexual supone un freno al crecimiento poblacional, debe existir un compromiso entre la inversión en la

reproducción sexual y el crecimiento partenogenético que maximice la producción de huevos diapáusicos (Snell, 1987). Además, el compromiso entre estos dos rasgos y la propia producción final de huevos diapáusicos podría variar entre poblaciones de *B. plicatilis* que habiten ambientes con diferentes regímenes selectivos (Serra y King, 1999; Schröder, 2005). La diferenciación de ambientes selectivos junto con el aislamiento entre poblaciones ofrecen oportunidades para la aparición de divergencias en rasgos de la historia vital y su mantenimiento por adaptación local (*i.e.*, proceso por el cual los individuos de las poblaciones locales tendrán mayor eficacia en su propio hábitat que inmigrantes de otras poblaciones; De Meester, 1996; Kawecki y Ebert, 2004). De hecho, a partir de estudios con marcadores moleculares neutros se sabe de la existencia de diferenciación genética entre poblaciones de *B. plicatilis* en relación con su grado de aislamiento, lo que ofrece oportunidades para la divergencia en rasgos de la historia vital entre dichas poblaciones (Gómez *et al.*, 1995; 2000; Ortells *et al.*, 2000; Ortells 2002). No obstante, si una localidad es muy variable (*i.e.*, incluye varios regímenes selectivos) podría mantenerse cierto polimorfismo (*i.e.*, variabilidad intrapoblacional) y no encontrarse evidencias de adaptación local (Spencer *et al.*, 2001).

La reproducción sexual en rotíferos depende de factores tanto internos como externos que, en último término, incidirán en la producción final de los huevos diapáusicos (Gilbert, 1977; Pourriot y Snell, 1983). Entre los factores internos puede destacarse, en primer lugar, la variación genética que puede existir entre clones y entre poblaciones en la propensión a la reproducción sexual (p.ej., razón de mixis más o menos alta; Hino e Hirano, 1976; Gilbert, 1977; Carmona *et al.*, 1994). Un segundo factor de tipo interno es la edad de las hembras, que afecta a la fracción de hembras sexuales producidas en la descendencia (Pourriot y Snell, 1983; Carmona *et al.*, 1994). Por su parte, entre los factores externos se han reconocido varias condiciones ambientales con influencia en la producción final de huevos diapáusicos en *B. plicatilis*. Los considerados más importantes son: (1) la temperatura (Snell,

1986; Hagiwara y Lee, 1991), (2) la salinidad (Lubzens *et al.*, 1980; Snell, 1986; Hagiwara *et al.*, 1988; 1989), y (3) la disponibilidad de alimento (Snell, 1986). Todos estos estudios se han desarrollado con determinadas cepas de *B. plicatilis* mantenidas en laboratorio, mientras que la variación en la producción de huevos diapáusicos entre y dentro de poblaciones naturales de esta especie no se ha abordado hasta el momento.

La distinción entre la variación fenotípica de las poblaciones debida a factores internos y la debida a factores ambientales se estudia típicamente mediante experimentos de 'transplantes recíprocos' (*i.e.*, experimentos donde todas las poblaciones se estudian en todas y cada una de las localidades de origen) o de 'jardín común' (*i.e.*, experimentos donde todas las poblaciones se estudian en las mismas condiciones) (Reznick y Travis, 1996; Gómez-Mestre y Tejedo, 2003). Este tipo de experimentos permite identificar y cuantificar la variación atribuible a la población de origen (*i.e.*, diferenciación genética), a las condiciones ambientales, y a la interacción entre ambas. La existencia de interacción significativa implica que diferentes poblaciones responden de forma distinta a distintos ambientes, y es un indicio de adaptación local (Lynch y Walsh, 1998; Gómez-Mestre y Tejedo, 2003).

De esta manera, mediante un diseño experimental de 'jardín común', en este capítulo se ha tratado de responder específicamente a las siguientes cuestiones: (1) ¿Difiere la producción de huevos diapáusicos entre poblaciones de *B. plicatilis sensu stricto* en la Península Ibérica? (2) ¿Existe variación dentro de las poblaciones de *B. plicatilis s.s.* en la producción de huevos diapáusicos? (3) Si existe diferenciación en la producción de huevos diapáusicos entre poblaciones, ¿depende también de las condiciones ambientales, atendiendo especialmente a la temperatura y a la salinidad? (4) ¿Hay indicios de adaptación local? Y por último, (5) ¿cómo se combina el crecimiento poblacional con la inversión en reproducción sexual para

resultar en la producción total de huevos diapáusicos en cada una de las poblaciones estudiadas?

## Material y métodos

### *Poblaciones y clones de estudio*

Para el estudio de la variabilidad intraespecífica – entre poblaciones y dentro de poblaciones – en la producción de huevos diapáusicos en la especie *B. plicatilis* s.s., se seleccionó un subconjunto de seis lagunas del total de lagunas estudiadas en esta tesis (véase el capítulo 2). Las lagunas seleccionadas para este experimento junto con su caracterización se presentan en la tabla 7.1. Las lagunas estudiadas representan un gradiente en la duración del hidropériodo, así como en las condiciones de salinidad y temperatura a las que se encuentran las poblaciones activas de *B. plicatilis* s.s.

Tabla 7.1. Características de las lagunas estudiadas. Los rangos de salinidad y temperatura corresponden a las condiciones en las que en otros estudios se han encontrado individuos de la especie *B. plicatilis* s.s. en la columna de agua. Fuente: Ortells *et al.* (2000), Gómez *et al.* (2002), Lapesa (2004).

| <b>Laguna</b>      | <b>Área<br/>(km<sup>2</sup>)</b> | <b>Profundidad<br/>(m)</b> | <b>Salinidad<br/>(g L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Temperatura<br/>(° C)</b> | <b>Patrón hídrico</b> |
|--------------------|----------------------------------|----------------------------|---|------------------------------|-----------------------|
| Salada de Chiprana | 0.23                             | 5.0                        | 32-47                                   | 15-25                        | Permanente            |
| Salobrejo          | 0.36                             | 0.8                        | 8-30                                    | 8-25                         | Semipermanente        |
| Hoya Rasa          | 0.08                             | < 1.0                      | -                                       | -                            | Estacional            |
| Hondo Sur          | 0.13                             | 0.8                        | 8-21                                    | 15-25                        | Semipermanente        |
| Balsa de Santed    | 0.02                             | < 1.0                      | 17-20                                   | 10-20                        | Episódica             |
| Poza Sur           | 0.01                             | 1.0                        | 10-32                                   | 20-25                        | Estacional            |

Se extrajeron muestras de sedimento superficial de cada una de las lagunas con una draga de mandíbulas tipo *Van Veen* (Ejkelkamp Agrisearch Equipment). Posteriormente, mediante la técnica de flotación en sacarosa (véase el capítulo 5), se aislaron huevos diapásicos del complejo *B. plicatilis* de cada muestra de sedimento, y se indujo su eclosión en el laboratorio. Las condiciones de eclosión utilizadas fueron las mismas que las de capítulos anteriores (6 g L<sup>-1</sup> de salinidad, 25° C de temperatura, e iluminación constante; véanse los capítulos 5 y 6).

Las hembras neonatas obtenidas a partir de la eclosión de huevos diapásicos aislados del sedimento fueron identificadas taxonómicamente para su asignación a la especie *B. plicatilis* s.s. Para ello, a partir de las neonatas resultantes de la eclosión de los huevos se fundaron clones por proliferación partenogenética mediante cultivo en tubos de ensayo con 40 mL de medio de 12 g L<sup>-1</sup> de salinidad preparado con sales comerciales (Instant Ocean®, Aquarium Systems), a 25° C de temperatura, y la microalga *Tetraselmis suecica* como alimento. En algunos casos, la identificación morfológica de las neonatas fue suficiente para descartar clones no pertenecientes a *B. plicatilis* s.s. (por su pertenencia a los morfotipos SS y SM, véase el capítulo 1). Sin embargo, para la discriminación entre clones pertenecientes a las dos especies con morfotipo L (*B. plicatilis* s.s. y *B.* 'Manjavacas') fue necesario el uso de técnicas moleculares. En estos casos se realizó un análisis de restricción del gen mitocondrial *COI* con dos enzimas (*Pvu II* y *Kpn I*), que son diagnósticos para *B.* 'Manjavacas' y *B. plicatilis* s.s. respectivamente (Campillo *et al.*, 2005). Este análisis fue llevado a cabo por Sergi Campillo (doctorando de la Unidad de Ecología Evolutiva del *Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva, Universitat de València*). Tras el proceso de identificación específica, se obtuvo una colección de 30 clones de *B. plicatilis* s.s. de cada una de las seis lagunas seleccionadas (180 clones en total). Estos clones se utilizaron para estudiar la variabilidad en la producción de huevos diapásicos dentro de cada población y entre las distintas poblaciones.

Los clones de *B. plicatilis* s.s. se mantuvieron hasta su uso en los experimentos en cultivos con 500 mL de medio de 22.5 g L<sup>-1</sup> de salinidad y a 22.5° C de temperatura, condiciones promedio de las que se utilizarían más adelante en los cultivos experimentales. Los animales se alimentaron con la microalga *T. suecica* viva administrada *ad libitum*. Dos veces por semana se eliminaba el 60 % del cultivo y se sustituía por nuevo medio que incluía también el alimento. Los cultivos de *T. suecica* utilizados como alimento se realizaron simultáneamente a los cultivos de mantenimiento de rotíferos y bajo las mismas condiciones de salinidad y temperatura que estos últimos. Para el crecimiento de *T. suecica*, el medio de cultivo salino se fertilizó con la fórmula f/2 de Guillard y Ryther (1962).

#### *Diseño experimental*

Se diseñó un experimento de 'jardín común' en el que los clones procedentes de las diferentes poblaciones de *B. plicatilis* s.s. se cultivaron en el laboratorio en combinaciones de varias condiciones experimentales controladas. Se determinó la producción total de huevos diapáusicos en 30 clones de cada una de las seis poblaciones de *B. plicatilis* s.s., cultivados en dos condiciones de temperatura (20° y 25° C) y dos salinidades (15 y 30 g L<sup>-1</sup>). Para cada una de las 720 situaciones experimentales resultantes (6 poblaciones x 30 clones x 2 temperaturas x 2 salinidades) se realizaron dos réplicas, lo que generó un total de 1440 cultivos experimentales.

Previamente a los cultivos experimentales (véase la figura 7.2), se establecieron cultivos pre-experimentales con el fin de (1) obtener un número suficiente de hembras experimentales, (2) aclimatar los rotíferos a las condiciones experimentales de alimentación, y (3) evitar efectos maternos.

Los cultivos pre-experimentales se iniciaron mediante la inoculación de aproximadamente 700 hembras procedentes de los cultivos de

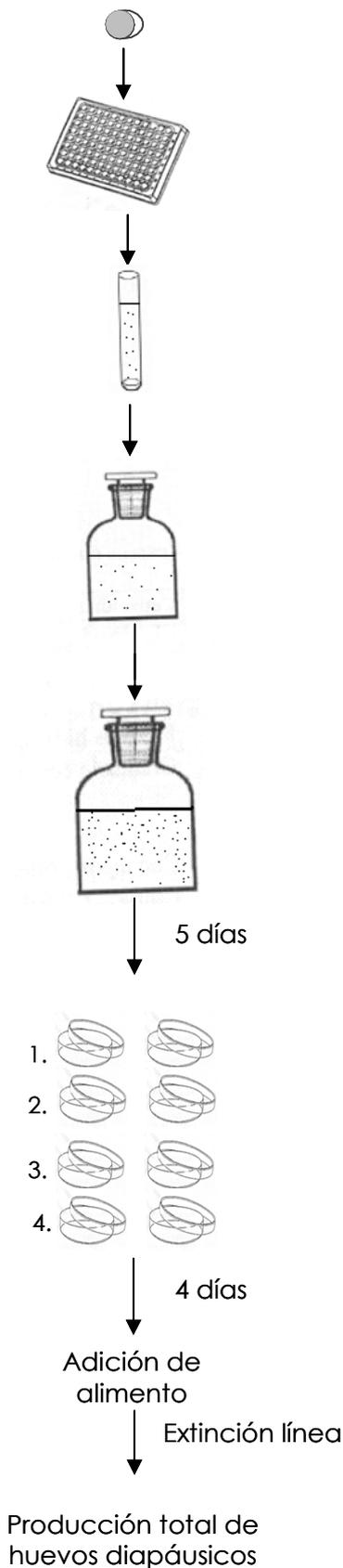
mantenimiento. Para ello, se estimó la densidad de rotíferos en dichos cultivos, y se filtró, a través de una malla de Nytal de 30  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, el volumen necesario en cada caso para obtener el inóculo. Las hembras se resuspendieron en 1 L de medio de cultivo fresco a 22.5 g L<sup>-1</sup> de salinidad y se mantuvieron en crecimiento a 22.5° C de temperatura e iluminación constante (35  $\mu\text{mol}$  quanta m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) durante 5 días. La densidad inicial de los cultivos pre-experimentales se fijó de forma que los niveles de mixis fueran bajos y así obtener, tras el periodo de cultivo pre-experimental, un número de hembras asexuales suficiente con el que iniciar los experimentos.

En los cultivos pre-experimentales y experimentales se utilizaron microalgas inertes de *T. suecica* obtenidas por congelación como fuente de alimento. Previamente al tratamiento de congelación, se estableció un cultivo de gran volumen de *T. suecica* en las mismas condiciones indicadas más arriba. La concentración celular del cultivo se estimó espectrofotométricamente mediante el uso de una curva de calibración (véase el capítulo 6). A continuación se procedió a la concentración del cultivo de microalgas mediante centrifugación a 12.6 G durante 5 minutos. Para el caso de los cultivos pre-experimentales, el medio con algas se sometió a varios ciclos sucesivos de centrifugación hasta su concentración a una densidad final de 2 x 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup>. Una vez concentradas las microalgas se distribuyeron en alícuotas de 25 mL que se congelaron en tubos de centrífuga a -80° C hasta su uso para la alimentación de los cultivos pre-experimentales. Para los cultivos experimentales el medio con algas se concentró a una densidad final de 50 x 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> y se repartió en alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  en tubos eppendorf® que se conservaron también a -80° C. Este procedimiento permitió utilizar microalgas de un mismo cultivo de origen en todos los cultivos pre-experimentales y experimentales, para procurar la constancia en la calidad de las microalgas utilizadas como alimento. Previamente a su uso, las algas se descongelaron a temperatura ambiente. La concentración inicial de alimento en los cultivos pre-

experimentales fue de  $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Para mantener las células en suspensión se introdujo en cada cultivo pre-experimental un tubo de aireación a baja presión. No se añadió alimento durante el periodo de cultivo pre-experimental.

Cada uno de los cultivos experimentales se inició con 12 hembras ovígeras asexuales, aisladas del cultivo pre-experimental de cada clon, en una placa de cultivo de poliestireno que contenía 50 mL de medio a la correspondiente salinidad experimental. A cada una de las placas de cultivo, se le añadió un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de microalgas congeladas a una concentración de  $50 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , de manera que la densidad inicial de alimento por placa fue de  $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Las placas se incubaron a la correspondiente temperatura experimental. A los cuatro días después del inicio del cultivo experimental se añadieron otros 100  $\mu\text{L}$  de algas congeladas a la misma concentración, y se dejó crecer a los rotíferos en las condiciones experimentales hasta la extinción del clon en el cultivo. Tras ello – entre 1 y 2 meses después del inicio de los cultivos experimentales – se procedió al recuento de los huevos diapásicos producidos por cada cultivo experimental.

Paralelamente, con idéntico diseño experimental, los mismos clones y partiendo de los mismos cultivos pre-experimentales, pero con cultivos experimentales independientes, Sergi Campillo obtuvo como parte de los trabajos preparatorios de su tesis doctoral los siguientes parámetros: (1) la tasa intrínseca de crecimiento poblacional y (2) un índice de mixis, como medida de reproducción sexual temprana, calculado como la fracción de huevos sexuales a los 4 días de cultivo experimental ((huevos de macho + huevos diapásicos)/ total de huevos producidos). Estos parámetros se utilizan en la presente tesis para explorar la relación entre ellos y la producción total de huevos diapásicos. El trabajo pre-experimental, y su diseño, fue realizado conjuntamente con Sergi Campillo.



**1. Aislamiento de huevos diapáusicos del sedimento**

**2. Eclosión de huevos diapáusicos**

- 6 g L<sup>-1</sup>
- 25° C
- Iluminación constante (150-170  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

**3. Identificación taxonómica vía morfología o análisis de restricción**

**4. Cultivos de mantenimiento de clones**

- 22.5 g L<sup>-1</sup>
- 22.5° C
- Iluminación constante (35  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
- *T. suecica* viva *ad libitum*

**5. Cultivos pre-experimentales**

- Densidad inicial: ~ 0.7 hembras mL<sup>-1</sup>
- 22.5 g L<sup>-1</sup>
- 22.5° C
- Iluminación constante ( 35  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
- 10<sup>5</sup> células *T. suecica* congelada (-80° C) mL<sup>-1</sup>

**6. Cultivos experimentales**

- 50 mL
- Densidad inicial por placa: 0.24 hembras asexuales mL<sup>-1</sup>
- 4 combinaciones de salinidad y temperatura:
  1. 15 g L<sup>-1</sup> - 20° C
  2. 15 g L<sup>-1</sup> - 25° C
  3. 30 g L<sup>-1</sup> - 20° C
  4. 30 g L<sup>-1</sup> - 25° C
- Iluminación constante ( 35  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
- 10<sup>5</sup> células *T. suecica* congelada (-80° C) mL<sup>-1</sup>

**7. Recuento producción total de huevos diapáusicos**

Figura 7.2. Diagrama del diseño experimental para el estudio de la variabilidad intraespecífica en la producción de huevos diapáusicos de *B. plicatilis* s.s.

Análisis de los datos

El diseño experimental se corresponde con un diseño jerárquico-factorial (Figura 7.3), con seis poblaciones, 30 clones (anidados dentro de población) cruzados con las combinaciones de dos temperaturas y dos salinidades, y con dos observaciones en cada combinación (dos réplicas).

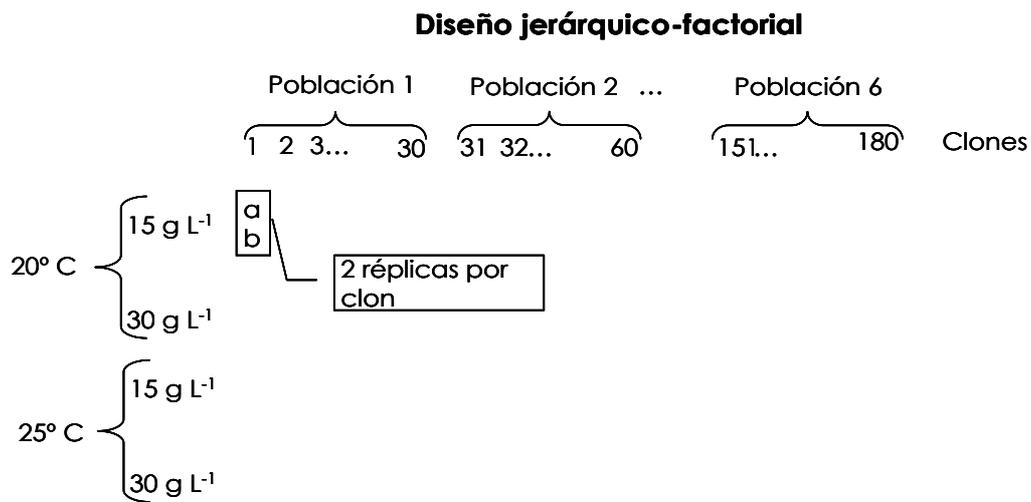


Figura 7.3. Esquema del diseño de análisis estadístico.

Este diseño experimental es mixto en dos sentidos: (1) porque combina factores cruzados y subordinados, y (2) porque combina factores fijos y aleatorios. El modelo lineal fue el siguiente:

$$Y_{ijklmn} = \mu + S_i + T_j + P_k + C_{l(k)} + SxT_{ij} + SxP_{ik} + SxC_{il(k)} + TxP_{jk} + TxC_{jl(k)} + SxTxP_{ijk} + SxTxC_{ijl(k)} + \epsilon_{n(ijklm)},$$

donde  $Y_{ijklmn}$  es la producción total de huevos diapásicos,  $\mu$  es la media general del rasgo,  $S_i$  indica el efecto fijo del nivel  $i$  del factor 'Salinidad',  $T_j$  indica el efecto fijo del nivel  $j$  del factor 'Temperatura',  $P_k$  indica el efecto fijo del nivel  $k$  del factor 'Población', y  $C_{l(k)}$  el efecto debido al nivel  $l$  del factor aleatorio 'Clon' anidado en 'Población'.  $SxT_{ij}$  indica el efecto de la interacción entre 'Salinidad' y 'Temperatura',  $SxP_{ik}$  indica el efecto de la

interacción entre 'Salinidad' y 'Población',  $TxP_{jk}$  indica el efecto de la interacción entre 'Temperatura' y 'Población',  $SxC_{il(k)}$  indica el efecto de la interacción entre 'Salinidad' y 'Clon' dentro de 'Población',  $TxC_{il(k)}$  indica el efecto de la interacción entre 'Temperatura' y 'Clon' dentro de 'Población',  $SxTxP_{ijk}$  indica el efecto debido a la triple interacción entre los factores 'Salinidad', 'Temperatura' y 'Población', y  $SxTxC_{ijl(k)}$  indica el efecto debido a la triple interacción 'Salinidad', 'Temperatura' y 'Clon' dentro de 'Población'. El término  $\varepsilon_{n(ijklm)}$  es una medida del error experimental, de la variación no controlada en el experimento. El análisis estadístico para este tipo de diseño fue un ANOVA jerárquico-factorial de efectos mixtos que se realizó mediante el paquete estadístico SPSS v. 12.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

Para cada una de las poblaciones se estudió cualitativamente la desviación con respecto a la producción promedio del conjunto de poblaciones en cada una de las condiciones experimentales, lo que permitió determinar si las condiciones ambientales donde se produjeron desviaciones positivas de la producción de huevos diapáusicos coinciden, al menos en tendencia, con las condiciones locales donde crece cada población de *B. plicatilis* s.s. en la naturaleza.

Para el estudio de la variabilidad intrapoblacional en la producción de huevos diapáusicos se estimó, para cada una de las poblaciones en cada una de las combinaciones de salinidad y temperatura, la componente genética de la varianza. Para ello se realizaron 24 (6 poblaciones x 2 temperaturas x 2 salinidades) ANOVAs de una vía sobre el siguiente modelo simplificado a partir del anterior:

$$Y_{ln} = \mu + C_l + \varepsilon_{ln}$$

Estas 24 pruebas ANOVA, así como la implementación de la función de estimación de los componentes de varianza, también se llevaron a cabo con el paquete estadístico SPSS v. 12.0.

Las relaciones entre la producción total de huevos diapáusicos, la tasa intrínseca de crecimiento poblacional, el índice de mixis temprana, y otras características de las lagunas estudiadas (área, profundidad y duración del hidropериodo) se estudiaron mediante análisis de correlación utilizando también SPSS v. 12.0. Nótese que en la variable discreta hidropериodo subyace una variación continua. Para el análisis de correlación se establecieron tres niveles (hidropериodo de corta, media y larga duración), con valores 1,2 y 3 respectivamente (véase el capítulo 2).

## Resultados

### *Producción de huevos diapáusicos*

El ANOVA jerárquico-factorial aplicado a la producción de huevos diapáusicos reveló la existencia de efectos significativos de todos los factores y de algunas interacciones (Tabla 7.2).

Tabla 7.2. ANOVA jerárquico-factorial sobre la producción de huevos diapáusicos de *B. plicatilis* s.s.

| <b>Fuente de variación</b>                 | <b>g.l.</b> | <b>F</b> | <b>p</b> |
|--|-------------|----------|----------|
| Salinidad                                  | 1, 174      | 279.64   | < 0.001  |
| Temperatura                                | 1, 173      | 71.34    | < 0.001  |
| Población                                  | 5, 174      | 43.39    | < 0.001  |
| Clon (Población)                           | 174, 198    | 1.47     | 0.001    |
| Salinidad x Temperatura                    | 1, 174      | 0.40     | 0.530    |
| Salinidad x Población                      | 5, 174      | 13.84    | < 0.001  |
| Salinidad x Clon (Población)               | 174, 173    | 3.90     | < 0.001  |
| Temperatura x Población                    | 5, 173      | 2.34     | 0.044    |
| Temperatura x Clon (Población)             | 173, 173    | 1.82     | < 0.001  |
| Salinidad x Temperatura x Población        | 5, 174      | 0.79     | 0.561    |
| Salinidad x Temperatura x Clon (Población) | 173, 698    | 2.71     | < 0.001  |

Se encontraron diferencias significativas debidas a la salinidad. En promedio, la producción de huevos diapáusicos resultó mayor a 15 g L<sup>-1</sup> que a 30 g L<sup>-1</sup>. También se detectó un efecto de la temperatura sobre la producción de huevos diapáusicos. Ésta siempre fue mayor a la mayor temperatura ensayada (25° C). Además, la producción total de huevos diapáusicos varió entre las diferentes poblaciones estudiadas. La población de Balsa de Santed produjo los números más altos de huevos diapáusicos independientemente de la combinación de condiciones ensayadas. El ANOVA jerárquico-factorial también indicó la existencia de un efecto significativo sobre la producción de huevos diapáusicos de la interacción entre salinidad y población. Este efecto puede apreciarse en la figura 7.4 observando la diferencia entre las pendientes de las rectas que unen las producciones medias de huevos diapáusicos de cada laguna a 15 y 30 g L<sup>-1</sup> de salinidad.

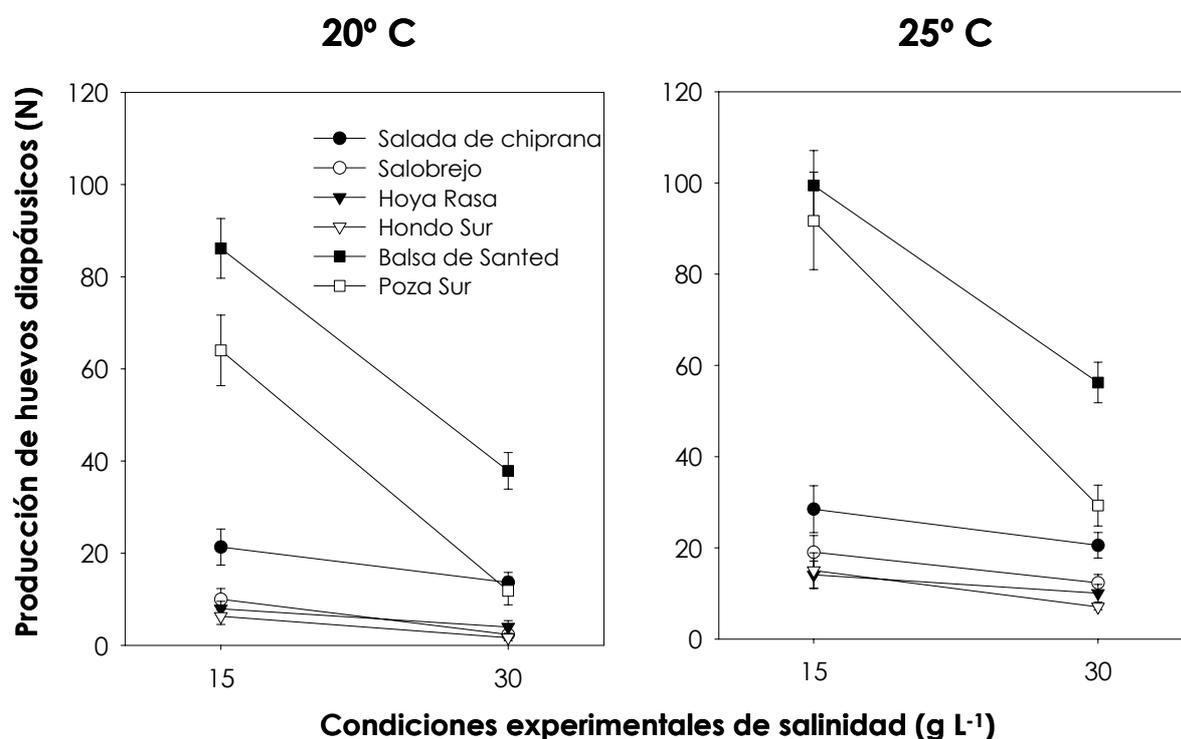


Figura 7.4. Normas de reacción de la producción total de huevos diapáusicos de cada población de rotíferos de la especie *B. plicatilis* s.s. en relación con la salinidad y la temperatura. Los valores representan medias  $\pm$  el error típico.

El análisis de las desviaciones con respecto a la producción promedio muestra que la población de Balsa de Santed produjo más huevos diapáusicos que el promedio de poblaciones estudiadas cualesquiera que fueran las condiciones ensayadas (Tabla 7.3). La población de Poza Sur también produjo más huevos diapáusicos que el promedio de todas las poblaciones en todos los casos, pero la desviación resultó mayor a baja temperatura (20° C). Las poblaciones de Hondo Sur, Hoya Rasa y Salobrejo siempre produjeron menos huevos diapáusicos que el promedio. Por último, la población de Salada de Chiprana produjo más huevos diapáusicos que el promedio de todas las poblaciones en una de las combinaciones de condiciones ensayadas (30 g L<sup>-1</sup> y 25° C), la cual está próxima a las condiciones naturales en las que esta población habita.

Tabla 7.3. Desviación con respecto a la producción promedio del conjunto de poblaciones en cada una de las condiciones experimentales. Se indican los valores de salinidad y temperatura asociados a altas abundancias de *B. plicatilis* s.s. en la naturaleza (véase la tabla 7.1). ++: (valor máximo + valor promedio)/2 < valor observado para la población; +: valor promedio del conjunto de poblaciones < valor observado para la población < (valor máximo + valor promedio)/2; -: (valor mínimo + valor promedio)/2 < valor observado < valor promedio; --: valor observado < (valor mínimo + valor promedio)/2. Los valores observados, promedio, máximo y mínimo son los valores específicos para cada una de las condiciones experimentales.

| Población          | Condiciones experimentales |                      |                      |                      | Condiciones de campo              |                      |
|--------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------------|----------------------|
|                    | 20° C                      |                      | 25° C                |                      | Salinidad<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Temperatura<br>(° C) |
|                    | 15 g L <sup>-1</sup>       | 30 g L <sup>-1</sup> | 15 g L <sup>-1</sup> | 30 g L <sup>-1</sup> |                                   |                      |
| Balsa de Santed    | ++                         | ++                   | ++                   | ++                   | 17-20                             | 10-20                |
| Poza Sur           | ++                         | ++                   | +                    | +                    | 10-30                             | 20-25                |
| Salada de Chiprana | -                          | -                    | -                    | +                    | 35-40                             | 15-25                |
| Hondo Sur          | --                         | --                   | --                   | --                   | 10                                | 10-20                |
| Hoya Rasa          | --                         | --                   | --                   | --                   | -                                 | -                    |
| Salobrejo          | --                         | --                   | --                   | --                   | 8-15                              | 8-25                 |

El ANOVA jerárquico-factorial (Tabla 7.2) también indicó la existencia de diferencias significativas en la producción de huevos diapáusicos entre clones dentro de cada población, lo que significa que existe variación genética intrapoblacional. Más aún, los clones dentro de cada población presentaron respuestas diferenciales con respecto a la salinidad y a la temperatura ensayadas (*i.e.*, efecto significativo de la interacción 'Salinidad x Clon (Población)' y 'Temperatura x Clon (Población)'). En la figura 7.5 se presentan las estimaciones de las componentes genéticas de la variación intrapoblacional en la producción de huevos diapáusicos para cada una de las poblaciones en las distintas condiciones experimentales. Dicha figura muestra de forma consistente que Balsa de Santed y Poza Sur son las poblaciones con mayor varianza genética para la producción de huevos diápausicos en todas las condiciones ensayadas.

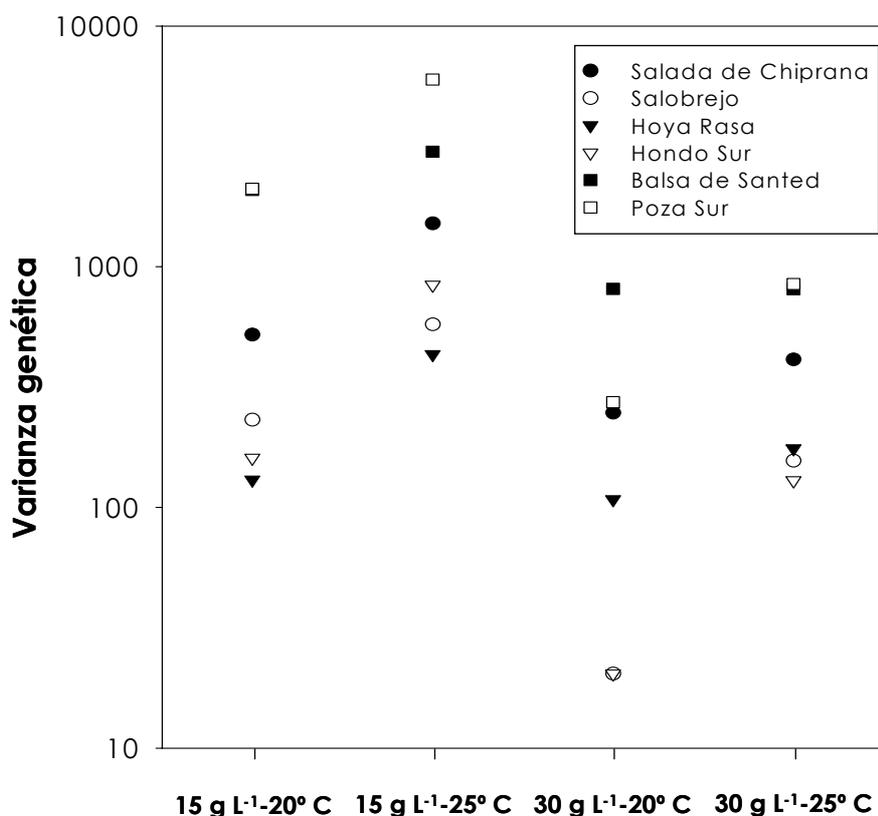


Figura 7.5. Valores de varianza genética en la producción total de huevos diapáusicos para las poblaciones estudiadas en cada una de las condiciones experimentales.

Nótese que los valores de la varianza genética son en general muy altos para el conjunto de poblaciones estudiadas. Esto indica una alta variabilidad intrapoblacional para la producción total de huevos diapásicos.

#### *Relaciones entre la producción de huevos diapásicos y otros parámetros demográficos*

Cuando se analizan los valores medios para cada población y condición experimental ensayada, existe una correlación significativa entre la producción total de huevos diapásicos y la tasa intrínseca de crecimiento poblacional ( $r$  de Pearson = 0.445,  $n = 24$ ,  $p = 0.029$ ). La producción total de huevos diapásicos también está correlacionada positiva y significativamente con el índice de mixis estimado ( $r$  de Pearson = 0.416,  $n = 24$ ,  $p = 0.043$ ). No se encontró correlación entre la tasa intrínseca de crecimiento poblacional y el índice de mixis ( $r$  de Pearson = -0.021,  $n = 24$ ,  $p = 0.923$ ).

Las relaciones entre estas tres variables (tasa intrínseca de crecimiento poblacional, índice de mixis y producción total de huevos diapásicos) se muestran gráficamente para cada una de las poblaciones estudiadas en la figura 7.6, en la que se observa la baja variación presentada por el índice de mixis dentro de cada una de las poblaciones de *B. plicatilis* s.s. – contrastando con cierta variación entre poblaciones – y su independencia con respecto al valor de la tasa intrínseca de crecimiento poblacional. Para valores similares del índice de mixis, el aumento en la tasa de crecimiento está generalmente asociado a una mayor producción de huevos diapásicos. Esta tendencia se aprecia claramente en las poblaciones de Poza Sur y Balsa de Santed. Para el resto de poblaciones estudiadas no se observó una tendencia tan clara.

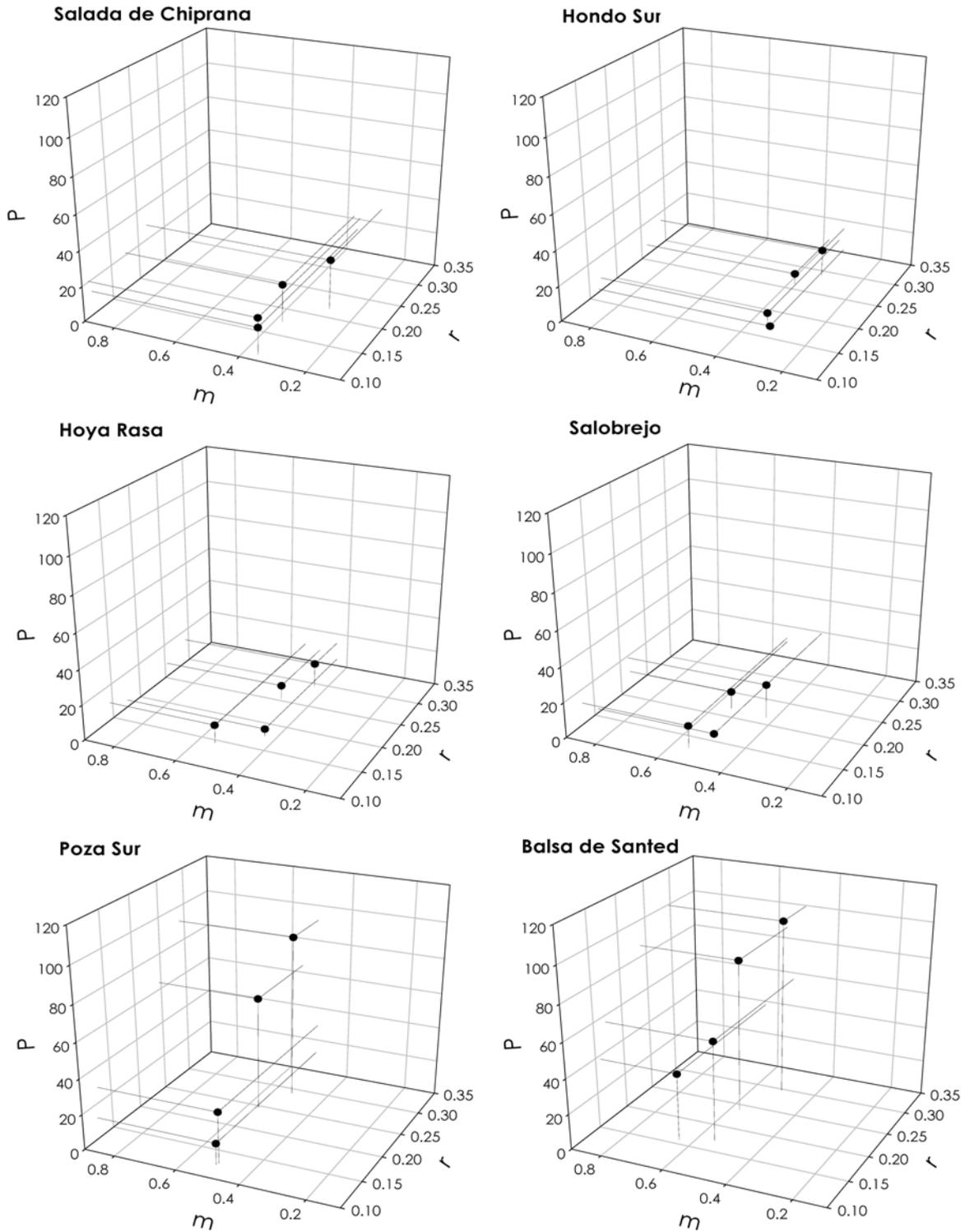


Figura 7.6. Relación entre la producción total de huevos diapásicos ( $P$ ), el índice de mixis ( $m$ ) y la tasa intrínseca de crecimiento poblacional ( $r$ ) en cada una de las poblaciones estudiadas. Los valores son las medias para cada una de las condiciones experimentales ensayadas. Nótese que las poblaciones se han ordenado horizontalmente por pares según la similitud de sus patrones.

En la figura 7.7 se muestra cómo se combinan la tasa intrínseca de crecimiento poblacional y el índice de mixis para generar una determinada producción de huevos diapáusicos. En cada población, cada uno de los tres parámetros estudiados (tasa intrínseca de crecimiento poblacional, índice de mixis y producción total de huevos diapáusicos) se valora, de manera análoga a la tabla 7.3, según una escala cualitativa de cuatro niveles establecida sobre el rango de sus valores medios para el conjunto de poblaciones y condiciones ensayadas.

|  |          | Índice de mixis       |      |                       |   |
|--|----------|-----------------------|------|-----------------------|---|
|  |          | Muy bajo              | Bajo | Alto                  | Muy alto  |
| Tasa intrínseca de crecimiento poblacional | Muy bajo |                       |      | Muy baja<br>Salobrejo |   |
|  | Bajo     | Baja<br>Chiprana      |      |                       |   |
|  | Alto     |                       |      |                       |   |
|  | Muy alto | Muy baja<br>Hondo Sur |      | Muy baja<br>Hoya Rasa | Alta<br>Poza Sur<br>Muy alta<br>Balsa de Santed |

Figura 7.7. Producción total de huevos diapáusicos resultante de la combinación entre tasa intrínseca de crecimiento poblacional e índice de mixis de las poblaciones estudiadas. Las clases consideradas se han calculado de forma análoga a las de la tabla 7.3. La correspondencia es la siguiente: Muy alto, ++; Alto, +; Bajo, -; Muy bajo, --.

La combinación de valores bajos de la tasa intrínseca de crecimiento poblacional y del índice de mixis resulta en una baja producción de huevos diapáusicos (Salada de Chiprana). Cuando la tasa de crecimiento es baja y el índice de mixis temprana es alto, la producción total de huevos diapáusicos es baja (véase el caso de la población de Salobrejo) pues no se

alcanza un tamaño poblacional elevado. La situación opuesta – esto es, alta tasa de crecimiento poblacional y bajo índice de mixis – también resultó en una baja producción de huevos diapáusicos (Hondo Sur). Por último, la combinación de valores altos de los dos parámetros no siempre resultó en valores altos de la producción total de huevos diapáusicos (véase el caso de la población de Hoya Rasa frente a las poblaciones de Balsa de Santed y Poza Sur). Nótese que los resultados obtenidos parecen ser muy dependientes de una de las condiciones experimentales ensayadas (15 g L<sup>-1</sup> y 25° C) que, en promedio, resulta en la mayor producción de huevos diapáusicos (véase la tabla 7.3).

Por otra parte, los parámetros demográficos analizados mostraron ciertas relaciones con características cuantificables del hábitat (área, profundidad y duración del hidropériodo). Se encontró una relación negativa y significativa entre el índice de mixis y la duración del hidropériodo ( $r$  de Pearson = -0.690,  $n = 24$ ,  $p < 0.001$ ), así como también entre dicho índice y el área ( $r$  de Pearson = -0.408,  $n = 24$ ,  $p = 0.04$ ) y la profundidad de las lagunas estudiadas ( $r$  de Pearson = -0.514,  $n = 16$ ,  $p = 0.04$ ). La producción total de huevos diapaúsicos también se relacionó negativamente con la duración del hidropériodo ( $r$  de Pearson = -0.671,  $n = 24$ ,  $p < 0.001$ ) y el área ( $r$  de Pearson = -0.566,  $n = 24$ ,  $p = 0.004$ ), pero no así con la profundidad de las lagunas estudiadas ( $r$  de Pearson = 0.004,  $n = 16$ ,  $p = 0.989$ ). Ninguna de las tres características de los hábitats estudiadas mostró correlación con la tasa intrínseca de crecimiento poblacional.

## Discusión

Nuestros resultados muestran la existencia de diferenciación en rasgos ecológicos en las poblaciones de *B. plicatilis* s.s. que habitan las lagunas y charcas de la región oriental de la Península Ibérica. En este sentido, este trabajo constituye el primer estudio poblacional en rotíferos que pone de

manifiesto dicha diferenciación. Además, en este trabajo el rasgo analizado ha sido la producción total de huevos diapáusicos que es una medida de eficacia biológica, lo que plantea la cuestión de por qué existe diferenciación en una medida de eficacia cuando lo esperable es que la selección natural hubiera maximizado el rasgo en todas las poblaciones. Una posible explicación se basaría en la existencia de presiones de selección divergentes sobre las diferentes poblaciones y de compromisos (*i.e.*, una población no puede hacerlo todo bien en todos los ambientes) de manera que unos ambientes serán mejores que otros para la producción de huevos diapáusicos dependiendo de la población. Estos compromisos se ponen de manifiesto en la existencia de interacción significativa entre población y ambiente (Lynch y Walsh, 1998; Gómez-Mestre y Tejedo, 2003). Por tanto, las interacciones detectadas en el presente estudio apuntan a la existencia de compromisos en la adaptación a las condiciones ambientales como causa de las diferencias de eficacia observadas entre las poblaciones en las condiciones de laboratorio.

Como ya se ha dicho, los hábitats que se han estudiado en esta tesis difieren en muchas propiedades, particularmente en la temperatura y la salinidad, dos condiciones que se han estudiado específicamente en nuestro diseño experimental. Los resultados muestran la existencia de interacción altamente significativa entre población y salinidad, lo que indica que no todas las poblaciones responden de igual manera al cambio en salinidad. En el caso particular de la población de Salada de Chiprana, que es la laguna con mayor salinidad de todas las estudiadas aquí, se ha encontrado que la producción de huevos diapáusicos – y, por tanto, la eficacia – excede lo esperado en los tratamientos experimentales de alta salinidad. Este resultado es un indicio de adaptación local. Por otra parte, se ha encontrado que las poblaciones de Balsa de Santed y Poza Sur, cuyas dos lagunas de origen se caracterizan por ser de pequeño tamaño y tener hidroperiodos de corta duración, produjeron más huevos diapáusicos que el resto de poblaciones de lagunas más grandes y que albergan agua durante periodos más largos

de tiempo, lo que sugiere que debe haber un tipo de respuesta común en la producción de huevos diapáusicos en relación con las características de tamaño y temporalidad. Estos factores, no contemplados como variables en el diseño de nuestros experimentos, también podrían explicar la divergencia observada en la producción de huevos diapáusicos entre poblaciones.

La mayor producción de huevos diapáusicos encontrada en las poblaciones de Balsa de Santed y Poza Sur, para todas las condiciones ensayadas podría explicarse porque – de forma similar a como se ha hipotetizado en capítulos anteriores (véase el capítulo 4) – la tasa de evolución fuera diferente entre lagunas sometidas a distintos regímenes selectivos, siendo mayor en estas dos poblaciones. Alternativamente, también es posible que la mayor producción de huevos diapáusicos observada en estas dos poblaciones se deba a una preadaptación a las condiciones experimentales del laboratorio, quizás en relación con la circunstancia de un aprovisionamiento del alimento en grandes pulsos. La primera hipótesis no se ve apoyada por los altos valores de varianza genética intrapoblacional encontrados en estas dos poblaciones, ya que si la tasa de selección fuese mayor en éstas se esperaría una mayor erosión de dicha varianza.

Los datos demuestran la existencia de variación intrapoblacional en la producción de huevos diapáusicos. La producción varía entre clones dentro de cada una de las poblaciones y, más aún, los clones de una población presentan respuestas diferenciales con respecto a la salinidad y la temperatura, lo que sugiere la existencia de diferenciación ecológica entre clones incluso dentro de una población. A este respecto, el hecho de que las lagunas estudiadas presenten una marcada heterogeneidad temporal (Lapesa, 2004), podría fomentar el mantenimiento de cierto grado de polimorfismo (Spencer *et al.*, 2001).

Por otra parte, nuestros resultados muestran que la salinidad y la temperatura también tienen efectos significativos sobre la producción de huevos diapáusicos. Todas las poblaciones produjeron más huevos diapáusicos a 15 g L<sup>-1</sup> que a 30 g L<sup>-1</sup>, una regularidad que se mantiene con la temperatura. *B. plicatilis* s.s. es una especie que se caracteriza por su eurihalinidad (ha sido encontrada en aguas de 2 a 45 g L<sup>-1</sup> de salinidad; Ortells, 2002; Ortells *et al.*, 2003; Lapesa, 2004), si bien en estudios previos se han encontrado costes asociados al aumento de la salinidad del medio (Lowe *et al.*, 2005), lo que podría implicar una menor producción de huevos diapáusicos. En lo que respecta al efecto de la temperatura, se sabe que en general en el género *Brachionus* las componentes de eficacia aumentan conforme aumenta la temperatura (Miracle y Serra, 1989). Nótese, sin embargo, que los valores de temperatura ensayados en nuestros experimentos se encuentran dentro del rango preferido por las poblaciones de *B. plicatilis* s.s. (Gómez *et al.*, 1997; Hagiwara y Lee, 1991).

La variación en la producción de huevos diapáusicos depende del compromiso entre otros rasgos de la historia vital (Figura 7.1), tal y como pone de manifiesto su correlación positiva y significativa con la tasa intrínseca de crecimiento poblacional y con el índice de mixis. Un resultado particularmente interesante es que los valores del índice de mixis se mantienen dentro de un intervalo bastante restringido en cada una de las poblaciones estudiadas. Estos valores tan conservativos de reproducción sexual sugieren la existencia de estrategias de inversión sexual determinadas en cada población. Estas estrategias parecen ser, pues, relativamente independientes de las tasas de crecimiento poblacional o de las condiciones de salinidad y temperatura. Según la teoría de los ciclos vitales, los patrones de reproducción sexual deben estar sometidos a grandes compromisos en función de las condiciones de predecibilidad del hábitat (Carmona *et al.*, 1995; Serra y King, 1999). Un resultado interesante a este respecto es que los valores del índice de mixis más altos se encontraron en las poblaciones que habitan las lagunas más pequeñas y con hidroperiodos más cortos (Poza Sur

y Balsa de Santed). Este tipo de ambiente se considera más inestable, susceptible a la variación ambiental como factor de riesgo, de manera que las poblaciones de rotíferos que los habitan realizan una inversión en reproducción sexual acorde con las predicciones teóricas, según las cuales en ambientes impredecibles se espera una iniciación temprana y sostenida de la reproducción sexual (Carmona *et al.*, 1995; Serra y King, 1999). Por su parte, la tasa de crecimiento poblacional, otra componente de eficacia biológica que determina la producción total de huevos diapáusicos, parece ser más dependiente de las condiciones ensayadas de salinidad y temperatura que de la temporalidad de las poblaciones. Estos compromisos entre rasgos, y entre éstos y las condiciones ambientales, impiden que los organismos maximicen su eficacia en todos los ambientes (Brown y Venable, 1986), lo que, como ya se ha dicho anteriormente, es un pre-requisito para la divergencia entre poblaciones.

En resumen, la existencia de divergencia entre las poblaciones de *B. plicatilis* s.s. y de una función hipotética de la adaptación a las condiciones locales vienen apoyados por los siguientes resultados obtenidos en este capítulo: (1) la diferenciación ecológica en la producción de huevos diapáusicos entre poblaciones, (2) la existencia de interacción entre población y ambiente para este rasgo, (3) el exceso de producción de huevos diapáusicos, con respecto a lo esperado, observado en la población de Salada de Chiprana en condiciones de salinidad próximas a las que le son localmente propias, y (4) la semejanza en los perfiles de producción de huevos diapáusicos, y su diferenciación del resto, de dos poblaciones (Balsa de Santed y Poza Sur) procedentes de hábitats con características similares de tamaño y temporalidad.

# 8

## Consideraciones finales, perspectivas y conclusiones

### Consideraciones finales y perspectivas

Es ampliamente reconocido que la diapausa es una etapa esencial de los ciclos vitales de los organismos zooplanctónicos que habitan ambientes temporalmente variables, pues permite la supervivencia de las poblaciones durante los periodos adversos. No obstante, y a pesar de antiguas aproximaciones fenomenológicas (p.ej., Weismann, 1876; Sars, 1885), su estudio desde una perspectiva ecológica y evolutiva apenas lleva tres décadas de desarrollo formal y en el caso de los rotíferos este periodo es incluso más corto si detraemos los estudios de inducción de la reproducción sexual asociada al inicio de la diapausa. En este sentido, los resultados de la presente tesis contribuyen a ampliar de manera importante la escasa información que hasta la fecha se tenía de los bancos de huevos diapáusicos de rotíferos. En esta tesis se han cubierto diferentes aspectos de la demografía de los bancos de huevos diapáusicos del complejo de especies del rotífero *Brachionus plicatilis* tales como la producción de huevos, su supervivencia en el sedimento y su capacidad de eclosión. Todos estos procesos tienen importantes implicaciones en la dinámica y viabilidad de las poblaciones naturales de rotíferos, son bien componentes de eficacia, bien una medida directa de la misma (i.e., la producción de huevos diapáusicos); por tanto, están sometidos a selección natural. Es por ello que un esfuerzo importante en esta tesis se ha dirigido a estudiar cómo varían

estos procesos bajo distintas condiciones ambientales que constituyen diferentes regímenes selectivos. Las aproximaciones utilizadas en las investigaciones realizadas incluyen (1) estudios descriptivos de los bancos de huevos diapásicos producidos por las poblaciones naturales del complejo *B. plicatilis*, (2) estudios experimentales con poblaciones de laboratorio, y (3) estudios con poblaciones teóricas mediante el desarrollo de modelos matemáticos. Tal y como sugiere Park (1946), en los estudios poblacionales ecológicos debería intentarse una combinación de todos estos tipos de aproximación. Por una parte, los experimentos y datos de campo deben servir para parametrizar los modelos. Por otra parte, los modelos teóricos aclaran la interpretación de las observaciones realizadas en el laboratorio y en la naturaleza, pero además, a partir de los propios modelos teóricos deben plantearse hipótesis para ser comprobadas mediante observaciones y experimentos (Gillman y Hails, 1997; Aparici, 1999).

Los objetivos planteados en esta tesis se han logrado en parte mediante un intenso trabajo descriptivo de la distribución, abundancia y edad de los bancos de huevos diapásicos del complejo *B. plicatilis* para los que previamente se disponía de escasa información (capítulo 2). A partir de este trabajo descriptivo se han podido contrastar los patrones de abundancia y viabilidad de los bancos de huevos de rotíferos con los de otros grupos de organismos zooplanctónicos hasta ahora mucho más estudiados. Además, la descripción detallada respecto a la tipología de huevos diapásicos hallados en el sedimento ha hecho posible constatar la importancia del deterioro de los huevos diapásicos mientras están enterrados en el sedimento, y ha permitido estimar el reclutamiento desde el sedimento a las poblaciones activas en la columna de agua (capítulo 5).

Una aproximación común en el estudio de los bancos de huevos diapásicos consiste en presentar estudios descriptivos asociados a modelos conceptuales sobre la dinámica de los bancos (De Stasio, 1989; Cáceres y Hairston, 1998; Marcus y Boero, 1998). No obstante, esta metodología, si no es

complementada con otro tipo de datos, no es satisfactoria, ya que no todos los procesos que afectan a los bancos pueden inferirse a partir de la simple cuantificación de los huevos viables del sedimento, que son los únicos estudiados comúnmente en trabajos previos a esta tesis. Por otra parte, existen algunos estudios en los que la implementación de modelos matemáticos formales, en oposición a los modelos conceptuales, se ha probado particularmente útil para el estudio de aspectos concretos de la diapausa (p.ej., el 'efecto de almacenamiento' y la coexistencia entre especies, que se verá más adelante; Cáceres, 1997b; o la estrategia óptima de eclosión en charcas efímeras; Ellner *et al.*, 1998; Ripley *et al.*, 2004). En esta tesis también se ha utilizado un modelo matemático, esta vez para relacionar aspectos estructurales con aspectos dinámicos de los bancos de huevos diapáusicos (capítulo 3). Como ya se ha avanzado, en este modelo se han incluido procesos anteriormente no estudiados pero que se han revelado importantes a partir del estudio descriptivo realizado previamente (p.ej., el deterioro de los huevos diapáusicos en el sedimento). Este modelo muestra que la abundancia y composición tipológica del banco reflejan la importancia relativa de los principales procesos que afectan a la dinámica de los bancos (producción, deterioro y eclosión de los huevos diapáusicos). Posteriormente, mediante un análisis conceptual basado en la teoría general de la diapausa (Cohen, 1966), se han relacionado estos procesos con características de los hábitats que actúan como presiones de selección. La vinculación entre los dos modelos (demográfico-matemático y evolutivo-conceptual) ha permitido asociar características de la columna de agua (adversidad, impredecibilidad) y del sedimento (adversidad) con la composición tipológica de los bancos de huevos. Los resultados de ambos modelos han servido para comparar y clasificar las diferentes lagunas estudiadas según sus efectos demográficos sobre los bancos de huevos diapáusicos (capítulo 4).

En muchos estudios sobre bancos de huevos diapáusicos se han llevado a cabo experimentos de laboratorio para estimar la capacidad de

eclosión de los huevos del sedimento y determinar el tamaño del banco de huevos todavía viables enterrados en el sedimento (Marcus, 1990; Marcus *et al.*, 1994; Viitasalo y Katajisto, 1994; Katajisto, 1996; Hairston *et al.*, 1995; 1999; Cousyn y De Meester, 1998; Jiang *et al.*, 2004). El estudio de viabilidad realizado en esta tesis (capítulo 5) amplía el dominio de esta aproximación a los rotíferos. Además, la caracterización tipológica de los huevos diapáusicos en función de su aspecto externo, y su relación con el éxito de eclosión, ha permitido establecer relaciones entre el deterioro de los huevos diapáusicos y su potencial para el reclutamiento de las poblaciones activas como se señala en las conclusiones finales del citado capítulo. A efectos prácticos, también se ha valorado hasta qué punto es válida la caracterización del banco de huevos viables a partir de la cuantificación de huevos diapáusicos aparentemente sanos, una práctica común en la mayoría de estudios de bancos de huevos de organismos zooplanctónicos (Hairston *et al.*, 1995; Weider *et al.*, 1997; Cáceres, 1998; Keller y Spaak, 2004). Por último, los patrones observados revelan que los procesos de deterioro de los huevos diapáusicos constituyen un complejo sistema de cambios fisiológicos que ocurren como consecuencia del envejecimiento natural de los huevos diapáusicos y/o la inhospitalidad del hábitat.

Cuando se produce la eclosión de los huevos diapaúsicos, los rasgos vitales de las hembras que emergen de ellos deben estar relacionados con las condiciones específicas del hábitat al que se van a enfrentar. Estas condiciones van a ser diferentes de las experimentadas por las hembras descendientes de los huevos partenogenéticos subitáneos, de manera que los rasgos vitales en las hembras provenientes de uno y otro tipo de huevo deben ser diferentes (Gilbert y Schröder, 2004). A pesar de que existen trabajos muy detallados a este respecto (Arbačiauskas y Lampert, 2003; Gilbert 2004), éstos son todavía muy escasos y se refieren a un conjunto parcial de especies y hábitats – típicamente lagos profundos –. En esta tesis se ha ampliado este tipo de estudios con una especie más (*Brachionus plicatilis sensu stricto*, que se añade a las especies *Daphnia magna* y

*Brachionus calyciflorus* de los estudios previos), con el valor adicional de haber analizado poblaciones de un tipo de hábitat – lagunas temporales someras – común, pero escasamente estudiado a este respecto (capítulo 6). Las diferencias en rasgos del ciclo vital entre las hembras emergidas de huevos diapáusicos y de huevos subitáneos deben venir determinadas en parte desde el momento en que ambos tipos de huevos se producen. Pero además, es posible que el consumo de las reservas energéticas durante la diapausa y/o al final de ésta afecte a las características del ciclo vital de las hembras que emergen de los huevos diapáusicos.

La heterogeneidad de los ambientes en los que se ha encontrado *B. plicatilis* s.s., así como su grado de aislamiento, ofrecen oportunidades para la aparición de divergencias en rasgos de la historia vital y su mantenimiento por adaptación local (De Meester, 1996). Algunos estudios previos han demostrado la existencia de diferenciación en marcadores neutros entre poblaciones de *B. plicatilis* s.s., lo que abre la posibilidad de diferenciación en rasgos ecológicos (Gómez *et al.*, 1995; 2000; Ortells *et al.*, 2000). En esta tesis se ha abordado por primera vez en rotíferos el estudio de la diferenciación intraespecífica en un rasgo de la historia vital que es, además, una medida de eficacia biológica: la producción de huevos diapáusicos (Serra y King, 1999; Serra *et al.*, 2005). Dado que las poblaciones de rotíferos estudiadas en esta tesis son temporales, la consecuencia de la mejor o peor adaptación de las poblaciones a las condiciones en la columna de agua debe traducirse, respectivamente, en una mayor o menor producción de huevos diapáusicos. Mediante un experimento en el laboratorio se ha podido demostrar la existencia de variabilidad intra e interpoblacional en la producción de huevos diapáusicos en *B. plicatilis* s.s (capítulo 7). Además, la respuesta a las condiciones ambientales ensayadas no es proporcional entre las poblaciones de estudio, lo que sugiere la existencia de un proceso de divergencia entre las mismas.

En su conjunto, como se ha querido resaltar en la anterior exposición de las diferentes aproximaciones que se han practicado en esta tesis, los diferentes estudios presentados contribuyen al conocimiento de la abundancia, viabilidad y dinámica de los bancos de huevos diapáusicos de rotíferos, y tienen implicaciones en el conocimiento de la dinámica y evolución de las propias poblaciones naturales de rotíferos y de la forma en que finalmente se estructuran las comunidades acuáticas, todo lo cual será resumido en las conclusiones que se reseñan más abajo. Por otro lado, los resultados de esta tesis abren varias cuestiones, algunas de las cuales ya se han esbozado en capítulos anteriores, que podrían ser abordadas en futuros estudios.

En primer lugar, pueden plantearse cuáles son los efectos de la estructura y la dinámica de los bancos de huevos diapáusicos de rotíferos a nivel microevolutivo sobre las poblaciones, comunidades y ecosistemas acuáticos donde se integran estos organismos.

A nivel poblacional, la formación de un banco de huevos diapáusicos tiene como efectos el alargamiento de los tiempos de generación y el solapamiento de generaciones (Hairston, 1998). Estos dos fenómenos conllevan, a su vez, una demora en las respuestas a la selección natural y la deriva genética, así como el mantenimiento de la diversidad genética en las poblaciones (Templeton y Levin, 1979; Hairston y De Stasio, 1988; Ellner y Hairston, 1994). Como sugiere Hairston (1998), para la comprobación de que las tasas de evolución son menores por efecto de los bancos se requeriría de un amplio conocimiento sobre (1) la variación histórica en la expresión de rasgos del ciclo vital asociados a la eficacia biológica, (2) la forma en que varía la selección a lo largo del tiempo, y (3) el grado de solapamiento de generaciones causado por el banco de huevos diapáusicos. Como también han señalado Brendonck y De Meester (2003), los bancos de huevos diapáusicos que presentan huevos viables en profundidad ofrecen una oportunidad única para estudios evolutivos, dado

que representan un registro accesible de la historia local de las poblaciones y pueden ser utilizados para estudiar la existencia de diferencias genéticas y en rasgos de la historia vital entre cohortes de huevos diapáusicos de distinta edad. Este tipo de estudios ha experimentado un auge importante en los últimos años sobre todo en bancos de huevos de copépodos y cladóceros (Hairston *et al.*, 1996; 1999; Kerfoot *et al.*, 1999; Cousyn *et al.*, 2001; Ortells *et al.*, 2005), aunque este no es el caso de los bancos de huevos diapáusicos de rotíferos que permanecen todavía inexplorados en este sentido.

Los bancos de huevos diapáusicos de las poblaciones de rotíferos también tienen importancia en las interacciones entre las especies de la comunidad zooplanctónica. El reservorio poblacional que implica la diapausa, insensible a la competencia una vez producido, proporciona un mecanismo para el mantenimiento de la diversidad entre especies competidoras en ambientes fluctuantes a través de un mecanismo que se ha denominado 'efecto de almacenamiento' (Chesson y Warner, 1981; Chesson, 1983; Warner y Chesson, 1985; Cáceres, 1997b; Philippi, 1998). Este efecto podría tener especial repercusión para explicar la coexistencia en simpatria de las especies del complejo *B. plicatilis*, pues la exclusión competitiva entre las especies del complejo en la columna de agua no tendría carácter definitivo ya que la población excluida por competencia podría reaparecer en el futuro en la columna de agua a partir de la eclosión de huevos diapáusicos del sedimento. A pesar de la existencia de algunos trabajos teóricos que predicen la coexistencia entre especies competidoras mediante este 'efecto de almacenamiento', la evidencia empírica es aún escasa (Cáceres, 1997b).

La cuantificación y caracterización de las diferentes formas de resistencia producidas por los organismos acuáticos y que se acumulan en los sedimentos permite comparar el potencial de riqueza en especies y diversidad entre diferentes sistemas. Este tipo de estudios, tal y como se ha realizado hasta el presente, implica la asignación taxonómica de las formas

de resistencia mediante identificación morfológica directa o su eclosión en el laboratorio (May, 1987; Della Tomasa *et al.*, 2000; Crispim y Watanabe, 2001; Duggan *et al.*, 2002; Vandekerkhove *et al.*, 2004). Sin embargo, las técnicas de identificación molecular permitirán en un futuro el análisis de diversidad específica del banco de huevos diapáusicos y, así, de la diversidad potencial residente en el propio hábitat a efectos de restauración ecológica, o de recuperación tras una perturbación natural (Brendonck y De Meester, 2003; Rice y Emery, 2003). Evaluar este potencial para el caso de los rotíferos es importante en estudios aplicados de biodiversidad o de conservación funcional de los ecosistemas. Es ampliamente reconocido que los rotíferos constituyen uno de los grupos mayoritarios del zooplancton y que realizan una función ecológica fundamental en los ecosistemas de agua dulce y salobre, en los que afectan al flujo de energía y la estructuración de las comunidades (Dumont, 1977).

## Conclusiones

A continuación se enumeran las principales conclusiones derivadas de esta tesis:

1. En los sedimentos de las charcas y lagunas someras de la región oriental de la Península Ibérica existen bancos de huevos diapáusicos del complejo de especies *Brachionus plicatilis* que pueden ser muy densos (hasta 26000 huevos cm<sup>-2</sup>). La abundancia de huevos diapáusicos en los bancos constituye una medida de su producción por las poblaciones activas en la columna de agua y varía entre lagunas en función de su localización geográfica y patrón hídrico.
2. En los bancos del complejo *B. plicatilis* se pueden reconocer los siguientes tipos de huevos diapáusicos: (1) *huevos con aspecto saludable*, considerados viables; (2) *huevos eclosionados*, que indican

el reclutamiento de individuos a la población activa; y (3) *huevos deteriorados*, considerados inviables.

3. Los perfiles verticales de los huevos diapáusicos totales del complejo de especies *B. plicatilis* en los sedimentos del conjunto de charcas y lagunas estudiadas sugieren una alta variación interanual en la producción de huevos diapáusicos.
4. La proporción de *huevos deteriorados* en los sedimentos del conjunto de lagunas estudiadas es muy alta (60-95 %), lo que indica una elevada mortalidad de los huevos en el sedimento. No obstante, los valores de densidad de *huevos con aspecto saludable* (2-200 huevos cm<sup>-2</sup>) muestran que el banco de huevos viables en estas lagunas es bastante denso y similar en magnitud al de otros grupos de organismos zooplanctónicos.
5. Tanto el número como la proporción de *huevos con aspecto saludable* disminuyen con la profundidad del sedimento. Este mismo patrón se observa en su éxito de eclosión y en el tiempo de respuesta a las condiciones que inducen la eclosión, lo que sugiere la existencia de fenómenos de senescencia en los huevos diapáusicos de rotíferos. La mayor abundancia de *huevos con aspecto saludable* en las capas superficiales del sedimento y los resultados del análisis de datación, indican que los bancos del complejo *B. plicatilis* en las lagunas estudiadas son jóvenes con una mediana de edad de entre 3 y 30 años, y una edad máxima de entre 60 y 80 años.
6. La posibilidad técnica de recontar tipos distintos de huevos (*i.e.*, con *aspecto saludable*, *deteriorados* y *eclosionados*) ha motivado la elaboración de un modelo matemático que, dando cuenta de la dinámica de estas categorías, permite relacionar aspectos estáticos y dinámicos del banco de huevos.

7. Bajo determinados supuestos simplificadores, la razón entre *huevos diapáusicos eclosionados* y *huevos con aspecto saludable* es un índice de la tasa de eclosión de huevos diapáusicos en el sedimento, la razón entre *huevos deteriorados* y *huevos con aspecto saludable* es indicativa de la tasa de deterioro de los mismos en el sedimento, y la suma de todas las categorías de huevos (*con aspecto saludable, deteriorados y eclosionados*) es una medida de la tasa de producción.
  
8. Las altas tasas de deterioro de los huevos diapausicos encontradas han motivado un análisis conceptual de las relaciones entre características del hábitat – actuando como condiciones evolutivas – y la dinámica de producción, eclosión y deterioro de huevos. Este análisis da por primera vez una gran importancia a las condiciones del sedimento y predice que la producción y deterioro de los huevos diapáusicos están respectiva y directamente relacionados con la calidad de la columna de agua y la adversidad del sedimento, mientras que las tasas de eclosión de los huevos diapáusicos en el sedimento son el resultado del balance entre la calidad del sedimento como refugio y la incertidumbre de la columna de agua. Como quiera que la importancia de las tasas de producción, eclosión y deterioro puede inferirse de propiedades observables en el sedimento (razones entre tipos de huevos), nuestro análisis resulta en relaciones fácilmente utilizables con propósitos de comprobación o interpretación.
  
9. En aquellos hábitats donde las condiciones del sedimento son más adversas (*i.e.*, en los que las tasas de deterioro de los huevos diapáusicos son altas) existe una mayor tendencia de los huevos diapáusicos a escapar de ellas (*i.e.*, las tasas de eclosión son elevadas), lo que es consistente con las predicciones del análisis teórico llevado a cabo en esta tesis.

10. Existe una relación negativa entre el grado de reducción en el tamaño del embrión y el éxito en la eclosión. El 98.9 % de las eclosiones se obtuvieron a partir de huevos diapáusicos con reducciones del embrión inferiores al 25 %; esto es, de *huevos con aspecto saludable*.
11. La correlación entre el número de *huevos diapáusicos con aspecto saludable* y su éxito de eclosión indica que la abundancia de este tipo de huevos es un buen índice del tamaño del banco de huevos viables en los sedimentos de charcas y lagunas.
12. En la especie *B. plicatilis sensu stricto* existe una diferenciación en los rasgos vitales entre las hembras provenientes de huevos diapáusicos y las procedentes de huevos partenogenéticos. La menor supervivencia y la ausencia de reproducción, en condiciones de privación de alimento, de las hembras provenientes de huevos diapáusicos puede explicarse por una diversificación en el uso de las reservas de los huevos diapáusicos o como resultado de que la estrategia de asignación de recursos a estos huevos es diferente de la de los huevos partenogenéticos.
13. Existe diferenciación entre poblaciones de *B. plicatilis* s.s. en su producción total de huevos diapáusicos bajo unas mismas condiciones ambientales. Esta diferenciación genética, en un rasgo ecológico que constituye un índice de eficacia biológica, apunta a una posible función de la adaptación local cuando se combina con las siguientes observaciones realizadas en esta tesis: (1) existe interacción entre genotipo (población) y ambiente, (2) la población de Salada de Chiprana produce un exceso de huevos diapáusicos en las condiciones más próximas a las locales, y (3) dos poblaciones (Balsa de Santed y Poza Sur) con semejanzas en sus hábitats tienen patrones de producción de huevos diapáusicos similares.

14. La relativa constancia de los valores del índice de mixis dentro de las poblaciones de *B. plicatilis* s.s. sugiere la existencia de estrategias fijas de inversión sexual independientes de la respuesta en la tasa intrínseca de crecimiento poblacional y de las condiciones ensayadas.
15. La producción total de huevos diapáusicos varía entre clones dentro de cada una de las poblaciones. La marcada heterogeneidad temporal de las lagunas estudiadas podría explicar el mantenimiento de este polimorfismo en las poblaciones.

En resumen, la presencia de bancos de huevos diapáusicos en el sedimento crea una asociación entre el sedimento y la columna de agua, y la fenología y propiedades (acopio de reservas, supervivencia de las neonatas, etc.) asociadas a los huevos diapáusicos son el resultado de las fuerzas selectivas que operan tanto en la columna de agua como en el sedimento.

## Referencias

- Albertsson, J., y K. Leonardsson. 2000. Impact of a borrowing deposit feeder, *Monoporeia affinis*, on viable zooplankton resting eggs in the Northern Baltic Sea. *Mar. Biol.* **136**: 611-619.
- Andrew, T.E. 1993. The influence of oxygen concentration on the respiration rate of the resting eggs of *Leptodora kindti* (Focke, 1844) and *Bythotrephes longimanus* Leydig 1860. *Arch. Hydrobiol.* **128**: 409-414.
- Aparici, E. 1999. Estratègies reproductives i assignació sexual en rotífers. Tesis doctoral, Universitat de València, València.
- Aparici, E., M.J. Carmona, y M. Serra. 2002. Evidence for an even sex allocation in haplodiploid cyclical parthenogens. *J. Evol. Biol.* **15**: 65-73.
- Arbačiauskas, K. 1998. Life-history traits of ex-ephippial and parthenogenetically derived daphnids: indicators of different life-history strategies. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* **52**: 339-358.
- Arbačiauskas, K., y W. Lampert. 2003. Seasonal adaptation of ex-ephippial and parthenogenetic offspring of *Daphnia magna*: differences in life history and physiology. *Funct. Ecol.* **17**: 431-437.
- Arndt, H. 1991. Population dynamics and production of a natural population of estuarine planktonic rotifers in the southern Baltic: *Brachionus quadridentatus* (Hermann, 1783). *Acta Ichthyol. Piscatoria (suppl.)* **21**: 7-15.
- Bailey, S.A., I.C. Duggan, C.D.A. van Overdijk, P.T. Jenkins, y H.J. MacIsaac. 2003. Viability of invertebrate diapausing eggs collected from residual ballast sediment. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 1701-1710.
- Bailey, S.A., I.C. Duggan, C.D.A. van Overdijk, T.H. Johengen, D.F. Reid, y H.J. MacIsaac. 2004. Salinity tolerance of diapausing eggs of freshwater zooplankton. *Freshw. Biol.* **49**: 286-295.
- Balompapueng, M.D., N. Munuswamy, A. Hagiwara, y K. Hirayama. 1997. Effect of disinfectants on the hatching of marine rotifer resting eggs *Brachionus plicatilis* Müller. *Aquac. Res.* **28**: 559-565.
- Ban, S. 1992. Seasonal distribution, abundance and viability of diapause eggs of *Eurytemora affinis* (Copepoda: Calanoida) in the sediment of Lake Ohnuma, Hokkaido. *Bull. Plankt. Soc. Jpn.* **39**: 41-48.

- Begon, M., J.L. Harper, y C.R. Townsend. 1995. Ecología. Individuos, poblaciones y comunidades. Omega, Barcelona.
- Belmonte, G., y V. Rossi. 1998. Resurrection and time travelling: diapause in crustaceans (and others). Trends, Ecol. Evol. **13**: 4-5.
- Belmonte, G., A. Miglietta, F. Rubino, y F. Boero. 1997 Morphological convergence of resting stages of planktonic organisms: a review. Hydrobiologia **355**: 159-165.
- Benton, T.G., y A. Grant. 1999. Optimal reproductive effort in stochastic, density dependent environments. Evolution **53**: 677-688.
- Bohonak, A.J., y D.G. Jenkins. 2003. Ecological and evolutionary significance of dispersal by freshwater invertebrates. Ecol. Lett. **6**: 783-796.
- Boraas, M.E. 1993. Semicontinuous culture methods. En: N. Waltz (ed.), Plankton regulation dynamics. Ecological Studies 98. Springer-Verlag, Berlin, pp. 13-20.
- Brendonck, L. 1996. Diapause, quiescence, hatching requirements: what we can learn from large freshwater branchiopods (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca, Notostraca, Vonchostraca) Hydrobiologia **320**: 85-97.
- Brendonck, L., y L. De Meester. 2003. Egg banks in freshwater zooplankton: evolutionary and ecological archives in the sediment. Hydrobiologia **491**: 65-84.
- Brendonck, L., y B.J. Riddoch. 2000. Egg bank dynamics in anostracan desert rock pool populations (Crustacea: Branchiopoda). Arch. Hydrobiol. **148**: 71-84.
- Brock, M.A., D.L. Nielsen, R.J. Shiel, J.D. Green, y J.D. Langley. 2003. Drought and aquatic community resilience: the role of eggs and seeds in sediments of temporary wetlands. Freshw. Biol. **48**: 1207-1218.
- Brown, J.S., y D.L. Venable. 1986. Evolutionary ecology of seed-bank annuals in temporally varying environments. Am. Nat. **127**:151-171.
- Cáceres, C.E. 1997a. Dormancy in invertebrates. Inv. Biol. **116**: 371-383.
- Cáceres, C.E. 1997b. Temporal variation, dormancy, and coexistence: A field test of the storage effect. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **94**: 9171-9175.
- Cáceres, C.E. 1998. Interspecific variation in the abundance, production, and emergence of *Daphnia* diapausing eggs. Ecology **79**: 1699-1710.
- Cáceres, C.E., y N.G. Hairston, Jr. 1998. Benthic-pelagic coupling in planktonic crustaceans: the role of the benthos. Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol. **52**: 163-174.
- Cáceres, C.E., y M.S. Schwalbach. 2001. How well do laboratory experiments explain field patterns of zooplankton emergence? Freshw. Biol. **46**:1179-1189.

- Cáceres, C.E., y D.A. Soluk. 2002. Blowing in the wind: a field test of overland dispersal and colonization by aquatic invertebrates. *Oecologia* **131**: 402-408.
- Cáceres, C.E., y A.J. Tessier. 2003. How long to rest: The ecology of optimal dormancy and environmental constraint. *Ecology* **84**: 1189-1198.
- Cáceres, C.E., y A.J. Tessier. 2004a. Incidence of diapause varies among populations of *Daphnia pulicaria*. *Oecologia* **49**: 1333-1340.
- Cáceres, C.E., y A.J. Tessier. 2004b. To sink or swim: Variable diapause strategies among *Daphnia* species. *Limnol. Oceanogr.* **49**: 1333-1340.
- Campillo, S., E.M. García-Roger, D. Martínez, y M. Serra. 2005. Morphological stasis of two species belonging to the L-morphotype in the *Brachionus plicatilis* species complex. *Hydrobiologia* **546**: 181-187.
- Carmona, M.J. 1992. Inducción de la fase sexual y aspectos relacionados en el rotífero *Brachionus plicatilis*. Tesis doctoral, Universitat de València, València.
- Carmona, M.J., A. Gómez, y M. Serra. 1995. Mictic patterns of the rotifer *Brachionus plicatilis* Müller 1786 in small ponds. *Hydrobiologia* **313/314**: 365-371.
- Carmona, M.J, M. Serra, y M.R. Miracle. 1993. Relationships between mixis in *Brachionus plicatilis* and preconditioning of culture medium by crowding. *Hydrobiologia* **255/256**: 145-152.
- Carmona, M.J, M. Serra, y M.R. Miracle. 1994. Effect of population density and genotype on life-history traits in the rotifer *Brachionus plicatilis* O.F. Müller. *J. Exp Mar. Biol. Ecol.* **182**: 223-235.
- Carvalho, G.R, y H.G. Wolf. 1989. Resting eggs of lake-*Daphnia*. I. Distribution, abundance and hatching of diapausing eggs collected from various depths in lake sediments. *Freshw. Biol.* **22**: 459-470.
- Caswell, H. 2001. Matrix population models: construction, analysis, and interpretation, 2<sup>nd</sup> ed. Sinauer, Sunderland MA.
- Charalambidou, I., y L. Santamaría. 2002. Waterbirds as endozoochorous dispersers of aquatic organisms: a review of experimental evidence. *Acta Oecologica* **23**: 165-176.
- Chesson, P.L. 1983. The estimation and analysis of preferences and its relationship to foraging models. *Ecology* **64**: 1279-1304.
- Chesson, P.L., y R.R. Warner. 1981. Environmental variability promotes coexistence in lottery competitive systems. *Am. Nat.* **117**: 923-943.

## Referencias

- Ciros-Pérez, J., M.J. Carmona, S. Lapesa, y M. Serra. 2004. Predation as a factor mediating resource competition among rotifer sibling species. *Limnol. Oceanogr.* **49**: 40-50.
- Ciros-Pérez, J., A. Gómez, y M. Serra. 2001. On the taxonomy of three sympatric sibling species of the *Brachionus plicatilis* (Rotifera) complex from Spain, with the description of *B. ibericus* n. sp. *J. Plankton Res.* **23**: 1311-1328.
- Clegg, J.S. 1997. Embryos of *Artemia franciscana* survive four years of continuous anoxia: the case for complete metabolic rate depression. *J. Exp. Biol.* **200**:467-475.
- Clegg, J.S. 2001. Cryptobiosis - a peculiar state of biological organization. *Comp. Biochem. Physiol.* **128**: 613-624.
- Clément, P., y E. Wurdak. 1991. Rotifera. En: F.W. Harrison y E.E. Ruppert (eds.), *Microscopic anatomy of invertebrates*. Vol. IV. Aschelminthes. Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 219-297.
- Cohen, D. 1966. Optimizing reproduction in a randomly varying environment. *J. Theoret. Biol.* **12**: 119-129.
- Cohen, D. 1970. A theoretical model for the optimal timing of diapause. *Am. Nat.* **104**: 389-400.
- Cousyn, C., y L. De Meester. 1998. The vertical profile of resting egg banks in natural populations of the pond-dwelling cladoceran *Daphnia magna* Straus. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* **52**: 127-139.
- Cousyn, C., L. De Meester, J.K. Colbourne, L. Brendonck, D. Verschuren, y F. Volckaert. 2001. Rapid, local adaptation of zooplankton behavior to changes in predation pressure in the absence of neutral genetic changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 5481-5485.
- Crispim, M.C., y T. Watanabe. 2001. What can dry reservoir sediments in a semi-arid region in Brazil tell us about Cladocera? *Hydrobiologia* **442**: 101-105.
- Darwin, C. 1859. *On the origin of species by means of natural selection or the preservation of favoured races in the struggle for life*. 6<sup>th</sup> Edition. John Murray, London.
- Davison, J. 1969. Activation of the ehippial eggs of *Daphnia pulex*. *J. Gen. Physiol.* **53**: 565-575.

- Della Tommasa, L., R. Danovaro, G. Belmonte, y F. Boero. 2004. Resting stage abundance in the biogenic fraction of surface sediments from the deep Mediterranean Sea. *Sci. Mar.* **68**: 103-111.
- De Meester, L. 1996. Local genetic differentiation and adaptation in freshwater zooplankton populations: patterns and processes. *Ecoscience* **3**: 79-87.
- De Meester, L., y H. De Jager. 1993. Hatching of *Daphnia* sexual eggs. I. Intraspecific differences in the hatching responses of *Daphnia magna* eggs. *Freshw. Biol.* **30**: 219-226.
- De Stasio, B.T., Jr. 1989. The seed bank of a freshwater crustacean: copepodology for the plant ecologist. *Ecology* **70**: 1377-1389.
- De Stasio, B.T., Jr. 2004. Diapause in calanoid copepods: within-clutch hatching patterns. *J. Limnol.* **63**: 26-31.
- Dowell, K.M. 1997. Evidence for diapause in the freshwater copepod *Skistodiaptomus pallidus*. *Am. Mid. Nat.* **137**: 362-368.
- Duggan, I.C., J.D. Green, y R.J. Shiel. 2002. Rotifer resting egg densities in lakes of different trophic state, and their assessment using emergence and egg counts. *Arch. Hydrobiol.* **153**: 409-420.
- Dumont, H.J. 1977. Biotic factors in the population dynamics of rotifers. *Arch. Hydrobiol. Beih.* **8**: 98-122.
- Ellner, S.P., y N.G. Hairston, Jr. 1994. Role of overlapping generations in maintaining genetic-variation in a fluctuating environment. *Am. Nat.* **143**: 403-417.
- Ellner, S.P., N.G. Hairston, Jr., y D. Babai. 1998. Long-term diapause and spreading of risk across the life cycle. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* **52**: 297-312.
- Epp, R., y P.W. Winston. 1977. Osmotic regulation in the brackish water rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). *J. Exp. Biol.* **68**: 151-156.
- Faustová, M., A. Petrušek, y M. Černý. 2004. Status of *Daphnia* resting egg banks in Bohemian Forest lakes affected by acidification. *Hydrobiologia* **526**: 23-31.
- Figuerola, J., y A.J. Green. 2002. Dispersal of aquatic organisms by waterbirds: a review of past research and priorities for future studies. *Freshw. Biol.* **47**: 483-494.
- Fryer, G. 1996. Diapause, a potent force in the evolution of freshwater crustaceans. *Hydrobiologia* **320**: 1-14.
- Gadgil, M. 1971. Dispersal: population consequences and evolution. *Ecology* **52**: 253-261.

- Gehan, E.A., y M.M. Siddiqui. 1973. Simple regression methods for survival time studies. *J. Am. Stat. Assoc.* **68**: 848-856.
- George, C.L., y J.A. Lindley. 1997. Hatching nauplii of planktonic calanoid copepods from intertidal estuarine sediments. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **77**: 899-902.
- Gilbert, J.J. 1974. Dormancy in rotifers. *Trans. Amer. Micros. Soc.* **93**: 490-513.
- Gilbert, J.J. 1977. Mictic-female production in monogonont rotifers. *Arch. Hydrobiol. Beih.* **8**: 142-155.
- Gilbert, J.J. 1980. Female polymorphism and sexual reproduction in the rotifer *Asplanchna*: evolution of their relationship and control by dietary tocopherol. *Am. Nat.*, **116**: 409-431
- Gilbert, J.J. 1983. Rotifera. En: K.G. Adiyodi y R.G. Adiyodi (eds.), *Reproductive biology of invertebrates. Vol. I. Oogenesis, Oviposition and Oosorption.* Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi, pp. 181-209.
- Gilbert, J.J. 2002. Endogenous regulation of environmentally induced sexuality in a rotifer: a multigenerational parental effect induced by fertilization. *Freshw. Biol.* **47**: 1633-1641.
- Gilbert, J.J. 2004. Females from resting eggs and parthenogenetic eggs in the rotifer *Brachionus calyciflorus*: lipid droplets, starvation resistance and reproduction. *Freshw. Biol.* **49**: 1505-1515.
- Gilbert, J.J., y T. Schröder. 2004. The ex-resting-egg generation in rotifers: emergence and unique features for colonization. *Limnol. Oceanogr.* **49**:1341-1354.
- Gilchrist, B.M., y J. Green. 1962. Carotenoid pigments in Rotifera. *Nature* **195**: 905-907.
- Gillespie, J. 1974. Natural selection for within-generation variance in offspring. *Genetics* **76**: 601-606.
- Gillespie, J. 1977. Natural selection for variances in offspring numbers - a new evolutionary principle. *Am. Nat.* **111**: 1010-1014.
- Gillman, M., y R. Hails. 1997. *An introduction to ecological modelling: putting practice into theory.* Methods in Ecology Series. Blackwell Science, Oxford.
- Gleason, R.A., N.H. Euliss, D.E. Hubbard, y W.G. Duffy. 2004. Invertebrate egg banks of restored, natural, and drained wetlands in the prairie pothole region of the United States. *Wetlands* **24**: 562-572.
- Gómez, A. 1996. *Ecología genética y sistemas de reconocimiento de pareja en poblaciones simpátricas de rotíferos.* Tesis doctoral, Universitat de València, València.

- Gómez, A. 2005. Molecular ecology of rotifers: from population differentiation to speciation. *Hydrobiologia* **546**: 83-99.
- Gómez, A., y G.R. Carvalho. 2000. Sex, parthenogenesis and the genetic structure of rotifers: microsatellite analysis of contemporary and resting egg bank populations. *Mol. Ecol.* **9**: 203-214.
- Gómez, A., M.J. Carmona, y M. Serra. 1997. Ecological factors affecting gene flow in the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera). *Oecologia* **111**: 350-356.
- Gómez, A., G.R. Carvalho, y D.H. Lunt. 2000. Phylogeography and regional endemism of a passively dispersing zooplankter: mtDNA variation in rotifer resting egg banks. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B: Biol. Sci.* **267**: 2189-2197.
- Gómez, A., M. Serra, G.R. Carvalho, y D.H. Lunt. 2002. Speciation in ancient cryptic species complexes: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Evolution* **56**: 1431-1444.
- Gómez, A., M. Temprano, y M. Serra. 1995. Ecological genetics of a cyclical parthenogen in temporary habitats. *J. Evol. Biol.* **6**: 601-622.
- Gómez-Mestre, I., y M. Tejedó. 2003. Local adaptation of an anuran amphibian to osmotically stressful environments. *Evolution* **57**: 1889-1899.
- Gracia, F.J. 1993. Evolución geomorfológica de la región de Gallocanta (Cordillera Ibérica Central). *Geographica* **30**: 3-17.
- Grice, G.D., y N.H. Marcus. 1981. Dormant eggs of marine copepods. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* **19**: 125-140.
- Guerrero, F., y V. Rodríguez. 1997. Existence and significance of *Acartia grani* resting eggs (Copepoda, Calanoida) in sediments of a coastal station in the Alboran Sea (SE Spain). *J. Plankton Res.* **20**: 305-314.
- Guillard, R.R.L., y J.H. Ryther. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve). *Can. J. Microbiol.* **8**: 229-239.
- Hagiwara, A., y A. Hino. 1989. Effect of incubation and preservation on resting egg hatching and mixis in the derived clones of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* **186/187**: 415-421.
- Hagiwara, A., y A. Hino. 1990. Feeding history and hatching of resting eggs in the marine rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **56**: 1965-1971.

- Hagiwara, A., y C.S. Lee. 1991. Resting egg formation of the L- and S-type rotifer *Brachionus plicatilis* under different water temperature. *Nippon Suisan Gakkaishi* **57**:1645-1650.
- Hagiwara, A., A. Hino, y R. Hirano. 1985. Combined effects of environmental conditions on the hatching of fertilized eggs of the rotifer *Brachionus plicatilis* collected from an outdoor pond. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **51**: 755-758.
- Hagiwara, A., A. Hino, y R. Hirano. 1988. Effects of temperature and chlorinity on resting egg formation in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **54**: 569-575.
- Hagiwara, A., N. Hoshi, F. Kawahara, K. Tominaga, y K. Hirayama. 1995. Resting eggs of the marine rotifer *Brachionus plicatilis* Müller: development, and effect of irradiation on hatching. *Hydrobiologia* **313/314**: 223-229.
- Hagiwara, A., C.-S Lee, G. Miyamoto, G., y A. Hino. 1989. Resting egg formation and hatching of the S-type rotifer *Brachionus plicatilis* at varying salinities. *Mar. Biol.* **103**: 327-332.
- Hairston, N.G.,Jr. 1996. Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. *Limnol. Oceanogr.* **41**: 1087-1092.
- Hairston, N.G.,Jr. 1998. Time travelers: what's timely in diapause research? *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* **52**: 1-15.
- Hairston, N.G.,Jr., y C.E. Cáceres. 1996. Distribution of crustacean diapause: Micro and macroevolutionary pattern and process. *Hydrobiologia* **114**: 27-44.
- Hairston, N.G.,Jr., y B.T. De Stasio, Jr. 1988. Rate of evolution slowed by a dormant propagule pool. *Nature* **336**: 239-242.
- Hairston, N.G.,Jr., y C.M. Kearns. 2002. Temporal dispersal: ecological and evolutionary aspects of zooplankton egg banks and the role of sediment mixing. *Integ. Comp. Biol.* **42**: 2-2392.
- Hairston, N.G.,Jr., y W.R. Munns, Jr. 1984. The timing of copepod diapause as an evolutionarily stable strategy. *Am. Nat.* **123**: 733-751.
- Hairston, N.G.,Jr., y E.J. Olds. 1984. Population differences in the timing of diapause: adaptation in a spatially heterogeneous environment. *Oecologia* **61**: 42-48.
- Hairston, N.G.,Jr., y R.A. Van Brunt. 1994. Diapause dynamics of two diaptomid copepod species in a large lake. *Hydrobiologia* **292/293**: 209-218.

- Hairton, N.G., Jr., A.M. Hansen, y W.R. Schaffner. 2000. The effect of diapause emergence on the seasonal dynamics of a zooplankton assemblage. *Freshw. Biol.* **45**: 133-145.
- Hairton, N.G., Jr., C.M. Kearns, y S.P. Ellner. 1996. Phenotypic variation in a zooplankton egg bank. *Ecology* **77**: 2382-2392.
- Hairton, N.G., Jr., L.J. Perry, A.J. Bohonak, M.Q. Fellows, C.M. Kearns, y D.R. Engstrom. 1999. Population biology of a failed invasion: Paleolimnology of *Daphnia exilis* in upstate New York. *Limnol. Oceanogr.* **44**: 477-486.
- Hairton, N.G., Jr., R.A. Van Brunt, C.M. Kearns, y D.R. Engstrom. 1995. Age and survivorship of diapausing eggs in a sediment egg bank. *Ecology* **76**: 1706-1711.
- Hall, C.J., y C.W. Burns. 2001. Hatching of *Boeckella hamata* (Copepoda: Calanoida) resting eggs from sediments of a tidally influenced lake. *N.Z.J. Mar. Fresh. Res.* **35**: 235-238.
- Hammer, U.T. 1986. *Saline Lake Ecosystems of the World*. Dr. W. Junk, Dordrecht.
- Hand, S.C. 1991. Metabolic dormancy in aquatic invertebrates. *Comp. Environ. Physiol.* **8**: 2-50.
- Hand, S.C. 1998. Quiescence in *Artemia franciscana* embryos: reversible arrest of metabolism and gene expression at low oxygen levels. *J. Exp. Biol.* **201**: 1233-1242.
- Harrington, J.F. 1972. Seed storage and longevity. En: T.T. Kozlowski (ed.). *Seed Biology* Vol. 3. Academic Press, New York, pp. 145-245.
- Hedrick, P.W. 1996. Bottleneck(s) or metapopulation in cheetahs. *Cons. Biol.* **10**: 897-899.
- Herzig, A. 1985. Resting eggs – a significant stage in the life cycle of crustaceans *Leptodora kindti* and *Bythotrephes longimanus*. En: Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (ed.), XIII. *Ecology of aquatic organisms*. 3. Animals. Stuttgart, pp. 3088-3098.
- Hickman, C.P., Jr., L.S. Roberts, y A. Larson. 1997. *Zoología. Principios integrales*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
- Hildrew, A.G. 1985. A quantitative study of the life history of a fairy shrimp (Branchiopoda: Anostraca) in relation to the temporary nature of its habitat, a Kenyan pool. *J. Anim. Ecol.* **54**: 99-110.

- Hino, A., y R. Hirano. 1976. Ecological studies on the mechanism of bisexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis*. I. General aspects of bisexual reproduction inducing factors. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. **42**: 1093-1099.
- Horn, H.S., y D.I. Rubenstein. 1984. Behavioural adaptations and life history. En: J.R. Krebs y N.B. Davies (eds.), Behavioural ecology. An evolutionary approach, 2<sup>nd</sup> edition. Blackwell, Oxford, pp. 279-298.
- Ihaka, R., y R. Gentleman. 1996. R: a language for data analysis and graphics. J. Comput. Graph. Statist. **5**: 299-314.
- Ito, T. 1958. Studies on the 'Mizukawari' in eel-culture ponds. X. The density of dormant eggs of rotifer on bottom deposits in eel-culture ponds. Report of Faculty of Fisheries, Prefectural University of Mie **3**: 170-177.
- Jankowski, T., y D. Straile. 2003. A comparison of egg-bank and long-term plankton dynamics of two *Daphnia* species, *D. hyalina* and *D. galeata*: potentials and limits of reconstruction. Limnol. Oceanogr. **48**: 1948-1955.
- Jarnagin, S.T., B.K. Swan, y W.C. Kerfoot, 2000. Fish as Vectors in the Dispersal of *Bythotrephes cederstroemi*: Diapausing Eggs Survive Passage through the Gut, Freshw. Biol. **43**: 579-589.
- Jarnagin, S.T., W.C. Kerfoot, y B.K. Swan. 2004. Zooplankton life cycles: direct documentation of pelagic births and deaths relative to diapausing egg production. Limnol. Oceanogr. **49**: 1317-1332.
- Jiang, X.D., G. Wang, y S. Li. 2004. Age, distribution and abundance of viable resting eggs of *Acartia pacifica* (Copepoda: Calanoida) in Xiamen Bay, China. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **312**: 89-100.
- Johnson, J.B., y K.S. Omland. 2004. Model selection in ecology and evolution. Trends Ecol. Evol. **19**: 101-108.
- Kankaala, P. 1983. Resting eggs, seasonal dynamics, and production of *Bosmina longispina maritima* (P.E. Müller) (Cladocera) in the Northern Baltic proper. J. Plankton Res. **5**: 52-69.
- Kasahara, S., y S. Uye. 1979. Calanoid copepod eggs in sea-bottom muds. V. Seasonal changes in hatching of subitaneous and diapause eggs of *Tortanus forcipatus*. Mar. Biol. **55**: 63-68.
- Kasahara, S., S. Uye, y T. Onbé. 1975. Calanoid copepod eggs in sea-bottom muds. II. Seasonal cycles of abundance in the populations of several species of copepods and their eggs in the Inland Sea of Japan. Mar. Biol. **31**: 25-29.

- Katajisto, T. 1996. Copepod eggs survive a decade in the sediments of the Baltic Sea. *Hydrobiologia* **320**: 153-159.
- Katajisto, T., M. Viitasalo, y M. Koski. 1998. Seasonal occurrence and hatching of calanoid eggs in the sediments of the Northern Baltic Sea. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **163**: 133-143.
- Kawecki, T.J., y D. Ebert. 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecol. Lett.* **7**: 1225-1241.
- Keller, B, y P. Spaak. 2004. Nonrandom sexual reproduction and diapausing egg production in a *Daphnia* hybrid species complex. *Limnol. Oceanogr.* **49**: 1393-1400.
- Keller, B., H.R. Bürgi, M. Sturm, y P. Spaak. 2002. Ehippia and *Daphnia* abundances under changing trophic conditions. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **28**: 852-855.
- Kerfoot, W.C., y L.J. Weider. 2004. Experimental paleoecology (resurrection ecology): Chasing Van Valen's Red Queen hypothesis. *Limnol. Oceanogr.* **49**: 1300-1316.
- Kerfoot, W.C., J.W. Budd, B.J. Eadie, H.A. Vanderploeg, y M. Agy. 2004a. Winter storms: Sequential sediment traps record *Daphnia* ehippial production, resuspension, and sediment interactions. *Limnol. Ocenogr.* **49**: 1365-1381.
- Kerfoot, W.C., X. Ma, C.S. Lorence, y L.J. Weider. 2004b. Toward resurrection ecology : *Daphnia mendotae* and *D. retrocurva* in the coastal region of Lake Superior, among the first succesful outside invaders? *J. Great Lakes Res.* **30**: 285-299.
- Kerfoot, W.C., J.A. Robbins, y L.J. Weider. 1999. A new approach to historical reconstruction: combining descriptive and experimental paleolimnology. *Limnol. Oceanogr.* **44**: 1232-1247.
- King, C.E., y M. Serra. 1998. Seasonal variation as a determinant of population structure in rotifers reproducing by cyclical parthenogenesis. *Hydrobiologia* **387/388**: 361-372.
- King, D., y J. Roughgarden. 1980. Graded allocation between vegetative and reproductive growth for annual plants in growing seasons of random length. *Theor. Pop. Biol.* **22**: 1-16.
- Kirk, K.L. 1997. Egg size, offspring quality and food level in planktonic rotifers. *Freshw. Biol.* **37**: 515-521.
- Knapp, R.A., J.A. Garton, y O. Sarnelle. 2001. The use of egg shells to infer the historical presence of copepods in alpine lakes. *J. Paleolim.* **25**: 539-543.

## Referencias

- Koller, D. 1969. The physiology of dormancy and survival of plants in desert environments. En: H.W. Woolhaus (ed.), Dormancy and survival, 23<sup>rd</sup> Symposium of the Society for Experimental Biology. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 449-469.
- Koste, W. 1978. Rotatoria. Die Rädertiere Mitteleuropas. 2 vols. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Kotani, T., M. Ozaki, K. Matsuoka, T.W. Snell, y A. Hagiwara. 2001. Reproductive isolation among geographically and temporally isolated marine *Brachionus* strains. *Hydrobiologia* **446/447**: 283-290.
- Kratz, T.K., y T. M. Frost. 2000. The ecological organisation of lake districts: general introduction. *Freshw. Biol.* **43**: 297-299.
- Krishnaswamy, S., D. Lal, J.M. Martin, y M. Meybeck. 1971. Geochronology of lake sediments. *Earth Planet. Sci. Lett.* **11**: 407-414.
- Lampert, W., y I. Krauss. 1976. Zur biologie der cladocere *Holopedium gibberum* Zaddach in Windgfällweiher (Schwarzwald). *Arch. Hydrobiol. Suppl.* **48**: 262-286.
- Langley, J.M., R.J. Shiel, D.L. Nielsen, y J.D. Green. 2001. Hatching from the sediment egg-bank, or aerial dispersing? – the use of mesocosms in assessing rotifer biodiversity. *Hydrobiologia* **446/447**: 203-211.
- Lande, R. 1982. A quantitative genetic theory of life history evolution. *Ecology* **63**: 607-615.
- Lansing, A.I. 1954. A nongenetic factor in the longevity of rotifers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **57**: 455-464.
- Lapesa, S. 2004. Efecto de la depredación por invertebrados sobre poblaciones simpátricas de especies crípticas de rotíferos. Tesis doctoral, Universitat de València, València.
- Lee, E.T. 1992. *Statistical Methods for Survival Data Analysis*. 2<sup>nd</sup> edition. Wiley, New York.
- Lees, A.D. 1955. *The Physiology of Diapause in Arthropods*. Cambridge University Press, London.
- Levin, S., D. Cohen, y A. Hastings. 1984. Dispersal strategies in patchy environments. *J. Popul. Biol.* **26**: 165-191.
- Lindley, J.A. 1990. Distribution of overwintering calanoid copepod eggs in the sea-bed sediments around Southern Britain. *Mar. Biol.* **104**: 209-217.

- López, P. 1983. Aguas salinas epicontinentales próximas a la costa española. Estudio del medio. Tesis doctoral, Universitat de Barcelona, Barcelona.
- Lowe, C.D., S.J. Kemp, A.D. Bates, y D.J.S. Montagnes. 2005. Evidence that the rotifer *Brachionus plicatilis* is not an osmoconformer. *Mar. Biol.* **146**: 923-929.
- Lubzens, E. 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia* **147**: 245-255.
- Lubzens, E., R. Fishler, y V. Berdugo-White. 1980. Induction of sexual reproduction and resting egg production in *Brachionus plicatilis* reared in sea water. *Hydrobiologia* **73**: 55-58.
- Lutz, R.V., N.H. Marcus, y J.P. Chanton. 1994. Hatching and viability of copepod eggs at two stages of embryological development: anoxic/hypoxic effect. *Mar. Biol.* **119**: 199-204.
- Lynch, M., y B. Walsh. 1998. Genetics and analysis of quantitative traits, Sinauer associates, Inc. Sunderland, MA.
- MacArthur, R.H., y E.O. Wilson. 1967. The theory of Island Biogeography. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Madhupratap, M., S. Nehring, y J. Lenz. 1996. Resting eggs of zooplankton (Copepoda and Cladocera) from the Kiel Bay and adjacent waters (Southeastern Baltic). *Mar. Biol.* **125**: 77-87.
- Maffei, C., G. Mura, y P. Zarattini. 2002. Assessing anostracan (Crustacea: Branchiopoda) cyst bank size: an attempt at a standardized method. *Hydrobiologia* **486**: 255-261.
- Marcus, N.H. 1989. Abundance in sediments and hatching requirements of eggs of *Centropages hamatus* (Copepoda: Calanoida) from the Alligator Harbour region, Florida. *Biol. Bull.* **176**: 142-146.
- Marcus, N.H. 1990. Calanoid copepod, cladoceran, and rotifer eggs in sea-bottom sediments of northern Californian coastal waters: identification, occurrence and hatching. *Mar. Biol.* **105**: 413-418.
- Marcus, N.H. 1991. Planktonic copepods in a sub-tropical estuary: seasonal patterns in the abundance of adults, copepodites, nauplii, and eggs in the sea bed. *Biol. Bull.* **181**: 269-274.
- Marcus, N.H. 1995. Seasonal study of planktonic copepods and their benthic resting eggs in Northern California coastal waters. *Mar. Biol.* **123**: 459-465.

## Referencias

- Marcus, N.H., y F. Boero. 1998. Minireview: The importance of benthic-pelagic coupling and the forgotten role of life cycles in coastal aquatic systems. *Limnol. Oceanogr.* **43**: 763-768.
- Marcus, N.H., R. Lutz, W. Burnett, y P. Cable. 1994. Age, viability, and vertical distribution of zooplankton resting eggs from an anoxic basin : Evidence of an egg bank. *Limnol. Oceanogr.* **39**: 154-158.
- Martí, R., y J.C. Del Moral (eds.). 2002. La invernada de aves acuáticas en España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza –SEO/BirdLife. Ed. Organismo Autónomo Parques Nacionales, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.
- Masero, R., y F. Villate. 2004. Composition, vertical distribution and age of zooplankton benthic eggs in the sediments of two contrasting estuaries of the Bay of Biscay. *Hydrobiologia* **518**: 201-203.
- May, L. 1987. Effect of incubation temperature on the hatching of rotifer resting eggs collected from sediments. *Hydrobiologia* **147**: 335-338.
- McPeck, M.A., y R.D. Holt. 1992. The evolution of dispersal in spatially and temporally varying environments. *Am. Nat.* **140**: 1010-1027.
- McPeck, M.A., y S. Kalisz. 1998. On the joint evolution of dispersal and dormancy in metapopulations. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* **52**: 33-51.
- Minkoff, G., E. Lubzens, y D. Kahan. 1983. Environmental factors affecting hatching of rotifer (*Brachionus plicatilis*) resting eggs. *Hydrobiologia* **104**: 61-69.
- Miracle, M.R., y M. Serra. 1989. Salinity and temperature influences in rotifer life history characteristics. *Hydrobiologia* **186/187**: 81-102.
- Montes, C., y P. Martino. 1987. Las lagunas saladas españolas. Seminario sobre bases científicas para la protección de los humedales de España. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Madrid, pp. 95-145.
- Moritz, C. 1987. A note on the hatching and viability of *Ceriodaphnia ehippia* collected from lake sediment. *Hydrobiologia* **145**: 309-314.
- Müller, H.J. 1970. Formen der dormanz bei insekten. *Nova Acta Leopoldina* **191**: 1-27.
- Mura, G. 2004. Structure and functioning of the 'egg bank' of a fairy shrimp in a temporary pool: *Chirocephalus ruffoi* from Pollino National Park (Southern Italy) as a case study. *Int. Rev. Hydrobiol.* **89**: 35-50.

- Næss, T. 1996. Benthic resting eggs of calanoid copepods in norwegian enclosures used in mariculture – abundance, species composition and hatching. *Hydrobiologia* **320**: 161-168.
- Nelder, J.A., y R.W.M. Wedderburn. 1972. Generalized linear models. *J. Roy. Stat. Soc. A.* **135**: 370-384.
- Nipkow, F. 1961. Die Rädertiere im Plankton des Zürischsees und ihre Entwicklungsphasen. *Schweiz. Z. Hydrol.* **23**: 398-461.
- Onbé, T. 1978. Sugar flotation method for sorting the resting eggs of marine cladocerans and copepods from sea-bottom sediment. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **44**:1411.
- Onbé, T. 1985. Seasonal fluctuations in the abundance of populations of marine cladoceransin and their resting eggs in the Inland Sea of Japan. *Mar. Biol.* **87**: 83-88.
- Ortells, R. 2002. Diversidad genética y ecológica en especies crípticas de rotíferos: patrones y procesos. Tesis doctoral, Universitat de València, València.
- Ortells, R., A. Gómez, y M. Serra. 2003. Coexistence of cryptic rotifer species: ecological and genetic characterisation of *Brachionus plicatilis*. *Freshw. Biol.* **48**: 2194-2202.
- Ortells R., T.B.H. Reusch, y W. Lampert. 2005. Salinity tolerance in *Daphnia magna*: characteristics of genotypes hatching from mixed sediments. *Oecologia* **143**: 509-516.
- Ortells, R., T.W. Snell, A. Gómez, y M. Serra. 2000. Patterns of genetic differentiation in resting egg banks of a rotifer species complex in Spain. *Arch. Hydrobiol.* **149**: 529-551.
- Pake, C.E., y D.L. Venable. 1996. Seed banks in desert annuals: implications for persistence and coexistence in a variable environment. *Ecology* **77**: 1427–1435.
- Panov, V.E., P.I. Krylov, y N. Riccardi. 2004. Role of diapause in dispersal and invasion success by aquatic invertebrates. *J. Limnol.* **63**: 56-69.
- Park, T. 1946. Some observations on the history and scope of population ecology. *Ecol. Monogr.* **16**: 313-320.
- Parker, B.R., F.M. Wilhelm, y D.W. Schindler. 1996. Recovery of *Hesperodiptomus arcticus* populations from diapausing eggs following elimination by stocked salmonids. *Can. J. Zool.* **74**: 1292-1297.

- Pérez, A., A. Luzón, A.C. Roc, A.R. Soria, M.J. Mayayo, y J.A. Sánchez. 2002. Sedimentary facies distribution and genesis of a recent carbonate-rich saline lake: Gallocanta Lake, Iberian Chain, NE Spain. *Sediment. Geol.* **148**: 185-202.
- Perona, R., y G.G. Vallejo. 1989. Mechanisms of yolk degradation in *Artemia*: a morphological study. *Comp. Biochem. Physiol.* **94**: 231-242.
- Philippi, T.E. 1998. Prolonged diapause and models of species coexistence: a cautionary tale from annual plants in deserts. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* **52**:19-31.
- Pianka, E.R. 1970. On r- and k-selection. *Am. Nat.* **104** : 592-597.
- Pourriot, R. 1965. Recherches sur l'écologie des rotifères. *Vie Milieu Suppl.* **21**: 1-224.
- Pourriot, R., y P. Clément. 1981. Action de facteurs externes sur la reproduction et le cycle reproducteur des rotifères. *Acta Ecol. Gen.* **2**: 135 -151.
- Pourriot, R., y T.W. Snell. 1983. Resting eggs of rotifers. *Hydrobiologia* **10**: 213-224.
- Pourriot, R., C. Rougier, y D. Benest. 1980. Hatching of *Brachionus rubens* O.F. Muller resting eggs. *Hydrobiologia* **73**: 51-54.
- Preston, B.L., T.W. Snell, T.L. Robertson, y B.J. Dingmann. 2000. Use of freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* in screening assay for potential endocrine disruptors. *Env. Tox. Chem.* **19**: 2923-2928.
- Real, L.A., y S. Ellner. 1992. Life history evolution in stochastic environments: a graphical mean-variance approach. *Ecology* **73**: 1227-1236.
- Reznick, D., y J. Travis. 1996. The empirical study of adaptation in natural populations. En: M.R. Rose y G.V. Lauder (eds.). *Adaptation*. Academia Press, San Diego; CA, pp. 243-290.
- Ricci, C. 2001. Dormancy patterns in rotifers. *Hydrobiologia* **446/447**: 1-11.
- Rice, K.J., y N.C. Emery. 2003. Managing microevolution: restoration in the face of global change. *Frontiers in Ecology and the Environment* **1**:469-478.
- Ripley, B.J., J. Holtz, y M.A. Simovich. 2004. Cyst bank life-history model for a fairy shrimp from ephemeral ponds. *Freshw. Biol.* **49**: 221-231.
- Ritchie, J.C., y J.R. McHenry. 1990. Application of radioactive fallout Cesium-137 for measuring soil erosion and sediment accumulation rates and patterns: a review. *J. Environ. Qual.* **19**: 215-233.
- Robertson, A. 1968. The spectrum of genetic variation. En: R.C. Lewontin (ed.), *Population Biology and Evolution*. Syracuse University Press, Syracuse, NY.

- Rodó, X., S. Giralt, F. Burjachs, F.A. Comín, R.A. Tenorio, y R. Julià. 2002. High resolution saline lake sediments as enhanced tools for relating proxy paleolake records to recent climatic data series. *Sediment. Geol.* **148**: 203-220.
- Rodrigo, M.A., X. Armengol-Díaz, R.Oltra, M.J. Dasí, y W. Colom. 2001. Environmental variables and planktonic communities in two ponds of El Hondo wetland (SE Spain). *Internat. Rev. Hydrobiol.* **86**: 299-315.
- Rohlf, F.J., y R.R. Sokal. 1995. *Statistical Tables*, 3rd ed. Freeman, San Francisco.
- Ruiz-Maya, L. 1986. *Métodos estadísticos de investigación. Introducción al análisis de la varianza*. INE, Madrid.
- Ruttner-Kolisko, A. 1974. Plankton rotifers. Biology and taxonomy. *Binnengewasser* **26**: 1-146.
- Santer, B., y E. Boldt. 1998. The seasonal pattern of lipids in the life cycle of the summer-diapausing freshwater copepod *Cyclops kolensis* (Lilljeborg). *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* **52**: 477-492.
- Sars, G.O. 1885. On some Australian Cladocera, raised from dried mud. *Forch. VidenskSelsk. Krist.* **1885**: 1-46.
- Schröder, T. 2001. Colonising strategies and diapause of planktonic rotifers (Monogononta, Rotifera) during aquatic and terrestrial phases in a floodplain (Lower Oder Valley, Germany). *Inter. Rev. Hydrobiol.* **86**: 635-660.
- Schröder, T. 2005. Diapause in monogonont rotifers. *Hydrobiologia* **546**: 291-306.
- Schwartz, S.S. y P.D.N. Hebert. 1987. Methods for the activation of the resting eggs of *Daphnia*. *Freshw. Biol.* **17**: 373-379.
- Seger, J., y H.J. Brockmann. 1987. What is bet-hedging? En: D. Futuyma y J. Antonovics (eds.), *Oxford surveys in evolutionary biology*. Oxford University Press, Oxford.
- Serra, M. 1987. Variación morfométrica, isoenzimática y demográfica en poblaciones de *Brachionus plicatilis*: diferenciación genética y plasticidad fenotípica. Tesis doctoral, Universitat de València, València.
- Serra, M., y M.J. Carmona. 1993. Mixis strategies and resting egg production of rotifers living in temporally-varying habitats. *Hydrobiologia* **255/256**: 117-126.
- Serra, M., y C.E. King. 1999. Optimal rates of bisexual reproduction in cyclical parthenogens with density-dependent growth. *J. Evol. Biol.* **12**: 263-271.

## Referencias

- Serra, M., T.W. Snell, y J.J. Gilbert. 2005. Delayed mixis in rotifers: an adaptive response to the effects of density-dependent sex on population growth. *J. Plankton Res.* **27**: 37-45.
- Serra, M., T.W. Snell, y C.E. King. 2003. The timing of sex in rotifers. En: A. Moya y E. Font (eds.), *Evolution from Molecules to Ecosystems*. Oxford University Press, New York.
- Simon, J.C., C. Rispe, y P. Sunnucks. 2002. Ecology and evolution of sex in aphids. *Trends Ecol. Evol.* **17**: 34-39.
- Snell, T.W. 1986. Effect of temperature, salinity and food level on sexual and asexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Mar. Biol.* **92**: 157-162.
- Snell, T.W. 1987. Sex, population dynamics and resting egg production in rotifers. *Hydrobiologia* **144**: 105-111.
- Snell, T.W., y E.M. Boyer. 1988. Thresholds for mictic female production in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **124**: 73-85.
- Snell, T.W., y B.L. Garman. 1986. Encounter probabilities between male and female rotifers. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **97**: 221-230.
- Snell, T.W., y C.R. Janssen. 1995. Rotifers in ecotoxicology: a review. *Hydrobiologia* **109**: 231-247.
- Snell, T.W., B.E. Burke, y S.D. Messur. 1983. Size and distribution of resting eggs in a natural population of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Gulf Res. Rep.* **7**: 285-287.
- Snell, T.W., J. Kubanek, W. Carter, A.B. Payne, J. Kim, M.K. Hicks, y C.P. Stelzer. A protein signal triggers sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Limnol. Oceanogr.* (enviado).
- Snell, T.W., M. Serra, y M.J. Carmona. 1999. Toxicity and sexual reproduction in rotifers: reduced resting egg production and heterozygosity loss. En: V.E. Forbes (ed.), *Genetics and ecotoxicology*. Taylor & Francis, London, pp. 169-185.
- Sokal, R.R., y F.J. Rohlf. 1995. *Biometry*. 3<sup>rd</sup> Edition. W.H. Freeman & Co., San Francisco.
- Spencer, M., N. Colegrave, y S.S. Schwartz. 2001. Hatching fraction and timing of resting stage production in seasonal environments: effects of density dependence and uncertain season length. *J. Evol. Biol.* **14**: 357-367.
- Starkweather, P.L. 2000. Rotifer feeding and nutrition – dual ecological role as predator and prey. En: L. Sanoamuang, H. Segers, R.J. Shiel, y R. Gulati (eds.), *Program and abstracts of the IX<sup>th</sup> International Rotifer Symposium*, pp. 104.
- Stearns, S.C. 1992. *The Evolution of Life Histories*. Oxford University Press, Oxford.

- Stelzer, C.P., y T.W. Snell. 2003. Induction of sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Monogononta, Rotifera) by a density-dependent chemical cue. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 939-943.
- Suatoni, E.M. 2003. Patterns of speciation in the rotifer species complex, *Brachionus plicatilis*. Ph. D. Thesis, University of Yale.
- Tanaka, S. 1992. Factors influencing embryonic diapause in the striped ground cricket, *Allonemobius fasciatus* (Orthoptera: Gryllidae). *Jpn. J. Ent.* **60**: 149-155.
- Tauber, M.J., C.A. Tauber, y S. Masaki. 1986. Seasonal adaptations of insects. Oxford University Press, New York.
- Templeton, A.R., y D.A. Levin. 1979. Evolutionary consequences of seed pools. *Am. Nat.* **114**: 232-249.
- Temprano, M., I. Moreno, M.J. Carmona, y M. Serra. 1994. Size and age at maturity of two strains of the rotifer *Brachionus plicatilis* in relation to food level. *Verh. Internat. Verein. Theor. Ang. Limn.* **25**: 2327-2331.
- Tessier, A.J., L.L. Henry, C.E. Goulden, y M.W. Durand. 1983. Starvation in *Daphnia*: Energy reserves and reproductive allocation. *Limnol. Oceanogr.* **28**: 667-676.
- Thiery, A. 1997. Horizontal distribution and abundance of cysts of several large branchiopods in temporary pool and ditch sediments. *Hydrobiologia* **359**: 177-189.
- Toole, E.H., y E. Brown. 1946. Final results of the Duvel buried seed experiment. *J. Agr. Res.* **72**: 201-210.
- Tsitsilas, A., y M.J. Barry. 2002. Optimising conditions for Australian *Daphnia ephippia*. *Verh. Int. Verein. Theor. Ang. Limn.* **28**: 1460-1463.
- Tunnacliffe, A., y J. Lapinski. 2003. Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (B. Biol. Sci.)*. **358**: 1755-1771.
- Uye, S. 1980. Development of neritic copepods *Acartia clausi* and *A. steuri*. 1. Some environmental factors affecting egg development and the nature of resting eggs. *Bull. Plankt. Soc. Jpn.* **27**: 1-9.
- Uye, S. 1983. Seasonal cycle in abundance of resting eggs of *Acartia steueri* Smirnov (Copepoda: Calanoida) in sea-bottom mud of Onagawa Bay, Japan. *Crustaceana* **44**: 103-105.

- Uye, S., K. Yoshiya, K. Ueda, y S. Kasahara. 1984. The effect of organic sea-bottom pollution on survivality of resting eggs of neritic calanoids. *Crustaceana Suppl.* **7**: 390-403.
- Vandekerkhove, J., G. Louette, L. Brendonck, y L. De Meester. 2005. Development of cladoceran egg banks in new and isolated pools. *Arch. Hydrobiol.* **162**: 339-347.
- Vandekerkhove, J., B. Niessen, S. Declerck, E. Jeppesen, J.M. Conde-Porcuna, L. Brendonck, y L. De Meester. 2004. Hatching rate and success of isolated versus non-isolated zooplankton resting eggs. *Hydrobiologia* **526**: 235-241.
- Van der Linden, A., J. Gadeyne, H. Van Onckelen, A. Van Laere, y W. Declier. 1991. Involvement of cyclic nucleotides in light -induced resumption of development of *Artemia* embryos. *J. Exp. Zool.* **258**: 312-321.
- Venable, D.L., y L. Lawlor. 1980. Delayed germination in desert annuals: Escape in space and time. *Oecologia* **46**: 272-282.
- Vicente, E., M.R. Miracle, X. Armengol, A. Camacho, J.R. Roca, J.M. Soria, M.D. Sendra, D. Gisbert, M.D. Boronat, E. Ortega, J. Rueda, y F. Mezquita. 1998. Estudio limnológico de 28 humedales de Castilla-La Mancha como base para la elaboración del Plan de Ordenación de los Recursos Naturales (P.O.R.N). Consejería de Agricultura y Medio Ambiente, JCCM.
- Viitasalo, M., y T. Katajisto. 1994. Mesozooplankton resting eggs in the Baltic Sea identification and vertical distribution in laminated and mixed sediments. *Mar. Biol.* **120**: 455-465.
- Viitasalo, S., y M. Viitasalo. 2004. Predation by the mysid shrimps *Mysis mixta* and *M. relicta* on benthic eggs of *Bosmina longispina maritima* (Cladocera) in the Northern Baltic Sea. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **281**: 155-163.
- Walker, K.F. 1981. A synopsis of ecological information on the saline lake rotifer *Brachionus plicatilis* Müller 1786. *Hydrobiologia* **81**: 159-167.
- Wallace, R.L., y C. Ricci. 2002. Rotifera. En: S.D. Rundle, A.L. Robertson y J.M. Schmid-Araya (eds.), *Freshwater Meiofauna: Biology and Ecology*. Backhuys Publ. Leiden. pp: 15-44.
- Wallace, R.L., y T.W. Snell. 1991. Rotifera, p. 187-248. En: J.H. Thorp y A.P. Covich (eds.), *Ecology and Systematics of North American Freshwater Invertebrates*. Academic Press, New York, pp. 187-248.
- Warner, R.R., y P.L. Chesson. 1985. Coexistence mediated by recruitment fluctuations : a field guide to the storage effect. *Am. Nat.* **125**: 769-787.

- Weider, L.J., W. Lampert, M. Wessels, J.K. Colbourne, y P. Limburg. 1997. Long-term genetic shifts in a microcrustacean egg bank associated with anthropogenic changes in the Lake Constance ecosystem. *Proc. R. Soc. Lond., Ser. B: Biol. Sci.* **264**: 1613-1618.
- Weismann, A. 1876. Zur Naturgeschichte der Daphniden. I: Ueber die Bildung von Wintereiern bei *Leptodora hyalina*. *Z. Wiss. Zool.* **27**: 51-112.
- Williams-Howze, J., B.E. Taylor, P.M. Biesiot, y G. Seaborn. 1998. Lipid analysis of *Agladiaptomus stagnalis* Forbes and their desiccation resistant diapausing eggs. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* **52**: 493-506.
- Wolf, H.G., y G.R. Carvalho. 1989. Resting eggs of lake-*Daphnia* II. *In situ* observations on the hatching of eggs and their contribution to population and community structure. *Freshw. Biol.* **22**: 471-478.
- Wurdak, E.S., J.J. Gilbert, y R. Jagels. 1978. Fine structure of the resting eggs of the rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Asplanchna sieboldi*. *Trans. Amer. Micros. Soc.* **97**: 49-72.
- Young, J.P.W. 1983. The population structure of cyclic parthenogens. En: G.S. Oxford y D. Rollinson (eds.), *Protein polymorphism: Adaptive and taxonomic significance*. Academic Press, London, pp. 361-378.
- Yúfera, M., E. Pascual, y J.M. Olivares. 2005. Factors affecting swimming speed in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* **546**: 375-380.
- Yurista, P.M. 1997. *Bythotrephes cederstroemi* diapausing egg distribution and abundance in Lake Michigan and the environmental cues for breaking diapause. *J. Great Lakes Res.* **23**: 202-209.



# **Apéndice A**

**Revisión bibliográfica sobre bancos de huevos diapáusicos de organismos zooplanctónicos.**

Tabla A.1. Revisión bibliográfica de estudios cuantitativos en bancos de huevos diapáusicos de los principales grupos de organismos del zooplancton. Los datos previos a 1995 se toman de la revisión de Hairston (1996). Los datos correspondientes al periodo 1995-2005 se han obtenido a partir de los *Current Contents* de la *ISI Web of Knowledge*. Adviértase que algunos de los estudios abordaron varios grupos taxonómicos.

| Habitat           |          | Grupo taxonómico   |  |  |   |
|-------------------|----------|--|--|--|---|
|                   |          | Rotíferos  | Cladóceros   | Copépodos  | Otros   |
| Continental       | Profundo | Duggan <i>et al.</i> , 2002<br>Nipkow, 1961  | Cáceres, 1998<br>Cáceres y Tessier, 2004<br>Carvalho y Wolf, 1989<br>Cousyn y De Meester, 1998<br>Faustová <i>et al.</i> , 2004<br>Hairston <i>et al.</i> , 1999<br>Herzig, 1985<br>Jankowski y Straile, 2003<br>Jarnagin <i>et al.</i> , 2004<br>Keller <i>et al.</i> , 2002<br>Kerfoot y Weider, 2004<br>Kerfoot <i>et al.</i> , 2004a; 2004 b<br>Lampert y Krauss, 1976<br>Moritz, 1987<br>Weider <i>et al.</i> , 1997<br>Yurista, 1997 | Ban, 1992<br>De Stasio, 1989<br>Dowell, 1997<br>Hairston y De Stasio, 1988<br>Hairston y Van Brunt, 1994<br>Hairston <i>et al.</i> , 1995<br>Hall y Burns, 2001<br>Kerfoot y Weider, 2004<br>Knapp <i>et al.</i> , 2001  |   |
|                   | Somero   | Ito, 1958<br>Schröder, 2001  | Vandekerkhove <i>et al.</i> , 2005   | Libman y Threkeld, 1999  | Brendonck y Riddoch, 2000<br>Gleason <i>et al.</i> , 2004<br>Hildrew, 1985<br>Mura, 2004<br>Maffei <i>et al.</i> , 2002<br>Thiery, 1997 |
| Marino, estuarino |          | Marcus <i>et al.</i> , 1994<br>Masero y Villate, 2004<br>Snell <i>et al.</i> , 1983<br>Viitasalo y Katajisto, 1994 | Kankaala, 1983<br>Madhupratap <i>et al.</i> , 1996<br>Onbé, 1978 ; 1985<br>Viitasalo y Katajisto, 1994<br>Viitasalo y Viitasalo, 2004  | Albertsson y Leonardsson, 2000<br>George y Lindley, 1997<br>Guerrero y Rodríguez, 1997<br>Jiang <i>et al.</i> , 2004<br>Kasahara y Uye, 1979<br>Kasahara <i>et al.</i> , 1975<br>Katajisto, 1996<br>Katajisto <i>et al.</i> , 1998<br>Lindley, 1990<br>Madhupratap <i>et al.</i> , 1996<br>Marcus, 1989; 1990; 1991; 1995<br>Marcus <i>et al.</i> , 1994<br>Masero y Villate, 2004<br>Næss, 1996<br>Uye, 1983<br>Viitasalo y Katajisto, 1994 | Della Tommasa <i>et al.</i> , 2004  |

# Apéndice B

## Informe sobre la datación con $^{210}\text{Pb}$ y $^{137}\text{Cs}$ de cores de sedimento de varias lagunas de la Península Ibérica

Se dataron seis cores de sedimentos procedentes de seis lagunas de la Península Ibérica con los métodos de  $^{210}\text{Pb}$  y  $^{137}\text{Cs}$ . Cada core tenía una longitud de diez centímetros y se dividió en cinco secciones iguales de dos centímetros de espesor. La descripción detallada del análisis llevado a cabo puede encontrarse en los trabajos de Krishnaswami *et al.* (1971) y de Ritchie y McHenry (1990). En general, el patrón esperado para  $^{210}\text{Pb}$  es una disminución exponencial con la profundidad en el sedimento, que se supone que está provocada por la acumulación estacionaria de sedimento y el decaimiento radioactivo del propio  $^{210}\text{Pb}$ . Las fuentes de  $^{210}\text{Pb}$  en el sedimento son tres: (1) el decaimiento de  $^{226}\text{Ra}$  en el sedimento (fondo o *background* de  $^{210}\text{Pb}$ ), (2) el aporte de  $^{210}\text{Pb}$  de manera directa y (3) de manera indirecta a partir del decaimiento de  $^{222}\text{Rn}$  en la atmósfera (exceso de  $^{210}\text{Pb}$ ). En el caso del  $^{137}\text{Cs}$ , se espera un máximo sub-superficial que corresponde al aporte que tuvo lugar en 1963, cuando las pruebas de armamento nuclear en la atmósfera produjeron un pico en la deposición de  $^{137}\text{Cs}$ . A partir de este dato es posible calcular una tasa de sedimentación y datar las diferentes secciones del sedimento.

Los perfiles radiométricos de las lagunas se muestran en la figura B.1. En tres de los seis casos analizados, los cores no se ajustaron a los patrones ideales esperados. Los resultados se describen más abajo, para cada una de las lagunas estudiadas:

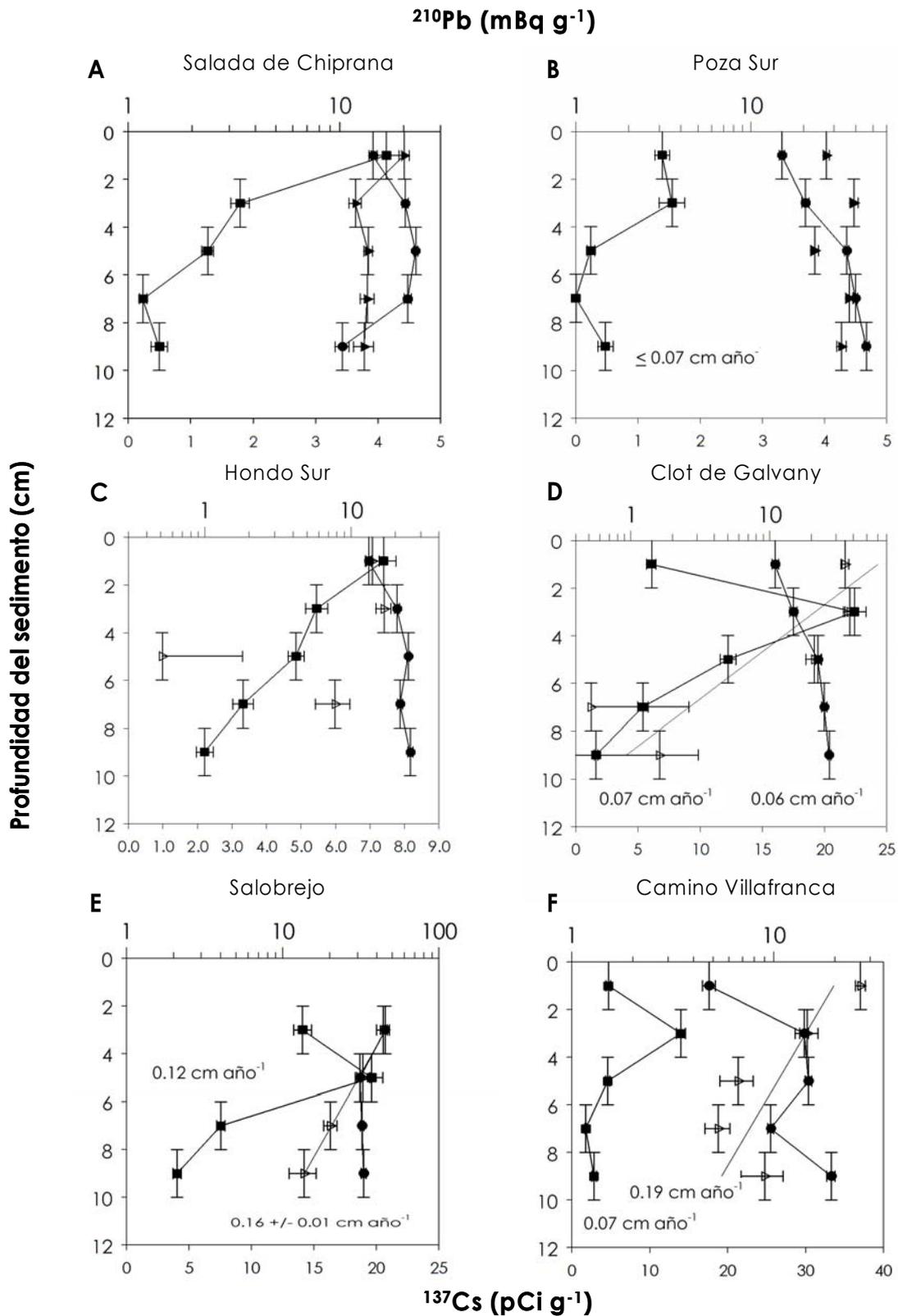


Figura B.1. Perfiles radiométricos de los cores de sedimento de las seis lagunas estudiadas. Círculo:  $^{226}\text{Ra}$ , Triángulo negro:  $^{210}\text{Pb}$  total, Triángulo blanco:  $^{210}\text{Pb}$  exceso, Cuadrado:  $^{137}\text{Cs}$ . Se representan medias  $\pm$  error típico. Se indica también, cuando fue posible, la tasa de sedimentación estimada.

**Salada de Chiprana:** No se encontró exceso de  $^{210}\text{Pb}$  sobre la radiación de fondo.  $^{137}\text{Cs}$  presentó el máximo en superficie, decreciendo rápidamente con la profundidad (véase la figura B.1.A). La cantidad total de  $^{137}\text{Cs}$  fue baja. Estos patrones son consistentes con una mínima acumulación de sedimento (prácticamente inapreciable) en el pasado reciente, o la erosión reciente del sedimento. Tanto para este core como para el de la Poza Sur, en las gráficas de la figura B.1 (A y B) se representa el perfil de  $^{210}\text{Pb}$  total, no el exceso de  $^{210}\text{Pb}$  (que es igual al total menos el  $^{210}\text{Pb}$  aportado a partir del  $^{226}\text{Ra}$ ).

**Poza Sur:** No se encontró  $^{210}\text{Pb}$  por encima de la radiación de fondo (Figura B.1.B).  $^{137}\text{Cs}$  estuvo presente en las dos secciones superiores del sedimento (esto es, los cuatro centímetros superiores del core). La presencia de  $^{137}\text{Cs}$  hasta cierta profundidad, mientras que  $^{210}\text{Pb}$  está ausente, es una inconsistencia difícil de interpretar. Los resultados sugieren una deposición inapreciable, o quizás la pérdida de la parte superior del core por erosión.

**Hondo Sur:** Como muestra la figura B.1.C,  $^{210}\text{Pb}$  está presente en los cuatro primeros centímetros del core en cantidades significativas, pero luego decrece de forma irregular con la profundidad.  $^{137}\text{Cs}$  presenta el máximo en la superficie y luego decrece de forma monótona con la profundidad del sedimento. Se sabe que esta charca fue alterada artificialmente hace aproximadamente 70 años. Los datos de los radionúclidos son consistentes con la siguiente interpretación: los cuatro primeros centímetros del sedimento representan nuevo sedimento depositado desde que la charca, que hoy sirve como reserva de agua, fue construida. No está claro a partir de los datos si el sedimento se mezcla o se deposita estacionalmente. Por debajo de los cuatro primeros centímetros de profundidad, el material está removido, y los radionúclidos pueden penetrar vía mezcla, lo que mimetiza un efecto de difusión.

**Clot de Galvany:** La figura B.1.D muestra cómo  $^{210}\text{Pb}$  decrece de forma irregular con la profundidad. Los seis primeros centímetros del core muestran más cantidad de  $^{210}\text{Pb}$  que los cuatro últimos centímetros. La aplicación del modelo de datación estándar indica una tasa de sedimentación de  $0.06 \pm 0.02 \text{ cm año}^{-1}$ . El pico de  $^{137}\text{Cs}$  sugiere una tasa de sedimentación media próxima a  $0.07 \text{ cm año}^{-1}$ . Como se ha señalado, ambos métodos implican tasas de sedimentación muy similares.

**Salobrejo:** Los datos aquí exhiben el patrón típico (Figura B.1.E). Excepto para la capa superficial,  $^{210}\text{Pb}$  disminuye exponencialmente con la profundidad de forma consistente con una tasa de acumulación de sedimento de  $0.16 \pm 0.01 \text{ cm año}^{-1}$ . El pico de  $^{137}\text{Cs}$ , a una profundidad entre cuatro y seis centímetros, indica una tasa de acumulación entre  $0.10$  y  $0.15 \text{ cm año}^{-1}$ . Así, los dos métodos son consistentes en cuanto a sus resultados. Los dos primeros centímetros del sedimento se excluyeron del análisis porque estaban constituidos prácticamente por materia orgánica, y la cantidad de sedimento analizable resultó ser demasiado pequeña.

**Camino Villafranca:** Los perfiles son normales (Figura B.1.F).  $^{210}\text{Pb}$  proporcionó una tasa de sedimentación de  $0.19 \text{ cm año}^{-1}$  con un rango de variación entre  $0.13$  y  $0.36$ . El método basado en  $^{137}\text{Cs}$  indica una tasa de sedimentación entre  $0.05$  y  $0.10 \text{ cm año}^{-1}$ . Si se excluye la sección de  $8\text{--}10 \text{ cm}$ , el análisis de  $^{210}\text{Pb}$  proporciona una tasa de  $0.11 \pm 0.02 \text{ cm año}^{-1}$  y la correlación resultante es mucho mayor. La coincidencia entre ambos métodos no es perfecta pero sugiere una tasa de sedimentación próxima a  $0.10 \text{ cm año}^{-1}$ .

Para la interpretación de estos datos, deben considerarse, al menos, tres limitaciones:

- (1) Para estimar con precisión una tasa de sedimentación es preferible que los registros de radionúclidos sean más largos que los aquí disponibles.
- (2) Los lagos someros están sujetos a fenómenos que pueden perturbar el sedimento y que pueden dificultar la interpretación del perfil de radionúclidos.
- (3) Los lagos formados recientemente tienden a presentar patrones de deposición temporal más complejos, que también dificultan el análisis.



# Apéndice C

## Composición estable en clases de profundidad del sedimento y clases de estado de huevos diapáusicos

Como se argumenta – primero – y se ilustra – después – más abajo, el modelo matemático propuesto en esta tesis (capítulo 3) para describir la dinámica de los huevos diapáusicos en el sedimento es consistente con un escenario ecológico en el que la eclosión, el deterioro y las pérdidas de los huevos diapáusicos son dependientes de la edad de los propios huevos y su profundidad en el sedimento, aunque estas características no se hagan explícitas. Igualmente, el modelo es consistente con un escenario en el que la mezcla entre capas de sedimento es posible, de tal manera que los huevos pueden desplazarse verticalmente en el mismo. Sin embargo, el modelo se basa en el supuesto de que las tasas que describen los procesos que afectan a los huevos (eclosión, deterioro, pérdida), así como otros aspectos no explicitados (p.ej., la dependencia de las tasas con respecto a la edad o la profundidad, tasas de migración entre capas de sedimento, etc.) son constantes. Al contrario de lo que se presupone, es obvio que puede existir variación en los valores anuales que pueden tomar las tasas de estos procesos. No obstante, puede entenderse que éstas son valores promedio sobre una escala apropiada de tiempo.

Efectivamente, bajo el supuesto de constancia temporal de las tasas, la composición del banco de huevos en lo que se refiere a (1) la edad de los huevos, (2) la profundidad a la que se encuentran los huevos, y (3) las diferentes categorías de huevos, debe converger a una composición

estable, tal y como predice la teoría general de poblaciones estructuradas en clases de estado (Caswell, 2001). A continuación se ilustra mediante un ejemplo simulado esta convergencia a la composición estable de clases de estado. El modelo conceptual en que se basa esta demostración se presenta gráficamente en la figura C.1. Nótese que, a diferencia del modelo presentado en el capítulo 3, se supone la distribución de los huevos en dos capas, con diferentes tasas.

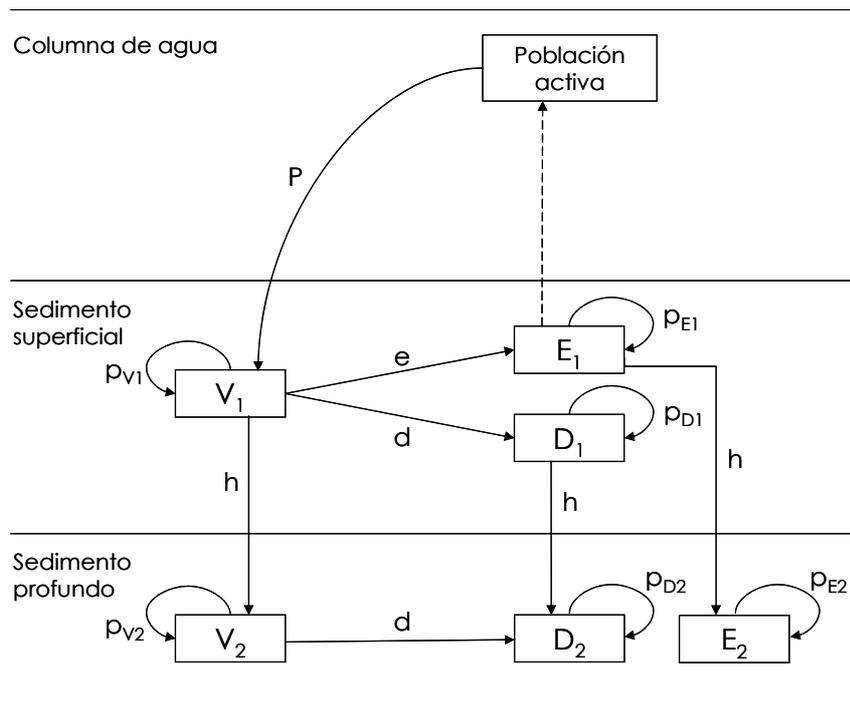


Figura C.1. Diagrama de la dinámica de bancos de huevos diapásicos. Las flechas indican flujos entre tipos de huevos y entre los compartimentos del sistema *columna de agua-sedimento*. Nótese que se han considerado dos compartimentos en el sedimento (superficial y profundo). La flecha discontinua representa la emergencia de neonatas a partir de la eclosión de huevos en el sedimento superficial. Se considera que no se producen eclosiones a partir de huevos enterrados en el sedimento profundo. Variables: *Huevos con aspecto saludable* ( $V$ ), *huevos eclosionados* ( $E$ ), *huevos deteriorados* ( $D$ ). Los subíndices 1 y 2 hacen referencia a la capa de sedimento donde se encuentran los huevos de cada tipo. Parámetros: tasa de producción de huevos diapásicos ( $P$ ), tasa de eclosión *per capita* ( $e$ ), tasa de deterioro *per capita* ( $d$ ), tasa de hundimiento *per capita* ( $h$ ), probabilidad de permanencia de *huevos con aspecto saludable* en la capa en que se encuentran ( $p_V$ ); de modo análogo a esta última, probabilidad de permanencia de *huevos eclosionados* ( $p_E$ ) y *deteriorados* ( $p_D$ ) en la capa en que se encuentren.

Se consideran tres clases de estado de conservación de los huevos diapáusicos, a saber: (1) *huevos con aspecto saludable (V)*, (2) *huevos deteriorados (D)*, y (3) *huevos eclosionados (E)*. Además, se consideran dos profundidades en el sedimento (*i.e.*, superficial y profundo), representadas por subíndices (1 y 2). En total, existen 6 estados diferentes de estado se relacionan mediante la siguiente matriz de transición (**M**):

$$\begin{array}{c}
 \\
 \\
 \\
 \\
 \\
 \\
 \end{array}
 \begin{matrix}
 & V_1 & E_1 & D_1 & V_2 & E_2 & D_2 \\
 \begin{matrix}
 V_1 \\
 E_1 \\
 D_1 \\
 V_2 \\
 E_2 \\
 D_2
 \end{matrix} & \left( \begin{array}{cccccc}
 p_{V1} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 e & p_{E1} & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 d & 0 & p_{D1} & 0 & 0 & 0 \\
 h & 0 & 0 & p_{V2} & 0 & 0 \\
 0 & h & 0 & 0 & p_{E2} & 0 \\
 0 & 0 & h & d & 0 & p_{D2}
 \end{array} \right)
 \end{matrix}$$

Para completar la dinámica, hay que tener en cuenta la producción desde la columna da agua al final de cada estación. Se supone que sólo son producidos *huevos con aspecto saludable*, con tasa *P*, y así la producción, que queda descrita por un vector es:

$$\mathbf{P} = (P \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0)^T$$

(T: transposición).

A partir de aquí, la dinámica de los huevos diapáusicos se encuentra con la iteración siguiente:

$$\mathbf{n}(1) = \mathbf{M} \mathbf{n}(0) + \mathbf{P}$$

$$\mathbf{n}(2) = \mathbf{M} \mathbf{n}(1) + \mathbf{P}$$

...

$$\mathbf{n}(t) = \mathbf{M} \mathbf{n}(t-1) + \mathbf{P}$$

donde  $\mathbf{n}(t)$  es el vector que contiene la composición de huevos diapáusicos en el tiempo  $t$ .

$$\mathbf{n}(t) = (V_1 \ E_1 \ D_1 \ V_2 \ E_2 \ D_2)^T$$

(Los coeficientes del vector son dependientes del tiempo, pero esto no se indica en la notación).

A continuación se proponen una serie de valores para los parámetros, de manera que la matriz de transición queda de la siguiente manera:

$$\begin{array}{c}
 \\
 \\
 \\
 \\
 \\
 \\
 \end{array}
 \begin{array}{cccccc}
 & V_1 & E_1 & D_1 & V_2 & E_2 & D_2 \\
 \begin{array}{c}
 V_1 \\
 E_1 \\
 D_1 \\
 V_2 \\
 E_2 \\
 D_2
 \end{array}
 & \left( \begin{array}{cccccc}
 0.2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0.2 & 0.6 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0.2 & 0 & 0.6 & 0 & 0 & 0 \\
 0.2 & 0 & 0 & 0.6 & 0 & 0 \\
 0 & 0.2 & 0 & 0 & 0.8 & 0 \\
 0 & 0 & 0.2 & 0.2 & 0 & 0.8
 \end{array} \right)
 \end{array}$$

Se considera que las tasas de hundimiento ( $h$ ) son independientes del tipo de huevo y afectan a la misma proporción (20 %) de huevos de cada tipo. La relajación de este supuesto no afecta a las conclusiones cualitativas. Las eclosiones sólo pueden producirse a partir de *huevos con aspecto saludable* en la capa superficial, y afectan al 20 % de los mismos. Se supone que en el sedimento profundo, los *huevos con aspecto saludable* no son capaces de eclosionar. Por último, el deterioro, que lógicamente sólo afecta a los *huevos con aspecto saludable*, no difiere en la capa superficial y en la profunda, y afecta en ambos casos al 20 % de dichos huevos. De nuevo, este supuesto puede relajarse sin perjuicio de las conclusiones. El resto de valores se han ajustado para que la suma de cada columna sea 0.8. Esto

implica que la probabilidad de pérdida de huevos de cualquier tipo en cualquier capa es también del 20 %.

A efectos de la simulación suponemos que

$$\mathbf{P} = (100 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0)^T$$

Para las condiciones iniciales, que no afectarán a la composición final, se supone un sedimento sin huevos diapáusicos (p.ej., una laguna de colonización reciente), y así:

$$\mathbf{n}(0) = (0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0)^T$$

La figura C.2 muestra la convergencia a una composición estable (constancia de las proporciones) de los estados de los huevos (profundidad y tipo).

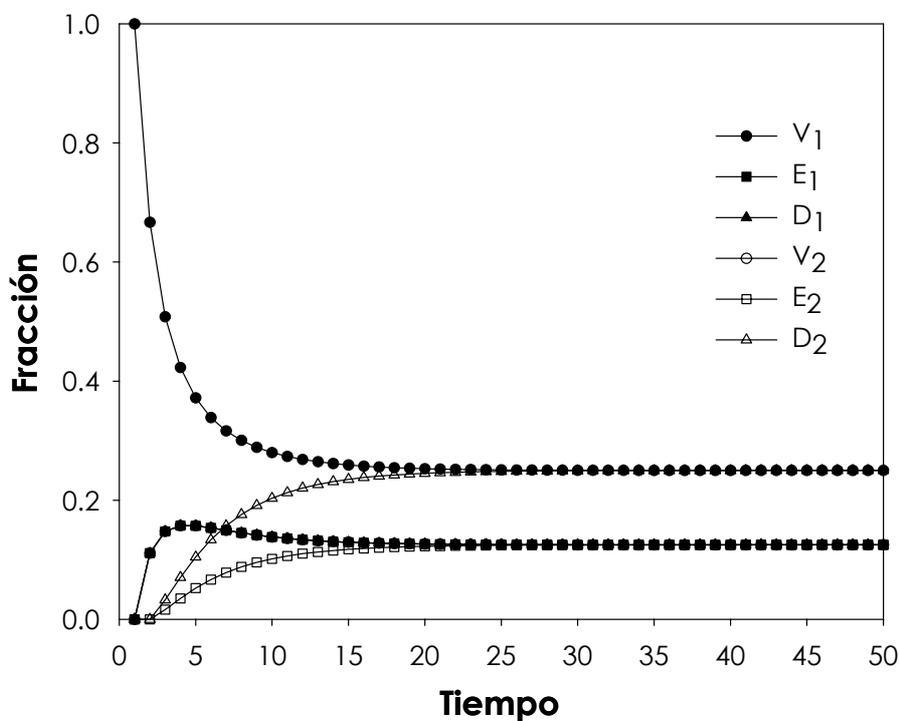


Figura C.2. Dinámica de la proporción de cada estado de huevo diapáusicos.

En apenas 25 ciclos (*i.e.*, pulsos de producción) se converge a una composición estable, la cual hace referencia, entre otras propiedades, a la profundidad, que en el caso concreto que se simula debe necesariamente estar correlacionada con la edad. A partir de un determinado momento, la proporción de cada tipo de huevo (independientemente de su condición o de la profundidad en que se encuentre) se mantiene invariable. Como ya se ha establecido, esta situación se alcanzará siempre que se mantengan constantes las tasas de los procesos que afectan a la dinámica de los huevos diapáusicos.

La variación de los números de cada estado de huevo diapáusico a lo largo del tiempo se muestra en la figura C.3. A partir del 25º ciclo, los números de cada estado de huevo se mantienen invariables. Esta característica no se cumple en general en los modelos de poblaciones estructurados habituales (Caswell, 2001), y aquí se debe a que el reclutamiento de huevos diapáusicos viables se supone constante.

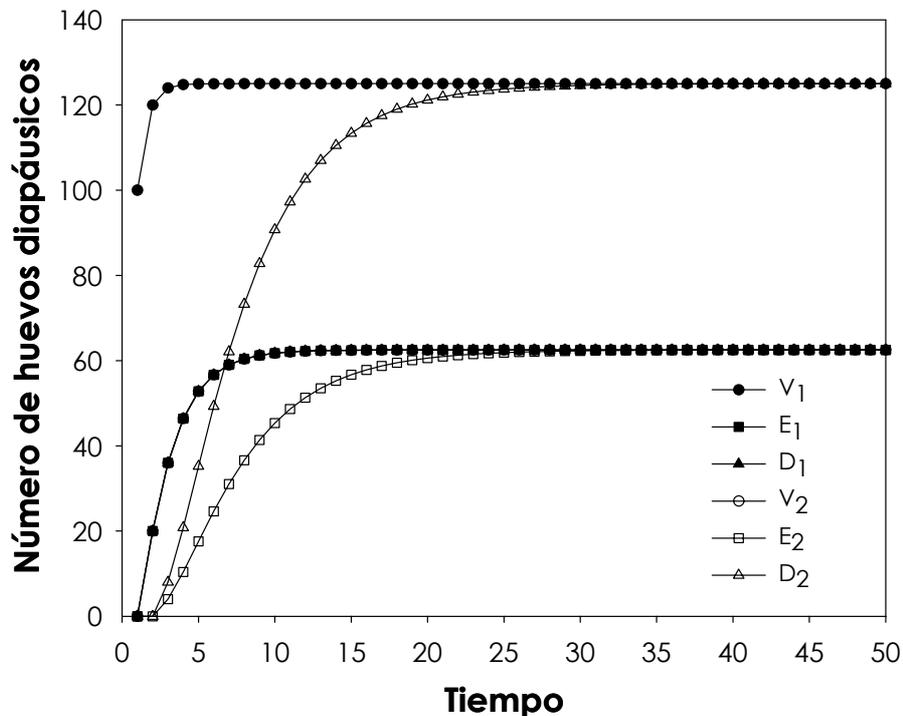


Figura C.3. Dinámica del número de cada estado de huevos diapáusicos.

En resumen, se muestra que la composición del banco no sólo converge a un estado estable, sino también estacionario, donde no cambian los números de huevos diapáusicos de cada tipo. De esta manera, incluso en un banco de estructura compleja se espera alcanzar una situación asintótica de equilibrio. Como se ha sugerido más arriba, el modelo podría complicarse aún más con la misma lógica añadiendo más capas de sedimento, considerando el movimiento hacia capas superiores de huevos diapáusicos profundos, o teniendo en cuenta diferentes clases de edad de los huevos. Con todas estas complicaciones se alcanzará igualmente una situación asintótica de equilibrio.



# Publicaciones

Publicaciones realizadas a partir de los resultados de esta tesis:

García-Roger, E.M., M.J. Carmona, y M. Serra. 2005. Deterioration patterns in diapausing egg banks of *Brachionus* (Müller, 1786) rotifer species. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **314**: 149-161.

García-Roger, E.M., A. Martínez, y M. Serra. 2006. Starvation tolerance of rotifers produced from parthenogenetic eggs and from diapausing eggs: a life table approach. J. Plankton Res. **28**: 257-265.

García-Roger, E.M., M.J. Carmona, y M. Serra. 2006. A simple model relating habitat features to a diapause egg bank. Limnol. Oceanogr. **51** (en prensa).

García-Roger, E.M., M.J. Carmona, y M. Serra. 2006. Patterns in rotifer diapausing egg banks: density and viability. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. (en revisión).

García-Roger, E.M., M.J. Carmona, y M. Serra. 2006. Hatching and viability of rotifer diapausing eggs collected from pond sediments. Freshw. Biol. (en revisión).

