

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INDUCCIÓN DE LA FASE SEXUAL Y ASPECTOS RELACIONADOS EN EL
ROTÍFERO *BRACHIONUS PLICATILIS*.



María José Carmona Navarro
1992

UMI Number: U607678

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607678

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

Tesis presentada para optar al grado de doctora en
la Facultad de Ciencias Biológicas de la
Universitat de València
La doctoranda

Fdo.: María José Carmona Navarro

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA BIBLIOTECA CIÈNCIES	BIOLOGICAS
Nº Registre <u>2358</u>	
DATA <u>19-X-92</u>	
SIGNATURA <u>TD-B 281</u>	
BIBLIOTECA	
Nº LIBIS: <u>21522121</u>	29 Cerr.

Tesis dirigida por:

María Rosa Miracle Solé
Dra. en Ciencias Biológicas
y Catedrática de Ecología
en la Universitat de València

Manuel Serra Galindo
Dr. en Ciencias Biológicas
y Profesor Titular de Ecología
en la Universitat de València

Fdo: María Rosa Miracle Solé

Fdo: Manuel Serra Galindo

A mis padres,

*por todo lo que me hicieron aprender
sin darse cuenta*

Mi agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que han colaborado en este trabajo.

El ímpetu inicial para la realización de este estudio fue proporcionado por María Rosa Miracle, a quien debo reconocerle su confianza en el proyecto y sus orientaciones durante la dirección del mismo. Manuel Serra me introdujo en el tema de estudio y condujo mis investigaciones durante estos años atendiéndome y estimulándome en todo momento. Quiero darle las gracias especialmente por haberme ayudado a esclarecer y presentar mejor mis ideas, y por la forma en que ha moldeado mi pensamiento. Angeles Esparcia me ayudó con sus sugerencias, indicaciones y apoyo en innumerables ocasiones. Claudia Ricci y Manuela Pagani aportaron interesantes opiniones en el enfoque de algunos problemas, y me concedieron toda clase de facilidades para el acceso a su material bibliográfico durante mis estancias en la Sezione di Ecologia de la Universita di Milano. Debo agradecerles, así como a los restantes miembros de esta institución, su acogida y el permitirme el libre uso de su material e instalaciones. Isabel Pardo y Carmen Amaro me asistieron durante mi formación inicial en las tareas de laboratorio. Carmina Tortajada, Toñi Rodrigo, William Colom, y Emilio Barba me animaron con su interés por mi trabajo y aportaron muchas indicaciones útiles. Javier Armengol y Rafael Oltra me proporcionaron datos y comentarios acerca de sus observaciones en poblaciones naturales de rotíferos. Salvador Peiró realizó

algunas de las fotografías de mayor dificultad técnica. Carmen Tor me proporcionó información bibliográfica. A Sergio Ferrer, Carmela Benlloch y Pedro Carrasco les agradezco su ayuda e indicaciones para el procesado del texto. Amparo Carmona ideó y diseñó la cubierta del manuscrito. Lorenzo Andrés colaboró en las tareas de diseño gráfico y edición, y con su interés por comprender mi campo de estudio me alentó para concluir este trabajo.

El Área de Ecología de la Universitat de València puso a mi disposición los medios necesarios para el desarrollo de este estudio y quiero agradecer a todos sus miembros el apoyo que siempre me han mostrado, agradecimiento que hago extensivo al Área de Microbiología (Facultad de Ciencias Biológicas) de esta misma universidad.

Este trabajo ha sido financiado en parte por una beca de Formación del Personal Investigador concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. Introducción general 3

PARTE PRIMERA: MATERIAL Y MÉTODOS. GENERALIDADES

2. Descripción de la especie. Origen geográfico de las cepas 11
- 2.1. Descripción de la especie 11
 - Taxonomía 11
 - Distribución y ecología 12
 - Etología alimentaria 12
 - Descripción morfológica. Anatomía 13
 - Reproducción 19
 - 2.2. Origen geográfico de las cepas 24
 - 2.3. Aislamiento de las cepas 27
3. Métodos generales de cultivo 29
4. Métodos bioquímicos. Aportaciones metodológicas 35
- 4.1. Introducción 35
 - 4.2. Técnicas de extracción y homogeneización de las proteínas 35
 - Protocolo para la preparación de las muestras 36
 - Desarrollo del método de extracción, comentarios y aportaciones 36
 - 4.3. Técnicas electroforéticas 37
 - Protocolo de elaboración de los geles. Electroforesis 38
 - Justificación de las características del sistema de electroforesis empleado 39
 - 4.4. Técnicas de tinción de proteínas de alta sensibilidad. Tinción de los geles 40
 - Protocolo para la fijación y tinción de los geles 41
 - Algunos comentarios al protocolo de tinción de los geles. Análisis y discusión de algunos aspectos metodológicos 43
 - 4.5. Grado de ajuste de las técnicas desarrolladas a los requerimientos del estudio 54

PARTE SEGUNDA: EL ESCENARIO ORGÁNICO DE LA MIXIS: VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA HEREDABLE Y ASOCIADA A LA EDAD

5. Estudio de los patrones de proteínas totales en diferentes clones de *Brachionus plicatilis* 59
- 5.1. Introducción 59
 - 5.2. Material y Métodos 60
 - 5.3. Resultados 64
 - 5.4. Discusión 73

6. Estudio del crecimiento y del envejecimiento individual en el clon CU de <i>Brachionus plicatilis</i>	81
6.1. Introducción	81
6.2. Material y Métodos	85
Estudio morfológico	86
Estudio bioquímico	88
6.3. Resultados	88
Resultados del estudio morfológico	88
Resultados del estudio bioquímico	92
6.4. Discusión	95

PARTE TERCERA: LA MIXIS: INDUCCIÓN, IMPLICACIONES Y FENÓMENOS ASOCIADOS

7. El significado de la mixis y los factores relacionados con la misma. Revisión bibliográfica y aportaciones teóricas	105
7.1. Introducción	105
7.2. Revisión bibliográfica de los factores relacionados con la mixis	106
7.3. Incidencia de la reproducción sexual en poblaciones naturales	123
7.4. El significado de la mixis	125
7.5. Desarrollo de un modelo teórico	129
Consideraciones previas	129
Modelo	130
Resultados	135
Discusión	142
8. El efecto combinado del genotipo, de la edad, y de la densidad poblacional sobre la historia vital y la mixis	149
8.1. Introducción	149
8.2. Material, Métodos y Experiencias preliminares	150
Concepción metodológica	150
Experiencias preliminares	150
Metodología para el estudio de la respuesta mítica a la densidad poblacional y su regulación por los factores internos genotipo y edad materna	156
8.3. Resultados	160
8.4. Discusión	189
Relación entre la producción de hembras míticas y la densidad poblacional en la especie <i>Brachionus plicatilis</i>	189
El efecto del genotipo materno sobre la respuesta mítica a la densidad en <i>Brachionus plicatilis</i>	192
Influencia de la edad de las hembras preparentales sobre el tipo de hembra descendiente	197

9. La acción de la densidad poblacional sobre la mixis a través del condicionamiento del medio de cultivo	201
9.1. Introducción	201
9.2. Material y Métodos	205
Experimento 1: Cultivos masivos	205
Experimento 2: Cultivos individuales	206
9.3. Resultados	208
Experimento 1	208
Experimento 2	210
9.4. Discusión	212
10. Estudio de las diferencias entre hembras míticas y hembras amíticas: rasgos demográficos y patrones de proteínas	219
10.1. Introducción	219
10.2. Material y Métodos	221
Dinámica de poblaciones	221
Análisis electroforético	222
10.3. Resultados y Discusión	223
CONCLUSIÓN	
11. Consideraciones finales y conclusiones	235
11.1. Consideraciones finales y perspectivas futuras	235
11.2. Conclusiones	239
BIBLIOGRAFÍA	245

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los rotíferos constituyen uno de los grupos de metazoos característicos del zooplancton de las aguas epicontinentales, así como de las zonas litoral-bentónicas. La diversidad funcional que presentan hace que su estudio sea obligado para conocer la estructura y dinámica de las comunidades acuáticas (véanse, p.e., Hutchinson, 1967; Margalef, 1983). Por ello, el estudio de los patrones de distribución de los rotíferos atrajo desde muy temprano la atención de los limnólogos. A partir de dichos estudios, y sobre todo en las dos últimas décadas, la atención de los investigadores ha ido ampliándose para dar cabida, junto a los estudios de distribución espacial y temporal, a la investigación de los mecanismos fisiológicos y genéticos que puedan explicar los patrones ecológicos observados, así como al estudio del significado adaptativo de tales mecanismos (p.e., King, 1977a,b, 1980; May *et al.*, 1987; Pejler *et al.*, 1983; Pourriot y Snell, 1983; Serra y Miracle, 1985, 1987; Snell, 1979, 1987; Ricci *et al.*, 1989). Del mismo modo que en el conocimiento de su ecología y evolución, ha tenido tradicionalmente importancia el estudio de la diversidad y distribución del grupo, de sus interacciones ecológicas (e.g., hábitos alimentarios, función en los ecosistemas, relaciones predador-presa, acuicultura), y del controvertido tema de sus relaciones evolutivas filogenéticas, y más recientemente ha adquirido especial relevancia el estudio de sus ciclos de vida centrado en aspectos tales como la dinámica de sus poblaciones, el comportamiento reproductivo y los procesos de senescencia. Los estudios sobre la biología de los rotíferos constituyen pues un campo de conocimiento en crecimiento cuyos límites no están claramente establecidos y que goza de una gran interdisciplinariedad.

Por otra parte, el análisis de las estrategias vitales está siendo considerado de gran importancia en el desarrollo de la ecología evolutiva. La teoría de los rasgos de los ciclos vitales, iniciada con los trabajos de Lack (1947), Medawar (1946, 1952) y Cole (1954), es un tema de creciente interés en el campo de la ecología, tal y como demuestra el que el concepto de estrategias vitales ocupe el noveno lugar en importancia, dentro de una lista de cincuenta y cinco conceptos ecológicos, según una encuesta realizada a los miembros de la British Ecological Society (Cherret, 1989). Dentro de la teoría de los rasgos vitales, la reproducción es un concepto clave en la comprensión de la diversidad de los ciclos de vida a través de los compromisos que las componentes reproductivas establecen con otros rasgos vitales en la historia evolutiva de los organismos (Harvey *et al.*, 1991).

Por ello, un fenómeno de interés desde una óptica de la ecología evolutiva es la peculiar estructura reproductiva de los rotíferos monogonontes, ya que presentan reproducción partenogenética cíclica. El descubrimiento de la partenogénesis en los rotíferos y la elucidación de los ciclos vitales de sus grupos principales han sido revisados de forma detallada por Remane (1929–33). Las primeras descripciones claras y los primeros dibujos de estos organismos fueron realizados por Leeuwenhoek (1702); todos ellos correspondientes a hembras. Los naturalistas posteriores, incluido Ehrenberg (1838), generalmente creyeron que los rotíferos eran hemarofroditas. Este fue el resultado de un error generalizado para reconocer o detectar a los machos de los rotíferos, lo que dio lugar a anecdóticos intentos de identificar órganos reproductores masculinos en las hembras (véase en Birky y Gilbert, 1971). Esta confusión fue disipada por la descripción realizada por Brighwelli de la especie *Asplanchna brighwelli* (1848), en la cual se reconocía al macho de la especie, los órganos reproductores de ambos sexos, la oogénesis y la copulación, aunque sus observaciones y experimentos no fueron lo suficientemente extensivos como para demostrar la existencia de la partenogénesis. Posteriormente, en base a los estudios de dinámica de poblaciones realizados en *Brachionus urceolaris*, Cohn (1856) estableció correctamente el ciclo de vida de los rotíferos, el cual incluía la existencia de dos tipos de hembras. No obstante, fue Maupas (1890, 1891) quien desarrolló los experimentos de laboratorio necesarios con *Epiphanes senta* y quien demostró claramente la existencia de hembras amícticas, las cuales producen hijas por partenogénesis, y de hembras mícticas, las cuales producen machos por partenogénesis o, si son fecundadas, huevos durables latentes que eclosionan dando lugar a hembras amícticas. Este autor también mostró que las hembras amícticas pueden producir en su descendencia tanto hembras mícticas como amícticas, y que la proporción de hembras mícticas era marcadamente mayor cuando los individuos se mantenían en determinadas condiciones ambientales. En dicho trabajo, se presenta la primera sugerencia de que una señal o estímulo externo puede modificar el desarrollo embrionario y el modo de reproducción de las hembras de los rotíferos, y es el trabajo seminal del que arranca un extenso campo de investigación en el que se incluye el trabajo aquí presentado. Los trabajos subsecuentes han proporcionado la generalización de que existen tres tipos diferentes de ciclos vitales en los rotíferos, que se corresponden con las tres grandes subdivisiones del phylum Rotifera. La alternancia de reproducción sexual y asexual descrita por Maupas la presenta la clase Monogononta. En las especies de la clase Bdelloidea no se han encontrado machos y la reproducción es estrictamente

partenogenética. Por último, los rotíferos epibiontes marinos de la clase Seisonidea parecen ser estrictamente sexuales.

Explicar el papel y la determinación de la reproducción sexual en los partenogenéticos cíclicos tales como rotíferos y cladóceros ha cautivado a los biólogos durante mucho tiempo. Actualmente el problema se compone esencialmente de tres partes (Snell, 1987): (1) el porqué de la existencia del sexo y cómo es mantenido por selección natural en los ciclos vitales, (2) cuándo es el momento adecuado para que se produzca el cambio de la fase asexual a la fase sexual del ciclo vital, y (3) cuál debe ser la frecuencia y cantidad de reproducción sexual, puesto que partenogénesis y reproducción sexual pueden ocurrir de forma concomitante en estos organismos. A estas cuestiones añade complejidad la diversidad de los hábitats que ocupan los rotíferos monogonotes, ya que el patrón que presenten dependerá de las fuerzas selectivas ejercidas por el hábitat particular en el que el organismo ha vivido. Por ello, cualquier investigación que intente contestar a alguna de estas preguntas debe esforzarse por contextualizar sus respuestas, tomando como marco de referencia la diversidad orgánica y ecológica, intra o interespecífica, que presenta el grupo. Además, es preciso considerar también las consecuencias indirectas que una u otra estrategia de reproducción sexual pueda conllevar. La selección natural actúa en rasgos sometidos a una tupida red de relaciones y constricciones que pueden modificar la respuesta selectiva. Así, por ejemplo, la reproducción sexual puede suponer costos fisiológicos, costos de endogamia o de exogamia, costos demográficos, etc., que impliquen dicha modificación.

Varios autores han desarrollado explicaciones acerca de como el sexo persiste en estos ciclos vitales heterogónicos (e.g., Williams y Mitton, 1973; Williams, 1975; Maynard-Smith, 1978; Manning y Jenkins, 1980; Bell, 1982). El efecto de la frecuencia de la reproducción sexual y de la tasa de hembras que se reproducen sexualmente, en la producción de huevos sexuales y en el crecimiento de la población ha sido explorado por Snell (1987). El momento de la determinación de la reproducción sexual dentro del ciclo vital ha sido también examinado desde una variedad de perspectivas (e.g., Williams y Mitton, 1973; Williams, 1975; Gilbert, 1974; King, 1980; Bell, 1982; Snell y Boyer, 1988). El presente trabajo considera cuestiones relacionadas principalmente con cuál es el momento más adecuado para la reproducción sexual dentro del ciclo vital de los rotíferos partenogenéticos cíclicos y se centra en el estudio de la inducción de la reproducción sexual, los factores externos e internos relacionados, los fenómenos



asociados y las implicaciones de este modo de reproducción en el rotífero *Brachionus plicatilis*.

El trabajo se ha estructurado en tres partes, cada una de ellas compuesta por un número variable de capítulos. La primera parte se ocupa de las generalidades, y comprende los capítulos 2, 3, y 4. En el capítulo 2 donde se describe la especie objeto de estudio se introducen los aspectos generales de la reproducción en esta especie presentando su ciclo reproductivo clásico así como algunas excepciones al mismo. En este capítulo se describen también brevemente las características de las lagunas de procedencia de las poblaciones de laboratorio analizadas.

Los capítulos 3 y 4 se dedican a la metodología general empleada en el trabajo, describiéndose en cada uno de los restantes capítulos los aspectos metodológicos particulares, así como los diseños experimentales empleados en el estudio de los aspectos que tratan. En el capítulo 3 se hace una relación de los métodos de cultivo y los diferentes tipos de cultivos utilizados para el desarrollo del trabajo. En el capítulo 4 se describe la metodología de carácter bioquímico, la cual ha tenido una gran relevancia en el desarrollo del estudio (análisis de diferencias intraespecíficas, caracterización del envejecimiento, y diferenciación de hembras míticas y amíticas). Se ha dedicado un capítulo independiente a estas técnicas porque su uso no se limitó a una mera aplicación de los protocolos, sino que el desarrollo y ajuste de estos métodos ha constituido una parte importante del trabajo y por ello se ha considerado interesante una descripción minuciosa de las técnicas desarrolladas. Se han incluido comentarios y advertencias acerca del uso de las mismas, ya que podrían constituir aportaciones metodológicas interesantes en la aplicación de estas técnicas y en su adecuación a otras situaciones y necesidades experimentales.

Antes de realizar una generalización de las propiedades ecológicas de una especie es necesario establecer la cantidad de variación, heredable o no, dentro y entre poblaciones. Los individuos pertenecientes a la misma población o especie pueden diferir entre sí debido a la variación genética individual, diferencias en edad, sexo, alimentación, estado del ciclo vital, forma corporal, hábitat, enfermedades, daños accidentales y parasitismo (Ferguson, 1980). En consecuencia, previo al estudio de la inducción de la reproducción sexual en diferentes poblaciones de laboratorio llevado a cabo en la parte tercera, la segunda parte, compuesta de los capítulos 5 y 6, estudia respectivamente la variabilidad intraespecífica genética y la debida a la edad –dos factores presumiblemente implicados en la mixis– mediante el análisis electroforético de proteínas totales, en la especie *Brachionus plicatilis*. La utilización de dicho análisis

electroforético permite, además, poner en relación los resultados de la segunda parte con el estudio de las diferencias entre hembras míticas y amíticas, llevado a cabo en la parte tercera por el mismo método. El capítulo 5 aborda el estudio de la variabilidad intraespecífica con el fin de evaluar la variación genética existente entre diferentes poblaciones de laboratorio, estableciéndose una caracterización de las mismas para su estudio en posteriores capítulos. Los resultados se discuten comparándolos con los de otros estudios anteriores de esta misma especie. También se discuten otros aspectos colaterales relativos al uso del análisis de proteínas totales con fines sistemáticos. El capítulo 6 estudia la variabilidad intraespecífica de origen fisiológico debida a la edad de los individuos. Tiene como objeto la caracterización bioquímica del envejecimiento de los individuos estableciendo una relación entre su edad fisiológica y el perfil de proteínas totales. Los resultados se relacionan con algunas de las teorías fisiológicas y evolutivas del envejecimiento.

En la tercera parte se abordan los objetivos principales del trabajo, con el estudio de la inducción de la fase sexual en el rotífero *Brachionus plicatilis*. Esta parte comprende los capítulos 7, 8, 9 y 10. El capítulo 7 intenta ofrecer una síntesis de las aproximaciones empíricas y teóricas al problema de la mixis en los rotíferos partenogenéticos cíclicos, y se centra en los factores relacionados con el control de la mixis y su posible significado ecológico desde el punto de vista de la adaptación y de la evolución. Este capítulo incluye una revisión bibliográfica de los estudios de laboratorio sobre los factores que controlan la producción de hembras míticas en los rotíferos monogonotes, la primera consecuencia que aparece tras la inducción de la mixis. Se incluyen también en la revisión los estudios de campo acerca de la incidencia de la reproducción sexual en las poblaciones naturales. Además, se ofrece una visión de las diferentes aproximaciones y planteamientos teóricos utilizados en la interpretación del significado ecológico y adaptativo del momento de la reproducción sexual en los ciclos vitales de los rotíferos, y de los posibles estímulos implicados en su inducción. Finalmente estas aproximaciones y criterios se integran en un modelo teórico de naturaleza cuantitativa que se describe en este capítulo y es utilizado en una serie de simulaciones con el objeto de predecir el momento óptimo para la inducción de la reproducción sexual en los rotíferos partenogenéticos cíclicos que ocupan hábitats variables en el tiempo.

El capítulo 8 estudia el efecto de la densidad de población sobre la producción de hembras míticas en poblaciones clónicas de laboratorio. En él se compara la respuesta mítica a la densidad de algunas de las cepas caracterizadas electroforéticamente en la

segunda parte de este trabajo, y se incluyen en la comparación otras cepas de origen remoto y cepas derivadas mediante huevos sexuales de una de las poblaciones de laboratorio. El diseño experimental es multifactorial, y junto al efecto del factor densidad de población se evalúa la importancia de los factores internos genotipo y edad en la respuesta mítica de las hembras de *Brachionus plicatilis*.

En el capítulo 9 se aborda el estudio del mecanismo de acción de la densidad de población sobre la mixis. Para ello se utiliza una aproximación metodológica consistente en probar la capacidad de inducción de la respuesta sexual en las hembras de *Brachionus plicatilis* de un medio de cultivo previamente condicionado por el crecimiento de una población de rotíferos en él. Además, para evaluar el grado de especificidad de la respuesta, ésta se compara con la obtenida para un medio precondicionado por otros organismos diferentes a los rotíferos. También se discuten las posibles relaciones entre densidad y mixis que sugieren conjuntamente los resultados experimentales y los datos de las simulaciones realizadas con el modelo descrito en el capítulo 7.

En el capítulo 10 se analizan las implicaciones fisiológicas de la reproducción sexual en los rotíferos partenogenéticos cíclicos mediante una comparación de las diferencias fisiológicas y de los rasgos vitales que presentan los dos tipos de hembras, míticas y amíticas, de una población clónica de laboratorio, y que por lo tanto sólo difieren en su comportamiento reproductivo. Las diferencias en los rasgos vitales entre ambos tipos de hembras se evalúan mediante análisis demográfico utilizando para ello datos sobre dinámica de poblaciones recopilados y cedidos por M. Serra. El estudio se completa con el análisis de las diferencias fisiológicas determinadas mediante la comparación de los patrones de proteínas totales de hembras míticas y amíticas, haciendo uso de la técnica electroforética ya empleada en capítulos precedentes. Los resultados del análisis de proteínas totales se interpretan en base a los obtenidos en el estudio sobre el envejecimiento individual realizado en el capítulo 6. Las diferencias en los patrones demográficos y proteínicos existentes entre hembras míticas y amíticas se discuten en relación con las teorías propuestas dentro del marco de la fisiología ecológica.

Por último, en el capítulo 11, se presenta la conclusión del trabajo donde se lleva a cabo una breve discusión de carácter general de los resultados obtenidos, y de las implicaciones y conexiones causales de estos resultados con nuevas perspectivas en el campo de la biología sexual de los rotíferos. Como final se sintetizan las principales conclusiones del trabajo.

PARTE PRIMERA: MATERIAL Y MÉTODOS. GENERALIDADES

La primera parte de este trabajo se ocupa de aspectos preliminares. El capítulo 2 hace una descripción de la especie estudiada y de las áreas geográficas de muestreo de donde proceden las poblaciones clónicas de laboratorio que se han analizado. Los capítulos 3 y 4, dedicados a la metodología de índole general utilizada en el conjunto del trabajo, describen respectivamente los métodos de cultivo y las técnicas bioquímicas empleadas.

2. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE. ORIGEN GEOGRÁFICO DE LAS CEPAS

2.1. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

Taxonomía

Los rotíferos han sido incluidos por algunos autores como una clase en el phylum Asquelmintos (Koste, 1978; Koste y Shiel, 1987), pero más comúnmente se consideran como un phylum (p.e., Edmondson, 1959; Wallace y Snell, 1991). En este último caso, el grupo conocido como asquelmintos no recibe estatus de taxon.

El rotífero *Brachionus plicatilis* Müller 1786 (sinónimos: *B. mülleri* Ehreberg 1834, *B. hepatolomeus* Gosse 1851 y *B. orientalis* Rodewald 1937) es un miembro de la familia Brachionidae, la mayor de las pertenecientes al orden Ploimida (clase Monogononta, phylum Rotifera).

Algunos autores consideran que el concepto clásico de especie biológica no puede ser aplicado de forma estricta a los rotíferos monogonontes, ya que sus ciclos vitales implican una alternancia de generaciones partenogenéticas y sexuales, existiendo un predominio, en muchos de ellos, de la modalidad de reproducción partenogenética. Por esto, Ruttner-Kolisko (1974) optó con respecto a la taxonomía de los rotíferos por el uso del concepto de especie como especie evolutiva (Simpson, 1961). Así la mayor parte de los trabajos taxonómicos recientes evitan el uso del término especie y agrupan a *Brachionus plicatilis* y las formas semejantes a él como ecotipos dentro de un grupo ("Formenkreiss") (Kutikova, 1970; Ruttner-Kolisko, 1974; Koste, 1978). Ruttner-Kolisko clasifica a *B. plicatilis* junto con otros *Brachionus* (*B. urceolaris* Müller 1773, *B. sessilis* Varga 1951, *B. rubens* Ehreberg 1838, entre otros) en el "Formenkreiss" *urceolaris*. Una clasificación semejante es la propuesta por Koste (1980): "Formenkreiss" *urceolaris*, grupo de especies *plicatilis*. No obstante, Koste y Ruttner-Kolisko coinciden en señalar que la morfología de *B. plicatilis* está claramente diferenciada de la de las restantes especies, siendo su rasgo más característico la presencia de cuatro lóbulos en la parte anterior de la placa ventral de la lorica. *B. plicatilis* muestra una gran variabilidad en cuanto a su tamaño y morfología (Kutikova, 1970; Koste, 1980; Sudzuki, 1987) tal y como cabía esperar de un organismo tan tolerante a las variaciones ambientales, y con una distribución tan amplia.

A pesar de las consideraciones anteriores, recientemente, Snell (1989) ha propuesto como válida la aplicación del concepto de especie biológica al grupo de los

monogonotes debido a que considera los episodios de sexualidad como un rasgo importante de su ciclo vital, y a la existencia de mecanismos efectivos de aislamiento reproductivo que permiten discriminar entre especies estrechamente relacionadas de forma absoluta y consistente con este concepto de especie.

Distribución y ecología

El rotífero *Brachionus plicatilis* es un organismo planctónico que habita preferentemente en ambientes atalasoalinos de elevada alcalinidad (Margalef, 1955; Pejler, 1974; Walker, 1981; Hammer, 1986), siendo frecuente su presencia en lagunas endorreicas (Margalef, 1955), aunque también lo es en lagunas litorales salobres (Bérsins, 1960). *Brachionus plicatilis* se ha encontrado en todas las regiones biogeográficas excepto en la Antártida (Pejler, 1977a), siendo más frecuente en aguas subtropicales. Su distribución cosmopolita sugiere un eficiente mecanismo de dispersión por lo que su presencia en el zooplancton de una localidad depende fundamentalmente de que las condiciones ambientales le resulten tolerables y de su eficacia bajo los distintos factores ecológicos.

Brachionus plicatilis ha sido observado en amplios rangos de los principales parámetros físico-químicos, caracterizándose como eurihalino y politérmico (Walker, 1981). Puede vivir en un rango de salinidad que va, como mínimo, desde 1 g/l hasta 97 g/l (Ito, 1956, 1960) y soporta ascensos bruscos de los valores de este parámetro (Epp y Winston, 1977). Su eurihalinidad viene dada por su capacidad de tolerar variaciones considerables de la concentración de solutos en sus fluidos corporales, lo cual le caracteriza como un organismo osmoconformador (Epp y Winston, 1977).

Las temperaturas a las que ha sido observado en la naturaleza, registradas en la literatura, varían entre un mínimo de 5°C (Walker, 1973) hasta un máximo de 30°C (Yúfera, 1982). Por otro lado, su tolerancia a las altas salinidades indica que posee cierta tolerancia a las bajas concentraciones de oxígeno (Walker, 1981).

Etología alimentaria

Por su función trófica, *B. plicatilis* es un organismo filtrador, que crea una corriente mediante su corona ciliada para atraer las partículas de las cuales se alimenta. En general, se acepta que se trata de un organismo polífago, poco selectivo, habiéndose citado una gran variedad de tipos de alimento (para referencias véanse, p.e., Ito e Iwai,

1957; Ito, 1960; Hirata y Mori, 1967; Theilaker y McMaster, 1971; Hirayama y Watanabe, 1973; Pourriot, 1977; entre otros). Sin embargo, es posible que realice una selección por el tamaño y por la actividad de las partículas que captura (Chotiyaputta e Hirayama, 1978). Hino e Hirano (1980) encontraron que el tamaño de partículas que puede ingerir oscila entre 2 y 28 μm .

Descripción morfológica. Anatomía

Los rotíferos son organismos pseudocelomados de tamaño microscópico. Son notables entre los metazoos por su pequeño tamaño; su longitud oscila en un rango de 40 a 2000 μm no superando la mayoría los 500 μm . Normalmente no son mayores que los protozoos, pero dentro de este tamaño tan reducido poseen una organografía animal casi completa. Su organización celular es fundamentalmente sincitial (Clément, 1977) y su desarrollo eutélico, es decir toda la actividad mitótica tiene lugar durante la embriogénesis, no produciéndose regeneración celular en el organismo adulto (Ruttner-Kolisko, 1974; Barrows y Kokkonen, 1985).

El cuerpo de *Brachionus plicatilis* puede dividirse en una breve región anterior o cabeza, un tronco largo, y un apéndice posterior llamado pie terminal.

La cabeza lleva la corona u órgano rotatorio con función locomotora y de captura del alimento. Este aparato ciliado es común a todos los rotíferos y da nombre al grupo. Debido a la forma característica en que baten sus cilios, da la impresión de una rueda que gira, y de ahí el nombre de rotíferos o "portadores de ruedas". Mediante la acción de un músculo retractor, la cabeza puede invaginarse en el tronco.

El tronco está protegido por un caparazón escleroproteínico, o loriga, formado en *Brachionus* por dos placas, una dorsal y otra ventral que se encuentran soldadas lateralmente. Ambas placas presentan prolongaciones y dentaciones en sus bordes, así como ornamentaciones externas; estos caracteres tienen valor taxonómico.

El pie, anillado, puede retraerse telescópicamente en el interior del tronco. Su forma es alargada, y termina en dos prolongaciones (dedos), en cada una de las cuales se abre una glándula (glándula pedia) que secreta una sustancia cementante, de forma que el rotífero puede fijarse temporalmente al sustrato.

Cuando el animal contrae la cabeza y el pie, puede observarse más claramente la forma de la loriga, cuya longitud oscila típicamente entre 125 y 315 μm (Walker, 1981). *Brachionus plicatilis* se caracteriza por presentar 6 prolongaciones agudas o espinas de aspecto y longitud variable en el borde anterior de la placa dorsal, y cuatro lóbulos más

o menos pronunciados en el borde anterior de la placa ventral de la loriga. La presencia de estos cuatro lóbulos es la característica más claramente definitoria de la especie, tal y como se ha indicado anteriormente. La morfología de la loriga esta sujeta a variación, lo que se ha usado para el establecimiento de formas taxonómicas.

La figura 2.1 muestra la organización anatómica de *B. plicatilis*, la cual se describe brevemente a continuación.

La pared del cuerpo es transparente y está formada por una cutícula, un tegumento sincitial y un sistema de músculos subepidérmicos. El citoplasma del tegumento sintetiza la cutícula, de naturaleza proteino-polisacarídica (Clément, 1969). El tegumento posee una lámina intracitoplasmática de naturaleza escleroproteínica que forma el exoesqueleto del rotífero. La estructura de esta lámina en el género *Brachionus* consiste en la yuxtaposición de estructuras tubulares verticales (Clément, 1977). Debido a las propiedades químicas que presenta, se piensa que esta lámina está constituida por un material escleroproteínico semejante a la queratina (Bender y Kleinow, 1988). El grosor de la lámina intracitoplasmática varía en las diferentes partes del cuerpo y aumenta con la edad del animal. La lámina es especialmente gruesa en el tronco, donde forma la llamada loriga, adelgazándose en el pie, principalmente en las articulaciones de los segmentos anulares que permiten la retracción telescópica del mismo. La placa intracitoplasmática del tegumento que cubre la parte anterior del animal es muy tenue permitiendo la contracción del animal por invaginación de esta parte en el tronco.

El tegumento de la cabeza presenta además una ciliación característica que constituye el aparato rotatorio. En *Brachionus plicatilis* este aparato presenta un campo bucal ciliado bien desarrollado que tiene forma de embudo y en cuyo vértice se encuentra la boca. Los bordes supraorales del campo bucal se extienden formando tres lóbulos provistos de cirros dispuestos en penachos que constituyen el llamado pseudotroco, el cual limita parcialmente el campo bucal. El borde de la cabeza presenta cinco lóbulos poco marcados en los que se inserta una banda ciliada o cingulo, cuyos cilios baten metacrónicamente. Este conjunto constituye la corona externa (véase la figura 2.2). El cingulo y el pseudotroco, que sobresale centralmente, delimitan una zona desnuda denominada campo apical, muy reducida en el género *Brachionus* (Koste y Shiel, 1987). En él se observan órganos sensoriales mecánicos (sedas) y químicos (fosetas vibrátiles).

Al sincitio del tegumento se encuentran vinculados numerosos órganos glandulares, en particular las glándulas pedias.

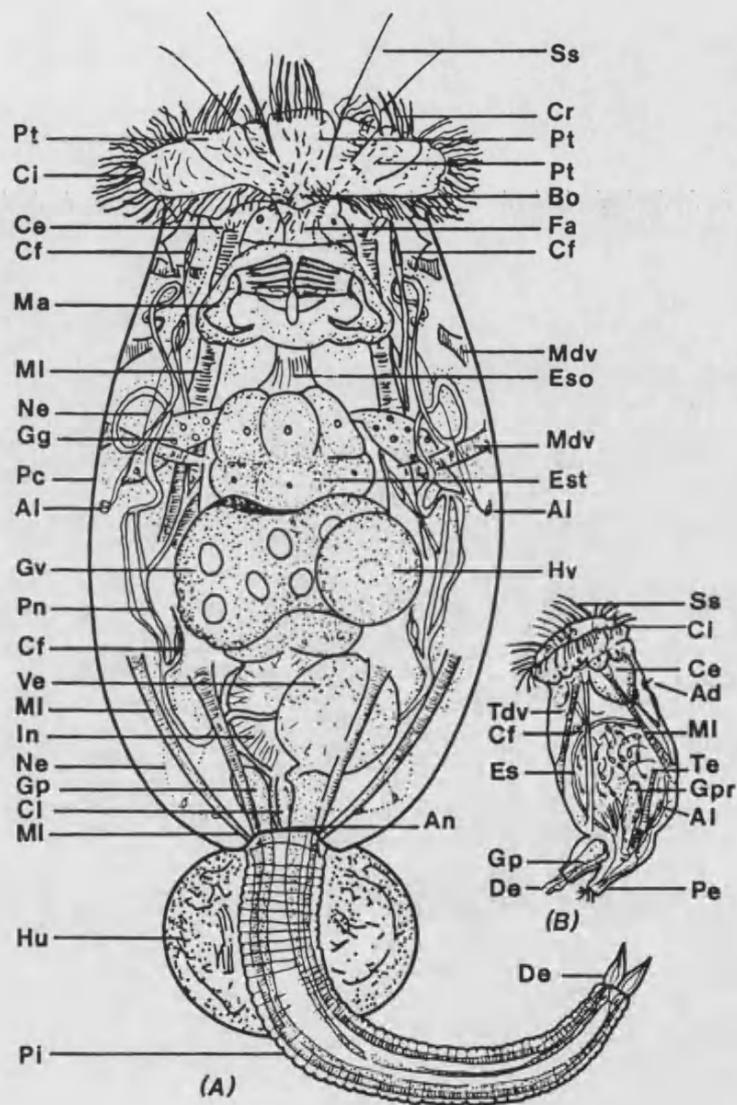


Figura 2.1. Brachionus plicatilis: (a) hembra, aspecto ventral; (b) macho, aspecto lateral. Ad, antena dorsal; An, ano; Al, antena lateral; Bo, boca; Ce, cerebro; Cf, célula flamígera; Ci, cíngulo; Cl, cloaca; Cr, cirro; De, dedo; Es, espermatozoides; Eso, esófago; Est, estómago; Fa, faringe; Gg, glándula gástrica; Gp, glándula pedal; Gpr, glándula prostática; Gv, germovitelario; Hu, huevo; In, intestino; Ma, mástax; MI, músculo longitudinal; Ne, nervio; Ss, seda sensitiva; Pc, pared del cuerpo; Pe, pene; Pi, pie; Pn, protonefridio; Pt, pseudotroco; Tdv, tubo digestivo vestigial; Te, testículo; Ve, vesícula. (Tomada de Serra, 1987; a su vez modificada a partir de Koste, 1980).

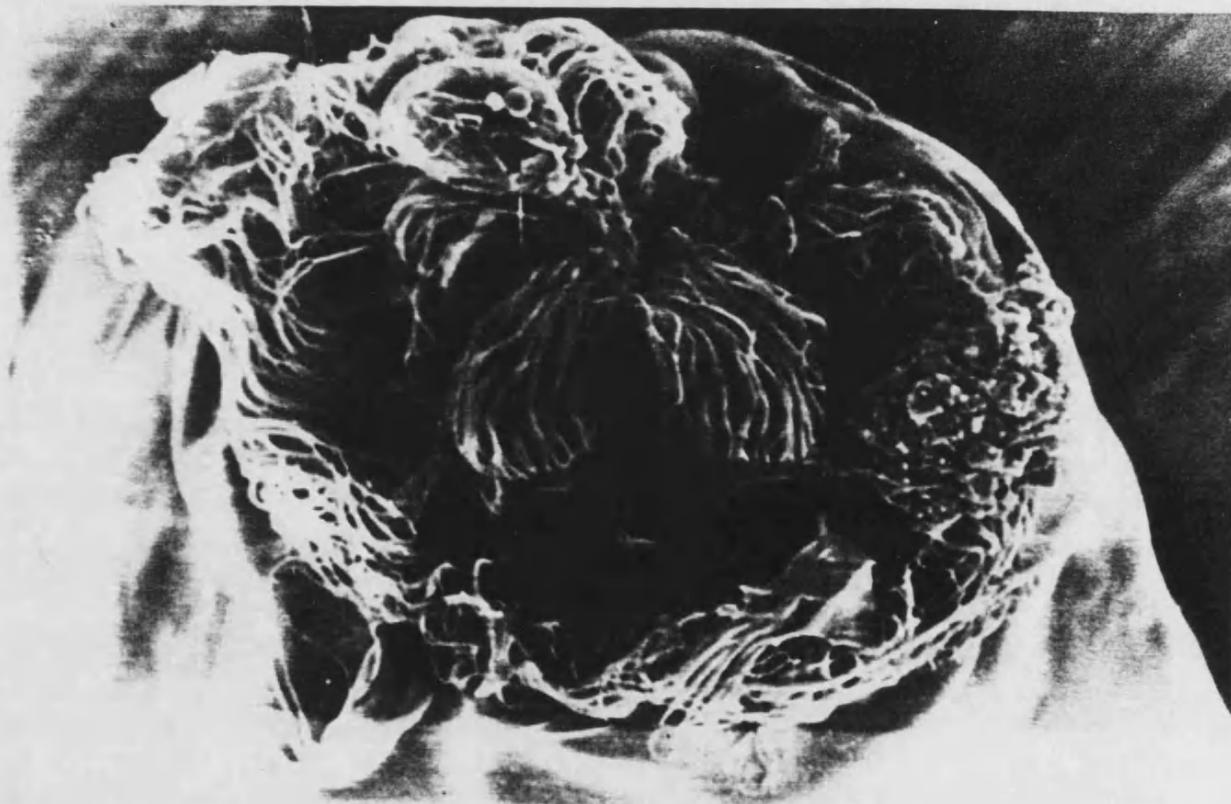


Figura 2.2. Fotografía al m.e. de barrido del aparato rotatorio de *Brachionus plicatilis*. La barra horizontal equivale a 10 μm . (Servicio de Microscopía Electrónica de la Universitat de València)

La musculatura de los rotíferos está constituida por dos tipos de músculos: los músculos viscerales que se extienden a lo largo del tubo digestivo y rodean otros órganos internos; y los músculos esqueléticos que controlan la forma del cuerpo, el movimiento y el desplazamiento espacial del animal. La musculatura esquelética no está constituida por masas continuas sino por pequeños músculos de fibra lisa o estriada orientados circular o longitudinalmente y constituidos por una o dos células (véase Clément y Amsellem, 1989). La cavidad visceral está atravesada por músculos longitudinales que se insertan en la pared del cuerpo y forman dos grupos: los músculos retractores cefálicos (dos pares: retractores dorsales y retractores centrales) y los retractores pédicos (un par). Cada músculo está adaptado de forma muy precisa para desempeñar un papel concreto en la conducta del organismo.

No existe cubierta dermomuscular, ni endotelio peritoneal mesodérmico. La cavidad corporal no es un celoma, sino el equivalente a un blastocele. En esta cavidad pseudocelomática se encuentran el sistema digestivo, el sistema nervioso y el germovitelario.

El *sistema digestivo* del animal se abre en una boca situada ventralmente en el llamado campo bucal, entre el cíngulo y el pseudotroco. El conducto bucal es ciliado y se encuentra separado de la faringe por un velo tenue que impide el retroceso del alimento ingerido. En la cara ventral de la faringe, y alojado en una invaginación del tubo digestivo que forma una especie de bolsa blanda o buche, se encuentra el mástax o aparato masticador. Característico de todos los rotíferos, está constituido por un conjunto de piezas duras quitinosas que se encuentran siempre en movimiento gracias a la presencia de una musculatura muy desarrollada. *Brachionus plicatilis* posee un tipo de mástax poco especializado, el denominado maleado. Las paredes de la cámara donde se encuentra el mástax contienen glándulas salivares que producen secreciones que van al interior de la misma, así como sensores nerviosos. La faringe va seguida de un corto esófago ciliado que desemboca en el estómago. El estómago es un saco ciliado constituido por un número constante de células y rodeado de una delicada malla de músculos longitudinales y circulares. En su interior desembocan un par de glándulas gástricas (Clément, 1977) que segregan enzimas para la digestión, la cual es extracelular. Un intestino globoso, corto, de paredes sincitiales, finas y densamente ciliadas, sigue al estómago, y se abre en la base del pie en una cloaca dorsal, en la que también desembocan el oviducto y la vejiga (Beaumont y Cassier, 1981). Existe un esfínter pilórico que separa el estómago del intestino.

El *aparato excretor* es protonefridial y está constituido por dos conductos principales ramificados, situados a cada lado del cuerpo, cuyos canales secundarios terminan en células flamígeras que realizan una función filtradora; el género *Brachionus* presenta 4 células terminales en cada conducto (Koste y Shiel, 1987). Los conductos de los protonefridios desembocan en una vejiga ventral, voluminosa en *Brachionus plicatilis*, que se contrae rítmicamente y expulsa las excretas. Los protonefridios, además de eliminar las sustancias de excreción, tienen un papel osmorregulador.

Los rotíferos no poseen ni aparato circulatorio, ni aparato respiratorio.

La parte central del *sistema nervioso* es una masa más o menos bilobulada, el cerebro, que se sitúa en posición dorsal con respecto al mástax. De él parten un par de nervios faríngeos que inervan la pared del mástax, formando un plexo nervioso en el que destaca el ganglio del mástax; y un par de nervios longitudinales que llegan hasta el pie y presentan numerosos ganglios en su trayecto (Wallace y Snell, 1991). Los músculos y órganos sensoriales de la región apical se encuentran inervados por nervios que parten directamente del cerebro. El sistema nervioso de estos organismos presenta como característica notable la clara separación entre elementos sensoriales y motores.

Entre los *órganos sensoriales* cabe destacar unas protuberancias dotadas de sedas táctiles denominadas antenas. En *Brachionus* existe una antena dorsal, situada en la cabeza, entre las espinas medias dorsales, y dos antenas laterales en la parte media anterior de la loriga. Otra estructura sensorial importante es una mancha ocular u ojo cerebral que aparece en posición anterodorsal. Ito e Iwai (1957) han descrito una serie de respuestas fototácticas y geotácticas en *B. plicatilis* que ponen de manifiesto la capacidad de su sistema nervioso para coordinar este tipo de reacciones. Existen además numerosos quimiorreceptores y sensores táctiles situados en su mayor parte en el campo apical.

En el *aparato reproductor* o germovitelarario existe una clara disociación entre la función germinativa y la vitelogénica. La gónada es bilobulada y con una porción ovárica y otra vitelógena, ambas envueltas por una membrana que se continua en un oviducto el cual desemboca en la cloaca. En las hembras de *Brachionus plicatilis* existen glándulas sexuales accesorias que segregan un material que adhiere el huevo al cuerpo de la madre tras su salida al exterior (Sudzuki, 1957).

El dimorfismo sexual en *Brachionus plicatilis* es notable. El macho es un organismo efímero, de dimensiones reducidas (su longitud varía entre un tercio y un cuarto de la longitud de la hembra). Su forma es cónica, menos oblonda que la de la hembra, y su organización está muy simplificada. Carece de loriga, presentando su

aparato rotatorio una única corona ciliada con función locomotora. En el campo apical sólo existen algunas sedas sensoriales. En la parte posterior del cuerpo se observa un pie muy corto que se encuentra desplazado lateralmente por un voluminoso pene situado en posición terminal. El tubo digestivo del macho está atrofiado, desprovisto de cloaca y ano, encontrándose la cavidad del cuerpo casi completamente ocupada por un gran testículo con un espermiducto ciliado que se encuentra flanqueado por dos masas glandulares (glándulas prostáticas) y que desemboca en un gonoporo situado en la extremidad del pene. En el testículo existen espermatozoides con una morfología similar a la típica de estas células. En *Brachionus plicatilis* el testículo presenta entre 40 y 200 espermatozoides (Gilbert, 1983a); junto a ellos se encuentran unas formaciones bastonoides que al parecer son estructuras derivadas de células germinales atípicas (Clément, 1977; véase también Gilbert, 1983a) y no una forma especial de espermátidas como se pensó en un principio. El macho posee aparato excretor y cerebro.

Reproducción

El ciclo reproductivo de *B. plicatilis* presenta las características generales del ciclo de los rotíferos monogonotes (figura 2.3), el cual ha sido especialmente estudiado en los géneros *Asplanchna* y *Brachionus* (King y Snell, 1977a, 1977b; Gilbert y Litton, 1978; Ruttner-Kolisko, 1983; Lubzens *et al.*, 1985).

Los rotíferos monogonotes son organismos partenogénéticos cíclicos heterogónicos que presentan un ciclo de vida caracterizado por la alternancia de periodos de reproducción asexual, en ausencia de machos (fase amíctica), y periodos de reproducción sexual (fase mítica del ciclo). Durante los periodos de reproducción asexual, las hembras amícticas diploides siempre producen huevos diploides mitóticos, que transportan adheridos a su cuerpo. Estos huevos que durante su maduración han experimentado una única división ecuacional formando un único cuerpo polar, se desarrollan partenogénicamente en hembras (partenogénesis ameiótica o apomixis; Birky y Gilbert, 1971; Ruttner-Kolisko, 1974; Gilbert, 1983a). La mayor parte del ciclo biológico de estos rotíferos transcurre en la fase asexual, pero bajo el estímulo de determinados factores internos y externos la reproducción sexual tiene lugar de forma concomitante. El mecanismo de inducción de la producción de hembras míticas no está bien determinado, y aunque se ha puesto en relación tanto con factores externos como internos (Gilbert, 1977a; Pourriot y Clément, 1981; Pourriot y Snell, 1983; Hino y

Hirano, 1984; Lubzens *et al.*, 1980, 1985; Snell, 1986; Lubzens y Minkoff, 1988; para una revisión del tema, veáse más adelante el capítulo 7), el estímulo que desencadena el inicio del ciclo sexual se desconoce todavía.

Los periodos de reproducción sexual se inician cuando después de recibir el estímulo adecuado, las hembras amícticas comienzan a producir hembras mícticas entre su descendencia. La proporción de hembras mícticas y la duración de su producción dependen de la intensidad del estímulo místico recibido.

En los rotíferos de la familia Brachionidae se acepta que el momento de la determinación del tipo de hembra (mística o amíctica) ocurre antes de que el huevo salga de la cavidad corporal materna (Shull, 1912; Buchner, 1941a; Ruttner-Kolisko, 1964), probablemente durante el proceso de maduración y crecimiento de los oocitos. Las hembras mícticas, morfológicamente indistinguibles de las hembras amícticas en el género *Brachionus*, producen huevos que experimentan divisiones meióticas durante su maduración dando lugar a la formación de dos cuerpos polares. Estos huevos místicos haploides, si no son fecundados, se desarrollan partenogenéticamente en machos. Cuando los huevos haploides son transportados por las hembras se distinguen fácilmente de los huevos diploides por su menor tamaño (figura 2.4). Tan pronto como aparecen los primeros machos en la población puede producirse la fecundación de las hembras mícticas. El apareamiento se produce mediante una firme adhesión del aparato copulador del macho a la pared corporal de la hembra. La inseminación tiene lugar mediante impregnación (fecundación) hipodérmica, desconociéndose el mecanismo por el cual el esperma atraviesa el tegumento de la hembra (Gilbert, 1983b). Es posible que las formas bastonoides existentes en el testículo de macho desempeñen una función importante en la perforación del tegumento (Clément, 1977; Ruttner-Kolisko, 1983). La fecundación se realiza preferentemente en las zonas del cuerpo de donde parte el pie o la corona ciliada, en las cuales el tegumento es más delgado. Además la fertilización del huevo se produce solamente cuando el macho se aparee con hembras mícticas muy jóvenes (de unas horas de vida) ya que su susceptibilidad de fecundación disminuye con la edad (Buchner *et al.*, 1967; Ruttner-Kolisko, 1983; Snell y Childress, 1987).

La copulación depende del reconocimiento por parte del macho, vía quimiorrepción, de las hembras de su misma especie (Gilbert, 1963a). El factor de reconocimiento en *Brachionus plicatilis* es una glicoproteína localizada en mayor concentración en los lugares de la superficie corporal de la hembra favorables para la penetración, y cuyos receptores específicos en el macho se encuentran localizados fundamentalmente en la corona y el campo bucal (Snell 1988; Snell y Nacionales,

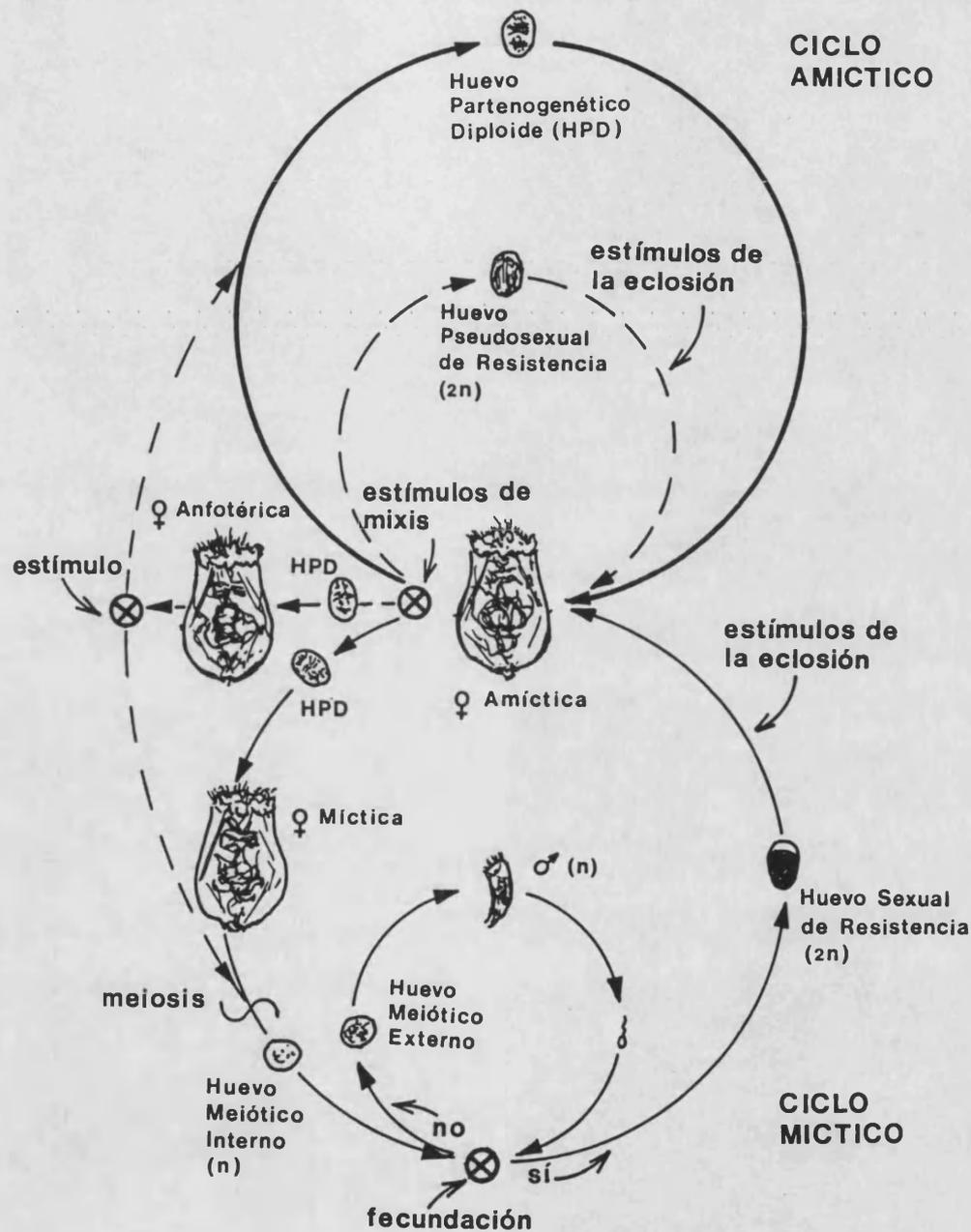


Figura 2.3. Ciclo reproductivo de los rotíferos monogonontes (tomado de Serra, 1987). Las líneas de trazo continuo indican los fenómenos observados en la generalidad de estos organismos y el grosor de la línea denota la mayor frecuencia de algunos procesos. Las líneas discontinuas representan los ciclos hipotéticos u observados sólo en algunos géneros. Los puntos en donde pueden darse diferentes alternativas se representan mediante el símbolo de llave (círculo con aspa).

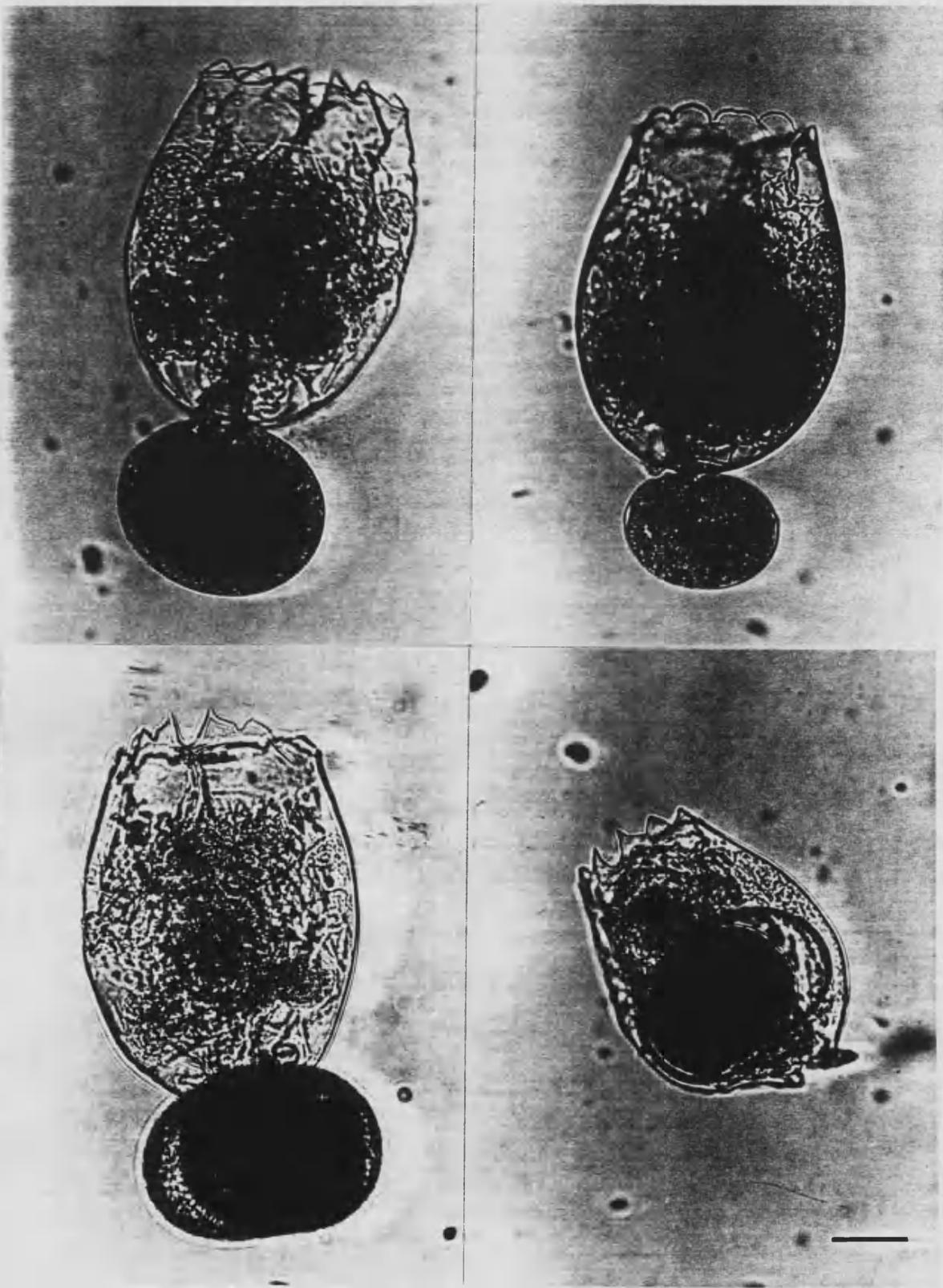


Figura 2.4. Microfotografías de cuatro hembras ovígeras de *Brachionus plicatilis*: hembra amíctica (superior izquierda), hembra mítica no fertilizada portando huevos de macho (superior derecha), y hembras míticas con huevo durable, externo (inferior izquierda) e interno (inferior derecha). La barra horizontal equivale a 50 μm .

1989). Si los huevos haploides todavía dentro de la hembra mítica son fecundados, dan lugar a embriones latentes enquistados denominados huevos durables (Gilbert, 1974). Estos huevos diploides, los únicos de origen sexual que aparecen en el ciclo, poseen una cubierta endurecida, son más oscuros y grandes que los huevos partenogénicos, y en uno de sus extremos presentan una cámara clara en forma de casquete (figura 2.4). Los huevos durables pueden ser transportados fuera o dentro del cuerpo de la hembra; en este último caso son liberados tras la muerte de la madre (Okauchi y Fukuso, 1985a; Serra, 1987). Los huevos de resistencia pueden soportar condiciones adversas –p.e., desecación– durante largos periodos de tiempo. Después de un periodo de latencia que varía en función de las especies, los huevos durables responden a señales específicas para cada especie (Gilbert, 1974; Pourriot y Snell, 1983), y eclosionan dando lugar a hembras diploides amíticas que entran de nuevo en la fase asexual del ciclo.

El esquema general del ciclo heterogónico de los rotíferos monogonotes que se ha descrito arriba presenta variaciones en algunos géneros, así como algunos aspectos poco documentados. En primer lugar, los machos no han sido vistos nunca en muchas especies de monogonotes (Dumont, 1983; Rao y Sarma, 1985), algunas de las cuales son de cultivo común. También algunas poblaciones de laboratorio de especies bisexuales sólo se reproducen asexualmente (Wesemberg-Lund, 1930; Ruttner-Kolisko, 1974). La detección de machos en los estudios de campo requiere largos programas de muestreo con frecuentes observaciones (Carlin, 1943; King y Snell, 1980), dada la naturaleza efímera de la reproducción sexual en las poblaciones naturales de rotíferos. Por otra parte, el desconocimiento de los factores específicos que provocan el cambio en el modo de reproducción, y la posible pérdida del potencial mítico con el cultivo en el laboratorio documentada por algunos autores (Ruttner-Kolisko, 1985; Buchner, 1987) convierten casi en impredecible la detección de machos en los cultivos de laboratorio. No obstante, la reproducción sexual ha sido comúnmente observada en cultivos de laboratorio de muchas especies, por ejemplo las de los géneros, *Asplanchna* y *Brachionus*, especialmente cuando el aislamiento a partir del campo es reciente, siendo la reproducción sexual un rasgo importante de su ciclo vital (Snell, 1989).

En segundo lugar, se ha descrito la existencia de huevos pseudosexuales –es decir huevos de resistencia no fertilizados (Ruttner-Kolisko, 1974; King, 1980; Ruttner-Kolisko, 1983)–, hecho que implica que no basta la observación de huevos durables, sino que deben ser observados los machos para la confirmación de la reproducción sexual en algunas especies.

En tercer lugar, además de los dos tipos de hembras (mícticas y amícticas) descritas clásicamente en los monogonontes, se ha observado y estudiado la existencia de un tercer tipo, la hembra anfotérica, capaz de producir huevos mícticos y amícticos. Estas hembras, que aparecen con una frecuencia muy baja, se han observado en algunas poblaciones de los géneros *Asplanchna*, *Sinantherina* y *Conochiloides* (Champ y Pourriot, 1977; Ruttner-Kolisko, 1977; Snell y King, 1977) y constituyen una importante excepción al esquema clásico del ciclo de vida de los rotíferos monogonontes.

Por último, algunos aspectos citológicos de la partenogénesis en los rotíferos permanecen poco estudiados. Aunque la haploidía de los huevos mícticos está apoyada por los primeros estudios citológicos (Shull, 1921; Whitney, 1929), la haploidía vegetativa de los machos se ha establecido de forma directa sólo para dos especies de *Asplanchna* (Robotti, 1975; Jones y Gilbert, 1976).

2.2. ORIGEN GEOGRÁFICO DE LAS CEPAS

Los lugares de origen de las cepas empleadas en el presente trabajo se muestran en la figura 2.5. Se trata de un conjunto de lagunas que se extienden a lo largo del litoral mediterráneo español, desde Almería hasta Gerona, a excepción de La Celadilla que se encuentra en el interior. En cuanto a la cepa cedida por el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, fue aislada en el marjal contiguo a dicho instituto. La situación geográfica de dicho centro se señala también en la figura 2.5.

A continuación se describe brevemente la situación y morfología de cada una de las lagunas enumerándolas según su localización en el litoral siguiendo la dirección Sur-Norte.

Lagunas de Almería (1-4). La Albufera Nueva (1) y la Albufera Honda (2) de Adra pertenecen a un mismo sistema. Están rodeadas de invernaderos y sometidas a vertidos de deshechos agrícolas y aterramientos. Su configuración actual corresponde a remodelaciones de una zona lagunar mucho más amplia en el pasado. La Albufera Nueva apareció durante el presente siglo (década de los años 30) como consecuencia de riadas que cerraron una pequeña ensenada. Tiene forma alargada paralela a la costa, siendo sus dimensiones de unos 900 m de largo por 350 de ancho según López (1983). Su profundidad máxima es de 2 m. La laguna está rodeada de carrizos y el fondo se encuentra cubierto de vegetación macrofítica. La Albufera Honda es también una laguna costera típica, que se encuentra separada de la anterior por una estrecha franja de tierra.

Esta laguna posee dos cubetas separadas por un estrangulamiento de su contorno que llega casi a cerrarse por efecto de la vegetación. Su profundidad es algo mayor que la de la anterior, 3.5 m. Su superficie es una extensión de 700 m de largo y 150 m de ancho (según López, 1983). Ninguna de estas dos lagunas se encuentra en comunicación con el mar.

En la costa almeriense es frecuente que los lechos fluviales semisecos formen pequeñas lagunas más o menos estables en sus desembocaduras. Este es el caso de La Rambla del río De Aguas, que forma una laguna en su parte final, por el afloramiento principalmente de agua dulce, aunque en invierno puede tener una importante penetración de agua marina. Esta laguna en ocasiones se encuentra dividida en dos charcas (3 y 4).

Lagunas de Alicante (5,6). El Hondo de Elche, ubicado ligeramente hacia el interior, es una zona húmeda situada en una depresión del terreno por debajo del nivel del mar. En esta depresión existen tres masas de agua que, siguiendo la dirección Sur-Norte, son, Charca Sur (5), Embalse de Poniente y Charca Norte. La Charca Sur es de tamaño mediano (500 m de longitud) y forma irregular, recibe aporte de agua de la Charca Norte con la cual se encuentra comunicada por un canal artificial que bordea el Embalse de Poniente. De la Charca Sur parte un canal hacia la costa. De esta forma, el agua más salada de las charcas no se mezcla con el agua del embalse, en el cual se recogen aguas de los ríos Vinapoló y Segura. En el embalse se acumulan excedentes de agua que desde allí es bombeada para el riego.

La laguna de *El Altet* (6), próxima a Santa Pola (Alicante), es de origen cárstico y se encuentra situada en una depresión del terreno por debajo del nivel del mar. Del cual recibe aportes de agua por filtración. Su forma es redondeada, siendo sus dimensiones de 200 x 300 m y su profundidad media de 2 m. La laguna está rodeada de un terreno elevado, salvo por un lado en el cual el terreno es más bajo y se abre una zona muy somera y con carrizos. Las condiciones de la laguna son bastante estables en el tiempo.

La Celadilla (7). Situada en el interior –a unos 200 km de la costa, cerca de Belmonte (Cuenca)– se encuentra la laguna de La Celadilla (7) que forma parte de un conjunto de varias lagunas. Se trata de una laguna endorreica que recibe agua de las formaciones cretácicas que la rodean. Su forma es alargada y es muy poco profunda (0.5 m), formando en un extremo una cubeta más honda (1.5 m). Las características de esta laguna salada son altamente fluctuantes encontrándose sometida a una intensa evaporación en verano.



1. Albufera Nueva de Adra.
 2. Albufera Honda de Adra.
 3. Rambla de Aguas, Charca Sur.
 4. Rambla de Aguas, Charca Norte.
 5. Humedal del Hondo de Elche.
 6. Laguna del Altet.
 7. La Celadilla.
 8. Marjal de Torreblanca.
 9. La Ricarda.
 10. La Massona.
- I.A.T.S.: Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal.

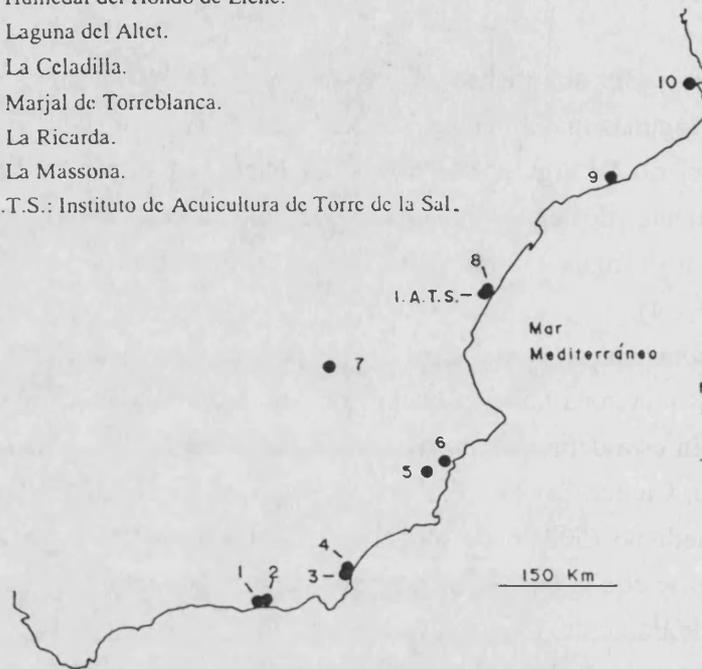


Figura 2.5. Situación geográfica de las lagunas en las que se recolectaron las diferentes cepas.

El Marjal de Torreblanca (8). En la costa baja de Torreblanca (Castellón) aparece una extensa marisma con zonas de inundación temporal y alguna pequeña laguna.

La Ricarda (9). Se trata de una laguna eutrófica de forma alargada (1300 x 100 m) situada perpendicularmente al mar en el Delta de Llobregat (10 km al sur de Barcelona). La profundidad llega hasta 3 m en el centro de la laguna. La laguna es de agua salada y no presenta estratificación vertical pero sí un marcado gradiente longitudinal de salinidad.

La Massona (10). Situada en Gerona, ya en la región septentrional del Mediterraneo español, es una laguna alargada (1000 x 100 m) perpendicular al mar, con una cubeta más profunda en el extremo cercano al mar que tiene 10 m de profundidad. Forma parte de un sistema de masas de agua localizado entre las desembocaduras de los

ríos Muga y Fluvià, de los cuales recibe aportes de agua dulce. A través de la franja de arena que la separa del mar se infiltra agua marina en esta laguna dando lugar a una estratificación debida al agua salada que se sitúa en el fondo de la cubeta profunda.

Las características fisicoquímicas de estas lagunas fueron estudiadas por López (1983). Una descripción más detallada de ellas puede encontrarse en el trabajo citado.

2.3. AISLAMIENTO DE LAS CEPAS

La relación de las cepas de *Brachionus plicatilis* empleadas en este estudio se presenta en la tabla 2.1 con el lugar, fecha de recolección y algunas características del agua en que fueron recogidas.

Tabla 2.1. Relación de las cepas de *Brachionus plicatilis* estudiadas. Se indican la denominación, la fecha y lugar del aislamiento, y algunas características del agua en que fueron recogidas. Las medidas expresadas entre paréntesis no corresponden al momento de la recolección y fueron tomadas de López (1983).

Denominación ^a	Laguna	Estación (año)	Conductividad, mS/cm	Temperatura, °C	pH
AD	Albufera Honda de Adra	Primavera (1981)	5.8	23.2	9.1
AD1	Albufera Nueva de Adra	Primavera (1983)	6.0	18.0	8.6
AD2	Albufera Nueva de Adra	Primavera (1983)	6.0	18.0	8.6
AD3	Albufera Honda de Adra	Otoño (1982)	6.0	17.0	8.0
"	Albufera Honda de Adra	Primavera (1983)	6.0	17.0	8.5
MOS	Rambla de Aguas, Charca Sur	Primavera (1983)	6.5	17.0	7.9
MON	Rambla de Aguas, Charca Norte	Primavera (1983)	6.5	17.0	7.8
HO1	Humedal del Hondo de Elche	Primavera (1983)	14.0	21.5	8.5
HO2	Humedal del Hondo de Elche	Otoño (1982)	14.0	20.0	8.2
"	Humedal del Hondo de Elche	Otoño (1983)	20.0	20.8	-
SPO	Laguna del Altet	Verano (1981)	22.5	26.6	(7.6)
SPO1	Laguna del Altet	Otoño (1982)	14.0	20.0	7.6
SPO2	Laguna del Altet	Otoño (1983)	21.0	21.0	7.7
CU	La Celadilla	Verano (1981)	36.0	17.0	8.0
FCA	I.A.T.S. ^b	Otoño (1980)	≈50.0	26.0	-
CA	Marjal de Torreblanca	Otoño (1980)	(8.0)	(13.5)	(8.5)
RI	La Ricarda	Primavera (1983)	42.0	20.0	-
MAS	La Massona	Primavera (1983)	36.1	20.1	-

a. La denominación se refiere a cepas o conjuntos de cepas.

b. I.A.T.S.: Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (Castellón).

Cada una de estas cepas procede de un clon originado a partir de una hembra partenogénica, aislada en las muestras de campo o cultivos originales. El aislamiento de los individuos fundadores y el establecimiento de los clones fue efectuado por Serra, tal y como describe en su trabajo de 1987. Las cepas se han mantenido en el laboratorio desde la fecha de su aislamiento, que oscila desde el 1980 al 1983, hasta el momento de realización de las experiencias, permaneciendo bajo condiciones controladas, tal y como se describe en el siguiente capítulo.

3. MÉTODOS GENERALES DE CULTIVO

Brachionus plicatilis es un rotífero filtrador que puede ser alimentado con una gran variedad de tipos de alimento, variedad que incluye: algas unicelulares, levaduras, bacterias y alimento inerte (Lubzens, 1987). No obstante, la alimentación con partículas inertes no resulta tan efectiva como la efectuada con organismos vivos (Person-le Ruyet, 1975; Hirayama y Nakamura, 1976; Scott, 1983). Por ello, un gran número de investigadores cultivan rotíferos en medios donde, previamente, se ha hecho crecer un organismo que les servirá de alimento. La alimentación con algas vivas permite mayores crecimientos poblacionales que la alimentación con levaduras (Hirata, 1979, 1980; Yúfera y Pascual, 1980; Esparcia y Serra, 1988). Además, las levaduras, a excepción de las levaduras marinas, parecen resultar nutricionalmente incompletas para el crecimiento de éste rotífero (Hirayama y Funamoto, 1983) y suelen utilizarse en dietas complementadas con algas.

En los rotíferos filtradores, el tamaño de las partículas ingeridas está estrechamente relacionado con el de la abertura bucal (Pourriot, 1977), y positivamente correlacionado con el tamaño del cuerpo (Hino e Hirano, 1980).

Teniendo en cuenta estos hechos, en el presente trabajo se utilizó como alimento de los rotíferos el alga prasinoficea *Tetraselmis sp.* (cedida por el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal). El alga *Tetraselmis* es un alga flagelada cuya morfología puede aproximarse a una elipse, su tamaño, de unos 13 μm de longitud, se encuentra dentro del rango de tamaño de las partículas que pueden ser ingeridas por *Brachionus plicatilis* (2–28 μm , Hino e Hirano, 1980).

Los cultivos de mantenimiento y experimentales de rotíferos exigen que éstos se encuentren en un medio controlado cuyas características deben ser adecuadas para el crecimiento de las distintas cepas. Además, el medio debe permitir el crecimiento del organismo con el cual serán alimentados los rotíferos.

Como medio de cultivo para el crecimiento de algas y rotíferos puede utilizarse un medio natural, modificado o no, o un medio artificial de composición conocida (Gilbert, 1970; King y Snell, 1978; Scott, 1983). La utilización de medios sintéticos tiene como ventaja la repetibilidad, al eliminar la variabilidad en la composición química y calidad nutricional asociada a los medios naturales. Por contra, el uso de medios sintéticos requiere un mayor conocimiento de los requisitos nutricionales de los rotíferos que se cultivan, ya que tales requisitos dependen de la especie e incluso difieren entre cepas de una misma especie (Pourriot, 1965a). Además, puede existir una gran especificidad en

relación con el nutriente requerido. Por ejemplo, Scott, en los trabajos de 1981 y 1983, demostró que *B. plicatilis* precisa vitamina B₁₂ para su crecimiento, pudiéndola tomar directamente del medio o de las algas. (Algunas especies de algas son capaces de producir una sustancia que provoca la unión de la vitamina B₁₂ a la superficie de la célula y en el medio circundante; Droop, 1968.)

Consideraciones como las anteriores hacen que muchos autores opten por cultivar el rotífero *B. plicatilis* en medios naturales o seminaturales (p.e., Hirayama y Ogawa, 1972; Yúfera *et al.*, 1983; Minkoff *et al.*, 1983; Lubzens *et al.*, 1985; Serra, 1987). En estos casos el medio consta frecuentemente de agua de mar tratada y, si se requiere, diluida hasta la salinidad deseada. El tratamiento suele orientarse a la homologación y enriquecimiento (fertilización) del agua para que permita cultivos densos de organismos. En este trabajo se ha utilizado agua de mar diluida hasta una salinidad de 12 g/l. El tratamiento de este agua consistía en su filtración, esterilización, y posterior fertilización por adición de una serie de nutrientes tales como sales de nitrógeno y fósforo, vitaminas y oligoelementos. Como solución de fertilización se utilizó una modificación de la solución *f/2* de Guillard y Ryther (1962) propuesta por Serra (1987) para su adaptación al crecimiento de *Tetraselmis sp.* (tabla 3.1). Otras variantes de este medio han sido utilizadas por otros autores que trabajan con *B. plicatilis* (p.e., Lubzens, 1981; Minkoff *et al.*, 1983).

La rutina seguida para el cultivo de las algas y su uso en los cultivos de rotíferos, la cual se corresponde básicamente con la descrita por Serra (1987), se describe a continuación. El agua de mar se recogía en el Puerto de Valencia y se almacenaba hasta su utilización en una cámara fría a 4°C. Previamente a su uso se filtraba a través de papel de filtro para eliminar impurezas, y se mezclaba con agua destilada hasta obtener, de forma aproximada, una salinidad de 12 g/l. Este agua de mar se sometía a esterilización por calor húmedo (120°C durante 20 minutos). Una vez estéril y aatemperada, el agua se fertilizaba con las soluciones indicadas en la tabla 3.1 que a su vez habían sido esterilizadas por calor húmedo, o por filtración en el caso de las vitaminas.

Aguas de 0 g/l de salinidad (agua destilada) y de aproximadamente 36 g/l (agua de mar sin diluir) también eran sometidas a filtrado y esterilización, utilizándose posteriormente para ajustar la salinidad de los medios de cultivo.

Tabla 3.1. Concentraciones de los compuestos utilizadas para enriquecer el medio de cultivo para las algas.

	Concentración, mg/l
Nutriente	
NaNO ₃	75
NH ₄ Cl	25
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	5,72
Oligoelementos	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0098
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0220
CoCl ₂ ·5H ₂ O	0,0100
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,0060
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,1800
FeCl ₃ ·6H ₂ O	3,15
Na ₂ EDTA	4,36
Vitaminas	
Tiamina·HCl	0,0001
Biotina	0,0005
B ₁₂	0,0005

Una vez fertilizada, se corregía la salinidad del agua destinada a los cultivos de algas, mediante las soluciones antes indicadas (0 g/l y 36 g/l aproximadamente) y un conductímetro Instran 10. Los medios resultantes eran utilizados para el cultivo del alga *Tetraselmis sp.* y para algunas operaciones de manipulación de rotíferos y de algas (lavado, aislamiento, dilución, resuspensión de concentrados de algas, etc).

Para el cultivo de las algas, una vez preparado el medio se inoculaba *Tetraselmis sp.* en el mismo, y se dejaba crecer en una cámara climática a una temperatura de 25±1°C en condiciones de iluminación constante (radiación fotosintéticamente activa, PAR: aproximadamente 35 µE/m²s). El cultivo se realizaba en botellas de vidrio de 3 l de capacidad dotadas de un sistema de aireación forzada por burbujeo de aire filtrado a través de algodón graso. Este sistema de agitación permanente permite la buena difusión los gases necesarios para el crecimiento algal y mantiene una distribución uniforme de

las células en el medio de cultivo uniformizando su exposición a la luz. Los cultivos de algas así conseguidos no estaban libres de bacterias, si bien este tipo de organismos nunca ocasionó problemas de contaminación.

Los cultivos de algas están también expuestos a la contaminación fortuita con ciliados y hongos, inutilizándose para el cultivo de rotíferos. En los casos en que esto ocurría, se descartaban los cultivos contaminados, y si el total de cultivos disponibles llegaba a contaminarse, se procedía al aislamiento del alga mediante pases sucesivos a pequeños volúmenes de medio de cultivo libre de contaminantes. Esta operación se realizaba por micropipeteo de las células de *Tetraselmis sp.* bajo un estereomicroscopio. Cuando se conseguía un cultivo libre de organismos contaminantes, se utilizaba como inóculo para restablecer los cultivos de mayor volumen. Otro método de aislamiento de las algas consiste en su siembra en medio sólido para el establecimiento de cultivos puros, pero este método es lento y las algas, al resuspenderse en medio líquido, tardan en recuperar su movilidad.

Los medios en los que había crecido *Tetraselmis sp.* hasta alcanzar una alta densidad de población eran utilizados como medio de cultivo para el rotífero *B. plicatilis*. Bajo las condiciones empleadas el alga alcanzaba densidades de población en torno a 10^6 células/ml que hacían posible su uso en las experiencias diseñadas.

Los cultivos de mantenimiento de las distintas cepas de *B. plicatilis* se efectuaron en tubos de fondo plano con una capacidad de 25 ml (al menos tres tubos por cepa) y tapados con algodón graso. La salinidad de estos cultivos era de aproximadamente 12 g/l, ya que los cultivos algales dedicados al mantenimiento de rotíferos no se controlaron estrictamente en su salinidad y ésta podía alterarse durante el periodo de crecimiento algal. La temperatura de cultivo era de 25°C y la iluminación constante (PAR: aproximadamente $35 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$). Estos cultivos eran alimentados sustituyendo parte del medio por medio fresco rico en algas, repitiéndose esta operación semanalmente. Durante la alimentación se observaba el cultivo mediante un estereomicroscopio para vigilar su estado, y cuando era necesario se renovaba el recipiente de cultivo.

Las condiciones de iluminación, salinidad y temperatura empleadas en los cultivos de algas y de mantenimiento de rotíferos se hicieron extensivas a los cultivos madre de rotíferos, experimentales y preexperimentales utilizados para este trabajo. Para estos tres últimos tipos de cultivos de rotíferos se destinaban cultivos algales en los que previamente se había medido la salinidad, reajustándola, si era necesario, hasta una concentración de 12 g/l. Los cultivos madre o fuente se establecían mediante la

inoculación de rotíferos procedentes de los cultivos de mantenimiento en cultivos de algas en fase exponencial de crecimiento.

Los cultivos de rotíferos preexperimentales y experimentales eran controlados de forma aún más estricta, y en ellos la concentración del cultivo algal se ajustaba previamente al inoculo de rotíferos. En estos casos el número de células de *Tetraselmis sp.* de un cultivo denso era evaluado mediante un contador automático de partículas Coulter-Counter ZM, con las condiciones que se indican en la tabla 3.2. Posteriormente al recuento, la concentración algal del cultivo se llevaba al valor deseado, mediante dilución de éste con medio fresco de la misma salinidad.

Las concentraciones de alimento utilizada se estableció teniendo en cuenta las consideraciones que hace al respecto Serra (1987). Dicha concentración se fijó siempre por encima de 3×10^5 células/ml. De acuerdo con la interpretación que Serra (1987) hace de los resultados de un estudio de Yúfera (1982) sobre el efecto de distintas concentraciones de alimento en las tasas de filtración, ingestión y parámetros vitales de *B. plicatilis*, las concentraciones celulares de *Tetraselmis sp.* que superan dicho valor, corresponden a un exceso de comida para este rotífero. La experimentación en condiciones de exceso de alimento tiende a independizar el comportamiento del rotífero con respecto a pequeños cambios en la cantidad de alimento, introducidos por error o por aclaramiento a lo largo de la experiencia. Además, al encontrarse el cultivo de rotíferos optimizado en relación con el alimento, se pueden poner de manifiesto más claramente los efectos de los factores estudiados.

Los cultivos madre, los preexperimentales y los experimentales de tipo masivo se efectuaron en botellas de vidrio de 200 ml de capacidad tapadas con algodón graso.

Para los cultivos experimentales de tipo individual se utilizaron pequeños pocillos de vidrio con una cavidad semiesférica de unos 22 mm de diámetro y aproximadamente 1 ml de capacidad. Esta modalidad de cultivo permite una cómoda y completa observación de la totalidad del cultivo mediante la utilización de un estereomicroscopio de luz transmitida Zeiss a 1.2x. Para evitar la evaporación del medio de cultivo, los pocillos se colocaban por grupos en placas Petri de 15 cm de diámetro con un poco de agua en el fondo, logrando así un efecto de cámara húmeda.

La captura y manipulación de los rotíferos se efectuó con la ayuda de pipetas Pasteur estiradas al fuego a las que se les acopla un tubo de goma anudado en su extremo. Este permite controlar la succión y expulsión de los rotíferos.

Tabla 3.2. Condiciones utilizadas para los recuentos de algas en el contador automático de partículas.

Electrolito	Isotón
Impedancia de apertura	5 kohms
Atenuación	32
Corriente	10 mA
Volumen de aspiración	500 μm
Diámetro de la apertura	140 μm
Constante de calibración	21
Rango de medida ^a	
diámetro inferior	5,92 μm
diámetro superior	13,05 μm
Valor utilizado para las cuentas	cuentas corregidas

a. Los diámetros que se reseñan son para esferas de igual volumen que las partículas correspondientes. La adecuación de los rangos se comprobó mediante recuento al microscopio en una cámara de Neubauer.

4. MÉTODOS BIOQUÍMICOS. APORTACIONES METODOLÓGICAS

4.1. INTRODUCCIÓN

Los estudios bioquímicos llevados a cabo en el presente trabajo tratan de evaluar la variabilidad intraespecífica en la especie *Brachionus plicatilis*, haciendo uso de los electroforegramas de proteínas totales obtenidos en geles laminares de poliacrilamida. Estos estudios presentaban principalmente el problema de minimizar el número de individuos presentes en la muestra, con el objeto de reducir el trabajo experimental, y permitir diseños experimentales más potentes. El criterio de minimización anterior se torna teóricamente pertinente cuando es posible obtener resultados a partir de un sólo individuo, anulando el efecto integrador de diversidad de la muestra.

Este problema se ha salvado mediante el desarrollo y puesta a punto de una serie de técnicas bioquímicas, en concreto:

- a) Técnicas de extracción y homogeneización de las proteínas de un sólo individuo.
- b) Técnicas electroforéticas con gran capacidad resolutive.
- c) Técnicas de tinción de proteínas de alta sensibilidad.

En los siguientes apartados de este capítulo se describen de forma detallada estas técnicas comentándose las aportaciones metodológicas más relevantes realizadas en relación con la modificación y optimización de protocolos experimentales ya existentes, o desarrollo y creación de otros nuevos que satisficieran y se adaptaran a las necesidades de las condiciones experimentales del presente trabajo. Por último se estudia la capacidad analítica del sistema metodológico propuesto.

4.2. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y HOMOGENEIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Habitualmente los extractos de proteínas de rotíferos para electroforesis se preparan a partir de un gran número de individuos mediante el filtrado de un medio de cultivo en el que se ha alcanzado una gran densidad de población (Snell y Winkler, 1984; Serra y Miracle, 1985; Bender y Kleinow, 1988). Este filtrado se resuspende en una solución tamponada en donde se procede a la trituración y homogeneización de los individuos mediante sonicación. Para la separación electroforética de las proteínas en condiciones desnaturalizantes se hierven alicuotas de este extracto crudo con un exceso del detergente dodecilsulfato de sodio (SDS) y un reactivo tiol. Dado que el interés del presente trabajo era minimizar el número de individuos por muestra y a ser posible

conseguir preparar muestras individuales, resultaba necesario desarrollar un método que obviamente no podía incluir una fase previa de sonicación para la extracción y homogeneización de las proteínas constituyentes del individuo. El método desarrollado se detalla a continuación.

Protocolo para la preparación de las muestras

Para la extracción de las proteínas, los rotíferos se lavan en agua de mar estéril diluida hasta una salinidad de 12 g/l de salinidad, tras haberles separado los huevos que portan con una aguja enmangada bajo un estereomicroscopio. Posteriormente cada individuo se aísla con ayuda de una micropipeta automática en 5 μ l de este agua. La gota que contiene al individuo se coloca sobre una superficie hidrófoba (que nos puede proporcionar un trozo de parafilm montado sobre un soporte rígido) para ser tratada con 20 μ l de una solución solubilizadora de las proteínas (composición: glicerol, 28.57% (v/v); SDS, 5.88% (p/v); 2-mercaptoetanol, 14.70% (v/v); azul de bromofenol, 0.002% (p/v); todo ello en un tampón Tris-ClH 0.275 M, pH 8 (Semancick, 1976)). Después de unos minutos, el cuerpo del rotífero se ha desintegrado completamente a excepción de las piezas más duras del aparato masticador. Una vez comprobada la completa disolución de los individuos, las muestras se recogen, se colocan en viales Eppendorff y se someten a ebullición durante 5 minutos, almacenándose hasta su uso a -20°C . Las muestras "en blanco", consistentes en 5 μ l de agua de aislamiento de los rotíferos a los que se añaden 20 μ l de la solución extractora, se trataron de la misma forma. Como marcadores de peso molecular se utilizaron los comercializados por Sigma para el rango de pesos moleculares entre 70 y 14 kDa (albúmina bovina, 66 kDa; ovoalbúmina, 45 kDa; gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, 36 kDa; anhidrasa carbónica, 29 kDa; tripsinógeno, 24 kDa; inhibidor de la tripsina, 20.1 kDa; lactoalbúmina, 14 kDa). Estas proteínas se disuelven en el mismo tampón que las muestras en una proporción 10 veces menor que la indicada por la casa comercial y se someten al mismo tratamiento térmico que las muestras.

Desarrollo del método de extracción, comentarios y aportaciones

El método de extracción detallado arriba surgió de una primera serie de experimentos en los que se examinó el efecto que tenía la aplicación directa de un tampón

desnaturalizante sobre los individuos de *Brachionus plicatilis*. Este estudio mostró que la disolución era eficiente, ya que con un corto tiempo de incubación y sin necesidad de ninguna acción mecánica el cuerpo de los individuos se desintegraba completamente, y únicamente permanecían visibles al estereomicroscopio los huevos y las piezas duras del aparato masticador del animal. Las partes blandas del cuerpo del rotífero se disuelven muy rápidamente, y es la loriga la que presenta una mayor resistencia. Los componentes de la loriga de *Brachionus plicatilis* son bastante resistentes a la hidrólisis enzimática, así como a ciertos agentes químicos conocidos por su poder de disolución de proteínas. No obstante, la loriga puede disolverse aplicando estas sustancias químicas en combinación con agentes que disocian los puentes disulfuro de las proteínas (Bender y Kleinow, 1988). En el presente trabajo, la disolución de las proteínas se efectúa con SDS en presencia de un reactivo tiol (2-mercaptoetanol) capaz de romper los puentes disulfuro de las proteínas. El detergente iónico no es capaz por sí sólo de disolver las partes más duras del tegumento del rotífero; sin embargo la disolución es completa con SDS en presencia de mercaptoetanol a 25°C y pH 8. El tratamiento con SDS en presencia de un agente reductor elimina las diferencias conformacionales y de densidad de carga existentes entre proteínas, las cuales se disocian en sus subunidades polipeptídicas y quedan cargadas negativamente migrando en los geles de poliacrilamida de acuerdo con el tamaño del polipéptido. El tratamiento térmico subsiguiente (5 minutos a 100°C) asegura la desnaturalización de las proteínas uniformizando su grado de disolución en todas las muestras. Sin tratamiento térmico la disociación de ciertos complejos de proteína altamente estables puede ser incompleta, especialmente algunas proteasas pueden permanecer activas y originar la degradación de otras proteínas presentes en la muestra. La caracterización electroforética de las proteínas y la detección de variabilidad atribuible a factores controlados únicamente es posible si las proteinasas endógenas procedentes de los tejidos del rotífero se inhiben, y esto se consigue mediante la desnaturalización térmica inmediatamente después de que se ha producido la disolución de las lorigas.

4.3. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS

Como método para la separación de la mezcla de proteínas presente en las muestras se utilizó la electroforesis en geles laminares de poliacrilamida. Dado que la separación electroforética estaba encaminada a la obtención de patrones de proteínas totales que podían implicar perfiles electroforéticos con un gran número de bandas se requería un

método capaz de proporcionar una fina separación entre ellas al tiempo que una buena definición de las mismas. El sistema empleado, la preparación de los geles y las condiciones para la electroforesis se detallan a continuación.

Protocolo de elaboración de los geles. Electroforesis

La separación de las proteínas se llevó a cabo mediante electroforesis en geles laminares de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Se emplearon geles de 16 cm de alto, 15 cm de ancho y de 1 mm de grosor en un sistema de electroforesis vertical y discontinuo (sistema Vertical Electrophoresis Unit de LKB). La elaboración de los geles y tampones de electroforesis se realizó de acuerdo con el procedimiento propuesto por Conejero y Semancik (1977). Las soluciones para la preparación de los geles se filtraron a través de filtros de nitrocelulosa de 0.45 μm . Los geles, compuestos de tres capas, se prepararon a partir de una solución madre que contenía 30% (p/v) de acrilamida y 0.8% (p/v) de bisacrilamida. La capa superior de empaquetamiento o de concentración, con 1.2 cm de recorrido, tenía la siguiente composición: acrilamida, 4% (p/v); bisacrilamida, 0.1% (p/v); persulfato de amonio, 0.06% (p/v); SDS, 0.01%; tetra-metil-etilen-diamina (TEMED), 0.1%; disuelto todo ello en un tampón Tris-Cl 120 mM, pH 8. La capa espaciadora, con 1.5 cm de recorrido, estaba compuesta por: acrilamida, 6% (p/v); bisacrilamida, 0.2% (p/v); persulfato de amonio, 0.05% (p/v); SDS, 0.01%; TEMED, 0.05%; disuelto en un tampón Tris-Cl 370 mM, pH 8.8. Por último, la capa de resolución con 11.5 cm de recorrido se componía de: acrilamida, 14% (p/v); bisacrilamida, 0.4% (p/v); persulfato de amonio, 0.08% (p/v); SDS, 0.01%; TEMED, 0.05%; disuelto en un tampón Tris-Cl 370 mM, pH 8.8. Los componentes de cada una de las tres capas se mezclaban en un recipiente rodeado de hielo. El oxígeno inhibe la polimerización por lo que las mezclas gelificantes para las tres capas deben desgasificarse bajo vacío unos 10 minutos antes de añadir el TEMED. Para obtener una interfase recta entre el gel de resolución y el espaciador, y entre éste último y el empaquetador, se añadía cuidadosamente alcohol *n*-butilico (aprox. 2 ml) inmediatamente después de verter la mezcla gelificante, el cual se eliminaba antes de introducir la mezcla para la siguiente capa. La polimerización tenía lugar a temperatura ambiente.

Las muestras (25 μl) se aplicaban lentamente en el interior de los pocillos con una jeringa Hamilton, evitando la formación de burbujas. En uno de los pocillos se colocaban 20 μl de la solución de marcadores de peso molecular y en otro una muestra

"en blanco" para poder desestimar durante el análisis del gel las falsas bandas (véase más adelante).

En la modalidad electroforética empleada, el desplazamiento de las proteínas, con el gel en posición vertical, se realiza hacia el polo positivo en condiciones de corriente constante (20 mA) suministrada por una fuente de alimentación Pharmacia ECPS 3000/150. El tampón de electroforesis usado fue Tris-glicina (Tris 50 mM, glicina 380 mM, SDS 0.1% (p/v), con un rango de pH entre 8.3 y 9.5), y la electroforesis se detenía cuando el frente marcado por el azul de bromofenol alcanzaba el límite inferior del gel, lo que ocurría unas cuatro horas después de iniciada la electroforesis.

Justificación de las características del sistema de electroforesis empleado

La mayor parte de los estudios en los que se utiliza la electroforesis de zona de proteínas en geles de poliacrilamida emplea un sistema de tampones disociante dirigido a la disociación de todas las proteínas en sus subunidades polipeptídicas. El sistema más comúnmente utilizado es el que emplea como agente disociante el detergente SDS. La simplicidad y rapidez del método, añadidas al hecho de que sólo se requieren muestras con cantidades de proteína del orden de microgramos, han hecho de la electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS el método más ampliamente usado para la determinación de la complejidad y pesos moleculares de los polipéptidos constituyentes de una muestra de proteínas. Por otra parte, a causa de la alta resolución obtenida con los métodos electroforéticos que emplean un sistema de tampones discontinuo (con diferencias en la composición y pH de los tampones integrantes), los sistemas discontinuos con SDS como agente disociante (sistema de tampón discontinuo en el que se añade este detergente a todos los tampones) son los que normalmente se escogen para el fraccionamiento de mezclas de proteínas con alta resolución. Teniendo en cuenta estas consideraciones y dadas las características de las muestras, en el presente trabajo se ha utilizado el sistema discontinuo con SDS propuesto por Conejero y Semancik (1977), el cual es capaz de resolver un gran número de bandas gracias a una combinación equilibrada de geles de concentración y separación.

Las concentraciones de acrilamida escogidas para cada capa de los geles fueron las mismas que las empleadas por Conejero y Semancik (1977), ya que tras una serie de experimentos preliminares en que se probaron geles a distintas concentraciones de acrilamida, fueron las anteriormente citadas las que rindieron mejores resultados en cuanto a resolución de las bandas.

El sistema discontinuo de tres capas propuesto por estos autores permite resolver un amplio rango de bandas de proteína, particularmente las correspondientes a proteínas de bajo peso molecular asociadas al frente de electroforesis que normalmente son las más difusas.

4.4. TÉCNICAS DE TINCIÓN DE PROTEÍNAS DE ALTA SENSIBILIDAD. TINCIÓN DE LOS GELES

La baja carga proteínica de las muestras exigió el uso de técnicas de tinción muy sensibles para visualizar el mayor número posible de proteínas separadas por electroforesis. El colorante azul de Coomassie es el método convencional de tinción de proteínas en geles de poliacrilamida. Sin embargo, la mayoría de las proteínas y péptidos en las muestras analizadas aquí se encuentran presentes en concentraciones demasiado bajas para ser reveladas por este método de tinción, hasta el punto de que no se detectó ninguna banda en los geles sometidos a este tipo de tinción en experimentos preliminares. Hasta la aparición de la tinción con nitrato de plata (Switzer *et al.*, 1979) la forma más sensible de visualizar proteínas en los geles era mediante autorradiografía y fluorografía, técnicas que implican la presencia de aminoácidos radioactivos durante la síntesis de proteínas, que deben ser suministrados *in vivo* con los inconvenientes consiguientes. La técnica de tinción con nitrato de plata propuesta por estos autores permitía por vez primera la detección de proteínas que antes sólo podían ser reveladas por métodos autorradiográficos. En los últimos años muchos autores han descrito tinciones de proteínas con plata en geles de poliacrilamida. En general estas técnicas son 100 veces más sensibles que la tinción con azul de Coomassie (Switzer *et al.*, 1979; Oakley *et al.*, 1980; Heukeshoven y Dernick, 1985) y en ocasiones resultan indispensables para la detección de pequeñas cantidades de proteínas. No obstante, los protocolos experimentales de tinción con plata requieren numerosas reacciones que producen dificultades considerables; incluso algunos protocolos prescriben una pretinción con azul de Coomassie para mejorar los resultados (véase más adelante). Además, en la mayor parte de los casos estas técnicas no son lo suficientemente versátiles como para poder ser aplicadas a todos los tipos de geles de poliacrilamida (Heukeshoven y Dernick, 1975). La mayor parte de los procedimientos de tinción existentes puede ser dividida en dos grandes categorías dependiendo de la composición de la soluciones de tinción y revelado. En la primera categoría se incluye el procedimiento propuesto por Oakley *et al.* (1980) como una modificación del descrito en

primer lugar por Switzer *et al.* (1979), en el que los geles se tiñen en una solución diamínica de plata y se revelan en una solución ácida de formaldehído. En la segunda categoría se encuentra el método detallado por Merrill *et al.* (1981) que implica el uso de una solución de nitrato de plata ligeramente ácida (pH 5–6) llevándose a cabo el revelado en una solución de carbonato sódico y formaldehído.

En una serie de experimentos preliminares se descartó el uso de las tinciones que implican soluciones de nitrato de plata en medio ácido (Merrill *et al.*, 1981; Heukeshoven y Dernick, 1975) debido a que el alto nivel de fondo obtenido llegaba a enmascarar completamente las bandas de proteína. Se optó pues por la modalidad de tinción en solución amoniacal de plata. En este trabajo se ha desarrollado y utilizado una modificación de la técnica de tinción propuesta por Oakley *et al.* (1980), dada la necesidad, para obtener una mayor sensibilidad y minimizar la tinción de fondo, de adaptar los tiempos de reacción y la composición de las soluciones a las características de los geles empleados y de las muestras objeto del presente estudio. Las modificaciones básicas para la adaptación del protocolo de Oakley a las condiciones experimentales han sido las siguientes: (1) un tiempo de aplicación de la solución argéntica más largo (1 hora frente a 15 minutos) pero con una concentración más baja (la mitad) de nitrato de plata, (2) un lavado más enérgico del gel antes del revelado, y (3) una temperatura mucho más alta durante la reacción de revelado (40° frente a los 25°C empleados por Oakley). Estas modificaciones resultaron de una serie de experimentos en los que se compararon diferentes variaciones del procedimiento de tinción, examinando los pasos esenciales de la reacción (tinción y revelado) y los efectos del uso de sustancias adicionales a los reactivos de fijación tales como el glutaraldehído, así como de otros colorantes de forma previa al proceso de tinción argéntica. El procedimiento descrito a continuación es el que se ha escogido, mediante ensayo y error, con el fin de obtener una mejor visualización de las proteínas.

Protocolo para la fijación y tinción de los geles

Los procesos de fijación y tinción se realizaron a 25°C, a excepción del revelado de los geles durante la tinción de plata, y bajo agitación en un agitador tangencial termostatado modelo Lab-line 3570–1. Para todos los pasos del procedimiento se utilizaron recipientes de plástico cuidadosamente lavados con ácido nítrico concentrado y aclarados con agua. Los geles se manipularon siempre con guantes de latex previamente

enjuagados con agua. El volumen de todas las soluciones se ajustó de forma que cubrieran totalmente los geles.

La fijación de las proteínas, una vez terminada la electroforesis se efectuó mediante el tratamiento de los geles con una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 12.55% (p/v) y alcohol isopropílico al 25% (v/v) durante una noche.

Los geles fueron previamente teñidos con una solución de azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250) al 0.05% (p/v), en alcohol isopropílico 25% (v/v) y ácido acético al 12% (v/v) manteniéndose en agitación suave durante una noche. La decoloración se efectuó con una solución al 10% (v/v) de ácido acético y 10% (v/v) de alcohol isopropílico.

Tras la pretinción de los geles con azul de Coomassie se utilizó el siguiente procedimiento de tinción con nitrato de plata: el gel se sumerge en una solución al 40% (v/v) de metanol y 10% (v/v) de ácido acético durante 3 horas. Después se lava dos veces en una solución al 10% (v/v) de metanol y 5% (v/v) de ácido acético, durante 15 minutos cada vez. A continuación se efectúa una fijación con glutaraldehído al 10% durante 30 minutos. La solución de glutaraldehído puede utilizarse varias veces. El gel se lava con agua destilada hasta eliminar el glutaraldehído; un procedimiento estándar consiste en lavar en agua durante toda la noche, tiñendo el gel al día siguiente tras efectuar tres cambios de agua de una hora cada uno. El gel se tiñe con una solución amoniacal de AgNO_3 recién preparada (0.4% (p/v) de AgNO_3 ; 0.35 (v/v) de NH_4OH ; 0.072% (p/v) de NaOH) durante una hora. (Para preparar 250 ml de esta solución se mezclan 3.5 ml de NH_4OH al 25% (v/v) con 50 ml de NaOH al 0.36% (p/v). Bajo agitación vigorosa se añaden lentamente a la mezcla anterior 10 ml de una solución al 10% (p/v) de NO_3Ag y se afora hasta el volumen total. La solución amoniacal de plata es potencialmente explosiva cuando se seca, debe por tanto desecharse después de su uso, o neutralizarse con ácido clorhídrico concentrado.) La plata residual en el gel se elimina mediante 3 lavados sucesivos de 2 minutos con agua destilada en un recipiente limpio. A continuación se aplica como revelador una solución con 0.005% (p/v) de ácido cítrico y 0.055% (v/v) de formalina (formol comercial al 40%). El gel se sumerge en esta solución hasta que aparecen las bandas teñidas de color pardo y alcanzan la intensidad deseada. El revelado se detiene eliminando el revelador y sustituyéndolo por ácido acético al 1% (v/v). El gel ya teñido se lava en agua pudiéndose almacenar en ella o secarse para una conservación más prolongada. Para el secado se utilizó un procedimiento de secado al vacío mediante calentamiento de los geles incluidos en

papel de celofán en una secadora LKB-202 durante una hora. Es recomendable trabajar con cada gel separadamente, fundamentalmente durante las fases de teñido y revelado.

Si las bandas de proteína están sobreteñidas o el fondo ha sufrido una tinción excesiva puede utilizarse el reductor fotográfico de Switzer *et al.* (1979) para la decoloración del gel. Este reductor se compone de dos soluciones que deben mezclarse a partes iguales y aplicarse o bien directamente cuando las manchas son intensas o se desea desteñir completamente el gel, o bien previamente diluidas para quitar manchas tenues. Una vez alcanzados los resultados deseados el reductor debe eliminarse completamente lavando exhaustivamente con agua. Cuando la decoloración es necesaria resulta conveniente efectuarla inmediatamente antes del secado del gel. Si se ha efectuado una decoloración parcial o total del gel para teñirlo de nuevo, no deben quedar restos del reductor pues de lo contrario durante este segundo proceso de tinción el gel se torna marrón o amarillo inutilizándose. En este caso es además conveniente equilibrar el gel en una solución de metanol al 50% antes de la tinción.

Algunos comentarios al protocolo de tinción de los geles. Análisis y discusión de algunos aspectos metodológicos

Tinción previa con azul de Coomassie. Para estudiar el efecto de la tinción previa con azul de Coomassie en los geles teñidos con nitrato de plata se llevó a cabo un experimento consistente en la comparación de fragmentos procedentes de un mismo gel teñidos antes con azul de Coomassie o directamente con nitrato de plata. En estas pruebas preliminares se observó una mayor sensibilidad a la tinción con nitrato de plata en los geles que previamente se habían teñido con azul de Coomassie. Además el desarrollo del color era inestable cuando la tinción argéntica se realizaba directamente. Otros autores observan un efecto similar de este colorante aniónico sobre la tinción amoniacal con plata (Irie *et al.*, 1982; Irie y Sezaki, 1983) e interpretan este efecto como el resultado de la retención de las proteínas en el gel ejercida por el colorante, sugiriendo además que los grupos sulfonilo de la molécula de colorante cargados negativamente podrían actuar como sensibilizador para la tinción con plata. Mold *et al.*, (1983) proponen también la pretinción del gel con un colorante (negro amido) o el tratamiento con su análogo (el ácido 2,7-naftalenodisulfónico (NDA)²) para aumentar la sensibilidad de la tinción amoniacal de plata de histonas, y sugieren un mecanismo explicativo, según el cual los grupos sulfonilo del colorante o del (NDA)² actuarían como lugares de nucleación que permitirían la deposición de la plata. También proponen

como efecto adicional la retención de las proteínas en el gel, si bien consideran que la fijación no es el único efecto de la pretinción. Por contra Heukeshoven y Dernick (1985) no encuentran tal aumento de sensibilidad y señalan que algunas proteínas pueden manifestar tinción débil o tenue cuando previamente se tiñen con azul de Coomassie, si bien el tipo de tinción utilizado en su trabajo es distinto del empleado aquí y por Irie y sus colaboradores (1982, 1983).

Fijación de las proteínas. Uso de soluciones hiper e hipotónicas. Los métodos de tinción utilizados actualmente para la detección de proteínas en geles de poliacrilamida requieren una fijación previa de las proteínas con ácidos y alcoholes (Steck *et al.*, 1980). En el protocolo de tinción propuesto en este trabajo, la desnaturalización de las proteínas se efectúa con una solución de TCA tras la electroforesis y posteriormente se somete al gel a una segunda fase de fijación en una solución de metanol-ácido acético. La fijación con TCA o soluciones alcohol-ácido previene la pérdida de las proteínas. Los geles muy delgados deben fijarse con TCA, sobre todo si su grosor es inferior a 0.5 mm. La fijación tras la electroforesis con TCA probablemente hace innecesaria una fijación posterior con la solución alcohol-ácido tras la tinción de Coomassie. No obstante, la fijación en la solución metanol(40%)-ácido acético(10%) tiene una función adicional, la de eliminar determinadas sustancias presentes en el gel y que pueden interferir en la reacción de tinción, tales como glicina (componente del tampón de electroforesis Tris-glicina), ácido acético y restos de azul de Coomassie (procedentes de etapas previas de fijación y tinción), SDS y glicerol (procedentes de las soluciones y tampones de electroforesis). Un proceso clave para lograr una tinción eficiente de las proteínas con nitrato de plata, es eliminar el SDS de los complejos SDS-proteína. El SDS que queda en el gel inhibe la tinción amoniacal y produce una tinción de fondo excesiva (Ohsawa y Ebata, 1983; Hukeshoven y Dernick, 1985).

Durante la fijación con la solución hipertónica metanol(40%)-ácido acético(10%) el gel se contrae, produciéndose un eflujo de agua a partir del él. En su inmersión posterior en una solución hipotónica (metanol(10%)-ácido acético(5%)) se expande recuperando su tamaño normal debido al influjo de agua. Estos flujos de agua con la consiguiente contracción y posterior expansión del gel, liberan el SDS unido a las proteínas, y eliminan los restos de tampón, colorantes e iones contaminantes que se encuentran retenidos en el gel. Así en realidad, la función fundamental de las soluciones alcohol-ácido en el protocolo propuesto es la de solvente para el lavado de estas sustancias que pueden interferir en la reacción de tinción. De esta forma, aun los geles

fijados con TCA suelen someterse a lavados con este tipo de soluciones durante periodos de tiempo prolongados pudiendo incluso ser almacenados en esta solución durante varias semanas (Wray *et al.*, 1981).

Por otra parte la fijación con metanol(40%)–ácido acético(10%) seguida del lavado en metanol(10%)–ácido acético(5%), sobre todo si este último se prolonga durante toda la noche anterior a la etapa de fijación con glutaraldehído, evita el problema de obtención de una tinción de fondo excesiva que suele producirse en geles con concentraciones superiores a un 10% de acrilamida (Oakley *et al.*, 1980).

Fijación secundaria con glutaraldehído. El pretratamiento de los geles con glutaraldehído en el método propuesto aumenta la sensibilidad de la tinción. El uso de este aldehído como fijador secundario en la tinción amoniaca con plata resulta controvertido, ya que existen protocolos que no lo incluyen (Wray *et al.*, 1981; Ohsawa y Ebata, 1983), mientras que otros lo consideran necesario para una tinción óptima (Oakley *et al.*, 1980; Dion y Pomenti, 1983; Giulian *et al.*, 1983; Scheleider y Watterson, 1983; Buchner y Tomkins, 1985).

Según Heukeshoven y Demick (1985) el efecto del pretratamiento de los geles con aldehídos queda restringido a mejorar la fijación de las proteínas y a producir un condicionamiento del gel generando un ambiente que favorece la reducción de los iones plata unidos a las proteínas. No obstante, estos autores no consideran necesaria la utilización de este fijador para la obtención de buenos resultados en su método de tinción, apuntando que también es innecesario en los métodos de tinción con diamina. Afirmación esta última basada únicamente en la existencia, como anteriormente se cita, de algunos protocolos de tinción de este tipo que no incluyen tal reacción de fijación. Por contra, Dion y Pomenti (1983) observan que la fijación secundaria con glutaraldehído es necesaria para obtener el máximo de sensibilidad en la tinción y afirman que de acuerdo con sus experimentos, este hecho no puede explicarse únicamente como el resultado de una fijación, que prevendría la elución de las proteínas del gel. Según estos autores los grupos aldehído–proteína formados tras el tratamiento con glutaraldehído participan directamente en la reacción de tinción con nitrato de plata y establecen que el glutaraldehído desempeña un importante papel en el realce de la detección de proteínas separadas por SDS–PAGE utilizando la tinción amoniaca de plata. El aumento de sensibilidad podría deberse pues, a la formación de compuestos estables entre el glutaraldehído y los aminoácidos de las proteínas. Los grupos aldehído de tales complejos que resistieran al lavado reducirían los iones Ag^+ dando lugar a

deposiciones de plata metálica en las bandas de proteína durante la inmersión del gel en la solución amoniacal de plata. Estas deposiciones localizadas de plata servirían como imagen latente o lugar de nucleación para la ubicación de la plata metálica adicional durante el revelado del gel.

Tiempo de tinción, lavados y revelado. La obtención de una tinción argéntica óptima implica un equilibrio entre (a) los pasos de fijación, tinción y revelado, que pueden provocar una tinción de fondo excesiva, y (b) las etapas de lavado, que eliminan el exceso de reactivos y reducen la tinción de fondo si bien a expensas de la tinción de las proteínas (Butcher y Tomkins, 1985). Por ello la optimización del protocolo de Oakley *et al.* (1980) para el sistema de geles empleado y características de las muestras estudiadas ha supuesto el ensayo de una serie de condiciones para distintos parámetros de estas etapas de la tinción dirigido a lograr un balance adecuado entre la tinción de las bandas de proteína y la de la matriz del gel. El método resultante, detallado antes (véase el apartado "Protocolo de tinción de los geles") implica una doble fijación (con una solución alcohol-ácido, y con una solución de glutaraldehído), y un lavado más prolongado después de la reacción de tinción. La fase de tinción en la solución amoniacal también se prolonga para conseguir suficiente deposición de plata en torno a las proteínas. La reacción de revelado se acelera mediante un aumento de la temperatura. El método permite una intensa tinción de las proteínas con un nivel de fondo aceptable.

Poehling y Neuhoff (1981) indican que la tinción de fondo depende del balance entre factores tales como exceso de glutaraldehído, tiempo de exposición a la plata, exceso de plata, tiempo de revelado y concentración de formaldehído en la solución de revelado.

La tinción de fondo puede aparecer durante la fase de tinción o durante el revelado de los geles (Granier y De Vienne, 1986). Un bajo nivel de tinción de fondo sólo se consigue con el lavado del exceso de glutaraldehído antes de la tinción, y de la plata que no ha reaccionado antes del revelado del gel (Giulian *et al.*, 1983).

El glutaraldehído debe eliminarse completamente de la matriz del gel para lo cual es necesario efectuar un lavado muy largo y enérgico ya que según nuestras observaciones el desarrollo de la tinción de fondo es claramente dependiente de la duración de la fase de lavado tras la incubación con este fijador. Estas observaciones coinciden con los resultados de las experiencias realizadas por Poehling y Neuhoff

(1981). No obstante, hay que indicar que se puede producir una pérdida de las proteínas durante las etapas de lavado prolongadas (Scheleider y Watterson, 1983) por lo que es necesario asegurar una buena fijación de las proteínas.

Se puede originar un problema de fondo similar si los complejos de plata libres no se eliminan del gel antes de su revelado en un agente reductor. En los experimentos realizados preliminarmente se observó que el tiempo de lavado tras la exposición a la solución diamínica propuesto por Oakley *et al.* (1980) en su protocolo resultaba insuficiente para eliminar la plata residual provocando, durante el revelado, el rápido desarrollo de una intensa tinción de fondo y en ocasiones la formación de espejos sobre la superficie del gel debido a la precipitación de complejos libres en forma de plata metálica. Se decidió pues efectuar un lavado más prolongado y se probaron varios tiempos (2x2 min, 3x2 min, 4x2 min y 6x2 min). El lavado más corto continuaba siendo insuficiente mientras que el más largo daba lugar a una fuerte disminución de la sensibilidad rindiendo una tinción de bandas muy débil. Los tiempos intermedios de lavado fueron los que rindieron mejores resultados en cuanto a la reducción de la tinción de fondo. Por ello, en nuestro método se intensifica la fase de lavado prolongándola en el tiempo y efectuando varios cambios del solvente durante la misma. La necesidad de este lavado más energético para eliminar la plata amoniacal que no ha reaccionado se debe a la relativa insolubilidad en soluciones acuosas que ésta presenta (Giulian *et al.*, 1983; Butcher y Tomkins, 1985).

Un lavado extensivo de los geles elimina los problemas de tinción de fondo excesiva y formación de espejos sobre la superficie del gel, pero provoca también una disminución en la intensidad de la tinción de las bandas de proteína. Resultados similares han sido observados por Butcher y Tomkins (1985). Se pensó en compensar este efecto optimizando otros parámetros de la reacción de tinción. Concretamente, se optó por aumentar el tiempo de exposición a la solución de plata amoniacal para permitir que la deposición de plata alrededor de las proteínas fuera suficiente.

El tiempo general de tinción recomendado en los protocolos de tinción con nitrato de plata es de unos 10–15 minutos (Wray *et al.*, 1981; Sezaki y Kato, 1982; Oshawa *et al.*, 1983; Marshal, 1984; Granier y De Vienne, 1986), ya que según los autores que los proponen, mayores tiempos de exposición implican tinciones de fondo excesivas. Algunos autores llegan a reducir el tiempo de tinción a 5 minutos (geles de 1 mm) y 3.25 minutos (geles de 0.75 mm), con resultados favorables para la obtención de un menor fondo (Giulian *et al.*, 1983). Sólo algunos autores proponen tiempos de tinción más

prolongados (Oakley *et al.*, 1980; Butcher y Tomkins, 1985), si bien en ninguno de los casos superan los 35 minutos.

La sensibilidad de la tinción depende del grado de penetración de las sustancias de tinción. Los colorantes a menudo penetran sólo el área próxima a la superficie del gel, especialmente si el grosor del mismo supera 1 mm o si el tiempo de tinción es reducido (Heukeshoven y Dernick, 1985). En contraste con la tinción por colorantes, la tinción con AgNO_3 actúa en la superficie o próxima a la superficie, y una tinción completa de la banda de proteína a través de la sección del gel sólo es posible con un tiempo prolongado de incubación en la solución de tinción (Poehling y Neuhoff, 1981).

En el presente trabajo, los mejores resultados se han obtenido prolongando el tiempo de tinción hasta 1 hora. Este mayor tiempo de exposición permite una mayor penetración y rinde mejores resultados en cuanto a intensidad de las bandas.

La concentración de nitrato de plata en la solución de tinción depende del grosor del gel; los geles más delgados necesitan concentraciones mayores que compensen la rápida difusión de los iones plata fuera del gel durante el revelado (Heukeshoven y Dernick, 1985). Hay que tener en cuenta que no sólo los iones plata unidos a las proteínas, sino también aquellos que se encuentran en la proximidad de las moléculas de proteína son esenciales para generar bandas teñidas (Heukeshoven y Dernick, 1985). En nuestro método los geles de 1 mm de grosor se tiñen en una solución cuya concentración en nitrato de plata es la mitad de la utilizada en el protocolo de Oakley *et al.* (1980). Esta reducción en la concentración compensa el efecto de tinción de fondo por exceso de plata que produce una solución más concentrada durante un tiempo de exposición tan prolongado. De esta manera la modificación realizada en el tiempo de exposición combinada con la reducción de la concentración de nitrato de plata en la solución de tinción permite una mayor penetración lográndose un aumento de intensidad de las bandas sin que se produzcan efectos negativos sobre el fondo del gel.

El tiempo para detener el revelado en la tinción con nitrato de plata puede variarse y usualmente es un compromiso entre el aumento de la intensidad de la tinción de fondo, y el oscurecimiento de las bandas de proteína (Scheleider y Watterson, 1983). Durante el revelado, es importante observar el color de la solución, si ésta toma un color pardo-amarillento, debe reemplazarse por una nueva solución. Algunos autores consiguen minimizar la aparición de fondo cambiando la solución de revelado por nueva nada más que aparecen las primeras bandas (Giulian *et al.*, 1982). La tasa de revelado de la plata

depende de la temperatura de incubación, el tiempo para obtener un revelado completo es más corto a temperaturas más altas (Tsutsui *et al.*, 1985). En el protocolo propuesto aquí, el desarrollo del color se acelera mediante la incubación a 40°C. De esta manera se evita la disminución de intensidad de la tinción debida a la pérdida de iones plata Ag^+ por difusión durante el revelado cuando el tiempo de reacción se prolonga demasiado.

Relación entre los distintos componentes en la solución de tinción. La relación entre las concentraciones de AgNO_3 , NaOH y NH_4OH es un factor importante en los resultados de la tinción (Poehling y Neuhoff, 1981; Eschenbruch y Bürk, 1982; Giulian *et al.*, 1983; Oshawa y Ebata, 1983). Sin embargo la relación entre los componentes de la solución amoniacal de plata varía notablemente en los diferentes protocolos de tinción. Algunos autores tratan de mejorar la sensibilidad de su método de tinción determinando la relación óptima de los componentes de la solución de tinción (Oshawa y Ebata, 1983). Sin embargo, estos trabajos resultan difícilmente generalizables debido a la existencia de otros parámetros que influyen en los resultados de la tinción y que no son comunes a los distintos protocolos, de manera que la composición óptima sólo es válida para las condiciones del protocolo dentro del cual se ha determinado.

De los tres componentes de la solución de tinción es la concentración de amonio la que resulta más crítica. Según los estudios realizados por Eschenbruch y Bürk (1982) un aumento del 20% en la concentración de amonio requerida por el protocolo de Oakley *et al.* (1980) da lugar a un revelado rápido con un considerable oscurecimiento del fondo, mientras que una disminución del 20% en esta concentración se traduce en un revelado escaso con la consiguiente pérdida de sensibilidad, pudiendo llegar a no aparecer bandas. De ahí los requerimientos de amonio "fresco" por parte de los protocolos con solución amoniacal de plata (Switzer *et al.*, 1979; Oakley *et al.*, 1980; Wray *et al.*, 1981). Para obtener resultados repetibles es pues necesario preparar la solución de tinción siempre de la misma forma. En ocasiones esto resulta complejo debido a la variabilidad de la concentración de amonio en las soluciones acuosas de amonio comerciales. La concentración puede controlarse minimizando aquellos factores que pueden modificarla (usando siempre la misma fuente, esto es misma marca comercial, repartiendo en pequeños frascos la solución madre, y conservándola refrigerada para evitar la disminución en concentración por evaporación; Switzer *et al.*, 1979).

Algunos autores proponen el uso de métodos de titulación para determinar la concentración absoluta de amonio que resulta óptima en su protocolo (Eschenbruch y Bürk, 1982) o para mantener constante la relación entre nitrato de plata y amonio

(Tsutsui *et al.*, 1985) independizando el resultado de la tinción de la concentración en amonio de las soluciones acuosas disponibles en el laboratorio. En nuestros estudios ha bastado con las precauciones expuestas por Switzer *et al.* (1979).

Aparición de artefactos. Un problema que presenta la tinción con nitrato de plata en SDS-PAGE es la aparición de artefactos tales como falsas bandas y líneas verticales en el gel teñido. En muchos trabajos se describen estos artefactos como una doble banda horizontal con peso molecular entre 50 y 68 kDa (alrededor de la banda del marcador de peso molecular seroalbúmina bovina), y a veces como varias líneas verticales en forma de lluvia en el gel teñido (Tsai y Frasch, 1982; Hashimoto *et al.*, 1983; Ochs, 1983; Granier y De Vienne, 1986). En los experimentos preliminares realizados en el presente trabajo estas bandas se identificaron como falsas bandas dado que se observaron en las carreras correspondientes a las muestras "en blanco" (5 μ l de medio de aislamiento de los rotíferos + 20 μ l de solución solubilizadora de las proteínas) y se consideró que eran independientes de la muestra atribuyéndose a la solución solubilizadora de las proteínas utilizada en la preparación de las muestras (tampón de las muestras), ya que persistían al someter a electroforesis dicha solución. Esta interpretación coincidía con los resultados de las experiencias realizadas por otros autores. Hashimoto *et al.* (1983) relacionaron la aparición de estos artefactos con la presencia de compuestos reductores (2-mercaptoetanol o ditioeritritol) en el tampón de las muestras, y propusieron su eliminación añadiendo iodoacetamida a las muestras antes de la electroforesis, sustancia que captura el exceso de agentes reductores. Sin embargo en un trabajo posterior (Ochs, 1983) se han presentado datos que indican un origen peptídico para estas bandas. Se trata de queratinas cutaneas humanas que contaminan las soluciones, reactivos, y equipo de electroforesis. Según este autor, el 2-mercaptoetanol no es la verdadera fuente de estas bandas sino que actúa aumentando la extractibilidad (solubilidad) de estas proteínas contaminantes, así como su movilidad electroforética (de ahí el efecto observado de disminución de artefactos al eliminar el 2-mercaptoetanol de las muestras). Puesto que este componente del tampón de las muestras afecta la solubilidad y movilidad de las proteínas, debe considerarse como un componente necesario de la misma; es más, todas las muestras que van a compararse deben contener la misma concentración de 2-mercaptoetanol (Ochs, 1983).

Para minimizar la presencia de proteínas contaminantes las soluciones deben filtrarse por filtros de nitrocelulosa (0.45 μ m) y usar guantes en la manipulación de los geles y material de electroforesis.

Uso de reductores fotográficos para la decoloración. Reciclado de los geles. El tratamiento con reductores fotográficos (Switzer *et al.*, 1979; Oakley *et al.*, 1980; Wray *et al.*, 1981) elimina la ligera película gris que en ocasiones queda por encima de la superficie del gel, disminuye el fondo y aumenta el contraste. Se puede utilizar cuando las bandas aparecen sobreteñidas o para eliminar los espejos aparecidos por una agitación deficiente. Además, estos reductores permiten la decoloración total de geles con una tinción insuficiente o con un fondo excesivo, para su posterior reciclado (esto es, reprocesado del gel mediante el procedimiento de tinción). El uso de una dilución adecuada de la solución reductora permite controlar la velocidad del proceso de decoloración. No obstante, la solución sulfato cúprico-tiosulfato propuesta por Switzer para la decoloración de geles produce en ocasiones un efecto muy persistente convirtiéndose en un problema fundamental el bloqueo de la reacción de decoloración del gel que en ocasiones continúa, aunque con una tasa muy baja, a pesar del extensivo lavado en agua, produciéndose la decoloración total del gel. Este efecto ha sido observado por otros autores (Poehling y Neuhoff, 1981; Eschenbruch y Bürk, 1982). El carácter incontrolable e impredecible del proceso ha llevado a algunos estudios para intentar conseguir una optimización de los parámetros de la reacción de decoloración (Marshall, 1984). En nuestro caso, cuando se requirió el uso del reductor se optó por la inmediata desecación del gel tras el lavado exhaustivo con agua.

Mecanismo de la tinción. El conocimiento que se tiene con respecto a los mecanismos de las reacciones que comporta la tinción con nitrato de plata no es satisfactorio. Teniendo en cuenta las diferentes soluciones que se adicionan para facilitar o mejorar la tinción, las reacciones implicadas parecen complejas y en ocasiones el acusado carácter empírico de los estudios sobre la tinción de plata, le dan a esta metodología un cierto sabor "alquimista". Se ha propuesto un gran número de hipótesis que tratan de explicar la reducción preferente de los iones plata en presencia de las proteínas (Wray *et al.*, 1981; Dion y Pomenti, 1983; Irie y Sezaki, 1983; Scheleider y Watterson, 1983; Mold *et al.*, 1983; Tsutsui *et al.*, 1985; Heukeshoven y Dernick, 1985). Además, no está claro si el mecanismo de la tinción amoniacal de plata alcalina es completamente diferente del de la tinción con solución de nitrato de plata en un medio ligeramente ácido o si sólo existe una diferencia gradual, sin importancia, entre ellas.

Las dos cuestiones fundamentales acerca de la química y el mecanismo molecular de la tinción de plata son: cuál es el paso inicial para la formación del grano de plata y

qué aminoácido (o aminoácidos) es responsable de la unión y reducción preferencial de los iones plata.

Se ha sugerido (Switzer *et al.*, 1979; Heukeshoven y Dernick 1985) que las etapas de desarrollo de la imagen en color durante el proceso de tinción de proteínas con plata son comparables a las del proceso fotográfico en cuanto al mecanismo de amplificación física que ocurre durante la exposición y revelado de una emulsión fotográfica: los núcleos de cristales de plata formados por la luz catalizan la posterior reducción de los iones plata y el desarrollo de la imagen fotográfica. En el proceso de tinción de proteínas con plata la formación de lugares de nucleación iniciales ocurre por una reducción preferente de los iones plata, que han formado complejo con determinados aminoácidos de las proteínas, por acción del tratamiento con formaldehído. Esta formación de lugares de nucleación va seguida por una rápida acumulación de depósitos de plata metálica resultantes de la reducción de los iones de plata libres presentes en el gel o en la solución, dando lugar a la imagen que se obtiene durante el revelado. De acuerdo con esta hipótesis está claro que el tratamiento previo del gel con agentes reductores (formaldehído o glutaraldehído) facilita la reducción primaria de los iones plata a plata metálica para la formación de los núcleos iniciales sobre los que se producirá la deposición adicional de iones plata durante el revelado, ya que estos agentes reductores proporcionan un ambiente libre de grupos y radicales oxidantes, si bien tal y como se ha indicado con anterioridad, algunos autores atribuyen una participación aun más directa a estas sustancias en el desarrollo de la tinción.

Durante el revelado, las bandas aparecen coloreadas en castaño oscuro o negro, a veces en gris. Existen varios factores responsables de las distintas coloraciones observadas tales como el tamaño, densidad, y tasa de formación de los granos de plata (Heukeshoven y Dernick, 1985) o la configuración y longitud de los enlaces formados (Nielsen y Brown, 1984).

La cisteína, metionina, lisina, y los ácidos glutámico y aspártico, son los aminoácidos que normalmente se consideran responsables de la unión con los iones Ag^+ y del inicio de la tinción. Concretamente se supone que el aminoácido lisina es esencial como blanco para el glutaraldehído cuyos radicales, a su vez, servirían como puntos de unión para los iones plata iniciando de esta manera la tinción (Dion y Pomenti, 1983; Irie y Sezaki, 1983; Scheleider y Watterson, 1983). En cuanto a los grupos sulfhidrilo de las cisteínas, parece que contrariamente a lo indicado por Wray *et al.* (1980) no intervienen en la tinción, tal y como indican los resultados de los experimentos realizados con proteínas que tienen bloqueados los grupos tiol de sus cisteínas o carecen

de este aminoácido (Heukeshoven y Dernick, 1985). Lo mismo ocurre con la metionina, la cual de acuerdo con los experimentos de estos autores tampoco resulta esencial para la tinción. Los experimentos realizados con poliaminoácidos sintéticos (Heukeshoven y Dernick, 1985) indican que la histidina es el aminoácido más importante para la unión y subsiguiente inducción de una tinción de plata efectiva. Los otros aminoácidos básicos, los ácidos, así como la prolina contribuyen a la susceptibilidad de las proteínas a la tinción, si bien en menor medida. Los grupos funcionales ácidos y básicos de las proteínas, así como del SDS y de ciertos colorantes se han considerado también como lugares de unión de los iones plata y por lo tanto de importancia para la tinción argéntica (Wray *et al.*, 1981; Dion y Pomenti, 1983; Irie y Sezaki, 1983; Mold *et al.*, 1983), si bien existen resultados que contradicen esta consideración (Heukeshoven y Dernick, 1985). No obstante, al margen de estas consideraciones tal y como proponen Scheleider y Watterson (1983), probablemente el estado de fosforilación, la naturaleza ácida de una proteína o la presencia de grupos sulfihidrido no pueden ser los únicos criterios para que se produzca una tinción positiva de las proteínas.

La estructura secundaria o terciaria de las proteínas puede ser importante en el mecanismo de la tinción de plata. Para que se produzca la unión de los iones plata y la formación de compuestos estables, es necesario que los grupos funcionales de las proteínas sean accesibles y que se produzca una ordenación estereométrica definida. Cabe por lo tanto esperar que una proteína tratada con SDS (desplegada) sea más reactiva que una proteína nativa (Heukeshoven y Dernick, 1985).

Carácter cualitativo o semicuantitativo de la tinción. La capacidad del nitrato de plata para interactuar con las proteínas de forma estequiométrica es un punto muy controvertido, ya que aunque se han llevado a cabo varios experimentos para cuantificar las bandas de proteína teñidas con esta sal (Switzer *et al.*, 1979; Poehling y Neuhoff, 1981; Giulian *et al.*, 1983; Irie y Sezaki, 1983; Mold *et al.*, 1983) el uso de este método de tinción para la caracterización cuantitativa está sujeto a muchas incertidumbres. La sensibilidad de la tinción con nitrato de plata es variable para las distintas proteínas individuales (Switzer *et al.*, 1979; Morrissey, 1981; Poehling y Neuhoff, 1981; Friedman, 1982) y dependiente de la concentración de proteína, siendo mucho mayor para concentraciones bajas que para las concentraciones más altas de proteína (Poehling y Neuhoff, 1981). La relación entre intensidad de la tinción y cantidad de proteína, que es lineal dentro de un rango de concentración de al menos dos o tres órdenes de magnitud para el colorante azul de Coomassie, sólo muestra relación lineal dentro de un

rango de un orden de magnitud en el caso de la tinción con nitrato de plata (Giulian *et al.*, 1983). Muchos colorantes aniónicos ofrecen linealidad dentro de un amplio rango de concentración sin saturación, mientras que la tinción de plata ofrece una sensibilidad mucho mayor pero la linealidad del procedimiento de tinción es mucho más restringida. Por lo tanto, su uso para la caracterización cuantitativa debe efectuarse con cautela. Sin embargo, se considera un método excelente cuando sólo se dispone de cantidades mínimas de proteínas y se requiere una caracterización únicamente cualitativa o semicuantitativa.

No obstante, la existencia de proteínas que se tiñen débilmente o no se detectan mediante tinción de plata (Irie *et al.*, 1982; Scheleider y Watterson, 1983) podría cuestionar el uso de esta técnica incluso como método cualitativo. Además, la variabilidad observada entre los diferentes métodos de tinción (Friedman, 1982; Scheleider y Watterson, 1983) constituye un problema. Los resultados del trabajo de Scheleider y Watterson (1983) muestran que esta incapacidad para detectar determinadas proteínas se puede explicar por la pérdida de las mismas (efecto notable en la zona de polipéptidos de bajo peso molecular) cuando se usan algunos protocolos que conllevan lavados muy prolongados y una fijación insuficiente. Este fenómeno proporciona además una explicación al hecho de que dos tinciones con diferente protocolo den lugar a resultados cualitativamente diferentes. Determinados tratamientos basados en la fijación con aldehídos y pretinción con azul de Coomassie (Morrisey, 1981; Scheleider y Watterson, 1983; Irie y Sezaki, 1983) pueden impedir la pérdida de proteínas del gel y aumentar la reactividad de ciertas proteínas a la tinción con nitrato de plata permitiendo una tinción menos sesgada de todos los polipéptidos presentes en el gel. No obstante, debe considerarse la posibilidad de que determinados polipéptidos estén presentes en el gel pero que no reaccionen con el nitrato de plata por carecer de los aminoácidos que se consideran esenciales para que se produzca la unión de los iones plata y el inicio de la reacción de tinción (Heukeshoven y Dernick, 1985).

4.5. GRADO DE AJUSTE DE LAS TÉCNICAS DESARROLLADAS A LOS REQUERIMIENTOS DEL ESTUDIO

Los protocolos para la preparación de las muestras, electroforesis en gel y tinción fueron ideados o adaptados para conseguir el análisis de las proteínas de rotíferos individuales pertenecientes a la especie *Brachionus plicatilis*.

El método desarrollado para la disolución y homogeneización de los individuos permitió la elaboración de muestras con un único rotífero, y por lo tanto su aplicación en los geles de poliacrilamida para la separación de las proteínas de cada individuo mediante electroforesis. Los métodos de separación de proteínas utilizados en combinación con la tinción argéntica, mucho más sensible que la habitual tinción con azul de Coomassie, han hecho posible la obtención del patrón de las proteínas mayoritarias de un único rotífero de la especie *Brachionus plicatilis*, un pequeño organismo de unos 200 μm de longitud (véase, p.e., Serra y Miracle, 1983) y con un contenido en proteínas de $0.35 \pm 0.12 \mu\text{g}$ (Kuhle y Kleinow, 1985). El nivel de detección alcanzado con la modificación de la tinción de plata permite ver de 37 a 49 subunidades polipeptídicas, de aquellas proteínas que constituyen mayoritariamente el organismo (véanse capítulos posteriores).

Con objeto de determinar si este patrón se podía considerar adecuado para la caracterización individual de los rotíferos y la evaluación de la variabilidad intraespecífica, se efectuó el estudio comparativo que se detalla a continuación.

Se separaron mediante electroforesis una serie de muestras preparadas diferentemente. Unas se habían preparado a partir de un número reducido de individuos (1, 5, 10, y 15 individuos) y siguiendo el protocolo que se ha detallado con anterioridad en el apartado 4.2 ("Protocolo para la preparación de las muestras"), mientras que otras procedían de dos extractos preparados a partir de un gran número de individuos, todos ellos de la misma cepa. Para preparar cada uno de estos dos últimos extractos se filtró medio litro de un cultivo denso de rotíferos (aprox. 100 individuos/ml), primero a través de una gasa para retener los agregados algales, y a continuación por una malla de Nylal de 50 μm de poro que retiene a los rotíferos. El residuo del filtrado se lavó repetidas veces con agua de 12 g/l de salinidad. Los rotíferos de uno de los filtrados se resuspendieron directamente en 1 ml de solución solubilizadora de las proteínas (para su composición, véase en el apartado 4.2 "Protocolo para la preparación de las muestras"), mientras que los rotíferos del otro filtrado se resuspendieron en 700 μl de una solución tamponada (composición: sacarosa 6.45 (p/v); polivinilpirrolidona 1% (v/v); CIMg 2 mM; ClK 20 mM; 2-mercaptoetanol 0.3% (v/v); tricina 15 mM, pH 7.4) para proceder a su homogeneización mediante sonicación. La sonicación se realizó aplicando 8 pulsos de 40 W durante 15 segundos separados por intervalos de 30 segundos en un aparato Labsonic 2000-Braum con una micropunta Needleprobe. Posteriormente la muestra sonicada se mezcló con la solución solubilizadora en proporción 7:3. Se sometieron a electroforesis una muestra de 25 μl de cada uno de estos extractos masivos y dos

muestras de las preparadas a partir de cada uno de los números de individuos que se han indicado al principio. Tras la electroforesis el gel se fijó y se tiñó con azul de Coomassie. Este colorante sólo detectó bandas en las carreras correspondientes a las muestras de los dos extractos preparados a partir de un gran número de individuos. No se observaron diferencias entre estos dos patrones que indicaran la necesidad del tratamiento de sonicación, lo cual implicaba que bastaba con la aplicación directa de la solución desnaturizante para lograr una buena disolución de los individuos. La parte del gel que contenía estos patrones se separó y el resto del gel se sometió a una tinción con nitrato de plata. Este método de tinción reveló bandas de proteína en todas las carreras. Los patrones de proteínas obtenidos a partir de los extractos proteicos de 5 rotíferos eran comparables en cuanto a complejidad e intensidad de sus bandas a los patrones obtenidos mediante tinción de Coomassie a partir de las muestras masivas, con una concentración de proteínas unas 200 veces mayor.

Los resultados de este estudio comparativo mostraron diferencias no sólo en la sensibilidad de los dos métodos de tinción, sino también en la especificidad y selectividad para teñir determinadas proteínas; la tinción con nitrato de plata presentó un comportamiento diferencial en relación con la tinción de Coomassie, tiñendo intensamente bandas que no se habían teñido o lo habían hecho muy ligeramente durante el tratamiento con este colorante.

Los patrones de proteínas obtenidos a partir de muestras que contenían un único individuo presentaban una riqueza y diversidad en bandas ligeramente inferior a las de los patrones que integraban proteínas de varios individuos. No obstante, estos patrones pueden considerarse lo suficientemente complejos y representativos de las proteínas constituyentes de los individuos de esta especie suficientes para el estudio de su variación según el genotipo y/o el estado fisiológico de los individuos.

PARTE SEGUNDA: EL ESCENARIO ORGÁNICO DE LA MIXIS: VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA HEREDABLE Y ASOCIADA A LA EDAD.

En esta segunda parte se analiza la variabilidad intraespecífica. Puesto que la comparación a este nivel implica el análisis de un gran número de caracteres de muchos especímenes se ha empleado la electroforesis de proteínas totales combinada con la técnica de tinción cuya puesta a punto se describe en el capítulo 4. Los factores principales que afectan la composición proteica de los individuos de una misma especie cultivados en condiciones ambientales uniformes son la variación genética, el sexo, la edad, y las diferencias fisiológicas. Así, mientras el capítulo 5 aborda el estudio de la variabilidad intraespecífica con el fin de evaluar la variación genética, en el capítulo 6 se estudia la variabilidad debida a la edad de los individuos.

5. ESTUDIO DE LOS PATRONES DE PROTEÍNAS TOTALES EN DIFERENTES CLONES DE *BRACHIONUS PLICATILIS*

5.1. INTRODUCCIÓN

Los rotíferos planctónicos pueden clasificarse en géneros bien definidos, pero sus especies son, en muchos casos, difícilmente distinguibles. Además, la variabilidad dentro de las especies es grande, tal y como demuestra el uso frecuente de categorías taxonómicas intraespecíficas: "Formenkreis", "Artgruppe", subespecie, variedad, forma (p.e., Kutikova, 1970; Koste, 1978; Pejler, 1977b). Esto se complica adicionalmente por la plasticidad en los rasgos morfológicos que muestran las especies sujetas a cambios ambientales, y por la existencia de fenómenos bien descritos tales como la ciclomorfosis en la que los animales sufren cambios morfológicos sustanciales de forma estacional (Hutchinson, 1967). De acuerdo con Hubendick (1962), la fauna hololímnic (i.e., con toda su vida activa desarrollada en el agua) se caracteriza por presentar su mayor grado de diversificación en las categorías taxonómicas más bajas y en consecuencia debe existir una elevada diversidad genética y ecofenotípica a nivel intraespecífico (Pejler, 1977a). Por ejemplo en *B. plicatilis* se distinguen diferentes morfologías (Sudzuki, 1987) y recientemente se aceptan dos formas claramente diferenciadas, denominadas S y L (Ito *et al.*, 1981; Hirayama, 1985; Fu *et al.*, 1991a,b; Rumegan *et al.*, 1991)

Hasta hace poco tiempo, la aproximación al problema de la diversidad genética intraespecífica se ha llevado a cabo usando únicamente métodos morfológicos (Kutikova, 1970; Pourriot, 1973a; Koste, 1978), pero actualmente existen varios trabajos publicados en los cuales se emplea el análisis electroforético isoenzimático (King, 1977a; King y Snell, 1977a; King y Zhao, 1987; Snell, 1979; Snell y Winkler, 1984; Serra y Miracle, 1985; Ricci *et al.*, 1989; Pagani *et al.*, 1991). Estos estudios han confirmado el alto nivel de variabilidad existente en las especies de rotíferos. En uno de estos trabajos (Snell y Winkler, 1984) se propone el uso de los caracteres isoenzimáticos, como más conveniente que el uso de los rasgos morfológicos, para el agrupamiento taxonómico de grupos que como los rotíferos zooplanctónicos presentan modificaciones morfológicas ambientales importantes.

En el presente capítulo se propone el uso de un método electroforético diferente para estudiar la variabilidad intraespecífica, el cual consiste en el análisis de proteínas totales. El desarrollo de las técnicas de tinción de plata de electroforegramas de

proteínas totales que se han descrito en el capítulo anterior hace posible la aplicación de este tipo de análisis a una sola hembra de rotífero y permite su caracterización mediante un gran número de bandas de proteínas. Asimismo, es posible obtener información adicional acerca de las proteínas mayoritarias y de sus pesos moleculares. De esta forma, un único análisis da una información más amplia aunque más grosera de los individuos que una serie de ensayos isoenzimáticos, los cuales implican casi necesariamente diferentes individuos para cada enzima. No obstante, no se trata de una aproximación alternativa, sino más bien complementaria, con respecto a la aproximación isoenzimática, ya que es capaz de mostrar variación no heredable pero no permite una interpretación genética directa de las diferencias entre bandas de proteína. El análisis de proteínas totales puede considerarse como intermedio entre el análisis morfológico y el isoenzimático, ya que esta técnica presenta una sensibilidad en la detección de diferencias y un grado de globalidad intermedias entre las otras dos aproximaciones, refleja la variabilidad ambiental, y es capaz de mostrar tanto cambios estructurales como funcionales.

El análisis de proteínas totales ha sido usado en el presente trabajo para estudiar la variación intraespecífica en 44 clones del rotífero *Brachionus plicatilis*, aislados en diferentes momentos, a partir de pequeñas lagunas del área costera mediterránea (véase la figura 2.5) y una laguna endorreica. Dentro de las especies de rotíferos, *B. plicatilis* es con mucho la más estudiada y por lo tanto, los resultados obtenidos aquí han podido ser comparados con la información preexistente obtenida por medio de otras aproximaciones al problema. Se discute además el posible uso de esta aproximación electroforética en la sistemática del grupo.

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se consideraron 44 cepas de la especie *Brachionus plicatilis* mantenidas en el laboratorio bajo condiciones controladas durante varios años (para una descripción detallada de dichas condiciones, véase el capítulo 3). De ellas, 42 eran originarias de 9 lagunas costeras del Mediterraneo español, una (la denominada CU) fue aislada de una laguna endorreica, y otra de las cepas (FCA) procedía de un cultivo del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal procedente a su vez del marjal circundante al mismo (para detalles del origen de las cepas, véanse la tabla 2.1, y la figura 2.5 en el capítulo 2). Estas cepas se recogieron durante la primavera, verano y otoño de varios años, y algunas de ellas han sido caracterizadas en estudios anteriores (Serra y Miracle 1983,

1985 y 1987; Serra, 1987; Miracle y Serra, 1989). Todos los cultivos de estas cepas orientados a la obtención de muestras para electroforesis se mantuvieron a una temperatura de 25°C en agua de mar diluida (12 g/l de salinidad) y bajo una fuente de iluminación constante. Como alimento se utilizó el alga prasinofícea *Tetraselmis sp.*. En primer lugar se establecieron cultivos masivos preexperimentales para cada una de las cepas objeto de estudio. A partir de cada uno de ellos se escogieron al azar 20 hembras partenogénicas portadoras de huevos. La recolección de estas hembras se llevó a cabo durante la fase avanzada de crecimiento exponencial. Se elige un periodo avanzado de la fase exponencial de crecimiento con el objeto de que la población se acerque a la distribución de equilibrio en las clases de edad que corresponde a esta fase (Lotka, 1922) y que depende únicamente de la tasa intrínseca de crecimiento, si la fecundidad y mortalidad específicas de edad permanecen constantes. Además, al tener el cultivo una mayor densidad se facilita la recolección de individuos. La determinación de esta fase se establece atendiendo a que las hembras portadoras de huevos sean bastante abundantes (aproximadamente la mitad de la densidad máxima) y que el cultivo tenga color verde, lo cual indica la abundancia del alimento. Las hembras portadoras de huevos se colocaron por grupos de 5 en pocillos con 0.5 ml de medio de cultivo. Cuando un alto porcentaje de huevos había eclosionado, después de un periodo de unas 4 horas en la cámara de cultivo, se seleccionaron aleatoriamente de entre la descendencia 10 neonatos hembra. Los recién nacidos se reconocen por su menor tamaño y porque no llevan huevos. Estos individuos experimentales se cultivaron individualmente bajo las condiciones previamente indicadas. El medio de cultivo con *Tetraselmis sp.* (5×10^5 células/ml), se renovó diariamente, controlándose previamente la densidad. Tras 48 horas de cultivo individual se obtuvieron los extractos proteicos de 8 de las 10 hembras aisladas para cada cepa. Todas las hembras utilizadas fueron hembras amícticas. Bajo las condiciones experimentales empleadas, los individuos no tienen descendencia hasta transcurridas 48 horas desde su nacimiento, por lo que es necesario esperar este tiempo para poder tipificar sin incertidumbre a los individuos experimentales como hembras amícticas, si su descendencia es femenina, o como hembras mícticas, si su descendencia es masculina.

Los extractos proteicos de estos individuos se utilizaron como muestras en la separación electroforética, a fin de obtener los patrones de proteínas totales para cada uno de los 8 individuos correspondientes a cada una de las 44 cepas.

La extracción y homogeneización de las proteínas de cada rotífero se llevó a cabo tal y como se describe en el capítulo de métodos bioquímicos (capítulo 4). La separación

electroforética de las proteínas y su posterior visualización mediante tinción se efectuaron también de acuerdo con la metodología descrita en el mencionado capítulo.

Las bandas de cada uno de los electroforegramas se numeraron de acuerdo con su movilidad electroforética teniendo en cuenta el total de bandas distintas observadas considerando todos los patrones obtenidos. Para cada una de las bandas se registró un número que indicaba ausencia (0), o su intensidad cuando estaba presente. De esta manera la intensidad fue codificada siguiendo una escala ordinal en orden de intensidad creciente cuyo rango de valores para cada banda se estableció en función del número de grados de intensidad que pudieron distinguirse. La comparación se realizó de forma independiente para cada banda y por lo tanto los valores de intensidad asignados a las bandas de un mismo patrón no son necesariamente comparables entre sí.

Los patrones observados para cada una de las cepas, una vez codificados se utilizaron para establecer relaciones entre ellas mediante el uso de técnicas de clasificación numérica. La proximidad entre los patrones observados para cada una de las cepas se estableció utilizando como medida el índice de similaridad de Gower, en el que se incluyeron las dobles ausencias (Índice de Gower sin ponderación, Legendre y Legendre, 1983). El análisis de agrupamiento se efectuó siguiendo el método UPGMA (Sneath y Sokal, 1973).

Además del estudio electroforético de las cepas, también se caracterizó mediante inspección microscópica el tipo morfológico al que éstas pertenecían. Para ello se utilizó el criterio morfológico definido por Ito *et al.* (1981; véase también Hirayama, 1985) según el cual se distinguen los tipos S (*small*, pequeño) y L (*large*, grande). Este criterio de asignación se basa en el tamaño del cuerpo y en la morfología de las espinas de la parte anterior de la loriga (figura 5.1). El tipo S tiene una loriga pequeña y redondeada, mientras que la del tipo L es comparativamente mayor y alargada. Las espinas anteriores de la loriga en el tipo S son puntiagudas y en el tipo L forman un ángulo más obtuso. Dado que se carece de criterios cuantitativos para dicha clasificación, las formas poco claras se clasificaron en un grupo intermedio, I. Además también se determinó el comportamiento de estas cepas en relación con la producción de huevos de resistencia durante su ciclo reproductivo sexual y el modo en que estos son transportados por las hembras. A este respecto se han observado dos comportamientos distintos por parte de las hembras de *Brachionus plicatilis* (Okauchi y Fukusho, 1985a; Serra, 1987): los huevos sexuales pueden ser transportados externamente por las hembras hasta que se desprenden de ella o permanecer en el interior del cuerpo de la hembra hasta la muerte de ésta (figura 5.1).

A partir de los distintos tipos electroforéticos observados entre las 44 cepas se establecieron grupos en orden al morfotipo a que estos pertenecían. Las relaciones entre estos grupos se establecieron mediante la técnica del análisis discriminante en su modalidad paso a paso. El análisis discriminante realizado se define en el apartado de Resultados y fue computado utilizando la rutina de programación BMDP (Dixon *et al.*, 1983) implementada en un ordenador IBM-AT.

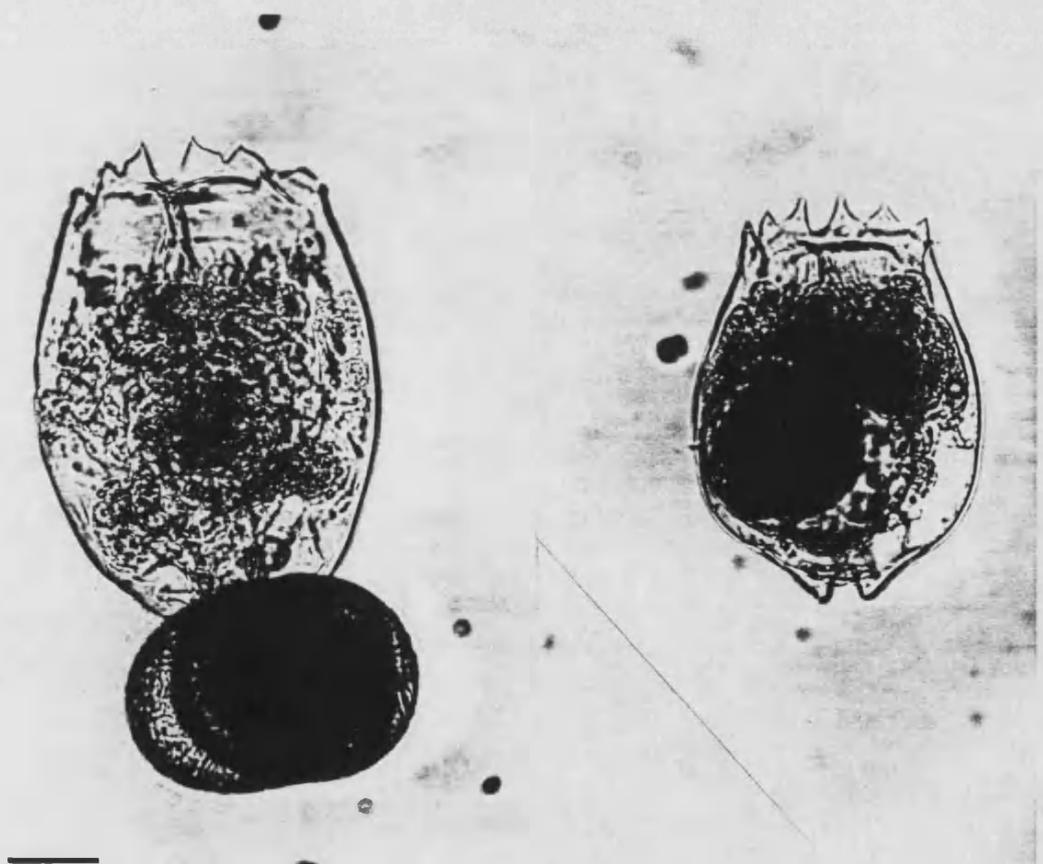


Figura 5.1. Microfotografía de dos clones de *Brachionus plicatilis* caracterizados como pertenecientes a los tipos morfológicos L (izquierda), y S (derecha). Obsérvese la posición de los huevos durables. La barra horizontal equivale a 50 μm .

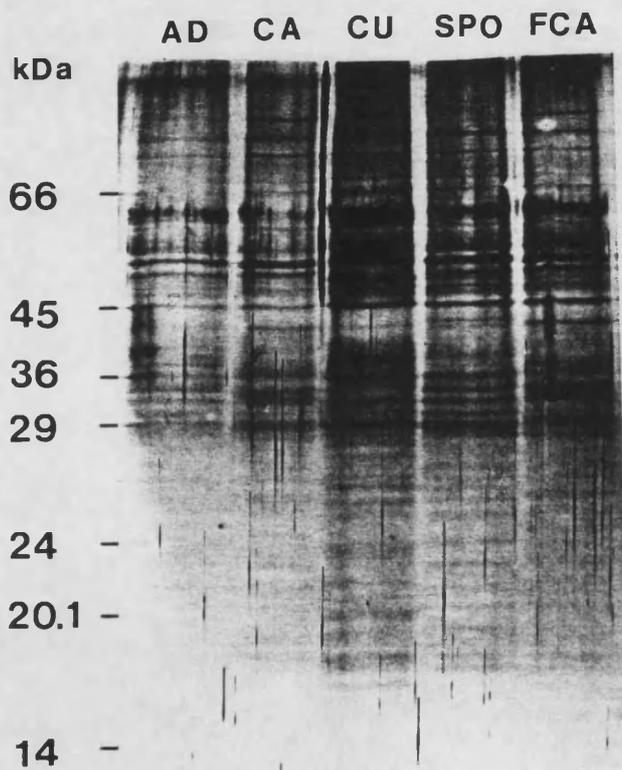


Figura 5.2. Fotografía de los patrones de proteínas de los clones que se indican.

5.3. RESULTADOS

El análisis de proteínas totales de los individuos de *Brachionus plicatilis* pertenecientes a los 44 clones estudiados reveló la existencia de 16 tipos de patrones distintos. Los resultados se sumarizan en la tabla 5.1 en la que se indican los tipos observados para cada fecha y lugar de origen. Estos tipos fueron establecidos a partir de la inspección detallada de los electroforegramas obtenidos (véase como ejemplo la figura 5.2),

inspección que tuvo como resultante la codificación que se muestra en la figura 5.3 y la tabla 5.2.

Las diferencias observadas son diferencias genéticas ya que para evitar cualquier diferencia debida a la edad, a las condiciones de alimento o a otras condiciones ambientales, las electroforesis se llevaron a cabo utilizando muestras con hembras amícticas únicas de dos días de edad y aisladas de cultivos mantenidos en el laboratorio bajo condiciones estables durante un largo periodo de tiempo. Los patrones de proteínas encontrados fueron totalmente repetitivos para los individuos pertenecientes a un mismo clon.

Los electroforegramas de algunos clones mostraron áreas pobremente teñidas debido a la baja carga proteínica de las muestras y a las condiciones de tinción del gel. Las bandas correspondientes a estas áreas (véanse las zonas delimitadas por líneas discontinuas en la figura 5.3) se consideraron como datos perdidos y se desestimaron en todos los análisis realizados subsecuentemente con los patrones previamente obtenidos.

Los individuos de *Brachionus plicatilis* muestran un patrón de proteínas totales con un número de bandas que oscila entre 37 (cepas FCA y CA) y 49 (cepa CU), siendo el valor promedio de 42.8 bandas (véase la figura 5.3). Del número total de 67 bandas distintas observadas, 19 se presentan de forma constante en todas las cepas y 12 de ellas se observan con la misma intensidad. Esto es, aproximadamente la mitad del número medio de bandas de proteína detectadas por individuo son comunes a todas las cepas estudiadas, pero sólo una cuarta parte de aquel total de bandas son iguales también en intensidad.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que existe un gran nivel de variabilidad dentro de la especie a pesar de que los individuos analizados se recogieron en un área geográfica cuya distancia máxima es sólo de alrededor de 850 km; aunque hay que considerar que este área implica un gradiente latitudinal de temperatura, e incluye aguas con proporciones iónicas y condiciones tróficas diferentes.

Contrastando con esta diversidad, los clones derivados a partir de individuos aislados de una misma laguna en la misma fecha, presentan el mismo patrón electroforético, con la excepción de las procedentes de la Albufera Nueva de Adra, donde se encontraron dos patrones electroforéticos distintos (AD1 y AD2) entre los cuatro clones analizados (véase la tabla 5.1). Aunque el número de clones estudiados para cada lugar y fecha de aislamiento es demasiado bajo como para confirmar esta hipótesis de uniformidad intrapoblacional o escasa variabilidad entre clones de una misma población, ésta se ve apoyada por el hecho de que también se observó

homogeneidad entre los electroforegramas cuando se analizó un número mayor de clones procedentes de una misma población. Concretamente, los 14 clones aislados a partir de muestras contemporáneas tomadas en El Hondo de Elche, muestran exactamente el mismo patrón de proteínas (HO1 en la tabla 5.1). También se observa uniformidad entre los patrones de las poblaciones procedentes de esta misma localidad y muestreadas en la misma estación del año pero en años diferentes.

Tabla 5.1. Origen geográfico y estacional de las cepas. Se indican el número de cepas aisladas de cada laguna, la fecha del aislamiento y la denominación del tipo electroforético.

Laguna	Estación (año)	Número de cepas analizadas	Número de tipos observados	Denominación ^a
Albufera Nueva de Adra	Primavera (1983)	4	2	AD1, AD2
Albufera Honda de Adra	Primavera (1981)	1	1	AD
	Otoño (1982)	3	1	AD3
	Primavera (1983)	2	1	AD3
Rambla de Aguas, Charca Sur	Primavera (1983)	3	1	MOS
Rambla de Aguas, Charca Norte	Primavera (1983)	1	1	MON
Humedal del Hondo de Elche	Otoño (1982)	5	1	HO2
	Otoño (1983)	2	1	HO2
	Primavera (1983)	14	1	HO1
Laguna del Altet	Verano (1981)	1	1	SPO
	Otoño (1982)	1	1	SPO1
	Otoño (1983)	2	1	SPO2
La Celadilla	Verano (1981)	1	1	CU
I.A.T.S. ^b	Otoño(1980)	1	1	FCA
Marjal de Torreblanca	Otoño(1980)	1	1	CA
La Ricarda	Primavera(1983)	1	1	RI
La Massona	Primavera (1983)	1	1	MAS

a. Cuando el mismo tipo electroforético se observó en diferentes momentos se utilizó la misma denominación.

b. I.A.T.S.: Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (Castellón).

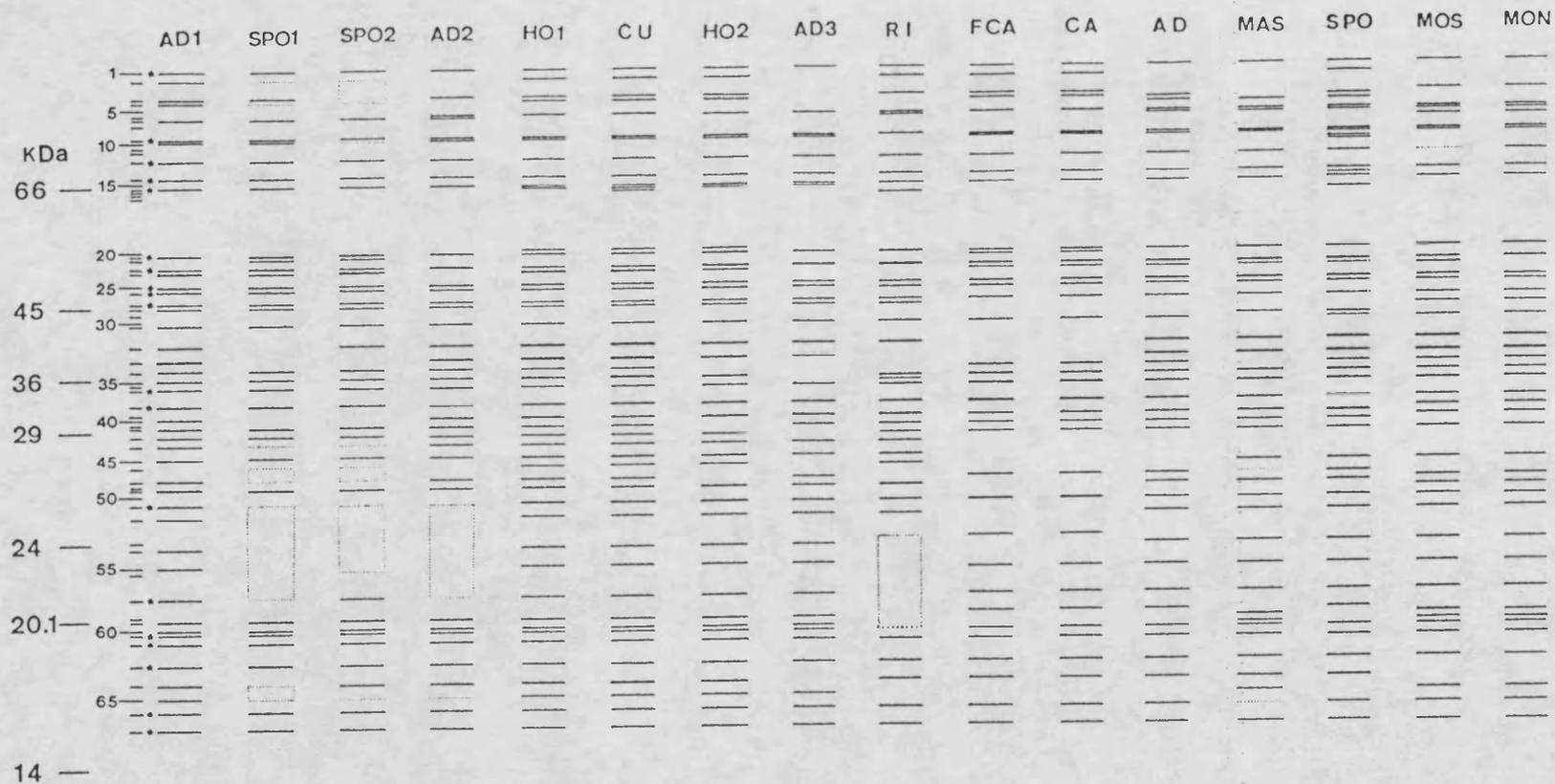


Figura 5.3. Esquema de los electroforegramas correspondientes a los clones de *Brachionus plicatilis* indicados en la tabla 5.1. La posición de los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda. Las bandas aparecen numeradas de acuerdo con su movilidad a la izquierda de la figura. Las líneas discontinuas indican áreas pobremente teñidas, las bandas visibles de las cuales se consideraron como datos perdidos en los análisis subsiguientes.

Tabla 5.2. Intensidad de las bandas correspondientes a diferentes cepas de *Brachionus plicatilis* a 25°C y 12 g/l de salinidad (véase la figura 5.3). Para cada una de las bandas, la intensidad fue codificada siguiendo una escala ordinal (0 indica ausencia, y la presencia es un número mayor o igual que 1 variable dentro del rango que se indica).

número de banda	rango	Cepa															
		AD1	SPO1	SPO2	AD2	HO1	CU	HO2	AD3	RI	FCA	CA	AD	MAS	SPO	MOS	MON
1	[0-1]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	[0-1]	1	?	?	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0
3	[0-1]	1	1	?	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1
4	[0-1]	1	?	?	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0
5	[0-1]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
6	[0-1]	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	[0-1]	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
8	[0-1]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
9	[0-1]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	[0-1]	1	1	?	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
11	[0-1]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
12	[0-1]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
13	[0-1]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1
14	[0-1]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	[0-1]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16	[0-1]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	[0-1]	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
18	[0-1]	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	[0-1]	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
20	[0-1]	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	[0-3]	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2	3	2	2

Tabla 5.2. Continuación.

número de banda	rango	Cepa															
		AD1	SPO1	SPO2	AD2	HO1	CU	HO2	AD3	RI	FCA	CA	AD	MAS	SPO	MOS	MON
22	[0-1]	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
23	[0-1]	1	2	1	2	1	1	2	2	3	2	2	2	3	3	2	2
24	[0-3]	3	2	3	0	3	3	2	0	0	1	1	1	1	1	2	0
25	[0-3]	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	3	3	3	2	1
26	[0-2]	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	1
27	[0-1]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
28	[0-2]	1	1	2	1	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0
29	[0-1]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
30	[0-2]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
31	[0-1]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
32	[0-3]	1	0	1	1	3	3	1	1	1	0	0	2	2	3	3	2
33	[0-6]	6	0	0	1	6	6	1	1	0	0	0	2	2	3	3	3
34	[0-1]	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1
35	[0-3]	2	1	1	1	2	3	1	0	2	3	2	2	2	3	1	1
36	[0-1]	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
37	[0-3]	1	1	2	2	1	1	1	1	2	3	3	2	2	3	2	2
38	[0-3]	2	2	1	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2	2	1	1
39	[0-1]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
40	[0-3]	1	0	0	1	2	1	2	2	2	1	1	2	2	3	0	0
41	[0-1]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
42	[0-1]	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
43	[0-1]	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
44	[0-1]	1	?	?	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0

Por otra parte las muestras procedentes de localidades distintas no presentan en ningún caso el mismo tipo de patrón electroforético, aún cuando estas muestras fueran tomadas en lagunas situadas geográficamente muy próximas, incluso en una misma zona húmeda, como es el caso de las Albuferas Nueva y Honda de Adra o las lagunas situadas en la desembocadura de Rambla de Aguas (véase la tabla 5.1 y la figura 2.5).

Los resultados del análisis realizado ponen también de manifiesto la existencia de variación estacional en las cepas de las lagunas muestreadas en diferentes momentos del año.

En la figura 5.4 se presentan los resultados de los dos análisis de similaridad y agrupamiento realizados sobre los datos, uno de ellos utilizando el total de los 16 patrones de proteínas observados y el segundo basado únicamente en los 12 electrotipos que no mostraban zonas de datos perdidos en sus electroforegramas. En ambos análisis, para el cálculo de los coeficientes de similaridad, no se consideraron las bandas inciertas cuando se encontraban presentes en uno de los dos tipos entre los que se realizaba la comparación. En esta figura se indican también algunas de las características de las cepas en cuanto al morfotipo y a la posición del huevo durable (véase el apartado de Material y Métodos) con el fin de compararlas con los resultados del análisis bioquímico. Se observa una fuerte relación entre el tipo morfológico al que pertenece una determinada cepa (S, I, ó L) y la posición, interna o externa, de los huevos durables (véase la figura 5.4). En las cepas pequeñas y de tamaño intermedio (S e I) únicamente se observaron huevos durables internos, mientras que los huevos durables externos parecen ser característicos de las cepas grandes (L). El análisis de los electromorfos muestra la existencia de dos grupos principales, uno constituido por las formas S y algunas intermedias, y el otro por las formas L, el cual incluye el resto de cepas I. La única excepción es el clon AD2, que en una primera apreciación de su tamaño corporal y forma de las espinas anteriores de la loriga se catalogó como una forma S, mientras que los patrones de proteínas totales revelan una mayor similaridad entre este clon y las cepas de morfología intermedia asociadas con el grupo de cepas L.

Con los tres grupos previamente designados (formas S, formas L y formas I) se llevó a cabo un análisis discriminante multivariante basado en 67 variables (bandas de proteína). Este tipo de análisis implica determinados supuestos a los que los datos no se ajustan totalmente. Por ello los resultados completos no se muestran aquí. No obstante, el análisis (véase la tabla 5.3) seleccionó precisamente las bandas que de acuerdo con la imagen visual de los datos brutos (figura 5.3), discriminan entre los tres grupos.

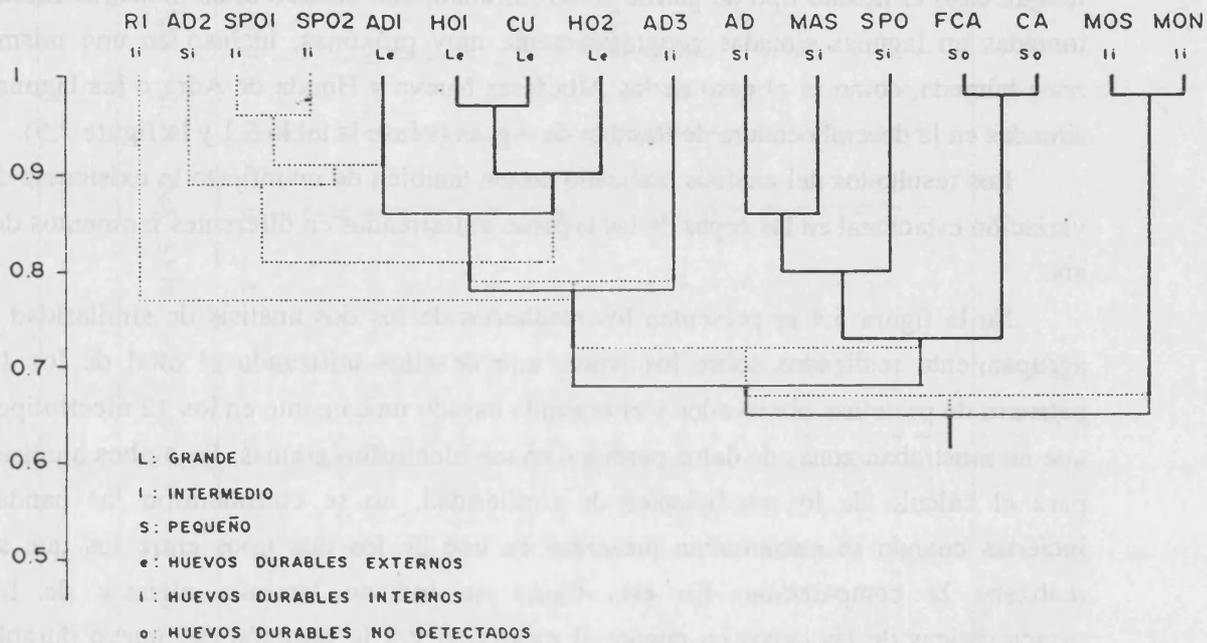


Figura 5.4. Clasificación de los clones de *Brachionus plicatilis* según la similitud de sus patrones de proteínas calculada de acuerdo con el índice de Gower teniendo en cuenta las dobles ausencias. El método de agrupamiento utilizado es el UPGMA. Para cada uno de los tipos electroforéticos encontrados, se indica el morfotipo (S, pequeño; L, grande; e I, intermedio) y la posición de los huevos durables (e, externos; i, internos; o, no detectados) característicos de los clones correspondientes. La línea continua fina indica los resultados del análisis de agrupamiento usando únicamente aquellos tipos electroforéticos que no incluyen áreas con datos perdidos. La línea discontinua corresponde a los resultados del mismo análisis usando el total de electroforegramas. La línea continua gruesa indica la coincidencia entre ambos análisis. A la izquierda se indica la escala de similitud.

Dentro de los dos grupos mayoritarios encontrados en el análisis de agrupamiento, los tipos electroforéticos más similares corresponden a cepas aisladas del ambiente natural durante la misma estación y en el mismo lugar (tal es el caso de SPO1 y SPO2), o a partir de lugares situados muy próximos (por ejemplo los clones MOS y MON, aislados de la misma desembocadura a partir de zonas separadas solamente por unos cuantos metros; y también FCA y CA, el primero de estos clones fue cedido por el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (Castellón) que a su vez lo obtuvo de la

misma localidad de la cual es originaria de cepa CA, aislada algunos años más tarde). No obstante, existen algunas cepas que fueron aisladas de localidades muy distantes (p.e. HO1 y CU) y que aparecen muy cercanas en el análisis de agrupamiento formando un grupo bastante compacto de cepas L.

Tabla 5.3. Resultados del análisis discriminante. Porcentaje de varianza explicada o poder discriminante de las dos variables canónicas, coeficientes asociados a ellas, y evaluación de los valores medios de las mismas para cada morfotipo

	Variable canónica	
	I	II
Porcentaje de varianza	97	3
Coeficientes		
banda 25	-26.8	2.9
banda 26	-8.8	3.6
banda 34	3.5	-1.2
banda 43	8.5	1.6
banda 46	-0.9	-2.8
Valores medios de los grupos		
S (pequeño)	6.3	5.8
I (intermedio)	44.3	-5.5
L (grande)	-28.4	-3.0

5.4. DISCUSIÓN

El análisis de isoenzimas permite una interpretación genética de los patrones electroforéticos, donde los isoenzimas pueden considerarse como aloenzimas de uno o más *loci*, es decir, las diferentes formas moleculares de un determinado enzima pueden relacionarse con la expresión de alelos determinados codificados por *loci* concretos. Dicha interpretación genética puede llevarse a cabo mediante (1) un análisis genético mendeliano concluyente, o mediante (2) el estudio de los zimogramas, los cuales debido

a su simplicidad permitan realizar una interpretación genética directa. Esta segunda aproximación se usa frecuentemente en los estudios realizados con animales partenogénicos donde el cruzamiento de los individuos resulta complicado y laborioso (Snell y Winkler, 1984; Young, 1979a,b; Weider, 1985). Sin embargo, la complejidad de algunos patrones (King y Zhao, 1987; Snell y Winkler, 1984; Serra y Miracle, 1985) y la variabilidad de resultados debida a la metodología empleada (Wolf, 1982) impiden en ocasiones la interpretación genética y aumentan el nivel de error. Por esta razón, los zimogramas se usan con frecuencia únicamente para el establecimiento de diferencias genotípicas (*i.e.*, como fenotipos electroforéticos o electromorfos), con una categoría similar al uso de rasgos morfológicos, pero con la ventaja de que los patrones isoenzimáticos se encuentran menos afectados por la variabilidad ambiental y permiten una distinción más fina.

El método bioquímico utilizado en el presente trabajo, el cual ha sido expuesto detalladamente en el capítulo anterior, permite obtener patrones de proteínas totales a partir de un único individuo presente en la muestra. Los electroforegramas resultantes del análisis del extracto de un individuo completo son lo suficientemente complejos como para que el método resulte efectivo en la detección de diferencias. En este método el patrón electroforético se utiliza globalmente, como un fenotipo, no siendo posible ninguna interpretación acerca de la base génica de la variabilidad intraespecífica observada. Los complejos electroforegramas resultantes del análisis de un organismo completo hacen que sólo sea probable la similaridad entre dos patrones de proteínas si ambos derivan de organismos genéticamente similares. Por lo tanto, si la interpretación genética de los resultados no es esencial para el estudio que se está realizando, un análisis electroforético de las proteínas totales podría complementar o reemplazar provechosamente al análisis isoenzimático, ya que el primero produce un mayor número de bandas a partir de un único individuo, incluso si éste es pequeño. Para obtener un número de bandas similar mediante el análisis de isoenzimas, es necesario analizar un número importante de sistemas enzimáticos y en el caso de los rotíferos, y aun usando técnicas muy especializadas (*e.g.*, Ricci *et al.*, 1989), es necesario al menos un individuo completo para el estudio de cada enzima. Además, una ventaja importante de este método, cuando se aplica a los rotíferos u otros animales pequeños es, que es posible comparar individuos, y por lo tanto obtener una medida del grado de variabilidad entre ellos. El método propuesto es sensible al estado fisiológico del individuo, pero las diferencias en los patrones de proteínas únicamente se hacen evidentes cuando los cambios fisiológicos implicados son importantes; por ejemplo, el

envejecimiento altera el patrón de proteínas pero sólo durante los últimos estadios de la vida; durante gran parte del ciclo vital los patrones de proteínas permanecen constantes (véase el capítulo 6).

Los resultados presentados aquí confirman el carácter politípico de la especie *Brachionus plicatilis*; es decir, la existencia de una fragmentación genética de la misma en tipos bien diferenciados. Este carácter ha sido establecido previamente en otros estudios sobre variabilidad interpoblacional mediante otras aproximaciones metodológicas diferentes: taxonomía clásica basada en rasgos morfológicos (Kutikova, 1970; Koste, 1978; Sudzuki, 1987), estudios biométricos (Serra y Miracle, 1983; Snell y Carrillo, 1984; Fu *et al.*, 1991a), y análisis isoenzimático (Snell y Winkler, 1984; Serra y Miracle, 1985; King y Zhao, 1987; Fu *et al.*, 1991b). Recientemente el establecimiento de cariotipos ha confirmado la existencia de un elevado grado de politipia (Rumegan *et al.*, 1991). Esta variabilidad interpoblacional parece contrastar con la reducida variabilidad genotípica observada entre colecciones de clones aislados de una misma población (*i.e.*, recogidos de la misma laguna en la misma fecha), las cuales presentan únicamente uno o dos genotipos dominantes; aunque el bajo número de clones que se ha estudiado aquí no permite ser concluyente. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Serra y Miracle (1985) trabajando sobre análisis isoenzimático con las mismas cepas, y otras aisladas de las mismas localidades, aunque los resultados del citado trabajo también se basan en un número de datos muy reducido, e insuficiente para establecer una generalización. Existen algunas diferencias menores entre ambos estudios que se comentan a continuación. Para las cepas pertenecientes a la misma población de Albufera de Adra (1983), el análisis de proteínas totales indica heterogeneidad, mientras que el análisis de isoenzimas muestra homogeneidad. Este resultado, no obstante, puede explicarse por el hecho de que el número de sistemas enzimáticos estudiados por Serra y Miracle (1985) fue pequeño, mientras que el análisis de proteínas totales implica, tal y como se ha indicado más arriba, una caracterización bioquímica más completa.

Por otra parte, en contraste con la baja variabilidad intrapoblacional sugerida en estos dos estudios exploratorios de pequeñas lagunas de las zonas húmedas mediterráneas (el realizado por Serra y Miracle, 1985, y el presentado aquí), King y Zhao (1987) encontraron una cantidad sustancial de variación genotípica dentro de lo que estos autores consideraron una única población; *i.e.* la población de *Brachionus plicatilis* del Lake Soda (USA). Estos autores sugieren que dicha variación se encuentra correlacionada con diferencias adaptativas a las distintas condiciones ambientales. La



heterogeneidad ambiental explicaría la coexistencia en la naturaleza de clones que no son ecológicamente equivalentes; los diferentes clones ocuparían diferentes microhábitats (Zhao y King, 1989). Por lo tanto, la disparidad entre los resultados de estos autores y los presentados aquí puede explicarse por los diferentes ecosistemas que se consideran en los dos estudios: el Soda Lake es un lago extenso, estable y profundo mientras que las poblaciones estudiadas aquí fueron obtenidas de pequeños cuerpos de agua, someros e inestables. En las lagunas pequeñas con condiciones fluctuantes la existencia de fuertes interacciones competitivas interclónicas (Snell, 1977a; Snell, 1979) y el sistema de reproducción heterogónico con múltiples generaciones partenogénicas interrumpidas por periodos de reproducción sexual (King, 1977b), explicarían el que la población de rotíferos de una determinada especie que comparte el mismo espacio y el mismo tiempo consistiera en uno o unos pocos clones. Por otra parte, estos mismos procesos y en áreas con diversidad de pequeñas localidades aisladas, sometidas a importantes fluctuaciones temporales de las condiciones provocarían, además de esta baja variabilidad genética intrapoblacional, una alta variabilidad interpoblacional (Serra y Miracle, 1985; Serra, 1987). La competencia entre clones adaptados a las diferentes condiciones ambientales junto con la restricción en el flujo genético entre poblaciones propiciada por la baja frecuencia de la reproducción sexual y la existencia de barreras reproductivas prezigóticas (Snell y Hawkinson, 1983; Snell, 1989) generaría una diferenciación geográfica y temporal entre las poblaciones.

En las localidades de las zonas húmedas mediterráneas en las que se ha considerado el ciclo anual se ha detectado variación estacional de las poblaciones de rotíferos mediante el uso de métodos biométricos y electroforéticos (Serra y Miracle, 1983, 1985). En el presente trabajo se ha encontrado regularidad estacional en un caso, en el Hondo de Elche, donde aparece el mismo tipo electroforético en otoño de dos años consecutivos, mientras que en la primavera intermedia se observa un electromorfo diferente. Esto sugiere que las cepas se encuentran adaptadas a las condiciones ambientales y por lo tanto la sucesión de clones no es un suceso aleatorio. Esta conclusión se encuentra también apoyada por el trabajo de King (1972) sobre la variación estacional de *Euchlanis dilatata*, donde se observó una adaptación de los sucesivos clones a la variación de las condiciones de temperatura durante el año. Este mismo autor, en otro trabajo realizado en una pequeña laguna, demostró mediante técnicas electroforéticas que los clones de *Asplanchna* pueden sustituirse de forma muy rápida lo cual indicaría la existencia de una selección muy fuerte (King, 1977a). Además existen evidencias de una especialización intraespecífica con respecto a la

temperatura y, en menor grado, a las condiciones de salinidad en las especies de rotíferos (véase la revisión de Miracle y Serra, 1989).

El análisis de agrupamiento revela que las cepas procedentes de la misma zona húmeda muestran cierta tendencia a presentar electroforegramas similares, mientras que existen marcadas diferencias entre las cepas procedentes de distintas zonas húmedas. Sin embargo, existen varias excepciones. Así, los clones originarios de localidades apartadas geográficamente pueden presentar patrones de proteínas muy relacionados. Esto sugiere que, aunque las diferencias genéticas entre las poblaciones parecen obedecer fundamentalmente a factores geográficos o factores ambientales correlacionados con estos últimos –de hecho la variación temporal detectada en los electroforegramas analizados es mucho menor que la variación espacial–, en la variación de las proteínas no solamente se encuentran implicados este tipo de factores.

Esta última conclusión se ve reforzada cuando se analizan las relaciones entre rasgos morfológicos y los electrotipos. En el dendrograma resultante del análisis de agrupamiento, las formas grandes con huevos durables externos (cepas L) forman un grupo bastante compacto. Estas cepas podrían constituir una forma bien caracterizada dentro de la especie, ya que muestran patrones muy similares aun cuando fueron aisladas de localidades bastante distantes entre sí. Además, cuando se cultivó y se analizó un gran número de clones a partir de una localidad particular (Hondo de Elche), habitada por formas L y muestreada en diferentes momentos del año, sólo se encontraron dos patrones muy similares (HO1, característico de la primavera y HO2, del otoño). Obsérvese también, que cuando los electroforegramas son marcadamente diferentes para cepas procedentes de una misma laguna, como es el caso de Adra Nueva, estas diferencias se corresponden con morfotipos distintos.

La existencia de una fragmentación de esta especie en tipos con una distribución amplia de cada uno de ellos, es decir no restringida a determinadas áreas geográficas, ha sido puesta también de manifiesto utilizando otras aproximaciones metodológicas (Serra y Miracle, 1983, 1985). Serra y Miracle (1983), en un estudio biométrico en el que se estudiaron poblaciones procedentes de las mismas lagunas que las estudiadas aquí, encontraron que, con unas pocas excepciones, las poblaciones procedentes de las localidades donde se encontraron formas L (Hondo de Elche, La Celadilla y Adra Nueva) aparecían próximas cuando se llevó a cabo un análisis de componentes principales sobre los coeficientes de alometría calculados entre diferentes parámetros corporales. Los mismos autores (Serra y Miracle, 1985) estudiaron dos cepas de formas L (la cepa CU analizada aquí y otra cepa de formas L, FCB) junto con algunas otras

cepas de morfología S, para las enzimas: esterasas, fosfatasa alcalina y malatodeshidrogenasa. Las cepas de formas L mostraron el mismo número de sistemas enzimáticos y presentaron el mayor grado de asociación en el análisis de agrupamiento realizado, si se exceptúan las cepas FCA y CA, las cuales, tal y como se ha indicado anteriormente, tienen el mismo origen geográfico. Las cepas S también aparecen juntas en el análisis de agrupamiento llevado a cabo aquí, pero el nivel de similaridad de esta agrupación es más bajo (alrededor de 0.73).

Las diferencias en el modo de cargar los huevos de resistencia subrayan la distancia genética entre los dos grupos de cepas, L y S. La relación entre el tipo morfológico y el modo de transportar los huevos sexuales, observada en todas las cepas que se han estudiado aquí, puede presentar excepciones ya que algunos autores (Okauchi y Fukusho, 1985b) encontraron una cepa con morfotipo S en la que los huevos durables eran transportados de forma externa por las hembras. La existencia de organismos que presentan una morfología intermedia, cuyos electroforegramas no son consistentes con su morfología y que se encuentran distribuidos entre los dos grupos principales del análisis de agrupamiento (véase la figura 5.4), subraya el hecho de que las formas S y L deben de representar tipos morfológicos extremos dentro de un amplio rango de variación. No obstante, las formas L parecen estar definidas y fijadas de forma más característica que las formas S, aunque para establecer una conclusión más definitiva deberían analizarse colecciones más amplias de cepas.

La exploración de la variabilidad intraespecífica realizada en este trabajo, revela la potencia del método de análisis de proteínas totales propuesto en la detección de diferencias genéticas. Por otra parte, a pesar de que existe un alto nivel de variación electroforética entre poblaciones, 19 bandas permanecen constantes en sus movilidades para todas las cepas estudiadas. En la cepa CU estas 19 bandas constantes son bastante estables, aun cuando se vean afectadas por cierta variabilidad no genética (véase el capítulo 6). Únicamente una de estas bandas no aparece en las hembras míticas y dos de estas bandas desaparecen durante el proceso de envejecimiento. Aunque el significado genético de estas bandas constantes no se conoce, un estudio comparativo de las mismas podría resultar útil para el estudio de relaciones taxonómicas superiores.

Desde hace algún tiempo, la variación en cuanto a movilidad electroforética de las proteínas isoenzimáticas ha sido utilizada en estudios de sistemática. El análisis isoenzimático ha sido de gran utilidad a la hora de corroborar la taxonomía convencional. Además, ha constituido una importante contribución proporcionando

caracteres para la delimitación de especies gemelas y para la taxonomía de grupos que presentan una morfología muy simple, demostrando el valor sistemático de los datos electroforéticos (Avisé, 1974). Las grandes diferencias bioquímicas entre especies dotan a las técnicas electroforéticas de un gran valor en la descripción objetiva e identificación de los miembros de las diferentes especies. La aplicación del análisis de proteínas en la sistemática de los rotíferos podría proporcionar una herramienta de trabajo adecuada en el establecimiento de comparaciones en el nivel taxonómico de especie. El método de electroforesis con SDS, puesto que separa los polipéptidos desnaturalizados únicamente por su peso molecular, produce un grupo de caracteres muy conservativos que permiten su uso en la resolución de problemas en categorías taxonómicas superiores (especie y género). Así, los cambios en aminoácidos individuales que pueden alterar la carga tienen poco o ningún efecto en el peso molecular del polipéptido. La movilidad de las proteínas en la electroforesis con SDS únicamente se verá afectada cuando se produzcan cambios importantes en los aminoácidos.

Los patrones generales de proteínas han sido previamente utilizados en la resolución de problemas taxonómicos a nivel de especie en otros grupos taxonómicos (véase Ferguson, 1980). A pesar de las limitaciones del método (*i.e.*, detecta la variabilidad intraespecífica tanto heredable como no heredable, y no permite la interpretación genética directa), la obtención de los patrones de proteínas totales de un individuo, realizados para colecciones de unos pocos individuos de cada especie podría ofrecer una indicación acerca de si el método electroforético sería útil en la resolución de un problema taxonómico particular. Además, en las situaciones en las que por los costos experimentales o por limitaciones del muestreo se dispone de pocos individuos puede constituir el único método utilizable. Cuando se ha llegado a una caracterización del patrón específico de una determinada especie, esta aproximación puede ser utilizada en la rutina de identificación de los individuos.

6. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO Y DEL ENVEJECIMIENTO INDIVIDUAL EN EL CLON CU DE *BRACHIONUS PLICATILIS*

6.1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los organismos individuales cambian a través del tiempo. Estos cambios incluyen alteraciones fisiológicas dependientes de la edad, tanto morfológicas como funcionales, que implican un deterioro del organismo. El proceso de adquisición de estos estados alterados está correlacionado con el paso del tiempo cronológico o del fisiológico, y es conocido como envejecimiento o senescencia. En realidad, en algunos medios de la investigación biológica los términos envejecimiento y senescencia no tienen el mismo significado. El término senescencia tiene un sentido más restringido y hace referencia a los procesos y aspectos del deterioro del organismo con la edad, en oposición con el término envejecimiento que no tiene necesariamente una connotación de deterioro. No obstante, a lo largo del presente trabajo envejecimiento se usa como sinónimo de senescencia. El estudio del envejecimiento y de la muerte, indudablemente, no es simple. El envejecimiento es un fenómeno bastante general; ahora, el momento de la aparición de los primeros síntomas y la tasa a la cual éstos progresan están bajo la influencia de un gran número de factores modificadores.

Aunque generalmente en el ámbito de la gerontología el envejecimiento se define en términos del aumento de probabilidad de muerte con la edad, dejando fuera de la definición cualquier consideración explícita acerca de la reproducción, algunos autores señalan que el declive y pérdida de la capacidad de reproducción con la edad es un fenómeno tan extendido como la disminución en la probabilidad de supervivencia (Medawar, 1952, 1955; Charlesworth, 1980; Rose, 1991). Atendiendo a esta consideración, en biología evolutiva el envejecimiento se define como la disminución persistente de los componentes de la eficacia biológica (*fitness*) específicos de la edad de un organismo debido a un deterioro fisiológico interno. En este sentido la definición evolutiva del envejecimiento cubre las dos componentes que cuantitativamente determinan la eficacia: probabilidad de supervivencia y fecundidad específicas de la edad.

Uno de los principales grupos de invertebrados que ha sido estudiado por los gerontólogos es el de los rotíferos (Rose, 1991). Los rotíferos constituyen un material experimental muy adecuado para el estudio del envejecimiento, debido a que (1) la

duración de su vida es corta y puede ser modificada por toda una serie de condiciones ambientales (Fanestil y Barrows, 1965), (2) toda la actividad sintética tiene lugar durante la embriogénesis primaria, y (3) son capaces de reproducirse partenogénicamente. Este peculiar tipo de reproducción permite la obtención de clones (individuos isogénicos) eliminando la variación genómica y los consiguientes cambios genéticos de la vida media, lo cual es un problema en el mantenimiento de animales para estudios gerontológicos. La posibilidad de obtener individuos genéticamente uniformes hace de estos organismos un material extraordinario para el estudio de los efectos del ambiente, de la herencia citoplasmática, del envejecimiento, y del metabolismo en general.

En el presente trabajo se presentan una serie de estudios experimentales centrados en la caracterización del envejecimiento individual en el rotífero *Brachionus plicatilis*. Dicha caracterización se ha abordado mediante análisis morfológico y bioquímico. Aunque una discusión de las diferentes teorías del envejecimiento se encuentra fuera del enfoque de este trabajo, los resultados se interpretan en base a algunas de las teorías fisiológicas y evolutivas que se han propuesto para la explicación de este fenómeno.

Antes de entrar en el desarrollo del trabajo que constituye este capítulo, se presenta a continuación una exposición sucinta de cuales han sido los principales estudios de envejecimiento en rotíferos antes aludidos y cuál es el estado de la cuestión en este momento. Debe advertirse que sólo se citan y comentan los estudios más directamente relacionados con las teorías del envejecimiento, dejando de lado (1) aquellos otros que, aunque presentan datos relevantes para el tema, no se centran en el estudio mismo, o (2) estudios sobre los procesos intrínsecos o extrínsecos ajenos al proceso de envejecimiento que determinan variación en la esperanza de vida .

Estudios sobre el envejecimiento en rotíferos

Los estudios sobre envejecimiento, utilizando como material de experimentación a los rotíferos, datan del primer cuarto de este siglo. Los primeros experimentos (Finensiger, 1926) correlacionan la duración de la vida con parámetros ambientales, tales como la temperatura y el pH. En general, estos estudios confunden el proceso de envejecimiento con la actividad metabólica. El hecho de que los rotíferos tiendan a vivir menos a altas temperaturas puede explicarse por un aumento de la actividad metabólica que provocaría una aceleración de las diferentes fases del ciclo vital y por lo tanto tiene escasa relevancia en el estudio de las bases fisiológicas del envejecimiento.

El primer estudio amplio sobre envejecimiento en rotíferos fue llevado a cabo por Jennings y Lynch (1928) como extensión de un primer trabajo en protozoos. Usaron un clon de *Proales sordida*, y observaron que la vida media de la descendencia variaba inversamente con la edad de la madre. Conforme una hembra envejecía, aumentaba la frecuencia de la producción de huevos abortivos, y sus huevos eran más variables en cuanto a tamaño y forma. Además, la progenie de las hembras viejas presentaba tasas de desarrollo y de fecundidad más variables. La explicación de estos autores al efecto materno sobre la supervivencia y fecundidad de la descendencia fue que los

individuos que se desarrollan a partir de huevos pequeños están fisiológicamente más estresados y como consecuencia presentan tasas de fecundidad menores, en comparación con los que se desarrollan a partir de huevos grandes. El efecto, puesto que se detectó en individuos pertenecientes a un mismo clon, se atribuyó a factores ambientales más que a factores genéticos. Una explicación alternativa propuesta por King y Miracle (1980) se basaría en variaciones en la actividad genética relacionadas con la edad, particularmente por la acción de genes reguladores.

La mayor contribución temprana al estudio del envejecimiento en rotíferos fue llevada a cabo por Lansing (1947) mediante el establecimiento de líneas isogénicas de edad parental uniforme (ortoclones). Lansing supuso que las diferencias en la longevidad media observadas por Jennings y Lynch (1928) se harían más patentes mediante el uso de esta técnica que convierte la edad materna en una variable experimental independiente. Lansing encontró que los ortoclones establecidos a partir de hembras jóvenes (pediaciones) tenían patrones de supervivencia expandidos (la vida media aumenta en cada generación), mientras que la vida de los ortoclones viejos (geriaciones) disminuía progresivamente en cada generación hasta que se producía la extinción. Este efecto era transmisible y acumulativo en su acción. Lansing (1948) determinó que el punto de inflexión entre patrones de supervivencia crecientes y decrecientes corresponde a la edad en la que el crecimiento cesa. Este autor sugiere que a partir de este momento, empieza a acumularse un factor citoplasmático de envejecimiento presumiendo que este factor era un componente del mecanismo de envejecimiento individual. Lansing (1954) propone que este factor, además de influir en la longevidad, altera el patrón de reproducción, variando el momento del inicio y la tasa de reproducción. Lansing (1947) también postula que el cambio en el patrón de envejecimiento de pediación a geriación, está relacionado con el aumento en la concentración de calcio intracelular estudiada anteriormente por este mismo autor (Lansing, 1942).

Las conclusiones de Lansing sobre el efecto de la edad materna en el envejecimiento fueron confirmadas por King (1967), el cual además encontró que los patrones de envejecimiento podían modificarse en función de la cantidad y calidad del alimento. Adicionalmente, King llevó a cabo un extenso análisis de las relaciones entre fecundidad y patrones de supervivencia de los ortoclones jóvenes y viejos, del cual concluyó que los geriaciones poseían una tasa neta de reproducción menor que los pediaciones. Debido a la mayor longevidad y fecundidad, los pediaciones presentaban crecimientos poblacionales más altos que los geriaciones. Durante el periodo transcurrido entre 1940 y 1968, aparecen otros artículos referentes a este tema (análisis de supervivencia y fecundidad); todos ellos fueron revisados de forma crítica por King (1969). En este último artículo, King hace una aproximación a la senescencia mediante la revisión de los trabajos publicados en rotíferos, destacando los procesos fisiológicos y genéticos que ocurren a los niveles de organismo y población. Los estudios sobre envejecimiento realizados a nivel de organismo y revisados en este trabajo consideran por lo general la manipulación de la duración de la vida en función del estrés fisiológico provocado por variables tales como la temperatura, el pH, la concentración de sales, el contenido en calcio, y los factores nutricionales. Los estudios con poblaciones de rotíferos demuestran claramente las diferencias en los patrones de supervivencia y tasas de crecimiento de las poblaciones derivadas de padres jóvenes y viejos.

La dependencia entre envejecimiento y edad materna no sería el único caso de efecto materno como queda explicado en el capítulo 7, la existencia de un mecanismo de control sobre la producción de hembras míticas (sexuales) por hembras amíticas (asexuales), ejercido por la edad materna, fue demostrado por Rougier y Pourriot (1977). Estos autores, encontraron que la tasa de producción de hembras míticas estaba muy negativamente correlacionada con la edad materna.

Algunos aspectos bioquímicos del efecto de envejecimiento fueron estudiados por Fanestil y Barrows (1965), y Meadow y Barrows (1971a), cuando analizaron las modificaciones en la composición corporal y en la actividad enzimática que ocurren a lo largo de la vida del rotífero *Philodina acuticornis*. De acuerdo con los datos presentados en este trabajo se produce un aumento del peso seco acompañado de un aumento proporcional en el contenido de proteínas con la edad, mientras que la concentración de ARN y las actividades de la malato y lactato deshidrogenasa disminuyen marcadamente al final de la vida. Meadow y Barrows (1971b)

pusieron de manifiesto, también en este organismo, el efecto de diferentes condiciones de cultivo y de la edad materna en la longevidad y fecundidad de la descendencia. Estos autores observaron sólo ligeras diferencias entre la duración de la vida de los pediaciones y geriaciones. La restricción nutricional resultó en una prolongación de la vida; este efecto ha sido detectado posteriormente por otros autores (Verdone-Smith y Enesco, 1982; Sawada y Enesco, 1984). Contrariamente a los resultados de Lansing (1942), en este estudio no se detectaron efectos ni de la concentración de calcio ni del tratamiento con agentes quelantes en la duración de la vida del rotífero *Philodina acuticornis*. Los resultados obtenidos por Lansing (1942), según los cuales los rotíferos comenzaban a acumular calcio tras completar su crecimiento somático, fueron apoyados posteriormente por Sinkock (1974, 1975): los rotíferos cultivados en medios con baja concentración de calcio presentaron vidas medias más largas que los cultivados en medios con alta concentración de calcio. Además, el tratamiento con agentes quelantes aumentó la duración de la vida de estos organismos. Según Sinkock estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo de envejecimiento en los rotíferos relacionado con la acumulación de calcio durante la vida. Desgraciadamente, Sinkock (1974, 1975) no utilizó ortoclonos, y la ausencia de medidas de la varianza en la concentración de calcio y duración de la vida dificulta la interpretación de sus resultados. Alternativamente, King y Miracle (1980) proponen otra posible explicación a estos resultados, según la cual la relación entre acumulación de calcio y envejecimiento no sería una relación causal directa sino indirecta a través de otro factor fisiológico desconocido. Enesco y Holtzman (1980) observaron también una disminución significativa de la duración de la vida en *Asplanchna brightwelli* a altas concentraciones de calcio y magnesio. No obstante, estos investigadores detectaron una disminución, en vez de un aumento, de la longevidad mediante el tratamiento con agentes quelantes. Este aparente efecto deletéreo de la acumulación de calcio con la edad permanece bajo revisión, no pudiendo establecerse por el momento ninguna generalización acerca de la mineralización de las células con la edad (véase, p.e., Barrows y Kokkonen, 1985).

En 1977 Snell y King examinaron las relaciones existentes entre reproducción y longevidad en el rotífero *Asplanchna brightwelli*. El estudio reveló que los organismos con la vida más larga, pasaban la mayor parte de su vida en fase reproductiva, distribuían su reproducción de forma equitativa en muchas clases de edad, y poseían tasas reproductivas relativamente bajas. En contraste, los individuos con una vida corta, pasaban la mayor parte de su vida en fase pre-reproductiva, concentrando su reproducción en unas pocas clases de edad, y se reproducían con tasas altas. Los resultados de este estudio son consistentes con la consideración de que la reproducción afecta negativamente a la supervivencia futura. Las relaciones entre reproducción y longevidad en esta misma especie han sido estudiadas posteriormente por Enesco *et al.* (1989a).

Las relaciones entre edad materna y características de la descendencia fueron también analizadas por Ricci (1980) en *Philodinia roseola*. Los resultados de este análisis muestran una mayor fecundidad y longevidad de los descendientes de las hembras maduras que se encuentran en la parte más activa del periodo reproductivo, mientras que los descendientes de las hembras más viejas que se encuentran en la parte final de su periodo reproductivo presentan fecundidades y longevidades ligeramente más bajas y claramente más variables. De este trabajo se concluye la existencia de relaciones entre la tasa materna de producción de huevos y las características de los descendientes.

En 1980 King y Miracle llevaron a cabo un análisis factorial de la tabla de vida de tres clones de *Brachionus plicatilis* cultivados a tres temperaturas distintas. Los resultados de estos experimentos pusieron de manifiesto la existencia de algunos problemas potenciales en el uso de poblaciones para el estudio de los efectos del envejecimiento en los individuos. Para estudiar los efectos del envejecimiento mediante el uso del análisis de supervivencia es necesario que la mortalidad esté relacionada con la senescencia. Sin embargo, bajo determinadas condiciones la mortalidad es independiente de la senescencia. Los datos de King y Miracle revelan cambios importantes entre los patrones de supervivencia de diferentes clones y de un mismo clon en diferentes condiciones ambientales. En determinadas condiciones ambientales la varianza de la duración media de la vida aumenta, y el patrón de supervivencia se aparta de la curva rectangular negativa esperada en ambientes más adecuados. Bajo estas condiciones, ni la duración media de la

vida, ni el patrón de supervivencia obtenido mediante tablas de vida de cohortes de rotíferos proporcionan datos adecuados para el estudio del envejecimiento individual.

Por último, en 1983, King analizó la propuesta de Lansing (1954), según la cual los miembros de las líneas de vida corta derivadas de padres viejos se reproducían más tempranamente y con tasas iniciales más altas que los miembros de las líneas de vida larga derivadas de padres jóvenes, las cuales retrasaban su primera reproducción a clases de edad más tardías en las sucesivas generaciones. El análisis de dicho efecto, fue llevado a cabo mediante la construcción de una tabla de vida a partir de los datos publicados por Lansing. Los resultados obtenidos por King apoyan las conclusiones de Lansing (1954), las cuales se encuentran muy próximas a las obtenidas por Snell y King (1977) y que se han comentado más arriba. El patrón encontrado por Lansing en el ortoclon viejo –reproducción temprana con tasas altas– es precisamente el patrón encontrado por Snell y King asociado con una duración media de la vida corta. Según King (1983), y en relación con el factor de envejecimiento propuesto por Lansing, estos resultados sugieren que el "Efecto Lansing" en *Philodina citrina*, según el cual descendientes de padres viejos tienden a tener una vida media más corta que los descendientes de padres jóvenes, no se debería a un factor de envejecimiento, sino a cambios en los patrones de fecundidad. Estos cambios tendrían su origen en la selección ejercida por el diseño experimental utilizado por Lansing. Desafortunadamente ninguno de los trabajos realizados sobre el "Efecto Lansing" en rotíferos replican completamente el diseño experimental utilizado por Lansing. Así, King (1967) estableció ortoclonos pero no midió la supervivencia y fecundidad en las sucesivas generaciones. Contrariamente a los resultados de Lansing, King (1967), tal y como se ha comentado más arriba, determinó que los ortoclonos viejos tenían valores de la tasa intrínseca de crecimiento y de la tasa neta de reproducción menores que los ortoclonos jóvenes. De acuerdo con King (1983), el "Efecto Lansing" debe interpretarse con precaución mientras no se demuestre que la duración de la vida en un procedimiento de selección ortoclonal no es simplemente una función de la alteración de los patrones de fecundidad. En este sentido, y según la propuesta de King (1983), un mejor conocimiento del control fisiológico de la reproducción conduciría a un mejor conocimiento del envejecimiento.

Los estudios más recientes sobre envejecimiento en rotíferos, algunos de los cuales se han citado anteriormente, han sido llevados a cabo por Enesco y colaboradores (Enesco y Verdone-Smith, 1980; Sawada y Enesco, 1984; Bozovic y Enesco, 1986; Enesco *et al.*, 1989b; Sawada *et al.*, 1990) en relación con el efecto de diferentes factores en la duración media de la vida. Una parte importante de estos trabajos se centra en el estudio del efecto de la radiación ultravioleta y de agentes antioxidantes tales como la vitamina E. Los resultados de estos trabajos se han interpretado en relación con una de las teorías fisiológicas del envejecimiento desarrolladas en el campo de la gerontología, la cual implica a la formación de radicales libres en el desarrollo de este proceso.

6.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Los rotíferos utilizados en el presente estudio, pertenecen al clon de laboratorio de la especie *Brachionus plicatilis* denominado CU (Serra y Miracle, 1983; véase el capítulo 5). Este clon procede de una laguna endorreica situada cerca de la localidad de La Celadilla (Cuenca), y ha sido mantenido en el laboratorio desde su aislamiento en 1981 cultivándolo con un exceso de comida, salinidad 12 g/l y 25°C de temperatura (para detalles adicionales sobre estas condiciones de cultivo véase el capítulo 3). La cepa CU fue seleccionada para el estudio del envejecimiento porque era la que había presentado

el patrón electroforético de proteínas totales más complejo en el estudio sobre la variabilidad intrapoblacional realizado en el capítulo 5. Además este clon había sido caracterizado también en estudios anteriores por otros autores (Serra y Miracle, 1983, 1985 y 1987; Serra, 1987; Miracle y Serra, 1989) y por lo tanto se disponía de información previa acerca del mismo.

Estudio morfológico

Con objeto de estudiar el crecimiento en relación con la edad, se establecieron dos diseños experimentales. El primero de ellos se orienta a la descripción de los cambios morfométricos a lo largo de toda la vida del animal, primando el número de edades observadas, sobre el número de repeticiones en cada edad. El segundo de ellos, se centra en el estudio biométrico de la etapa postmadurativa de la vida del individuo, y se realizó dando más importancia al número de observaciones (*i.e.*, individuos diferentes) por edad, con el consiguiente aumento en potencia de la pruebas estadísticas empleadas.

Diseño experimental 1. Para la obtención de los individuos experimentales, a partir de cultivos del clon CU crecidos en las condiciones antes citadas se separaron, durante la fase de crecimiento exponencial (véase el capítulo 5), 300 hembras partenogenéticas portadoras de dos o más huevos. Estas hembras se colocaron en pocillos que contenían 0.5 ml de medio de cultivo con 5×10^5 células de *Tetraselmis sp./ml*, poniendo unas 10 hembras en cada pocillo. Después de un periodo inferior a 4 horas en la cámara de cultivo, durante el cual se produce la eclosión de un número suficiente de huevos, se aislaron los neonatos descendientes de las hembras previamente separadas. Estos neonatos se trasladaron a pocillos individuales con 0.5 ml de medio cuya concentración algal era la misma que la del medio de aislamiento, y se colocaron de nuevo en la cámara iniciándose los cultivos de experimentación. Los individuos experimentales se siguieron durante su ciclo vital renovándoles el medio de cultivo y retirando su descendencia cada 24 horas. Periódicamente individuos escogidos al azar se fijaron, para su posterior medición, mediante la adición de una gota de lugol a cada uno de los pocillos que los contenían. El número de hembras medidas fue de 10 para las edades menores pero disminuyó durante el transcurso de la experiencia, de manera que el número de repeticiones fue inferior en los últimos días a causa de la escasa población superviviente. De los individuos escogidos se midieron la longitud (L) y la anchura (A) de la loriga durante los 12 días de vida de los rotíferos estudiados.

La frecuencia de obtención de individuos para su análisis fue diaria, y además, durante las primeras 24 horas de vida se efectuaron mediciones adicionales a las 4, 6, 8, 12 y 18 horas. Las medidas se efectuaron con un microscopio invertido Zeiss equipado con micrómetro ocular, utilizándose un objetivo 40x. Para cada una de las muestras y cada parámetro biométrico se calculó la media aritmética, la desviación típica de la media y su intervalo de confianza al 95%. Los intervalos de confianza se calcularon a partir de la distribución *t* de Student (Sokal y Rohlf, 1986).

Diseño experimental 2. En este segundo experimento se midieron tres parámetros de la loriga: la longitud, L, la anchura, A, y la separación entre las espinas laterales o anchura de la parte anterior, AA. Las mediciones se efectuaron sobre tres grupos de hembras, cada uno de ellos compuesto por 24 individuos y correspondientes a tres edades de la fase postmadurativa de su vida (5, 6 y 7 días).

Para la obtención de los individuos experimentales se siguió el mismo protocolo experimental que en el Diseño experimental 1. Estos individuos se aislaron en pocillos individuales y se siguieron a lo largo de su vida. El medio de cultivo se renovó diariamente, desechándose la descendencia. Los días 5, 6 y 7 desde el inicio del experimento se fijaron 24 individuos escogidos al azar, mediante la adición de una gota de lugol a cada uno de los pocillos que los contenían. Paralelamente se llevó a cabo una descripción morfológica de cada una de las hembras, indicando si presentaban o no los síntomas, que según las observaciones previas y los datos bibliográficos, acompañan al envejecimiento. Asimismo se anotó la presencia de descendencia y de huevos, elaborando de esta forma un pequeño historial para cada uno de los individuos medidos.

Las medidas se efectuaron, al igual que en el experimento anterior, mediante el uso de un microscopio invertido Zeiss con micrómetro ocular, utilizándose un objetivo de 40x. La significación del efecto de la edad sobre cada una de las medias de los parámetros medidos se determinó mediante un análisis univariante de la varianza (ANOVA) para cada parámetro (según Cooley y Lohnes, 1971; Sokal y Rohlf, 1979). Adicionalmente se utilizó el Método de Scheffé (Ruiz-Maya, 1983) a fin de establecer contrastes entre las medias de las medidas y entre ciertas combinaciones lineales de las mismas.

Estudio bioquímico

Con el objeto de estudiar la variación de los patrones de proteínas totales en relación con la edad, en los individuos del clon CU de la especie *Brachionus plicatilis*, se diseñó el experimento que se describe a continuación. Los cultivos experimentales comenzaron con el aislamiento de neonatos. Para la obtención de estos individuos experimentales se siguió el mismo protocolo que se ha descrito más arriba para las experiencias correspondientes al Estudio morfológico. Los 430 neonatos aislados de este modo se siguieron durante su ciclo vital renovándoles el medio de cultivo y retirando su descendencia con una periodicidad diaria. Durante los días 2, 4, 6, 8 y 9, posteriores al nacimiento y aislamiento de estos individuos, se obtuvieron los extractos proteicos de 20 individuos tomados al azar, para su posterior electroforesis. De este modo se preparó un total de 100 muestras, cada una de ellas correspondiente a un individuo. Con estas muestras se realizaron 10 electroforesis en geles de poliacrilamida. En cada uno de los geles, se separaron 12 muestras, de las cuales 10 correspondían a otras tantas extracciones de 1 rotífero, mientras que las dos restantes correspondían a una muestra en blanco, y una muestra de los marcadores de peso molecular usados como patrón de referencia (véase el capítulo 4). De un total de 10 electroforesis, 5 se realizaron con muestras de edad uniforme (correspondientes a las 5 edades analizadas), y las 5 restantes con muestras de distintas edades (dos muestras por clase de edad). Todo el experimento completo se repitió dos veces en un mismo año. Las técnicas de extracción de las muestras y de elaboración, fijación y tinción de los geles, así como las condiciones y el material utilizado en el proceso de electroforesis se describen detalladamente en el capítulo 4.

6.3. RESULTADOS

Resultados del estudio morfológico

La evolución de los valores obtenidos para los parámetros, longitud (L) y anchura (A) de la loriga a lo largo de la vida del rotífero *Brachionus plicatilis* (clon CU), se presenta en la figura 6.1. A la vista del gráfico, se observa que los dos parámetros estudiados (L y A) sufren una evolución semejante en los valores que adoptan en relación con la edad. Asimismo es de notar que en el momento del nacimiento el organismo posee ya un tamaño considerable; en los neonatos del clon CU éste es aproximadamente un 58% de

la longitud máxima y un 54% de la anchura máxima. Los individuos alcanzan su tamaño adulto –90% de la longitud máxima, 85% de la anchura máxima– entre el primero y segundo día de vida, que es cuando se inicia la reproducción. El máximo tamaño se alcanza alrededor del sexto día de vida, siendo la edad reproductiva y la longevidad máximas encontradas de 8 días y 12 días respectivamente. Los resultados de los experimentos de dinámica de poblaciones realizados por Serra (1987) mostraron que el clon CU en las condiciones experimentales utilizadas en el presente estudio tiene una duración media de la vida de 6.86 días y una edad media en el momento de la última reproducción de 6.5 días.

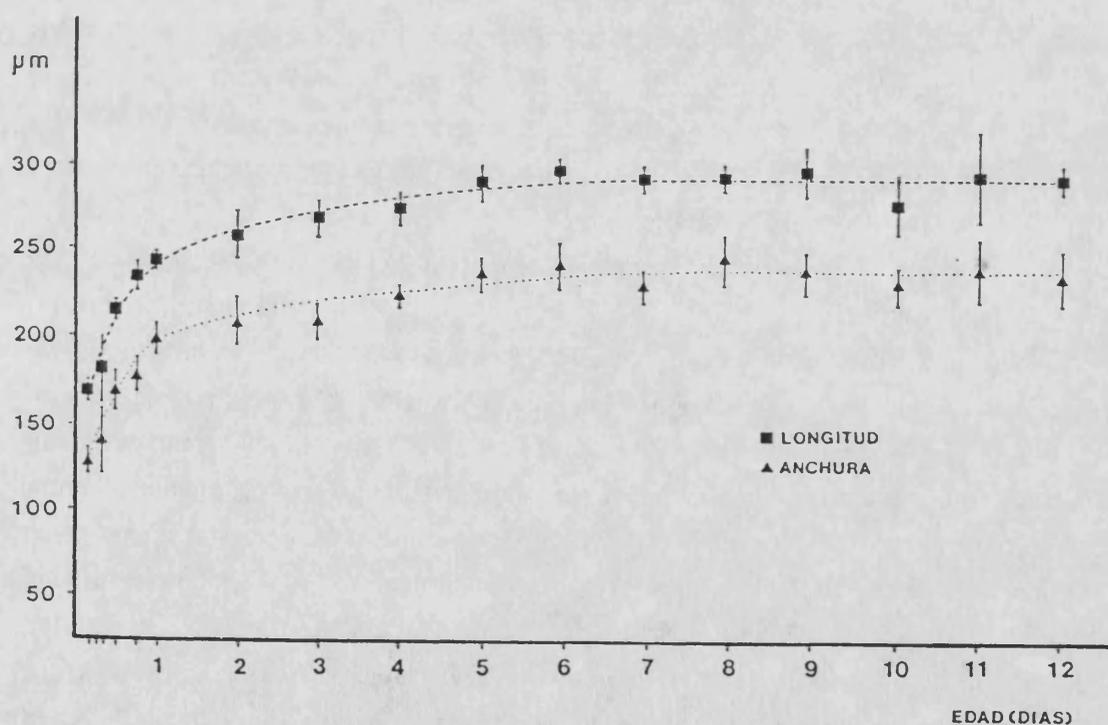


Figura 6.1. Crecimiento en longitud y anchura del rotífero *Brachionus plicatilis* a 25°C y 12 g/l de salinidad y alimentado con *Tetraselmis sp.* a la concentración de 5×10^5 células/ml. Las barras verticales representan los intervalos de confianza al 95% calculados a partir de la distribución *t* de Student.

Tabla 6.1. Valores medios y sus errores típicos (ambos en μm) para los parámetros: longitud de la loriga (L), anchura máxima de la loriga (A) y anchura de la parte anterior de la loriga (AA) correspondientes a los individuos de *Brachionus plicatilis*, con las edades que se indican.

Edad (días)	L	A	AA
5	257.54 (4.01)	178.40 (2.37)	103.13 (2.18)
6	259.92 (4.45)	188.22 (3.05)	103.13 (1.83)
7	266.36 (5.45)	196.85 (3.94)	102.95 (2.03)

El estudio del crecimiento somático individual muestra que el aumento en longitud y anchura en relación con la edad (figura 6.1) puede describirse aproximadamente por la función de Bertalanffy (Bertalanffy, 1948), tal y como se ha observado en otras especies de rotíferos (Lebedeva y Gerasimova, 1985). El tipo de variación seguido por los dos parámetros estudiados se asemeja al de una curva de saturación. En una primera fase, correspondiente a los primeros días de vida, se producen cambios de tamaño rápidos. La tasa de cambio se atenúa con la edad, alcanzándose una segunda etapa (entre el quinto y sexto día de vida) en la cual los cambios, de existir, son muy leves.

En una segunda experiencia (Diseño experimental 2) se centró el estudio en esta segunda etapa, porque se pensó que en ella podían acontecer cambios en el tamaño relacionados con el proceso de envejecimiento. Los resultados de los valores medios y su desviación típica, para los parámetros longitud (L), anchura (A) y anchura de la parte anterior (AA), correspondientes a las tres edades estudiadas en esta segunda experiencia se indican en la tabla 6.1. Mientras que el parámetro AA no presenta variaciones con la edad, se observa un aumento en L y A. A fin de determinar la significación de estas diferencias se realizó un análisis univariante de la varianza (ANOVA). Los resultados de este análisis para cada uno de los tres parámetros (L, A y AA), y de los contrastes realizados por el método de Scheffé, se muestran en la tabla 6.2. Las diferencias entre las medias correspondientes a cada edad comprobadas mediante el análisis de la varianza son altamente significativas para el parámetro anchura de la loriga, no resultando significativas las diferencias de longitud y anchura de la parte anterior entre las tres edades. Estos resultados se ven confirmados por el primer contraste realizado por el método de Scheffé en el que se comparan las medias de los tres parámetros para los individuos de 5 y 7 días de edad. De los resultados de estos dos análisis en los que se

detecta la existencia de un efecto significativo de la edad sobre la anchura se puede concluir que, tal y como indicaban las observaciones previas, en la fase final de la vida se produce un aumento en la anchura de loriga de naturaleza distinta a los cambios que acontecen en las primeras etapas de la vida. Por último, los resultados del segundo contraste realizado por el método de Scheffé (tabla 6.2) indican que este aumento de anchura parece ser lineal. Las observaciones realizadas de otros síntomas del envejecimiento, caracterizan a los individuos senescentes por una producción de huevos muy baja o inexistente, una fuerte disminución de la tasa de movimiento ciliar, la pérdida de motilidad, un aumento de pigmentación que torna los tejidos claros en tejidos amarillos, apagados y opacos. Algunos individuos viejos muestran el pie rígido y muy distendido, posiblemente como consecuencia de la relajación muscular que debe producirse en la etapa final de la vida.

Tabla 6.2. Resultados del análisis univariante de la varianza para cada uno de los tres parámetros corporales (L, longitud; A, anchura; y AA, anchura de la parte anterior de la loriga), y de los contrastes realizados por el método de Scheffé (el primer contraste compara las medias de las medidas de cada uno de los tres parámetros para los días 5 y 7 de edad mientras que el segundo comprueba la hipótesis de variación lineal).

ANOVA							
Fuente	g.l.	CM			Razón F		
		L	A	AA	L	A	AA
Edad	2	86.29	360.88	0.06	0.93	8.39**	0.29
Error	69	92.46	43.01	0.17	-	-	-

n= 24, ** si $p \leq 0.01$

Contrastes de Scheffé	Razón F		
	L	A	AA
$\bar{X}_5 = \bar{X}_7$	1.78	20.55**	0.05
$(\bar{X}_5 + \bar{X}_7)/2 = \bar{X}_6$	0.08	0.17	0.02

** si $p \leq 0.01$, $\bar{X}_n =$ media del parámetro a la edad n

Resultados del estudio bioquímico

Los patrones de proteínas totales obtenidos a partir de los individuos jóvenes del clon CU en las dos réplicas del experimento se caracterizan por mostrar una gran uniformidad entre ellos (figura 6.2). Sin embargo, conforme aumenta la edad de los individuos se producen cambios en los patrones de proteínas generándose una gran variabilidad relativa entre individuos de la misma edad cronológica. Los individuos de 2 y 4 días de edad presentan característicamente el mismo patrón juvenil.

Para inspeccionar esta homogeneidad se llevó a cabo un experimento en el que se compararon los patrones de proteínas de individuos jóvenes (2 días de edad) procedentes de huevos puestos por madres jóvenes y viejas (de 2 y 6 días de edad respectivamente). En este experimento no se detectó un efecto de la edad materna sobre el perfil de proteínas totales de estos individuos jóvenes, ya que todos ellos presentaron el mismo patrón.

En contraste con la gran uniformidad existente entre los patrones de los individuos de 2 y 4 días de edad, los patrones de los individuos de 6 días de edad presentan variabilidad y esta variabilidad aumenta con la edad como consecuencia de los cambios que se producen en el perfil de bandas. Las tendencias principales de estos cambios dependientes de la edad pueden verse en la figura 6.3, donde se presentan los esquemas de los patrones de bandas característicos de los individuos jóvenes y viejos para su comparación. El patrón característico de un individuo con dos días de edad cronológica se compone de un total de 49 bandas (la representatividad de este patrón ha sido confirmado mediante la electroforesis de muestras correspondientes a extractos de 5 y 10 individuos). La comparación de este patrón juvenil con el correspondiente a un individuo senescente (edad cronológica ocho días) revela dos tipos de tendencias. (1) Por una parte, una disminución en el número de bandas acompañada de una pérdida de intensidad en una parte importante de las que permanecen. En el patrón senescente desaparecen 11 bandas de proteína, distribuidas a lo largo de todo el rango de pesos moleculares (bandas: 2, 11, 12, 22, 29, 34, 38, 39, 41, 43 y 45). Estas bandas que faltan representan el 22.4% del número total de polipéptidos detectados en el patrón juvenil. Además, 13 bandas muestran una disminución importante en su intensidad. Por lo general son bandas correspondientes a polipéptidos de alto peso molecular, con peso molecular superior a 66 kDa (bandas numeradas de la 3 a la 10), y algunas otras por encima de 24 kDa (bandas: 19, 23, 25, 26, y 32).

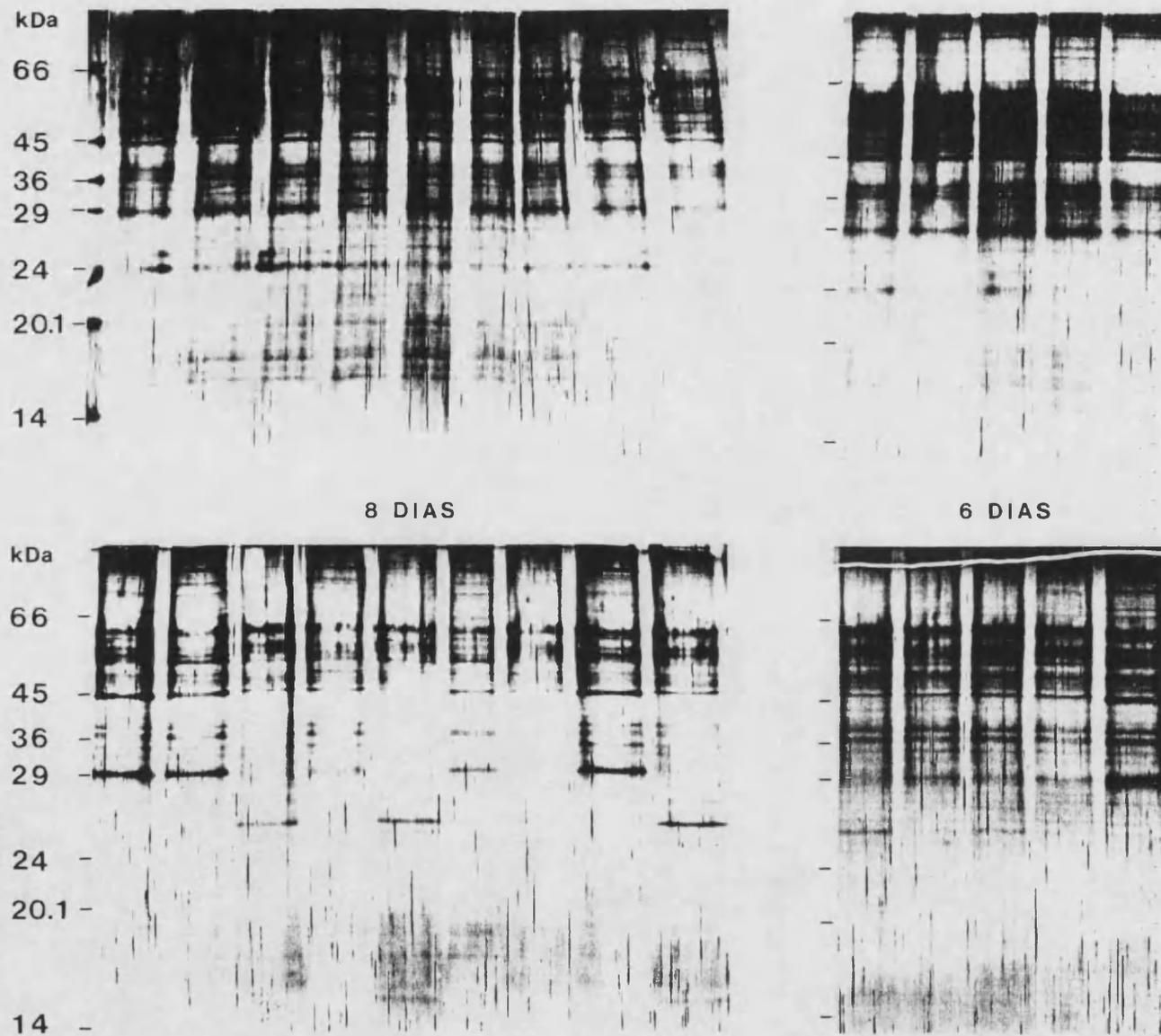


Figura 6.2. Patrones de proteínas totales de *Brachionus plicatilis* (clon CU a 25°C y 12 g/l de salinidad). La posición de los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda.

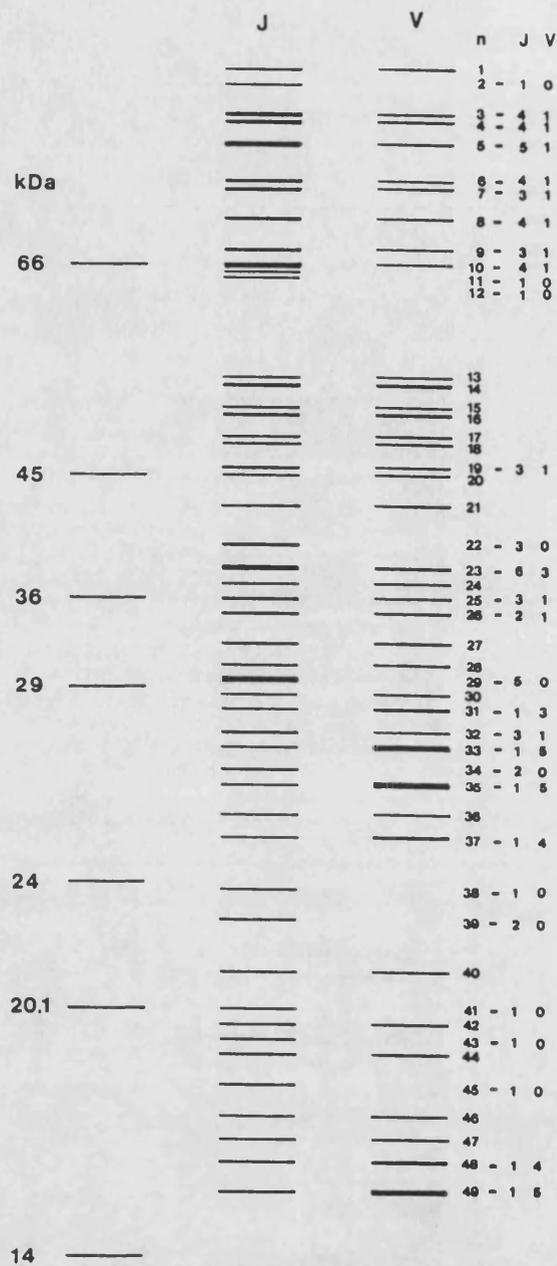


Figura 6.3. Esquema de los electroforegramas correspondientes a las hembras jóvenes (J) y viejas (V) del clon CU de *Brachionus plicatilis*. La posición y el peso molecular en kilodaltons (kDa) de las proteínas marcadoras se muestra a la izquierda. El patrón de proteínas de un individuo joven consta de 49 bandas. Las bandas se han numerado de acuerdo con su movilidad electroforética al lado derecho de la figura. Para cada banda que presentaba diferencias en los patrones jóvenes y viejos, se ha registrado un número indicando su ausencia (0) o su intensidad, cuando la banda estaba presente. La intensidad es un valor ordinal el cual fue registrado independientemente para cada banda. Este número corresponde a una escala de valores establecida en orden de intensidad creciente y cuyo rango depende del número de grados de intensidad que pudieron distinguirse para cada banda.

(2) Por otra parte, 6 bandas de bajo peso molecular, prácticamente imperceptibles en el patrón juvenil, experimentan un aumento importante de intensidad en los individuos senescentes (obsérvense las bandas números 31, 33, 35, 37, 48 y 49 en la figura 6.2). Éstas son cuatro bandas que se encuentran en el rango de pesos moleculares entre 24 y 29 kDa, y las dos proteínas de migración más rápida.

Los dos rasgos más característicos del patrón senescente son las dos intensas bandas de proteína con peso molecular de 26 y 27 kDa (bandas 33 y 35 respectivamente), y la reducción en intensidad de los componentes proteicos de mayor peso molecular.

6.4. DISCUSIÓN

El envejecimiento va acompañado de toda una serie de síntomas que se expresan en la morfología y el comportamiento fisiológico de los organismos. Los resultados del presente estudio indican que los rotíferos senescentes pueden identificarse por una degeneración de las funciones reproductivas, tasas de alimentación y movimientos lentos, así como por los cambios morfológicos que experimentan. Entre estos cambios, las observaciones sistemáticas realizadas revelan un abombamiento de la parte inferior del cuerpo, que aparece en la mayoría de individuos senescentes. La mayor parte de estos rasgos, directamente observables, asociados con el fenómeno del envejecimiento han sido descritos previamente por otros autores (Lansing, 1947). La disminución de la velocidad de natación ha sido cuantificada por Luciani *et al.* (1983), y el declive de la fertilidad con la edad es un fenómeno bien conocido (p.e., King, 1967; Aronovich y Spektorova, 1974; Snell y King, 1977; Ricci, 1983).

Los resultados del estudio biométrico realizado a lo largo de la vida de *Brachionus plicatilis* (Diseño experimental 1), muestran que el crecimiento somático en longitud y anchura de la loriga de este organismo puede describirse por una curva de pendiente decreciente. El crecimiento somático es un proceso finito que sigue una dinámica del tipo "curva de saturación", la tasa de crecimiento es muy marcada durante el periodo juvenil; los cambios de tamaño son muy rápidos y agudos antes de que se produzca la primera reproducción. Luego, el proceso de crecimiento va disminuyendo paulatinamente. La deceleración del proceso de crecimiento con el inicio del periodo reproductivo puede relacionarse con el hecho de que el individuo dispone de una cantidad de energía que es limitada. El patrón de crecimiento de un organismo depende de la asignación de recursos entre procesos anabólicos y catabólicos, y de los primeros

-i.e., la producción- la asignación entre el crecimiento y la reproducción (Calow, 1978; Sibly y Calow, 1987). Los modelos teóricos de optimización, basados en los supuestos de la fisiología ecológica y evolutiva, en general predicen que en los organismos el tamaño máximo se alcanzará antes de la reproducción ("bang-bang strategist", Sibly *et al.*, 1985). No obstante, muchos organismos se apartan de lo predicho por dichos modelos (véase, p.e., Perrin, 1989) lo cual también parece ser cierto para el caso de *Brachionus plicatilis*. Es, aproximadamente, entre el quinto y sexto día de vida, en plena etapa postmadurativa cuando se alcanza el tamaño máximo en esta especie. En cualquier caso, la asignación de recursos a la reproducción frena la tasa de crecimiento somático.

Por otra parte, el gran tamaño relativo de los neonatos condiciona que una parte importante del citoplasma materno pase al huevo, lo cual implica que los fenómenos de herencia citoplasmática puedan ser importantes en estos organismos.

Los resultados de la segunda experiencia (Diseño experimental 2), centrada en la etapa final de la vida, demuestran la existencia de cambios en la anchura de la loriga relacionados con la edad. Este aumento de anchura parece no obedecer a crecimiento somático en sentido estricto ya que se produce a edades tardías, después del crecimiento primario del individuo, y no va acompañado de un aumento de los demás parámetros corporales estudiados. De este modo, los resultados morfométricos concuerdan con las observaciones preliminares que sugerían un abombamiento del cuerpo en los individuos senescentes. El ensanchamiento de la parte posterior de la loriga podría producirse como consecuencia de algún proceso de distensión muscular. Estos cambios en tamaño, que ocurren al final de la vida, debido a su naturaleza más atenuada en relación con los del crecimiento, no se pusieron de manifiesto en la primera experiencia, pero sí en esta segunda, en la cual se aumentó el número de repeticiones por nivel.

Los métodos bioquímicos propuestos en el presente trabajo para el análisis de proteínas totales permiten su aplicación a una sola hembra de rotífero (véase el capítulo 4), haciendo posible su caracterización mediante un patrón lo suficientemente complejo, tal y como se discutió en el capítulo 5. El patrón de proteínas totales constituye una "huella" del estado del organismo en la cual influirán tanto factores genéticos como fisiológicos, ya sean estos últimos respuestas al ambiente o a la edad del animal. Por ello, los estudios con proteínas totales permiten diseños experimentales capaces de detectar variación en relación con factores bien determinados. La aplicación de esta técnica en el estudio del envejecimiento individual muestra que los patrones de proteínas son completamente uniformes para individuos jóvenes e isogénicos cultivados en las mismas condiciones, pero que comienzan a cambiar cuando estos individuos

alcanzan una determinada edad. Estos cambios van modificando el patrón juvenil para generar un perfil de proteínas característico de los individuos senescentes. El análisis electroforético de las proteínas durante la vida de los individuos permite detectar cambios dependientes de la edad en su composición proteica, lográndose una caracterización del envejecimiento de los individuos. Estos resultados implican la posibilidad de disponer de una medida de la edad fisiológica de los individuos mediante el uso de un método bioquímico. El problema de descubrir medidas fisiológicas del envejecimiento es complejo (para una discusión detallada, véase Rose, 1991), ya que no todos los atributos que experimentan un cambio con la edad sirven como indicadores de la edad fisiológica con respecto al envejecimiento. Los cambios relativos al envejecimiento deben presentar una relación causal con la probabilidad de supervivencia, o de supervivencia y reproducción en la aproximación evolutiva del envejecimiento. Además, cualquier efecto que altere de forma específica el proceso del envejecimiento debería tener en principio un efecto proporcional sobre la aparición de estos cambios. En este sentido, el perfil de proteínas totales podría constituir un buen indicador de la edad fisiológica ya que, tal y como se discutirá en el capítulo 10, los procesos que actúan específicamente en la senescencia tienen un efecto proporcional en la aparición de estas marcas de reconocimiento.

La desaparición de algunas proteínas de alto peso molecular en los individuos viejos podría estar relacionada con la reducción de la masa visceral, especialmente del material del germovitelario, que se produce durante la senescencia, así como con procesos degenerativos de otros tipos. Por otra parte, esta pérdida de bandas, junto con la intensificación de algunas de las bandas correspondientes a componentes proteicos de bajo peso molecular, podría estar asociada con una disminución en la tasa de recambio (*turnover*) de las proteínas con la edad. Existe una extensa evidencia de que la síntesis total de proteínas disminuye con la edad en una amplia variedad de organismos (revisado en Makrides, 1983; véanse también Richardson y Bichernal-Sparks, 1983; Holehan y Merry, 1986). Además, la ausencia de un declive similar en el contenido de proteínas de los tejidos de muchos organismos (Richardson, 1985) implica que las tasas de degradación de las proteínas también podrían disminuir con la edad provocando un aumento en la vida media de las proteínas. En los rotíferos se ha observado una disminución dependiente de la edad de la actividad de determinados enzimas junto con un aumento en el contenido total de proteínas (Meadow y Barrows, 1971a). Algunos autores sugieren que la disminución en el recambio de las proteínas podría constituir la base molecular de muchas de las manifestaciones fisiológicas del envejecimiento, dada

su importancia en el control del metabolismo celular y en la regulación de la actividad enzimática (véase, por ejemplo, la revisión realizada por Holehan y Merry, 1986). Además, de lo anterior puede concluirse que los individuos viejos tienen macromoléculas que no son reemplazadas tan rápidamente como en los individuos jóvenes, y que por lo tanto se encuentran potencialmente expuestas a procesos de deterioro postsintético durante la vida del organismo adulto. La susceptibilidad de las proteínas a sutiles cambios postraduccionales provocaría un aumento de su termolabilidad y una disminución en su actividad específica (Kanungo, 1980; Makrides, 1983). La desamidación y racemización espontánea de ciertos restos aminoácidos (McKerrow, 1979; Finch, 1987), así como la metilación, glicosilación (Gershon y Gershon, 1970), hidrólisis y formación de radicales libres (véase por ejemplo Rose, 1991) son algunos de los procesos propuestos como determinantes de la aparición de proteínas alteradas durante el envejecimiento y que han sido considerados por algunos autores como posibles mecanismos moleculares de la fisiología del envejecimiento.

Los cambios en los perfiles de proteínas totales característicos del envejecimiento aparecen a partir de los 6 días de edad de los individuos; la misma edad a la cual cesa el crecimiento somático. Esta relación entre el crecimiento y el proceso de envejecimiento se encuentra de acuerdo con las observaciones de Lansing (1948) según las cuales el cese del crecimiento en los rotíferos parece coincidir con la expresión del envejecimiento. La existencia de relaciones entre el proceso de crecimiento y el envejecimiento también ha sido puesta de manifiesto en otros organismos (Lints, 1978).

La edad a la cual aparecen los primeros síntomas del envejecimiento se encuentra también muy próxima a la duración media de la vida y a la edad media de la última reproducción. Lo cual implica que la duración de la vida coincide casi con la edad media de la última reproducción. No obstante, existe una gran variabilidad en la duración de la vida de los distintos individuos, y la duración máxima de la vida es casi el doble de la duración media. La edad a la cual se produce el cese de la reproducción es mucho menos variable. La existencia de una coincidencia temporal entre el cese del crecimiento y la duración media de la vida, por un lado, y las primeras manifestaciones del envejecimiento (medido independientemente de la duración media de la vida), por otro, es consistente con una de las teorías fisiológicas explicativas del envejecimiento, la teoría del envejecimiento genéticamente controlado (véase Lints, 1978). Según esta teoría, los fenómenos del envejecimiento forman parte de los procesos de diferenciación y desarrollo de los individuos, y por lo tanto son el resultado de un programa genético preexistente.

Los resultados presentados aquí también muestran una coincidencia temporal entre el final del periodo reproductivo y el momento de aparición de los rasgos del envejecimiento en los perfiles de proteínas totales. Meadow y Barrows (1971b) observaron que los rotíferos presentan bajas tasas de mortalidad durante su periodo reproductivo. Estos autores indican que el cese de la reproducción en el rotífero *Philodina* señala el principio de una alta mortalidad y que esto sugiere que la senescencia se inicia en un momento determinado; lo que representaría un proceso programado de envejecimiento. Esta idea de que el final del periodo reproductivo señala el final de la vida por procesos intrínsecos resulta también apoyada por los resultados del trabajo de Enesco *et al.* (1989a) en *Asplanchna brightwelli* y es aplicable a muchos phyla, tal y como ha sido discutido por Comfort (1979).

La mayoría de las teorías sobre envejecimiento, de las múltiples que se han desarrollado en el campo de la gerontología, son hipótesis puramente fisiológicas que no han sido elaboradas sobre bases evolutivas. Por ello, muy pocas han sido interpretadas en términos de biología evolutiva. Sin embargo, la coincidencia temporal entre cese total del crecimiento y manifestación del envejecimiento podría ser interpretada dentro del contexto de la teoría evolutiva del envejecimiento según un desarrollo que se propone aquí siguiendo la línea argumental utilizada por Rose (1991) a propósito del envejecimiento en organismos con crecimiento continuo; línea argumental que, como se verá, en algún grado puede aplicarse a organismos de crecimiento finito. Para la mayor parte de los evolucionistas la causa última del envejecimiento es el declive de la fuerza de la selección natural con la edad (p.e., Charlesworth, 1980; Rose, 1991). La teoría evolutiva de la senescencia se basa pues, en la existencia de diferencias, específicas de la edad, en la contribución de la reproducción a la eficacia biológica global (*fitness*): la evolución del envejecimiento únicamente se produce si un incremento de la reproducción a una edad previa provoca un mayor aumento de la eficacia, que el mismo incremento a edades subsecuentes (p.e., Bell, 1984a). Existen dos mecanismos genéticos principales que explicarían la evolución de la senescencia: (1) la pleiotropía antagónica, en la cual los alelos que tienen efectos beneficiosos al principio de la vida tienen efectos deletereos antagónicos al final de la misma (Williams, 1957); y (2) la especificidad de la acción génica con respecto a la edad, según la cual los alelos que tienen efectos deletereos al final de la vida son esencialmente selectivamente neutros, debido a que no tienen o tienen escaso efecto al principio de la vida, y su selección a edades tardías es muy ligera como consecuencia del declive de la fuerza de la selección natural con la edad (Medawar, 1952). La teoría evolutiva del envejecimiento tiene como

corolario que la evolución del envejecimiento es una consecuencia de la acción de la selección natural sobre las tasas de supervivencia y de reproducción específicas de la edad. De acuerdo con la formulación matemática de esta teoría por Hamilton y Charlesworth (véanse en Rose, 1991, las ecuaciones propuestas por Hamilton, 1966, y por Charlesworth, 1980), la fuerza de la selección natural sobre la supervivencia empieza a disminuir desde el momento de la primera reproducción y alcanza un valor de cero al final del periodo reproductivo (Medawar, 1952). Una de las predicciones de esta teoría es que en aquellos organismos que presentan un aumento de la fecundidad después de la madurez reproductiva, envejecen más lentamente que aquellos que no presentan este tipo de incremento (Williams, 1957).

La relación entre el cese del crecimiento y el envejecimiento podría explicarse por la relación entre el tamaño y la fecundidad, la cual es muy general (Calow, 1978; Begon *et al.*, 1990). El crecimiento que continúa después del inicio de la reproducción se encuentra normalmente asociado con un aumento de la fecundidad. Esto resultaría en una disminución más lenta de la fuerza de la selección con la edad lo cual llevaría a una demora del envejecimiento (Rose, 1991). Los rotíferos continúan creciendo, aunque con una tasa muy lenta, después de que alcanzan la madurez reproductiva (Lansing, 1948; Lebedeva y Gerasimova, 1985; véanse también los resultados presentados aquí). En el caso de *Brachionus plicatilis*, tal y como se ha discutido más arriba, el crecimiento somático cesa aproximadamente a la edad promedio de la última reproducción. Un problema que presenta la aceptación de la hipótesis aquí esbozada es que no se dispone de datos que relacionen fecundidad con tamaño en rotíferos. El incremento de fecundidad con la edad que suele observarse cuando se construyen tablas de vida de cohortes de rotíferos es un proceso complejo que puede deberse al incremento de fecundidad de cada individuo de la cohorte y/o a la variación entre individuos en el momento de inicio de la reproducción. Es más, cuando se estudian datos de fecundidad reseñada por individuo (p.e., en Serra, 1987, véase en el apéndice correspondiente a los datos de las tablas de vida, los de la cepa CU), no se observa una tendencia clara al incremento de la fecundidad, aunque datos como los comentados aquí, recolectados con periodicidad diaria, no parecen muy adecuados para descubrir variaciones finas en la fecundidad.

Otras posibles relaciones a través de las cuales podría ensayarse una explicación para la coincidencia del cese del crecimiento con el comienzo de la senescencia podrían venir determinadas por los patrones óptimos de asignación de recursos entre los procesos de mantenimiento (relacionados con el envejecimiento), crecimiento y

reproducción. Aunque la familia de modelos teóricos que relacionan estos aspectos está creciendo (véase, por ejemplo, Sibly y Calow, 1987; Kirkwood y Rose, 1991) todavía parece ser insuficiente para abordar satisfactoriamente el problema.

Como puede observarse existe una fuerte indeterminación teórica en la interpretación de la coincidencia temporal entre el inicio del envejecimiento y otros rasgos de la historia vital. No obstante, otros de los resultados encontrados aquí poseen una interpretación directa; este es el caso de la coincidencia temporal entre el final del periodo reproductivo y la aparición de los patrones de proteínas característicos de la senescencia, ya que el final de la reproducción coincidiría según las predicciones de esta teoría con el momento en el cual la intensidad de la fuerza de la selección se hace cero.

Por otra parte, los datos presentados aquí ilustran la falta de correlación entre la edad cronológica y la edad fisiológica, incluso entre individuos pertenecientes a un mismo clon, y por lo tanto isogénicos, sometidos a las mismas condiciones ambientales. Los individuos envejecen a velocidades diferentes, de manera que a partir de una situación uniforme (patrones de proteínas de individuos jóvenes), se alcanza una situación de gran variabilidad (electroforegramas de proteínas correspondientes a individuos de edad cronológica avanzada) en la que los individuos de la misma edad cronológica presentan perfiles de proteínas diferentes correspondientes a distintas fases o estados de un esquema de variación. Por lo tanto, una misma edad cronológica integra estados fisiológicos distintos de los organismos (véase la figura 6.4). Esta variabilidad individual no impide el que los rasgos de la historia vital de estos organismos respondan de forma predecible a los factores ambientales. Así, si estos organismos eutélicos se cultivan en otras condiciones, tales como una temperatura mayor o menor, la duración de su vida es respectivamente más corta o más larga (Miracle y Serra, 1989) y su tamaño corporal menor o mayor (King y Miracle, 1980; Lebedeva y Gerasimova, 1985; Serra y Miracle, 1985), pero la relación entre la vida máxima y vida media, periodo reproductivo y periodo de crecimiento se mantiene aproximadamente constante.

Dadas las interrelaciones que existen entre crecimiento, reproducción y longevidad, el envejecimiento en los rotíferos debe considerarse una fase más del ciclo vital de estos organismos conjuntamente con las fases de crecimiento y reproducción. Así, estas primeras fases influirán sobre la fase final de la vida y por lo tanto sobre el inicio, tasa y duración de la senescencia de los individuos. En relación con estos procesos existe una plasticidad temporal importante en el desarrollo de los individuos, la cual se hace extensiva a los procesos de envejecimiento. Así, como ha quedado dicho, la variabilidad en cuanto al momento en el que pueden aparecer los síntomas del

envejecimiento es considerable. De acuerdo con los resultados presentados aquí esta variabilidad no se debe únicamente a las condiciones genéticas o del ambiente general de los individuos, sino también a otras causas. Estas causas podrían ser: (1) factores aleatorios intrínsecos implicados en los cambios de la potencialidad o funcionalidad de la expresión génica en células que no se dividen activamente, (2) otros factores tales como la edad materna o agentes infecciosos. Ambas causas a su vez podrían deberse a pequeñas diferencias en el ambiente de los individuos (externo, interno o intracelular) que condicionaran la acción génica, o a la asignación aleatoria de material genético extranuclear entre individuos isogénicos. En cualquier caso, procesos de retroalimentación podrían amplificar severamente estas diferencias mínimas iniciales.

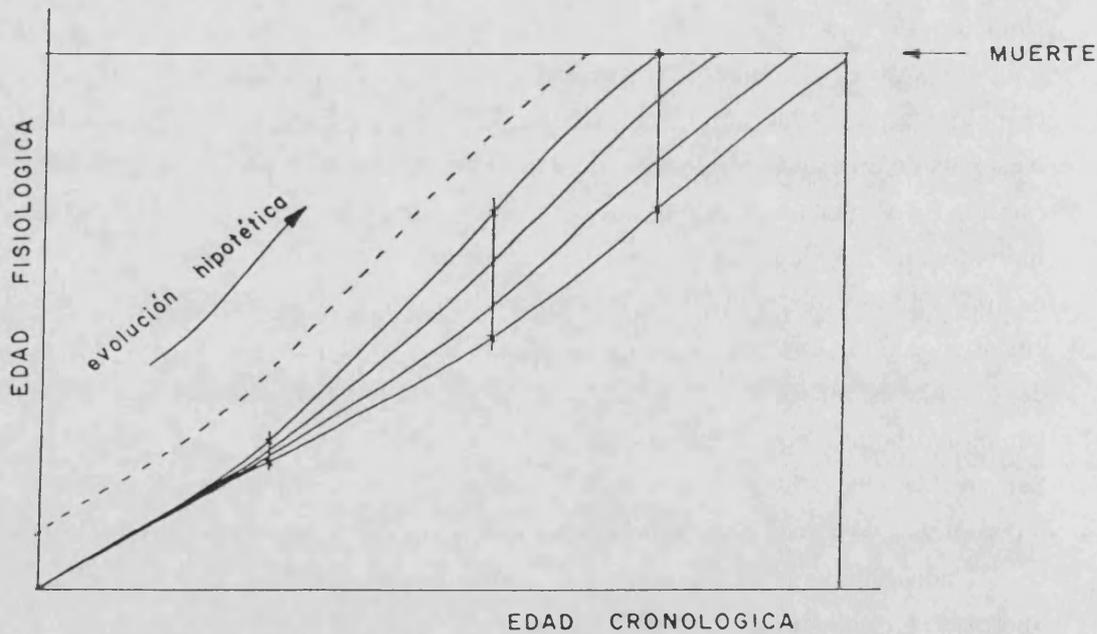


Figura 6.4. Modelo gráfico ideal de la evolución temporal de distintos individuos de una población clónica cultivados en las mismas condiciones. Las curvas de trazado continuo representan la relación entre la edad cronológica (días de vida) y la edad fisiológica para individuos distintos. Las barras verticales representan la variabilidad asociada a la edad. La línea de trazado discontinuo representa la evolución de un individuo con edad fisiológica avanzada en el momento de su nacimiento.

PARTE TERCERA: LA MIXIS: INDUCCIÓN, IMPLICACIONES Y FENÓMENOS ASOCIADOS

Esta tercera parte se centra en el estudio del momento en que se produce la reproducción sexual dentro del ciclo vital de los rotíferos, así como de las señales ambientales utilizadas para el inicio de la misma en el rotífero *Brachionus plicatilis*, considerando el posible significado ecológico y evolutivo de los factores que controlan la sexualidad en esta especie. La comprensión del significado de la mixis desde una perspectiva ecológica y evolutiva viene condicionada por un buen conocimiento del momento de inducción de la misma y de los factores que controlan esta inducción. Esto ha motivado el desarrollo de un gran número de trabajos empíricos acerca de los factores relacionados con la inducción de la reproducción sexual en poblaciones naturales y de laboratorio que son objeto de la revisión bibliográfica que se presenta en el capítulo 7. Se ofrece también en este capítulo una visión de las diferentes aproximaciones utilizadas en la interpretación del significado adaptativo del momento de la mixis en los rotíferos partenogenéticos cíclicos, y se describe un modelo teórico con el que mediante una serie de simulaciones se intenta predecir el momento óptimo para la mixis en los rotíferos monogonotes con una cierta ecología. El capítulo 8 considera la respuesta mítica de *Brachionus plicatilis* a la densidad de población y la importancia que en la modulación de esta

respuesta tienen la edad de la hembra y su genotipo. Los experimentos presentados en el capítulo 9 han sido diseñados para explorar la naturaleza del efecto de la densidad y se sugiere el posible significado adaptativo de una señal dependiente del hacinamiento de la población para la respuesta sexual de los rotíferos. Por último, el capítulo 10 estudia, mediante análisis demográfico y de proteínas totales, las diferencias fisiológicas que como consecuencia de su distinto comportamiento reproductivo presentan las hembras míticas y amíticas en rasgos de su historia vital, tales como la supervivencia, la fecundidad y la senescencia.

7. EL SIGNIFICADO DE LA MIXIS Y LOS FACTORES RELACIONADOS CON LA MISMA. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y APORTACIONES TEÓRICAS

7.1. INTRODUCCIÓN

La reproducción sexual es un fenómeno complejo en el curso del cual el genoma se diversifica mediante un tipo de división nuclear denominado meiosis y un tipo de fusión nuclear denominado singamia o fertilización. Durante la meiosis el genoma se reordena por el proceso de recombinación genética y por la distribución aleatoria de cada par de cromosomas homólogos en cada uno de los productos meióticos. La posterior singamia o fertilización reconstituye el estado diploide. El producto diploide de la fusión, el cigoto, resulta de la unión de dos núcleos haploides meióticamente diversificados, y por lo tanto es generalmente diferente de cualquiera de los dos núcleos diploides de los que desciende. La reproducción sexual es sinónimo de mixis (Ghiselin, 1974), ya que es un proceso de mezcla que cambia la relación entre diversos elementos (genes o grupos de ligamiento) del genoma, con o sin la introducción de nuevo material genético.

El modo predominante de reproducción en los animales es la reproducción sexual, siendo la partenogénesis una forma de reproducción derivada de la reproducción sexual (Bell, 1982; Suomalainen *et al.*, 1987). En ella un huevo da lugar a un nuevo individuo sin fertilización. La partenogénesis limita o inhibe el potencial para la recombinación genética.

No obstante, los animales no se encuentran necesariamente restringidos a un único tipo de reproducción. Los rotíferos de la clase Monogononta se caracterizan por poseer un ciclo de vida en el que la partenogénesis alterna con la reproducción bisexual, fenómeno conocido como partenogénesis cíclica o heterogonia (véase el capítulo 2). Esta partenogénesis es apomíctica y por lo tanto estrictamente clonal en ausencia de mutación. La fase partenogenética en el ciclo vital puede considerarse como un periodo de clonaje, y la fase sexual como un episodio de diversificación genética, siendo cada uno de los cigotos supervivientes el fundador de un nuevo clon.

Los partenogenéticos cíclicos son de gran interés porque retienen su capacidad para la reproducción bisexual, combinando las ventajas del rápido crecimiento poblacional proporcionado por la partenogénesis con las ventajas evolutivas de la recombinación genética y la singamia. Este tipo de organismos es útil en el estudio del

significado funcional de la mixis porque permiten comparar la biología de la reproducción sexual y de la asexual en una misma línea de descendencia.

En este capítulo se describen los factores relacionados con la reproducción sexual en los rotíferos monogonontes, y más concretamente con la inducción de la producción de hembras míticas, primer paso para la entrada en la fase sexual del ciclo vital. Se revisan los trabajos de carácter empírico llevados a cabo en el laboratorio sobre el control de la reproducción sexual, así como las observaciones en el campo que evidencian el suceso de este tipo de reproducción en condiciones naturales. Asimismo se abordan los planteamientos y aproximaciones de tipo teórico dirigidos a comprender el significado ecológico de la reproducción sexual en los rotíferos desde un punto de vista de la adaptación y evolución. Por último, el cuadro presentado se completa con la descripción de un modelo teórico y la discusión de los resultados obtenidos en las simulaciones con él efectuadas.

7.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LOS FACTORES RELACIONADOS CON LA MIXIS

La producción de hembras míticas es el paso inicial para la reproducción sexual, el cual viene seguido por la producción de machos, la fertilización y finalmente la producción de huevos durables. El conocimiento del momento en el que tiene lugar la reproducción sexual en los ciclos de vida, y de los tipos de señales ambientales utilizados para iniciar la reproducción sexual ayudaría a comprender el significado adaptativo de la mixis. Pero desafortunadamente y a pesar de la gran cantidad de bibliografía existente, la regulación de la producción de hembras míticas, y por lo tanto de la reproducción sexual, no se conoce bien.

Un gran número de investigadores han tratado de identificar los factores ambientales que provocan la producción de hembras míticas. Los primeros trabajos de Maupas, Nusbaum, Whitney, Shull, y otros (revisados por Birky y Gilbert, 1971) presentan resultados contradictorios y en ocasiones erróneos. Muchos de estos primeros estudios resultan difíciles o imposibles de interpretar, ya que usan una gran variedad de complejos medios de cultivo, cuyas fuentes de alimento se controlan de forma deficiente tanto en sus aspectos cualitativos como cuantitativos. Además, la temperatura, el fotoperiodo y la densidad de población a menudo no se encuentran bajo control en el diseño experimental, y frecuentemente, se omite el uso de controles experimentales adecuados. Estos primeros resultados aparecen tabulados en el trabajo de Halbach y Halbach-Keup (1972) y se resumen aquí en la tabla 7.1.

Tabla 7.1. Resumen de los resultados de algunos trabajos antiguos acerca de la influencia de diferentes factores externos sobre la tasa de mixis de los rotíferos (tomado de Halbach y Halbach-Kcup (1972)).

Factor	Induce	Inhibe	Ausencia de efecto	Género	Autor	
Cantidad de alimento: alimento abundante	+			<i>Asplanchna,</i>	Mitchell (1913), Shull (1915), Whitney (1916, 1917, 1919), Buchner y Kiechle (1965), Buchner <i>et al.</i> , (1969).	
	+			<i>Brachionus,</i>		
	+			<i>Epiphanes,</i>		
	+			<i>Pedalion</i>		
		+		<i>Asplanchna,</i>	Nusbaum (1987), Shull (1910a,b), Tauson (1927), Erman (1962).	
		+	<i>Brachionus,</i>			
		+	<i>Epiphanes</i>			
			+	<i>Asplanchna,</i>	Punnett (1906). Whitney (1907), Zawadowsky (1916), Watzka (1928), Buchner (1941b),	
			+	<i>Brachionus,</i>		
			+	<i>Diglena,</i>		
			+	<i>Epiphanes,</i>		
			+	<i>Keratella</i>		
Calidad del alimento: algas verdes	+			<i>Asplanchna,</i>	Mitchell (1913), Whitney (1914a, b, 1915, 1916), Shull (1915), Luntz (1929) (Hertel, 1942), Gaudenzi, y Kiechle (1965), Buchner <i>et al.</i> , (1969).	
	+			<i>Brachionus,</i>		
	+			<i>Diaschiza,</i>		
	+			<i>Diglena,</i>	Luntz (1929), Gilbert (1963).	
	+			<i>Epiphanes</i>		
			+	<i>Brachionus</i>		
Cambio de pH	+			<i>Asplanchna,</i>	Tauson (1925), Luntz (1929)	
	+			<i>Brachionus</i>		
			+	<i>Brachionus,</i>	Rumianzeff (1923), Luntz (1926), Buchner (1941b).	
			+	<i>Pterodina</i>		
Temperatura	+			<i>Brachionus,</i>	Maupas (1891), Halbach (1970b).	
	+			<i>Epiphanes</i>		
			+		<i>Epiphanes</i>	Shull (1911).
				+	<i>Asplanchna,</i>	Nusbaum (1897), Punne (1906), Whitney (1907), Watzka (1928), Buchner (1941b).
			+	<i>Brachionus,</i>		
			+	<i>Epiphanes,</i>		
			+	<i>Keratella</i>		
Cambio de temperatura: choque térmico	+			<i>Asplanchna,</i>	Moro (1915), Tauson (1926, 1927), Buchner (1941b), Pourriot (1965), Buchner y Kiechle (1966), Buchner <i>et al.</i> , (1969).	
	+			<i>Brachionus</i>		
			+	<i>Monostyla</i>	Laderman y Guttman (1963).	

internos

ambientales

poblacionales

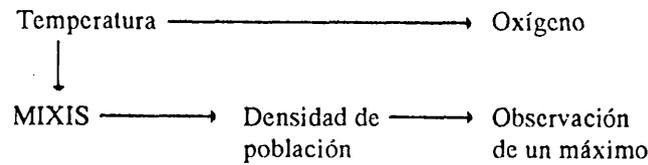
internos	ambientales	poblacionales
Edad de la madre	Calidad del alimento	Agrupamiento
Edad de las hembras preparentales	Cantidad de alimento	Densidad poblacional
Genotipo	Salinidad	Fase de crecimiento poblacional
	Temperatura	
	Fotoperiodo	

Figura 7.1. Clasificación de los factores más frecuentemente asociados con la reproducción sexual en algunas especies de rotíferos.

La mayor parte de los trabajos modernos cuidadosamente controlados se refieren a los géneros *Brachionus*, *Asplanchna* y *Notommata*. Existe una gran cantidad de información acerca de los factores internos y externos que inducen y modulan la producción de hembras míticas en estos tres géneros. La bibliografía existente al respecto ha sido objeto de varias revisiones (Gilbert, 1977a; Pourriot y Clément, 1981; Pourriot y Snell, 1983). Los factores internos más importantes identificados por estos autores son la edad de la madre y su genotipo. Entre los otros factores implicados más consistentemente con la producción de hembras míticas, están la densidad de población, el agrupamiento (número de individuos cultivados en un volumen constante de medio de cultivo), el fotoperiodo, la temperatura, la salinidad, y los aspectos cualitativos y cuantitativos de la dieta.

En el cuadro que aparece en la figura 7.1 se clasifican de forma esquemática estos factores que son los que más frecuentemente se han asociado con la reproducción sexual en algunas especies de rotíferos. Sin embargo, es conveniente señalar que en los estudios de campo y en algunos diseños experimentales de los trabajos realizados en el laboratorio la observación de tal asociación no siempre implica una relación causal

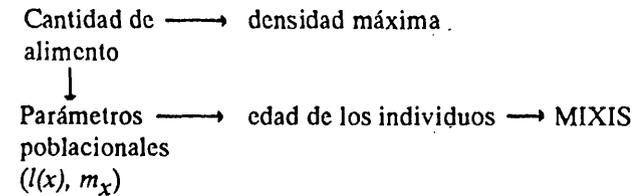
A)



Se supone que una disminución de la temperatura induce la mixis. Este cambio en la temperatura aumenta la concentración de oxígeno. La inducción de la mixis provoca una disminución del crecimiento de la población, y por lo tanto la inducción coincide con la observación de un máximo poblacional. Un investigador podría asociar la inducción de la mixis con: un descenso de la temperatura, un aumento del oxígeno, o un aumento de la densidad de población, cuando el carácter de las relaciones sería:

oxígeno-mixis: relación espuria
 temperatura mixis: relación causal directa
 máximo de densidad-mixis: relación causal inversa

B)



Un mayor nivel de alimento cambia la densidad máxima que puede alcanzar la población. Este nivel de alimento afecta también a los parámetros poblacionales ($l(x)$ y m_x) los cuales determinan un cambio en la estructura de edad de la población. La tasa de mixis de la población como un todo es dependiente de cambios en la edad de los individuos. El carácter de las relaciones para las distintas asociaciones de parámetros que se podrían observar es el siguiente:

cantidad de alimento-mixis: relación causal indirecta
 edad-mixis: relación causal directa
 densidad-mixis: relación espuria

Figura 7.2. Ejemplos imaginarios de las diferentes relaciones causales que podrían existir entre algunos factores relacionados con la mixis y las posibles asociaciones que podría detectar un investigador según el parámetro del sistema que estudiara. Obsérvese que dichas asociaciones no siempre implican causación directa.

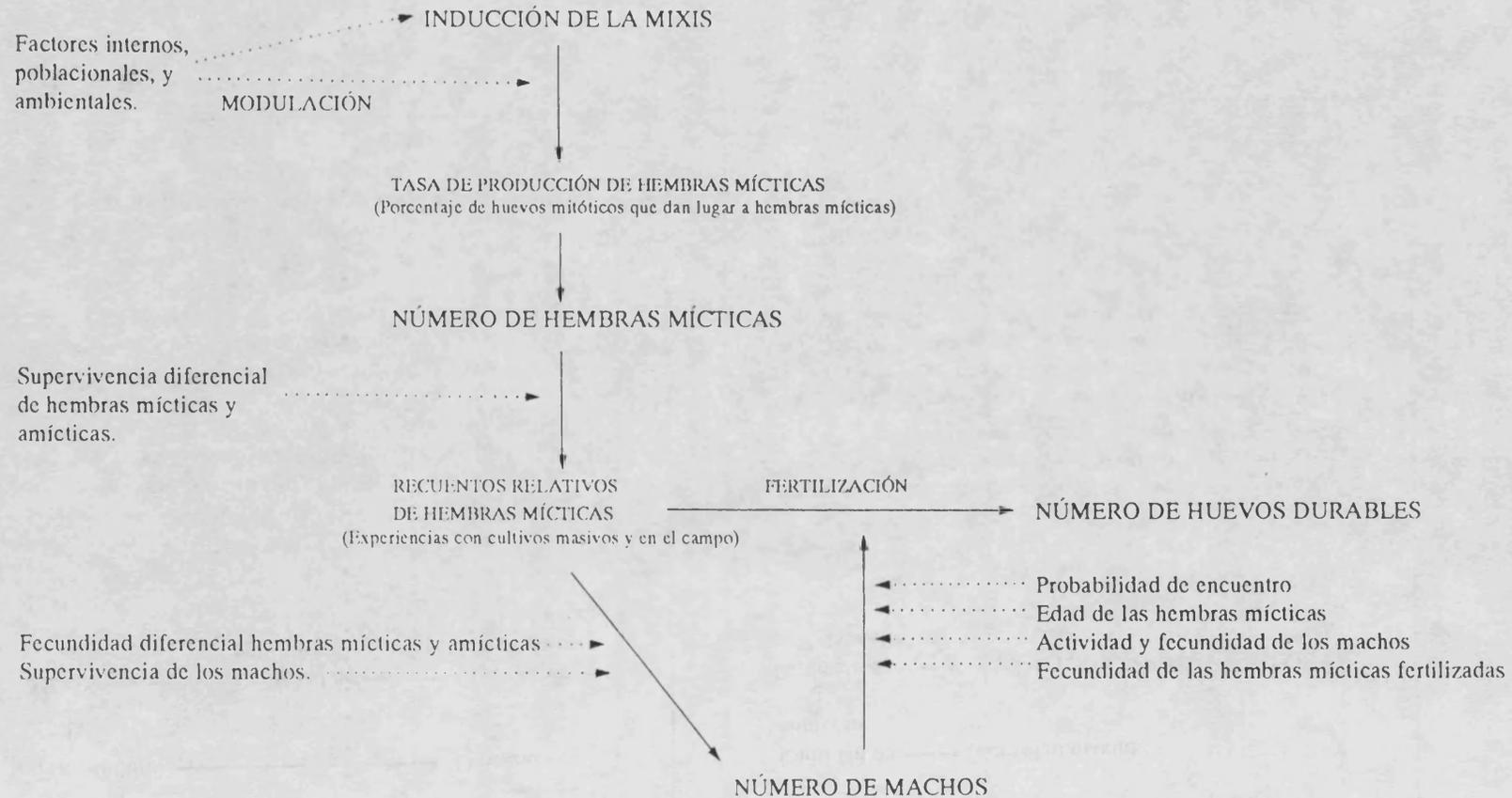


Figura 7.3. Diferentes procesos que comprende la fase de reproducción sexual en el ciclo heterogónico de los rotíferos monogonontes. Se indican las distintas variables por las que dichos procesos se encuentran afectados.

directa entre el factor y el efecto observado. Esta situación se ilustra en la figura 7.2 mediante unos ejemplos imaginarios, y en los que se indican las posibles relaciones causales que podrían existir entre algunos factores abióticos y poblacionales, y la reproducción sexual, de las cuales se derivarían asociaciones que no implican causación directa.

Otra dificultad para establecer comparaciones entre estudios e interpretar resultados de forma global viene determinada por el tipo de medida utilizado por el investigador para evaluar la magnitud de la reproducción sexual. De los diferentes procesos que comprende la reproducción sexual (figura 7.3), todos los cuales son relevantes para la comprensión de este fenómeno, únicamente se ha considerado aquí la inducción por ser la fase más específicamente asociada a la mixis y que puede estar sujeta a procesos selectivos no triviales. Por ello la revisión bibliográfica se ha centrado en los estudios sobre la producción de hembras míticas, la primera consecuencia que aparece tras la inducción de la mixis. Cuando se ha considerado relevante para esclarecer la asociación entre determinados factores y la inducción de la mixis, se han tenido en cuenta también estudios que evalúan la producción de machos y huevos durables, aun cuando otros procesos pudieran distorsionar la relación entre dichos indicadores y la producción de hembras míticas.

A continuación se relacionan y discuten los factores que se han enumerado más arriba, y que como se ha señalado han sido asociados de forma más consistente con la reproducción sexual en los rotíferos.

Densidad de población o hacinamiento. La sexualidad en varias especies de *Brachionus* se ha relacionado con las altas densidades de población tanto en cultivos de laboratorio (Gilbert, 1963b, 1977b; Hino e Hirano, 1976; Pozuelo, 1977; Pourriot y Clément, 1981; Pourriot y Snell, 1983) como en poblaciones naturales (Buchner, 1941b; Wesenberg-Lund, 1930; Ito y Iwai, 1958; Bogoslavsky, 1963) y naturales manipuladas (Miracle y Guiset, 1977). No obstante, aunque la densidad es el factor que de una forma más general se ha identificado como estímulo efectivo en la inducción de la mixis en el género *Brachionus*, su efecto no ha sido observado en algunos estudios. Así, Halbach y Halbach-Keup (1972) no encontraron correlación entre sexualidad y densidad de población en el estudio realizado en tanques de cultivo con individuos de tres especies del género *Brachionus* procedentes de 15 ambientes distintos. Otros autores tampoco han detectado el efecto de la densidad (Scott, 1977; Pourriot y Rougier, 1979).

El efecto de la densidad de población en la producción de hembras míticas en *Brachionus calyciflorus* fue puesto de manifiesto en primer lugar por Buchner (1941b) y posteriormente confirmado por Gilbert (1963b). En cultivos de laboratorio a corto plazo, las hembras mantenidas desde su nacimiento a una densidad de 4 hembras/ml produjeron un número de descendientes míticas significativamente mayor que las cultivadas a una densidad de 0.66 hembras/ml. Esta relación se mantuvo independientemente de que las hembras progenitoras fueran cultivadas de forma aislada o en grupos de seis (Gilbert, 1963b). Por lo tanto, Gilbert (1963b), y Birky y Gilbert (1971) concluyeron que el efecto del hacinamiento era independiente de una interacción directa entre los individuos o de efectos de grupo, aunque no descartaron que tales efectos pudieran tener lugar en los rotíferos.

Las experiencias llevadas a cabo por Rougier y Pourriot (1977) en *B. calyciflorus* mostraron resultados diferentes a los obtenidos por Gilbert (1963b), y de difícil interpretación dada la inconstancia de la influencia de la densidad y del agrupamiento sobre la tasa de mixis que observan estos autores. Según la interpretación dada por ellos, sus resultados ponen de manifiesto un efecto del agrupamiento que predomina sobre la densidad de población, y que varía en función de esta última, la cual parece tener también efecto sobre la tasa de mixis pero de forma irregular. Sin embargo, si se realiza una revisión detallada de los resultados de este estudio, éstos indican que el efecto del agrupamiento no se detecta en algunas de las densidades ensayadas. (No observan efecto del agrupamiento a las densidades medias (0.6 y 1 hembra/ml) mientras que a las densidades extremas (0.2 y 2 hembras/ml) el agrupamiento ejerce una influencia significativa pero inversa según el nivel de agrupamiento considerado.) Además para aquellas densidades en las que se detecta un efecto significativo de este factor, su influencia es positiva o negativa según el nivel de agrupamiento considerado. Del mismo modo, la influencia de la densidad sólo se detecta para algunos niveles de agrupamiento, pero cuando este efecto se manifiesta es siempre de carácter positivo. Por lo tanto los resultados sugieren que ambos factores actúan de una forma interactiva compleja, de modo que no es posible identificar ningún patrón simple; esto quizás resulta más acentuado con respecto al efecto del agrupamiento.

Estos mismos autores, en un estudio realizado en la especie *Brachionus plicatilis*, encontraron que en la cepa utilizada la producción de hembras míticas era dependiente del agrupamiento, el cual muestra un efecto positivo, pero no lograron poner de manifiesto un efecto de la densidad de población (Pourriot y Rougier, 1979). La ausencia de tal efecto fue observada también en una cepa estudiada por Lubzens (1981).

Pero aunque en dicha cepa la densidad de población por sí misma no fue capaz de inducir la sexualidad, una vez que ésta se indujo mediante cambios en la salinidad del cultivo, el nivel de mixis aumentó con la densidad de población (Lubzens *et al.*, 1980; Lubzens, 1981; Lubzens *et al.*, 1985). Desgraciadamente las experiencias llevadas a cabo por Hino e Hirano (1976) en esta misma especie, y en las que se detectó un efecto positivo de la densidad de población sobre la mixis, utilizan un diseño experimental que superpone el efecto de la densidad *sensu stricto* (volumen de medio disponible por hembra aislada) con el del agrupamiento. En un reciente estudio, Snell y Boyer (1988) encontraron un efecto positivo de la densidad de población sobre la producción de hembras míticas en el rango de densidades ensayadas, y establecieron un valor umbral de 0.147 hembras/ml para la producción de hembras míticas en su cepa de *Brachionus plicatilis*.

En las experiencias realizadas con cultivos masivos de laboratorio a largo plazo, en los cuales el medio no se renueva, la dinámica poblacional se caracteriza por un rápido aumento de la producción de hembras míticas con la densidad de población. La producción de hembras míticas alcanza su máximo ligeramente antes o al mismo tiempo que la densidad poblacional, y entonces disminuye hasta cero antes de que se produzca la desaparición de la población de animales activos. Tal patrón fue observado por Buchner (1941b) en *Brachionus urceolaris*, por Ito (1960) y por Pozuelo (1977) en *B. plicatilis*, y por Gilbert (1963b, 1977b) en *B. calyciflorus*. En ocasiones la disminución de la proporción de hembras míticas con el envejecimiento del cultivo se produce incluso cuando las densidades de población continúan siendo altas (Gilbert 1963b, 1977b).

El mecanismo por el que actúa el efecto del hacinamiento no se conoce. El efecto de la densidad en cultivos a corto plazo ha sido atribuido por Gilbert (1963b) a la acumulación de una sustancia producida y secretada o excretada al medio por los rotíferos. Gilbert (1963b) encontró que las condiciones de hacinamiento producidas por *Paramecium caudatum* no inducían la producción de hembras míticas en *B. calyciflorus*. Por el contrario, el hacinamiento con *B. angularis* indujo la producción de hembras míticas. Por ello, este autor consideró que la sustancia propuesta debía de tener cierta especificidad taxonómica. Las observaciones de Halbach y Halbach-Keup (1972) son compatibles con esta interpretación, ya que estos autores observaron que los periodos de sexualidad en tres especies de *Brachionus* que coexisten eran independientes unos de otros. El declive de la sexualidad en los cultivos a largo plazo cuando las densidades de población aún son altas resulta más difícil de interpretar dentro

del marco de esta hipótesis. Gilbert (1963b) propone que la hipotética sustancia debía de ser producida por los rotíferos solamente en las fases de crecimiento exponencial, o sólo por los individuos jóvenes, los cuales predominan en dichas fases de crecimiento.

Fotoperiodo. Las investigaciones de (Pourriot, 1963; Pourriot y Clément, 1975) demostraron por primera vez que la sexualidad en algunas especies de rotíferos podía estar controlada por el fotoperiodo. Por ejemplo, comprobaron que las hembras míticas aparecen en los cultivos del rotífero *Notommata copeus* únicamente cuando el fotoperiodo diario es superior a unas 15 horas. Respuestas similares al fotoperiodo se han observado también en *Notommata codonella* y *Trichocerca ratus* (Pourriot, 1963). Posteriormente, Laderman y Gutman (1974) observaron que el cambio del fotoperiodo provoca la aparición de hembras míticas en *Brachionus rubens*. No existen evidencias de tal efecto en otras especies del mismo género y del género *Asplanchna*.

En *Notommata copeus* los fotoperiodos con capacidad inductora, según (Clément y Pourriot, 1972) parecen alterar la fisiología de las hembras amíticas de manera que algunos de sus huevos se desarrollan dando lugar a hembras míticas. Los resultados de otros varios estudios sobre *N. copeus* sugieren que el fotoperiodo no influye sobre la tasa de reproducción, y la respuesta de las madres es independiente de su edad (Pourriot y Clément, 1975, Clément y Pourriot, 1975, 1976a). El efecto del fotoperiodo se encuentra modulado por la densidad de población, aunque de una forma bastante compleja. Así, el nivel de producción de hembras míticas disminuye significativamente conforme aumenta la densidad de población; esto es, la frecuencia de descendientes míticos es menor cuanto menor es el volumen del medio en que se cultiva a la madre (Clément y Pourriot, 1973a). Sin embargo, a una densidad dada las hembras agrupadas producen más descendientes míticas que una hembra aislada (Clément y Pourriot, 1973b). Además, si las hembras se cultivan agrupadas en un medio renovado a intervalos, la producción de hembras míticas es mayor cuanto mayor es la frecuencia de renovación del medio. Por lo tanto el efecto del fotoperiodo se encuentra regulado por el hacinamiento, si bien en un sentido opuesto al observado en los cultivos de *Brachionus* y *Asplanchna*, y este efecto del hacinamiento se encuentra a su vez modificado por un "efecto de grupo", el cual es un efecto del número absoluto de hembras y no de su densidad. La compleja hipótesis propuesta para explicar el efecto observado de la densidad y el agrupamiento (Clément y Pourriot, 1975) implica la secreción de dos sustancias antagónicas por parte de *N. copeus*. Tanto la existencia de estas sustancias como los aspectos básicos del intrincado esquema hipotético de

actuación propuesto para las mismas, carecen de soporte experimental. No obstante, las consideraciones sobre las posibles causas de los efectos de la densidad y del agrupamiento en *Notommata copeus* resultan de interés en el análisis de la producción de hembras míticas de otros rotíferos tales como *Brachionus*.

Dieta. Uno de los factores externos relacionados con la producción de hembras míticas es la dieta, tanto en sus aspectos cualitativos como cuantitativos.

Quizás uno de los efectos de la calidad de la dieta mejor estudiados es la inducción de la producción de hembras míticas en el género *Asplanchna* por la presencia de alfa-tocoferol (vitamina E), sintetizado por los organismos fotosintéticos. En *Asplanchna brightwelli*, *Asplanchna sieboldi* y *Asplanchna intermedia* se precisa la presencia de este compuesto en la dieta para la expresión de la sexualidad. El alfa-tocoferol es efectivo a concentraciones muy bajas (0.2–0.4 pg por individuo en *A. sieboldi*, Birky y Gilbert, 1972; 0.02 pg/hembra en *A. brightwelli*, Gilbert, 1983c), y es altamente específico, de manera que los análogos de su molécula carecen de actividad inductora (Gilbert y Birky, 1971).

La sexualidad en estas especies está estrechamente relacionada con un complejo polimorfismo de origen no genético (Gilbert y Thompson, 1968; Gilbert, 1980a). La expresión de este polimorfismo requiere alfa-tocoferol, y el tipo de reproducción de una hembra está relacionado con el morfotipo que presenta. Así, el efecto del alfa-tocoferol sobre la sexualidad se encuentra modificado por la frecuencia de la distribución de los diferentes morfotipos, la cual a su vez está controlada por el alfa-tocoferol y probablemente por el tamaño de la presa (Gilbert, 1973a, 1975a, 1977a y 1980a). Los aspectos ecológicos y evolutivos del polimorfismo en *Asplanchna* han sido discutidos por Gilbert (1973a,b, 1980a). Aunque el alfa-tocoferol es necesario para la producción de hembras míticas en estas especies de *Asplanchna*, existe un efecto modulador de la respuesta por la densidad de población (Birky, 1969; Gilbert, 1983c), lo cual sugiere que este último factor podría controlar la sexualidad en poblaciones naturales.

Los efectos de la calidad de la dieta en la respuesta mítica han sido también puestos de manifiesto en algunas especies del género *Brachionus*. Aunque se ha observado una ausencia de efecto del alfa-tocoferol sobre la mixis en *Brachionus calyciflorus* (Gilbert y Litton, 1975), así como una falta de relación entre polimorfismo y sexualidad (Gilbert, 1977c), las tasas de mixis pueden verse alteradas por la especie algal utilizada como alimento de los rotíferos (Pourriot, 1957; Pourriot y Rougier, 1979). Pourriot y Rougier mostraron que el tipo de alga utilizada para la alimentación de

Brachionus plicatilis podía influir en la producción de hembras míticas. Estos autores observaron que las tasas de mixis eran mayores en los rotíferos alimentados con una dieta de *Nanochloris* que con una de *Dunaliella*. Además, los efectos del agrupamiento (implicados como posible efecto para la mixis en *B. plicatilis*, tal y como se ha indicado antes) aparecieron en aquellos grupos alimentados con *Dunaliella*, pero no se detectaron en aquellos con una dieta de *Nanochloris*. Un efecto similar del tipo de alga utilizado como alimentación sobre la tasa de mixis ha sido observado en *B. calyciflorus* (Gilbert, 1980b) y en *Brachionus rubens* (Pourriot *et al.*, 1986a). El tipo de alimento algal influencia netamente las tasas de mixis independientemente de su acción sobre la fecundidad.

Lubzens *et al.* (1980) observaron una menor producción de huevos durables en *B. plicatilis* alimentado con *Platymonas* y *Phaeodactylum* en comparación con la producción obtenida bajo una dieta de *Chlorella stigmatopora*. No obstante, en este caso el diseño experimental no permite distinguir si tal reducción en la producción de huevos durables se debe a una disminución en la tasa de mixis o a una disminución de la fecundidad de las hembras fertilizadas.

Otro aspecto cualitativo de la dieta relacionado con la expresión de la reproducción sexual en *B. plicatilis* es la edad del cultivo de algas utilizado como alimento de los rotíferos (Lubzens y Minkoff, 1988), es decir de los cambios en la calidad nutricional relacionados con la edad de los organismos fitoplanctónicos utilizados como alimento. Este factor parece determinar el patrón de aparición de descendientes míticas a lo largo de la puesta de las hembras (para una descripción detallada de los diferentes patrones observados en relación con los distintos tratamientos alimentarios ensayados, véase más adelante, epígrafe "Edad de las hembras"). Lubzens y Minkoff (1988) propusieron para explicar sus resultados, o bien la existencia de un factor específico, semejante al alfa-tocoferol, en las algas en fase de crecimiento exponencial, o bien el valor nutricional de la dieta por sí mismo como factor inductor de la mixis. Así, los cambios que se producen en las características nutricionales de las algas durante el tránsito de la fase de crecimiento exponencial a la fase estacionaria tardía determinarían el patrón de aparición de descendientes míticas. La mixis aparecería cuando las algas suministradas como alimento fueran jóvenes en su mayoría y resultaría suprimida como consecuencia del envejecimiento del cultivo. Un trabajo relativamente reciente (Ben-Amotz y Fishler, 1982) mostró también que la manipulación de las condiciones de crecimiento de las algas empleadas como alimento

de *B. plicatilis* puede dar lugar a la aparición de reproducción sexual en condiciones donde la reproducción es exclusivamente asexual.

Snell y Bieberich (en prensa) compararon la respuesta mítica y la producción de huevos durables en *B. plicatilis* cultivado con *Chlorella*, el alga cianofícea *Schizothrix*, levaduras, y combinaciones de estos tres tipos de alimento. La mayor producción de hembras míticas se observó con una dieta que combinaba los dos tipos de algas, mientras que la mayor y más consistente cantidad de huevos durables se produjo cuando se incluyó la levadura en la dieta, ya como única fuente de alimento o en combinación con las algas. Los resultados de este estudio muestran que la producción de hembras míticas y la producción de huevos durables podrían tener requerimientos nutricionales distintos.

El efecto de los aspectos cuantitativos de la dieta ha sido estudiado por Lubzens (1981), quien examinó la producción de huevos durables en cultivos con seis niveles diferentes de alimento (0.1, 0.5, 1, 2, 4, y 8×10^6 células/ml) usando *Chlorella stigmatophora* en medios con agua de mar al 25%, 50%, 75%, y 100%. La tasa intrínseca de crecimiento de la población (r) fue muy baja a las dos salinidades más altas y por lo tanto el número de machos fue también bajo, no observándose huevos durables a estas salinidades. En los medios con 25 y 50% de agua de mar se observaron valores altos de r , excepto para el menor nivel de alimento. La máxima producción de huevos durables ocurrió al nivel de alimento medio utilizado. Hay que hacer constar sin embargo, que los niveles de alimento experimentados fueron todos ellos muy altos.

Snell y Boyer (1988) determinaron el nivel umbral de alimento necesario para la producción de hembras míticas. En su trabajo, que ilustra cómo diferentes valores en la concentración de alimento afectan a la producción de hembras amíticas y míticas, estos autores ensayaron 5 niveles de alimento (en un rango de 5×10^3 a 10^6 células/ml de *Dunaliella*). La producción de hembras míticas al igual que la de las amíticas aumentó linealmente con la concentración de alimento a partir de un valor umbral. El valor umbral para la producción de hembras míticas fue de 15.3×10^3 células/ml, aproximadamente 10 veces superior al necesario para la producción de hembras amíticas.

Temperatura. Beauchamp (1935) observó una menor frecuencia de reproducción sexual en el rotífero de agua dulce *Asplanchna girodi* a temperaturas extremas o bajos niveles de alimento. En la cepa de *Brachionus plicatilis* estudiada por Hino e Hirano (1984) utilizando un diseño experimental que independizaba de forma muy estricta el

efecto de la temperatura del de la densidad de población, la tasa de producción de hembras míticas disminuyó fuertemente a altas temperaturas (37°C). Esta reducción de los niveles de reproducción sexual es consistente con los resultados de Snell (1986). Este autor utilizó el número de machos como indicador del nivel de reproducción sexual. No obstante, hay que señalar que una reducción en el número de machos no indica necesariamente una menor producción de hembras míticas sino que puede deberse a una menor fecundidad de las hembras míticas o a una menor supervivencia de este tipo de hembras o de los machos para determinados valores de los factores estudiados (véase la figura 7.3). En el citado estudio de Snell no se detectó un efecto diferente de la temperatura elevada sobre la duración media de la vida de las hembras míticas con respecto a la de las hembras amíticas, pero sí sobre la fecundidad. La disminución de la fecundidad de las hembras míticas observada a altas temperaturas contribuiría fuertemente en la reducción en el número de machos que se detecta en tales condiciones extremas de temperatura. Además, la supervivencia de los machos no fue evaluada, y también podría influir en los resultados obtenidos. Por lo tanto, el efecto real de las altas temperaturas sobre la producción de hembras míticas no queda bien determinado en este estudio.

En este mismo trabajo, Snell (1986) estudió también el efecto de las bajas temperaturas sobre una cepa de *Brachionus plicatilis*. A bajas temperaturas (20°C) no tuvo lugar la producción de machos, lo que fue atribuido a una supresión de la producción de hembras míticas, ya que en el efecto de este cambio de temperatura, tanto en la supervivencia como en la fertilidad, no hay diferencias entre las hembras míticas y las amíticas. En cambio Hino e Hirano (1984) observaron la mayor producción de hembras míticas a 15°C. Lamentablemente, estos autores no investigaron el efecto sobre la producción de hembras míticas a temperaturas inferiores a 15°C, ni tampoco indicaron el efecto de las temperaturas ensayadas (15, 20, 25, y 30°C) sobre la reproducción asexual. El distinto origen de las cepas empleadas por Hino e Hirano (1984) y Snell (1986) podría explicar el diferente comportamiento en cuanto a los niveles de reproducción sexual observados para la temperatura más baja ensayada en ambos estudios, así como la mayor tolerancia a las altas temperaturas manifestada por la cepa empleada por Snell (1986).

En otras especies del género *Brachionus* se han realizado experiencias para determinar el efecto de las bajas temperaturas sobre la reproducción sexual, si bien con un carácter distinto a las experiencias citadas anteriormente. Ruttner-Kolisko (1964) mostró que en *Brachionus rubens* un súbito choque térmico frío (6°C durante 2 horas)

inducía a un gran número de los ovocitos en crecimiento a desarrollarse dando lugar a hembras míticas. Gilbert (1977d) realizó también algunos experimentos en los que sometía a rotíferos de la especie *Brachionus calyciflorus* a este tipo de choque térmico. Los resultados de este estudio no mostraron un efecto claro: sólo en uno de los 5 experimentos llevados a cabo con esta especie se observó un efecto aparente del choque frío. Aunque el conocimiento del mecanismo de acción del choque térmico ayudaría a explicar el modo de acción de otros factores inductores, probablemente el efecto detectado por Ruttner-Kolisko (1964) es irrelevante desde un punto de vista ecológico ya que este tipo de cambios bruscos de temperatura no debe de ser experimentado de forma habitual por las poblaciones de rotíferos naturales y de laboratorio, y posiblemente comportan cambios fisiológicos que usualmente no se encuentran asociados con la producción de hembras míticas en la naturaleza.

En *Notommata copeus* las tasas de mixis se encuentran afectadas negativamente por el descenso de la temperatura (a 18°C la tasa de mixis es tres veces menor que a 28°C). Las temperaturas altas modifican la posición del valor umbral del fotoperiodo para la respuesta mítica, la cual aparece con menos horas de luz (Pourriot *et al.*, 1986b).

En rotíferos de la especie *B. plicatilis*, Hino e Hirano (1985) pusieron de manifiesto la existencia de una relación entre (1) la temperatura a la cual se habían formado los huevos durables y (2) el patrón de reproducción sexual que en relación con la temperatura presentaba la cepa derivada de tales huevos. Entre las cepas derivadas de huevos durables producidos a altas temperaturas (mayores de 25°C en este estudio) la tasa de aparición de hembras míticas no se ve afectada por la temperatura del medio de cultivo. Sin embargo, entre aquellas derivadas de huevos originados a baja temperatura (por debajo de 25°C) la tasa de mixis aumenta cuando disminuye la temperatura en el rango de temperaturas inferiores a 25°C, y no se ve afectada por las superiores a 25°C.

Salinidad. En el rotífero eurihalino *Brachionus plicatilis* Lubzens *et al.* (1980) encontraron que la cepa que estudiaban cultivada en agua de mar (38 g/l de salinidad; 30°C) se reproducía asexualmente incluso en condiciones de alta densidad de población (densidades de población superiores a 40 hembras/ml). La inducción de la producción de hembras míticas se produjo reduciendo la concentración en agua de mar del medio de cultivo (Lubzens *et al.* 1980; Lubzens, 1981). Se desconoce el mecanismo por el cual el cambio de la salinidad del medio de cultivo ejerce esta influencia. De acuerdo con Pourriot y Snell (1983), es posible que las salinidades elevadas inhiban la mixis, y una

vez que este bloqueo se elimina mediante la transferencia de los rotíferos a salinidades más bajas, la mixis aparece, pero como respuesta a otros estímulos ambientales.

En un trabajo posterior, Lubzens *et al.* (1985) exploraron el rango de salinidades a las que se produce la respuesta sexual a la salinidad y su relación con la reproducción asexual. A salinidades extremas (2 y 30 g/l de salinidad) se registraron bajas proporciones de hembras míticas, y se detectaron los mayores niveles de mixis a salinidades intermedias (entre 4 y 20 g/l). Los resultados indican una relación entre las tasas exponenciales de reproducción asexual y la mixis que sugiere que las condiciones de salinidad que conducen a una tasa óptima de reproducción asexual facilitan también la reproducción sexual. Snell (1986), en un estudio del efecto de diferentes factores ambientales sobre la reproducción de las hembras míticas y amíticas, observó también una menor producción de machos a salinidades extremas. No obstante, aunque la producción de machos es una medida del nivel de reproducción sexual, tal y como se ha indicado para la temperatura una reducción en el número de machos puede explicarse por una menor producción de hembras míticas, una menor fecundidad de las hembras míticas, o una disminución en la supervivencia de estas hembras o de los machos en estas condiciones de salinidad extremas. La elección de una de estas tres causas debe efectuarse mediante contraste experimental. Sin embargo, en los resultados descritos por Snell (1986) no se presentan datos del posible efecto que pudiera tener el rango de salinidades ensayadas sobre la supervivencia y la fecundidad de las hembras míticas.

Los resultados de Hino e Hirano (1988) corroboran los de Lubzens *et al.* (1985) y son consistentes con la interpretación de los resultados de Snell (1986) como un efecto de la salinidad sobre la tasa de producción de hembras míticas, ya que encontraron un aumento de la tasa de producción de hembras míticas a salinidades intermedias (4 a 16 g/l), así como un crecimiento de la población más rápido. En este mismo estudio, estos autores además observan que la respuesta mítica a la salinidad de las cepas derivadas de huevos durables depende de las condiciones de salinidad en las que se cultivó la cepa parental. Las cepas originadas a partir de huevos durables que se formaron en cultivos con una salinidad del 4 g/l presentan tasas de mixis que varían notablemente en función de la salinidad del cultivo, siendo mayores a salinidades bajas. Contrariamente las cepas procedentes de huevos durables originados a 16 g/l de salinidad muestran una respuesta mítica independiente de la salinidad del medio de cultivo. La tasa de mixis cambia en relación con los factores ambientales, pero el patrón de cambio que presenta una cepa dada depende de las condiciones en que se formó su huevo durable fundador.

Recientemente, Pozuelo y Lubian (en prensa) han confirmado el efecto negativo de las altas salinidades sobre la reproducción sexual.

Edad de las hembras. En una serie de trabajos (Pourriot y Rougier, 1976; Rougier y Pourriot, 1977; Clément *et al.*, 1977; Rougier *et al.*, 1977) se puso de manifiesto que la edad de las hembras estaba inversamente correlacionada con la proporción de hijas míticas producidas en las especies *Brachionus calyciflorus* y *Brachionus rubens*. Al menos un 80% de los huevos producidos por las hembras durante los primeros días de puesta se desarrollaban dando lugar a hembras míticas. Este porcentaje disminuía regularmente conforme aumentaba la edad de la hembra madre. No obstante, este patrón de disminución regular de la tasa de mixis con la edad de la madre parece presentar variaciones en *B. calyciflorus* en función de la temperatura (Pourriot y Rougier, 1986). La renovación diaria del medio no implicaba la desaparición del efecto de la edad materna sobre la mixis y por lo tanto éste debía implicar modificaciones internas del organismo relacionadas con el envejecimiento. La influencia del envejecimiento sobre el control de la reproducción sexual en *B. calyciflorus* fue adicionalmente puesta de manifiesto en el mismo trabajo al detectar un efecto negativo de la edad de las hembras preparentales (abuelas) sobre la proporción de hembras míticas producidas por las madres. Este efecto desaparecía con la renovación diaria del medio lo cual parece indicar que podría estar mediado por la secreción o excreción de sustancias por parte de los rotíferos.

Clément y Pourriot (1977, 1979, 1980) observaron efectos similares de la edad de las hembras preparentales en *Notommata copeus*, si bien este efecto parece tener una naturaleza distinta al observado en el género *Brachionus*. En *Notommata copeus* estos autores detectaron también una variación en la producción de hembras míticas a lo largo del periodo reproductivo pero dicho patrón no parece estar relacionado con la edad de la madre (Clément y Pourriot, 1976a).

Los experimentos llevados a cabo en *Brachionus plicatilis* (Lubzens y Minkoff, 1988) pusieron de manifiesto una serie de patrones de aparición de descendencia mítica en relación con la edad de las madres que difieren del descrito para *B. rubens* y *B. calyciflorus* (véase inmediatamente más arriba). Estos autores realizaron un seguimiento de la secuencia de aparición de hembras míticas en la progenie de individuos que fueron sometidos a varios tratamientos complejos, diferentes en cuanto a la edad del cultivo algal. En todos los casos los neonatos producidos en primer lugar fueron hembras amíticas, y se encontró variabilidad en los patrones de aparición de hembras

mícticas entre los neonatos nacidos posteriormente. En el patrón más frecuente, denominado tipo A por los autores, la probabilidad de que una hembra recién nacida sea mítica aumenta hacia la mitad de la fase reproductiva de sus progenitoras para sufrir después un leve descenso. En el segundo patrón, tipo B, la probabilidad de que una neonata sea mítica es constante durante el periodo reproductivo de las madres, a excepción de las neonatas nacidas inicialmente que son invariablemente amícticas. Por último, en el tipo C, la producción de hembras míticas es máxima al final del periodo reproductivo de las madres. Los tres patrones, que según la interpretación dada por Lubzens y Minkoff (1988) vendrían determinados por cambios en la calidad de la dieta (véase más arriba, epígrafe "Dieta"), difieren de los observados en *B. rubens* y *B. calyciflorus*, donde las tasas de ρ mixis más elevadas se observaron al inicio del periodo reproductivo. Lubzens y Minkoff (1988) atribuyen estas diferencias a la especificidad de los patrones según las especies o a la metodología empleada en las diferentes experiencias. Hino e Hirano (1976) observaron también una cierta tendencia a la aparición tardía de las hembras míticas en la descendencia de *B. plicatilis*.

Cepa. Las diferentes líneas, clones o variedades de una misma especie pueden responder bastante diferentemente a los factores ambientales en relación con la expresión de su sexualidad. Algunas de las discrepancias que aparecen en la bibliografía pueden ser debidas a tales diferencias. Se ha observado una considerable variabilidad intraespecífica en la respuesta mítica de *Brachionus calyciflorus* (Gilbert, 1963b), *Trichocerca rattus* (Pourriot, 1965b), *Notommata copeus* (Clément y Pourriot, 1976b) y *Asplanchna sieboldi* (Birky, 1969; Gilbert, 1975a, b). Estas observaciones sugieren que la producción de hembras míticas se encuentra en parte bajo control genético, y continúan acumulándose nuevas evidencias que apoyan esta idea. Pourriot y Clément (1977) compararon la respuesta mítica de tres clones de *Notommata copeus* a diferentes densidades de población, agrupamiento, y edades de las hembras preparentales. Aunque se observó uniformidad en el tipo de respuesta entre los diferentes clones, la magnitud de la misma fue diferente. La existencia de diferencias entre la respuesta mítica de diferentes clones de *B. calyciflorus*, y su posible determinación genética fue documentada también por Buchner (1977).

Hino e Hirano (1977) examinaron 20 cepas, cada una de ellas derivada de un huevo durable, procedentes todos ellos de un mismo cultivo de *B. plicatilis*. Se observó una gran variabilidad en cuanto a su tendencia para experimentar mixis: en algunas cepas no aparecen hembras míticas hasta transcurridas 25 generaciones, mientras que

en otras aparecen hembras míticas en cada generación. Un estudio similar de Lubzens (1989), en el que se evalúa la capacidad mítica de diferentes clones originados a partir de huevos durables de un clon de laboratorio de *B. plicatilis*, muestra que entre las cepas derivadas existe una gran variabilidad en cuanto a los niveles de mixis y capacidades para producir huevos durables. Algunas de estas cepas únicamente se reproducen asexualmente, otras presentan un bajo nivel de mixis y no producen huevos durables, por último existen otras que presentan las características de la cepa originaria, con un alto nivel de mixis y producción de huevos durables.

Una importante variabilidad intercepa ha sido también observada en *B. plicatilis* por Snell y Bieberich (en prensa). La comparación entre cepas realizada en un ambiente controlado reveló una diferencia de hasta el doble de magnitud en la intensidad de la respuesta. Snell y Hoff (1985) y Pozuelo y Lubian (en prensa), detectaron una escasa variabilidad entre cepas en relación con la tasa de reproducción asexual, pero una gran variabilidad en la de reproducción sexual, que atribuyen a la existencia de variabilidad genética en cuanto a la capacidad para experimentar la mixis.

7.3. INCIDENCIA DE LA REPRODUCCIÓN SEXUAL EN POBLACIONES NATURALES

Existen muy pocos estudios en los que se haya realizado un seguimiento de la incidencia de la reproducción sexual en poblaciones naturales (Wesenberg-Lund, 1930; Carlin, 1943; Nauwerck, 1963; Amren, 1964), y de ellos sólo algunos han proporcionado datos cuantitativos sobre la reproducción sexual observada. El volumen de información más importante de que se dispone hace referencia a los rotíferos planctónicos de grandes lagos (Carlin, 1943; Nauwerck, 1963). Carlin (1943) determinó las densidades poblacionales de muchas especies de rotíferos realizando observaciones muy frecuentes durante largos periodos de tiempo. Sus datos no implican una cuantificación de los niveles de reproducción sexual sino que únicamente registran los momentos en que se observaron machos. En algunos géneros y especies no se detectaron periodos de sexualidad o éstos eran muy infrecuentes, además, este autor encontró una variabilidad interanual en la aparición de las fases sexuales dentro de cada una de las especies estudiadas. No obstante, y de acuerdo con King (1980), se pueden establecer tres patrones a partir de los estudios de Carlin. Los individuos de algunas especies tales como *Notholca caudata* tienden a reproducirse sexualmente durante la fase de crecimiento de la población, es decir durante la primera parte del ciclo de la población. Este tipo de especies es relativamente poco frecuente. Una gran proporción de especies

sigue el patrón de *Keratella quadrata*, *Polyarthra dolichoptera* y *Polyarthra major*, e inician su reproducción sexual ligeramente antes o durante el periodo en que la población alcanza su tamaño máximo. Por último, la reproducción sexual en algunas especies tales como *Polyarthra vulgaris* tiene lugar al final del ciclo de crecimiento de la población. El patrón más generalizado, en el que el momento de la reproducción sexual coincide con el máximo de la población fue puesto de manifiesto por los estudios de Wesenberg-Lund (1930) y Nauwerck (1963). Lo mismo fue corroborado por los metódicos estudios de Amren (1964) sobre la abundancia de *K. quadrata* y *P. dolichoptera* en una serie de lagunas, en los que se efectuaron recuentos del número de hembras míticas observadas en relación con el total de hembras. Estos últimos muestran que los individuos de ambas especies inician la reproducción sexual de forma ligeramente anticipada o al mismo tiempo que la población alcanza su tamaño máximo. Del mismo modo, Bogoslavsky (1963) encontró que la aparición de reproducción sexual en *Brachionus calyciflorus* en dos lagunas diferentes se encontraba asociada con el máximo de la población y que variaba considerablemente de un año a otro, llegando a no tener lugar durante los años en los que las densidades poblacionales eran muy bajas.

Así, el patrón general observado en la mayoría de las especies, según el cual la sexualidad coincide con los máximos de población, indica una relación de la producción de hembras míticas con la densidad de población o con factores ambientales asociados con la misma. En las especies en las que la sexualidad no está relacionada con la densidad de población, aquella usualmente ocurre solamente en un momento determinado del año, lo cual sugiere un control por la temperatura o el fotoperiodo (Gilbert, 1974). En aquellas especies en las que la reproducción sexual tiene lugar al final del ciclo de la población, durante la fase de disminución poblacional tras su máximo, el estímulo para la mixis podría estar relacionado con factores físicos asociados con el deterioro del hábitat (King, 1980). Sin embargo en los estudios con poblaciones naturales resulta muy difícil determinar los factores naturales que efectivamente controlan el inicio y el grado de la reproducción sexual. Halbach y Halbach-Keup (1972), por ejemplo, no pudieron identificar los factores ambientales o los parámetros de la población que podían haber tenido una influencia directa en la tasa de producción de hembras míticas en tres especies del género *Brachionus*, a pesar de la minuciosidad de su estudio. Estos investigadores midieron cada tres días durante el verano de 1967 todas aquellas variables que, según consideraron, podían ser importantes en el control de la sexualidad. La elucidación de estos estímulos ambientales resulta difícil debido a la homogeneidad morfológica entre hembras míticas y amíticas, a los

cortos tiempos de generación de muchas especies, y a la dificultad para aislar los efectos de las diferentes variables ambientales que pueden controlar la reproducción sexual, máxime cuando deben existir complejas interacciones entre ellas. El análisis de la producción de hembras míticas realizado por King y Snell (1980) en una población natural de *Asplanchna girodi* supuso un exhaustivo seguimiento de la densidad poblacional mediante frecuentes muestreos en los que el aislamiento y cultivo de las hembras permitieron determinar de forma precisa su tipo reproductivo. Los datos de este estudio sugieren que la reproducción sexual en esta especie está relacionada de forma directa o indirecta con la densidad de la población. Los resultados del estudio realizado por Johansson (1987) en una población natural de *Synchaeta* indican que la inducción de la reproducción sexual tiene lugar durante la primera fase de crecimiento de la población si las condiciones nutricionales son favorables. Los factores bióticos tales como la temperatura y la salinidad fueron descartados dada la baja variabilidad que presentaron en los periodos de producción de hembras míticas. En este caso la calidad del alimento parece ser el factor asociado.

7.4. EL SIGNIFICADO DE LA MIXIS

El significado ecológico de la reproducción sexual en los rotíferos se basa en la adaptación a ambientes cambiantes y su efecto sobre la dinámica poblacional. En primer lugar, como productos de la reproducción sexual, los huevos durables permiten a los rotíferos escapar de ambientes adversos mediante la latencia. El significado de la latencia como estrategia adaptativa ha sido discutido por varios autores (p.e., Cohen, 1968; Templeton y Levin, 1979; Elgmork, 1980; Johnson y Gaines, 1990).

Una segunda consideración importante para esclarecer el significado de la mixis es el origen sexual de los huevos durables. La reproducción sexual, y la recombinación genética que ésta implica, contribuyen a la variabilidad genotípica de la población promoviendo su adaptación. La mayoría de estudios teóricos sobre el mantenimiento y evolución de la reproducción sexual se centran en las ventajas asociadas con la producción de descendientes genéticamente diversos, diversidad que es la consecuencia más obvia de la reproducción sexual (para una revisión de las diversas teorías y modelos sobre la evolución del sexo, véanse por ejemplo, Bell, 1982; Stearns, 1987; o también, Williams y Mitton, 1973; Levin, 1975; Williams, 1975; Maynard Smith, 1978; Young, 1981; Bernstein *et al.*, 1985; entre otros). No obstante, la necesidad de la recombinación en los rotíferos para generar variabilidad genética ha sido cuestionada (Ruttner-Kolisko,

1963, 1983; King, 1980). Debido a que los rotíferos tienen grandes tamaños poblacionales y tiempos de generación cortos, King (1980) sugirió que en estos organismos la mutación debe de tener mayor importancia en la generación de variabilidad genética que la reproducción sexual. Aunque este autor no negó que la recombinación pudiera tener alguna función en la capacidad de adaptación de los rotíferos, sugirió que la razón primaria por la que el sexo existe en estos organismos es porque es la forma en la que los rotíferos generan sus huevos durables. Según su interpretación, el carácter adaptativo de los huevos durables en cuanto a sus rasgos de latencia y capacidad de colonización sería mucho más importante desde un punto de vista evolutivo que su contribución a la variabilidad genética. Esta hipótesis es únicamente aceptable suponiendo un costo prácticamente despreciable para la reproducción sexual o que la producción de huevos durables por vía asexual se encuentra evolutivamente constreñida.

En tercer lugar, una consecuencia ecológica de la reproducción sexual es la merma del crecimiento poblacional, pudiéndose llegar a su supresión. El periodo innato de latencia que presentan los huevos durables (Gilbert, 1974; Pourriot y Snell, 1983) elimina a las hembras de la población. La latencia alarga el tiempo de generación retrasando de forma notable la contribución reproductiva de las hembras al crecimiento de la población. Como consecuencia, las poblaciones que se reproducen exclusivamente de forma asexual tienen tasas de crecimiento mayores que las que además se reproducen sexualmente (Birky y Gilbert, 1971; Gilbert, 1983c; Snell, 1987). Esta relación entre reproducción sexual y crecimiento poblacional ha sido ampliamente explorada por Snell (1987) mediante simulación por ordenador utilizando un modelo teórico.

La comprensión del significado de la mixis en los rotíferos desde una perspectiva ecológica y evolutiva viene condicionada por un conocimiento profundo del momento en que se produce la reproducción sexual dentro de los ciclos vitales, así como de las señales ambientales utilizadas para el inicio de la misma. Esto ha motivado la realización de un gran número de estudios dirigidos a identificar los estímulos determinantes de la fase sexual del ciclo vital en varias poblaciones de rotíferos. Tales estudios, objeto de la revisión realizada en los dos apartados anteriores, han aportado un gran volumen de datos con algunos descubrimientos notables. Sin embargo, es difícil establecer una generalización inequívoca a partir de los resultados de todos los experimentos realizados, puesto que la sexualidad resulta estimulada por diferentes tratamientos en diferentes rotíferos. Además, la existencia de interacciones entre los

factores externos que tienen influencia sobre la mixis añade complejidad en la detección de las señales que determinan su inducción, tal y como se ha indicado previamente.

Por ello, no es de extrañar que los intentos de ofrecer una visión global acerca del significado adaptativo de la mixis se orienten a identificar varios patrones en relación con el momento de la inducción y de los factores inductores, para asociarlos a continuación con diferentes consecuencias evolutivas o con los contextos ecológicos en los que las poblaciones han evolucionado.

Así, una primera relación entre pauta y procesos hace referencia a las consecuencias evolutivas del momento de la dinámica poblacional en el que se induce la mixis. King (1980), examinando los datos referentes al momento en el que se produce la reproducción sexual en los ciclos vitales y el efecto que tiene la sexualidad sobre la estructura de las poblaciones zooplanctónicas, estableció una comparación de las consecuencias que tendría la reproducción sexual según se produjera en la fase temprana, media o tardía del ciclo de crecimiento de las poblaciones de rotíferos citando algunos ejemplos de poblaciones naturales (véase el apartado 7.3). De acuerdo con su argumentación la reproducción sexual en la mitad y parte final del ciclo probablemente supondría prácticamente una endogamia ya que la intensa selección asociada con la sucesión de generaciones partenogénicas habría reducido ya la variabilidad a un nivel muy bajo en ese momento. Contrariamente, la mixis al principio del ciclo de crecimiento generaría más variabilidad debido a que la recombinación tendría lugar antes de que la selección hubiera eliminado muchos de los tipos clonales generados por la reciente eclosión de los huevos durables. Esta argumentación pone de manifiesto que el momento del ciclo en que tiene lugar la reproducción sexual es crucial en la determinación de sus efectos genéticos.

Una segunda búsqueda de relaciones entre patrones y procesos ha intentado establecer un vínculo entre la naturaleza del efecto inductor de la mixis y el contexto ecológico de las distintas poblaciones de rotíferos. El estímulo más generalmente relacionado con la inducción de la mixis en los rotíferos es la densidad poblacional. Así, los factores relacionados con este parámetro están implicados en los tres géneros de rotíferos que principalmente se han discutido en el apartado 7.2, pero sólo constituyen el estímulo inductor de mayor importancia en el género *Brachionus*. En *Notommata* y *Asplanchna* pueden modular o modificar de forma significativa los efectos de otros factores bióticos (alfa-tocoferol, y por tanto, biomasa de algas verdes en *Asplanchna*) o abióticos (fotoperiodo en *Notommata*), pero al menos en algunas especies de

Asplanchna, la densidad de población no puede por sí misma inducir la producción de hembras míticas.

Gilbert (1974, 1980b) ha tratado de explicar porqué ciertas especies utilizan una determinada señal para la mixis (p.e., el alfa tocoferol en *Asplanchna*) mientras que otras especies utilizan señales totalmente diferentes (p.e., fotoperiodo en *Notommata*). Según este autor cada uno de los mecanismos de control debe tener ciertas ventajas; es decir, deben de existir razones biológicas que justifiquen la respuesta a un determinado estímulo. Gilbert propone una hipótesis según la cual el tipo de factor inductor de la producción de hembras míticas estaría relacionado con la dinámica de la población. Así, los rotíferos cuyas poblaciones tienen densidades estables o con variaciones predecibles a lo largo del año, tendrían señales para la mixis relacionadas con un parámetro ambiental fiable, tal y como el fotoperiodo. El fotoperiodo proporciona una señal estacional segura y consistente que únicamente resulta apropiada para especies con densidades poblacionales relativamente estables a lo largo del tiempo. Por contra, las especies que aparecen irregularmente o que presentan normalmente densidades demasiado bajas para que la reproducción sexual pueda prosperar, utilizarían como señales para la mixis factores relacionados con su propia población, tales como la densidad o la calidad y cantidad de la dieta. Así, desde la perspectiva de Gilbert, el tipo de señal utilizada para la mixis por una población está relacionado con la predictibilidad del ambiente que ocupa. La respuesta mítica a un estímulo particular habría evolucionado de acuerdo con la ecología de la especie, concretamente en relación con el patrón de abundancia que la especie en cuestión presentase.

Un tercer argumento interpretativo de los patrones de mixis busca una relación entre los periodos de mixis y las condiciones ecológicas, favorables o desfavorables, del medio. Dada la capacidad de los huevos durables para la dispersión en el espacio y en el tiempo permitiendo el escape de condiciones desfavorables, muchos de los trabajos empíricos que se han considerado en el apartado 7.2 están orientados al estudio del efecto de los cambios en las condiciones sobre la inducción de la reproducción sexual. Algunos autores han interpretado este efecto como una respuesta al deterioro del hábitat (Lechner, 1966; Ruttner-Kolisko, 1974; Thane, 1974). Esta idea es coherente con varias hipótesis y modelos acerca del valor adaptativo de la recombinación que establecen que la reproducción sexual es ventajosa en ambientes saturados y/o impredecibles por su heterogeneidad espacial o temporal (Ghiselin, 1974; Williams, 1975; Maynard Smith, 1978). Estas hipótesis implican que la sexualidad en los ciclos de vida heterogónicos podría ocurrir en momentos de mínima heredabilidad de la eficacia biológica (véase,

p.e., Williams, 1975; Bell, 1982), es decir en periodos de cambio ambiental. La mixis se produciría cuando el ambiente futuro es impredecible, y por lo tanto existe una mayor probabilidad de que algunos de los nuevos genotipos tengan mayor eficacia. Esta relación entre sexo y fluctuación ambiental tiene un buen apoyo en los rotíferos monogonotes, ya que los huevos de origen sexual son huevos latentes que eclosionan bajo condiciones ambientales impredecibles. Si es ventajoso que la reproducción sexual tenga lugar de forma anticipada a un cambio ambiental, será adaptativo que dicha reproducción resulte estimulada por cambios bruscos en las condiciones de cultivo o por condiciones de cultivo que señalen la inminencia de un futuro cambio.

Sin embargo, según algunos autores (Gilbert, 1980b; Pourriot y Snell, 1983) el momento de la reproducción sexual en los rotíferos resulta mejor explicado como la consecuencia de una selección a favor de que la reproducción sexual sea desencadenada por condiciones que son favorables para la producción de huevos durables. Por lo tanto las señales o estímulos que inician la reproducción sexual deberán ser indicativos de tales condiciones (Pourriot y Snell, 1983). Los dos rasgos principales de un ambiente adecuado para la producción de huevos durables fueron identificados por Gilbert (1980b). En primer lugar, la densidad de población debe ser lo suficientemente alta como para asegurar la fertilización. El encuentro entre macho y hembra es un suceso aleatorio cuya probabilidad aumenta con la densidad de población (Gilbert, 1974, 1980b). Posteriormente, Snell y Garman (1986) estudiaron mediante el desarrollo de un modelo teórico la relación entre densidad de población y expectativa de descendencia sexual en los rotíferos. En segundo lugar, deben existir recursos nutricionales adecuados que permitan a las hembras producir huevos durables ricos en reservas energéticas. Esta hipótesis, que relaciona el momento de la mixis con periodos de gran disponibilidad de recursos, se encuentra de acuerdo con los estudios de Lubzens *et al.* (1985) y Snell (1986), los cuales ponen de manifiesto que la reproducción sexual presenta más constricciones que la reproducción partenogenética.

7.5. DESARROLLO DE UN MODELO TEÓRICO

Consideraciones previas

En el apartado anterior se ha ofrecido una visión de las diferentes aproximaciones y criterios utilizados en la interpretación del significado adaptativo del momento de la mixis en los rotíferos, y de los posibles estímulos implicados en su inducción.

Aunque en ocasiones se ha establecido una contraposición entre tales aproximaciones y criterios (Pourriot y Snell, 1983; Lubzens *et al.*, 1985), éstos no son necesariamente excluyentes, por lo que se consideró interesante la integración de todos ellos en un único modelo teórico de naturaleza cuantitativa que predijera la estrategia óptima para el momento de la reproducción sexual en rotíferos monogonontes con una cierta ecología. Así, se desarrolló un modelo que tiene en cuenta una serie de consideraciones y constricciones para describir la dinámica de poblaciones de rotíferos que ocupan hábitats variables en el tiempo (véase más arriba y también la descripción del modelo). En este contexto ecológico la importancia de los factores externos, tales como las fluctuaciones del medio, resulta preponderante con respecto a aquellos procesos internos que pudieran explicar el momento óptimo de la mixis a través de aquella cadencia de generaciones asexuales y sexuales que mantiene un grado adecuado de variabilidad genética con el mínimo de costo (hipótesis del balance; Williams y Mitton, 1973; Williams, 1975). En efecto, siempre bajo el supuesto de la necesidad de mantener en una línea de descendencia cierto nivel de variabilidad genética por recombinación, la variabilidad temporal podría modificar la cadencia predicha por la hipótesis del balance, ya que sería ventajoso el que la descendencia sexual apareciera en un hábitat con condiciones algo distintas a las del hábitat parental, o en términos más técnicos en momentos de mínima heredabilidad de la eficacia entre hábitats (Williams, 1975; Bell, 1982)

El modelo se ha utilizado para comparar mediante simulación por ordenador diferentes estrategias en cuanto al momento de inducción de la mixis y la tasa de producción de hembras míticas.

Este modelo, que se describe a continuación, fue implementado en BASIC para su simulación en un IBM-PS2 por M. Serra.

Modelo

Las características reproductivas del ciclo de vida heterogónico de los rotíferos monogonontes se han descrito detalladamente de forma previa bajo el epígrafe "Reproducción" del apartado 2.1 del presente trabajo.

A partir de una inspección del ciclo vital de los rotíferos pueden considerarse al menos seis variables de estado para describir la dinámica de una población de rotíferos: número de hembras amíticas (F_a), número de hembras míticas susceptibles de

fertilización (F_f), número de hembras míticas productoras de huevos durables (F_r), número de machos (M) y número de huevos durables (E).

Cuando se induce la reproducción sexual en una población, al menos parte de las hembras descendientes de las hembras amíticas son hembras míticas. La aparición de este tipo de hembras tiene consecuencias importantes para la dinámica de la población ya que las hembras míticas producen machos o huevos durables que debido al periodo de latencia no contribuyen al crecimiento de la población. Por lo tanto, en este sistema el único circuito de realimentación positiva es el existente entre dos hembras amíticas directamente, o a través de un huevo durable, y es en este tipo de hembra en el que se basa el crecimiento en curso de la población. Por contra, la supervivencia de un genotipo depende de la producción de huevos durables ya que constituyen el principal estado de dispersión del ciclo vital. Por lo tanto, los huevos partenogénéticos y sexuales tienen funciones ecológicas distintas en el ciclo vital de estos organismos.

La densidad de población es un factor crítico en la producción de huevos durables debido a que las bajas densidades hacen improbable el encuentro entre macho y hembra, y a que a altas densidades se puede producir un mayor número de hembras míticas, puesto que dichas densidades implican mayores números de hembras amíticas que, como se ha indicado, son la fuente de hembras míticas. Sin embargo, la mixis, que se inicia con la producción de hembras míticas a partir de las hembras amíticas, disminuye la tasa de crecimiento poblacional y por lo tanto afecta a la densidad de la población. Consecuentemente, existe un complejo compromiso entre el crecimiento de la población y la producción de huevos durables. Además, deben considerarse otros factores para comprender las constricciones que afectan a la reproducción sexual; por ejemplo, la reproducción sexual necesita recursos y condiciones ambientales adecuadas que permitan la supervivencia de las hembras amíticas y de los machos, así como la asignación de recursos a la producción de huevos durables.

El modelo desarrollado y que se describe a continuación (tabla 7.2) considera todos estos compromisos y constricciones para evaluar qué estrategia entre otras alternativas podría dar lugar a un mayor número de huevos durables, el cual se considera una medida de la eficacia y objeto de optimización. El modelo se centra en la dinámica de poblaciones de rotíferos que ocupan hábitats temporales. Se supone que la tasa instantánea potencial de nacimiento [$b(t)$] es dependiente del tiempo considerándose así los factores ambientales variables que afectan a cualquier tipo de reproducción. Por lo tanto, $b(t)$ aparece en las ecuaciones que describen el crecimiento de las hembras amíticas, de las hembras míticas susceptibles de fertilización (*i.e.*, sólo las recién

nacidas), de los machos y de los huevos durables. La tasa de mixis ($m(t)$, definida como la proporción de huevos mitóticos que se desarrollan dando lugar a hembras míticas) también se considera dependiente del tiempo. Consecuentemente, $b(t)[1-m(t)]$ y $b(t)m(t)$ son respectivamente las tasas de reclutamiento de hembras amíticas y de hembras míticas a partir de las hembras amíticas. Los valores de $m(t)$ constituyen la estrategia de mixis y se consideran bajo control interno desde el punto de vista evolutivo.

La desaparición de hembras amíticas se debe a la muerte, que queda descrita por q , mientras que la de las hembras míticas fertilizables puede deberse a uno de los tres procesos siguientes: muerte (descrita por q), crecimiento somático (que implica el paso de las hembras susceptibles de fertilización a hembras no fertilizables, paso que viene descrito por la tasa instantánea s), y fertilización (descrita por e y proporcional a la densidad de los machos). El modelo supone que la fertilización implica una pérdida de este tipo de hembra porque las posteriores fertilizaciones se han considerado improbables o irrelevantes para la producción de huevos durables.

Las ecuaciones que se proponen para las otras cuatro variables de estado son una consecuencia directa de las relaciones que se acaban de describir más arriba, y aparecen junto con las correspondientes a estas dos variables en la tabla 7.2. Se ha considerado la misma tasa instantánea de mortalidad (q) para todos los tipos de hembras. Para la pérdida de los machos se propone otro parámetro (u), el cual da cuenta conjuntamente de la muerte y del paso al estado post-reproductivo. Finalmente, el modelo supone que tanto la tasa instantánea de producción de machos como la tasa instantánea de producción de huevos durables son proporcionales a $b(t)$, siendo sus constantes de proporcionalidad p y q respectivamente.

Este modelo de ecuaciones diferenciales carece de expresión integrada, lo cual ha hecho necesario el uso de la simulación algebraica por ordenador para explorar la respuesta de este sistema de ecuaciones a diversos patrones para la mixis, diferentes en cuanto al momento de su inducción, y a la tasa de mixis una vez inducida ésta. Dicha respuesta fue estimada calculando la producción de huevos durables en cada una de las condiciones ensayadas.

Tabla 7.2. Modelo de ecuaciones diferenciales para la dinámica de una población de rotíferos. Se indican también los valores para los parámetros constantes utilizados en las simulaciones.

Variable	Tasa de crecimiento
Hembras amícticas, F_a	$dF_a(t)/dt = b(t)[1-m(t)]F_a(t) - qF_a(t)$
Hembras mícticas fertilizables, F_f	$dF_f(t)/dt = b(t)m(t)F_a(t) - qF_f(t) - sF_f(t) - eF_f(t)M(t)$
Hembras mícticas productoras de machos, F_m	$dF_m(t)/dt = sF_f(t) - qF_m(t)$
Hembras mícticas productoras de huevos durables, F_r	$dF_r(t)/dt = eF_f(t)M(t) - qF_r(t)$
Machos, M	$dM(t)/dt = pb(t)F_m(t) - uM(t)$
Huevos durables, E	$dE(t)/dt = gb(t)F_r(t)$

Parámetros constantes: $q = 0.4 \text{ d}^{-1}$ (Serra, 1987); $s = 8 \text{ d}^{-1}$ (Buchner *et al.*, 1967, y Ruttner-Kolisko, 1974); $e = 0.004 \text{ ld}^{-1}$ (Snell y Garman, 1986); $u = 0.7 \text{ d}^{-1}$ (Snell y Garman, 1986); $p = 1.5$ (Serra, 1987); $g = 0.2$ (Snell y Garman, 1986; Serra, 1987). Para obtener los datos o criterios a partir de los que se derivan los valores de estos parámetros se han utilizado las fuentes que se indican, aunque se han hecho algunas presunciones adicionales no contenidas en estas fuentes. Nótese que debido a las unidades de e , los resultados de las simulaciones vienen expresados en individuos o huevos por litro.

Los valores utilizados para los parámetros constantes en las simulaciones se muestran también en la tabla 7.2. Estos valores se han estimado a partir de la información disponible en la bibliografía para la especie *Brachionus plicatilis*, aunque con frecuencia han sido necesarias presunciones adicionales. De hecho, una de las estimas de q para una población de laboratorio de esta especie fue 0.22 días^{-1} (véase Serra, 1987), pero este valor daba lugar a densidades de población irrealísticamente elevadas en las simulaciones; por ello, se ha utilizado un valor más alto para este

parámetro, el cual resulta más realista para poblaciones naturales donde los riesgos ecológicos deben de ser mayores. El valor para el parámetro u se ha calculado suponiendo una vida reproductiva para los machos de dos días (véase Snell y Garman, 1986); de esta forma un grupo de machos con una distribución simétrica de edades (de 0 a 2 días), y sin reclutamiento resultaría reducido a la mitad en un día. Consecuentemente, y a partir de la expresión $(M/2) = M \cdot e^{-u(t=1)}$, el valor de u sería 0.7 días^{-1} . Este mismo argumento se ha utilizado para determinar el valor de s , suponiendo que las hembras míticas son susceptibles de fertilización únicamente durante las cuatro horas posteriores a su nacimiento (Buchner *et al.*, 1967; Ruttner-Kolisko, 1974; Snell y Childress, 1987). En cuanto a la tasa de encuentro entre macho y hembra, se ha obtenido de Snell y Garman (1986), dando por bueno que la frecuencia observada por estos autores (1.49 encuentros/min, para 1 macho y 500 hembras/ml) puede extrapolarse linealmente a un día y una hembra por litro. Para estimar p se ha utilizado la relación entre los tiempos de generación "hembra a hembra" y "hembra a macho" (Serra, 1987). En cuanto a g se ha calculado de forma aproximada suponiendo que la velocidad de producción de huevos durables es aproximadamente $1/5$ de la de producción de huevos mitóticos, lo cual resulta consistente con los valores que usualmente se indican para la producción de huevos a lo largo de la vida (p.e., 2 ó 3 huevos durables *versus* 10–15 huevos mitóticos; véanse, Snell y Garman, 1986; Serra, 1987).

Se han utilizado dos tipos de funciones para describir $b(t)$: funciones cuasi-sinusoidales y funciones lineales decrecientes. Ambos tipos de funciones se construyeron a no ser negativas. El primer tipo de funciones se ha utilizado para estudiar el ciclo completo de crecimiento de una población iniciado a partir de una densidad de una hembra por litro, y siendo $b(t=0) - q$ positivo, próximo a cero. El segundo tipo de funciones se ha utilizado para estudiar de forma más detallada la fase final de la dinámica de crecimiento de la población sin considerar su historia previa. En ambos tipos de funciones los valores de $b(t)$ se han mantenido constantes dentro de un mismo día para promediar el efecto de las oscilaciones diarias. Además, el máximo valor de este parámetro debe cumplir la siguiente relación: $b(t) - q < 1 \text{ días}^{-1}$, ya que ello corresponde aproximadamente al límite observado para la tasa intrínseca de crecimiento en los rotíferos.

El modelo considera los cambios en la tasa de mixis suponiendo que $m(t)$ puede cambiar una vez de 0, para $t < D$, a un valor diferente, m , para $t \geq D$, donde D es el primer día en que se induce la mixis (*i.e.*, la tasa de mixis constante implica que $D = 0$).

Se simularon 41 días de dinámica poblacional. Las simulaciones se calcularon igualando las ecuaciones diferenciales a ecuaciones en diferencias finitas utilizando incrementos de tiempo muy cortos (0.042 d). Dichas simulaciones se llevaron a cabo mediante programas escritos en BASIC e implementados en un ordenador IBM-PS2.

La carencia de forma funcional explícita por parte de este modelo de optimización requiere su resolución por métodos de simulación. Ello implica una pérdida de generalidad y por lo tanto el que las conclusiones puedan verse críticamente afectadas en el caso de que los valores escogidos para los parámetros no fueran realistas. Por esto, se llevó a cabo un análisis de sensibilidad para evaluar el efecto que tenía un cambio en los parámetros sobre los principales resultados obtenidos (véase Gladstein *et al.*, 1990).

Algunas simplificaciones presueltas en el modelo son las siguientes: (1) en general no se tiene en cuenta ni la estructura en edades de la población ni otras diferencias fisiológicas; (2) los efectos de la densidad sobre $b(t)$ no se consideran explícitamente; (3) se ignoran los tiempos de latencia; (4) la respuesta mítica es sincrónica e irreversible; (5) la fertilidad de los machos no resulta afectada por las copulaciones previas y cada encuentro es fértil; (6) no se considera estocasticidad intrínseca ni ambiental; (7) algunos parámetros no son dependientes del tiempo; (8) las tasas de muerte no dependen del tipo de hembra; (9) todos los huevos durables se consideran equivalentes independientemente del momento en que se produjeron, y de esta manera las diferencias en variabilidad genética, viabilidad y momento para su eclosión se desprecian. Además, excepto para el análisis de estabilidad evolutiva, las simulaciones no consideran la variabilidad genética en cuanto a estrategia para la mixis. Y por último, hay que señalar que de las funciones supuestas para $b(t)$ surgen otras simplificaciones que afectan al modelo.

Resultados

Para estudiar el ciclo completo de crecimiento poblacional, se llevó a cabo un primer grupo de simulaciones utilizando funciones cuasi-sinusoidales para $b(t)$. A partir de una función básica con un valor máximo para $b(t)$ igual a uno se generaron otras funciones multiplicando ésta por un factor. Las funciones resultantes tienen diferentes valores máximos para $b(t)$, y por lo tanto pueden diferir en el momento en el que $b(t)-q$ se convierte en negativo. La figura 7.4 muestra la variación de $b(t)-q$ para una función de $b(t)$ cuyo máximo es igual a 0.95 y la dinámica de una población de rotíferos que crece en ausencia de reproducción sexual con esta tasa instantánea de crecimiento. Tal y como

se espera a partir de las condiciones del modelo, la máxima densidad de hembras (1864 hembras/l) se alcanza cuando $b(t)-q$ se hace negativo y no cuando el ambiente es más favorable. Las condiciones más favorables para el crecimiento poblacional se presentan el día 10 (valor máximo de $b(t)$, $t=10$) mientras que el máximo poblacional se produce el día 22 (momento en que $b(t)-q < 0$).

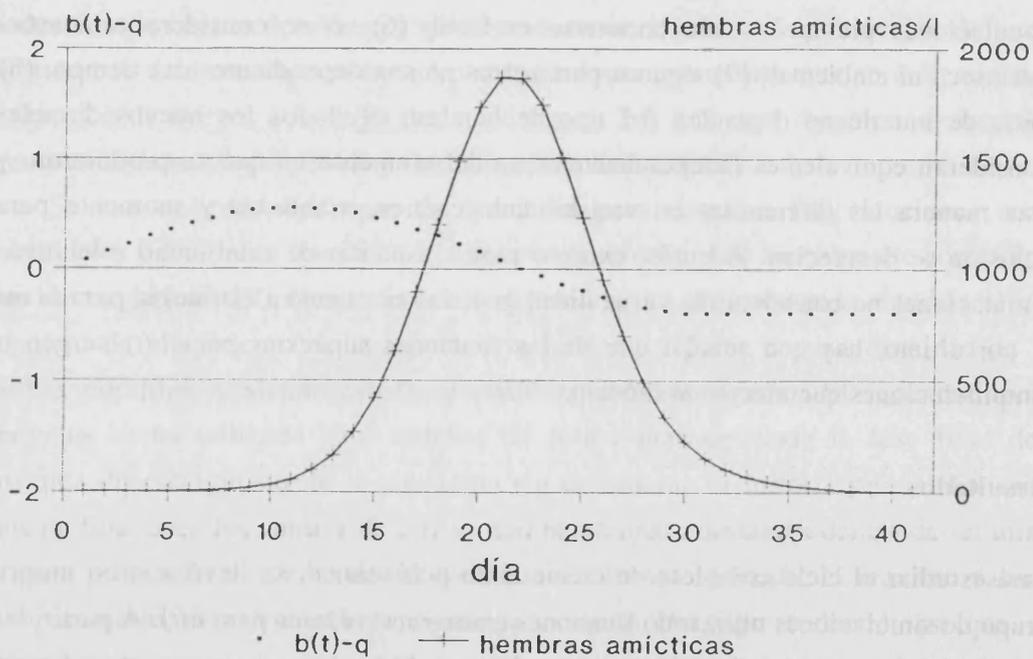


Figura 7.4. Simulación de la dinámica de una población de rotíferos iniciada con una densidad de una hembra por litro y que crece en ausencia de reproducción sexual con la tasa instantánea de crecimiento ($b(t)-q$) que se indica (valor máximo de $b(t)=0.95$).

La figura 7.5 muestra la relación entre la tasa de mixis y la producción de huevos durables obtenida en las simulaciones cuando la tasa de mixis se mantuvo constante. Una de estas simulaciones ($b(t)$ con un máximo igual a 1.2) dió lugar a densidades máximas para F_a improbablemente altas. No obstante, el conjunto de resultados ofrece un patrón que se ha considerado interesante: la tasa de mixis que maximiza la producción de huevos durables (tasa de mixis óptima) es menor que 0.1 en todos los casos y disminuye conforme el valor medio de $b(t)$ aumenta.

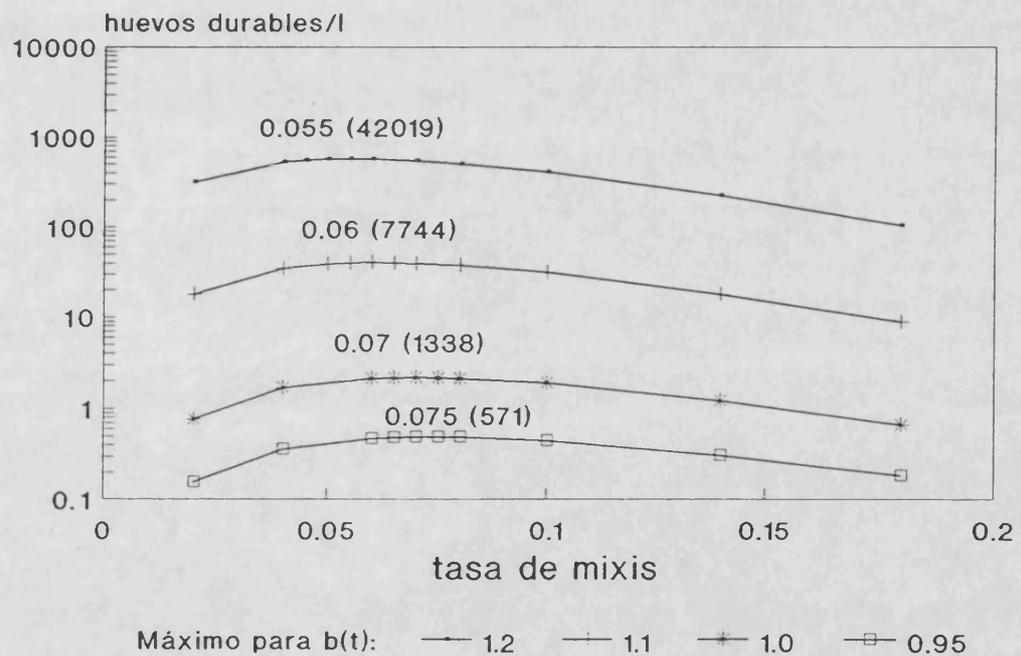


Figura 7.5. Efecto de varias tasas constantes de mixis en el número total de huevos durables producidos por poblaciones que crecen con funciones cuasi-sinusoidales para $b(t)$ con los máximos que se indican. Los valores en cada curva indican la tasa óptima de mixis que se registró en las simulaciones, y, entre paréntesis, el valor máximo de $F_a (l-1)$ correspondiente a dicha tasa de mixis.

Los resultados obtenidos cuando se permitió que la tasa de mixis cambiara su valor de 0 a un valor diferente aparecen en la figura 7.6 (función de $b(t)$ con un valor máximo de 0.95). En este caso la tasa de mixis con mayor producción de huevos durables fue 1. Además, para rendir este máximo de huevos durables la mixis debería ser inducida al principio del día 18, nueve días después de que se alcance el máximo valor de $b(t)$ y tres días antes de que $b(t)-q$ se haga negativa. Según las simulaciones, la mixis provoca un declive en la población, y así el registro máximo del número total de hembras en la estrategia óptima (1301 hembras/l) se obtiene el día 19. La figura 7.6 muestra también que cuanto menor es la tasa de mixis más temprano es el día óptimo para la inducción de la misma.

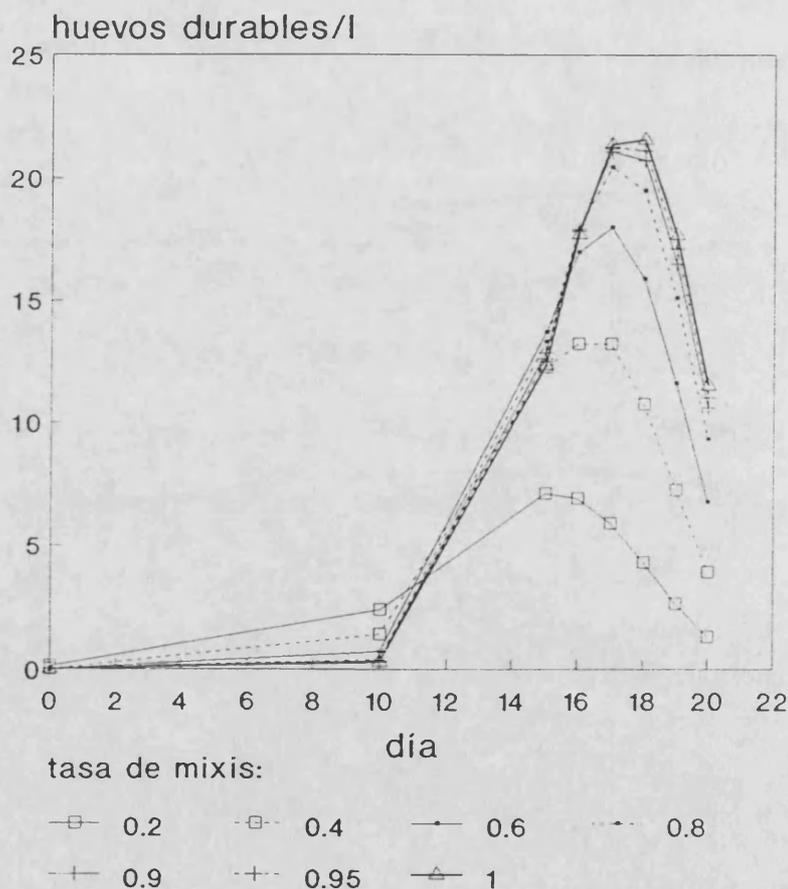


Figura 7.6. Efecto del día en que se induce la mixis sobre el total de huevos durables producidos. (La función para $b(t)$ es una función cuasi-sinusoidal cuyo valor máximo es $b(t)=0.95$; $F_a(0)=1\text{ l}^{-1}$).

En las simulaciones llevadas a cabo suponiendo una tasa de mixis variable, se exploró también el efecto de diferentes valores medios de $b(t)$, que implicaron valores máximos igual a 0.9, 1, 1.1 y 1.2. Los resultados fueron muy similares a los encontrados cuando el valor máximo para $b(t)$ fue de 0.95. La tasa óptima de mixis resultó ser 1 en todos los casos, y el día óptimo para la inducción de la mixis fue el día 17 (máximo $b(t)= 0.9$), el día 18 (máximos de $b(t)= 1$ y 1.1) y el día 19 (máximo $b(t)= 1.2$). Conforme $b(t)$ aumentó en valor medio, el primer día en que se cumple que $b(t)-q < 0$ varió de la siguiente manera: $\text{máx}(b(t))= 0.9$, día 21; $\text{máx}(b(t))= 1$ ó 1.1, día 22; $\text{máx}(b(t))= 1.2$, día 23.

Los resultados de estas simulaciones sugieren que el momento óptimo para la mixis se encuentra relacionado fundamentalmente con el momento en que $b(t)-q$ se vuelve negativo. Para explorar con mayor detalle esta fase, se realizó una serie de simulaciones usando una función lineal para $b(t)$ con diferentes pendientes negativas, pero con $b(t)-q$ convirtiéndose en negativo al principio del 7º día en todos los casos (véase la figura 7.7a). Las simulaciones se repitieron tomando diversos valores arbitrarios pero realistas, para el número inicial de hembras. De esta forma no se tuvo en cuenta cómo se alcanzó este número inicial de hembras; es decir no se consideró la historia previa de la población. Los resultados mostraron que independientemente del número inicial de hembras y de la pendiente de $b(t)$, el día óptimo para la inducción de la mixis fue el día 3 (figura 7.7b,c). Puesto que el comienzo de la simulación fue arbitrario, este resultado queda más correctamente expresado diciendo que la mixis, para maximizar la producción de huevos durables, debería ser inducida cuatro días antes de que $b(t)-q$ se haga negativa. Cabe indicar también (figura 7.7c) que si la mixis se produjera después del momento óptimo, la producción de huevos durables disminuiría de forma más pronunciada en el caso de que la función de $b(t)$ tuviera una fuerte pendiente negativa.

Análisis de sensibilidad. Para evaluar la sensibilidad de los resultados a los valores asignados a los parámetros constantes, se determinó el momento óptimo para la mixis utilizando de forma combinada los siguientes conjuntos de valores: $s= 2, 16$; $e= 0.001, 0.08$; $F_a(0)= 100, 1000, 2400$. Para estas simulaciones se utilizaron funciones de $b(t)$ linealmente decrecientes (véase la figura 7.7a). Los valores reseñados para los parámetros se combinaron a su vez con las dos funciones de $b(t)$ con pendientes extremas, de manera que se ensayó un total de 24 condiciones para establecer en cada una de ellas el momento óptimo de mixis (tasa de mixis cuando se induce: 1). Algunos

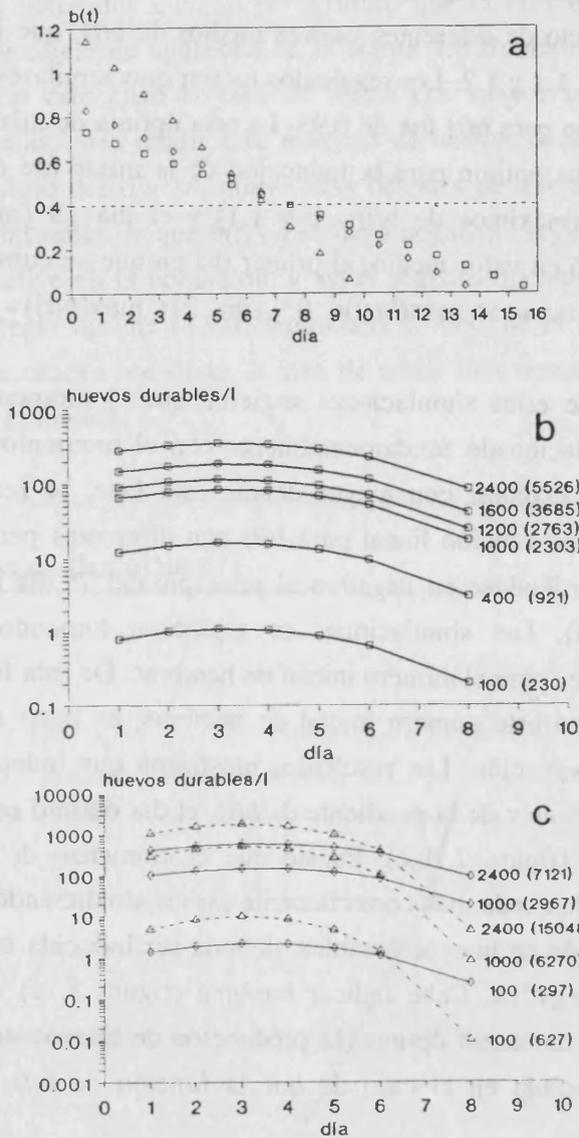


Figura 7.7. Estudio de la fase final de crecimiento de una población suponiendo para la tasa instantánea de nacimientos ($b(t)$) las funciones que se indican en la gráfica a: b y c, efecto del día de inducción de la mixis en la producción total de huevos durables. Los símbolos que aparecen en las dos gráficas inferiores indican la pendiente de la recta utilizada en la simulación correspondiente. Los valores en la parte derecha de cada curva son el número inicial de hembras amícticas por litro, y los que aparecen entre paréntesis son los valores máximos de F_a registrados para la estrategia óptima de inducción de la mixis. (La tasa de mixis cuando ésta se induce se considera igual a 1).

de los valores asignados a los parámetros pudieran considerarse irrealistas, pero resultan apropiados para evaluar la robustez de los resultados.

Todas las simulaciones daban el mismo día óptimo para la inducción de la mixis (día 3) indicando así la robustez de los resultados. Además, en el análisis de sensibilidad se obtuvieron otros resultados que se cree conveniente reseñar a continuación. Tal y como se esperaba, la producción de huevos durables aumentó con la tasa de encuentros entre macho y hembra (e), y con el número inicial de hembras amícticas considerado. El patrón más general obtenido fue el aumento de la producción de huevos durables con la disminución de s ; esto es, cuando se supuso que las hembras míticas retrasaban su salida del estado fertilizable. Las excepciones a esta regla se registraron con los siguientes grupos de condiciones: (1) $e = 0.08$; $F_a(0) = 1000, 2400$; $b(t)$ con alta pendiente negativa; y (2) $e = 0.08$; $F_a(0) = 2400$; $b(t)$ con baja pendiente negativa. Para completar el análisis de sensibilidad, se comprobó que, suponiendo otros valores en los parámetros ($s = 2, 16$; $e = 0.001, 0.08$; $F_a(0) = 1000$; $b(t)$ con la menor pendiente negativa), con una tasa de mixis de 0.95 se producían menos huevos durables que con tasa de mixis igual a 1.

Análisis de estabilidad evolutiva o de invasibilidad. Las simulaciones que se han descrito presumen una población en la que no existe variabilidad en cuanto a la estrategia para la mixis. Por lo tanto, las estrategias óptimas resultantes quedan restringidas a una comparación entre varias poblaciones, cada una de ellas homogénea en cuanto al momento en el que experimentan la mixis. Para determinar si una población con tal tipo de estrategia óptima para el momento de la mixis podría ser invadida por otra población con una estrategia alternativa, se llevaron a cabo una serie de simulaciones suponiendo la existencia de dos estrategias en la población inicial. Además, mediante la comparación de la frecuencia alélica inicial (*i.e.*, en las hembras amícticas) con la frecuencia alélica en los huevos durables, es posible evaluar la selección que sufre inicialmente la estrategia alternativa. Para simplificar se supuso que la estrategia alternativa estaba determinada por un alelo dominante portado por hembras amícticas heterocigotas emulando así lo que ocurriría con una mutación.

Las simulaciones se llevaron a cabo usando la función de $b(t)$ con baja pendiente negativa (figura 7.7a), $F_a(0) = 1000$ y los valores usuales para el resto de parámetros (véase la tabla 7.2; $m(t)$ cambiando una vez para cada fenotipo, de 0 a 1).

Los resultados (figura 7.8a) muestran que una estrategia alternativa en la que la mixis se produjera antes de aquel momento que resultó ser el óptimo para una población homogénea (esto es, mixis el día 2 *versus* mixis el día 3) podría ser seleccionada

inicialmente. Sin embargo, se produciría una selección en contra de dicha estrategia alternativa cuando su frecuencia alélica inicial fuera mayor que aproximadamente 0.35 (*i.e.*, el 70% de las hembras amícticas con el fenotipo alternativo). Es interesante señalar que, aunque algunas de las poblaciones mezcladas aumentan su producción de huevos durables, la selección no es totalmente dependiente de esta mejora, ya que cuando la frecuencia del alelo alternativo es 0.35 éste resultaría ligeramente seleccionado pero la producción de huevos durables es menor que la que se obtendría en una población homogénea con la estrategia óptima (*i.e.*, con inducción de la mixis el día 3).

Contrariamente a lo que ocurre con una subpoblación que anticipa la mixis, una estrategia alternativa en la que la mixis se retrasara (*i.e.*, el día de la inducción de la mixis es el 4º) no resultaría seleccionada (figura 7.8b), aunque se podría mejorar la producción de huevos durables en una población mezclada de estrategias "óptimas" y "retrasados".

También se observó que si la estrategia óptima para una población homogénea estuviera determinada por un alelo dominante llevado por hembras heterocigotas, podría invadir tanto una población que experimente la mixis más tempranamente (día 2) como más tardíamente (día 4). Por último, los resultados de las simulaciones mostraron que una población que experimenta la mixis en el día 2 puede ser a su vez invadida por un estrategia en el que la mixis se induce el día 1, presumiendo que este último fenotipo está determinado por un alelo dominante portado por heterocigotos.

En conjunto, el análisis de estabilidad evolutiva señala que la estrategia óptima para una población homogénea puede ser invadida pero no extinguida por genotipos que determinan una mixis progresivamente más precoz, aunque debe observarse que sólo se ha analizado la selección inicial.

Discusión

Los resultados de las simulaciones muestran que cuando la tasa de mixis se mantiene constante, la máxima producción de huevos durables se obtiene para bajas proporciones de hembras míticas (<10%). Este resultado es semejante al obtenido en las simulaciones realizadas por Snell (1987) suponiendo un ambiente constante tanto para crecimiento independiente como dependiente de la densidad de población. Snell (1987) encontró además que la proporción óptima de hembras míticas producidas aumenta con la tasa intrínseca de crecimiento poblacional (r) y disminuye con su capacidad de carga

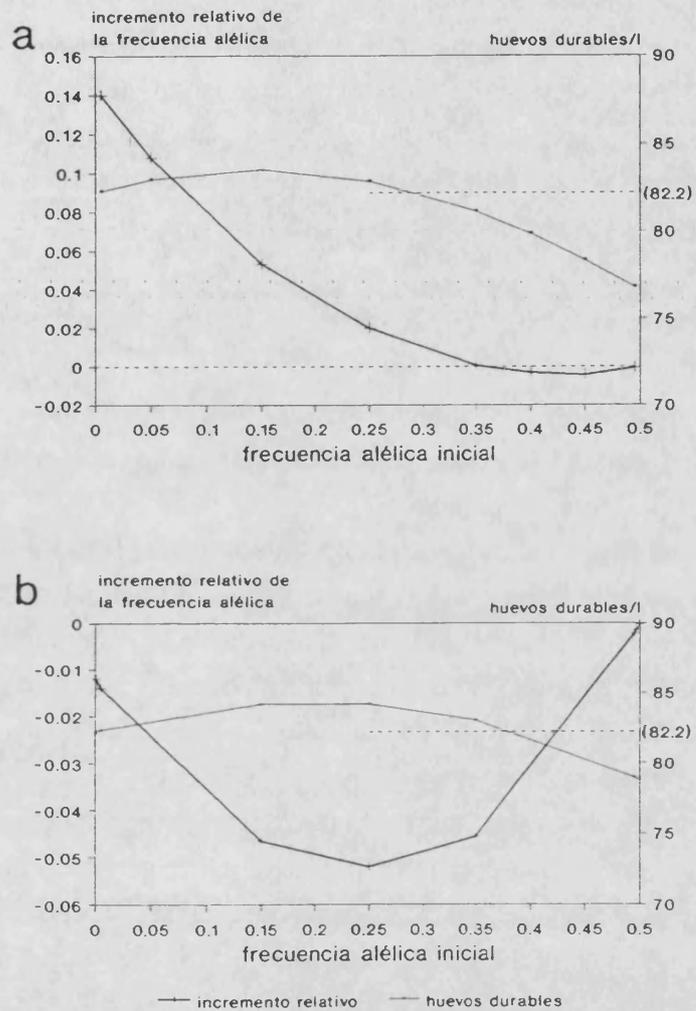


Figura 7.8. Incremento de la frecuencia de un alelo en los huevos durables en relación con su frecuencia inicial en las hembras amícticas de una población. Este alelo se supone dominante, determina el día para la inducción de la mixis y es portado en heterocigosis por algunas de las hembras amícticas (véanse las frecuencias alélicas iniciales) mientras que el resto de las hembras de la población desarrollan la estrategia óptima para una población homogénea (i.e., día para la inducción de la mixis: día 3); **a**: el alelo determina que la inducción de la mixis se produzca el día 2; **b**: el alelo determina que la inducción de la mixis se produzca el día 4. En la figura se indican además el número de huevos durables producidos en la población mezclada, y entre paréntesis los que se hubieran producido en una población homogénea para la estrategia óptima.

(K), mientras que en el presente trabajo se ha encontrado que un aumento en los valores medios de la tasa instantánea de nacimientos provoca una disminución en la proporción óptima de hijas sexuales. No obstante, esta divergencia puede ser sólo aparente puesto que en el modelo presentado aquí las tasas de nacimientos ($b(t)$) más altas implican valores más altos de r , o más exactamente, valores medios de $r(t)$ más altos, pero también mayores densidades poblacionales máximas (asimilables a una mayor K), y esto último podría afectar más fuertemente la dinámica de la mixis.

Contrariamente a lo observado en el primer grupo de simulaciones, cuando se permitió que la tasa de mixis variara a lo largo del ciclo de crecimiento cambiando de 0 a un valor distinto de cero, la tasa óptima de mixis fue 1. Contrastando con este resultado teórico, en los estudios de laboratorio no se han observado valores similares. Los valores experimentales para la tasa de mixis suelen estar entre 0 y 0.5 en *Brachionus plicatilis* (Hino e Hirano, 1977; Pourriot y Rougier, 1979), aunque debe tenerse en cuenta que las evaluaciones realizadas en el laboratorio pueden conducir a una subestima de la tasa de mixis que se da en condiciones naturales, ya que el cultivo en el laboratorio puede implicar una selección a favor de tasas de mixis bajas (Hino e Hirano, 1976; Ruttner-Kolisko, 1985; Buchner, 1987; véase para discusión el capítulo 8). Por otro lado, algunas de las observaciones en muestras de campo sugieren altas proporciones de hembras míticas (Amren, 1964; Pourriot, 1965b), y así mismo lo hacen las dinámicas poblacionales observadas en limnocorrales (Miracle y Guiset, 1977).

De todos modos una tasa óptima de mixis igual a 1 debe considerarse como un resultado dependiente del supuesto de variación temporal de la tasa de nacimiento, y de que tal tasa llega a ser tan baja que no compensa a la mortalidad. En efecto, si la r potencial (*i.e.*, r en ausencia de mixis) no se hiciera negativa, la desaparición de la población que implicaría una tasa de mixis igual a 1 no sería adaptativa. Sin embargo, el supuesto de variación temporal de la tasa de nacimientos parece razonable ya que, los hábitats naturales que ocupan los rotíferos son frecuentemente ambientes sujetos a una amplia variación temporal (véase, *p.e.*, King, 1980), lo cual implica que el ambiente en ciertos momentos resulta inadecuado para la supervivencia de los rotíferos. Esta utilización temporal del hábitat queda acentuada si se acepta que una cepa sólo se ajusta bien a un estrecho conjunto de condiciones ambientales, tal y como sugieren los estudios sobre la estructura genética de las poblaciones de rotíferos (King, 1977; Snell, 1979; Serra y Miracle, 1985; King y Zhao, 1987; véase también el capítulo 5). Por lo tanto, en el contexto ecológico en el que deben de vivir un gran número de poblaciones de rotíferos, cabría esperar altas tasas de mixis a partir del modelo aquí propuesto. De esta

forma, y puesto que se va a producir la desaparición de la población, se conseguiría un mayor número de huevos latentes que aseguraran la supervivencia de la población hasta el siguiente periodo de crecimiento.

No obstante lo anterior, es posible que el modelo propuesto sobreestime las tasas de mixis, puesto que los resultados de las simulaciones pueden verse afectados por la forma que se ha supuesto para la función de $b(t)$. Probablemente, una función para la tasa de nacimientos con varias fases consecutivas de aumento y disminución sin llegar a imponer la extinción podría implicar que las tasas de mixis inferiores a 1 resultaran adaptativas, ya que las hijas partenogenéticas podrían restablecer rápidamente el crecimiento de la población cuando volviera a aumentar la tasa de nacimientos. Además, tal y como muestra la figura 7.6, cuando la tasa de mixis se aleja ligeramente de 1 no se produce un descenso brusco en la producción de huevos durables, por lo que el costo de tal alejamiento no resultaría muy elevado. Debe tenerse en cuenta también, que si la tasa instantánea de nacimiento variase aleatoriamente a lo largo del tiempo también se obtendrían funciones de $b(t)$ con varios máximos, y valdría la argumentación anterior. Frecuentemente se propone una estrategia de "apuestas compensatorias" como óptima en hábitats impredecibles (véase, p.e., Begon *et al*, 1990). En un hábitat fluctuante que hace impredecible la mortalidad de los descendientes cabe esperar que los progenitores "compensen sus apuestas", en el caso de los rotíferos heterogónicos mediante la producción de hijas míticas y amíticas.

Los resultados de las simulaciones realizadas con el modelo establecen de forma reiterada una relación entre el momento idóneo para la inducción de la mixis (esto es, el que maximiza la producción de huevos durables) y el momento en que la tasa potencial de crecimiento se hace negativa; es decir cuando el hábitat deja de ser adecuado para el crecimiento poblacional. En este último momento si no se ha producido la mixis la fuente directa de hembras míticas, las hembras amíticas, alcanzaría su máximo, y consecuentemente se podría producir un mayor número de huevos durables. No obstante, la mixis debería ocurrir ligeramente antes de dicho momento, cuando la disponibilidad de recursos y la condiciones ambientales fueran aún adecuadas para la producción de hembras míticas, la supervivencia de los machos y la formación de huevos durables. Esta restricción de la reproducción sexual, indicada ya previamente por otros autores (Snell, 1986; Snell y Boyer, 1988; véase el apartado 7.4), sería la responsable de que una anticipación de la mixis con respecto al momento en el cual el hábitat deja de ser adecuado para la supervivencia de los rotíferos, mejorara la

producción de huevos durables, ya que así se dispondría de los recursos necesarios para llevar a cabo la reproducción sexual.

Los resultados de las simulaciones son consistentes con la asociación empírica entre mixis y altas densidades de población (véase el apartado 7.3; Wesenberg-Lund, 1930; Carlin, 1943; Nauwerck, 1963; Amren, 1964; King y Snell, 1980). Esto se debe en primer lugar a que en las simulaciones la mixis provoca una disminución drástica en el crecimiento de la población lo que se traduce en un descenso en la densidad de la población, por lo que la mixis aparece asociada con un máximo poblacional. En segundo lugar, el momento óptimo para la inducción de la mixis se sitúa anticipadamente en las proximidades del máximo tamaño potencial de la población, es decir se encuentra temporalmente asociado con el tamaño máximo que la población podría haber alcanzado si la mixis no se hubiera inducido (véase figura 7.4), lo que tendría lugar cuando la tasa de crecimiento se hace negativa.

El análisis de invasibilidad sugiere que se puede mantener en la población polimorfismo genético para el momento de la mixis, el cual causaría en promedio una inducción de la mixis más temprana que en una población homogénea con la estrategia óptima. Este análisis también sugiere que la producción de huevos durables podría ser mayor si la tasa de mixis no cambiara bruscamente de 0 a 1, sino de una forma más gradual, bien para cada individuo o para toda la población en conjunto. Para llegar a esta conclusión basta observar en la figura 7.8 que la mayor producción de huevos durables se consigue cuando existen en la población dos fenotipos diferentes para el momento de la inducción de la mixis, no importando aquí si las diferencias fenotípicas se encuentran determinadas por el genotipo, plasticidad o heterogeneidad ambiental. Estas consideraciones, junto con la ausencia de tiempos de latencia en el modelo, sugieren que el momento óptimo para la inducción de la mixis podría ser ligeramente anterior que el resultante de las simulaciones. Por último, uno de los resultados interesantes de las simulaciones realizadas es el de que el momento óptimo para la inducción de la mixis depende de una condición futura; es decir, debe anticiparse al momento en el que la tasa de crecimiento potencial se hace negativa. Por lo tanto, esta condición, sus consecuencias o sus causas temporalmente más próximas no pueden funcionar como señal para la inducción de la mixis. La señal que se podría esperar fuera seleccionada debería ser una señal correlacionada con la condición selectiva pero que se produjera de forma previa a dicha condición. Obviamente, la correlación entre señal y condición es poco probable que sea igual a 1, y además la mejor señal podría depender crucialmente

de las características del hábitat. Por lo tanto, la evolución de la estrategia óptima podría estar seriamente afectada por este tipo de restricción "informativa".

8. EL EFECTO COMBINADO DEL GENOTIPO, DE LA EDAD, Y DE LA DENSIDAD POBLACIONAL SOBRE LA HISTORIA VITAL Y LA MIXIS

8.1. INTRODUCCIÓN

Un gran número de factores tanto internos como externos se han relacionado con la inducción de la mixis en las diferentes especies de los rotíferos pertenecientes a la clase de los Monogononta (véase la revisión bibliográfica realizada en el capítulo 7). La alta densidad de población es uno de los factores que se han asociado más frecuentemente con la reproducción sexual en muchas de estas especies de rotíferos. Así, las evidencias experimentales apoyan esta asociación en los tres géneros que se han estudiado más detalladamente: *Brachionus*, *Notommata* y *Asplanchna*.

Aunque la densidad es el factor que de una forma más general se ha identificado como estímulo efectivo en la inducción de la mixis en el género *Brachionus*, existen varios factores ambientales que también se han relacionado con la aparición y/o el nivel de mixis. Estos factores se han tratado de forma extensa en el capítulo anterior y se citan ahora brevemente: el cambio en el fotoperiodo (Laderman y Gutman, 1974), la especie de algas usada como alimentación (Pourriot y Rougier, 1979; Gilbert, 1980b; Pourriot *et al.*, 1986a; Lubzens *et al.*, 1980), la cantidad de alimento (Lubzens, 1981; Snell y Boyer, 1988), la salinidad a la cual fueron cultivadas las algas utilizadas para la alimentación (Ben-Amotz y Fisher, 1982) y la edad del cultivo de algas (Lubzens y Minkoff, 1988). La temperatura (Hino e Hirano, 1984; Snell, 1986) y la salinidad (Lubzens *et al.*, 1980; Lubzens, 1981; Lubzens *et al.*, 1985; Snell, 1986; Hino e Hirano, 1988) parecen desempeñar una importante función reguladora en la especie eurihalina *Brachionus plicatilis*. Además, los factores internos tales como los efectos maternos y la variación genética entre clones determinan la respuesta mítica a estos factores (Pourriot y Rougier, 1976; Rougier y Pourriot, 1977; Clément *et al.*, 1977; Rougier *et al.*, 1977; Buchner, 1977; Hino e Hirano, 1977; Snell y Hoff, 1985; Lubzens, 1989).

El presente capítulo se centra en el estudio del efecto de la densidad de población sobre la reproducción sexual en la especie *Brachionus plicatilis* y de la modulación de este efecto por factores internos tales como la edad de la madre y su genotipo. El estudio combina el análisis de estos tres factores comparando la respuesta mítica de un número importante de cepas que guardan entre si distintas relaciones de parentesco. Además, la aproximación realizada al estudio de la densidad permite establecer por primera vez en

esta especie las relaciones entre la mixis y este factor en condiciones experimentales que independizan el efecto de la densidad del de otros factores. Adicionalmente, y aunque en este trabajo no se han estudiado sistemáticamente aquellos otros factores externos distintos de la densidad que se han relacionado con la producción de hembras míticas en esta especie (véase más arriba y en el capítulo 7), en una serie de experiencias preliminares se estudió el grado en que podía afectar la variación de algunos de estos factores –i.e., el nivel de alimento y la salinidad– en la producción de hembras míticas.

8.2. MATERIAL, MÉTODOS Y EXPERIENCIAS PRELIMINARES

Concepción metodológica

La densidad de población se estima normalmente por la relación entre el número de individuos y el volumen de medio en que estos se cultivan o encuentran (n/v). La influencia de la densidad de población puede estudiarse a partir de individuos aislados ($n=1$) o no aislados ($n>1$). Si la diferencia entre estas dos situaciones es significativa existirá una influencia del agrupamiento; esto es, este último efecto existirá si para una misma densidad de población las reacciones de los individuos son diferentes en función de que se encuentren aislados o agrupados (véase el "efecto de grupo" en el apartado 7.2). Se considera por lo tanto que existe un efecto de la densidad *sensu stricto* cuando se detecta un efecto de este factor en condiciones que implican el cultivo de los animales de forma aislada. La mayoría de los experimentos para determinar el efecto del hacinamiento se basan en el seguimiento de individuos confinados en pequeños recipientes de cultivo en los que el medio no se renueva, dado que el mecanismo postulado por algunos autores para este efecto es la acumulación de sustancias en el medio de cultivo. En estos experimentos, los descendientes se van separando de sus madres a cortos intervalos de tiempo y se añade alimento fresco si es necesario.

Experiencias preliminares

1. Para determinar el efecto de la densidad de población sobre la producción de hembras míticas en la especie *Brachionus plicatilis* se realizó una experiencia preliminar en la que se analizó el número de hembras míticas producidas por individuos de esta especie cultivados en dos densidades de población diferentes: 1 hembra/ml y 5 hembras/ml. En

este estudio se utilizó un clon de esta especie denominado CU (véanse los capítulos 5 y 6) el cual, desde su aislamiento, había sido mantenido durante varios años en el laboratorio bajo condiciones de cultivo controladas (para una descripción detallada de estas condiciones véase el capítulo 3). Esta experiencia preliminar se realizó siguiendo el diseño experimental propuesto por Hino e Hirano (1976) en un estudio previo del efecto de la densidad sobre la reproducción sexual en esta misma especie. Este diseño no permite diferenciar entre el efecto de la densidad *sensu stricto* y el efecto del agrupamiento (véase más arriba y el apartado 7.2).

En el protocolo experimental de esta experiencia los cultivos experimentales se inician con el aislamiento de neonatos. Para ello, y de forma previa a la experiencia, se establecen cultivos masivos inoculando hembras portadoras de huevos procedentes de un cultivo madre en fase de crecimiento exponencial, en un medio de cultivo fresco cuya concentración algal se había ajustado a 5×10^5 células de *Tetraselmis sp./ml*. El número de hembras inoculado para iniciar estos cultivos preexperimentales debe adecuarse de forma que la densidad máxima alcanzada durante el mantenimiento de dichos cultivos no supere la menor densidad experimental que se va a ensayar. Los cultivos preexperimentales se mantienen a 12 g/l de salinidad y 25°C de temperatura en una cámara climática con iluminación constante. Después de un periodo de cultivo de dos días, se transfieren hembras ovígeras de este cultivo preexperimental a un medio fresco sin alimento (agua, 12 g/l salinidad) donde se mantienen también a baja densidad poblacional. Transcurrido un periodo de tiempo inferior a 4 horas en la cámara de cultivo, durante el cual se produce la eclosión de un número suficiente de huevos, se recoge el número de neonatos necesario para llevar a cabo la experiencia. Estos neonatos se diferencian fácilmente de sus madres por su menor tamaño. La ausencia de alimento en el medio de aislamiento uniformiza las condiciones con las que se inicia el cultivo de estos organismos experimentales.

Para realizar esta experiencia preliminar se aislaron, siguiendo el protocolo que se termina de describir y que aparece en la figura 8.1, un total de 60 hembras recién nacidas, 20 para cada una de las tres réplicas realizadas en la experiencia. Cada una de estas réplicas consistió en dos cultivos para la densidad de 1 hembra/ml (designados aquí cultivos A₁ y A₂), y un cultivo para la densidad de 5 hembras/ml (cultivo B). Los cultivos A₁ y A₂ de cada uno de los tres replicados se establecieron colocando hembras recién nacidas en 5 ml de medio de cultivo, mientras que los cultivos B consistieron en 10 individuos situados en un volumen de medio de 2 ml. De esta forma se mantiene el mismo número de individuos bajo cada una de las dos densidades experimentales, con lo

que cabe esperar números de descendientes aproximadamente iguales que permitan comparar mejor los resultados obtenidos en los experimentos.

Las restantes condiciones de cultivo fueron las mismas que para los cultivos preexperimentales (12 g/l de salinidad, 5×10^5 células/ml e iluminación constante en una cámara a 25°C). Los cultivos se siguieron durante 96 h retirando los descendientes a intervalos de 24 h. Estos descendientes se cultivaron de forma aislada en pocillos individuales hasta que se pudieron clasificar como hembras míticas o amíticas en función del sexo de su progenie. Aunque estos dos tipos de hembras pueden diferenciarse también por el tamaño de los huevos que producen, su tipificación mediante el cultivo hasta la producción de descendientes proporciona resultados más exactos y fiables.

Con los datos resultantes de la tipificación de la descendencia de los individuos experimentales se calculó una tasa de mixis definida como la proporción de hijas míticas con respecto al total de la descendencia fértil tipificada (tasa de mixis, $TM = \text{hembras míticas} / (\text{hembras míticas} + \text{hembras amíticas})$). En este caso se calculó una tasa de mixis para cada uno de los tres cultivos (A_1 , A_2 , y B) de cada réplica y referida al periodo de 96 h estudiado. Además, se calculó una tasa de mixis global para cada una de las dos densidades ensayadas promediando los resultados obtenidos en las tres réplicas del experimento.

Los resultados de esta experiencia preliminar pusieron de manifiesto la existencia de un efecto de la densidad en la tasa de producción de hembras míticas del clon CU de *Brachionus plicatilis* (véase la tabla 8.1). Los datos obtenidos a partir de las tres réplicas del experimento muestran de forma consistente que únicamente aparecieron descendientes míticas entre la progenie de las hembras experimentales cultivadas a la mayor densidad ensayada (tasa de mixis media global a partir de las tres réplicas, $\overline{TM} = 0.057$; desviación típica entre réplicas, $DT = 0.013$), mientras que nunca se observaron descendientes míticas entre la descendencia de las hembras cultivadas a la densidad de 1 hembra/ml ($\overline{TM} = 0$; $DT = 0$).

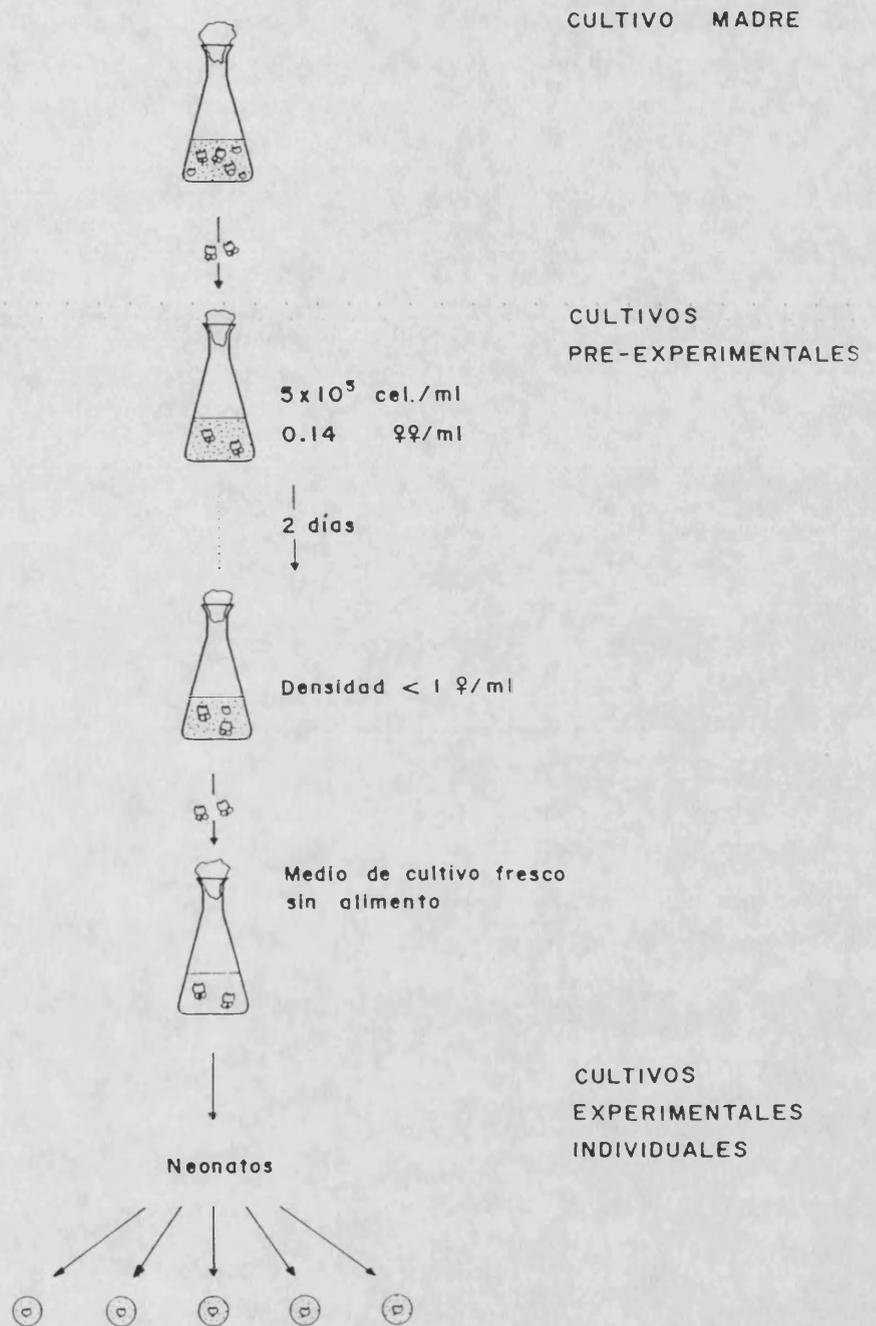


Figura 8.1. Protocolo experimental para la obtención de los neonatos utilizados en las experiencias.

Tabla 8.1. Experiencia preliminar: Efecto de la densidad de población sobre la producción de hembras míticas en el clon CU de *Brachionus plicatilis* a 12 g/l de salinidad y 5×10^5 células de *Tetraselmis sp.*/ml. Se indican los resultados para los cultivos A₁, A₂, y B de cada una de las réplicas del experimento. También se presentan las medias conjuntas para las tasas de mixis obtenidas en las tres réplicas y sus desviaciones típicas (DT).

Cultivo	Réplica								
	I			II			III		
	A ₁	A ₂	B	A ₁	A ₂	B	A ₁	A ₂	B
<i>Condiciones de cultivo</i>									
nº de hembras	5	5	10	5	5	10	5	5	10
volumen, ml	5	5	2	5	5	2	5	5	2
densidad, hembras/ml	1	1	5	1	1	5	1	1	5
<i>Resultados</i>									
nº de descendientes	43	41	105	48	57	95	47	48	83
nº de desc. tipificados	43	41	100	48	56	95	47	47	83
nº de hembras míticas	0	0	4	0	0	5	0	0	7
tasa de mixis (TM)	0		0.004	0		0.053	0		0.084
<i>Resultados globales</i>									
\overline{TM}_1 hembra/ml:	0	DT: 0							
\overline{TM}_5 hembras/ml:	0.05	DT: 0.013							

Las experiencias presentadas en este capítulo se centran en el estudio del factor que de forma más consistente se ha relacionado con la mixis en el género *Brachionus*, la densidad poblacional, y no se considera en extenso el estudio de otros factores externos que se han relacionado con la producción de hembras míticas en *Brachionus plicatilis*. No obstante, se realizaron algunas experiencias previas adicionales para determinar cómo podía afectar la variación de algunos factores –concretamente el nivel de alimento y la salinidad– al efecto producido por la densidad de población en la mixis del clon CU de *Brachionus plicatilis* el cual se había establecido en la experiencia preliminar que se termina de describir más arriba.

II. Durante las experiencias realizadas para estudiar el efecto de la densidad el medio de cultivo no se renueva. En nuestro caso, el exceso de *Tetraselmis* utilizado como alimento y el crecimiento algal que se produce en el transcurso de las experiencias hace innecesaria la adición de alimento después de la inoculación inicial. Asimismo, asegura tasas de crecimiento relativamente uniformes entre los distintos cultivos experimentales. No obstante, esta circunstancia implica la imposibilidad de llevar a cabo un control estricto de las condiciones de alimentación durante los experimentos. Para estimar la posibilidad de que la variación en la cantidad de alimento pudiera afectar a la respuesta mítica de las hembras experimentales se decidió llevar a cabo una experiencia siguiendo el mismo diseño experimental antes descrito pero usando un nivel de alimento menor. Así, se realizaron dos nuevas réplicas del experimento en las que la concentración algal inicial del medio de cultivo fue de 10^5 células/ml en lugar de las 5×10^5 células/ml utilizadas en las tres réplicas previas. No se detectó efecto de la disminución del nivel de alimento y las tasas de mixis obtenidas fueron consistentes con las observadas previamente (para la densidad de 1 hembra/ml: $\overline{TM} = 0$; $DT = 0$; y para la densidad de 5 hembras/ml: $\overline{TM} = 0.055$; $DT = 0.031$).

III. Dada la importancia de la salinidad como factor modulador de la respuesta mítica en la especie *Brachionus plicatilis* (Lubzens *et al.*, 1985; Snell, 1986), se decidió llevar a cabo una experiencia con carácter preliminar para evaluar la magnitud de la respuesta mítica a la densidad que manifiestan individuos de esta especie cultivados en un medio con una salinidad menor a la fijada en las experiencias previamente descritas. De esta manera se pueden establecer unas condiciones de salinidad adecuadas para el estudio del efecto del hacinamiento. Para estudiar el efecto de un cambio en la salinidad del medio de cultivo en la respuesta mítica de la cepa CU a la densidad se realizó una nueva repetición del experimento comparando una salinidad

menor (9 g/l) con la salinidad fijada en el resto de experiencias previas, 12 g/l. Se utilizó el mismo protocolo experimental con la diferencia de que las 10 hembras experimentales sometidas a la densidad de 1 hembra/ml se cultivaron de forma aislada en cada una de las dos salinidades ensayadas (es decir 10 réplicas para cada salinidad, cada una consistente en 1 hembra en 1 ml de medio de cultivo), y los cultivos a la densidad de 5 hembras/ml se establecieron colocando 5 individuos en 1 ml de medio de cultivo (dos réplicas para cada salinidad, cada una consistente en 5 hembras en 1 ml de medio de cultivo). Los resultados de esta experiencia previa son consistentes con los de las experiencias anteriores, ya que no se observaron hembras míticas entre los descendientes de las hembras amíticas cultivadas a la densidad de 1 hembra/ml en ninguna de las dos salinidades ensayadas. En cuanto a las hembras cultivadas a la densidad de 5 hembras/ml, mostraron tasas de mixis mayores a 12 g/l de salinidad ($\overline{TM}=0.038$; $DT=0.017$) que a 9 g/l de salinidad ($\overline{TM}=0.007$; $DT=0.007$); así pues no se observó un efecto modulador positivo del descenso de la salinidad sobre la tasa de mixis del clon CU.

Metodología para el estudio de la respuesta mítica a la densidad poblacional y su regulación por los factores internos genotipo y edad materna.

Las experiencias cuyos métodos se describen en este apartado se orientaron a estudiar de forma detallada el efecto estricto de la densidad poblacional sobre la producción de hembras míticas en individuos de la especie *Brachionus plicatilis*, la existencia del cual ya fue sugerida por los resultados de las experiencias preliminares. Además, se deseaba estudiar la influencia de dos factores internos, la edad de la hembra y su genotipo, en la respuesta mítica a este factor. Con estos objetivos se realizó un estudio comparativo de la respuesta mítica a la densidad de la cepa CU y de otras 12 cepas pertenecientes a la misma especie. De estas últimas, 7 eran cepas derivadas de CU mediante huevos durables, y las 5 restantes eran cepas cultivadas en el laboratorio y con diferentes orígenes geográficos. Tres de estas últimas cepas –ADN, MOJS, y SPO, procedentes del litoral mediterráneo español– habían sido mantenidas en nuestro laboratorio desde su aislamiento (véanse los capítulos 2 y 5). Las dos cepas restantes, RKL y RKE, fueron cedidas por A. Ruttner–Kolisko; la primera de ellas es de origen austriaco y había sido cultivada durante más de 25 años en el laboratorio por esta investigadora mientras que RKE procede de Colorado (USA) y le fue cedida a su vez por R.W. Epp.

En las cepas derivadas por medio de huevos sexuales de la cepa CU de *Brachionus plicatilis* fue necesaria una fase de aislamiento, inducción de la eclosión de los huevos, y establecimiento de los clones, previa al desarrollo del protocolo experimental. Para el establecimiento de estas cepas, designadas aquí como CU1, CU2, CU3, CU4, CU5, CU6, y CU7, se recogieron huevos durables procedentes de un cultivo masivo de laboratorio de dicha cepa. Los huevos se separaron a partir del sedimento con una pipeta Pasteur y se resuspendieron en agua de mar diluida a una salinidad de 12 g/l. A continuación se colocaron en viales de 10 ml envueltos en papel de aluminio y se conservaron en una cámara frigorífica a una temperatura de 4°C durante un periodo de tiempo de un mes. Estas condiciones de ausencia de alimento y completa oscuridad mantienen a los huevos en estado de latencia bloqueando su eclosión (Minkoff *et al.*, 1983). Si los huevos se mantienen en las mismas condiciones en que se originaron, el patrón de eclosión que se observa es errático. Según Pourriot y Snell (1983) para conseguir una eclosión sincrónica de los huevos es necesario que éstos experimenten un periodo de bloqueo de al menos un mes. Transcurrido este periodo de tiempo se colocaron 28 de estos huevos de forma aislada en pocillos que contenían un medio de cultivo con 5×10^5 células de *Tetraselmis sp.*/ml. Las condiciones para la eclosión fueron 25°C, 12 g/l de salinidad e iluminación constante. Dos días después eclosionaron 7 de los 28 huevos durables, y las hembras originadas a partir de cada uno de ellos se mantuvieron en los pocillos hasta que se dispuso de un pequeño cultivo con el que establecer el cultivo madre utilizado en el protocolo experimental.

En el estudio realizado se analizó la respuesta mítica de las 13 cepas a dos densidades (1 hembra/ml y 5 hembras/ml). Para estudiar el efecto de la densidad sin superposición del efecto del agrupamiento, las experiencias se realizaron con individuos aislados, variando el volumen del medio de cultivo para obtener las densidades experimentales deseadas. El diseño experimental utilizado implicó el seguimiento mediante observaciones periódicas, de las hembras cultivadas individualmente en estas dos densidades experimentales, desde su nacimiento hasta su muerte. Esto permitió la obtención de datos para el estudio de la dinámica poblacional y de la variación de la respuesta mítica en relación con la edad. Para evitar que factores no controlados afectaran a la comparación entre densidades, siempre se realizaron simultáneamente los ensayos a las dos densidades correspondientes a una cepa. A continuación se describen las técnicas empleadas para el establecimiento y seguimiento de los cultivos individuales.

Los cultivos experimentales se iniciaron con 12 individuos recién nacidos, los cuales no habían sido alimentados, para cada una de las densidades ensayadas. Para obtener estos individuos experimentales se utilizó el protocolo que se describe en el apartado "Experiencias preliminares" (véase la figura 8.1). Así, se recogieron 24 neonatos al azar separándolos en dos grupos experimentales. Los 12 individuos correspondientes a cada grupo experimental se aislaron en pocillos individuales y se cultivaron a lo largo de toda su vida en una de las dos densidades experimentales: 1 hembra/ml ó 5 hembras/ml. Estas densidades se establecieron colocando los individuos aislados en 1 ml y 0.2 ml de medio de cultivo respectivamente. De esta forma se efectuaron 12 réplicas para cada una de las dos densidades ensayadas. El medio de cultivo no se renovó durante el experimento y el crecimiento algal que se produjo durante el mismo hizo innecesaria la adición de alimento después de la inoculación inicial. A intervalos de 24 horas se separó la descendencia de las hembras experimentales, lo cual atenuó la variación de las densidades de rotíferos en el medio cultivo, y permitió el seguimiento de los descendientes para la determinación del tipo de hembra al que pertenecían. Estos descendientes se colocaron en otros pocillos con medio de cultivo fresco donde se cultivaron de forma individualizada hasta que alcanzaron la madurez reproductiva y pudieron ser tipificados como hembras míticas o amíticas, según que produjeran machos o hembras como descendientes.

Este proceso se repitió exactamente para cada una de las 13 cepas estudiadas, a excepción de la cepa ADN para la cual se realizó una repetición adicional en la que se ensayó una densidad menor, 0.2 hembras/ml. Para ello los individuos experimentales se cultivaron aislados en 5 ml de medio de cultivo. Además, se realizó una repetición del experimento para la cepa CU bajo las mismas condiciones experimentales pero renovando el medio de cultivo cada 24 horas con ocasión de la separación de los descendientes.

La tasas de mixis en relación con la densidad para cada una de las cepas se calcularon a partir de los datos como la proporción de hijas que eran míticas con respecto al total de descendencia fértil tipificada en cada una de las dos densidades experimentales ensayadas.

Análisis estadístico de los datos. El diseño experimental del estudio realizado tiene un carácter multifactorial que permite clasificar el total de descendientes tipificados en el conjunto de experiencias que lo componen según diferentes factores (C, clones o cepas; D, densidad; E, edad de la madre; y H, tipo de hembra).

Los datos recogidos mediante el referido diseño fueron analizados según tres pruebas estadísticas. (1) Con objeto de analizar la existencia de variabilidad en la respuesta a la densidad de las cepas estudiadas, se llevó a cabo una prueba G de independencia de tres vías (Sokal y Rohlf, 1979). Para ello, el número total de descendientes tipificados se clasificó según tres factores: tipo de hembra al que correspondían (míctica o amíctica), densidad experimental a la que habían sido cultivadas sus madres (1 hembra/ml ó 5 hembras/ml) y cepa a la que pertenecían. Este análisis estadístico hace una evaluación global –sobre el conjunto de resultados– de la respuesta de las distintas cepas a la densidad. (2) Para evaluar dicha respuesta para cada cepa, las diferencias entre las proporciones de hembras míticas a las dos densidades ensayadas se analizaron utilizando una prueba estadística para diferencias entre porcentajes ("Test de igualdad de dos porcentajes", pp 663–664 Sokal y Rohlf, 1979). Dada la información previa de que se disponía se diseñó *a priori* una prueba de una cola, ya que se esperaba una mayor proporción de hembras míticas a la mayor densidad experimental ensayada. (3) Las relaciones entre la edad de la madre y la proporción de descendientes míticas se analizaron estadísticamente mediante una segunda prueba G de independencia de tres factores. En esta prueba la descendencia se clasificó según su tipo (H, míctica o amíctica), clase de edad en la que se encontraba su madre (E) y caso experimental (CD); este último factor aglomera los factores cepa (C) y condición experimental de densidad (D). Estas tres pruebas estadísticas pueden tener relaciones de dependencia entre sí, y los niveles de significación pueden verse afectados por ello. Sin embargo, se optó por no realizar un único análisis de los datos debido a dos criterios: la información que proporciona cada análisis, y el que el procedimiento empleado permite evitar frecuencias esperadas demasiado bajas (véase Snedecor y Cochran, 1971). Para lograr este último objetivo las edades fueron aglomeradas según se describe en el apartado de Resultados.

Análisis demográfico de los datos. A partir de los datos obtenidos se calcularon los valores de los principales parámetros de la dinámica poblacional. La notación empleada para estos parámetros es: $l(x)$, proporción de individuos supervivientes a la edad x ; $m(x)$, tasa de fertilidad dependiente de la edad; e_0 , esperanza de vida en el nacimiento; R_0 , tasa neta de reproducción; y G_c , tiempo de generación de la cohorte. (Para una exposición general de las formas de cálculo y el significado de estos parámetros véanse, p.e., Tanner, 1978; Pianka, 1982; Krebs, 1985; Serra, 1987.) Para los parámetros

dependientes del tiempo la unidad utilizada es el día, la cual coincide con el tiempo transcurrido entre observaciones.

La totalidad de estos parámetros se ha calculado para cada cepa y condición de densidad poblacional considerando dos grupos distintos dentro de las hembras experimentales: (1) hembras amícticas que únicamente produjeron descendientes amícticas (H_a), (2) hembras amícticas que produjeron descendientes míticas y amícticas. (Ninguna de las hembras experimentales produjo únicamente descendientes míticas.) Para este segundo grupo de hembras los parámetros poblacionales globales se calcularon según dos criterios distintos, considerando la totalidad de la descendencia (H_m); y considerando únicamente las descendientes míticas ($H_{m(m)}$).

Para el cálculo de los parámetros demográficos se utilizó un modelo de análisis de la dinámica poblacional (véase, p.e., en Serra, 1987, Modelo Ia) utilizando programas de ordenador escritos en APL por M. Serra e implementados en un ordenador IBM-PS2 .

8.3. RESULTADOS

La tabla 8.2 muestra las tasas de mixis obtenidas en las distintas cepas de *Brachionus plicatilis* cultivadas a dos densidades de población, 1 hembra/ml y 5 hembras/ml. Tal y como se ha indicado en el apartado de Material, Métodos y Experiencias preliminares, sobre el número de descendientes se realizó un análisis de frecuencias mediante una prueba G de independencia de tres factores para establecer si la respuesta a la densidad resultaba modificada significativamente por la pertenencia a una u otra cepa (prueba de independencia entre cepa, densidad y tipo de hembra $C \times D \times H$). En este análisis se incluyeron todas las cepas a excepción de CU4 debido a que su inclusión en el análisis implicaba frecuencias para los esperados menores que uno. Los resultados de esta prueba de independencia aparecen en la tabla 8.3. En ella puede verse que los tres factores –cepa, densidad y mixis– no son independientes pudiendo dividirse el valor total de G en componentes, cada uno de los cuales comprueba un aspecto diferente de la dependencia conjunta de los tres factores. En el análisis de la primera componente (interacción $C \times D$) se encontró que la cepa y la densidad de población eran dependientes, lo que indica que las cepas tienen distintas fecundidades globales con respecto a la densidad. La prueba de independencia entre tipo de hembra y cepa ($C \times H$) fue significativa; esto significa que las proporciones de hembras míticas y amícticas son diferentes para las distintas cepas. Dado que existen 11 grados de libertad para esta prueba, se puede realizar una subdivisión en contrastes separados *a priori*. Las doce

Tabla 8.2. Efecto de la densidad de población en 13 cepas de la especie *Brachionus plicatilis* (*n*, número de descendientes; *A*, número de descendientes amícticos; *M*, número de descendientes mícticos; *TM*, tasa de mixis; *ts*, valor del estadístico del "Test para diferencias entre porcentajes"; *p*, probabilidad). Los números que aparecen entre paréntesis a la derecha de los nombres de las cepas asocian a aquéllas que se ensayaron dentro de un mismo bloque experimental; esto es, simultáneamente.

		DENSIDAD EXPERIMENTAL									
		1 hembra/ml				5 hembras/ml				significación ^a	
		n	A	M	TM	n	A	M	TM	ts	p
CEPA											
SPO	(1)	155	153	2	0.013	168	146	6	0.039	1.48	<0.1
MOJS	(2)	218	206	4	0.019	124	112	2	0.017		
ADN	(3)	138	124	11	0.081	106	98	6	0.060		
RKL	(3)	112	111	1	0.001	102	101	0	0		
RKE	(4)	241	238	0	0	168	164	1	0.006	1.411	<0.1
CU	(5)	235	232	0	0	169	163	1	0.006	1.520	<0.1
CU1	(5)	215	195	0	0	148	128	2	0.015	2.169	<0.025
CU2	(6)	113	104	0	0	79	72	0	0		
CU3	(6)	96	91	0	0	85	80	0	0		
CU4	(7)	68	62	0	0	48	40	0	0		
CU5	(7)	241	232	4	0.017	169	157	8	0.048	1.774	<0.05
CU6	(8)	291	282	0	0	171	162	3	0.018	2.757	<0.005
CU7	(8)	229	201	24	0.106	162	139	14	0.091		
Control ^b											
CU	(5)	250	249	0	0	306	299	0	0		

a. Los valores de probabilidad corresponden a la significación estadística de las diferencias entre las proporciones de hembras mícticas y amícticas encontradas a las dos densidades experimentales que se indican. La prueba estadística diseñada fue una prueba de una cola ya que *a priori* se esperaban mayores proporciones de hembras mícticas a la mayor densidad experimental. Por lo tanto, sólo se realizó dicha prueba en aquellas cepas en las que se encontró la relación esperada. A efectos puramente indicativos, ya que resulta estadísticamente incorrecto, se da a continuación una lista de los valores encontrados para *ts* y *p* cuando se realizó una prueba de dos colas diseñada *a posteriori* en aquellas cepas en las que los resultados mostraron una relación inversa entre tasa mixis y densidad: MOJS (*ts* = 0.129, *p* < 0.9); ADN (*ts* = 0.637, *p* < 0.6); RKL (*ts* = 0.461, 0.8 < *p* < 0.6); CU7 (*ts* = 0.480, 0.8 < *p* < 0.6). Obsérvese que las diferencias no son significativas.

Para una de estas cepas, ADN, se realizó una repetición adicional (bloque experimental 4) pero a una densidad pre-experimental menor (<0.2 hembras/ml), siendo las densidades experimentales 0.2 hembras/ml y 1 hembra/ml. Los resultados fueron los siguientes: *TM* a 0.2 hembras/ml = 0.134, *TM* a 1 hembra/ml = 0.192, dando la prueba estadística de una cola los siguientes valores: *ts* = 1.519, *p* < 0.1 (0.2 hembras/ml: *n* = 201, *A* = 174, *M* = 27; 1 hembra/ml: *n* = 175, *A* = 139, *M* = 33). Esto es, se encontró el efecto esperado de la densidad.

b. Resultados de la repetición de la experiencia realizada con el clon CU para determinar la influencia de la renovación del medio de cultivo en el efecto de la densidad detectado. Se utilizaron las mismas condiciones pero renovando el medio de cultivo cada 24 horas.

cepas proporcionan dos clases: la constituida por las cepas alejadas geográficamente en cuanto a su origen de la cepa CU y que no guardan relación de parentesco con ella (SPO, MOJS, ADN, RKL, y RKE), y la constituida por esta cepa y aquellas derivadas de la misma por medio de huevos durables (CU, CU1, CU2, CU3, CU5, CU6, y CU7). Las pruebas de independencia entre el tipo de descendiente y las cepas alejadas geográficamente de CU (Ca vs. H) es significativa, y lo mismo ocurre entre el tipo de hembra y la cepa CU y sus derivadas (Cp vs. H). O sea, dentro de estos dos conjuntos de cepas existen diferencias en las proporciones de descendientes míticas y amíticas. Sin embargo, no fue significativa una prueba de independencia entre el tipo de hembra y las cepas aglomeradas ahora en dos únicas categorías (Ca y Cp), indicando que la distribución de descendientes míticas y amíticas puede considerarse independiente de que las cepas pertenezcan a una u otra clase.

Tabla 8.3. Prueba G de independencia C x D x H (C, cepa o clon; D, condición experimental de densidad; H, tipo de hembra descendiente) con descomposición del valor total del estadístico G en sus componentes. Se indican los valores obtenidos para G , los valores de probabilidad (p) y el número de grados de libertad ($g.l.$) asociados a cada una de las pruebas. El análisis se completó con una descomposición del valor del estadístico G correspondiente a la independencia C x H (Ca, cepas no derivadas de CU; Cp, CU y cepas derivadas de CU).

Hipótesis analizada	g.l.	G	p
Independencia C x D	11	23.274	0.01–0.025
Independencia C x H	11	131.124	<0.001
Ca x H	(4)	(33.297)	<0.001
Cp x H	(6)	(97.635)	<0.001
{Ca}, {Cp} x H ^a	(1)	(0.096)	0.7–0.8
Independencia D x H	1	1.773	<0.2
Interacción C x D x H	11	19.027	0.05–0.1
Independencia C x D x H	34	175.198	<0.001

a. Prueba de independencia entre H y las cepas reunidas en las dos clases que se indican.

La componente final para el análisis es la interacción trifactorial entre la cepa, la densidad y el tipo de hembra (C x D x H). Esta interacción, resulta significativa para $0.05 \leq p \leq 0.1$ encontrándose el valor de G muy próximo al valor para $p= 0.05$. Por lo tanto, la respuesta mítica a la densidad es dependiente de la cepa. Este resultado puede ayudar a explicar otro resultado aparentemente paradójico y es que no se puede concluir que la densidad y el tipo de hembra (D x H) sean dependientes, esto es, que la densidad tenga un efecto neto para todas las cepas consideradas en conjunto, aunque el valor de probabilidad es demasiado bajo para poder afirmar rotundamente la independencia de dichos factores.

La variabilidad en la respuesta de las cepas queda patente en la tabla 8.2 en la que se observa que de las 13 cepas estudiadas, 3 no mostraron respuesta a la densidad (CU2, CU3 y CU4) en el intervalo de las densidades estudiadas. En cuanto a las 10 cepas restantes, en las que se observaron tasas de mixis distintas en relación con la densidad de población ensayada, 6 mostraron el patrón esperado es decir un aumento de la producción de hembras míticas con la densidad, observándose en las 4 restantes el patrón opuesto, si bien dicho patrón debe considerarse como un efecto de muestreo más que como la resultante de una respuesta inversa a la densidad. En efecto, mientras que las cepas que mostraron el patrón esperado dan resultados estadísticamente significativos, los resultados de la prueba de dos colas practicada sobre las cepas con respuesta inversa sugieren que éstos no son significativos (véase la nota al pie de la tabla 8.2). Debe considerarse que las probabilidades en esta prueba de dos colas podrían verse falseadas, ya que la prueba se diseñó *a posteriori*, una vez conocidos los resultados. La repetición del experimento a una densidad menor (0.2 hembras/ml) con la cepa ADN, una de las cepas que había mostrado mayor proporción de hembras míticas a la menor densidad experimental, mostró la relación esperada entre mixis y densidad, la cual resultó estadísticamente significativa (véase el pie de la tabla 8.2).

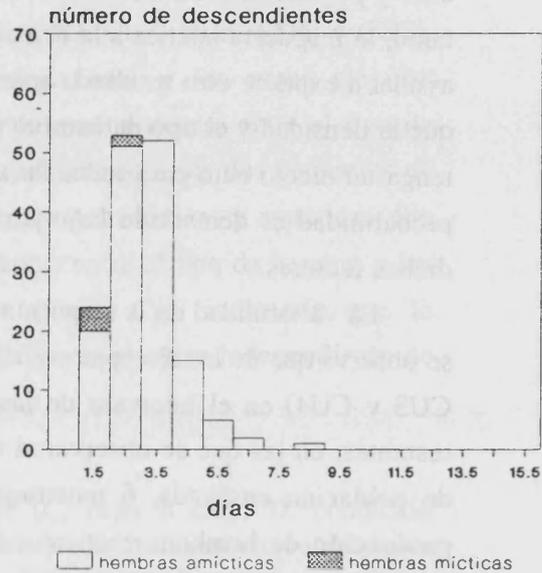
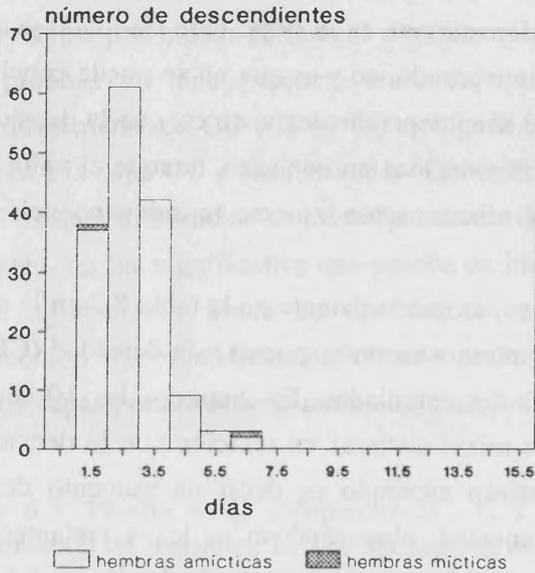
En cuanto a los resultados de la repetición del experimento con la cepa CU pero siguiendo una pauta de renovación diaria del medio de cultivo mostraron una ausencia de descendientes míticas en la dos densidades ensayadas.

La figura 8.2 muestra el número descendientes míticas con respecto al total de descendencia tipificada que se observaron a lo largo del periodo de puesta de las hembras experimentales pertenecientes a los diferentes clones estudiados y que fueron cultivados a dos densidades de población. En las condiciones experimentales utilizadas no se detectan descendientes hasta la segunda observación después del nacimiento (48 horas) de las hembras experimentales, aunque la producción de huevos se inicia al día

SPO

densidad: 1 hembra/ml

densidad: 5 hembras/ml



MOJS

densidad: 1 hembra/ml

densidad: 5 hembras/ml

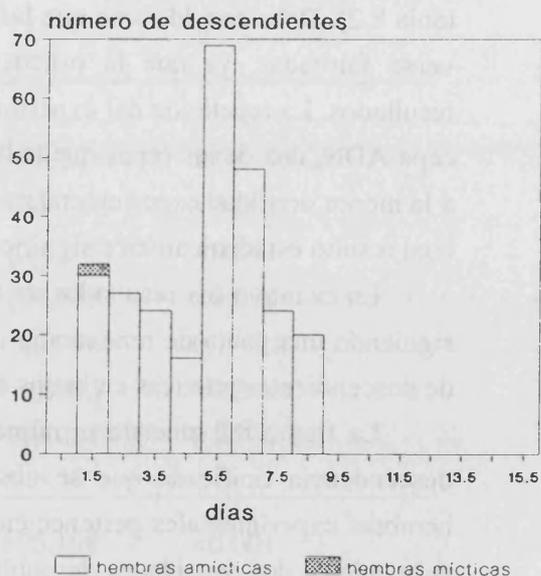
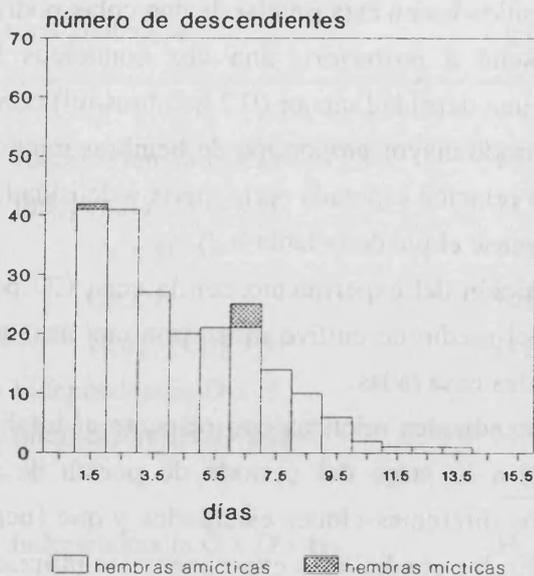
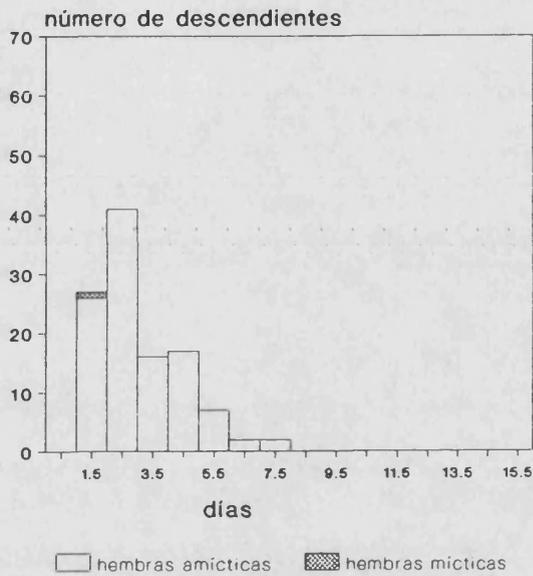


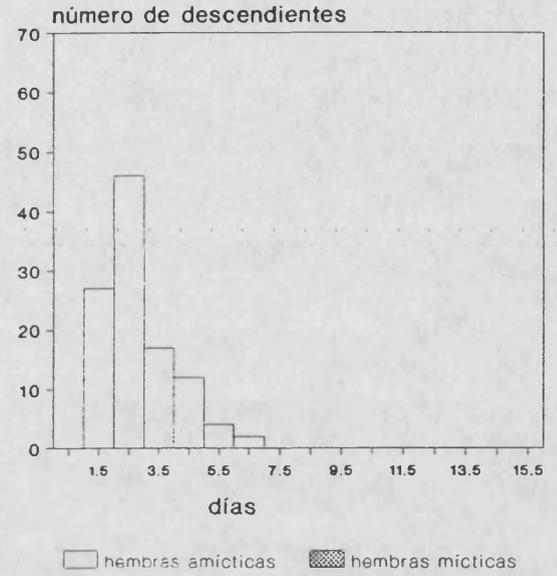
Figura 8.2. Distribución de los números de descendientes mícticas y amícticas a lo largo del periodo reproductivo de las hembras experimentales, pertenecientes a distintos clones, cultivadas aisladamente en las densidades que se indican: clones SPO y MOJS. Los histogramas corresponden al número total de descendientes producido por 12 hembras entre una observación y la siguiente (cada 24 horas).

RKL

densidad: 1 hembra/ml

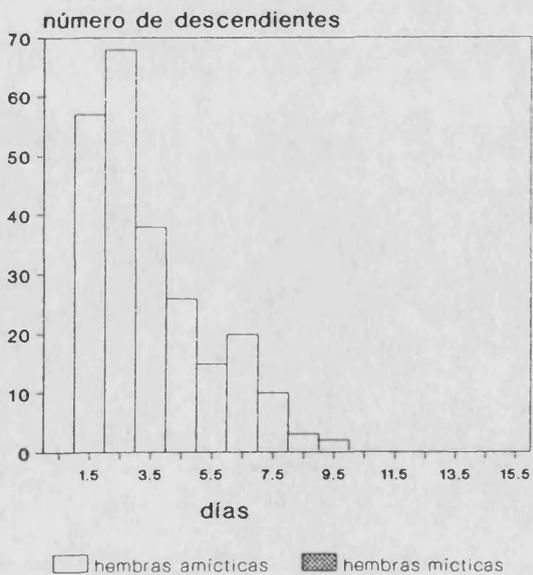


densidad: 5 hembras/ml



RKE

densidad: 1 hembra/ml



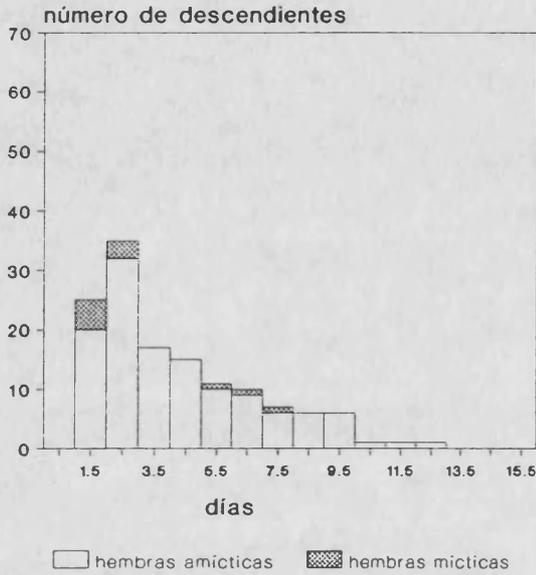
densidad: 5 hembras/ml



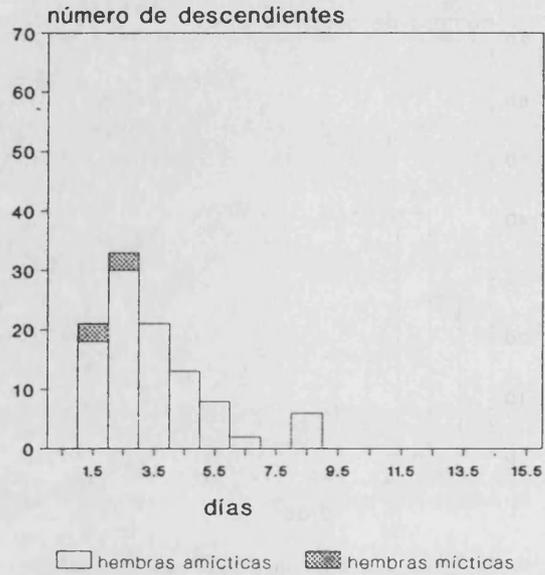
Figura 8.2. Continuación: clones RKL y RKE.

ADN

densidad: 1 hembra/ml

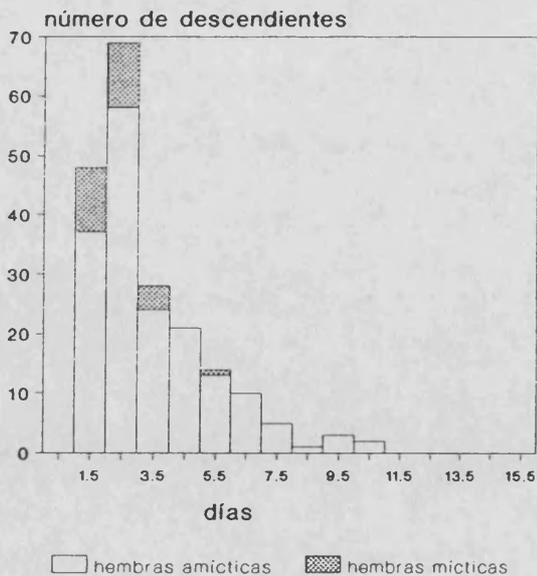


densidad: 5 hembras/ml



ADN'

densidad: 0.2 hembras/ml



densidad: 1 hembra/ml

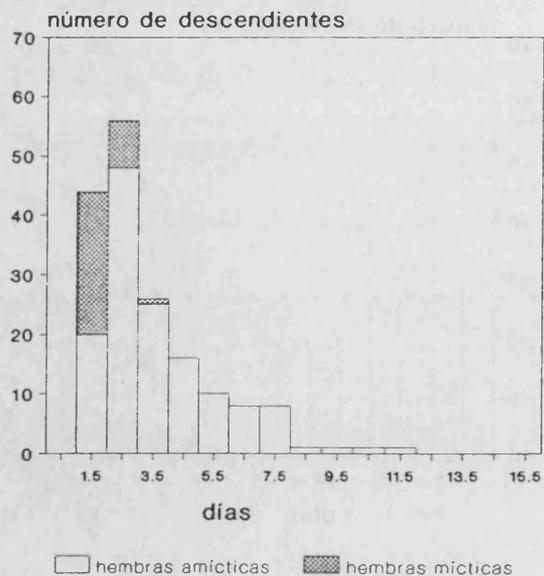
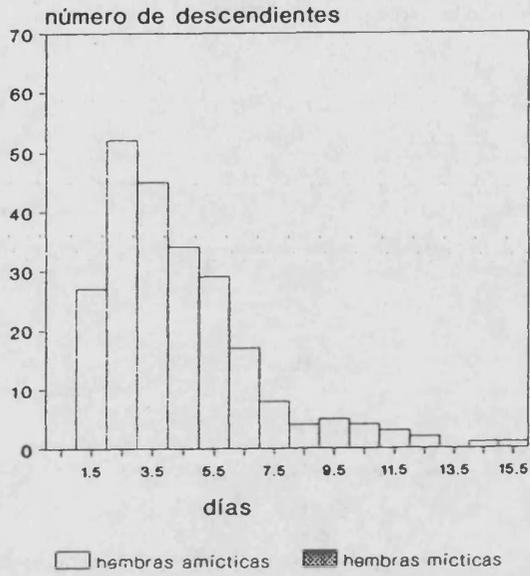


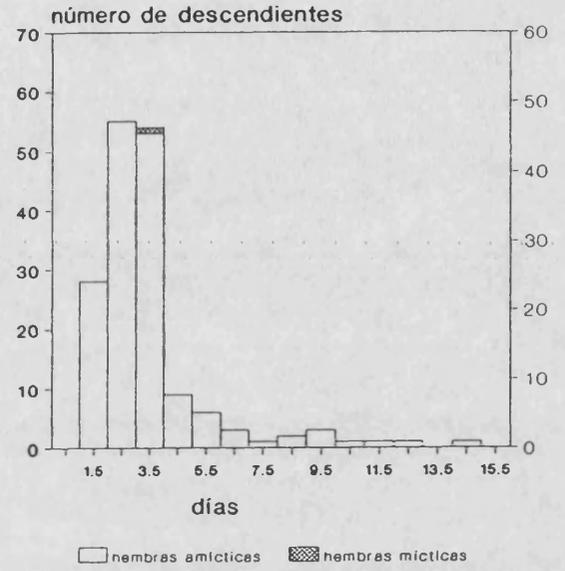
Figura 8.2. Continuación: clon ADN. La repetición adicional a una densidad preexperimental menor (<0.2 hembras/ml) se denota como ADN'.

CU

densidad: 1 hembra/ml

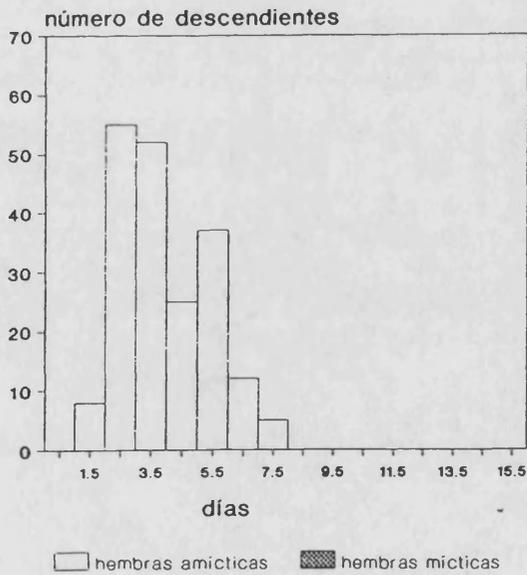


densidad: 5 hembras/ml



CU1

densidad: 1 hembra/ml



densidad: 5 hembras/ml

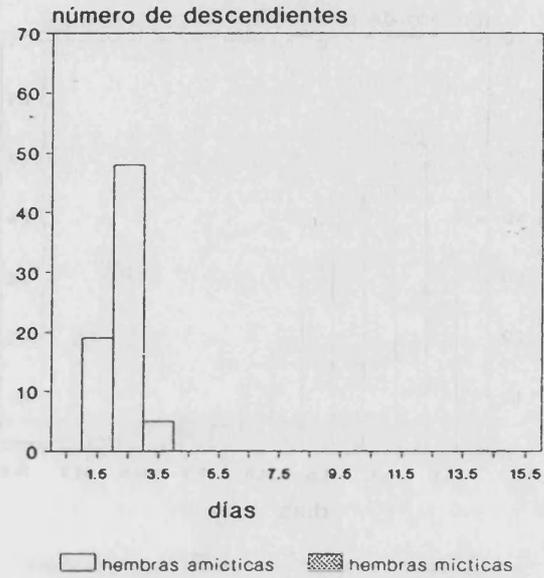
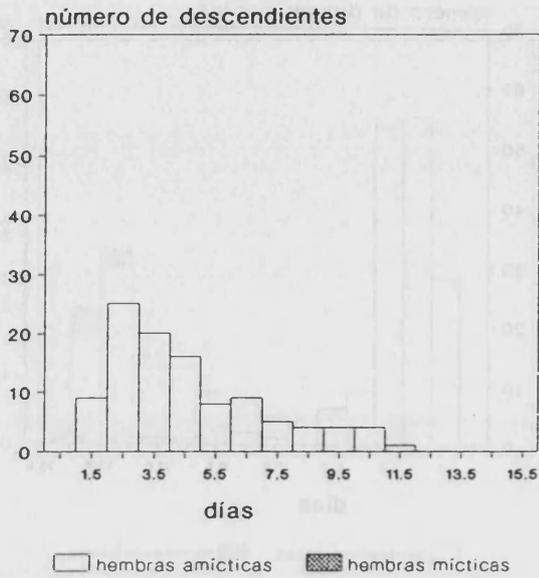


Figura 8.2. Continuación: clones CU y CU1.

CU2

densidad: 1 hembra/ml

densidad: 5 hembras/ml



CU3

densidad: 1 hembra/ml

densidad: 5 hembras/ml

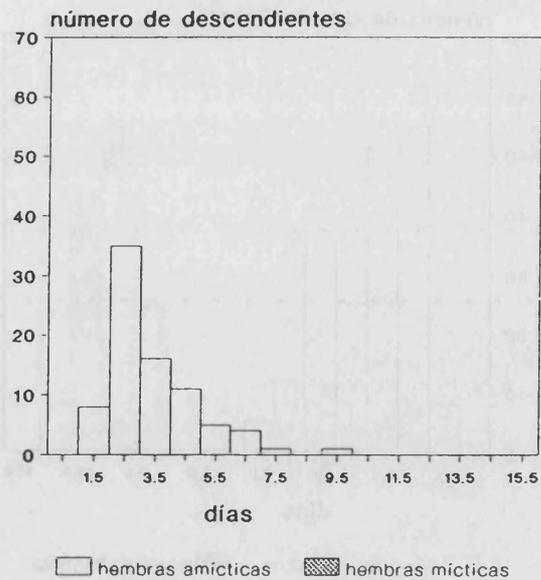
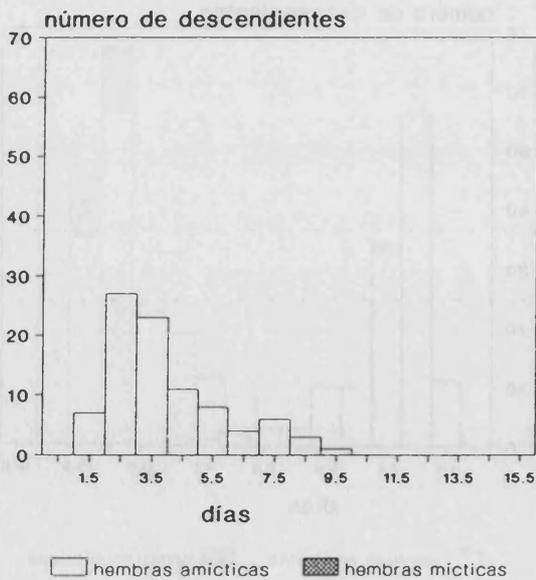
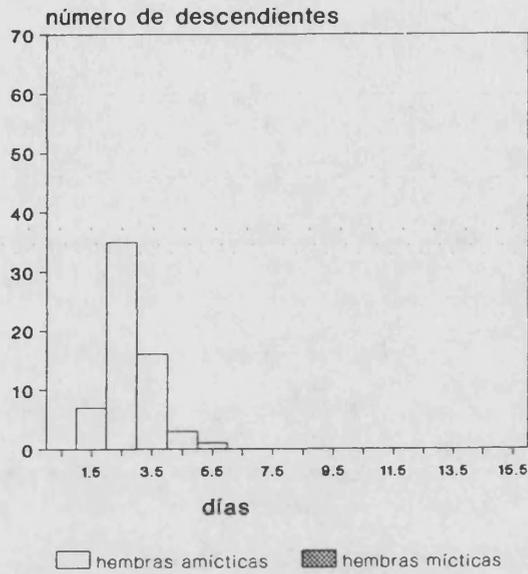


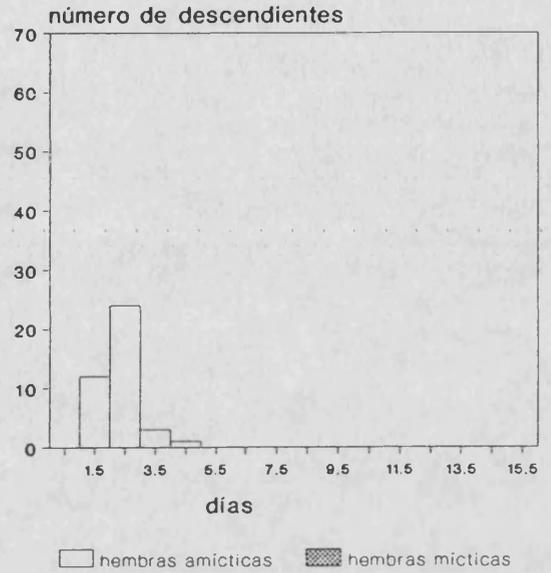
Figura 8.2. Continuación: clones CU2 y CU3.

CU4

densidad: 1 hembra/ml

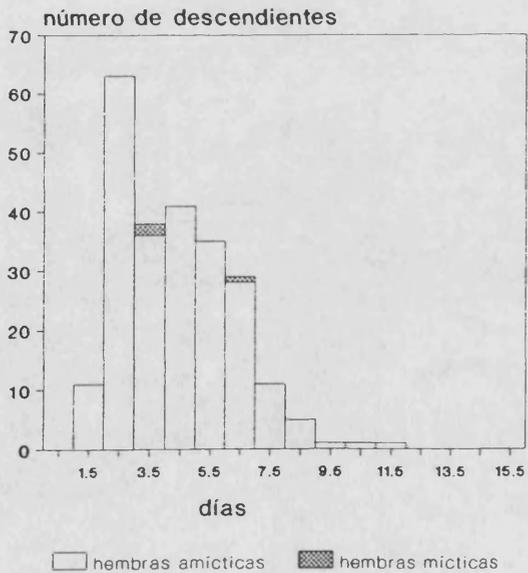


densidad: 5 hembras/ml



CU5

densidad: 1 hembra/ml



densidad: 5 hembras/ml

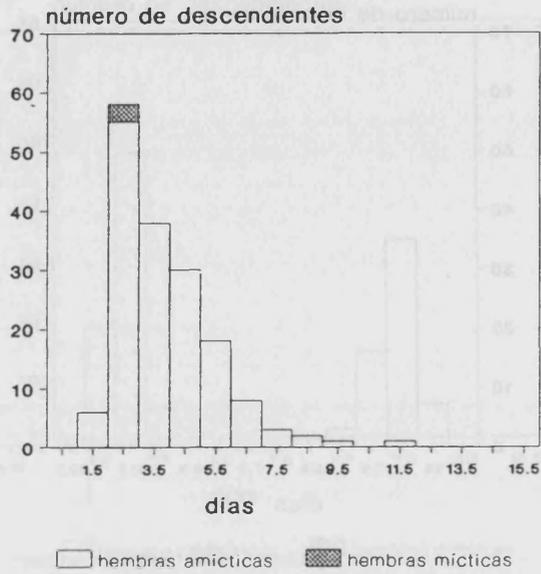
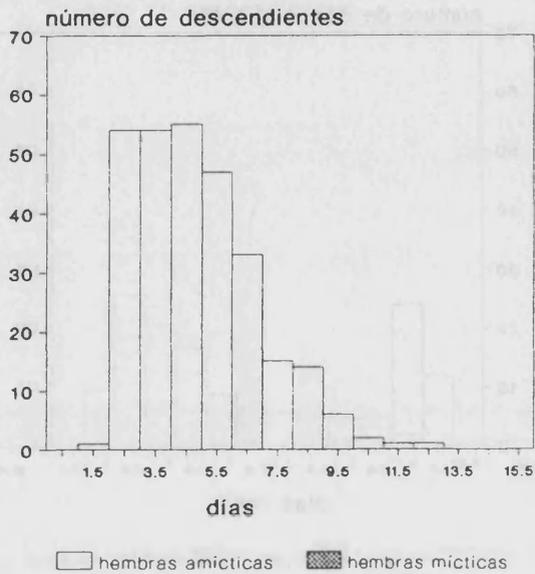


Figura 8.2. Continuación: clones CU4 y CU5.

CU6

densidad: 1 hembra/ml

densidad: 5 hembras/ml



CU7

densidad: 1 hembra/ml

densidad: 5 hembras/ml

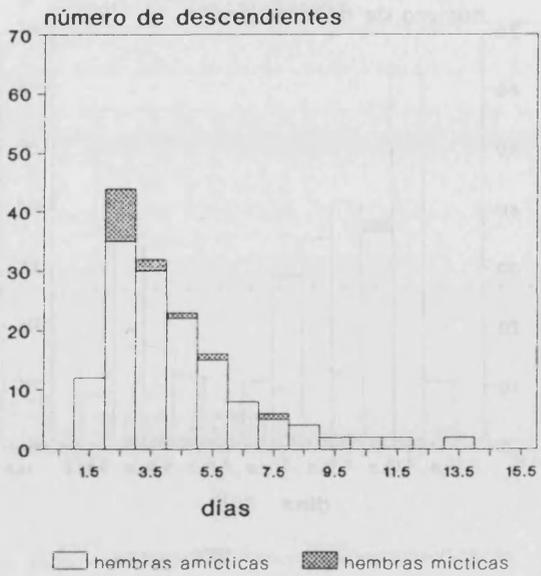
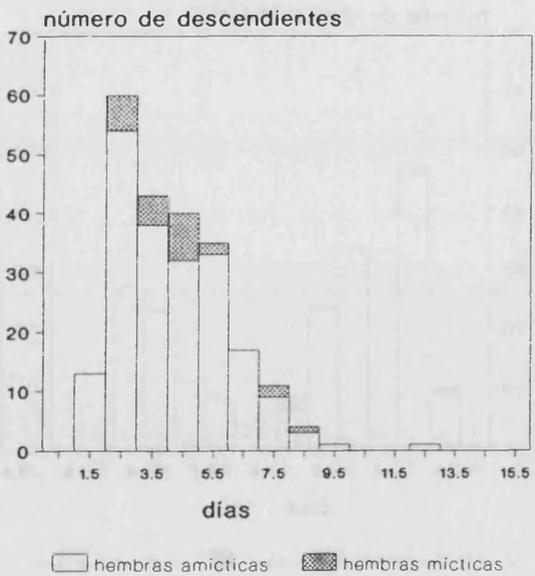
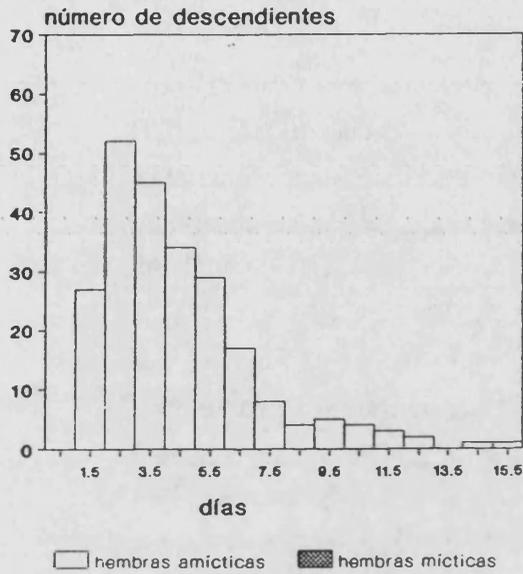


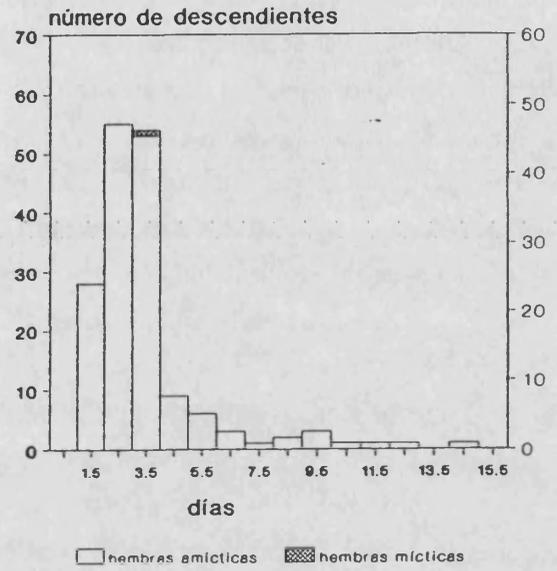
Figura 8.2. Continuación: clones CU6 y CU7.

CU

densidad: 1 hembra/ml

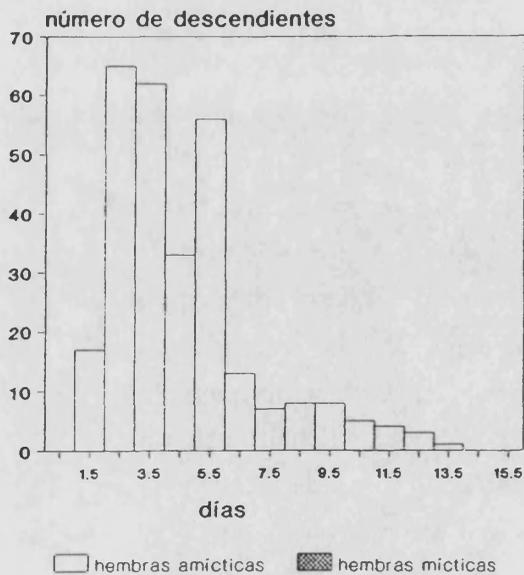


densidad: 5 hembras/ml



CUR

densidad: 1 hembra/ml



densidad: 5 hembras/ml

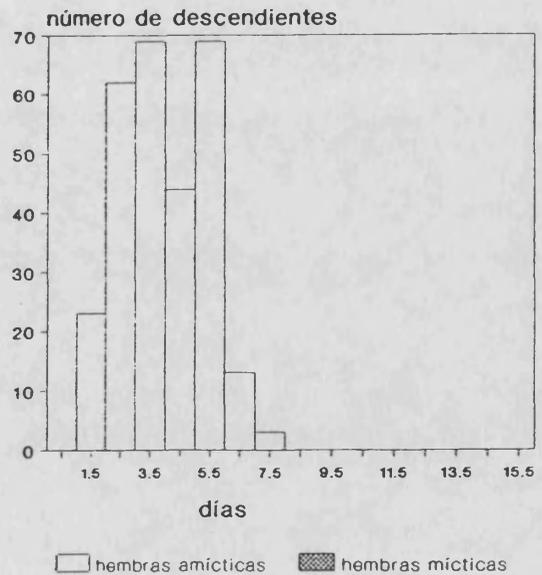


Figura 8.2. Continuación: comparación de los resultados obtenidos con el clon CU cultivado en medio confinado (CU) y en medio renovado cada 24 horas (CUR).

siguiente del nacimiento. La duración del periodo de puesta varía para los diferentes clones. Considerando el total de situaciones experimentales, únicamente se observaron descendientes míticas en las clases de edad pertenecientes al intervalo entre 1 y 9 días de edad de las hembras experimentales, ambos inclusive.

El análisis de independencia empleado para estudiar el efecto de la edad materna sobre el tipo de descendientes se realizó sobre una tabla de contingencia trifactorial (CD x E x H) en la que se incluyeron todas aquellas situaciones experimentales (combinaciones de cepa y densidad experimental, CD) en las cuales se habían observado hembras míticas entre los descendientes (15 casos: SPO₁, SPO₅, MOJS₁, MOJS₅, ADN₁, ADN₅, ADN_{0.2'}, ADN_{1'}, CU₅, CU₁₅, CU₅₁, CU₅₅, CU₆₅, CU₇₁ y CU₇₅) a excepción de dos casos (RKL₁ y RKE₅) que no se incluyeron en el análisis por determinar el que aparecieran frecuencias esperadas menores que uno. Cada uno de estos casos se ha designado con el nombre de la cepa y la condición de densidad ensayada como subíndice; para la cepa ADN, se indica con un apóstrofo la repetición del experimento a una densidad menor. El número total de descendientes producidos durante los 8 días en que se observaron descendientes míticas se agrupó en tres clases de edad que reunieron las edades de la siguiente manera: clase de edad 1, edades 2 y 3 días; clase de edad 2, edades 4 y 5 días; clase de edad 3, edades 6, 7, 8, y 9 días. A su vez, los descendientes dentro de cada condición experimental y clase de edad se clasificaron como hembras míticas o amíticas (factor H). Con un criterio conservativo de cara a la demostración de dependencia de la mixis con la edad, se excluyeron las edades reproductivas tardías en las que no se observó mixis.

Los resultados de este segundo análisis de contingencia de 3 vías se indican en la tabla 8.4. La prueba de independencia CD x E x H es significativa, lo cual indica la existencia de relaciones de dependencia entre los tres factores. La independencia CD x E es también significativa, lo cual implica que el patrón de fecundidad en relación con la clase de edad depende del par cepa–densidad. La distribución de los descendientes en las dos clases de hembras –míticas y amíticas– depende de la combinación experimental cepa–densidad, tal y como indica el valor de *G* obtenido para la independencia CD x H. En el caso de la independencia E x H (véase también la figura 8.3), el valor de *G* obtenido es también significativo, y por lo tanto se puede rechazar la hipótesis nula de independencia entre la clase de edad en la que se encuentra la madre y la distribución observada para sus descendientes en los dos tipos de hembras, míticas y amíticas. Esto significa que existen diferencias en la distribución de descendientes asociadas con la edad de la madre. Dado que existen 2 grados de libertad en esta prueba,

y que el valor de G es lo suficientemente grande (27.065) como para, en potencia, proporcionar componentes significativos con un único grado de libertad, se realizó una subdivisión de dicho valor para contrastar las distribuciones en los dos tipos de hembras (mícticas y amícticas) de los descendientes correspondientes a las dos clases de edad que agruparon las mayores proporciones de descendientes (clase de edad 1 contra clase de edad 2). La prueba de independencia de tipo de descendientes contra las dos clases de edad es significativa, lo que implica que entre estas dos clases de edad existen diferencias en cuanto a las proporciones de descendientes mícticas y amícticas producidas. En cuanto al valor obtenido en el cálculo de la componente final, interacción CD x E x H, es significativo indicando que la distribución de hijas mícticas y amícticas en las distintas clases de edad depende de la combinación cepa–densidad de población.

Tabla 8.4. Prueba G de independencia CD x E x H (CD, caso experimental resultante de la combinación cepa–condición de densidad; E, clase de edad en la que se encuentra la madre; H, tipo de hembra descendiente); descomposición del valor total de G en sus componentes. Se indican los valores obtenidos para G , los valores de probabilidad (p) y el número de grados de libertad ($g.l.$) asociados a cada una de las pruebas. El análisis se completa con una descomposición del valor de G para la independencia de E x H (E1, clase de edad 1; E2, clase de edad 2).

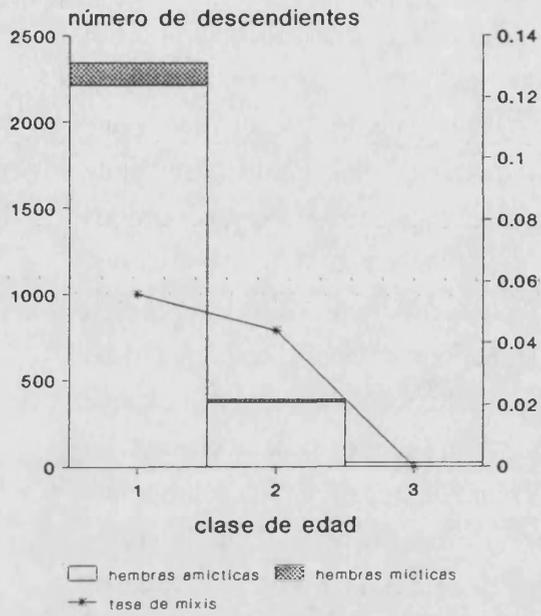
Hipótesis analizada	g.l.	G	p
Independencia CD x E	28	226.493	<0.001
Independencia CD x H	14	122.408	<0.001
Independencia E x H	2	27.065	<0.001
{E1}, {E2} x H ^a	(1)	(23.655)	<0.001
Interacción CD x E x H	28	80.283	<0.001
Independencia CD x E x H	72	456.246	<0.001

a. Prueba de independencia entre H y las edades reunidas en las dos clases que se indican.

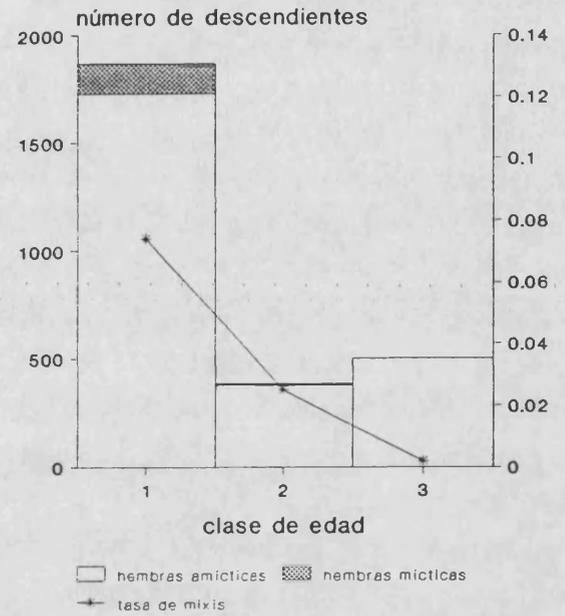
Los resultados de este segundo análisis de frecuencias (CD x E x H) indican una relación de dependencia entre la clase de edad en la que se encuentra una hembra y la proporción de descendientes míticas que ésta produce. En relación con ello, hay que tener en cuenta que los datos referentes a la descendencia de las hembras experimentales utilizados en este análisis se restringieron a la parte del periodo de puesta en que se observaron descendientes míticas. Además, el criterio utilizado para la asignación de los descendientes a las tres clases de edad fue puramente cronológico, no teniéndose en cuenta que una misma edad cronológica pudiera englobar edades fisiológicas distintas, bien determinadas por diferencias genotípicas, y por ello dependientes de la cepa (véase más adelante la variación en la duración media de la vida en las distintas cepas, e_0 en la tabla 8.5), bien por diferencias intragenotípicas, y por ello dependientes de cada individuo. Por lo tanto, la relación entre las tasas de mixis y la edad podría verse afectada por estos dos motivos. Para estudiar si las conclusiones podían verse alteradas por estas consideraciones, se calcularon las tasas en relación con las clases de edad según diversos criterios de asignación de las edades de las hembras experimentales a las clases de edad. Todos estos criterios consideraron todo el periodo reproductivo; es decir, no desestimaron las edades tardías en las que no se produjeron descendientes míticas, y se generaron siempre tres clases de edad. Los criterios fueron: (1) cada clase de edad representa un tercio del periodo reproductivo, el cual se determinó para la globalidad de las hembras experimentales; (2) cada clase de edad representa un tercio del periodo reproductivo, el cual se determinó para cada par cepa-densidad; así pues, las clases de edad 1 de dos cepas diferentes no hacen necesariamente referencia a los mismos días de vida; (3) cada clase de edad representa un tercio del

Figura 8.3. Número de descendientes amíticas, míticas y tasas de mixis en relación con la clase de edad en la que se encuentran las madres, establecidas dichas clases de edad según 4 criterios distintos. En todos los casos se consideraron únicamente aquellas cepas y densidades en las que se habían observado descendientes míticas. Los tres primeros criterios consideran el total del periodo reproductivo de las hembras dividiéndolo en tres partes iguales cada una de las cuales corresponde a una clase de edad. En el criterio 1 el periodo reproductivo se determinó globalmente para el total de las hembras experimentales, en el criterio 2 el periodo reproductivo se determinó para cada par cepa-densidad, y en el criterio 3 para cada hembra experimental individualmente. El cuarto criterio corresponde al establecido para el análisis de independencia CD x E x H, en el que se consideraron sólo los días del periodo reproductivo en los que se observó descendencia mítica en alguna de las cepas.

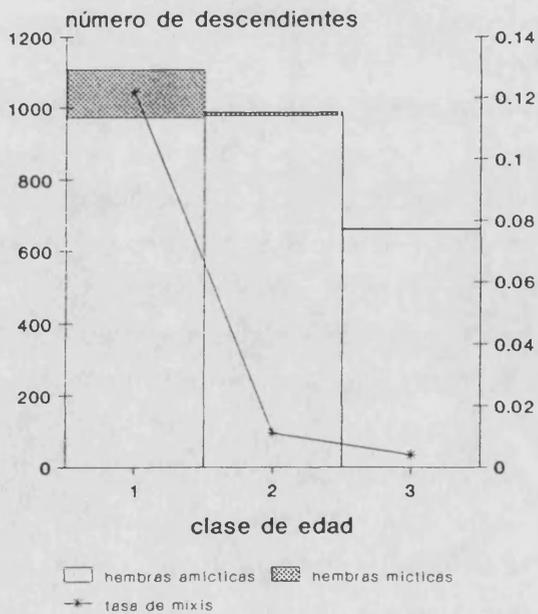
critério 1



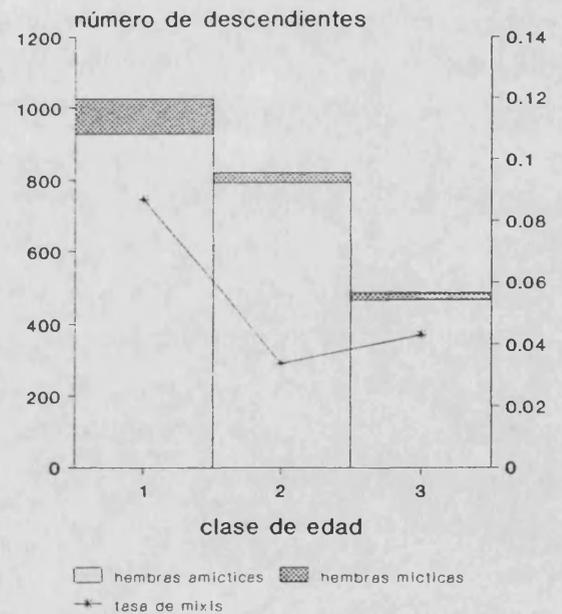
critério 2



critério 3



critério 4



periodo reproductivo, el cual se determinó para cada hembra experimental; así pues la clase de edad 1 de dos individuos no hace referencia necesariamente a los mismos días de vida, aunque los dos individuos pertenezcan a la misma cepa. La figura 8.3 muestra las tasas de mixis para cada clase de edad calculadas según estos criterios, y también según el criterio utilizado en el análisis de frecuencias. En dicha figura se observa que las conclusiones cualitativas se conservan y que las diferencias cuantitativas son muy pequeñas. Nótese que los resultados más divergentes corresponden a los dos criterios que podrían considerarse más extremos. En el caso del criterio 4, el más conservativo, únicamente se consideran los días del periodo reproductivo en los que aparecen descendientes míticas, excluyéndose la parte final del periodo de puesta en la que todas las descendientes fueron amíticas; por lo tanto es explicable el que las tasas de mixis de las clases de edad 2 y 3 sean semejantes siendo ligeramente superior la de la clase 3. En el criterio 1 basta que un individuo tenga un periodo reproductivo mucho más largo que los restantes para que aumente considerablemente la amplitud global del intervalo constituido por las edades reproductivas, y por lo tanto se desplace el tercio final de dicho intervalo a un grupo de edades en el que la mayoría de los individuos ya no tienen descendientes o éstas son amíticas, de ahí la ausencia de descendientes míticas en la clase de edad 3 obtenida según este criterio. No obstante, independientemente del criterio considerado la mayor proporción de hembras míticas se produce durante la fase inicial del periodo reproductivo (véase la figura 8.3). Estos resultados se conservan si se consideran las tasas de mixis diarias obtenidas sumando el total de descendientes míticas y amíticas producido cada día por el total de hembras estudiadas (figura 8.4).

Los resultados del análisis demográfico aparecen en la figura 8.5 y la tabla 8.5. La figura 8.5 muestra las curvas de supervivencia y la evolución de la fecundidad específica de la edad a lo largo de la vida de las hembras pertenecientes a las diferentes cepas en las dos condiciones de densidad ensayadas. Los valores de los principales parámetros globales de reproducción y de la esperanza de vida en el nacimiento aparecen en la tabla 8.5. A continuación se hace una enumeración de los aspectos más importantes puestos de manifiesto por estos resultados.

(1) Las curvas de supervivencia son curvas de Tipo I (véase, p.e., Krebs, 1985). Es decir, para cualquier cepa y condición de cultivo, la mortalidad específica de edad cambia con la edad, dando lugar a una curva característica de organismos con senescencia. (2) En las cepas estudiadas parece haber un efecto de la densidad sobre la duración de la vida, la cual se ve reducida con el aumento de la primera (veáanse también los valores de e_0 en la tabla 8.5), a excepción de las cepas ADN, CU5 y CU7 en la

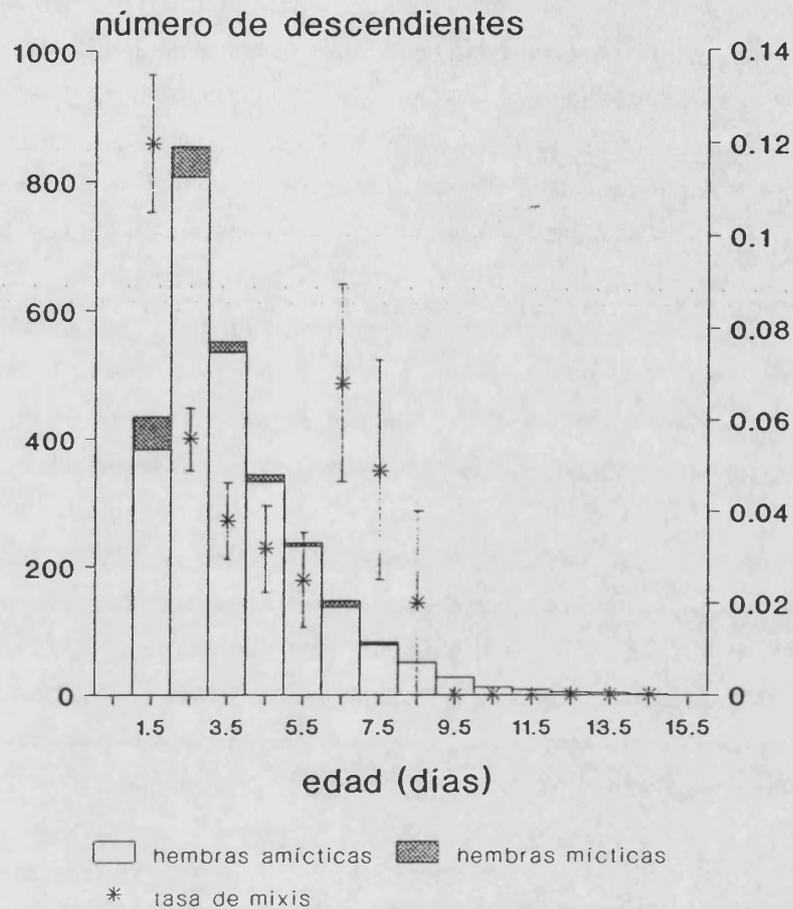


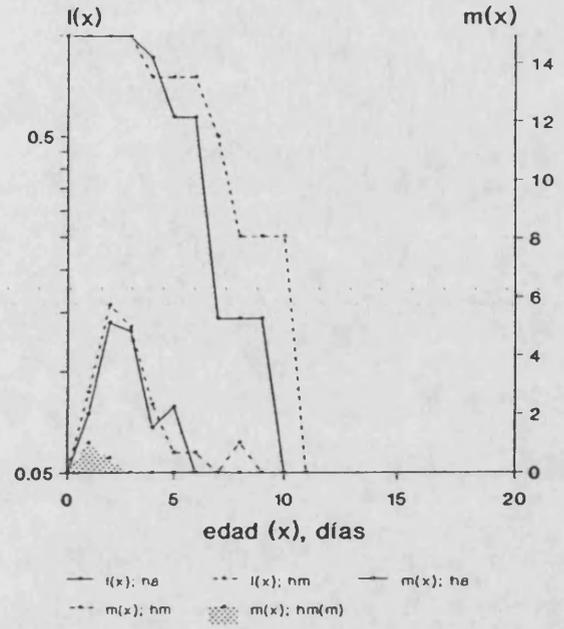
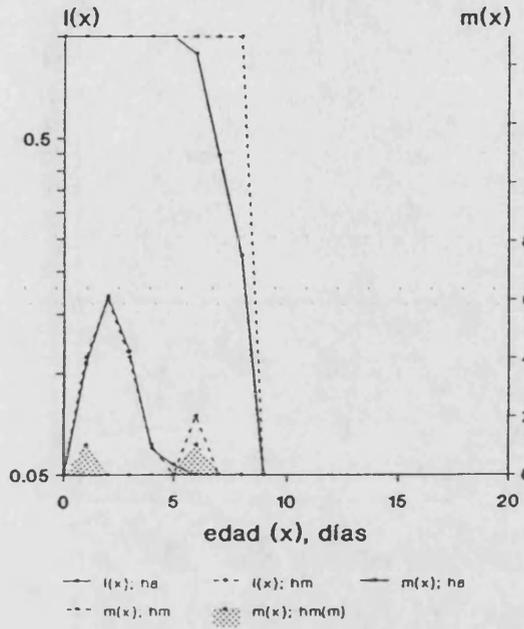
Figura 8.4. Número total de descendientes amícticas, mícticas y tasas de mixis obtenidos diariamente en las 17 situaciones experimentales en las que se observó reproducción sexual. Las barras verticales indican los errores típicos de las tasas de mixis.

repetición del experimento a una densidad menor, y en las que se observó un ligero aumento de e_0 en las hembras productoras de descendientes mícticas (H_m) cuando estas se cultivaron a la mayor densidad experimental. (3) Se observa una influencia de la densidad de población sobre la tasa neta de reproducción; así, los valores de R_0 son mayores a la menor densidad ensayada. Esto también puede observarse por inspección de las curvas de fecundidad específica de cada edad, las cuales muestran además que la forma de la curva de la fecundidad es bastante similar para las dos densidades ensayadas. (4) A pesar de la relación reseñada en el punto anterior y de que, como se ha

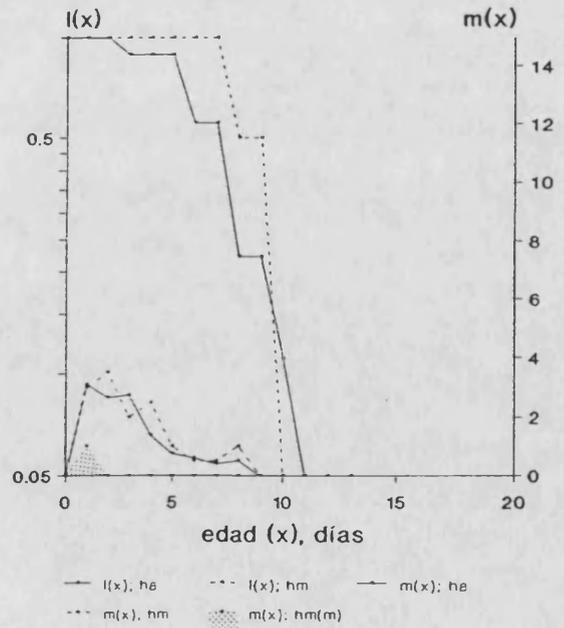
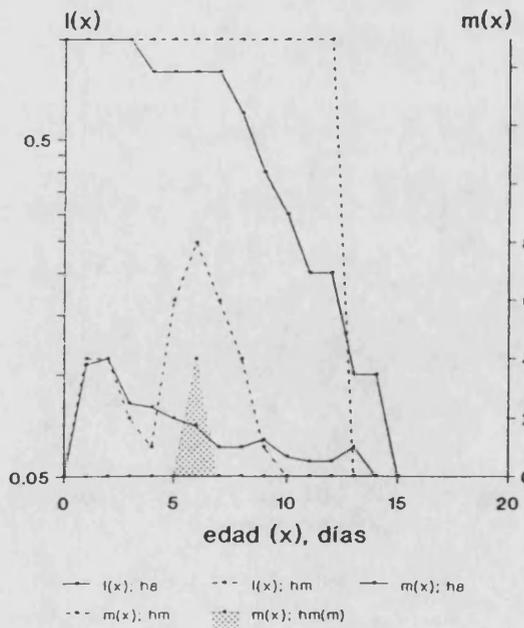
establecido más arriba, las densidades altas generalmente implican mayores tasas de mixis, no existe una relación generalizada entre R_0 y la tasa de mixis (véanse las tablas 8.2 y 8.5), como se comprueba en las siguientes propiedades de los datos: (4a) los valores del coeficiente de correlación, r , entre estos dos parámetros, R_0 y las tasas de mixis, dentro de cada densidad son muy bajos y no son estadísticamente significativos (r para la densidad de 1 hembra/ml= 0.037, $n= 14$; r para la densidad de 5 hembras/ml= 0.370, $n= 14$); (4b) la relación entre R_0 y la densidad se mantiene en las cepas que no presentan reproducción sexual, las cuales muestran la particularidad de que sus R_0 suelen ser bajas, o cuando las cepas no responden positivamente a este factor. (5) El efecto negativo de la densidad sobre los parámetros R_0 y e_0 se conserva en la repetición del experimento realizada con la cepa CU cuando se siguió una pauta de renovación diaria del medio. Sin embargo, la densidad no afecta tan claramente al tiempo de generación de la cohorte G_c . (6) Los valores de los parámetros demográficos para las hembras productoras de descendientes míticas y aquellas que sólo produjeron descendencia amítica son bastante similares y varían aparentemente de forma irregular. (7) Pese a la existencia de cierta variabilidad, los valores para los parámetros demográficos en las distintas cepas son comparables y coinciden con los de otros estudios llevados a cabo con algunas de las cepas (Serra, 1987). Cabe destacar la variabilidad que presentan en los valores para R_0 , G_c y e_0 la cepa CU y sus cepas derivadas.

Figura 8.5. Curvas de supervivencia, $l(x)$, y fecundidad, $m(x)$, específicas de edad de las hembras pertenecientes a las 13 cepas estudiadas en las condiciones de densidad que se indican. Ambos parámetros se han calculado considerando dos grupos distintos dentro de las hembras experimentales: (1) hembras amíticas que únicamente produjeron descendientes amíticas (H_a), (2) hembras amíticas que produjeron descendientes míticas y amíticas. Para este segundo grupo de hembras los dos parámetros poblacionales se calcularon según dos criterios distintos, considerando la totalidad de la descendencia (H_m), y considerando únicamente las descendientes míticas ($H_{m(m)}$).

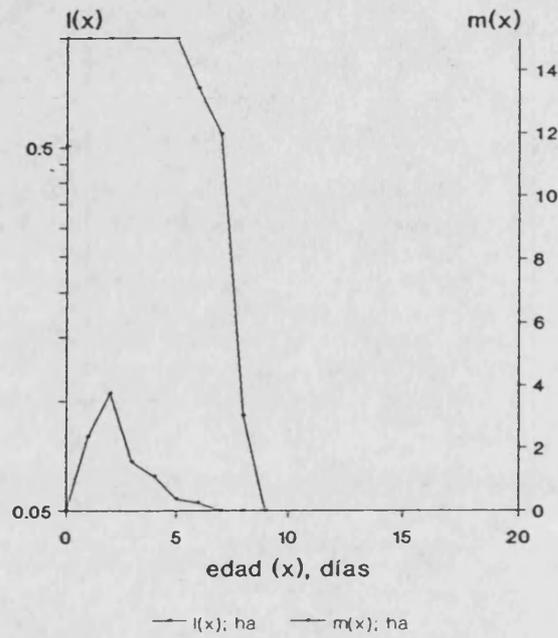
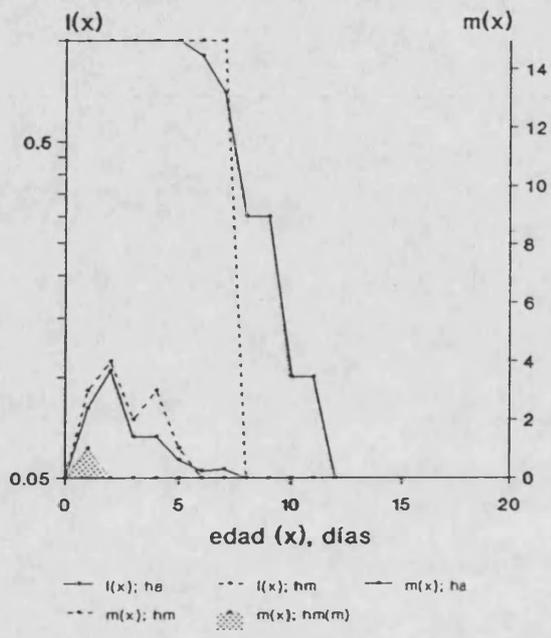
SPO



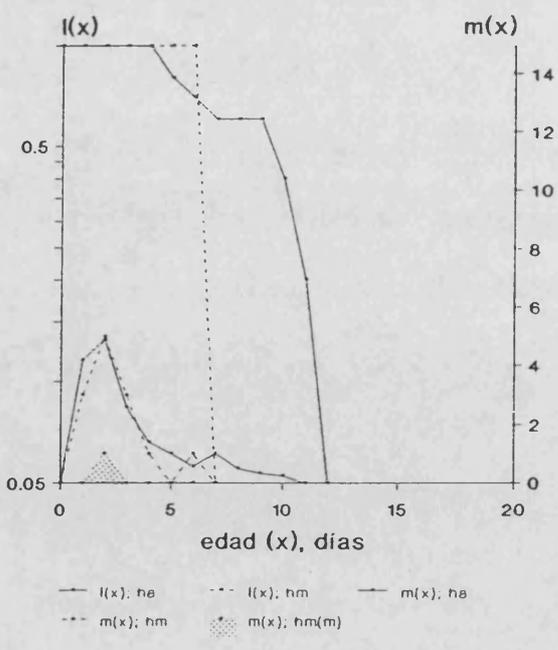
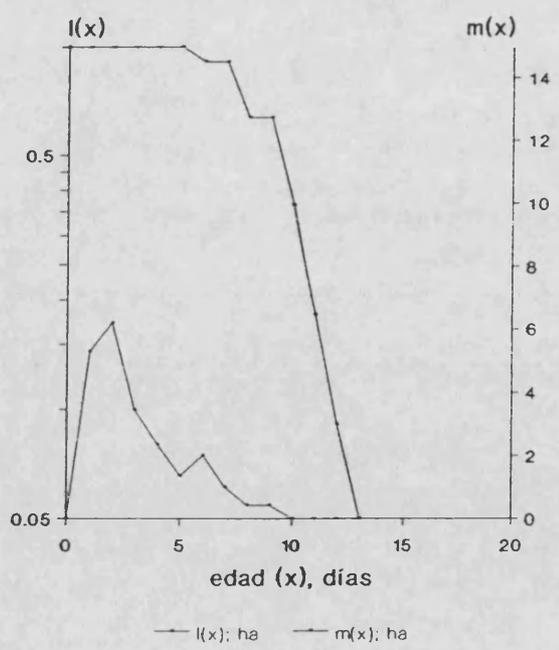
MOJS



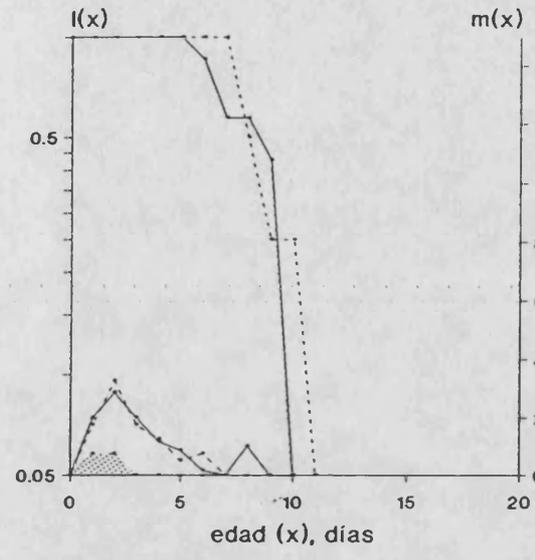
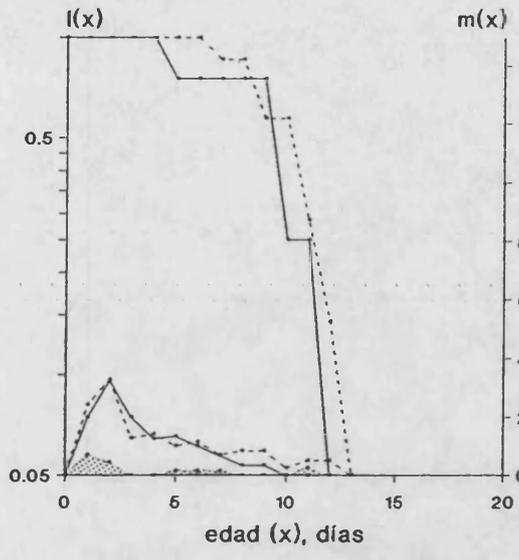
RKL



RKE



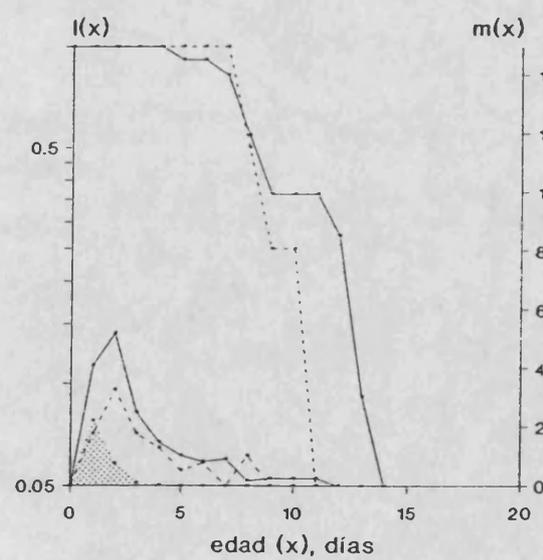
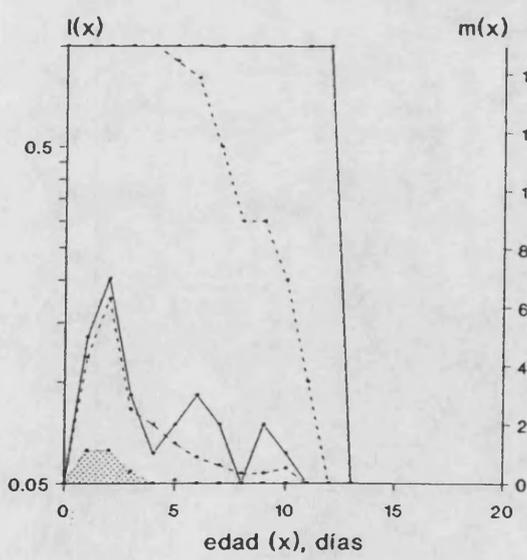
ADN



$l(x); ha$ $l(x); hm$ $m(x); ha$
 $m(x); hm$ $m(x); hm(m)$

$l(x); ha$ $l(x); hm$ $m(x); ha$
 $m(x); hm$ $m(x); hm(m)$

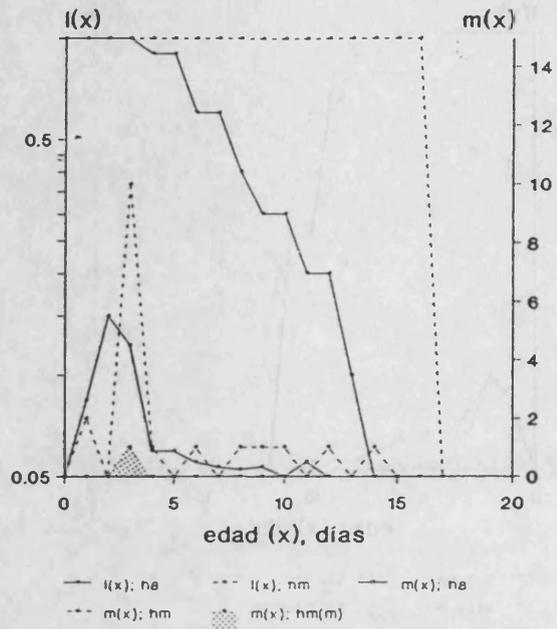
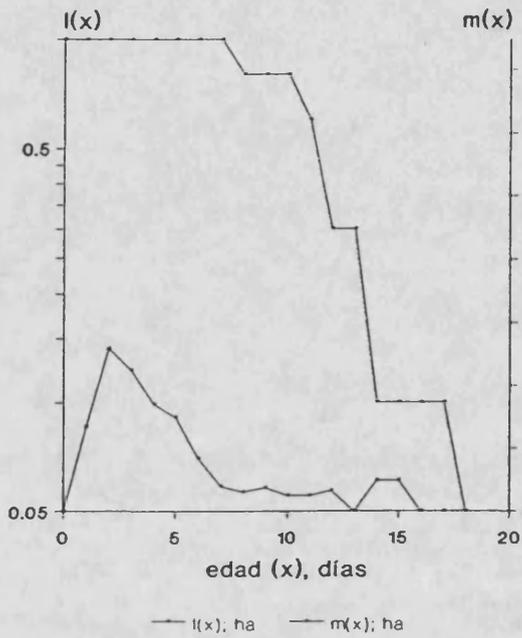
ADN'



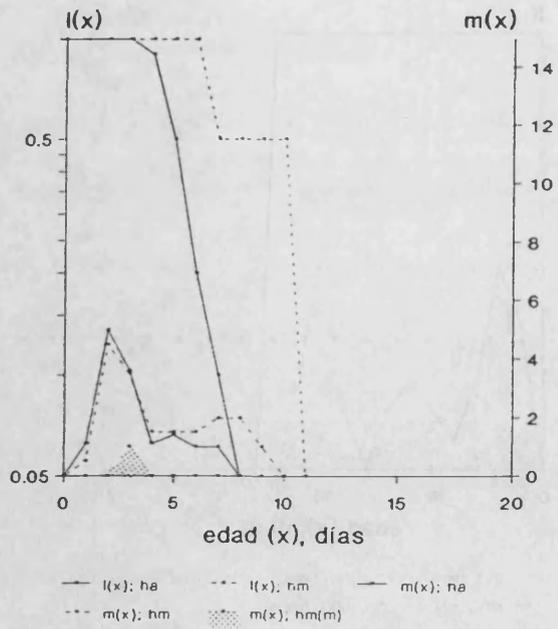
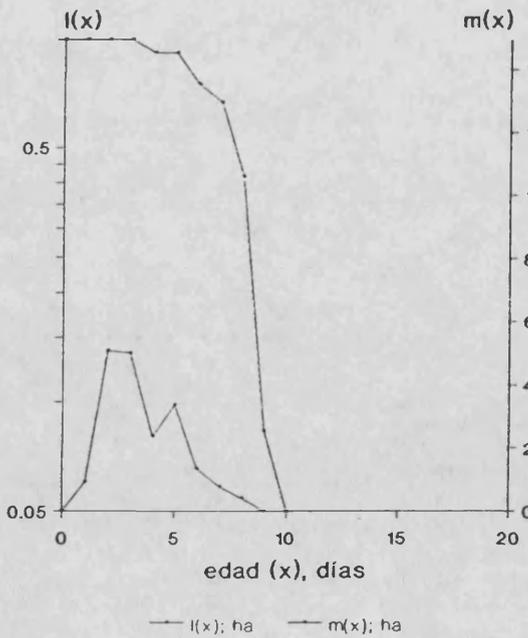
$l(x); ha$ $l(x); hm$ $m(x); ha$
 $m(x); hm$ $m(x); hm(m)$

$l(x); ha$ $l(x); hm$ $m(x); ha$
 $m(x); hm$ $m(x); hm(m)$

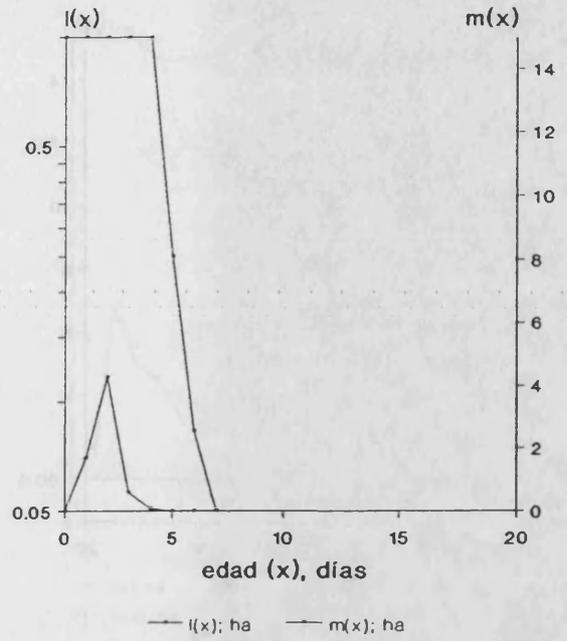
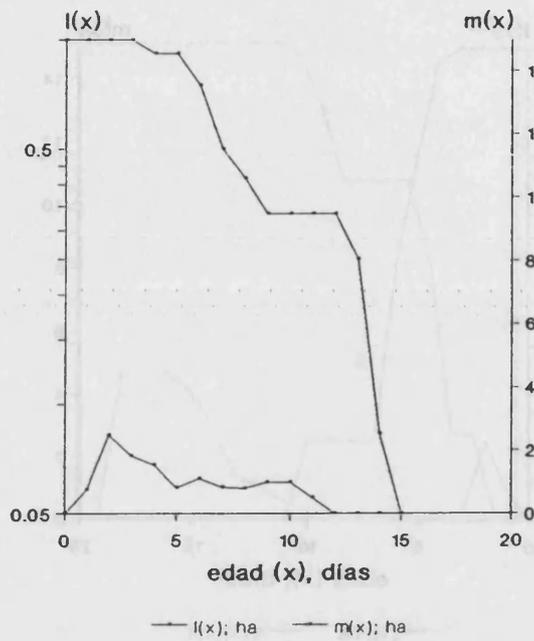
CU



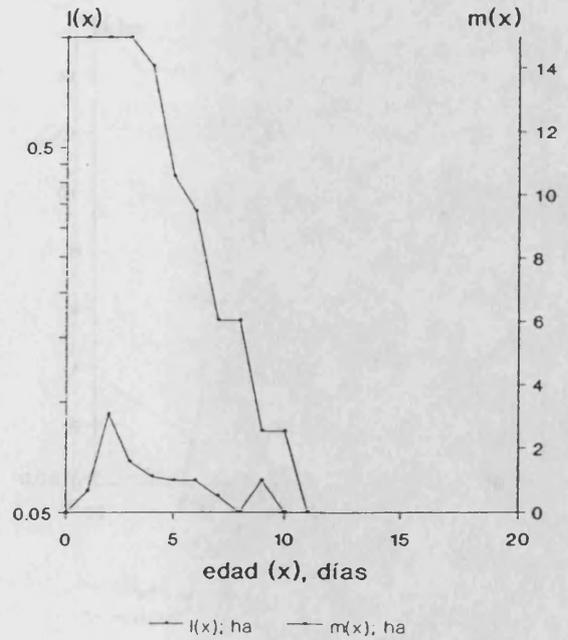
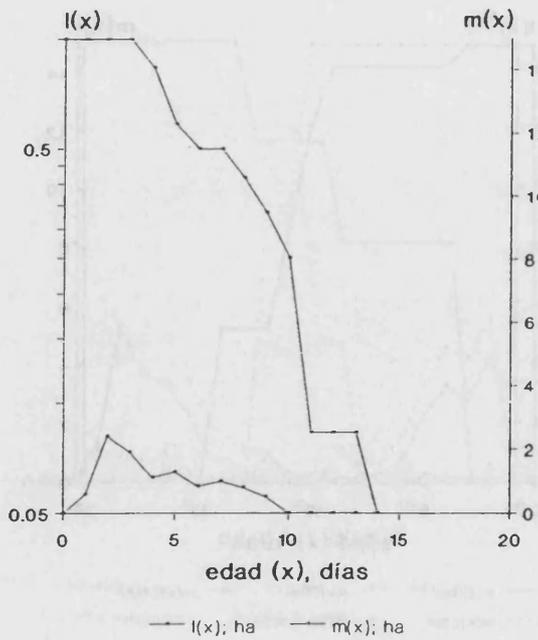
CU1



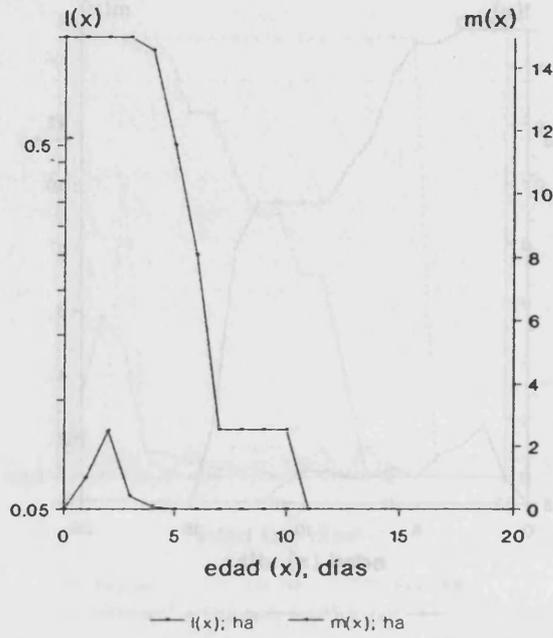
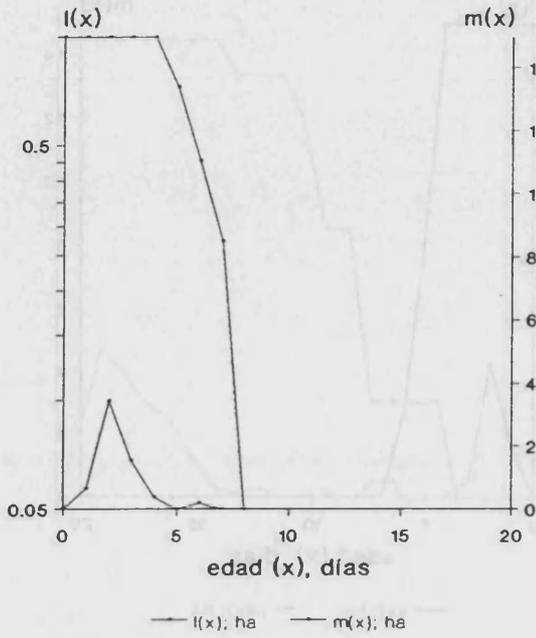
CU2



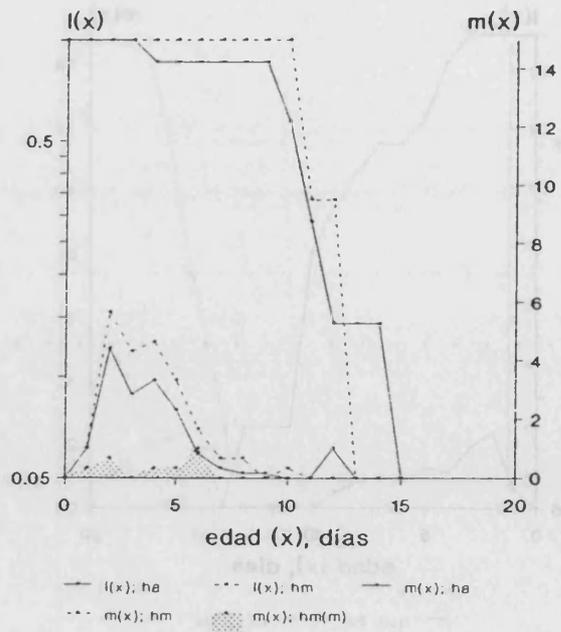
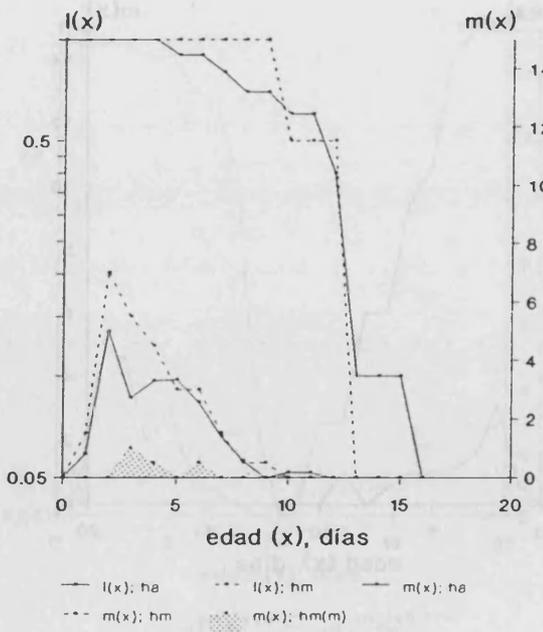
CU3



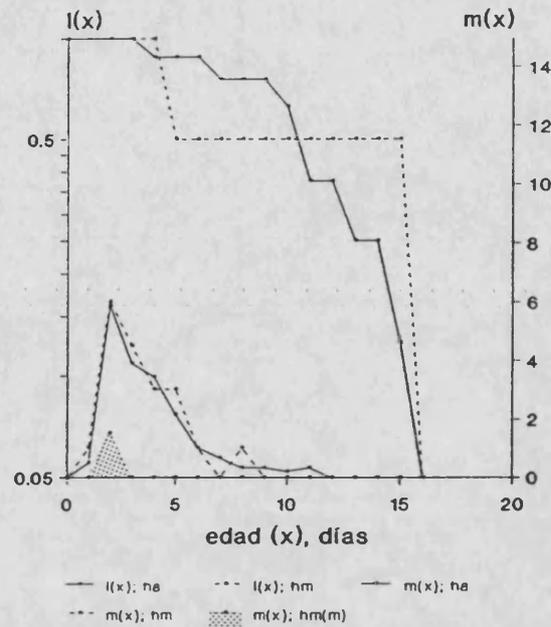
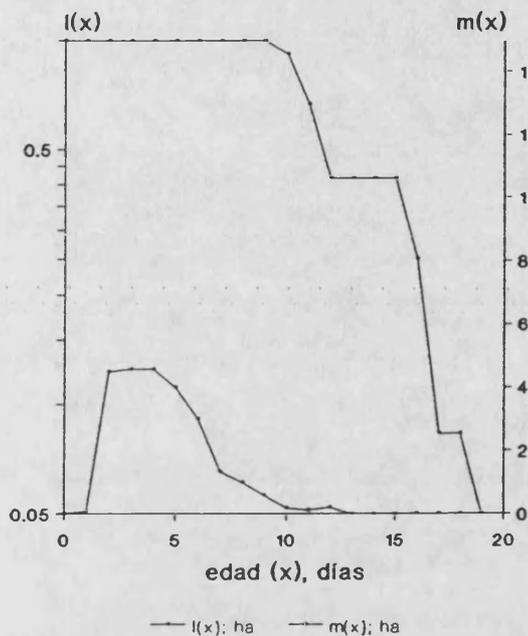
CU4



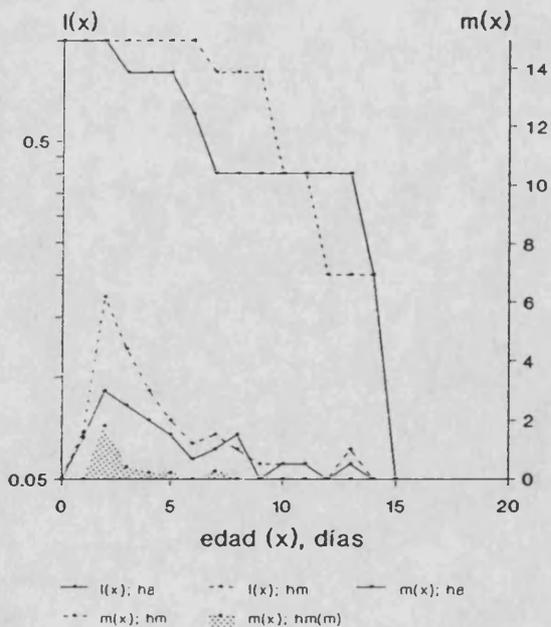
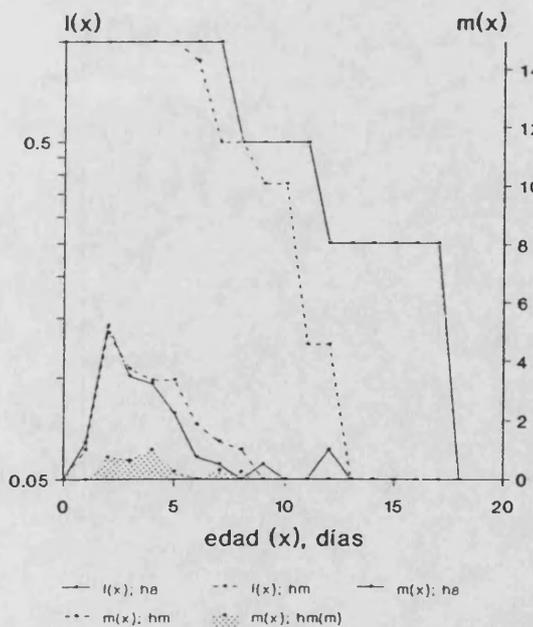
CU5



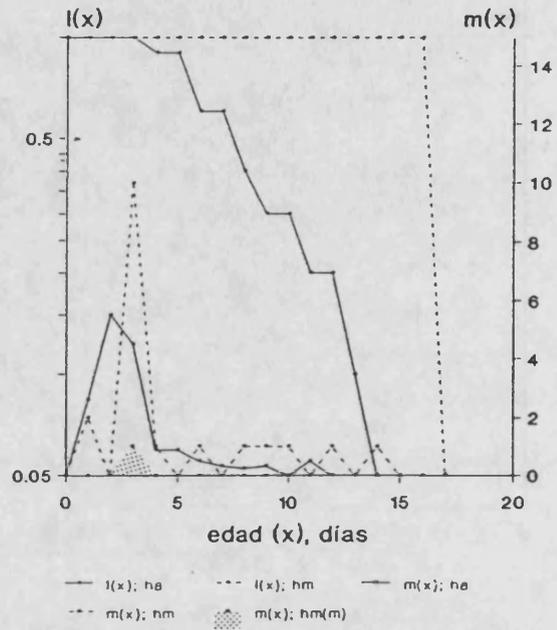
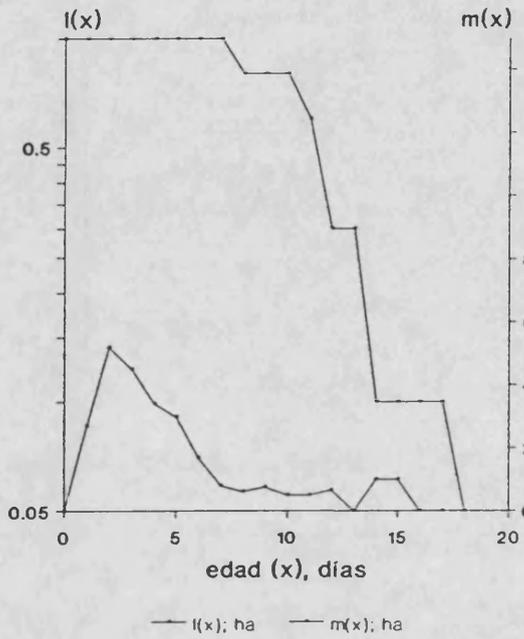
CU6



CU7



CU



CUr

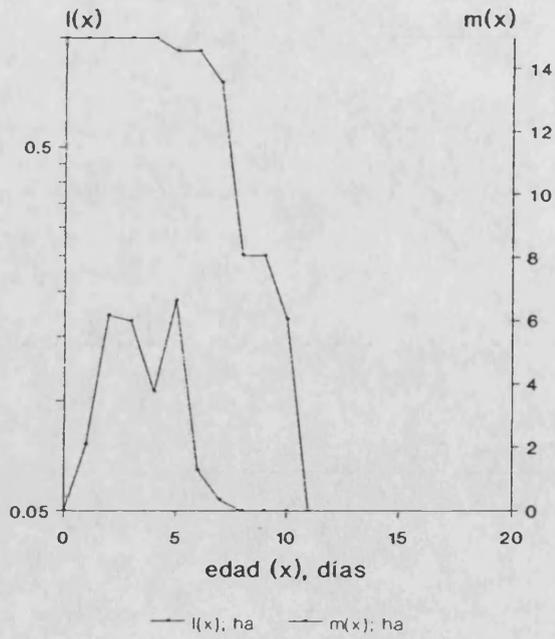
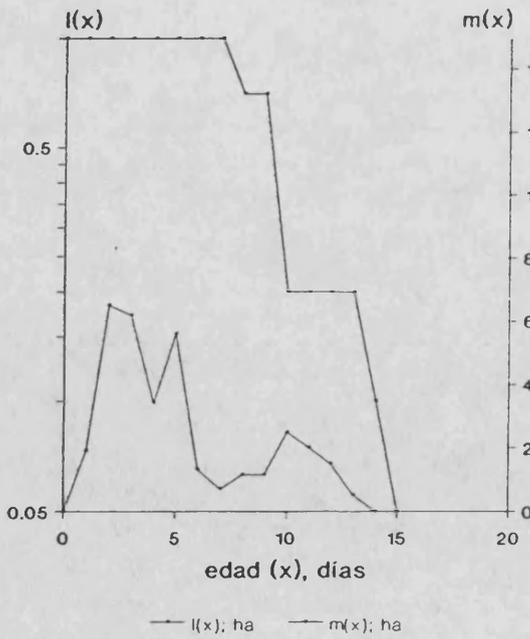


Tabla 8.5. Resultados del análisis demográfico de los datos del estudio sobre el efecto de la densidad de población en 13 cepas de la especie *Brachionus plicatilis* (n : número de descendientes; e_0 : esperanza de vida en el nacimiento; R_0 : tasa neta de reproducción; G_c : tiempo de generación de la cohorte; H_a : hembras productoras únicamente de descendencia amíctica; H_m : hembras productoras de descendientes míticas y amícticas considerando para el cálculo del parámetro el total de la descendencia; $H_{m(m)}$: hembras productoras de descendientes míticas y amícticas considerando para el cálculo del parámetro únicamente la descendencia mítica).

DENSIDAD EXPERIMENTAL									
1 hembra/ml					5 hembras/ml				
n		e_0 (ET)			n		e_0 (ET)		
H_a	H_m	H_a	H_m		H_a	H_m	H_a	H_m	
CLON									
SPO	9	1	7.06 (0.34)	8.50 (1.00)	7	4	5.93 (0.75)	7.00 (1.44)	
MOJS	10	1	8.60 (1.10)	12.50 (1.00)	9	2	6.83 (0.80)	8.50 (1.00)	
ADN	4	7	8.75 (1.49)	10.79 (0.78)	7	4	7.93 (0.65)	8.50 (0.71)	
ADN02	1	10	12.50 (1.00)	7.60 (0.71)	-	11	-	9.13 (0.88)	
RKL	10	1	7.90 (0.56)	7.50 (1.00)	11	0	6.86 (0.31)	-	
RKE	11	-	9.23 (0.62)	-	10	1	8.40 (0.90)	6.50 (1.00)	
CU	10	-	11.50 (0.93)	-	10	1	8.00 (1.04)	16.50 (1.00)	
CU1	12	-	7.25 (0.49)	-	10	2	5.20 (0.37)	8.50 (2.00)	
CU2	12	-	8.67 (1.09)	-	12	-	4.83 (0.19)	-	
CU3	12	-	7.17 (0.96)	-	12	-	5.58 (0.61)	-	
CU4	11	-	5.95 (0.37)	-	12	-	5.50 (0.52)	-	
CU5	10	2	10.40 (1.06)	11.00 (1.50)	7	3	9.93 (1.25)	11.17 (0.67)	
CU6	12	-	13.17 (0.89)	-	8	2	10.38 (1.41)	10.00 (5.50)	
CU7	4	8	11.00 (2.36)	9.38 (0.90)	5	5	8.50 (2.35)	10.30 (1.32)	
Control ^a									
CU	10	-	9.80 (0.76)	-	12	-	7.75 (0.49)	-	

a. Para determinar la influencia de la renovación del medio de cultivo en el efecto de la densidad detectado en el clon CU se realizó una repetición de la

Tabla 8.5. Continuación.

	DENSIDAD EXPERIMENTAL											
	1 hembra/ml						5 hembras/ml					
	R ₀ (ET)			G _c			R ₀ (ET)			G _c		
	H _a	H _m	H _{m(m)}	H _a	H _m	H _{m(m)}	H _a	H _m	H _{m(m)}	H _a	H _m	H _{m(m)}
CLON												
SPO	15.33 (1.67)	17.00 (1.00)	2.00 (1.00)	2.21	2.59	3.50	14.57 (1.17)	16.50 (2.78)	1.50 (0.50)	2.64	2.65	1.33
MOJS	17.60 (2.47)	36.00 (1.00)	4.00 (1.00)	3.63	5.08	6.00	10.78 (1.09)	13.50 (1.50)	1.00 (0.00)	2.64	3.07	1.00
ADN	11.25 (1.44)	13.29 (1.34)	1.71 (0.36)	3.27	4.05	3.33	9.57 (0.57)	9.75 (1.11)	1.50 (0.29)	2.93	3.03	1.50
ADN02	26.00 (1.00)	17.60 (0.79)	2.70 (0.34)	3.92	2.69	1.85	-	15.09 (1.16)	3.00 (0.54)	-	2.83	1.30
RKL	9.90 (1.14)	13.00 (1.00)	1.00 (1.00)	2.55	2.61	1.00	9.27 (0.38)	-	-	2.34	-	-
RKE	21.91 (1.55)	-	-	3.02	-	-	15.50 (0.95)	13.00 (1.00)	1.00 (1.00)	2.79	2.46	2.00
CU	23.50 (1.18)	-	-	3.96	-	-	15.00 (1.03)	19.00 (1.00)	1.00 (1.00)	2.69	5.00	3.00
CU1	17.92 (1.66)	-	-	3.40	-	-	11.70 (0.93)	15.50 (6.50)	1.00 (0.00)	2.68	4.00	3.00
CU2	9.67 (1.69)	-	-	4.07	-	-	6.58 (0.48)	-	-	1.86	-	-
CU3	8.00 (1.61)	-	-	3.59	-	-	7.17 (0.65)	-	-	2.88	-	-
CU4	6.09 (0.56)	-	-	2.33	-	-	4.00 (0.52)	-	-	1.90	-	-
CU5	18.80 (3.08)	27.00 (1.00)	2.00 (1.00)	3.93	3.78	4.00	14.57 (2.82)	22.33 (1.76)	2.67 (0.88)	3.45	3.76	4.00
CU6	24.00 (0.76)	-	-	4.39	-	-	17.25 (2.10)	17.00 (3.00)	1.50 (0.50)	3.53	3.12	2.00
CU7	17.25 (3.47)	20.00 (3.04)	3.00 (0.66)	3.46	3.79	3.79	11.20 (4.86)	21.40 (0.93)	2.80 (0.74)	3.80	3.81	2.86
Control ^a												
CU	28.50 (2.07)	-	-	4.06	-	-	25.50 (0.91)	-	-	3.40	-	-

a. Para determinar la influencia de la renovación del medio de cultivo en el efecto de la densidad detectado en el clon CU se realizó una repetición de la experiencia bajo las mismas condiciones pero renovando el medio de cultivo cada 24 horas.

8.4. DISCUSIÓN

Relación entre la producción de hembras míticas y la densidad de población en la especie *Brachionus plicatilis*

Los resultados de los experimentos realizados en el presente capítulo muestran que la producción de hembras míticas en *Brachionus plicatilis* es un fenómeno dependiente de la densidad. Las hembras amíticas cultivadas aisladamente producen por lo general porcentajes de hembras míticas significativamente mayores en la densidad de 5 hembras/ml que en la densidad de 1 hembra/ml. Estos resultados son consistentes con los encontrados por Gilbert (1963b) en *Brachionus calyciflorus* utilizando un diseño experimental similar. En la especie *B. plicatilis* este efecto positivo de la densidad de población sobre la reproducción sexual ha sido detectado por varios autores utilizando cultivos masivos de laboratorio (Ito, 1960; Pozuelo, 1977; Lubzens *et al.*, 1985; Snell y Boyer, 1988) dentro de un amplio intervalo de densidades de población. Sin embargo, los escasos estudios que han sido realizados con pequeños cultivos en los que el tamaño del grupo de organismos experimentales se encuentra controlado, permitiendo así estudiar de forma más precisa la acción de la densidad poblacional, presentan resultados poco consistentes. Hino e Hirano (1976) trabajando con *Brachionus plicatilis* compararon los porcentajes de descendientes míticas obtenidos a partir de hembras cultivadas de forma agrupada en dos densidades de población, 1 hembra/ml y 5 hembras/ml (valores de densidad que coinciden con los ensayados aquí). Los porcentajes de hembras míticas obtenidos fueron significativamente mayores en la densidad poblacional más elevada, la cual además correspondía al mayor nivel de agrupamiento. Estas experiencias ponen de manifiesto la existencia de un efecto positivo de la densidad poblacional sobre la mixis, pero el diseño experimental utilizado por estos autores no permite separar el efecto de la densidad poblacional *sensu stricto* del posible efecto del agrupamiento. El protocolo experimental utilizado por Pourriot y Rougier (1979), más preciso, permite separar estos dos efectos. Sin embargo, estos autores no lograron poner de manifiesto el efecto de la densidad en las experiencias realizadas con hembras cultivadas de forma aislada pertenecientes a una cepa de esta misma especie, aunque detectaron una intensificación de la reproducción sexual como consecuencia del aumento en el número de individuos cultivados en un volumen constante de medio.

En este contexto, las experiencias realizadas en este capítulo ponen de manifiesto la existencia de un efecto de la densidad de población sobre la reproducción sexual en esta especie sin interferencia del efecto del agrupamiento. No obstante, si se comparan los resultados obtenidos con la cepa CU en estas experiencias y los obtenidos en las experiencias realizadas de forma preliminar con esta misma cepa utilizando el diseño experimental propuesto por Hino e Hirano (1976), se observa que aunque en ambos casos existe un efecto positivo de la densidad, las tasas de mixis son mayores en las hembras agrupadas (experiencias preliminares, tabla 8.1) que en las hembras cultivadas individualmente (tabla 8.2). Puesto que las densidades ensayadas fueron las mismas en ambos casos, las diferencias en los valores de las tasas sugieren la existencia de un efecto del agrupamiento añadido al efecto de la densidad sobre la producción de hembras míticas en las experiencias preliminares. Este efecto, como se comenta más arriba, fue puesto de manifiesto en esta especie por otros autores (Pourriot y Rougier, 1979). La influencia de los efectos de grupo en la respuesta mítica de los rotíferos ha sido considerada como importante por algunos autores (p.e., Snell y Hoff, 1985), aunque en *Brachionus plicatilis* tales efectos únicamente se han considerado en el estudio de Pourriot y Rougier (1979) y parecen manifestarse de forma compleja.

Unas de las evidencias experimentales que han sido consideradas por algunos autores (véase, p.e., Snell y Hoff, 1985) como más convincentes en la demostración de la existencia de efectos de la densidad de población en *B. plicatilis* son las experiencias realizadas con renovación del medio de cultivo (Hino e Hirano, 1976, 1977). Tanto en estos trabajos de Hino e Hirano (1976, 1977), como en el experimento realizado con la cepa CU siguiendo una pauta de renovación del medio de cultivo que se ha presentado aquí, se produce una supresión del efecto de la densidad sobre la mixis (véanse los resultados para CU control en la tabla 8.2). El cambio del medio de cultivo a intervalos de 24 horas suprime de forma efectiva la reproducción sexual en este clon. Sin embargo, la pauta de renovación utilizada por Hino e Hirano (1976, 1977) implica el cambio del medio cada 2 horas, por lo que cabe pensar, aunque estos autores no dan datos acerca de ello, que en la cepa de *Brachionus plicatilis* que ellos estudian es necesaria esta pauta de renovación tan frecuente para conseguir el efecto de supresión de la reproducción sexual.

La disminución de la respuesta sexual con cambios frecuentes del medio de cultivo sugiere fuertemente que la densidad ejerce su efecto a través de algún factor que condiciona el medio de cultivo. La acumulación de una sustancia química en el medio de cultivo liberada por los rotíferos o sintetizada en dicho medio ha sido sugerida por

varios autores como mecanismo explicativo del efecto de la densidad (Gilbert, 1963b, en *B. calyciflorus*; Hino e Hirano, 1976, en *B. plicatilis*). El modo de acción de la densidad de población es objeto de estudio y discusión en el capítulo siguiente.

La densidad de población ejerce también una acción significativa sobre la fecundidad y la duración media de la vida. Los valores de G_c no cambian de forma tan consistente con la densidad como los valores de los restantes parámetros demográficos. Según los resultados del presente estudio, la densidad de población tiene una influencia negativa sobre la tasa neta de reproducción, así como sobre las tasas de fecundidad diarias. Este comportamiento es común a otras cepas de *Brachionus plicatilis* (véase Pourriot y Rougier, 1979) pero difiere del observado por Gilbert (1963b) en una cepa de *Brachionus calyciflorus*, la cual mostró una relación de independencia entre R_0 y densidad poblacional. El efecto negativo de la densidad poblacional sobre R_0 y e_0 se conserva cuando el medio de cultivo se renueva diariamente (véase CU, y CU control en la tabla 8.2) aunque los valores de estos parámetros son más elevados cuando las hembras se transfieren diariamente a un medio fresco que cuando se mantienen a lo largo de su vida en el mismo medio de cultivo. Esto sugiere que el efecto observado de la densidad sobre estos parámetros poblacionales podría deberse a una alteración de las condiciones del medio durante el periodo de cultivo que consecuentemente resulta más intensa en los cultivos más densos, y es debilitada por la pauta de renovación del medio. Estas relaciones entre densidad y parámetros demográficos pueden ser utilizadas para descartar o apoyar hipótesis alternativas. En algunos trabajos antiguos (Buchner, 1941b) se propone una hipótesis explicativa de la naturaleza del efecto de la densidad según la cual la aparición de mixis en las poblaciones densas se debe a la "vitalidad de los rotíferos", es decir se encuentra relacionada con las altas tasas de crecimiento poblacional. Sin embargo, Moro en su trabajo de 1915 señala que la bisexualidad puede presentarse tanto en condiciones que aumenten la fecundidad como en condiciones que la reduzcan. Los resultados de Gilbert (1963b) en *B. calyciflorus* son consistentes con esta idea, ya que le permiten concluir que las tasas de mixis son dependientes de la densidad poblacional pero no pueden explicarse en términos de variaciones en las tasas de reproducción. La influencia negativa de la densidad de población sobre las tasas netas de reproducción y la ausencia de relación entre las tasas de mixis y este parámetro (R_0) detectadas en el presente trabajo permiten concluir, de acuerdo con Gilbert (1963b), que la aparición de mayores proporciones de hembras míticas a la densidad poblacional más alta no puede interpretarse como directamente asociada a mayores tasas netas de reproducción.

La consideración de Buchner (1941b), según la cual las altas tasas de reproducción favorecen la bisexualidad y las bajas tasas de reproducción tienden a inhibirla, ha tomado fuerza en los últimos años debido a los resultados de algunos trabajos realizados con cultivos masivos de *B. plicatilis* en los que se detecta una relación entre las tasas de crecimiento poblacional (r) y las tasas de reproducción sexual (Lubzens *et al.*, 1985; Snell y Boyer, 1988). Estos autores sugieren que la reproducción sexual en *B. plicatilis* se produce cuando la tasa de crecimiento poblacional es alta, la cual se considera representativa de la tasa de reproducción partenogenética. Esta asociación entre mixis y tasa de reproducción resulta inconsistente con los resultados de los autores que trabajan con cultivos individuales de diversas especies de rotíferos y en los que se ha detectado una relación de independencia entre las tasas de mixis y las tasas de reproducción (Gilbert, 1963b en *B. calyciflorus*; los presentados aquí en *B. plicatilis*; Rougier *et al.*, 1977 y Pourriot *et al.*, 1987 en *B. rubens*; Gilbert, 1968 en *Asplancha brightwelli*; Pourriot y Clément, 1975 y Clément y Pourriot, 1977 en *Notommata copeus*). La divergencia de resultados puede explicarse por el uso de diferentes diseños experimentales. De hecho, en las discusiones de estos trabajos no se considera la importancia que los efectos de la estructura en clases de edad de la población, inherente a los cultivos masivos, pueden tener sobre la reproducción sexual, máxime cuando se postula la existencia de cambios dependientes de la edad en la tasa de mixis (Rougier y Pourriot, 1977; Pourriot y Rougier, 1977; véase también el apartado anterior de Resultados). En efecto, cuando la población se encuentra en fase de crecimiento exponencial, en su composición en clases de edad existe un predominio de individuos jóvenes que, según los trabajos que se citan arriba, son los que presentan tasas de mixis más altas. Además, a mayor tasa de crecimiento exponencial, mayor tenderá a ser el predominio de los jóvenes, comportando así una tendencia al incremento de la tasa de mixis poblacional.

El efecto del genotipo materno sobre la respuesta mítica a la densidad en *Brachionus plicatilis*

Los valores de descendientes míticas y amíticas encontrados para las 13 cepas estudiadas son indicativos de la existencia de diferencias entre ellas en la respuesta mítica a la densidad. Los distintos clones responden con diferentes proporciones de descendientes míticas. Incluso alguno de los clones no presenta mixis en las condiciones exploradas aquí. Dado que estas diferencias se manifiestan dentro de unas

mismas condiciones experimentales, probablemente sean debidas a diferencias genéticas en la capacidad para expresar la mixis. No se puede descartar enteramente que algunas de las diferencias entre cepas sean debidas a la acción de factores difíciles de controlar, como la calidad del cultivo de algas. No obstante, las diferencias se mantienen entre cepas ensayadas en un mismo bloque experimental. La variabilidad interclónica en la respuesta mítica y su posible origen genético han sido puestos de manifiesto en otros estudios sobre diversos aspectos de la reproducción sexual en *Brachionus plicatilis* (Hino e Hirano, 1977; Snell y Hoff, 1985; Lubzens, 1989), así como en otras especies de este género y de otros pertenecientes a los rotíferos monogonontes (véase la revisión bibliográfica presentada en el capítulo 7).

Los datos presentados aquí también muestran que las condiciones de densidad necesarias para la producción de hembras míticas no son las mismas para todas las cepas estudiadas. Así, algunas de las cepas no presentan reproducción sexual en las condiciones ensayadas, y otras no responden positivamente al aumento de la densidad. La imposibilidad de detectar una relación entre la reproducción sexual y la densidad en algunas de las cepas puede deberse a que éstas presenten diferencias en sus valores umbrales de densidad para la producción de hembras míticas. Snell y Boyer (1988) determinaron un valor umbral de 0.147 hembras/ml para la producción de hembras míticas en su cepa de *B. plicatilis*, un valor mucho menor que la menor densidad experimentada en el presente trabajo (1 hembra/ml). Por lo tanto, si alguna de las cepas estudiadas aquí presentara un valor umbral muy bajo, su mantenimiento durante el cultivo preexperimental a un valor de densidad poblacional superior a este valor umbral podría afectar a su respuesta a la densidad durante el cultivo experimental. Esta idea resulta apoyada por los resultados del experimento realizado con la cepa ADN. Esta es una de las cepas que no presentó respuesta positiva a la densidad para las condiciones generales del ensayo. Sin embargo, utilizando una densidad preexperimental menor (<0.2 hembras/ml) y un intervalo de densidades experimentales con valores más bajos (0.2 hembras/ml y 1 hembra/ml), la cepa ADN mostró una respuesta mítica significativamente positiva a la densidad. Así, una posible explicación es que las cepas tienen diferentes niveles de sensibilidad en su respuesta mítica a los factores ambientales y la historia previa de los neonatos utilizados en los experimentos puede afectar las respuestas de estos individuos a la densidad de población.

El hecho de que algunas cepas no presenten reproducción sexual puede deberse a que estas cepas carezcan de capacidad para reproducirse sexualmente o a que las condiciones no sean las adecuadas. Es posible que estas cepas posean umbrales más

altos de densidad para su reproducción sexual, es decir que tengan una baja sensibilidad al factor inductor de la sexualidad; la densidad de población en este caso. En el estudio realizado por Hino e Hirano (1977) se encontraron también muchas diferencias en la frecuencia de producción de hembras míticas de 20 cepas derivadas de huevos durables. Dentro de las mismas condiciones experimentales, la proporción de hembras míticas fue variable entre cepas, no detectándose producción de hembras míticas en una de ellas.

El grado de variabilidad en la respuesta mítica a la densidad entre las cepas derivadas de huevos durables de la cepa CU es similar al de las restantes cepas, no emparentadas con CU. Este resultado pone de manifiesto la capacidad de generar variabilidad genética que tiene el proceso de recombinación durante la reproducción sexual y la gran varianza mantenida en el genoma de la cepa CU. Los estudios de las tasas de mixis realizados en clones derivados de huevos durables resultantes de la fertilización intraclónica de cepas con distintas tasas de mixis sugieren una base poligénica para la capacidad de reaccionar a los factores promotores de la mixis (Buchner, 1977). Dicha generación de variabilidad resulta patente también en otros rasgos vitales de las cepas derivadas, tal y como ponen de manifiesto los valores de los parámetros poblacionales. Estos resultados coinciden con los de Hino e Hirano (1977) y Lubzens (1989) en *Brachionus plicatilis*, y con los de Gilbert (1983c) en *Asplanchna brightwelli*, quienes encontraron una gran variación entre los niveles de mixis de las cepas derivadas de una misma cepa parental. Los resultados presentados aquí, junto con los de estos autores, muestran que los cultivos iniciados a partir de huevos durables pueden ser muy variables en cuanto a sus características reproductivas y por lo tanto no resulta muy adecuado el uso de individuos procedentes de huevos sexuales para realizar repeticiones dentro de un mismo diseño experimental, uso que ha sido practicado por algunos autores (Hino e Hirano, 1977; Snell y Boyer, 1988). Además, los resultados presentados aquí permiten evaluar la variabilidad generada por recombinación como equivalente a la que existe entre cepas de orígenes muy distintos.

En conjunto, los valores de las tasas de mixis que se han encontrado son bastante bajos cuando se comparan con los reseñados para *Brachionus plicatilis* en la bibliografía (véase la recopilación realizada por Snell, 1987, y el trabajo de Hawigara e Hino, 1989). En la mayoría de estos estudios no se emplean diseños experimentales comparables a los utilizados aquí y por lo tanto sólo algunos de ellos sirven de referencia para los resultados obtenidos. Las tasas de mixis encontradas por Pourriot y Rougier (1979) tienen un valor similar al de la mayor tasa encontrada en el presente trabajo, la

correspondiente a la cepa CU7 (0.121 y 0.106 son, respectivamente, los valores de la tasa de mixis para la cepa estudiada por estos autores y para la cepa CU7). El diseño experimental empleado por Hino e Hirano (1976) coincide con el de las experiencias preliminares realizadas aquí. No obstante, también en este caso las tasas de mixis de la cepa CU son más bajas que las detectadas por estos autores. Así, las tasas de mixis para CU en la mayor densidad poblacional son comparables a las obtenidas en la cepa estudiada por Hino e Hirano (1976) cultivada en su menor densidad experimental. Las tasas de mixis para RKE y RKL, las dos cepas cedidas por A. Ruttner-Kolisko son menores que las reseñadas por esta autora en su trabajo de 1985 (0.03 y 0.01 respectivamente), aunque no se indican las condiciones en las cuales fueron obtenidas estas tasas.

Estas divergencias cuantitativas de la respuesta mítica a la densidad observadas en los resultados de distintos autores se podrían explicar como una consecuencia de diferencias genéticas entre las distintas cepas de una misma especie o de algunos aspectos metodológicos de los diferentes experimentos. Además, en el caso de las cepas mantenidas en el laboratorio, estas diferencias podrían verse acrecentadas por el debilitamiento de la respuesta mítica que, según sugieren algunos autores (Hino e Hirano, 1976; Rougier y Pourriot, 1977; Ruttner-Kolisko, 1985; Buchner, 1977, 1987), se produce tras largos periodos de cultivo masivo en el laboratorio. Este debilitamiento de la capacidad para reaccionar al factor promotor de la mixis, la densidad de población en este caso, podría haber afectado la respuesta de algunas de las cepas que se han estudiado en el presente trabajo y que se habían mantenido durante varios años en cultivos de laboratorio. Las condiciones de cultivo en el laboratorio, tal y como se indicó en el capítulo 7, pueden implicar una selección de las tasas de mixis bajas. Bajo las condiciones estables de los cultivos de laboratorio, por lo general los huevos durables se eliminan cuando se transfiere la cepa a un medio nuevo, a excepción de los que eclosionan espontáneamente, lo cual constituye un suceso raro en estas condiciones. En estas circunstancias, si en la población existen individuos con menor capacidad heredable para la reproducción sexual, éstos acabarán dominando produciéndose la citada selección a favor de las bajas tasas de mixis. Una explicación similar ha sido sugerida también por Hino e Hirano (1976).

Sin embargo, las bajas tasas de mixis en las cepas derivadas que se han estudiado aquí son difíciles de explicar como el resultado de una selección genética durante los largos periodos de cultivo en el laboratorio, ya que estas cepas fueron mantenidas poco tiempo en cultivo antes de su uso en los experimentos. Algunos autores han detectado un

bloqueo de la reproducción sexual durante las primeras generaciones de algunas de las hembras derivadas de huevos durables (Hino e Hirano, 1977; Gilbert, 1983c; Hawigara e Hino, 1989). Este fenómeno se ha interpretado como un mecanismo para asegurar el crecimiento de la población, vía reproducción asexual, cuando se produce la eclosión de los huevos durables. No obstante, ésta no es una explicación pausable en este caso puesto que el número de generaciones entre la eclosión del huevo y el uso de la cepa generada a partir de él en los experimentos presentados fue el suficiente como para asegurar la pérdida del posible bloqueo de la sexualidad. Según los resultados de Hino e Hirano (1977) un 70% de las cepas derivadas de huevos durables comienzan a producir descendientes míticas antes de la octava generación. Una posible explicación para los relativamente bajos valores de descendientes míticas producidas por las cepas derivadas de huevos durables de la cepa CU podría fundamentarse en dos aspectos. En primer lugar, los valores de las tasas de mixis de las cepas derivadas deben de estar condicionadas por su procedencia vía fecundación intraclónica de una cepa con tasa de mixis baja. En segundo lugar, según un estudio realizado por Hagiwara e Hino (1989), las condiciones externas durante el periodo de latencia y la incubación de los huevos durables afectan las características reproductivas de los clones derivados de ellos. Los resultados del citado estudio mostraron que hay relación entre las condiciones a las que se someten los huevos durables durante el periodo de latencia y las tasas de mixis que presentan las estirpes fundadas por dichos huevos. Según estos autores los huevos durables que han experimentado como condiciones inhibitorias 4°C y oscuridad (las utilizadas para los huevos durables de CU), fundan cepas con menores tasas de mixis, mientras que aquellos que se incuban inmediatamente después de su formación en las mismas condiciones en que se originaron dan lugar a clones con tasas de mixis más altas. Estos mecanismos podrían controlar la dinámica poblacional de *Brachionus plicatilis* en la naturaleza. Si los huevos durables del sedimento eclosionan tras un periodo invernal de diapausa, los clones derivados experimentarían un rápido crecimiento poblacional. Contrariamente, si los huevos eclosionan sin experimentar un periodo de inhibición los clones tienen altas tasas de mixis y producen un gran número de huevos durables que permitirán el restablecimiento de la población en la siguiente estación.

Influencia de la edad de las hembras parentales sobre el tipo de hembra descendiente

La aparición de descendientes míticas entre la progenie de las hembras de *Brachionus plicatilis* no es constante a lo largo del periodo reproductivo de las hembras de esta especie. Los resultados del presente estudio indican que se producen cambios dependientes del tiempo de cultivo en la tasa de mixis de *Brachionus plicatilis*.

Los cambios de las tasas de mixis en relación con el tiempo de cultivo de las hembras experimentales dependen de la cepa a la que éstas pertenecen y de las condiciones de densidad en las que han sido cultivadas. No obstante, considerando globalmente los resultados, el patrón más general que se ha encontrado es aquél en el que la mayor proporción de nacimientos de hembras míticas se produce durante la primera parte del periodo reproductivo de las madres y va disminuyendo a lo largo del periodo de cultivo. Este patrón de disminución temporal de las tasas de mixis se mantiene independientemente del criterio utilizado para la asignación de las edades de las hembras a las tres clases de edad establecidas, con la única excepción del criterio utilizado en el análisis de frecuencias (criterio 4) que es el más conservativo y favorece la no detección de diferencias entre las clases 2 y 3.

Los cambios en las proporciones de hijas míticas asociados al tiempo de cultivo podrían atribuirse en principio a distintos fenómenos: (1) la existencia, de acuerdo con algunas de las hipótesis que tratan de explicar el efecto de la densidad, de un autocondicionamiento del medio de cultivo ya que éste no se renueva durante el experimento; (2) la influencia de cambios en las características nutricionales del medio (cambios cualitativos o cuantitativos de las algas utilizadas como alimento); (3) el efecto de la edad materna sobre la frecuencia de aparición de los dos tipos de hembras descendientes. Obsérvese que el primer fenómeno para ser relevante a lo que se está discutiendo requiere tanto de la citada hipótesis del efecto de la densidad como de otra adicional, a saber, que la sensibilidad de la hembra al efecto de la densidad no se pierde con la edad.

En el caso de que el patrón observado fuera la consecuencia del autocondicionamiento del medio como efecto de la densidad cabría esperar un aumento progresivo de las tasas de mixis, lo cual es justamente el patrón contrario al que en general se ha observado, aunque en algunas de las cepas podría producirse un efecto de este tipo. Por lo tanto, de existir un efecto de autocondicionamiento del medio en los experimentos aquí desarrollados, éste sería suficientemente débil como para quedar

enmascarado por otros procesos, o iría acompañado de una disminución en la sensibilidad de las hembras con la edad.

El efecto de cambios en el alimento ha sido invocado para explicar variaciones temporales en las tasas de mixis durante el cultivo individual de rotíferos por Lubzens y Minkoff (1988) quienes encontraron una relación entre mixis y tiempo de cultivo marcadamente diferente a la encontrada aquí. En sus resultados, las tasas de mixis siguen una curva unimodal cuyo valor máximo coincide con la parte media del periodo reproductivo de las hembras, y luego disminuyen lentamente. El patrón encontrado aquí tampoco coincide con ninguno de los complejos patrones observados por estos autores al variar las condiciones de cultivo (renovación diaria del medio y uso de alimento envejecido). Lubzens y Minkoff (1988), considerando el conjunto de sus experimentos, concluyeron que el patrón unimodal observado en medio confinado era el resultado de un efecto del envejecimiento de las algas utilizadas como alimento sobre la reproducción sexual. Esto explicaría únicamente la fase decreciente de la tasa de mixis con la edad observada por estos autores. No parece posible aplicar una argumentación parecida a los resultados encontrados en el presente trabajo. En primer lugar, las diferencias entre los patrones reseñados aquí y por los autores citados deben prevenir contra cualquier aplicación directa de su explicación. Además y más crucialmente, no se observó envejecimiento algal, antes al contrario, dominó el crecimiento durante los ensayos.

Por lo expuesto, la explicación más pausable para la variación observada es la existencia de un efecto de la edad materna semejante al hipotetizado en otras especies de este género, *B. calyciflorus* y *B. rubens* (Pourriot y Rougier, 1976, 1977; Rougier y Pourriot, 1977), donde las mayores tasas de mixis se producen durante la parte inicial del periodo de reproducción. En estas dos especies se ha estudiado intensivamente el efecto de la edad materna en diversas condiciones de cultivo. Tanto en medio confinado como en medio renovado la producción diaria de hembras míticas, que es muy alta al principio, disminuye rápida y progresivamente durante la vida de las hembras.

Este patrón de disminución de la proporción de hembras míticas pone en relación los ritmos de reproducción sexual con el proceso de envejecimiento de las hembras, las cuales al final de su vida únicamente producen descendientes amíticas. La edad materna debe considerarse pues como un factor interno que controla la producción de hembras míticas, modulando el efecto de otros factores externos tales como la densidad poblacional. La existencia de cambios dependientes de la edad en las tasas de mixis tiene implicaciones importantes a nivel poblacional ya que ocasionaría modificaciones de la

tasa de mixis poblacional a lo largo del tiempo dependiendo de cómo cambiara la estructura de edad de la población.

9. LA ACCIÓN DE LA DENSIDAD POBLACIONAL SOBRE LA MIXIS A TRAVÉS DEL CONDICIONAMIENTO DEL MEDIO DE CULTIVO

9.1. INTRODUCCIÓN

Los organismos partenogenéticos cíclicos, mediante la combinación de la reproducción sexual y asexual en sus ciclos vitales pueden beneficiarse de las ventajas de ambos sistemas de reproducción (Maynard-Smith, 1978; Bell, 1982). Sin embargo, esta opción es relativamente rara entre los metazoos (Hebert, 1987) lo cual sugiere que la partenogénesis cíclica puede implicar en ocasiones problemas especiales. Lynch y Grabel (1983) mencionan tres posibles obstáculos en la adopción y mantenimiento de este sistema de reproducción: la existencia de barreras citogenéticas extremadamente estrictas, la aparición temprana de constricciones evolutivas, y la interferencia con los organismos partenogenéticos obligados derivados secundariamente. Además, es posible que el aumento de complejidad en el ciclo vital que implica la partenogénesis cíclica constituya por sí mismo un obstáculo, puesto que un ciclo de vida que emplea dos modos de reproducción debe ser necesariamente más complicado que cualquiera de las dos alternativas (Hobaek y Larsson, 1990).

Los organismos partenogenéticos cíclicos deben hacer en el momento oportuno y de forma correcta el cambio de la reproducción asexual a la sexual basado en estímulos ambientales. Durante este cambio, su proporción sexual secundaria debe variar de 0 a 0.5 si la inversión de los padres en descendientes de ambos sexos es la misma (Fisher, 1930; es más, como en el caso de los rotíferos la producción de un macho probablemente cueste menos que la de una hembra, el valor final deberá ser mayor que 0.5). La maduración de la progenie masculina debe sincronizarse con la producción de huevos sexuales para asegurar la fertilización de los mismos. Además en algunos grupos de partenogenéticos cíclicos, como es el caso de los rotíferos, la fase sexual del ciclo vital se encuentra asociada con la diapausa, *i.e.*, con la formación de huevos de resistencia, y en ocasiones precede a un periodo adverso en el que la supervivencia resulta improbable de otra forma. Bajo estas circunstancias, el momento para el inicio de los procesos sexuales resulta particularmente crítico, ya que estos deben completarse mientras que el hábitat todavía permite el crecimiento y la producción de huevos. Empezar demasiado pronto implica una pérdida de crecimiento potencial de la población y como consecuencia una escasa producción de huevos durables. Retrasar demasiado el

cambio puede imposibilitar el que la formación de huevos durables concluya con éxito. Por lo tanto en esta fase parece inevitable la existencia de una fuerte selección para el momento óptimo del cambio (veáse el capítulo 7, y en particular el apartado 7.5). La importancia de que el cambio se produzca en el momento oportuno dependerá de la probabilidad de sobrevivir el periodo crítico sin diapausa.

En los rotíferos los huevos latentes son normalmente sexuales, y requieren del proceso de fertilización. Por contra, los huevos diploides partenogenéticos se desarrollan directamente en hembras que pueden ser de dos tipos (mícticas y amícticas). La producción de hembras mícticas es el proceso inicial de la fase de reproducción sexual. En el cambio de la fase de reproducción asexual a la fase de reproducción sexual se han implicado tanto factores externos como internos (véanse los capítulos 7 y 8). Tal y como se ha puesto de manifiesto en el capítulo 8 del presente trabajo la densidad de población es un componente importante en el desencadenamiento de la reproducción sexual, ya que se trata del factor relacionado de forma más consistente con la sexualidad en el género *Brachionus*, tanto en cultivos de laboratorio (Ito, 1960; Gilbert, 1963b, 1977b; Hino y Hirano, 1976; Pozuelo, 1977; Pourriot y Clément, 1981; Snell y Boyer, 1988) como en poblaciones naturales (Buchner, 1941b; Wesenberg-Lund, 1930; Ito y Iwai, 1958; Bogoslavsky, 1963) y naturales manipuladas (Miracle y Guiset, 1977).

El modo de acción de la densidad de población en los cultivos de *Brachionus* ha sido tentativamente atribuido a la acumulación de alguna sustancia liberada en el medio de cultivo por los propios rotíferos (Gilbert, 1963, 1977b; Hino y Hirano, 1976), aunque no se ha llevado a cabo una demostración directa de la existencia de tal sustancia.

Los experimentos que se describen a continuación fueron diseñados para determinar si el estímulo proporcionado por el hacinamiento para la producción de hembras mícticas en la especie *Brachionus plicatilis* era una señal mediada químicamente. Es decir, si efectivamente la densidad poblacional ejercía un efecto sobre la reproducción sexual a través de algún factor que condicionaba el medio de cultivo. La aproximación realizada en el presente estudio consistió en probar si el medio de cultivo previamente condicionado presentaba propiedades inductoras sobre la producción de hembras mícticas equivalentes a las de las hembras vivas.

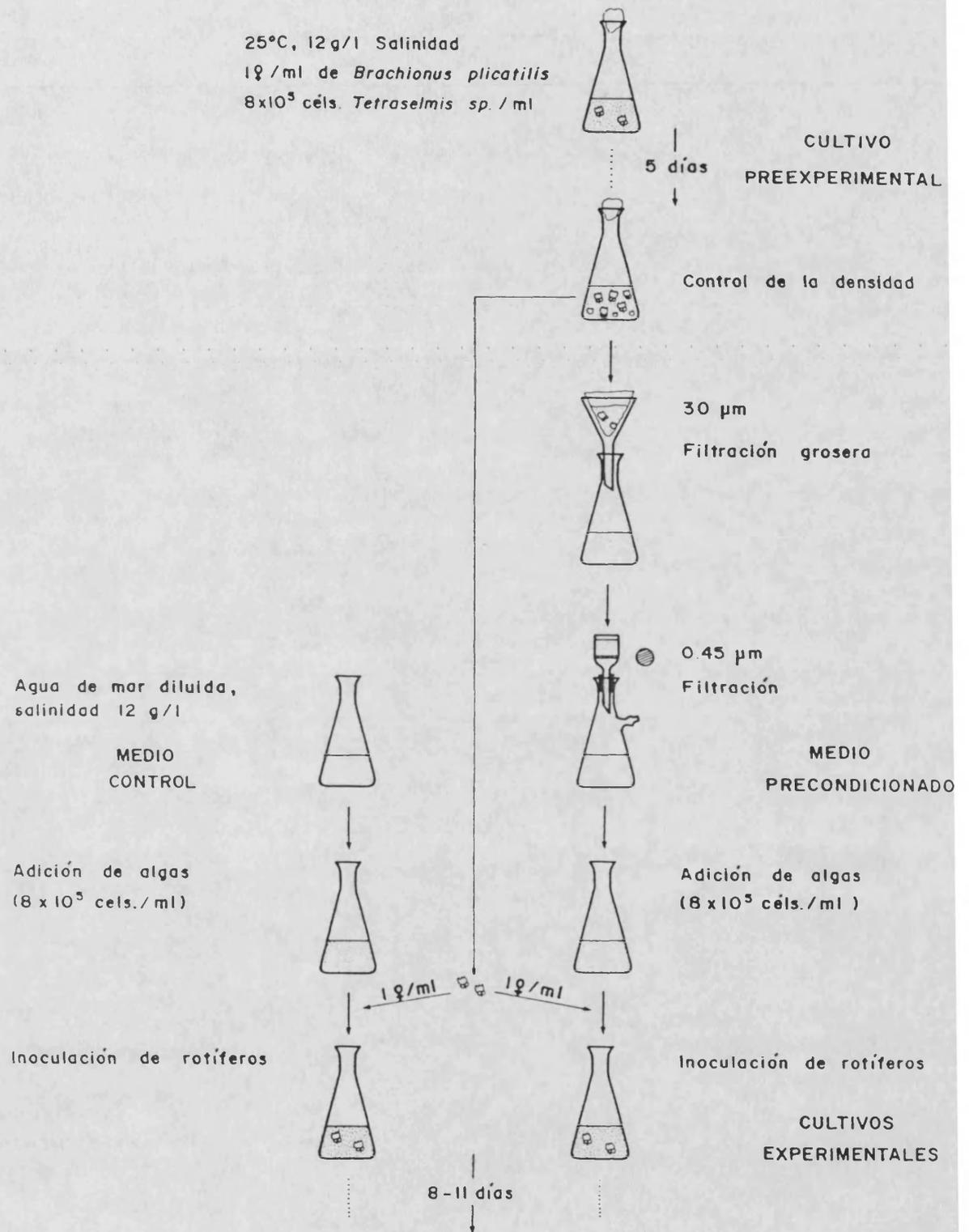


Figura 9.1. Protocolo experimental utilizado en el Experimento 1: ensayos 1, 2 y 3.

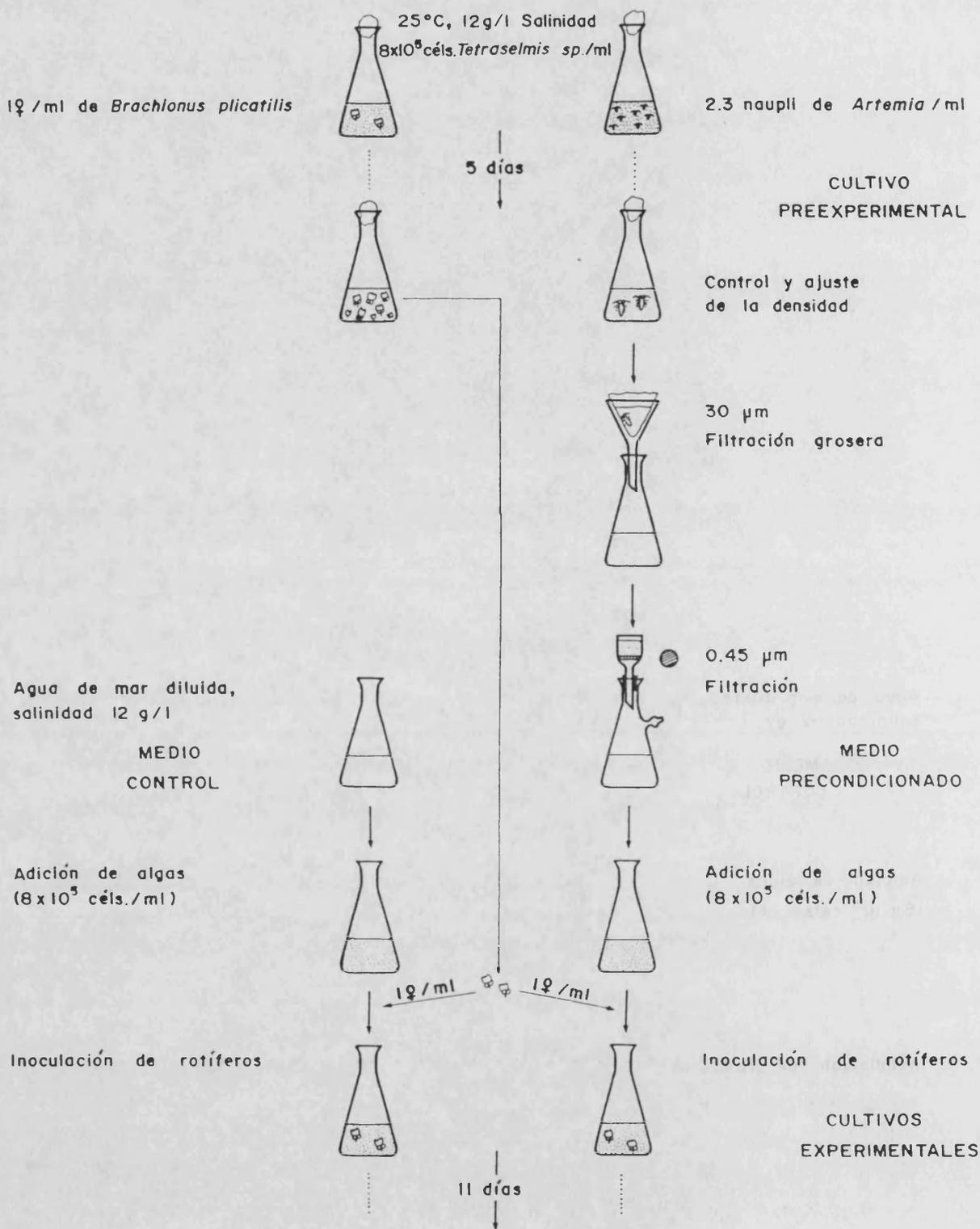


Figura 9.2. Protocolo experimental utilizado en el Experimento 1: ensayo 4.

9.2. MATERIAL Y MÉTODOS

En todos los experimentos se utilizó el clon CU de *Brachionus plicatilis* cultivado a una temperatura de 25°C y 12 g/l de salinidad, y alimentado con un exceso de *Tetraselmis sp.*. Los cultivos de *Artemia salina* utilizados en los experimentos que se describen a continuación fueron establecidos a partir de quistes desecados siguiendo básicamente el procedimiento descrito por Amat (1980). Estos cultivos se mantuvieron en las mismas condiciones que los cultivos de rotíferos, las características generales de los cuales ya han sido descritas en el capítulo 3.

Para estudiar el efecto de un medio previamente condicionado, por el crecimiento de rotíferos en el mismo, sobre la producción de hembras míticas en el clon CU de *B. plicatilis*, se han utilizado dos tipos de cultivos diferentes (masivos e individuales) que implicaron dos diseños experimentales distintos, que junto con sus resultados se han denominado aquí Experimento 1 y Experimento 2. En ambos casos se ha estimado y comparado la producción de hembras míticas en dos condiciones experimentales diferentes: medio precondicionado frente a medio fresco.

Experimento 1: cultivos masivos

La rutina experimental utilizada aparece esquematizada en la figura 9.1. Dicha rutina se iniciaba con el establecimiento de cultivos masivos preexperimentales. Para ello se inoculaban hembras amíticas ovígeras a una densidad de 1 hembra/ml en 100 ml de un cultivo de *Tetraselmis sp.* cuya concentración se había ajustado a 8×10^5 células/ml. Estas hembras procedían de un cultivo madre que se encontraba en fase de crecimiento exponencial tardía (véase el capítulo 5). Tras un periodo de cultivo de 5 días se medía la densidad alcanzada por la población de rotíferos y se procedía a la filtración del cultivo. El proceso de filtración se efectuaba en dos fases: primero se realizaba un filtrado grosero a través de gasa de algodón, y posteriormente otro a través de un filtro de nitrocelulosa de $0.45 \mu\text{m}$. El filtrado, tras la adición de alimento, se utilizaba como medio precondicionado en uno de los cultivos experimentales de rotíferos, mientras que en el otro cultivo experimental, utilizado como control, se empleaba medio de cultivo fresco (agua de mar diluida a 12 g/l de salinidad) al que se había añadido la misma concentración de alimento. Las algas añadidas se concentraban previamente por filtración resuspendiéndose posteriormente en ambos cultivos experimentales de manera que la concentración final era de 8×10^5 células/ml. Los dos cultivos se iniciaban

inoculando hembras portadoras de huevos procedentes del cultivo preexperimental a una densidad de 1 hembra/ml. Los cultivos experimentales se muestreaban diariamente hasta que se producía el envejecimiento de la población y la proporción de hembras con huevos era muy baja. Cada día se tomaban dos muestras de cada uno de los frascos de cultivo, esto es, del cultivo control y del precondicionado. Tras la fijación de las mismas con lugol se contaban los rotíferos diferenciando hembras ovígeras míticas y amíticas, de acuerdo con el tamaño y tipo de los huevos que portaban, hembras no ovígeras, y machos. A partir de estos recuentos se calculó el nivel de mixis diario para cada cultivo como la proporción de hembras ovígeras que eran míticas. Este procedimiento experimental se utilizó en cuatro ensayos distintos, tres de ellos con niveles diferentes de precondicionamiento del medio de cultivo. Estos grados de precondicionamiento se consiguieron utilizando para la obtención del medio condicionado cultivos preexperimentales de *Brachionus plicatilis* con tres densidades diferentes: 22, 86.3, y 96.5 hembras/ml. El último ensayo (ensayo 4 en la figura 9.2) se realizó con el fin de introducir un control biológico en el experimento. El procedimiento que se siguió en este ensayo fue el mismo que para los otros tres (figura 9.1) excepto en que el medio precondicionado correspondía al filtrado de un cultivo de 5 días de *Artemia salina* cuya densidad inicial fue calculada y corregida durante el periodo de cultivo para obtener una concentración final en biomasa similar a la alcanzada en el medio preexperimental de *Brachionus plicatilis* con densidad intermedia (86.3 hembras/ml; ensayo 2).

Los intervalos de confianza para las proporciones de hembras míticas se calcularon para las muestras de tamaño mayor que cuatro a partir de una tabla de límites de confianza para porcentajes basados en la distribución binomial (véanse pp 332–338 Sokal y Rohlf, 1988).

Experimento 2: Cultivos individuales

Los experimentos realizados con el clon CU de *Brachionus plicatilis* y que se han detallado en el capítulo anterior (capítulo 8) permitieron establecer el conjunto de condiciones experimentales adecuado para el estudio de los efectos del precondicionamiento del medio de cultivo. Las condiciones de cultivo usadas en este experimento vinieron determinadas por los resultados de un experimento factorial realizado previamente con la cepa CU, y en el que se estudiaba el efecto combinado de la densidad de población y la renovación del medio de cultivo. Los resultados de este experimento, que ya se mostraron en el capítulo 8, se resumen junto con las condiciones

del mismo en la tabla 9.1. A partir de las 43 hembras experimentales estudiadas se tipificaron un total de 943 descendientes. Sólo se observaron tasas de mixis significativamente mayores que cero (valor del estadístico del "Test para diferencias entre porcentajes", $t_s = 1.520$, $p < 0.1$) en la densidad más alta de las ensayadas cuando el medio de cultivo no se renovó (medio confinado), y éstas fueron bajas (véase la tabla 9.1). Este resultado se ve confirmado por el de otros experimentos realizados en el clon CU con diversos intereses y cuyos resultados no se muestran en el presente trabajo. De acuerdo con los resultados de este experimento previo, resulta muy improbable que la inducción de la mixis en esta cepa pueda tener lugar en cultivos individuales con una densidad de 1 hembra/ml y en las condiciones fijadas en los diseños experimentales, si la posible modificación del medio debida al hacinamiento resulta suprimida mediante la renovación diaria del medio. Por lo tanto estas condiciones fueron las utilizadas para evaluar el efecto del acondicionamiento del medio sobre la mixis en individuos cultivados aisladamente en el Experimento 2. Este experimento se inició con 50 hembras recién nacidas obtenidas según el protocolo para la obtención de neonatos que se describe bajo el epígrafe de "Experiencias preliminares" en el apartado 8.2. (véase también la figura 8.1). Estas hembras se cultivaron a lo largo de toda su vida en pocillos individuales que contenían 1 ml de medio con una concentración de 5×10^5 células de *Tetraselmis sp.*/ml. De los 50 cultivos individuales 25 se realizaron utilizando un medio acondicionado que se había obtenido según el protocolo correspondiente al Experimento 1, excepto en el hecho de que el medio fue esterilizado y conservado bajo refrigeración (4°C) hasta su uso en los experimentos (esto es, un periodo de tiempo que osciló entre 0 y 9 días). De esta forma el medio acondicionado, tras la adición de un nivel controlado de alimento (5×10^5 células/ml) pudo ser renovado diariamente. Para la adición del alimento las células del alga se concentraban por filtración y después se resuspendían en el medio. El otro grupo de 25 cultivos individuales se utilizó como control en el experimento, usando para la renovación diaria del medio, un medio fresco en el que previamente se resuspendía una concentración de alimento igual a la de los cultivos con medio acondicionado. La progenie de las hembras experimentales se recogió cada 24 horas y se cultivó individualmente hasta que produjo descendencia que permitió tipificar a las madres como hembras míticas o amíticas. Con los datos así obtenidos se calculó una tasa de mixis global para cada grupo experimental en la misma forma que en los experimentos descritos en el capítulo 8, es decir como la proporción de hijas míticas con respecto al total de la descendencia fértil tipificada ($TM = \text{hembras míticas} / (\text{hembras míticas} + \text{hembras amíticas})$).

Las diferencias entre las proporciones de hijas míticas producidas en las dos condiciones experimentales (medio precondicionado y medio control) se analizaron utilizando la prueba estadística de una cola para diferencias entre porcentajes que se había utilizado previamente con la misma concepción en el capítulo 8 ("Test de igualdad de dos porcentajes", Sokal & Rohlf, 1979, pp 663–664):

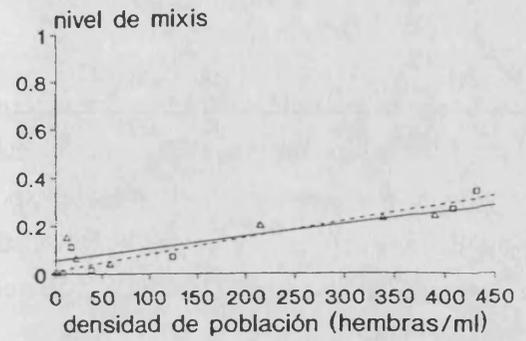
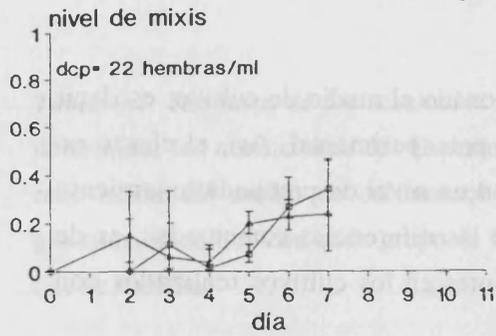
9.3. RESULTADOS

Experimento 1

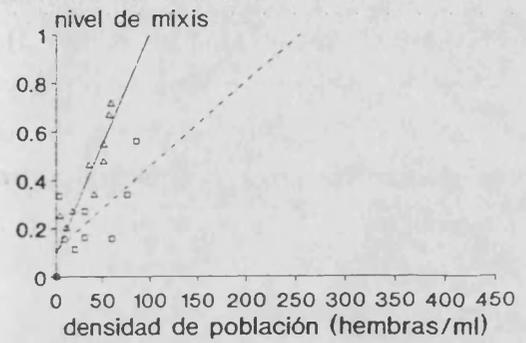
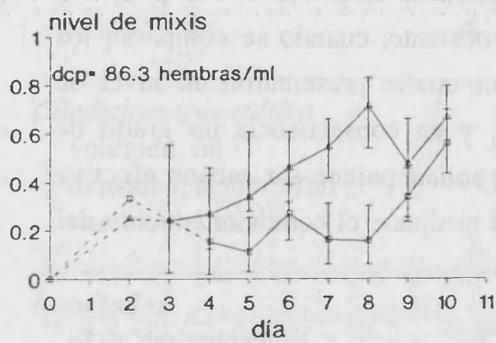
La figura 9.3 muestra la variación de la proporción de hembras míticas durante el crecimiento de la población, así como la relación entre el nivel de mixis y la densidad poblacional en cada par de cultivos experimentales (precondicionado y control) de los cuatro ensayos realizados. Se observa que muy frecuentemente el nivel de mixis aumenta con el tiempo, y que existe una relación lineal positiva entre dicho nivel de mixis y la densidad de la población con la única excepción del cultivo control en el ensayo 4. A pesar de la variabilidad observada entre los resultados de los diferentes ensayos, la cual puede atribuirse a la existencia de efectos dependientes del bloque experimental, los cultivos realizados en medio precondicionado produjeron proporciones más altas de hembras míticas que los cultivos control asociados a ellos con la única excepción del ensayo 1 en el cual no se detectaron diferencias entre los niveles de mixis de ambos cultivos experimentales. La aparición de este efecto parece, pues, estar

Figura 9.3. Variación de la proporción de hembras míticas durante el crecimiento de la población (a la izquierda), y relación entre el nivel de mixis y la densidad poblacional (a la derecha) en cada par de cultivos experimentales (precondicionado y control) de los cuatro ensayos realizados en el Experimento 1. En los ensayos 1–3 el medio precondicionado se obtuvo mediante el crecimiento previo de una población de *Brachionus plicatilis*, siendo la densidad del cultivo preexperimental (dcp) la densidad final alcanzada. En el ensayo 4, el medio precondicionado fue obtenido por el crecimiento previo de *Artemia salina* siendo la biomasa final similar a la alcanzada en el precondicionamiento del medio para el ensayo 2. Las barras verticales indican los intervalos de confianza para el 95 %. En las figuras de la izquierda, los valores calculados a partir de muestras con $n < 5$, para los cuales no se muestran los intervalos de confianza, están unidos por una línea discontinua. En las figuras de la derecha se representa la línea de regresión que mejor se ajusta a los puntos.

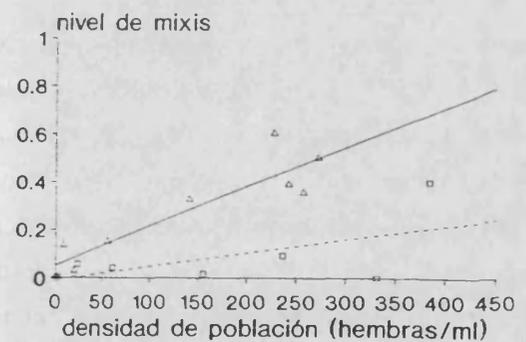
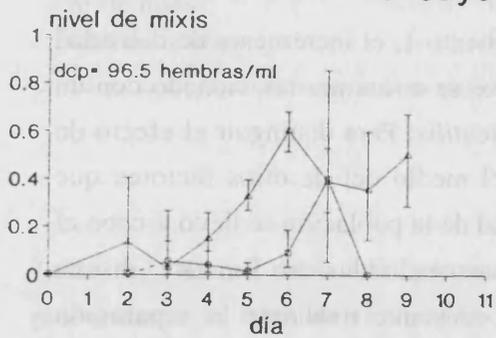
ensayo 1



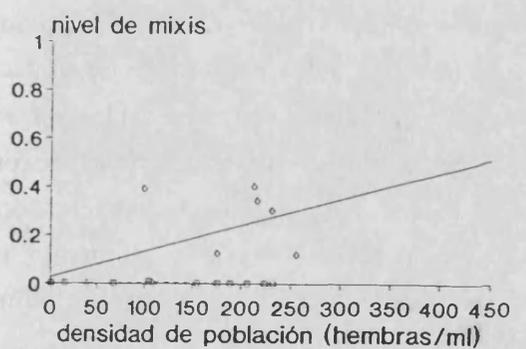
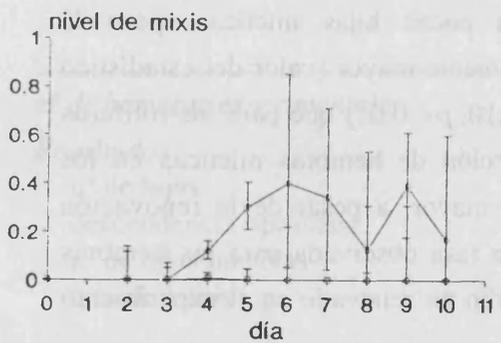
ensayo 2



ensayo 3



ensayo 4



- control
- △ precondicionado por *Brachionus*
- ◇ precondicionado por *Artemia*

relacionada con la intensidad con que fue precondicionado el medio de cultivo, es decir con la densidad poblacional alcanzada en el cultivo preexperimental. Así, el efecto no resulta evidente en el ensayo 1, el cual corresponde a un nivel de precondicionamiento mucho menor que los otros ensayos. Aun existiendo las diferencias comentadas, es de señalar el hecho de que la mixis tiende a aparecer antes en los cultivos realizados con medio precondicionado.

El precondicionamiento del medio de cultivo por *Artemia salina* muestra también un efecto positivo sobre la producción de hembras míticas en la cepa de *B. plicatilis* estudiada (véase el ensayo 4 en la figura 9.3). No obstante, cuando se comparan los resultados correspondientes a los ensayos 2 y 4, los cuales presentaron un nivel de biomasa similar en los cultivos preexperimentales, y en consecuencia un grado de condicionamiento inespecífico comparable, *Artemia salina* parece ser menos efectiva que *Brachionus plicatilis* en la inducción de la mixis mediante el condicionamiento del medio.

Experimento 2.

En los cultivos masivos llevados a cabo en el Experimento 1, el incremento de densidad poblacional debido a la reproducción de los individuos se encuentra relacionado con un aumento de la reproducción sexual en *Brachionus plicatilis*. Para distinguir el efecto de la densidad mediado por el precondicionamiento del medio del de otros factores que podrían estar actuando durante el aumento en densidad de la población se llevó a cabo el Experimento 2, el cual implicó el uso de cultivos individuales. En este diseño experimental la densidad poblacional se mantiene constante mediante la separación periódica de la descendencia.

Los resultados de este experimento se resumen en la tabla 9.2. Los rotíferos cultivados en medio precondicionado produjeron pocas hijas míticas, pero la proporción de descendencia mítica fue significativamente mayor (valor del estadístico del "Test para diferencias entre porcentajes", $t_s = 10.10$, $p < 0.01$) que para los rotíferos cultivados en el medio control. La tasa de producción de hembras míticas en los cultivos realizados con medio precondicionado fue mayor, a pesar de la renovación diaria del medio realizada en el experimento, que la tasa observada para las hembras cultivadas a una densidad de 5 hembras/ml y en medio no renovado en el experimento realizado previamente (véase la tabla 9.1).

Tabla 9.1. Resumen de los resultados del experimento previo (capítulo 8) que sirvió para determinar las condiciones del Experimento 2. Efecto de la densidad de población y de la renovación del medio de cultivo sobre la producción de hembras míticas. Resultados globales obtenidos con cada grupo de 10–12 individuos en las condiciones experimentales que se indican.

	Grupo			
	A	B	C	D
<i>Condiciones de cultivo</i>				
volumen, ml	1	0.2	1	0.2
densidad, hembras/ml	1	5	1	5
cambio del medio	no	no	diario	diario
<i>Resultados</i>				
nº de descendientes	235	169	250	306
descendencia tipificada	232	163	249	299
nº de hijas	0	1	0	0
tasa de mixis	0	0.006	0	0

Tabla 9.2. Efecto del medio precondicionado en la proporción de hembras míticas producidas a lo largo de la vida de las hembras amíticas cultivadas individualmente. Condiciones de cultivo: volumen, 1 ml (*i.e.*, 1 hembra/ml); medio renovado diariamente.

	Control	Medio precondicionado
<i>nº de hembras experimentales</i>	22	21
<i>Resultados</i>		
nº de hijas	538	555
descendencia tipificada	534	550
nº de hijas míticas	0	5
tasa de mixis	0	0.091

9.4. DISCUSIÓN

La existencia de un efecto positivo monótono de la densidad de población sobre la mixis en el género *Brachionus* es un fenómeno bien establecido que ha sido detectado por diversos autores dentro de un amplio intervalo de densidades (véase la tabla 9.3). Los resultados de los experimentos realizados con cultivos masivos que se presentan en este capítulo confirman el efecto positivo de la densidad sobre la reproducción sexual en *B. plicatilis* puesto de manifiesto en el capítulo anterior y en la literatura sobre el tema. Estos resultados confirman el efecto de la densidad de población sobre la producción de hembras míticas en el clon CU de esta especie dentro del intervalo de densidades comprendido entre 3 y 431 hembras/ml (véase el ensayo 4 en la figura 9.3).

Las densidades poblacionales alcanzadas en los cultivos masivos son probablemente mucho más altas que las que habitualmente se encuentran en la naturaleza para *Brachionus plicatilis*, por lo que podría pensarse que las conclusiones obtenidas a partir de la mayor parte de las experiencias llevadas a cabo aquí y por otros autores son de difícil aplicación a la naturaleza. No obstante, en muestras de campo (tomadas en una laguna perteneciente al mismo sistema cárstico del que se aisló la cepa utilizada en estos experimentos), se han detectado densidades de hasta 64 individuos/ml (J. Armengol Díaz, *comunicación personal*), y los datos sobre la abundancia de esta especie en lagos salados coinciden con esta observación (Hammer, 1986), lo que indica que en determinados ambientes naturales son posibles densidades poblacionales muy altas. Además, aunque el análisis de poblaciones en el laboratorio a densidades muy bajas resulta técnicamente muy difícil, los experimentos realizados con cultivos individuales permiten establecer condiciones de densidad más próximas a las naturales. Las densidades de 1 hembra/ml y 5 hembras/ml estudiadas en el capítulo 8 se encuentran dentro de los valores de densidad observados en los estudios de campo para *Brachionus plicatilis* y otras especies de este género (Walker, 1973, 7 individuos/ml en *B. plicatilis*; Gilbert, 1963b, 0.5 individuos/ml en *B. calyciflorus*, 1.5 individuos/ml en *B. quadridentatus*; Rougier y Pourriot, 1977, 0.1 individuos/ml en *B. calyciflorus*; King, 1980, 0.058 individuos/ml en *B. bavanensis*; R. Oltra (*comunicación personal*), 1 individuo/ml en *B. plicatilis*). Por lo tanto, el efecto de la densidad observado en el laboratorio no carece de significado ecológico.

Varios autores han hipotetizado que el efecto del hacinamiento sobre la tasa de mixis observado en varias especies de rotíferos del género *Brachionus* podría estar mediado por la acumulación de un metabolito en el medio de cultivo (Gilbert, 1963b,

Tabla 9.3. Efecto de la densidad poblacional sobre la reproducción sexual en distintas especies de rotíferos del género *Brachionus*.

Autor	año	especie	tipo de cultivo	rango de densidad	efecto
Gilbert	1963b	<i>B. calyciflorus</i>	individual	0.66 y 4 hembras/ml	+
Gilbert	1977	<i>B. calyciflorus</i>	masivo	de 6 a 15 hembras/ml	+
Hino e Hirano	1976	<i>B. plicatilis</i>	individual	1 y 5 hembras/ml	+
Ito	1960	<i>B. plicatilis</i>	masivo	aprox. de 5 a 455 hembras/ml	+
Lubzens <i>et al.</i>	1985	<i>B. plicatilis</i>	masivo	aprox. de 5-10 a 100-200 hembras/ml	+
Lubzens	1990	<i>B. plicatilis</i>	masivo	de 50 a 100 hembras/ml	+
Pourriot y Rougier	1977	<i>B. calyciflorus</i>	individual	0.2, 0.6, 1 y 2 hembras/ml	complejo
Pourriot y Rougier	1979	<i>B. plicatilis</i>	individual	0.6, 1, 2, y 4 hembras/ml	ausente
Snell y Boyer	1989	<i>B. plicatilis</i>	masivo	de 0.14 a 7.4 hembras/ml	+

1974, 1977b; Hino e Hirano, 1976, 1977, 1984, 1988). Los resultados que se han presentado en el capítulo 8 están de acuerdo con esta hipótesis aunque al igual que los de los autores citados no constituyen una prueba inequívoca de tal mecanismo de actuación de la densidad poblacional sobre la mixis. En este sentido los resultados de los experimentos realizados tanto con cultivos masivos como individuales, que se detallan en el presente capítulo, proporcionan una prueba directa positiva para esta hipótesis en *Brachionus plicatilis*. Estos experimentos ponen de manifiesto que es posible provocar un aumento de las tasas de mixis cultivando a los rotíferos en un medio que ha sido previamente modificado (precondicionado) por el crecimiento de una población de rotíferos en él, y además que los medios precondicionados por poblaciones más densas producen niveles más altos de mixis. La promoción de la mixis mediante el hacinamiento de los individuos parece ser un fenómeno dependiente de la densidad que se encuentra, al menos en parte, mediado químicamente. Es decir, el mecanismo de actuación de este factor sobre la reproducción sexual puede explicarse por la acumulación de un compuesto químico en el medio de cultivo aunque podrían existir otros mecanismos inductores de la mixis dependientes de la densidad que no se basaran en la acción de una sustancia química.

En los cultivos masivos el efecto positivo del medio precondicionado sobre la producción de hembras míticas se manifiesta tanto en los mayores niveles de mixis que presentan los cultivos tratados como en la anticipación de la reproducción sexual en estos cultivos cuando se comparan con los cultivos control. Este efecto queda también demostrado por el aumento de los niveles de mixis que se observa en los cultivos masivos con el tiempo, y por lo tanto con la densidad de población; esto podría explicarse como un resultado del autocondicionamiento del medio de cultivo por parte de los rotíferos en el curso de la experiencia, ya que el medio no se renovó. Este autocondicionamiento vendría dado tanto por el aumento en número de los individuos como por la acumulación temporal de la sustancia, aunque podrían estar actuando otros factores junto con este efecto.

La respuesta mítica al precondicionamiento del medio encontrada en el Experimento 2 es débil pero estadísticamente significativa, aunque dado el bajo nivel de significación, las conclusiones acerca del significado biológico de este resultado deben interpretarse con precaución. No obstante, el conjunto de resultados obtenido a partir de ambos experimentos es cualitativamente consistente en la demostración de la existencia de un efecto de tipo químico relacionado con la densidad. Las diferencias cuantitativas entre los Experimentos 1 y 2 pueden explicarse a partir de las diferencias en sus diseños

experimentales. De hecho, en el Experimento 1 es posible el sinergismo entre el preconditionamiento del medio y el autocondicionamiento del mismo, el cual puede ser importante dado que las densidades experimentales que se alcanzan son muy altas; el grupo de individuos considerado en ambos experimentos presenta diferencias obvias en su estructura en clases de edad; y además el medio preconditionado utilizado en el Experimento 2 fue sometido a un proceso de almacenamiento a baja temperatura. Se presenta aquí una contraposición común en las experiencias ecológicas: para que una experiencia sea concluyente en cuanto al establecimiento de relaciones causales, el contexto experimental debe ser complicado artificialmente y, en consecuencia, se pierde aplicabilidad directa del resultado a las condiciones naturales (Diamond, 1986)

No obstante, la importancia del ligero efecto observado en los cultivos individuales (Experimento 2) reside en que éste se detectó en condiciones experimentales en las que otros efectos, tales como el del autocondicionamiento del medio, estaban ausentes. En efecto, las condiciones experimentales utilizadas en este experimento minimizan el autocondicionamiento, lográndose una supresión de su efecto. De hecho, éste y otros posibles factores no fueron capaces de inducir la mixis en los cultivos no tratados con medio preconditionado. Por lo tanto, los resultados de los experimentos realizados con cultivos individuales sugieren muy fuertemente que el efecto químicamente mediado ejercido por el hacinamiento no sólo aumenta la producción de hembras míticas, tal y como indican los resultados de los experimentos con cultivos masivos, sino que tiene capacidad para inducir dicha producción. Además, los resultados obtenidos a partir de los cultivos individuales descartan la posibilidad de que el medio preconditionado actúe, al menos completamente, modificando la estructura en clases de edad de la población. Dada la relación de dependencia entre las tasas de mixis y la edad (Pourriot y Rougier, 1976; Rougier y Pourriot, 1977; Lubzens y Minkoff, 1988; véase también el capítulo 8), la posible existencia de diferencias en la supervivencia o fecundidad específicas de la edad y debidas al ambiente (*i.e.*, medio condicionado) implicaría un cambio en la estructura en clases de edad de la población que podría causar diferencias en los niveles de mixis de la población como un todo, aunque las tasas de mixis individuales permanecieran inalteradas.

A pesar de las primeras conjeturas de Gilbert (1963b) acerca de la naturaleza química del efecto de la densidad sobre la mixis en *Brachionus*, hasta el momento sólo se ha llevado a cabo un intento para comprobar esta hipótesis (Snell y Boyer, 1988), y sus resultados fueron negativos. Estos autores proponen como posible causa de estos resultados negativos la inestabilidad de las moléculas hipotéticamente implicadas en el

efecto de la densidad sobre la mixis. Varios experimentos realizados en el presente estudio cuyos resultados no han sido presentados aquí, y en los que se empleó medio precondicionado preservado mediante congelación (-29°C) fracasaron en el intento de poner de manifiesto los efectos de este medio sobre la mixis; por lo tanto parece ser que la influencia del condicionamiento es inestable. En consecuencia, es posible que las bajas, pero significativas, tasas de mixis inducidas por el medio precondicionado en los experimentos con cultivos individuales que se describen en el presente trabajo, puedan ser atribuidas a una pérdida en la eficacia inductora del medio precondicionado durante el proceso de almacenamiento en condiciones de refrigeración al que éste fue sometido.

Aunque los datos del presente capítulo ponen en evidencia la existencia de un mecanismo de tipo químico, la naturaleza del compuesto o compuestos implicados en la mixis permanece sin esclarecer. El hecho de que *Brachionus plicatilis* responda también, aunque de forma más débil, al precondicionamiento del medio por *Artemia* es un dato interesante a tener en cuenta, ya que sugiere que uno o más metabolitos generales, quizás un producto de desecho, podrían trabajar como inductores de la mixis.

Obviamente es preciso disponer de un mayor número de datos antes de proceder a la generalización de esta hipótesis, no obstante, en este contexto cabe cuestionarse si el compuesto químico implicado en la promoción de la mixis actúa: (1) como una condición química que afecta a la reproducción sexual de forma similar a como lo hacen otros factores abióticos; (2) como una señal de hacinamiento, y por lo tanto de la alta probabilidad de encuentro entre macho y hembra; un modo de actuación que constituye un punto de vista estándar para las relaciones entre densidad y mixis (Snell y Garman, 1986); o (3) como una señal anticipada del deterioro del hábitat por sobreexplotación de recursos, resultando entonces relevantes los niveles de densidad de la propia población y de sus competidores. Estudios recientes sobre la determinación del sexo de la progenie y por lo tanto sobre la inducción de la reproducción sexual en *Daphnia magna* por estímulos de tipo químico dependientes de la densidad (Hoback y Larsson, 1990) apoyan esta última posibilidad. De acuerdo con los resultados del presente capítulo, el efecto químico inespecífico del hacinamiento sobre la producción de hembras míticas que se ha puesto de manifiesto en *B. plicatilis* sugiere también que la función que desempeña la densidad de población en la inducción de la mixis podría estar relacionada con una estrategia para escapar mediante diapausa de un hábitat que se está deteriorando. Tal y como demuestran algunos trabajos, la reproducción sexual presenta más dificultades fisiológicas y se encuentra ecológicamente más restringida que la reproducción asexual (Lubzens *et al.*, 1985; Snell, 1986; Snell y Boyer, 1988) de manera que los huevos

durables no pueden producirse en un ambiente degradado en el que la disponibilidad de recursos sea escasa. Por lo tanto, teniendo en cuenta estas consideraciones, las cuales han sido cuantitativa y técnicamente estudiadas en el apartado 7.5, resulta de vital importancia el que la inducción de la mixis se produzca antes de que las condiciones de hábitat sean desfavorables, cuando los recursos aún son adecuados. De ahí la necesidad de una señal anticipada al deterioro del hábitat que permita que el cambio a la fase sexual del ciclo vital se produzca en un momento en el que la producción de huevos durables se pueda completar con éxito, como demuestra el modelo teórico sobre optimización del momento de la mixis (apartado 7.5). La alta densidad de población es indicativa de recursos abundantes capaces de soportar el crecimiento de la misma, pero también de una futura degradación del ambiente causada por su sobreexplotación. Resulta pues presumiblemente adaptativo que los factores implicados en la inducción de la mixis sean predictivos de aquellas condiciones donde la reproducción sexual pueda tener lugar. Además el carácter adaptativo de la respuesta al hacinamiento también se manifiesta en que la mixis se induciría cuando la probabilidad de encuentro entre macho y hembra es alta, y la fuente potencial de hembras míticas –i.e., las hembras amíticas– es grande, lo cual llevaría a una optimización de la producción de huevos durables.

Así pues, el cambio de la reproducción partenogenética a la reproducción sexual basado en un estímulo dependiente de la densidad de población resulta adaptativo por diversos motivos, luego es presumible que distintos procesos selectivos hayan actuado en la misma dirección.

10. ESTUDIO DE LAS DIFERENCIAS ENTRE HEMBRAS MÍCTICAS Y HEMBRAS AMÍCTICAS: RASGOS DEMOGRÁFICOS Y PATRONES DE PROTEÍNAS

10.1. INTRODUCCIÓN

En los rotíferos monogonontes la inducción de la mixis y el envejecimiento son procesos que afectan fuertemente a la dinámica de las poblaciones. Aunque en estos dos procesos se encuentran implicados factores externos (véanse los capítulos anteriores), ambos están esencialmente relacionados con alteraciones en el medio interno de los individuos, y por lo tanto probablemente están también afectados por efectos maternos.

Tal y como se comentó en el capítulo 6, el rasgo definitorio del envejecimiento desde un punto de vista evolutivo es una disminución en los componentes de la eficacia de los individuos con la edad, es decir en la probabilidad de supervivencia y en la fecundidad específicas de la edad. En dicho capítulo se refirieron varios cambios individuales relativos al proceso de envejecimiento en los rotíferos de la especie *Brachionus plicatilis*. Estos cambios incluyen el vaciado de las entrañas, especialmente del material de las gónadas, junto con una producción muy baja o inexistente de huevos, una reducción importante de la motilidad, un aumento de la pigmentación, y una variación en los patrones de proteínas totales de los individuos (véase el capítulo 6).

En contraste con lo que ocurre con el envejecimiento, normalmente sólo la morfología y el tamaño de los huevos que producen permite diferenciar los tres tipos de hembras descritas en los rotíferos en relación con su ciclo reproductivo: (1) las hembras amícticas que se reproducen mediante huevos mitóticos partenogenéticos; (2) las hembras mícticas no fertilizadas que se reproducen mediante partenogénesis de huevos meióticos; y (3) las hembras mícticas fertilizadas que producen huevos sexuales de resistencia. Las hembras mícticas y amícticas son morfológicamente indistinguibles, aunque algunos autores han encontrado sutiles diferencias estructurales entre ellas (Beauchamp, 1935; Hauer, 1937; Ahlstrom, 1940). Por ejemplo, Ahlstrom (1940) observó algunas diferencias en la ornamentación de la loriga de las hembras mícticas y amícticas de *Brachionus angularis*, y Hauer (1937) reflejó diferentes patrones ornamentales en sus ilustraciones de la loriga de estos dos tipos de hembras en *Brachionus leydigi*. No obstante, estas observaciones no son concluyentes puesto que las hembras estudiadas por estos autores fueron aisladas de poblaciones naturales y por lo

tanto podrían corresponder a distintos genotipos o haberse desarrollado en condiciones ambientales distintas. Existen también referencias acerca de las diferencias en tamaño entre las hembras míticas y amíticas. En muestras procedentes de poblaciones naturales, las hembras míticas de *Brachionus angularis* parecen ser menores que las hembras amíticas (Ahlstrom, 1940). En cultivos de laboratorio de *Brachionus calyciflorus* (Gilbert, 1983a) se ha observado esta misma relación. No obstante, en general se puede considerar que ambos tipos de hembras son siempre muy similares, si no idénticas en cuanto a su morfología, lo cual contrasta con el hecho de que biológicamente son muy diferentes; el tipo de óvulos producidos y el mecanismo de producción de los mismos (véase más arriba) en las hembras míticas difiere marcadamente del de las hembras amíticas.

Esta similitud morfológica resulta útil para estudiar como las diferentes conductas reproductivas se encuentran relacionadas con otros rasgos de la historia vital, tales como la fertilidad, la supervivencia y el envejecimiento, sin la interferencia de otras fuentes de variabilidad fenotípica (véase p.e., King, 1970). Así, existen varios estudios realizados en el primer tercio de este siglo que comparan la supervivencia y fecundidad en hembras míticas y amíticas. Los datos de estos primeros estudios indican con frecuencia la existencia de diferencias significativas en los patrones de supervivencia y en algunos parámetros de reproducción entre estos dos tipos de hembra. Además, los resultados de estos estudios muestran que las fecundidades relativas de los diferentes tipos de hembra varían en las distintas especies de rotíferos, de manera que en algunas especies las hembras míticas no fertilizadas producen menos huevos que las hembras amíticas (*Asplanchna intermedia*, Tauson, 1925; *Lecane inermis*, Miller, 1931). Para otras especies las fecundidades son aproximadamente iguales (*Epiphanes senta*, Ferris, 1932; *Euchlanis triquetra*, Lehmensick 1926), y para un tercer grupo de especies las hembras míticas productoras de machos tienen fecundidades mayores que las hembras amíticas (*Asplanchna sieboldi*, Wesenberg-Lund 1930; *Testudinella elliptica*, Luntz 1926). (Para una revisión de estos estudios y de sus referencias bibliográficas, véase King, 1970.) Posteriormente otros autores han realizado comparaciones similares en otras especies (King, 1970; Pourriot, 1973b; Ruttner-Kolisko, 1974; Snell, 1977b, 1986; Serra, 1987) que muestran en algunos casos la existencia de diferencias en los patrones de supervivencia y fertilidad de las hembras míticas y amíticas.

En el presente capítulo se lleva a cabo una caracterización bioquímica de las hembras míticas no fertilizadas de *Brachionus plicatilis* mediante la utilización de técnicas electroforéticas. Además, haciendo uso de esta aproximación bioquímica y de

datos demográficos se trata de describir y explicar algunas de las diferencias entre la historia vital de las hembras míticas no fertilizadas y la de las hembras amíticas, especialmente las relaciones entre los rasgos reproductivos por un lado, y la duración de la vida y el envejecimiento por el otro. Con este objetivo se combinan aquí los resultados de este estudio con la caracterización bioquímica del envejecimiento realizada en el capítulo 6.

10.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos se llevaron a cabo con hembras de la especie *Brachionus plicatilis* pertenecientes a los clones CU y SPO (Serra y Miracle, 1983, 1985; véase también el capítulo 5). Estos clones habían sido mantenidos en nuestro laboratorio bajo condiciones controladas durante varios años (estas condiciones de cultivo se describen detalladamente en el capítulo 3).

Dinámica de poblaciones

Los datos demográficos analizados en este capítulo tienen su origen en el estudio demográfico realizado por Serra (1987). Este autor determinó varios parámetros demográficos para las hembras de los clones CU y SPO (véanse los capítulos 5 y 8) cultivadas en tres condiciones de temperatura (20, 25 y 30°C) y tres salinidades (9, 12 y 24 g/l), generándose así 18 situaciones experimentales distintas. La metodología empleada en el estudio de la dinámica poblacional de estos clones en estas condiciones aparece descrita de forma extensa en el trabajo de dicho autor (Serra, 1987) pero se resume aquí para facilitar la comprensión del análisis de los resultados.

Para cada uno de los ensayos se estableció un cultivo masivo preexperimental de las mismas condiciones de temperatura y salinidad que los de experimentación. Cuando estos cultivos se encontraban en fase exponencial avanzada de crecimiento se aislaban unas 200 hembras portadoras de huevos, las cuales se controlaban hasta conseguir recoger 50 hembras recién nacidas descendientes de estas hembras previamente separadas. Estos neonatos se cultivaron individualmente a lo largo de su vida en 0.5 ml de medio con una densidad de algas *Tetraselmis sp.* de 5×10^5 células/ml. El medio de cultivo se renovó diariamente y los descendientes se contaron y separaron de sus madres con una periodicidad de 24 horas en el caso de los cultivos a 20 y 25°C de temperatura, y de 12 horas para los cultivos a 30°C. Las hembras experimentales se clasificaron

como hembras amícticas, míticas productoras de huevos durables, míticas productoras de machos (hembras míticas no fertilizadas), o hembras indeterminadas, por no haber producido descendencia. A partir de los datos obtenidos en el seguimiento de estas hembras se calcularon los valores de los principales parámetros de la dinámica poblacional considerando separadamente las hembras amícticas y las hembras míticas no fertilizadas. De estos parámetros se analizan aquí: e_0 , duración media de la vida o esperanza de vida; R_0 , número promedio de descendientes producidos por hembra; y G_c , edad media de producción de descendencia. Para el grupo de las hembras amícticas, R_0 y G_c , son respectivamente la tasa neta de reproducción y el tiempo de generación de la cohorte. En el caso de las hembras míticas, dado el carácter masculino de su descendencia, G_c no se puede considerar un tiempo de generación y por lo tanto representaría la edad media de la madre a la cual nacen los machos. Lo mismo ocurre con R_0 , la cual se convierte en una medida de la producción de machos de la que no se puede deducir el estado de la población.

Análisis electroforético

La cepa usada en el estudio electroforético fue la cepa CU de *Brachionus plicatilis* cuyos proteinogramas se han estudiado previamente en relación con el envejecimiento en el capítulo 6. Las técnicas de extracción de las muestras y de elaboración, fijación y tinción de los geles, así como las condiciones y el material utilizado en el proceso de electroforesis se describen detalladamente en el capítulo 4.

Diseño experimental. A fin de obtener los patrones proteínicos característicos de las hembras míticas y compararlos con los de las hembras amícticas, en el clon CU de *B. plicatilis*, se diseñó la siguiente experiencia. A partir de un cultivo madre en fase exponencial de crecimiento se separaron 400 hembras portadoras de dos o más huevos. Tras la eclosión de los mismos, se aislaron 230 neonatos en pocillos individuales que contenían 0.5 ml de una suspensión algal con una concentración de 5×10^5 células de *Tetraselmis sp.*/ml. Transcurridas 24 horas desde que se efectuó el aislamiento, se renovó el medio de cultivo trasladando el individuo del pocillo original a uno nuevo. El segundo día de vida, y puesto que ya ha aparecido descendencia, es posible tipificar las hembras originales en función de que produzcan neonatos hembras (hembras amícticas) o neonatos machos (hembras míticas). Del total de hembras, y una vez conocido el tipo a que pertenecían, se aislaron al azar 40 hembras amícticas y 40 hembras míticas que se procesaron como muestras para electroforesis. De este modo se obtuvo un total de 80

muestras, cada una de ellas correspondiente a un individuo. Con estas muestras se realizó un total de 8 electroforesis en geles de poliacrilamida. En cada uno de los geles se corrieron 12 muestras, de las cuales 10 correspondían a otras tantas extracciones de un rotífero, mientras que las dos restantes correspondían a una muestra en blanco, y una muestra de marcadores de peso molecular conocido (véase el capítulo 4). De las 10 muestras, 5 contenían hembras amícticas y las 5 restantes hembras mícticas. La distribución de las muestras en el gel se efectuó alternando las correspondientes a los dos tipos de hembras. Para intensificar las bandas más ligeras y confirmar los patrones obtenidos en esta primera serie de electroforesis, se llevó a cabo una segunda serie de electroforesis en la que se procesaron los extractos correspondientes a grupos de 5 hembras.

10.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 10.1 presenta la comparación entre los valores de los parámetros demográficos evaluados para las hembras amícticas y para las hembras mícticas no fertilizadas. Las hembras mícticas no poseen valores para el número medio de descendientes por hembra (R_0) muy diferentes a los de las hembras amícticas. Así, las medias para el total de las R_0 de las hembras mícticas y de las hembras amícticas, 15.9 y 16.4 ($n= 17$) respectivamente, presentan aproximadamente el mismo valor. La ausencia de una tendencia general a presentar mayores valores de R_0 por parte de un determinado tipo de hembra coincide con las observaciones de King (1970). Este autor indica que las diferencias que algunas veces se observan para las R_0 entre los dos tipos de hembras podrían ser dependientes de la variación intraespecífica y de las condiciones ambientales. Esta explicación resulta pausable a partir de los resultados presentados aquí, los cuales, en todo caso, limitan la posibilidad de generalizar las diferencias entre la fecundidad de las hembras mícticas y amícticas encontradas por varios autores trabajando con distintas especies de rotíferos (véase la Introducción).

Según los datos presentados (G_c , tabla 10.1), las hembras mícticas producen su descendencia masculina más tempranamente que las hembras amícticas su correspondiente descendencia femenina, con únicamente dos excepciones (CU, T: 25°C, S: 9 g/l; y SPO, T: 30°C y S: 9 g/l), en las cuales la relación se invierte, pero con valores muy próximos entre sí. Aún cuando en ocasiones los datos para G_c se calcularon sobre un número pequeño de hembras mícticas, la tendencia expuesta para los valores de este parámetro por este tipo de hembras parece ser una tendencia general en esta especie.

Serra (1987) calculó la recta de regresión de Teissier (véase Jensen, 1986) entre los tiempos que tardan en aparecer las descendencias de las hembras amícticas y míticas según los datos presentados en la tabla 10.1. De acuerdo con los resultados de este autor, se puede considerar que el tiempo de generación para las hembras amícticas es aproximadamente 1.26 veces el tiempo de generación de las hembras míticas, es decir las hembras nacen aproximadamente 1.26 veces más tarde que los machos a partir de sus respectivas madres (G_c , amícticas = 1.26 G_c , míticas - 0.07; $r = 0.97$; $n = 17$; $p \leq 0.01$). Esta relación puede interpretarse como una consecuencia directa del menor costo que implica la producción de machos dado su pequeño tamaño. Es decir, para una asignación reproductiva mayor o igual, los huevos más pequeños pueden producirse con una tasa mayor.

Las hembras míticas suelen tener una vida más corta que las amícticas de la misma cepa y condiciones ambientales tal y como sugiere la comparación de los valores de la duración media de la vida en la tabla 10.1. Si se ignoran las diferencias inferiores a medio día, la e_0 de las hembras míticas es menor que la e_0 de las hembras amícticas en 9 de los 17 ensayos que se presentan, mientras que el patrón opuesto únicamente aparece en 3 de estos ensayos. No obstante, debe señalarse que en dos ensayos, uno perteneciente a cada patrón, únicamente se siguió a una hembra mítica.

Según los datos presentados en este capítulo, las hembras míticas productoras de machos de *Brachionus plicatilis* tienen una vida más corta que las hembras amícticas. La diferencia entre la duración de la vida de ambos tipos de hembras no es muy grande, pero es un rasgo constante que se mantiene en casi todas las condiciones de cultivo. Este resultado coincide con el patrón observado por Snell (1986) para una cepa de *Brachionus plicatilis* estudiada en tres condiciones de temperatura distintas (18, 28 y 38°C) aunque las diferencias entre la duración media de la vida para los dos tipos de hembras fueron demasiado pequeñas como para considerarse estadísticamente significativas.

La menor duración de la vida de las hembras míticas de *Brachionus plicatilis* apoyada por los datos presentados aquí coincide con las observaciones de Pourriot (1973b) en *Brachionus calyciflorus* y *Notommata copeus*, pero se encuentra en oposición con los patrones observados en otras especies. Por ejemplo, King (1970) encuentra variabilidad en las diferencias de la duración media de la vida de las hembras sexuales y asexuales de *Euchlanis dilatata*, aunque el patrón observado con mayor frecuencia es una vida más corta para las hembras amícticas. Snell (1977b), también observa una vida más larga para las hembras míticas en *Asplanchna brightwelli*.

Tabla 10.1. Valores de la esperanza de vida (e_0), fertilidad media por hembra durante todo el periodo reproductivo (R_0) y edad media de producción de la descendencia (G_c) para las hembras amícticas y las hembras mícticas no fertilizadas de dos clones de la especie *Brachionus plicatilis* en las condiciones que se indican (ET, error típico; n, número de hembras analizadas). Valores tomados de Serra (1987). También se indican los valores del coeficiente de correlación (r) entre las diferencias en los parámetros correspondientes a los dos tipos de hembras.

Cepa						
Temperatura	e_0 (ET; n)		R_0 (ET)		G_c (ET)	
	amícticas	mícticas	amícticas	mícticas	amícticas	mícticas
Salinidad						
CU						
20°C						
9 g/l	16.1 (1.4; 15)	11.7 (0.8; 30)	20.3 (1.6)	18.1 (1.4)	8.0	5.8
12 g/l	16.7 (0.9; 31)	13.0 (1.2; 16)	18.6 (0.8)	18.7 (0.7)	7.6	5.5
24 g/l	10.8 (0.6; 44)	6.4 (- ; 1)	5.9 (0.5)	12.0 (-)	6.5	4.8
25°C						
9 g/l	5.6 (0.2; 45)	6.0 (0.3; 0)	7.3 (0.4)	4.7 (1.8)	2.9	3.1
12 g/l	7.3 (0.3; 16)	7.5 (0.5; 28)	22.2 (0.7)	16.4 (1.1)	3.5	2.7
24 g/l	9.5 (0.4; 43)	8.4 (1.5; 4)	21.2 (1.1)	11.5 (2.3)	4.8	3.2
30°C						
9 g/l	5.5 (0.8; 9)	4.6 (0.3; 30)	12.8 (2.2)	13.1 (0.8)	2.9	1.9
12 g/l	5.1 (0.3; 40)	4.1 (1.3; 4)	17.9 (1.3)	16.0 (1.4)	2.6	1.9
24 g/l	4.1 (0.3; 29)	4.0 (0.5; 5)	10.8 (1.2)	11.0 (2.0)	2.6	2.3
SPO						
20°C						
9 g/l	11.5 (1.5; 7)	11.5 (0.6; 27)	14.6 (3.1)	18.4 (1.5)	7.1	6.5
12 g/l	13.4 (1.1; 22)	12.7 (0.9; 15)	12.9 (1.4)	17.6 (1.7)	7.0	6.1
24 g/l	10.1 (0.4; 28)	- (- ; 0)	1.7 (0.1)	- (-)	6.8	-
25°C						
9 g/l	7.6 (0.3; 46)	15.4 (- ; 1)	24.7 (0.7)	9.0 (-)	3.3	2.6
12 g/l	6.1 (0.5; 18)	5.9 (0.3; 24)	15.3 (1.4)	17.3 (1.6)	3.4	2.7
24 g/l	7.3 (0.4; 34)	5.9 (0.8; 8)	12.6 (1.1)	9.1 (2.1)	4.6	3.9
30°C						
9 g/l	5.6 (0.3; 43)	5.2 (0.5; 2)	15.4 (0.7)	17.5 (0.5)	2.2	2.3
12 g/l	4.8 (0.4; 37)	6.0 (0.7; 8)	17.2 (1.0)	11.8 (2.4)	2.2	1.5
24 g/l	5.5 (0.2; 41)	5.5 (0.4; 9)	20.0 (0.7)	16.1 (0.9)	2.7	2.2

Correlaciones^a: $r(\Delta e_0, \Delta R_0)$: -0.533; $r(\Delta e_0, \Delta G_c)$: 0.543; $r(\Delta R_0, \Delta G_c)$: 0.151

a. $\Delta e_0 = e_0$, amícticas - e_0 , mícticas; $\Delta R_0 = R_0$, amícticas - R_0 , mícticas; $\Delta G_c = G_c$, amícticas - G_c , mícticas



Ruttner–Kolisko (1974) en cambio señala que no existen diferencias en la duración de la vida entre estos dos tipos de hembras en *Brachionus urceolaris*. La dificultad para explicar esta disparidad de resultados se ve aumentada por el hecho de que algunos de estos autores no presentan detalles cuantitativos (Ruttner–Kolisko, 1974) o estos se limitan a la supervivencia sin ofrecer datos de la fecundidad (Snell, 1977b).

Dado el fuerte contraste entre resultados y las limitaciones que presentan las evidencias disponibles a partir del análisis demográfico (*i.e.*, la observación de un patrón no uniforme), se decidió llevar a cabo una aproximación bioquímica alternativa para evaluar los rasgos del envejecimiento en las hembras míticas no fertilizadas de *Brachionus plicatilis*.

En la figura 10.1 se muestran los patrones de proteínas totales obtenidos a partir de hembras míticas y amíticas del clon CU de *Brachionus plicatilis*. El electroforegrama característico de las hembras míticas jóvenes se representa de forma esquemática en la figura 10.2. En esta figura se incluyen los electroforegramas tipo correspondientes a una hembra amítica joven y a una hembra amítica vieja cuyas diferencias se estudiaron en profundidad en el capítulo 6.

Los patrones juveniles de las hembras amíticas y míticas no fertilizadas, aunque similares muestran algunas diferencias importantes. Cuando se compara con el de las hembras amíticas jóvenes, el patrón de proteínas de las hembras míticas productoras de machos de la misma edad cronológica, se caracteriza por: (1) la ausencia de 7 bandas de proteína (bandas: 1, 2, 3, 4, 11, 12 y 38), (2) una clara reducción en la intensidad de 8 bandas (bandas: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 23 y 40), (3) un aumento en intensidad de 3 bandas (bandas: 24, 29 y 36), y (4) la presencia de una banda ausente en los patrones amíticos (banda número 22). Así, en general, existe una reducción en número e intensidad de las bandas en los proteinogramas de las hembras míticas. Este fenómeno afecta principalmente a las bandas correspondientes a proteínas de baja movilidad electroforética (proteínas de alto peso molecular), y coincide con la pauta seguida por los patrones de proteínas durante el envejecimiento de los individuos. En efecto, las diferencias observadas en los proteinogramas de las hembras míticas, en relación con los de las hembras amíticas de su misma edad cronológica, muestran rasgos en común con los cambios inducidos por el envejecimiento: (1) una ausencia de las mismas tres bandas (bandas: 2, 11 y 12), (2) una disminución de la intensidad, en un grado similar, en seis bandas (bandas: 5, 6, 7, 8, 9 y 10), y (3) una modificación de la intensidad de tres bandas (bandas: 23, 36 y 40), aunque en menor grado, que incluye el aumento de intensidad en una de ellas.

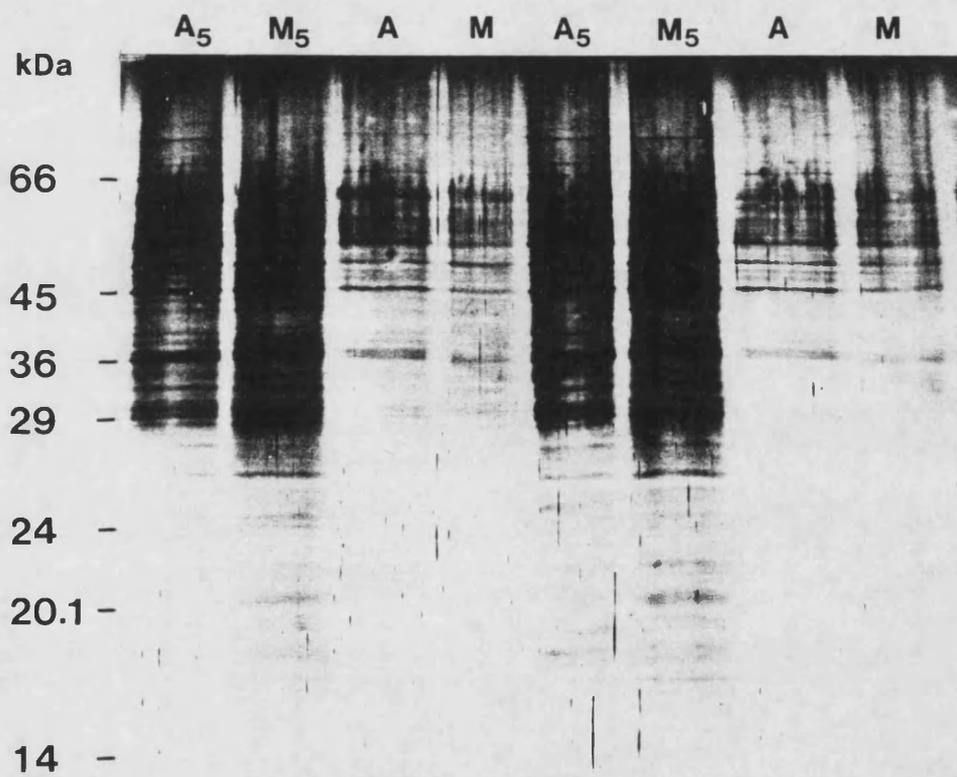


Figura 10.1. Patrones de proteínas totales de hembras amícticas (A) y mícticas (M) de *Brachionus plicatilis* (clon CU a 25°C y 12 g/l de salinidad). Se incluyen los patrones obtenidos a partir de muestras de 1 y 5 individuos. (Estas últimas se denotan con un 5 como subíndice en la parte superior del electroforegrama). El peso molecular en kilodaltons (kDa) de los marcadores de peso molecular aparece señalado a la izquierda de la fotografía.

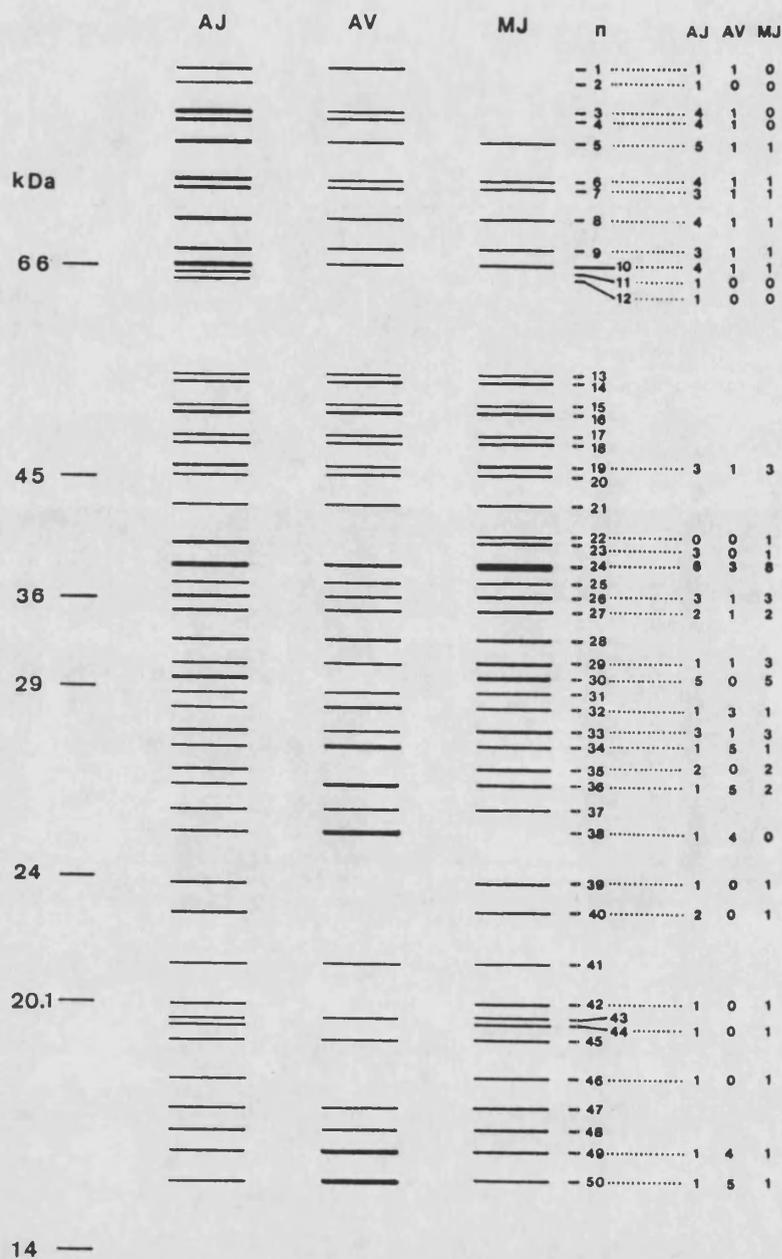


Figura 10.2. Representación esquemática de los electroforegramas de proteínas totales correspondientes a los siguientes tipos de individuos del clon CU de *B. plicatilis*: AJ, hembra amíctica joven (2 días de edad); AV hembra amíctica senescente (8 días de edad); MJ, hembra mítica joven (2 días de edad). A la izquierda aparecen representadas las 7 proteínas patrones de peso molecular conocido, tomadas como referencia. Las bandas aparecen numeradas junto al último electroforegrama. A la derecha se presenta una tabla en la que se indica para cada una de las bandas su presencia (1) o ausencia (0) en el electroforegrama correspondiente. Algunas de las bandas presentan valores superiores a 1, con lo cual se intenta señalar la intensidad de las mismas (variable en un rango entre 1 y 6). Obsérvese que la numeración no se corresponde exactamente con la empleada en el capítulo 6.

No obstante, debe señalarse que el patrón de proteínas de las hembras míticas no puede interpretarse únicamente en términos de envejecimiento individual, ya que presenta algunos rasgos específicos propios: la ausencia de cuatro bandas, tres de ellas en la zona de baja movilidad electroforética y la característica banda número 22 que junto con el aumento en intensidad de la banda número 29 se convierte en un rasgo distintivo del electroforegrama de las hembras sexuales.

La similitud que muestran los patrones de proteínas de las hembras amíticas senescentes y de las hembras míticas jóvenes podría ser en parte espuria, ya que ninguna de estas dos clases de hembras produce huevos de hembra en sus ovarios. No obstante, una gran parte del proteinograma se encuentra implicada en esta similitud, la cual no sólo incluye la ausencia y disminución correlacionada de la intensidad de ciertas bandas, sino también el aumento de intensidad de una determinada banda (véase la banda número 36 en la figura 10.2). Dicho aumento constituye un rasgo muy característico del patrón senescente. Los resultados sugieren que el proceso de envejecimiento se produce antes en las hembras míticas no fertilizadas que en las hembras amíticas. Esta conclusión se encuentra reforzada por los datos electroforéticos resultantes de un estudio realizado con carácter exploratorio y en el que se compararon hembras míticas y amíticas de 2, 4, 6, 8, y 10 días de edad. Aunque únicamente se consideró una hembra mítica para cada edad, las hembras míticas parecen mostrar una aproximación más rápida al patrón característico de la senescencia. El patrón proteico de las hembras míticas coincide pues, en su mayor parte, con el de las hembras amíticas pero aparecen rasgos correspondientes al fenómeno de envejecimiento. De esta manera gran parte de las diferencias encontradas entre los patrones de ambos tipos de hembras se pueden interpretar en función de fenómenos de senescencia, si bien algunas de ellas son únicamente atribuibles a la clase de hembra.

Dentro de un marco fisheriano, el envejecimiento más rápido de las hembras míticas no fertilizadas de *Brachionus plicatilis* que revelan los resultados bioquímicos y los datos demográficos presentados aquí, puede interpretarse como una consecuencia de que ambos tipos de hembras presenten diferentes patrones para la asignación energética en reproducción. Epp y Lewis (1979) tratan de explicar el significado adaptativo del dimorfismo sexual en muchas especies de rotíferos a través de la ventaja selectiva que supone el producir un mayor número de machos por unidad de tiempo, como consecuencia del menor tamaño de los machos (véase también más arriba). Las presiones de selección habrían favorecido en el curso de la evolución a aquellas hembras que proveen a su descendencia masculina únicamente con la energía mínima

necesaria para lograr reproducirse, de manera que es posible maximizar el número de huevos producidos por unidad de tiempo. Los resultados presentados aquí muestran que el número de huevos producidos por unidad de tiempo es mayor para las hembras míticas que para las amíticas, aunque el número total de huevos producidos es aproximadamente el mismo. Por lo tanto, de acuerdo con Epp y Lewis (1979) el valor adaptativo del pequeño tamaño de los huevos vendría determinado en mayor medida por la ventaja de poder responder rápidamente a los estímulos ambientales que por la ventaja de producir muchos huevos por unidad de tiempo. Otra consecuencia de la menor talla de los machos es la posibilidad de aumentar su velocidad absoluta de natación, sin que este aumento de actividad implique un aumento desmesurado en el consumo energético (Epp y Lewis, 1979). No obstante, la ventaja selectiva que supondría esto con respecto a la probabilidad de encuentro entre macho y hembra es muy baja, aunque no puede despreciarse (Snell y Garman, 1986).

Los resultados obtenidos aquí son consistentes con la interpretación propuesta por Epp y Lewis (1979). Las hembras míticas no fertilizadas incrementarían su eficacia aumentando su tasa de producción de descendencia (menor G_c). Pero adicionalmente, la disminución en G_c para las hembras míticas se encuentra correlacionada con una disminución de la duración de la vida (veáanse la figura 10.3 y la tabla 10.1) muy probablemente lo primero sea la causa de lo último. *A priori* parece posible que una relación causal inversa, pudiera subyacer a la covariación observada: una menor e_0 causaría una lógica restricción de la fecundidad a las edades menores –causando menores R_0 ,– que implicaría una disminución espuria en G_c . No obstante, esta explicación es improbable puesto que la correlación entre las diferencias en G_c y e_0 se mantiene cuando las hembras míticas presentan valores de R_0 , iguales o mayores que los de las hembras amíticas (véanse en la figura 10.3 $\Delta R_0 \leq 0$). Además, según Serra (1987), las hembras míticas analizadas morían con el germovitelario agotado y poseían periodo postreproductivo, por lo tanto G_c de las hembras míticas no es menor por el simple hecho de que las hembras míticas vivan menos.

En los ciclos vitales de los organismos existe un compromiso entre las dos componentes para la asignación energética: el crecimiento somático y la reproducción (p.e., Stearns, 1976; Calow, 1979). Por lo tanto, un aumento en la proporción de energía canalizada a la reproducción, aunque aumente la eficacia, puede implicar también un costo funcional, puesto que un aumento en la asignación actual en reproducción puede afectar adversamente a la supervivencia futura ("coste de la supervivencia"), a la reproducción futura ("coste de la reproducción") o a ambas (Calow, 1979). Este tipo de

correlaciones negativas entre los rasgos de la historia vital ha sido puesto de manifiesto en los rotíferos (Snell y King, 1977; Bell, 1984b; Rao y Sarma, 1988). A partir de todas las observaciones realizadas en el presente trabajo se puede proponer que la disminución de G_c en las hembras míticas de *B. plicatilis* no sólo se consigue asignando menos recursos por descendiente, sino también aumentando la asignación reproductiva o el costo reproductivo durante los primeros estadios de la vida. De hecho, la asignación reproductiva total es probablemente menor en las hembras míticas no fertilizadas ya que tienen un número de descendientes parecido pero de menor tamaño. Sin embargo, una mayor asignación reproductiva específica de edad en las hembras míticas jóvenes podría explicar el envejecimiento más rápido de estas hembras que reflejan sus patrones de proteínas.

Esta hipótesis exige que haya una ventaja selectiva muy importante en la producción temprana de machos, ventaja capaz de compensar el deterioro corporal que dicha producción produciría. Esta ventaja puede derivarse de la siguiente explicación. *Brachionus plicatilis* es un estratega de la r (Walker, 1981) cuyos valores para la tasa intrínseca de reproducción (r) pueden alcanzar 1.9 días^{-1} (Serra, 1987). Sin embargo, las hembras amíticas tienen un periodo reproductivo más largo que el esperado a partir de la contribución específica de edad a r (King, 1982). Patrones similares han sido interpretados como una adaptación a las fluctuaciones ambientales (Perron, 1983), y se ha puesto de manifiesto que la reproducción asexual se encuentra orientada a la permanencia y/o crecimiento de la población. Por contra, cuando se induce la reproducción sexual se produce una disminución en el tamaño de la población, tal y como se ha comentado en capítulos anteriores de esta tercera parte. Cuando el número de hembras míticas susceptibles de fertilización disminuye, una producción rápida de machos podría ser ventajosa puesto que los machos aparecidos tempranamente aumentarían su probabilidad de llevar a cabo una copulación. Esta situación podría darse, por ejemplo, como consecuencia de la disminución en el tamaño total de la población, permaneciendo la tasa de mixis constante. Si esta interpretación es correcta, en determinadas condiciones poblacionales una asignación reproductiva más alta durante los primeros días de vida de las hembras míticas en relación con las amíticas, podría ser selectivamente ventajosa, y consecuentemente la selección de este rasgo causaría un envejecimiento más temprano y una menor duración de la vida en este tipo de hembras.

Otra posible explicación para el envejecimiento temprano de las hembras míticas vendría dada por la existencia de una relación entre el final del periodo reproductivo y el

comienzo del envejecimiento somático, tal y como proponen las teorías sobre el envejecimiento que lo consideran un suceso programado. Dichas teorías resultan apoyadas por algunas observaciones realizadas en rotíferos (Meadow y Barrows, 1971b; Enesco *et al.*, 1989a; véase también el capítulo 6).

Como conclusión se puede establecer que, las hembras míticas desarrollan antes sus funciones reproductivas, y también envejecen y mueren antes, bien porque existe una relación adaptativa que colapsa la vida dependiendo de la reproducción, bien porque la mayor velocidad en la producción de machos, cuando éstos son menores que las hembras, eleva el desgaste metabólico de las madres.

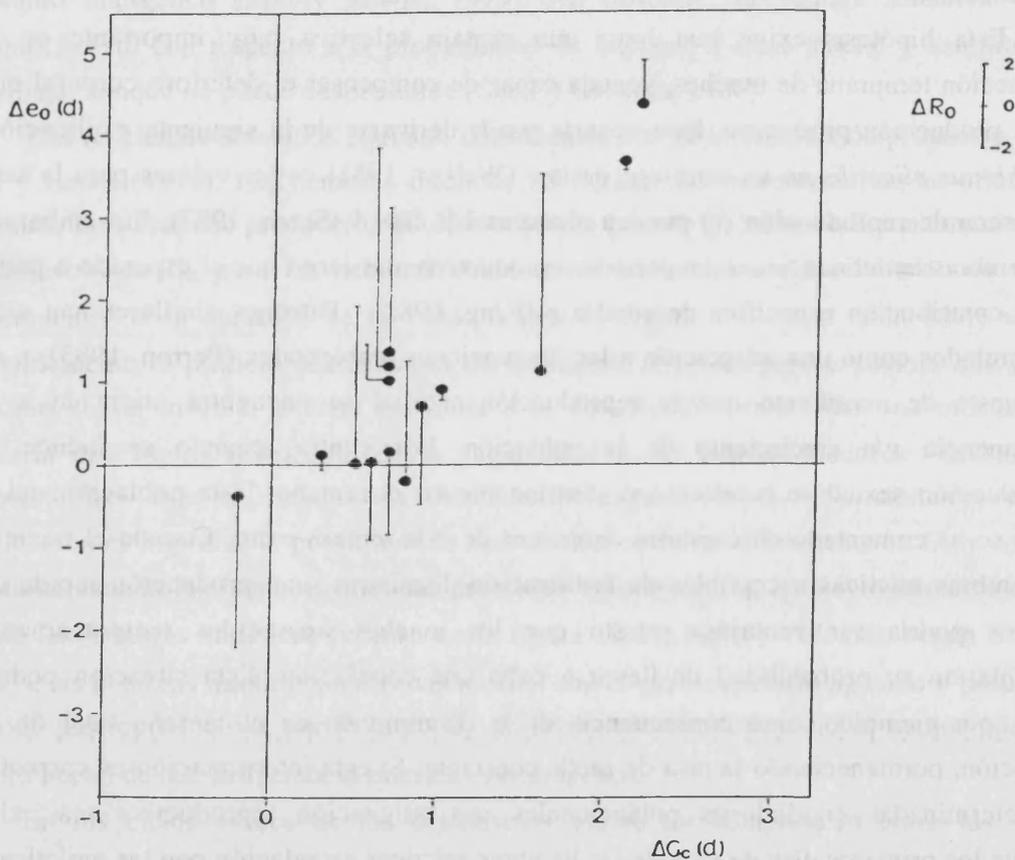


Figura 10.3. Relación entre la diferencia en e_0 entre hembras amíticas y míticas de *Brachionus plicatilis*, y la correspondiente diferencia en G_c . Sobre cada uno de los puntos se representa mediante una barra vertical la diferencia en R_0 entre los dos tipos de hembras, de acuerdo con la escala que se indica en la parte superior derecha. ($\Delta e_0 = e_0$, amíticas - e_0 , míticas; $\Delta R_0 = R_0$, amíticas - R_0 , míticas; $\Delta G_c = G_c$, amíticas - G_c , míticas).

CONCLUSIÓN

11. CONSIDERACIONES FINALES Y CONCLUSIONES

11.1. CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

La densidad de población es un factor clásico en los experimentos de inducción de la reproducción sexual en el género *Brachionus* (e.g., Buchner, 1941a,b; Gilbert, 1963b). El efecto positivo de este factor sobre la producción de hembras míticas en la especie *Brachionus plicatilis* resulta apoyado por los resultados de los capítulos anteriores (capítulos 8 y 9). Éstos, además, tienen implicaciones importantes en la determinación de la naturaleza del mecanismo de acción de la densidad de población sobre la mixis. Aunque en los estudios sobre inducción de la mixis, la existencia de un estímulo asociado al hacinamiento y mediado por una sustancia química se ha sospechado desde hace mucho tiempo (Buchner, 1941b; Gilbert, 1963b), la existencia de dicha sustancia no había sido demostrada de forma inequívoca. En este sentido los experimentos con medio precondicionado evidencian la existencia de un mecanismo químico y por lo tanto sugieren que el efecto de la densidad de población está, al menos en parte, químicamente mediado. La respuesta a la modificación química del medio en *Brachionus* no se encuentra restringida a la inducción de la reproducción sexual. Otros ejemplos de respuestas mediadas químicamente incluyen la inducción de espinas posterolaterales en *Brachionus calyciflorus* por una sustancia secretada en el medio por su depredador *Asplanchna* (Gilbert, 1967) y el comportamiento reproductivo de los machos durante el apareamiento (Gilbert, 1963a; Snell y Hawkinson, 1983). Por lo tanto, las señales químicas parecen tener importancia general en la conducta y en las adaptaciones del ciclo vital de este género.

A pesar de la relevancia de la densidad de población sobre la mixis en *B. plicatilis*, sus efectos positivos pueden ser modulados por otros factores entre los que cobran especial importancia factores internos tales como la edad de la madre y su genotipo. Este estudio demuestra la existencia de diferencias intraespecíficas en el control de la reproducción sexual dentro de esta especie (capítulo 8); los resultados del análisis electroforético de las cepas muestran una elevada diversidad genética entre ellas (capítulo 5), diversidad que se ha logrado poner de manifiesto mediante análisis de proteínas totales y que afecta también a la capacidad de las cepas para reaccionar al factor densidad. Los rotíferos de especies eurioicas, como es el caso de *Brachionus plicatilis*, ocupan un amplio rango de hábitats diferentes, y por lo tanto no es razonable pensar que su respuesta a un determinado factor ambiental deba ser la misma en todos

ellos. En particular, cabría esperar que los factores asociados con el hacinamiento de la población tuvieran una importancia variable en las diferentes poblaciones y hábitats, determinando sobre todo diferentes umbrales para los cuales se expresa respuesta.

Las observaciones anteriores ponen de manifiesto la necesidad de incorporar la variación intraespecífica en los estudios de laboratorio sobre los mecanismos de inducción de la mixis para evitar las generalizaciones infundadas, al tiempo que explican algunos resultados aparentemente contradictorios que se desprenden de trabajos realizados con cepas distintas de una misma especie. En este sentido, este estudio constata la ya conocida diversificación genética del rotífero *B. plicatilis*, diversificación que afecta a las proteínas mayoritarias. Esto se ha logrado demostrar mediante el desarrollo de una técnica que permite el análisis de muestras individuales, de manera que el control de la variación asociada al estado fisiológico del organismo puede ser lograda sin excesivos costos de experimentación y existe seguridad de que la comparación entre electroforegramas implica a genotipos diferentes. Lo importante de la referida diversificación genética, en el contexto del presente estudio, es su relación con aspectos de la fase sexual; así, como se ha comentado, es relevante que afecte a la inductibilidad de la mixis, pero también, el que diferentes respuestas míticas y/o comportamientos sexuales puedan reforzar la divergencia genética. Por ejemplo, los estudios sobre variabilidad genética intraespecífica realizados con anterioridad mediante aproximaciones metodológicas diferentes, casi con la misma colección de cepas, en esta misma especie apuntan al igual que los reseñados aquí (capítulo 5) hacia un elevado grado de homogeneidad poblacional que contrasta con la gran diversidad entre poblaciones de distintas lagunas o de distintos momentos del año. La debilidad del flujo genético entre lagunas distantes y una competencia intraespecífica elevada podrían constituir explicaciones pausibles para estos resultados. Por otra parte el carácter esporádico de la reproducción sexual, las diferentes respuestas de las cepas a los estímulos de la mixis, y el comportamiento reproductivo de los machos tendente al apareamiento intraclónico (Snell y Hawkinson, 1983) podrían contribuir al establecimiento de barreras al flujo genético entre las poblaciones de rotíferos. Por ello sería interesante conocer la importancia del flujo genético entre las poblaciones naturales de *Brachionus plicatilis*.

El alto grado de fragmentación genética de la especie queda patente en el estudio de la asociación entre la morfología y los patrones de variación deducidos a partir de los electroforegramas de proteínas totales, ya que dicho estudio indica que la subdivisión de *Brachionus plicatilis* en los dos morfotipos S y L es significativa desde el punto de vista

de su constitución genética (capítulo 5). La divergencia genética entre los dos tipos morfológicos S y L ha sido establecida mediante otras metodologías (Fu *et al.*, 1991a,b). Estudios recientes (Rumegan *et al.*, 1991) sugieren que las diferencias entre los cariotipos de los dos morfotipos son tan pronunciadas que podrían considerarse dos especies diferentes, aunque se desconocen los mecanismos de aislamiento reproductivo que han podido operar en la diferenciación de ambos tipos.

En este sentido, y puesto que el reconocimiento para la cópula constituye un factor clave en el aislamiento reproductivo de los rotíferos y en la evaluación del flujo genético, los resultados del presente trabajo establecen la relevancia de un mejor conocimiento de los mecanismos de la comunicación química entre macho y hembra durante el apareamiento, de manera que se pudieran desarrollar pruebas rápidas para la cuantificación del grado de aislamiento reproductivo (Snell, 1989).

Junto al genotipo, la edad materna limita o regula la respuesta a la densidad, lo cual resulta particularmente interesante por la importancia que la estructura en edades de la población puede tener sobre la respuesta mítica observada por el experimentador. La edad comporta cambios importantes en la fisiología de las hembras que de nuevo se manifiestan en variaciones en los rasgos demográficos y en la composición proteínica, los cuales se han podido observar gracias a la utilización de una técnica de análisis de proteínas sensible no sólo a diferencias genéticas sino también a los estados fisiológicos relacionados con la edad, técnica por otra parte que también ha permitido encontrar diferencias entre hembras míticas y amíticas.

Los resultados del presente trabajo establecen otros nexos entre edad y características reproductivas y suscitan cuestiones relativas al envejecimiento interesantes desde una perspectiva ecológica y evolutiva. Las diferentes conductas reproductivas, que presentan los dos tipos de hembras que aparecen en el ciclo vital de los rotíferos tienen implicaciones importantes en otros rasgos de su historia vital tales como la supervivencia y el envejecimiento. En este sentido, la aceleración de la senescencia en las hembras míticas de *Brachionus plicatilis*, al parecer como consecuencia de un mayor esfuerzo reproductivo temprano, tiene claras conexiones con las teorías que dentro del marco teórico de la ecología fisiológica (Townsend y Calow, 1981) se han desarrollado para explicar la existencia de los procesos de senescencia, y las tasas con las que estos procesos progresan. Los recursos asignados a la reproducción dejan de estar disponibles para el crecimiento y mantenimiento somáticos. La reproducción temprana puede dar lugar a un deterioro permanente en las condiciones somáticas que se vería reflejado en una reducción de la esperanza de vida o de la

fertilidad subsecuente. Kirkwood (1981) ha sugerido que el mantenimiento somático mediante procesos de reparación podría tener importancia general en el retraso de la senescencia. Esta teoría, que trata de explicar la senescencia en un nivel próximo, el fisiológico, es convergente con las teorías que tratan de explicarla a un nivel último, el evolutivo (capítulo 6). La teoría evolutiva del envejecimiento basada en la acción antagónica de genes pleiotrópicos introduce la idea de un compromiso entre los beneficios obtenidos al principio de la vida y los costos en la edad adulta. Ambas explicaciones de la senescencia convergen en la sugerencia de que su evolución puede comprenderse mejor como una consecuencia de la prioridad que la selección natural le confiere a la reproducción (Kirkwood y Rose, 1991).

La visión de la reproducción sexual en *B. plicatilis* que se desprende del presente trabajo es la de una respuesta reproductiva compleja en la que dos grupos de factores son decisivos: las condiciones del ambiente a partir del cual surge el estímulo inductor de la respuesta mítica, y las condiciones internas del animal. Hasta el momento la mayoría de las investigaciones se han centrado fundamentalmente en las primeras condiciones. Quizás las investigaciones en un futuro deberían dirigirse hacia un estudio más profundo del conjunto de condiciones endógenas y de los mecanismos que determinan la capacidad de reaccionar a los estímulos externos.

Desde un punto de vista evolutivo, el control de la reproducción sexual por factores ambientales en los ciclos vitales de los rotíferos partenogenéticos cíclicos debió surgir como respuesta a la necesidad de asociar el momento del cambio con un factor ambiental o un estado fisiológico que reflejara condiciones adecuadas para una optimización de la producción de huevos durables (Gilbert, 1980b) aunque, por los resultados del modelo teórico expresado aquí, no se pueden descartar procesos de selección dependiente de frecuencias, con lo que no necesariamente se maximizaría la producción total de huevos de resistencia. En cualquier caso, en la evolución del control de la reproducción sexual, la producción de hembras míticas habría dejado de ser un suceso errático para ser confinado a los momentos o condiciones que con gran probabilidad dieran como resultado encuentros sexuales frecuentes, fertilización de muchas hembras míticas, y producción de un gran número de huevos durables. Así, la reproducción sexual aparecería de forma ocasional y eficiente, y no interferiría de forma constante con la capacidad de la población para aumentar en número vía reproducción partenogenética.

Puesto que la fase sexual en los ciclos vitales de los rotíferos heterogónicos resulta inducida por diferentes factores en los diferentes géneros, e incluso pueden existir

diferencias entre especies de un mismo género, es lógico suponer que la respuesta a estos factores resultará particularmente adaptativa en cada uno de estos géneros. Por lo tanto, la asociación de la producción de hembras míticas con la densidad de población implica que esta última debe de proporcionar una señal que es adaptativa para el momento de la reproducción sexual en *Brachionus plicatilis*. Así, junto a las relaciones entre densidad y mixis derivadas de constricciones de la reproducción sexual, tales como la disponibilidad de recursos y el encuentro entre macho y hembra, los resultados de las simulaciones con el modelo de optimización (capítulo 7) y los datos experimentales (capítulo 9) apuntan a que la respuesta mítica dependiente de la densidad podría constituir una estrategia para escapar mediante diapausa de un hábitat que se está deteriorando. Esta es una visión de la función de la densidad de población en la inducción de la reproducción sexual que podría tener especial relevancia en los rotíferos que ocupan hábitats con condiciones variables en el tiempo.

Por otra parte, la mayoría de las investigaciones sobre la producción de hembras míticas se ha llevado a cabo en poblaciones de laboratorio. Como consecuencia existe muy poca información sobre las tasas de mixis durante los periodos de reproducción sexual y la forma en que estas tasas se encuentran asociadas con factores tales como la densidad de población, disponibilidad de diferentes tipos de alimento, y parámetros físico-químicos. Resultaría particularmente interesante este tipo de información para mejorar tanto la comprensión de las interrelaciones entre la dinámica poblacional y la reproducción sexual de una especie, como la apreciación del significado adaptativo de la reproducción sexual y de la naturaleza de su control.

11.2. CONCLUSIONES

A continuación se enumeran las principales conclusiones que pueden obtenerse de los resultados encontrados en el presente trabajo, así como de su discusión.

1. El análisis de las proteínas totales, gracias al sistema metodológico desarrollado, permite obtener del extracto de un sólo individuo un patrón de proteínas lo suficientemente complejo para una efectiva detección de variabilidad individual en el rotífero *Brachionus plicatilis*.
2. El análisis de proteínas totales muestra un elevado grado de variabilidad interpoblacional que confirma el carácter politípico de la especie *Brachionus plicatilis*

puesto de manifiesto mediante otras aproximaciones metodológicas. El análisis de proteínas totales sugiere una importante relación entre el patrón de proteínas y el morfotipo (S o L) que presentan las cepas. En algunos ecosistemas la variabilidad intrapoblacional es reducida y los patrones de proteínas parecen tener un ciclo anual que se repite en años sucesivos.

3. El crecimiento somático en longitud y anchura de *Brachionus plicatilis* es un proceso finito que sigue una dinámica del tipo "curva de saturación". La deceleración del proceso de crecimiento con el inicio del periodo reproductivo (aproximadamente entre el primer y el segundo día de vida, a 25°C y 12 g/l de salinidad en la cepa CU) puede relacionarse con el hecho de que el individuo dispone de una cantidad de energía que es limitada: la asignación de recursos a la reproducción frena la tasa de crecimiento somático. El tamaño máximo se alcanza hacia la mitad de la vida máxima, que es cuando empieza el periodo postreproductivo en las condiciones mencionadas.

4. Durante el proceso de envejecimiento se produce una serie de cambios morfológicos que permiten identificar a los rotíferos senescentes. Entre los cambios observados, y según resulta del estudio biométrico, se encuentra el ensanchamiento de la parte posterior de la lóriga, sin crecimiento longitudinal ni de la anchura de la parte anterior, lo que sugiere que el referido ensanchamiento es de naturaleza distinta a los procesos de crecimiento somático juvenil, así como que podría deberse a algún proceso de distensión muscular.

5. El análisis electroforético de las proteínas durante la vida de los individuos permite detectar cambios dependientes de la edad en el conjunto de proteínas totales, lográndose una caracterización del envejecimiento de los individuos. Los cambios en intensidad y número de bandas que pone de manifiesto la comparación entre los electroforegramas característicos de individuos jóvenes y senescentes confieren un aspecto global determinado al patrón proteínico, el cual se torna identificable en función de la edad del individuo. Estos resultados tienen gran interés en los estudios sobre envejecimiento pues implican la posibilidad de disponer de una medida de la edad fisiológica de los individuos mediante el uso de un método bioquímico. Los patrones de proteínas totales de los individuos jóvenes se caracterizan por presentar una gran uniformidad entre ellos. Sin embargo, a una cierta edad de los individuos, se producen cambios en los perfiles de proteínas generándose una gran variabilidad relativa entre individuos de la misma edad

cronológica. La edad a la cual aparecen los cambios característicos del envejecimiento coincide con la edad media del cese del crecimiento somático y de la reproducción, y se encuentra muy próxima a la duración media de la vida.

6. Los resultados del análisis bioquímico ilustran la diferencia entre edad cronológica y edad fisiológica; la tasa de envejecimiento es diferente incluso entre individuos isogénicos cultivados en las mismas condiciones ambientales. Existe una plasticidad temporal importante en el desarrollo del proceso de envejecimiento, la cual no se debe únicamente a las condiciones genéticas o del ambiente general de los individuos, y en la que podrían estar implicados factores aleatorios intrínsecos, efectos maternos y/o agentes infecciosos.

7. Las simulaciones con el modelo de optimización desarrollado muestran que cuando la tasa de mixis se mantiene constante a lo largo del tiempo, la máxima producción de huevos durables se obtiene para tasas de mixis bajas ($< 10\%$).

8. En las simulaciones llevadas a cabo suponiendo una tasa de mixis variable (*i.e.*, la tasa de mixis cambia de cero a un valor diferente de cero), la tasa de mixis óptima es 1. Además, cuanto menor es la tasa de mixis, más temprano es el día óptimo para la inducción de la misma (atendiendo a la producción de huevos durables).

9. Los resultados de las simulaciones realizadas con el modelo establecen de forma reiterada que el momento idóneo para la inducción de la mixis –atendiendo a la producción de huevos durables– es ligeramente anterior al momento en que la tasa potencial de crecimiento se hace negativa; es decir, cuando el hábitat deja de ser adecuado para el crecimiento poblacional.

10. El análisis de estabilidad evolutiva o invasibilidad sugiere que se puede mantener en la población un polimorfismo genético para el momento de la mixis, el cual causaría en promedio una inducción de la mixis más temprana que en una población homogénea para la estrategia óptima.

11. Las experiencias realizadas con cultivos individuales, sin interferencia del efecto del agrupamiento, si son analizadas de forma estadística global, ponen de manifiesto una tendencia al aumento de la proporción de reproducción sexual con el incremento de la

densidad. Si se comparan estas experiencias, realizadas sin renovación del medio, con las realizadas cambiando el medio de cultivo cada 24 horas, se observa que en este último caso se suprime de forma efectiva la reproducción sexual en el clon CU de *Brachionus plicatilis*. Esto sugiere que la densidad de población ejerce su efecto a través de algún factor que condiciona el medio.

12. La densidad de población ejerce un efecto negativo en la duración media de la vida y en la tasa neta de reproducción de las cepas estudiadas. Este efecto negativo se conservó, aunque con menor intensidad, en la experiencia realizada con la cepa CU en la que el medio de cultivo se renovó diariamente, de lo cual se deriva que la relación entre la densidad y los parámetros demográficos se debe a una alteración de las condiciones del medio durante el periodo de cultivo.

13. No existe relación entre la tasa de mixis y la tasa neta de reproducción (R_0). Esto y la influencia negativa de la densidad de población sobre R_0 permite concluir que la producción de mayores proporciones de hembras míticas a la densidad poblacional más alta no está directamente asociada con mayores tasas netas de reproducción.

14. Existe una variabilidad intercepa en la respuesta mítica a la densidad. Estas diferencias cuantitativas en la respuesta mítica de las cepas se manifiestan tanto en la intensidad de la respuesta como en los valores de densidad a los que las cepas responden.

15. El grado de variabilidad en la respuesta mítica a la densidad entre cepas derivadas de huevos durables procedentes de una cepa es similar al que existe entre cepas no emparentadas, lo cual pone de manifiesto la capacidad de generar variabilidad genética que tiene el proceso de recombinación durante la reproducción sexual, así como la elevada varianza que con respecto a la respuesta mítica puede mantenerse en el genoma de una cepa.

16. Los rasgos vitales diferentes de la respuesta mítica presentan también una alta variabilidad entre las cepas establecidas a partir de huevos durables procedentes de una misma cepa. Como consecuencia, no resulta adecuado el uso de cultivos procedentes de huevos durables para estandarizar repeticiones dentro de un mismo diseño experimental.

17. La aparición de descendientes míticas entre la progenie de las hembras de *Brachionus plicatilis* no es constante a lo largo de su periodo reproductivo. Los cambios de las tasas de mixis en relación con el tiempo de cultivo de las hembras experimentales dependen de la cepa a la que pertenecen y de las condiciones de densidad en las que se cultivan. No obstante, considerando globalmente los resultados, el patrón más general es aquél en el que la mayor proporción de nacimientos de hembras míticas se produce durante la primera parte del periodo reproductivo de las madres y va disminuyendo a lo largo del periodo de cultivo.

18. Los resultados de los experimentos realizados con medio precondicionado en cultivos masivos confirman el efecto de la densidad poblacional sobre la reproducción sexual en *Brachionus plicatilis*.

19. Los resultados de los experimentos realizados con medio precondicionado proporcionan una prueba directa positiva para la hipótesis según la cual la densidad poblacional actúa sobre la mixis mediante la acumulación de un metabolito en el medio de cultivo. La promoción de la mixis mediante el hacinamiento de los individuos parece ser un fenómeno dependiente de la densidad que se encuentra, al menos en parte, mediado químicamente. Los resultados obtenidos con cultivos individuales sugieren que el efecto químicamente mediado ejercido por el hacinamiento no sólo aumenta la producción de hembras míticas sino que tiene capacidad para inducir dicha producción.

20. La inducción de la mixis por el condicionamiento del medio es en algún grado un efecto inespecífico, como muestra el hecho de que dicho condicionamiento se logre mediante el cultivo de *Artemia salina*. Ello sugiere que la función que desempeña la densidad de población en la inducción de la mixis podría estar relacionada con una estrategia para escapar mediante diapausa de un hábitat que está demasiado saturado y va dejando de ser adecuado para el crecimiento poblacional.

21. Los resultados del análisis bioquímico y los datos demográficos presentados revelan un desarrollo reproductivo y un envejecimiento más rápido de las hembras míticas no fertilizadas que de las hembras amíticas de *Brachionus plicatilis*, lo cual puede interpretarse como una consecuencia de la existencia de diferentes patrones para la asignación energética en reproducción en ambos tipos de hembras. El número de huevos producidos por unidad de tiempo es mayor en las hembras míticas que en las amíticas,

aunque el número total de huevos producidos es similar. La disminución en el tiempo de generación en las hembras míticas de *B. plicatilis* parece alcanzarse, no sólo asignando menos recursos por descendiente, sino también aumentando la asignación reproductiva o el costo reproductivo durante los primeros estadios de la vida, de manera que el envejecimiento sería más rápido en estas hembras como reflejan sus patrones de proteínas. Esta hipótesis exige que haya una ventaja selectiva muy importante en la producción temprana de machos.

El presente estudio en *Brachionus plicatilis* proporciona nueva información sobre la biología de la reproducción sexual de esta especie. Pone de manifiesto la importancia de la densidad como factor inductor y demuestra la existencia de diferencias intraespecíficas en el control de la reproducción sexual en esta especie. Además, ayuda a interpretar el significado funcional de la respuesta mítica a la densidad en *B. plicatilis*. Finalmente, permite una aproximación al análisis del significado ecológico de la evolución de los estímulos para la transición de la reproducción partenogenética a la sexual dentro del ciclo vital.

BIBLIOGRAFÍA

- Afifi, A.A., y S.P. Azen, 1979. *Statistical Analysis. A computer oriented approach*. Academic Press, London, 442 pp.
- Ahlstrom, E.H., 1940. A revision of the rotatorian genera *Brachionus* and *Platyias* with descriptions of one new species and two new varieties. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 77: 143–184.
- Amat, F., 1980. Diferenciación y distribución de las poblaciones de *Artemia* (Crustáceo, Branquiópodo) de España. I. Análisis morfológico. Estudios alométricos referidos al crecimiento y la forma. *Inv. Pesq.* 44: 217–240.
- Amren, H., 1964. Ecological and taxonomical studies on zooplankton from Spitsbergen. *Zool. Bidr. Upps.* 36: 209–276.
- Aronovich, T.M., y L.V. Spektorova, 1974. Survival and fecundity of *Brachionus calyciflorus* in water of different salinities. *Hydrobiol. J.* 10: 71–74.
- Avise, J.C., 1974. Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.* 23: 465–481.
- Barrows CH. H., y G.C. Kokkonen, 1985. Rotifers. *Interdiscipl. Topics Geront.* 21: 188–200.
- Beauchamp, P. De, 1935. Sur les caractères des deux sortes de femelles chez *Asplancha girodi* de Guerne (rotifère). *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 120: 126–128.
- Baumont A., y C. Cassier, 1981. *Biologie animale*, Tome 1. Dunod, 459 pp.
- Begon, M., J.L. Harper, y C.R. Townsend, 1990. *Ecology: individuals, populations and communities*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 945 pp.
- Bell, G., 1982. *The Masterpiece of Nature –The Evolution and Genetics of Sexuality*. University of California Press, Berkeley, California, 635 pp.
- Bell, G., 1984a. Evolutionary and nonevolutionary theories of senescence. *Am. Nat.* 124: 600–603.
- Bell, G., 1984b. Measuring the cost of reproduction. I. The correlation structure of the life table of a planktonic rotifer. *Evolution* 38: 300–313.
- Ben-Amotz, A., y R. Fishler, 1982. Induction of sexual reproduction and resting egg production in *Brachionus plicatilis* by a diet of salt grown *Nannochloris oculata*. *Mar. Biol.* 67: 289–294.
- Bender, K., y W. Kleinow, 1988. Chemical properties of the lorica and related parts from the integument of *Brachionus plicatilis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 89: 483–487.
- Bernstein, H., G.S. Byers, y R.E. Michod, 1985. Genetic damage, mutation, and the evolution of sex. *Science* 229: 1277–1281.

- Bertalanffy, L., 1948. Das organische Wachstum und seine Gesetzmässigkeiten. *Experientia* 4: 255–269.
- Bérzins, B., 1960. Rotatoria IV. Order: Monogononta. Sub-order Ploima. Family: Brachionidae (cont.). Genera: *Brachionus*, *Kellicottia*, *Argonotholca*, *Notholca*, *Pseudonotholca*, *Euchlanis*, *Tripleuchlanis*. *Cons. Sci. Explor. Mer Zooplankton Sheet*, 87.
- Birky, C.W., 1969. The developmental genetics of polymorphism in the rotifer *Asplanchna*. III. Quantitative modification of developmental responses to vitamin E, by the genome, physiological state, and population density of responding females. *J. Exp. Zool.* 170: 437–448.
- Birky, C.W., y J.J. Gilbert, 1971. Parthenogenesis in rotifers: The control of sexual and asexual reproduction. *Am. Zool.* 11: 245–266.
- Birky, C.W., y J.J. Gilbert, 1972. Vitamin E as an extrinsic and intrinsic signal controlling development in the rotifer *Asplanchna*: uptake, transmission, and localization of H³-alpha-tocopherol. *J. Exp. Morphol.* 27: 103–120.
- Bogoslavsky, A.S., 1963. Materials to the study of the resting eggs of rotifers. Communication I. *Byull. Mosk. Obshch. Ispyt. Prir.* 68: 50–67.
- Bozovic, V., y H. E. Enesco, 1986. Effect of antioxidants on rotifer lifespan and activity. *Age* 9: 41–45.
- Brighwelli, T., 1848. Some account of a dioecious rotifer, allied to the genus *Notommata* of Ehrenberg. *Ann. Mag. Nat. Hist. Ser. 2*: 153–158.
- Buchner, H., 1941a. Entwicklungsphysiologische Untersuchungen über den Determinationspunkt. *Arch. Entwicklunsmech. Organ.* 141: 145–158.
- Buchner, H., 1941b. Experimentelle Untersuchungen über den Generationswechsel der Rädertiere. II. *Zool. Jahrb. Abt. Allg. Zool. Physiol.* 60: 279–344.
- Buchner, H., 1977. Physiological basis of the reproduction of heterogonus rotatoria. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 8: 167–168.
- Buchner, H., 1987. Studies on the control of heterogonus reproduction in Rotifers. III. The loss of mictic potential in *Brachionus urceolaris*. *Arch. Hydrobiol.* 109: 333–354.
- Buchner, H., C. Mutschler, y H. Kiechle, 1967. Die Determination der Männchen- und Dauereiproduktion. *Biol. Zent.* 86: 599–621.
- Butcher, A., y J.K. Tomkins, 1985. A comparison of silver stain methods for detecting proteins in ultrathin polyacrylamide gels on support film after isoelectric focusing. *Anal. Biochem.* 148: 384–388.
- Calow P., 1978. *Life cycles*. Chapman and Hall, London, 164 pp.
- Calow P., 1979. The cost of reproduction. A physiological approach. *Biol. Rev.* 54: 23–40.

- Carlin, B., 1943. Die Planktonrotatorien des Motalaström. Medd. Lunds Univ. Limnol. Inst 17: 1-163.
- Champ, P., y R. Pourriot, 1977. Reproductive cycle in *Sinanterina socialis*. Arch. Hydrobiol. Beih. 8: 184-186.
- Charlesworth, B., 1980. Evolution in age-structured populations. Cambridge University Press, Cambridge, 300 pp.
- Cherret, J.M. (ed.), 1989. Ecological concepts. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Chotiyaputta, C., y K. Hirayama, 1978. Food selectivity of the rotifer *Brachionus plicatilis* feeding on phytoplankton. Mar Biol. 45: 105-111.
- Clément, P., 1969. Premières observations sur l'ultrastructure comparée des teguments des rotifères. Vie et Milieu A, 20: 461-482.
- Clément, P., 1975. Ultraestructura de l'oeil cérébral d'un rotifère *Trichocerca rattus*. J. Microscopie Biol. Cell. 22: 69-86.
- Clément, P., 1977. Ultrastructural research on rotifers. Arch. Hydrobiol. Beih. 8: 270-297.
- Clément, P., y J. Amsellem 1989. The skeletal muscles of rotifers and their innervation. Hydrobiologia 186/187: 255-278.
- Clément, P., y R. Pourriot, 1972. Photopériodisme et cycle hétérogonique chez certains rotifères monogonontes. I. Observations préliminaires chez *Notommata copeus*. Arch. Zool. Exp. Gen. 113:41-50.
- Clément, P., y R. Pourriot, 1973a. Influence de la densité de population sur la production de femelles mictiques induites par photopériode chez *Notommata copeus* (rotifère). C.R. Acad. Sci., Paris 276: 3151-3154.
- Clément, P., y R. Pourriot, 1973b. Mise en evidence d'un effect de masse et d'un effect de groupe dans l'apparition de phases de reproduction sexuée chez le rotifère *Notommata copeus*. C.R. Acad. Sci., Paris 277: 2533-2536.
- Clément, P., y R. Pourriot, 1975. Influences du groupement et de la densité de population sur le cycle de reproduction de *Notommata copeus* (rotifère). I. Mise en évidence et essai d'interpretation. Arch. Zool. Exp. Gen. 116: 375-422.
- Clément, P., y R. Pourriot, 1976a. Photopériode et cycle hétérogonique chez le rotifère *Notommata copeus*. IV. Influences de l'intensité d'éclairement en lumière monochromatique. Variations du pourcentage de femelles mictiques au cours de la ponte dels femelles parentales. Arch. Zool. Exp. Gén. 117: 205-224.
- Clément, P., y R. Pourriot, 1976b. Influence du groupement et de la densité de population sur le cycle de reproduction des rotifères. II. Comparaison de deux souches de *Notommata copeus* Ehrb. Arch. Zool. Exp. Gén. 117: 5-13.

- Clément, P., y R. Pourriot, 1977. Cytoplasmic and chromosomal inheritance of the mictic reaction in a parthenogenetic clone of *Notommata copeus*. Arch. Hydrobiol. Beih. 8: 205–206.
- Clément, P., y R. Pourriot, 1979. Influence de l'âge des grandparents sur l'apparition des mâles chez le Rotifère *Notommata copeus* Ehr. Int. J. Invert. Reprod. 1: 89–98.
- Clément, P., y R. Pourriot, 1980. About a transmissible influence through several generations in a clone of the rotifer *Notommata copeus* Ehr. Hydrobiologia 73: 27–31.
- Clément, P., C. Rougier, y R. Pourriot, 1977. Les facteurs exogènes et endogènes qui controlen l'apparition des males chez les Rotifères. Bull. Soc. zool. Fr. 101: 86–95.
- Cohen, D., 1968. A general model of optimal reproduction in a randomly varying environment. J. Ecol. 56: 219–228.
- Cohn, F., 1856. Über die Fortpflanzung der Rädertiere (*Brachionus urceolaris*). Z. wiss. Zool. 7: 430–486.
- Cole, L.C., 1954. The population consequences of life history phenomena. Q. Rev. Biol. 29: 103–137.
- Comfort, A., 1979. The biology of senescence. 3rd Edn., Elsevier North–Holland, New York.
- Conejero, V., y J.S. Semancik, 1977. Analysis of the proteins in crude extracts by polyacrylamide slab gel electrophoresis. Phytopathology 66: 1424–1426.
- Cooley, V.W., y P.K. Lohnes, 1971. Multivariate Data Analysis. J. Wiley & Sons, N.Y., 364 pp.
- Diamond, J., 1986. Overview: Laboratory experiments, field experiments, and natural experiments. En: J. Diamond y T.J. Case (eds.), Community ecology. Harper and Row, New York, 545 pp.
- Dion, A., y A.A. Pomenti, 1983. Ammoniacal silver staining of proteins: mechanism of glutaraldehyde enhancement. Anal. Biochem. 129: 490–496.
- Dixon, W.J., M.B. Brown, L. Engelman, J.W. Frane, M.A. Hill, R.I. Jennrich, y J.D. Toporek, 1983. BMDP Statistical Software. 1983 Printing with Additions. Univ. California. Berkeley, 773 pp.
- Droop, M.R., 1968. Vitamin B₁₂ and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. J. mar. biol. Ass. U.K. 48: 689–733.
- Dumont, H.J., 1983. Biogeography of rotifers. Hydrobiologia 104: 19–30.
- Edmonson, W.T., 1959. Rotifera. En: W.T. Edmonson (ed), Freshwater biology. 2nd Edition. Wiley, New York, 420–494.
- Ehremberg, C.G., 1838. Die Infusionstierchen als vollkommene Organismen. Ein Blick in das tiefere organische Leben der Natur. Leipzig: I–XVIII + 1–547.

- Elgmork, K., 1980. Evolutionary aspects of diapause in freshwater copepods. En: W.C. Kerfoot (ed.), *Evolution and Ecology of Zooplankton Communities*. Univ. Press of New England, Hanover, N.H.: 411–417.
- Enesco, H.E., V. Bozovic, y P.D. Anderson, 1989a. The relationship between lifespan and reproduction in the rotifer *Asplanchna brightwelli*. *Mechanisms of Ageing and Development* 48: 281–289.
- Enesco, H.E., y F. Holtzman, 1980. Effect of calcium, magnesium and chelating agents on the lifespan of the rotifer *Asplanchna brightwelli*. *Exp. Geront.* 15: 389–392.
- Enesco, H.E., y C. Verdone-Smith, 1980. Alfa-tocopherol increases lifespan in the rotifer *Philodinia*. *Exp. Geront.* 15: 335–338.
- Enesco, H.E., A. Wolanskyj, y M. Sawada, 1989b. Effect of copper on lifespan and lipid peroxidation in rotifers. *Age* 12: 19–23.
- Epp, R.W., y W.M. Lewis (Jr.), 1979. Sexual dimorphism in *Brachionus plicatilis* (Rotifera): evolutionary and adaptative significance. *Evolution* 33: 919–928.
- Epp, R.W., y P.W. Winston, 1977. Osmotic regulation in brackish-water rotifer *Brachionus plicatilis*: (Müller). *J. Exp. Biol.* 68:151–156.
- Eschenbruch, M., y R.R. Bürk, 1982. Experimentally improved reliability of ultrasensitive silver stain of protein in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 125: 96–99.
- Esparcia, A., y M. Serra, 1988. Efecto del alimento tratado térmicamente en el crecimiento poblacional de *Brachionus plicatilis*: Müller, 1786 (Rotífera: Brachionidae). *Inv. Pesq.* 52: 345–353.
- Fanestil, D.D., y C.H. Barrows, 1965. Aging in the rotifer. *J. Geront.* 20: 462–469.
- Ferguson, A., 1980. *Biochemical systematics and evolution*. Blakie, Glasgow, 194 pp.
- Finch, C.E., 1987. The orderly decay of order in the regulation of aging processes. En: F.E. Yates (ed.), *Self-organizing systems. The emergence of order*. Plenum Press, New York: 213–236 pp.
- Finensinger, J.E. 1926. Effect of certain chemical and physical agents on fecundity and length of life and on their inheritance in a rotifer *Lecane (Dystyla) inermis* (Brice). *J. Expl. Zool.* 44: 63–94.
- Fisher, R.A., 1930. *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford University Press, Oxford, XIV+272 pp.
- Friedman, R.D., 1982. Comparison of four different silver-staining techniques for salivary protein detection in alkaline polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 126: 346–349.
- Fu, Y., K. Hirayama, y Y. Natsukari, 1991a. Morphological differences between two types of the rotifer *Brachionus plicatilis* O.F. Müller. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 151: 29–41.

- Fu, Y., K. Hirayama, y Y. Natsukari, 1991b. Genetic divergence between S and L type strains of the rotifer *Brachionus plicatilis* O.F. Müller. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 151: 43–56.
- Gershon, H., y D. Gershon, 1970. Detection of inactive molecules in aging of the organism. *Nature* 227: 1214–1217.
- Ghiselin, M.T., 1974. *The Economy of Nature and the Evolution of Sex*. University of California Press, Berkeley, Ca.
- Gilbert, J.J., 1963a. Contact chemoreception, mating behaviour, and sexual isolation in the rotifer genus *Brachionus*. *J. Exp. Biol.* 40: 625–641.
- Gilbert, J.J., 1963b. Mictic-female production in the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *J. Exp. Zool.* 153: 113–124.
- Gilbert, J.J., 1967. *Asplanchna* and posterolateral spine production in *Brachionus calyciflorus*. *Arch. Hydrobiol.* 64: 1–62.
- Gilbert, J.J., 1968. Dietary control of sexuality in the rotifer *Asplanchna brightwelli* Gosse. *Physiol. Zool.* 41: 14–43.
- Gilbert, J.J., 1970. Monoxenic cultivation of the rotifer *Brachionus calyciflorus* in a defined medium. *Oecologia* 4: 89–101.
- Gilbert, J.J., 1973a. The induction and ecological significance of gigantism in the rotifer *Asplanchna sieboldi*. *Science* 181: 63–66.
- Gilbert, J.J., 1973b. The significance of polymorphism in the rotifer *Asplanchna*. Humps in males and females. *Oecologia* 13: 135–146.
- Gilbert, J.J., 1974. Dormancy in rotifers. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 93: 490–513.
- Gilbert, J.J., 1975a. Polymorphism and sexuality in the rotifer *Asplanchna*, with special reference to the effects of prey-type and clonal variation. *Arch. Hydrobiol.* 75: 442–483.
- Gilbert, J.J., 1975b. Polymorphism and sexuality in the rotifer *Asplanchna sieboldi*. Variability in the body-wall-outgrowth response to dietary tocopherol. *Physiol. Zool.* 48: 409–419.
- Gilbert, J.J., 1977a. Mictic-female production in monogonont rotifers. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 8: 142–155.
- Gilbert, J.J., 1977b. A note on mictic-female production in monoxenic cultures of *Brachionus calyciflorus*. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 8: 156–157.
- Gilbert, J.J., 1977c. A note on the relationships between polymorphism and mictic-female production in *Brachionus calyciflorus*. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 8: 161–162.
- Gilbert, J.J., 1977d. A note on the effect of cold shock on mictic-female production in *Brachionus calyciflorus*. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 8: 158–160.

- Gilbert, J.J., 1980a. Some effects of diet on the biology of the Rotifers *Asplanchna* y *Brachionus*. En: D.C. Smith y Y. Tiffon (eds), Nutrition in the lower metazoa. Perg. Per., Oxford: 57–71 pp.
- Gilbert, J.J., 1980b. 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. 1983a. Rotifera. En: K.G. y R.G. Adiyodi (eds.), Reproductive biology of invertebrates. Volume II. Spermatogenesis and sperm function. J. Wiley and Sons, New York: 181–195 pp.
- Gilbert, J.J. 1983b. Rotifera. En: K.G. y R.G. Adiyodi (eds.), Reproductive biology of invertebrates. Volume IV. Fertilization, development, and parental care. J. Wiley and Sons, New York: 181–193 pp.
- Gilbert, J.J. 1983c. Control of sexuality in *Asplanchna brightwelli*: threshold levels of dietary tocopherol and modification of tocopherol response by exogenous and endogenous factors. Hydrobiologia 104: 167–173.
- Gilbert, J.J., y C.W. Birky, 1971. Sensitivity and specificity of the *Asplanchna* response to dietary alpha-tocopherol. J. Nutr. 101: 113–126.
- Gilbert, J.J., y J.R. Litton, 1975. Dietary tocopherol and sexual reproduction in the rotifers *Brachionus calyciflorus* y *Asplanchna sieboldi*. J. Exp. Zool. 194: 485–494.
- Gilbert, J.J., y J.R. Litton, 1978. Sexual reproduction in the rotifer *Asplanchna girodi*: effects of tocopherol and population density. J. Exp. Zool. 204: 113–122.
- Gilbert, J.J., y G.A. Thompson, 1968. Alpha-tocopherol control of sexuality and polymorphism in the rotifer *Asplanchna*. Science 159: 734–736.
- Giulian, G.G., R.L. Moss, y M. Greaser, 1983. Improved methodology for analysis and quantitation of proteins on one-dimensional silver-stained slab gels. Anal. Biochem. 129: 277–287.
- Gladstein, D.S., N.F. Carlin, S.N. Anstad, y W.H. Bassert, 1990. The need for sensitivity analyses of dynamic optimization models. Oikos 60: 121–126.
- Granier, F., y D. De Vienne, 1986. Silver staining of proteins: standardized procedure for two-dimensional gels bound to polyester sheets. Anal. Biochem. 155: 45–50.
- Guillard, R.R.L., y J.H. Ryther, 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* (Hustedt) and *Detonula confervacea* (Cleve). Can. J. Microbiol. 8: 229–239.
- Halbach, U., y G. Halbach-Keup, 1972. Einfluss von Aussenfaktoren auf den Fortpflanzungsmodus heterogener Rotatorien. Oecologia 9: 203–214.
- Hammer, V.T., 1986. Saline lake ecosystems of the world. H.J. Dumont (ed.), Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 616 pp.

- Harvey, P.H., L. Partridge, y T.R.E. Southwood (eds.), 1991. The evolution of reproductive strategies. University Press, Cambridge.
- Hashimoto, F., T. Horigome, M. Kanbayashi, K. Yoshida, y H. Sugano, 1983. An improved method for separation of low-molecular-weight polypeptides by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* 129: 192-199.
- Hauer, 1937. Zur Kenntnis der Rotatorienfauna des Eichener See. *Bitr. Naturkd. Forsch. Südwestdeutsch.* 2: 165-173.
- Hawigara, 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.
- Hebert, P.D.N., 1987. Genotypic characteristics of cyclic parthenogens and their obligately asexual derivatives. En: S.C. Stearns (ed.), *The evolution of sex and its consequences*. Birkhäuser, Basel, Switzerland: 175-195 pp.
- Heukeshoven, J., y R. Dernick, 1985. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6: 103-112.
- Hillis, D., 1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 23-42.
- 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. Jap. Soc. Sci. Fish.* 42: 1093-1094.
- Hino, A, y R. Hirano, 1977. Ecological studies on the mechanism of bisexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis*. II. Effects of cumulative parthenogenetic generation. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 43: 1147-1155.
- Hino, A, y R. Hirano, 1980. Relationship between body size of the rotifer *Brachionus plicatilis* and the maximum size of particles ingested. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 46: 1217-1222.
- Hino, A, y R. Hirano, 1984. Relationships between water temperature and bisexual reproduction rate in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 50: 1481-1485.
- Hino, A, y R. Hirano, 1985. Relationships between the temperature given at the time of fertilized eggs formation and bisexual reproduction pattern in the deriving strains of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 51: 511-514.
- Hino, A, y R. Hirano, 1988. Relations between water chlorinity and bisexual reproduction rate in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 54: 1329-1332.
- Hirata, H, 1979. Rotifer culture in Japan. *Spec. Publ. Europ. Maricult. Soc.* 4: 361-388.
- Hirata, H, 1980. Culture methods of the marine rotifer *Brachionus plicatilis*. *Min. Rev. Data File Fish. Res.* 1: 27-46.

- Hirata, H., y Y. Mori, 1967. Mass-culture of the marine rotifer *Brachionus plicatilis* fed on the bread yeast. Saibai-gyo-gyo 5: 36-40.
- Hirayama, K., 1985. Biological aspects of the rotifer *Brachionus plicatilis* as a food organism for mass culture of seedling. Coll. fr. japon. Océanogr., Marseille 16-21 Sept. 85, 8: 41-50.
- Hirayama, K., y H. Funamoto, 1983. Supplementary effect of several nutrients on nutritive deficiency of baker's yeast for population growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 49: 505-510.
- Hirayama, K., y K. Nakamura, 1976. Fundamental studies on the physiology of rotifers in mass culture. V. Dry *Chlorella* powder as food for rotifers. Aquaculture 8: 301-307.
- Hirayama, K., y S. Ogawa, 1972. Fundamental studies on physiology of rotifer for its mass culture. I. Filter Feeding of Rotifer. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 38: 1207-1214.
- Hirayama, K., y K. Watanabe, 1973. Fundamental studies on physiology of rotifer for its mass culture. IV. Nutritional effect of yeasts on population growth of rotifer. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 39: 1129-1133.
- Hobaek, A., y P. Larsson, 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.
- Holehan, A.M., y B.J. Merry, 1986. The experimental manipulation of ageing by diet. Biol. Rev. 61: 329-368.
- Hubby, J., y R.C. Lewontin, 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural population. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoscura*. Genetics 54: 577-594.
- Hubendick, B., 1962. Aspects on the diversity of the fresh-water fauna. Oikos 13: 249-261.
- Hutchinson, G.E., 1967. A treatise on Limnology. Vol. 2. J. Wiley.
- Irie, S., y M. Sezaki, 1983. A quantitative determination of relative amount of histones in polyacrylamide gel by silver stain. Anal. Biochem. 134: 471-478.
- Irie, S., M. Sezaki, y Y. Kato, 1982. A faithful double stain of proteins in the polyacrylamide gels with Coomassie blue and silver. Anal. Biochem. 126: 350-354.
- Ito, T., 1956. Studies on the 'Mizukawari' in eel-culture ponds. III. The effects of chlorinated lime, copper sulphate, calcium hydroxide, sea- and fresh-waters in 'Mizukawari' pond. Rep. Fac. Fish. Prefect. Univ. Mie 2: 317-324.
- Ito, T., 1960. On the culture of the mixohaline rotifer *Brachionus plicatilis* Müller in sea water. Rep. Fac. Fish. Prefect. Univ. Mie 3: 708-740.
- Ito, T., y T. Iwai, 1957. Studies on the 'Mizukawari' in eel-culture ponds. VII. The relation between the feeding habits of *Brachionus plicatilis* and the size of phytoplankters. Rep. Fac. Fish. Prefect. Univ. Mie 2: 509-516.

- Ito, T., y T. Iwai, 1958. Studies on the "Mizukawari" in eel-culture ponds. VIII. "Mizukawari" phenomena occurred in six eel-culture ponds near Tsu City, Mie Prefecture in 1955. Rep. Fac. Fisheries Prefect Univ. Mie 3: 122-158.
- Ito, S., H. Sakamoto, M. Hori, y K. Hirayama, 1981. Morphological characteristics and suitable temperature for the growth of several strains of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Bull. Fact. Fish. Nagasaki University 51: 9-16.
- Jennings, H.S. and Lynch, R.S., 1928. Age, mortality, fertility and individual diversities in the rotifer *Proales sordida* Gosse. I. Effect of the age of the parent on characteristics of the offspring. J. Exp. Zool. 50: 345-407.
- Jensen, A.L., 1986. Functional regression and correlation analysis. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 43: 1742-1745.
- Johansson, S., 1987. Factors influencing the occurrence of males in natural populations of *Synchaeta* spp. Hydrobiologia 197: 323-327.
- Johnson, M.L., y M.S. Gaines, 1990. Evolution of dispersal: Theoretical models and empirical tests using birds and mammals. Annu. Rev. Ecol. Syst. 21: 449-480.
- Jones, P.A., y J.J. Gilbert, 1976. Male haploidy in rotifers: relative DNA content of nuclei from male and female *Asplanchna*. J. Exp. Zool. 198: 281-285.
- Kanungo, M.S., 1980. Biochemistry of ageing. Academic Press, London, 281 pp.
- Kerfoot, W.C., 1980. Perspectives on cyclomorphosis: separation of phenotypes and genotypes. En: W.C. Kerfoot (ed.), Ecology and Evolution of Zooplankton Communities. Univ. Press of New England, Hanover, N.H: 470-496 pp.
- King, C.E., 1967. Food, age, and the dynamics of a laboratory population of rotifers. Ecology 48: 111-128.
- King, C.E., 1969. Experimental studies of aging in rotifers. Exp. Gerontol. 4: 63-79.
- King, C.E., 1970. Comparative survivorship and fecundity of mictic and amictic female rotifers. Physiol. Zool. 43: 206-212.
- King, C.E., 1972. Adaptation of rotifers to seasonal variation. Ecology 53: 408-418.
- King, C.E., 1977a. Genetics of reproduction, variation, and adaptation in rotifers. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 8: 187-201.
- King, C.E., 1977b. Effects of cyclical ameiotic parthenogenesis on gene frequencies and effective population size. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 8: 207-211.
- King, C.E., 1980. The genetic structure of zooplankton populations. En: W.C. Kerfoot, (ed.), Evolution and ecology of zooplankton communities. University Press of New England, Hanover, N.H: 315-328 pp.

- King, C.E., 1982. The evolution of the life span. En: H. Dingle y J.P. Hegman (eds.), *Evolution and genetics of the life histories*. Springer-Verlag, New York: 121-138 pp.
- King, C.E., 1983. A re-examination of the Lansing Effect. *Hydrobiologia* 104: 135-139
- King, C.E., y M.R. Miracle, 1980. A perspective on aging in rotifers. *Hydrobiologia* 73: 13-19.
- King, C.E., y T. Snell, 1977a. Sexual recombination in rotifers. *Heredity* 39: 357-360.
- King, C.E., y T. Snell, 1977b. Genetic basis of amphoteric reproduction in rotifers. *Heredity* 39: 357-360.
- King, C.E., y T. Snell, 1978. Culture media (natural and syntetic): Rotifera. CRC Handbook series in nutrition and food (Section G: Diets, culture media, food supplements): 71-75 pp.
- King, C.E., y T. Snell, 1980. Density dependent sexual reproduction in natural populations of the rotifer *Asplanchna girodi*. *Hydrobiologia*, 73: 149-152.
- King, C.E., y Y. Zhao, 1987. Coexistence of rotifer (*Brachionus plicatilis*) clones in Soda Lake, Nevada. *Hydrobiologia* 147: 57-64.
- Kirkwood, T.B.L., 1981. Repair and its evolution: survival versus reproduction. En: C.R. Townsend y P. Calow (eds.), *Physiological Ecology: an Evolutionary Approach to Resource Use*. Blackwell Scientific Publications, Oxford: 165-189.
- Kirkwood, T.B.L., y M.R. Rose, 1991. Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Phil. Trans. R. Soc. London* 332: 15-24.
- Koste, W., 1978. *Rotatoria* (2 vols). Borntraeger, Berlin: 637 pp. + 234 pls.
- Koste, W., 1980. Portrait of Rotifera: *Brachionus plicatilis*, a freshwater rotifer. *Mikrokosmos* 69: 148-155.
- Koste, W., y R.J. Shiel, 1987. Rotifera from Australian Inland Waters. II. Epiphanidae and Brachionidae (Rotifera: Monogononta). *Invertebr. Taxon.* 7: 949-1021.
- Koste, W., y R.J. Shiel, 1989. Classical taxonomy and modern methodology. *Hydrobiologia* 186/187: 279-284.
- Krebs, C.J., 1985. *Ecología. Estudio de la distribución y la abundancia*. Industria Editorial Mexicana, México, XXXII+753 pp.
- Kühle, K., y W. Kleinow, 1985. Measurements of hydrolytic enzymes in homogenates from *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Comp. Biochem. Physiol.* 2: 437-442.
- Kutikova, L.A., 1970. Rotifers. The fauna of the U.S.S.R. L. izq. "Nauke".
- Laderman, A.D., y H.N. Gutman, 1974. Induction of sexuality by alteration of photoperiod in the rotifer *Brachionus rubens*. *J. Exp. Zool.* 152: 5-11.
- Lack, D., 1947. The significance of clutch size. *Ibis* 89: 302-352.
- Lansing, A.I., 1942. Some effects of hydrogen ion concentration, total salt concentration, calcium and citrate on longevity and fecundity of the rotifer. *J. Exp. Zool.* 91: 195-211.

- Lansing, A.I., 1947. A transmissible, cumulative and reversible factor in aging. *J. Geront.* 2: 228–239.
- Lansing, A.I., 1948. Evidence for aging as a consequence of growth cessation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 34: 304–310.
- Lansing, A.I., 1954. A nongenetic factor in the longevity of rotifers. *Ann. New York Acad. Sci.* 57: 455–464.
- Lebedeva, L.I., y T.N. Gerasimova, 1985. Peculiarities of *Philodina roseola* (Ehrbg.) (Rotatoria Bdelloida). Growth and reproduction under various temperature conditions. *Int. Revue. ges. Hydrobiol.* 70: 509–525.
- Lechner, M., 1966. Untersuchungen zur Embrionalentwicklung des Rädertieres *Asplanchna girodi* de Guerne. *Roux. Arch. Entwickl. Mech. Org.* 157: 117–173.
- Leeuwenhoek, A., 1702. Letter nº 144 discovers rotifers.
- Legendre L., y P. Legendre, 1983. Numerical ecology. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, XXII+246pp.
- Levin, D.A., 1975. Pest pressure and recombination systems in plants. *Am. Nat.* 109: 437–451.
- Lewontin, R.C. y J.L. Hubby, 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural population. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoscura*. *Genetics* 54: 595–609.
- Lints, F.A., 1978. Genetics and aging. *Interdisciplinary Topics in Gerontology*. Karger, S., Basel, 129pp.
- López, P., 1983. Aguas salinas epicontinentales próximas a la costa española. Estudio del medio. pH. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. Barcelona.
- Lotka, A.J., 1922. The stability of the normal age distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 8: 339–345.
- Lubzens, E., 1981. Rotifer resting eggs and their application to marine aquaculture. *Eur. Maricult. Soc. Spec. Publ.* 6: 163–179.
- Lubzens, E., 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia* 147: 245–255.
- Lubzens, E., 1989. Possible use of rotifer resting eggs and preserved live rotifers (*Brachionus plicatilis*) in aquaculture. En: N. De Paw, E. Jaspers, H. Ackefors y N. Wilkins (eds), *Aquaculture: A biotechnology in progress*. European Aquaculture Society, Bredene, Belgium: 741–750 pp.
- 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.

- Lubzens, E., y G. Minkoff, 1988. Influence of algae fed to rotifers (*Brachionus plicatilis* O.F. Müller) on the expression of mixis in their progenies. *Oecologia* 75: 430–435.
- Lubzens, E., G. Minkoff y S. Marom, 1985. Salinity dependence of sexual and asexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Mar. Biol. (Berl.)* 85: 123–126.
- Luciani, S., Chasse, J. and Clément, P. 1983. Aging in *Brachionus plicatilis*. The evolution of swimming as a function of age at two different calcium concentrations. *Hydrobiologia* 104: 141–146.
- Lynch, M., y W. Grabiell, 1983. Phenotypic evolution and parthenogenesis. *Am. Nat.* 122: 745–764.
- Makrides, S.C., 1983. Protein synthesis and degradation during aging and senescence. *Biol. Rev.* 58: 343–342.
- Manning, J.T, y J. Jenkins, 1980. The 'balance argument and the evolution of sex. *J. Theoret. Biol.* 86: 595–601.
- Margalef, M., 1955. Los organismos indicadores en la limnología. Ministerio de agricultura (Inst. Forestal Inv. y Exp.), Madrid, 300pp.
- Margalef, R., 1983. Limnología. Omega, Barcelona, 1010 pp.
- Marshall, T., 1984. Detection of protein in polyacrylamide gels using an improved silver stain. *Anal Biochem.* 136: 340–346.
- Maupas, 1890. Sur la multiplication et la fécondation de l'*Hydatina senta* Ehr. *Compt. Rend.* 61: 310–312.
- Maupas, 1891. Sur le déterminisme de la sexualité chez l' *Hydatina senta*. *Compt. Rend.* 60: 345–381.
- May, L., R., Wallace y A. Herzig (eds.), 1987. Rotifer symposium IV. Developments in Hydrobiology 42. Dr. Junk Pub., The Hague.
- Maynard Smith, J. 1978. The evolution of sex. Cambridge University Press, Cambridge, 222 pp.
- McKerrow, J.H., 1979. Non-enzymatic, post-translational amino acid modifications in ageing. A brief review. *Mech. Ageing Dev.* 10: 371–377.
- Meadow, N.D., y C.H. Barrows, 1971a. Studies on aging in a bdelloid rotifer: I. The effect of various culture systems on longevity and fecundity. *J. Exp. Zool.* 176: 303–313.
- Meadow, N.D., y C.H. Barrows, 1971b. Studies on aging in a bdelloid rotifer: II. The effect of various environmental conditions and maternal age on longevity and fecundity. *J. Gerontology* 26: 302–309.
- Medawar, P.B., 1946. Old age and natural death. *Modern Quart.* 1: 30–56.
- Medawar, P.B., 1952. An unsolved problem in biology. H.K. Lewins, London, 24 pp.

- Medawar, P.B., 1955. The definition and measurement of senescence. En: G.E.W. Woltensholme, M.P. Cameron, y J. Etherington (eds.), Ciba foundation Colloquia of Ageing. Vol. 1, General Aspects. J&A Churchill, London: 4-15 pp.
- Merril, C.R., D. Goldman, S.A. Sedman, y M.H. Ebert, 1981. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211: 1437-1438.
- 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 A. Guiset, 1977. Some effects of enclosure on congeneric species of rotifers. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 8: 94-97.
- Miracle, M.R., y M. Serra, 1989. Salinity and temperature influence in rotifer life history characteristics. *Hydrobiologia* 186/187: 81-102.
- Mold, D.E., J. Weingart, J. Assaraf, D.B. Lubahn, D.N. Kelner, B. Ramsay Shaw, y K.S. McCarty, 1983. Silver staining of histones in Triton-acid-urea gels. *Anal. Biochem.* 135: 44-47.
- Moro, L., 1915. Partenogenesi e anfigonia nei Rotiferi. *Recerche sperimentali sul Brachionus pala*. *Bios* 2: 219-264.
- Morrissey, J.H., 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* 117: 307-310.
- Nauwerck, A., 1963. Die Beziehungen zwischen Zooplankton und Phytoplankton im See Erken. *Symb. Bot. Upsal.* 17: 1-163.
- Nielsen, B.L., y L.R. Brown, 1984. The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 141: 311-315.
- Oakley, B.R., D.R. Kirsch, y N.R. Morris, 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 105: 361-363.
- Ochs, D., 1983. Protein contaminants of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 135: 470-474.
- Ohsawa, K., y N. Ebata, 1983. Silver stain for detecting 10-femtogram quantities of protein after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 135: 409-415.
- Okauchi, M., y K. Fukusho, 1985a. Different modes in carrying resting eggs between two wild types of the rotifer *Brachionus plicatilis* from Matsusaka. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 51: 1907.
- Okauchi, M., y K. Fukusho, 1985b. Different modes in carrying resting eggs of wild S-strains of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture* 8: 59-61.

- Pagani, M., C. Ricci, and A.M. Bolzern, 1991. Comparison of five strains of a parthenogenetic species, *Macrotrachela quadricornifera* (Rotifera, Bdelloidea). II. Isoenzymatic patterns. *Hydrobiologia* 211: 157–163.
- Pejler, B., 1974. On the Rotifer Plankton of some Eats African Lakes. *Hydrobiologia* 44: 389–396.
- Pejler, B., 1977a. On the global distribution of the family *Brachionidae* (Rotatoria). *Arch. Hydrobiol. Beih.* 8: 212–220.
- Pejler, B., 1977b. General problems on rotifer taxonomy and global distribution. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 8: 212–220.
- Pejler, B., R. Starkweather, y Th. Nogrady (eds.), 1983. *Biology of rotifers. Developments in Hydrobiology* 14. Dr. Junk Pub., The Hague.
- Perrin, N., 1989. Reproductive allocation and size constrains in the cladocera *Simocephalus velutus* (Müller). *Functional Ecology* 3: 279–283.
- Perron, F.E., 1983: Growth, fecundity, and mortality of *Conus pennaceus* in Hawaii. *Ecology* 64: 53–62.
- Person-le Ruyét, 1975. Techniques d'élevage en masse d'un Rotifère (*Brachionus plicatilis* Müller) et d'un Crustacé Branchiopode (*Artemia salina* L.). 10th Europ. Symp. Mar. Biol., Ostend, Belgium, Sept. 17–23, 1985, 1: 331–343.
- Pianka, E.R., 1982. *Ecología evolutiva*. Omega, Barcelona, 365 pp.
- Poehling, H., y V. Neuhoff, 1981. Visualization of proteins with a silver "stain": a critical analysis. *Electrophoresis* 2: 141–147.
- Pourriot, R., 1957. Influence de la nourriture sur l'apparition des femelles mictiques, chez deux espèces et une variété de *Brachionus* (rotifères). *Hydrobiologia* 9: 60–65.
- Pourriot, R., 1963. Influence du rythme nyctéméral sur le cycle sexuel de quelques rotifères. *Comptes Rendus Acad. Sci. Paris* 256: 5216–5219.
- Pourriot, R., 1965a. Recherches sur l'écologie des rotifères. *Vie Milieu suppl.* 21, 224 pp.
- Pourriot, R., 1965b. Sur la déterminisme du mode de reproduction chez les rotifères. *Schweiz. Z. Hydrobiol.* 27: 76–87.
- Pourriot, R., 1973a. Rapports entre la temperature, la taille des adultes, la longueur des oeufs la taux de développement embryonnaire chez *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifère). *Ann. Hydrobiol.* 4: 103–115.
- Pourriot, R., 1973b. Recherches sur la biologie des rotifères III. Fécondité et durée de vie comparées chez les femelles amictiques et mictiques de quelques espèces. *Annls. Limnol.* 9: 241–258.
- Pourriot, R., 1977. Food and feeding habits of rotifers. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 8: 243–260.

- Pourriot, R., y P. Clément, 1975. Influence de la durée de l'éclairement quotidien sur le taux de femelles mictiques chez *Notommata copeus* Ehr. (rotifère). *Oecologia* 22: 67–77.
- Pourriot, R., y P. Clément, 1977. Comparison of the control of mixis in three clones of *Notommata copeus*. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 8: 174–177.
- Pourriot, R., y P. Clément, 1981. Action de facteurs externes sur la reproduction et le cycle reproducteur des rotifères. *Acta. Oecol., Gen.* 2: 135–151.
- Pourriot, R., y C. Rougier, 1976. Influence de l'âge des parents sur la production de femelles mictiques chez *Brachionus calyciflorus* (Pallas) et *B. rubens* Ehr. (Rotifères). *C.R. Acad. Sci. Paris* 283: 1497–1500.
- Pourriot, R., y C. Rougier, 1977. Effects de la densité de population et groupement sur la reproduction de *Brachionus calyciflorus* (Pallas) [Rotifère]. *Annls. Limnol.* 13: 101–113.
- Pourriot, R., y C. Rougier, 1979. Influences conjuguées du groupement et de la qualité de la nourriture sur la reproduction de *Brachionus plicatilis* O.F. Müller (Rotifère). *Netherl. J. Zool.* 19: 242–264.
- Pourriot, R., y C. Rougier, 1986. Rythmes de production de femelles sexuées chez le rotifère *Brachionus calyciflorus* en élevage à température constante. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 111: 203–207.
- Pourriot, R., C. Rougier, y D. Benest, 1986a. Qualité de la nourriture et controle de la mixis chez le rotifère *Brachionus rubens* Ehr. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 111: 105–111.
- Pourriot, R., C. Rougier, y D. Benest, 1986b. Influence de la température et la réponse mictique a la photopériode chez le rotifère *Notommata copeus* Ehrb. *Vie Milieu* 36: 37–43.
- Pourriot, R., C. Rougier, y D. Benest, 1987. Qualité de la nourriture et contrôle de la mixis chez le rotifère *Brachionus rubens*, Ehr. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 111: 105–111.
- Pourriot, R., y T.W. Snell, 1983. Resting eggs of rotifers. *Hydrobiologia* 104: 213–224.
- Pozuelo, M., 1977. Male production in seawater cultured *Brachionus plicatilis*. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 8: 172–173.
- Pozuelo, M., y L.M. Lubián. Sexuality and reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis* cultured at different salinities. *Hydrobiologia*. En prensa.
- Rao, T.R., y S.S.S. Sarma, 1988. Effect of food and temperature on the cost of reproduction in *Brachionus patulus* (Rotifera). *Proc. Indian. natn Sci. Acad.* 6: 435–438.
- Remane, A., 1929–1933. Rotatorien. En: H.G. Bronn (ed.), *Klassen und Ordnungen des Tier-Reichs*, Vol. 4 (pt. 2, sctns. 1–4), 1–576. C.F. Winter, Leipzig.
- Ricci, C., 1980. Experimental observations on maternal reproductive rate and offspring characteristics. *Hydrobiologia* 73: 21–25.

- Ricci, C., 1983. Life histories of some species of Rotifera Bdelloidea. *Hydrobiologia* 104: 175–180.
- Ricci, C., M., Pagani, y A.M. Bolzern, 1989. Temporal analysis of clonal structure in a moss bdelloid population. *Hydrobiologia* 186/187: 145–152.
- Richardson, A., 1985. The effect of age and nutrition on protein synthesis by cells and tissues from mammals. En: R.R. Watson (ed.), *Handbook of Nutrition in the aged*. CRC Press, Boca Raton, Florida: 31–48 pp.
- Richardson, A., y M.C. Birchernall–Sparks, 1983. Age–related changes in protein synthesis. *Rev. Biol. Res. Aging* 1: 255–73.
- Robotti, C., 1975. Chromosome complement and male haploidy of *Asplanchna priodonta* Gosse 1850 (Rotatoria). *Experientia* 31: 1270.
- Rose, M.R., 1991. *Evolutionary biology of aging*. Oxford University Press, New York, 221pp.
- Rougier, C., y R. Pourriot, 1977. Aging and control of reproduction in *Brachionus calyciflorus* (Pallas) (Rotifère). *Exp. Geront.* 12:137–151.
- Rougier, C., R. Pourriot, y P. Clément, 1977. Determination of mixis in *Brachionus*. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 8: 163–166.
- Ruiz–Maya, L., 1983. *Métodos estadísticos de investigación*. Instituto Nacional de Estadística, Madrid, 367 pp.
- Rumengan, I., H. Kayano, y K. Hirayama, 1991. Karyotypes of S and L type rotifers *Brachionus plicatilis* O.F. Müller. *J. Exp. Mar. Biol.* 154: 171–176.
- Ruttner–Kolisko, A., 1963. The interrelationships of the Rotatoria. En: Dougherty *et al.* (eds), *The Lower Metazoa*. University of California Press: 263–273.
- Ruttner–Kolisko, A., 1964. Über die labile Periode im Fortpflanzungszyklus der Rädertiere. *Inv. Rev. ges. Hydrobiol.* 49: 473–482.
- Ruttner–Kolisko, A., 1974. Plankton Rotifers. Biology and taxonomy. *Binnengewasser* 26: 146pp.
- Ruttner–Kolisko, A., 1977. Amphoteric reproduction in a population of *Asplanchna priodonta*. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 8: 178–181.
- Ruttner–Kolisko, A., 1983. The significance of mating processes for the genetics and for the formation of resting eggs in monogonont rotifers. *Hydrobiologia* 104: 181–190.
- Ruttner–Kolisko, A., 1985. Results of individual cross–mating experiments in three distinct strains of *Brachionus plicatilis* (Rotatoria). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 22: 2979–2981.

- Sawada, M., H.C. Carlson, y H.E. Enesco, 1990. The effects of UV radiation and antioxidants on life span and lipid peroxidation in the rotifer *Asplanchna brightwelli*. Arch. Gerontol. Geriatr. 10: 27–36.
- Sawada, M., y H.E. Enesco, 1984. A study of dietary restriction and lifespan in the rotifer *Asplanchna brightwelli* monitored by chronic neutral red exposure. Exp. Geront. 19: 329–334.
- Scheleider, M., y M. Watterson, 1983. Analysis of differences between Coomassie blue stain and silver stain procedures in polyacrylamide gels: conditions for the detection of calmodulin and troponin C. Anal. Biochem. 131: 312–317.
- Scott, J.M., 1977. Rotifer reproduction under controlled experimental conditions. Arch. Hydrobiol. Beih. 8: 171–196.
- Scott, J.M., 1983. Rotifer nutrition using supplemented monoxemic cultures. Hydrobiologia 104: 155–166.
- Semancik, J.S., 1976. Structure and replication of plants viroids. En: D. Baltimore, A.S. Huang y C.F. Fox (eds.), Animal Virology, ICN–UCLA, Symposia on Molecular and Cellular Biology. Acad. Press, New York: 529–545 pp.
- Serra, M., 1987. Variación morfométrica, isoenzimática y demográfica en poblaciones de *Brachionus plicatilis*: diferenciación genética y plasticidad fenotípica. Tesis doctoral. Universidad de Valencia, Valencia.
- Serra, M., y M. R. Miracle, 1983. Biometric analysis of *Brachionus plicatilis* ecotypes from Spanish lagoons. Hydrobiologia 104: 279–291.
- Serra, M., y M. R. Miracle, 1985. Enzyme polymorphism in *Brachionus plicatilis* populations from several Spanish lagoons. Verh. Int. Ver. Limnol. 22: 2991–2996.
- Serra, M., y M. R. Miracle, 1987. Biometric variation in three strains of *Brachionus plicatilis* as a direct response to abiotic variables. Hydrobiologia 147: 83–89.
- Shull, A.F., 1912. Studies in the life cycle of *Hydatina senta*. III. Internal factors influencing the proportion of male–producers. J. Exp. Zool. 12: 283–317.
- Shull, A.F., 1921. Chromosomes and the life cycle of *Hydatina senta*. Biol. Bull. 41: 56–61.
- Sibly, R.M., y P. Calow, 1987. Growth and resource allocation. En: P. Calow (ed.), Evolutionary physiological ecology, Cambridge University Press, Cambridge: 37–52 pp.
- Sibly, R.M., P. Calow, y N. Nichols, 1985. Are patterns of growth adaptative?. Journal of Theoretical Biology 112: 553–574.
- Simpson, G.G., 1961. Principles of animal taxonomy. Columbia University Press, N.Y., 247 pp.
- Sinkock, 1974. Calcium and aging in the rotifer *Mytilina brevispina* Var. Redunca. J. Gerontol. 29: 514–517.

- Sinkock, 1975. Life extension in the rotifer *Mytilina brevispina* Var. *Redunca* by the application of chelating agents. *J. Gerontol.* 30: 289–293.
- Sneath, P. H. A., y R.R. Sokal, 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco, XV+ 573 pp.
- Snedecor, G.W., y W.G. Cochran, 1971. *Métodos estadísticos*. CECSA, Mexico, 703 pp.
- Snell, T.W., 1977a. Clonal selection: Competition among clones. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 8: 202–204.
- Snell, T.W., 1977b. Lifespan of male rotifers.– *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn Limnol.* 8: 65–66.
- Snell, T.W., 1979. Intraspecific competition and population structure in rotifers. *Ecology* 60: 494–502.
- Snell, T.W., 1986. Effect of temperature, salinity and Food level on sexual and asexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Marine Biology* 92: 157– 162.
- Snell, T.W., 1987. Sex, population dynamics and resting eggs production in rotifers. *Hydrobiologia* 144: 105–111.
- Snell, T.W., 1988. Characteristics of the mate recognition factor in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 89: 481–485.
- Snell, T.W., 1989. Systematics, reproductive isolation and species boundaries in monogonont rotifers. *Hydrobiologia* 186/187: 299–310.
- Snell, T.W., y C.J. Bieberich. Factors modulating mictic female production in the rotifer *Brachionus plicatilis*. En prensa.
- Snell, T.W., y E. M. Boyer, 1988. Thresholds for mictic–female production in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Müller). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 124: 73–85.
- Snell, T.W., y K. Carrillo, 1984. Body size variation among strains of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 37: 359–367.
- Snell, T.W., y M. Childress, 1987. Aging and loss of fertility in male and female *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Int. J. Invertebr. Reprod. Dev.* 12:103–110.
- 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.A., Hawkinson, 1983. Behavioral reproductive isolation among populations of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Evolution* 37: 1294–1305.
- Snell, T.W., y F.H. Hoff, 1985. The effect of environmental factors on resting eggs production in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *J. World Maricul. Soc.* 16: 484–497.
- Snell, T.W., y C.E. King, 1977. Lifespan and fecundity patterns in rotifers: The cost of reproduction. *Evolution* 31: 882–890.

- Snell, T.W., y M.A. Nacionales, 1989. Localization of the mate recognition glycoprotein on the rotifer *Brachionus plicatilis*. En prensa.
- Snell, T.W., y B.C. Winkler, 1984. Isozyme analysis of rotifer proteins. *Biochem. Syst. Ecol.* 12: 199–202.
- Sokal, R.R, y F.J. Rohlf, 1979. *Biometría*. Blume, Madrid, 832 pp.
- Sokal, R.R, y F.J. Rohlf, 1986. *Biometría*. Blume, Madrid, 362 pp.
- Soumalainen, E., A. Saura, y J. Lokki, 1987. *Cytology and Evolution in Parthenogenesis*. CRC Press, Inc., Boca de Raton, Florida.
- Stearns S.C., 1976. Life history tactics: A review of ideas. *Quart. Rev. Biol.* 51: 3–47.
- Stearns S.C., 1987. *The evolution of sex and its consequences*. Birkhäuser Verlag Basel, 403 pp.
- Steck, G., P. Leuthard, y R.R. Bürk, 1980. Detection of basic proteins and low molecular weight peptides in polyacrilamide gels by formaldehyde fixation. *Anal. Biochem.* 107: 21–24.
- Sudzuki, M., 1957. Studies on the egg-carrying types in Rotifera. II. Genera *Brachionus* and *Keratella*. *Zool. Mag. Tokyo* 66: 11–20.
- Sudzuki, M., 1987. Intraspecific variability of *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 147: 45–47.
- Switzer, R.C., C.R. Merrill, y S. Shifrin, 1979. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 98: 231–237.
- Tanner, J.T., 1978. *Animal Populations*. The University of Tennessee Press. Knoxville (Tennessee), XII+186 pp.
- Templeton, A.R., y D.A. Levin, 1979. Evolutionary consequences of seed pools. *Am. Nat.*, 114: 232–249.
- Thane, A., 1974. Rotifera. En: A.C. Giese y J.S. Pearse (eds), *Reproduction of Marine Invertebrates*. Vol. I: Acoelomate and Pseudocoelomate Metazoans. Academic Press New York, London: 471–484 pp.
- Theilacker, G.H., y M.F. McMaster, 1971. Mass-culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* and its evaluation as a food for larval anchovies. *Mar. Biol.* 10: 183–188.
- Townsend C.R., y P. Calow, 1981. *Physiological ecology: an evolutionary approach to resource use*. Oxford: Blackwell Scientific Publications
- Tsai, C. H., y C.E. Frash, 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 119: 115–119.
- Tsutsui, K., T. Kurosaki, K. Tsutsui, N. Nagai, y T. Oda, 1985. Silver staining for selective detection of histones in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 146: 111–147.

- Verdone-Smith, C., y H.E. Enesco, 1982. The effect of temperature and of dietary restriction on lifespan and reproduction in the rotifer *Asplanchna brightwelli*. *Exp. Gerontol.* 17: 255-262.
- Walker, K.F., 1973. Studies on a saline lake ecosystem. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.* 24: 21-71.
- 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 T.W. Snell, 1991. Rotifera. En: *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. Academic Press: 187-248 pp.
- Weider, L.J., 1985. Spatial and temporal genetic heterogeneity in a natural *Daphnia* population. *Plankton Res.* 7: 101-123.
- Wesenberg-Lund, C., 1930. Contributions to the biology of the Rotifera. Part II. The periodicity and sexual sexual periods. *Mem. Acad. Roy. Sci. et Lett. de Danmark. Sec. Sci. Serie 9.* 2: 1-230.
- Whitney, D.D., 1929. The chromosome cycle in the rotifer *Asplanchna amphora*. *J. Morphol. Physiol.* 47: 416-433.
- Williams, G.C., 1957. Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* 11: 398-411.
- Williams, G.C., 1975. *Sex and Evolution*. Princeton University Press., Princeton, NJ., 200 pp.
- Williams, G.C., y J.B. Mitton 1973. Why reproduce sexually?. *J. theor. Biol.* 39: 545-554.
- Wolf, H.G., 1982. A comparison of different electrophoretic techniques for the detection of isoenzymes in single Daphnids. *Arch. Hydrobiol.* 95: 521-531.
- Wray, W., T. Boulikas, V.P. Wray, y R. Hancock, 1981. Silver staining of proteins in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.* 118: 197-203.
- Young, J.P.W., 1979a. Enzyme polymorphism and cyclic parthenogenesis in *Daphnia magna*. I. Selection and clonal diversity. *Genetics* 92: 953-970.
- Young, J.P.W., 1979b. Enzyme polymorphism and cyclic parthenogenesis in *Daphnia magna*. II. Heterosis following sexual reproduction. *Genetics* 92: 971-982.
- Young, J.P.W., 1981. Sib competition can favor sex in tow ways. *J. theor. Biol.* 88: 755-756.
- Yúfera, M., 1982. Aislamiento, caracterización, y puesta en cultivo de una cepa de pequeño tamaño de *Brachionus plicatilis*: O.F. Müller (1786). Tesis doctoral. Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Yúfera, M., L.M. Lubian y E. Pascual, 1983. Efecto de cuatro algas sobre el crecimiento poblacional de dos cepas de *Brachionus plicatilis*: (Rotifera: Brachionidae) en cultivo. *Inv. Pesq.* 47: 325-337.

- Yúfera, M., y E. Pascual, 1980. Estudio del rendimiento de cultivos del rotífero *Brachionus plicatilis*: O.F. Müller alimentados con levadura de panificación. *Inv. Pesq.* 44: 361–368.
- Zhao Y., y C.E. King, 1989. Ecological genetics of the rotifer *Brachionus plicatilis* in Soda Lake, Nevada, USA. *Hydrobiologia* 185: 175–181.

"Hacer una tesis significa aprender a poner orden en las propias ideas y a ordenar los datos: es una especie de trabajo metódico; supone construir un "objeto" que sirva también a los demás. Y para ello no es tan importante el tema de la tesis como la experiencia de trabajo que comporta... Quizás con el tiempo uno se vuelve más malicioso, se aprenden más cosas; pero el modo de trabajar sobre las cosas que se conocen dependerá siempre del modo en que se han buscado al principio muchas cosas que no se conocían."

(Umberto Eco, *Como se hace una tesis doctoral*)