

Tesis Doctoral

Efectos de la radiación ultravioleta sobre las interacciones entre zooplancton e ictioplancton en lagos patagónicos

Rocco, Vanina E.

2004

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en Ciencias Biológicas de la
Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rocco, Vanina E.. (2004). Efectos de la radiación ultravioleta sobre las interacciones entre zooplancton e ictioplancton en lagos patagónicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3761_Rocco

Cita tipo Chicago:

Rocco, Vanina E.. "Efectos de la radiación ultravioleta sobre las interacciones entre zooplancton e ictioplancton en lagos patagónicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3761_Rocco

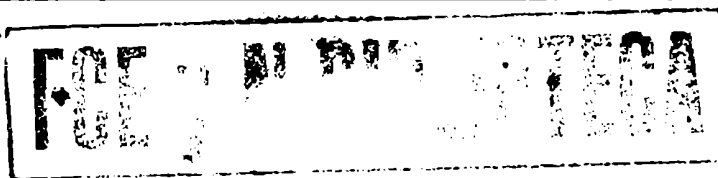
EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Efectos de la radiación ultravioleta sobre las interacciones entre zooplancton e ictioplancton en lagos patagónicos

AUTOR: Vanina E. Rocco

DIRECTORES: Dr. Horacio Zagarese y Dra. Mariana Lozada

TESIS PARA OPTAR POR EL TITULO DE DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE
BUENOS AIRES, ORIENTACIÓN CIENCIAS BIOLÓGICAS

AÑO 2004

3761

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**Effects of ultraviolet radiation on the
interactions between zooplankton and
ichthyoplankton in Patagonian lakes**

AUTHOR: Vanina E. Rocco

ADVISORS: Dr. Horacio Zagarese and Dra. Mariana Lozada

THESIS SUBMITTED TO THE UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES IN CANDIDANCY FOR
THE DEGREE OF DOCTOR IN BIOLOGICAL SCIENCES

YEAR 2004

Si la mayor parte de todo es agua, ¿será que algún Dios lloró mucho alguna vez?.....leímos en alguno de tus escritos.-

Seguramente, aquel Dios del inmenso llanto, que como vos decías, hizo que el elemento más abundante en este mundo fuera el agua, fue el que inspiró tus estudios en ese medio para que alcanzaras este logro que decidiste no disfrutar, tal vez por la inmensa modestia que ostentaban todos tus actos y que quiso que tengamos que ser nosotros quienes agradezcamos ser tus padres y roguemos a ese Dios que en la vida que comenzaste este 14 de Mayo te tenga junto a El disfrutando de esa paz y libertad que siempre anhelaste.-

En tu nombre agradecemos a todos los que te conocieron y ayudaron de alguna manera a cristalizar esta Tesis; desde aquella maestra Marta del Jardín de Infantes Mitre, que te enseñó a comprender y responder a las consignas.- A tus maestros y compañeros de la escuela primaria "Jorge A. Boero", a los que siempre tuviste en tu corazón, Carmencita, Andrea, Mariela, Mariana, Paulita, Sebastián, Mariano, el "Gordo" y otros.- A todos tus profesores y compañeras del Liceo N° 9 ; Cecilia, Laura, Maru, Paula, Clara y Mariel que continuó con vos en la Facultad.- A tus profesores y compañeros de la Facultad de Ciencias Exactas; otra vez Mariel, Santiago, Gregorio, Carlos Mauro, Paulita, Cecilia.- A tus compañeros en tus trabajos de investigación en el Palmar, (con tu Supervisora y amiga Lic. Fernanda Manvielle) en el Instituto Malbrán, en la Islas Bermudas, en Ushuaia.- A tus compañeros en la Campaña a la Antártida del verano del 2000, como Rodrigo entre otros y su familia.- A todos tus amigos de Bariloche; Valeria, Patricia, Fabiola, Mecha, Paola, Carolina, Joe, Emiliano, Fernando, Christian y tantos otros, (que fueron tu otra familia cuando te fuiste allí), que te brindaron amor y contención.-

En especial y por último, agradecemos a tu Director Dr. Horacio Zagarese, a su esposa, que te comprendió y ayudó en muchos momentos y a tu Co-Directora Dra. Mariana Lozada, que te guiaron en tu investigación e hicieron posible que en tu ausencia, todo tu trabajo, esta Tesis se pudiera recopilar y dar a conocer.-

Gracias en tu nombre a todos ellos y a muchos que no nombramos y seguramente están comprendidos y gracias a vos por todas las alegrías y el amor que nos diste; gracias por tu inteligencia y gran sensibilidad.-

Para vos, el eterno amor y recuerdo de mamá, papá y tus hermanos, Luis Augusto, Esteban y Gisella y sus esposas y esposo que fueron tus otros hermanos.- Gracias Vanina.-

El trabajo de investigación presentado en esta tesis ha sido realizado íntegramente por Vanina. Únicamente los últimos retoques de la edición final estuvieron a cargo de nosotros como sus directores.

Esperamos que esta presentación sirva como reconocimiento a todos sus años de trabajo y como recuerdo de los mejores momentos compartidos.

Horacio E. Zagarese

Mariana Lozada

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con una beca de postgrado de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y posteriormente una beca de postgrado de CONICET en el Centro Regional Universitario de la Universidad Nacional del Comahue. El trabajo fue financiado por CONICET PIP, ANPCyT PICT, International Foundation for Science grant , InterAmerican Institute for Global Change Research CRN 026.

Los directores de Vanina desean agradecer a Carolina Morales, Cristián Jiménez, Cristina Alonso, Daniela Milano, Diego Añón Suárez, Fabiola Salvador, Fernando Raffo, Joe, Juan Pablo Barriga, Mercedes Urquiza, Miguel Battini, Paola D'Adamo, Patricia Pérez, Valeria Fernández Arhex, sus compañeros de la Base Esperanza, sus compañeros del Laboratorio Ecotono y otros amigos que la ayudaron en el transcurso de su tesis.

Las siguientes publicaciones forman parte de esta tesis:

- 2004 Alonso, C., V Rocco, J. P. Barriga, M. A. Battini, and H. E. Zagarese. Surface avoidance by freshwater zooplankton: Field evidence on the role of ultraviolet radiation. *Limnology and Oceanography*, 49: 225-232.
- 2002 Rocco, V. E. , O. Oppezzo, R. Pizarro, R Sommaruga, M. A. Ferraro, and H. E. Zagarese. Ultraviolet damage and counteracting mechanisms in the copepod *Boeckella poppei* from Antarctic freshwater lakes. *Limnology and Oceanography*, 47 (3): 829-836.
- 2002 Rocco, V. E., J. P. Barriga, H. E. Zagarese, and M. Lozada. How much does ultraviolet radiation contribute to the feeding performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles under natural illumination? *Environmental Biology of Fishes*, 63 (2): 223-228.
- 2000 Battini, M., V. Rocco, M. Lozada, Tartarotti, B., and H. E. Zagarese. Effects of ultraviolet radiation on the eggs of landlocked *Galaxias maculatus* (Galaxidae, Pisces) in Northwestern Patagonia. *Freshwater Biology*: 44: 547-552.

RESUMEN

Esta tesis investiga los efectos de la radiación ultravioleta sobre organismos acuáticos. En particular se estudiaron los efectos sobre el zooplancton, sobre sus principales depredadores, las larvas de peces, y sobre la interacción entre presa y depredador. Este trabajo se realizó en distintos ambientes y diferentes escalas. Los ambientes incluyeron varios lagos del Noroeste Patagónico y la Península Antártica. Las escalas variaron desde experimentos de laboratorio hasta muestreos de campo. Los resultados indican que la radiación ultravioleta tiene efectos negativos, tanto sobre el zooplancton, como sobre sus depredadores. Dichos efectos son claramente dependientes de la dosis a la que los organismos son expuestos, y por lo tanto, varían con la profundidad y la transparencia de cada ambiente en particular.

Se analizó también las distintas estrategias utilizadas por los organismos para contrarrestar los efectos negativos de la RUV. Los resultados sugieren fuertemente que dichas estrategias están condicionadas por el ambiente físico y el entorno ecológico. Por ejemplo, en ambientes profundos, como los grandes lago pedemontanos Patagónicos, el zooplancton puede encontrar refugio en profundidad durante el verano. Por el contrario en ambientes menos profundos, muchos organismos recurren a otro tipo de estrategias, tales como la fotoprotección mediante la acumulación de compuestos capaces de bloquear la radiación, o la foto-reparación, a través de mecanismos enzimáticos. La posibilidad de foto-reparación parece estar muy limitada en ambientes fríos, presumiblemente debido a la baja eficiencia de la enzima fotoliasa a baja temperatura. Por otra parte, el empleo de compuestos fotoprotectores parece estar condicionado, al menos en parte, por la presencia de depredadores visuales, como los estadios juveniles de peces.

Se investigó también la posibilidad de que los peces pudieran utilizar las longitudes de onda dentro del espectro ultravioleta para localizar a sus presas. Estos estudios se llevaron a cabo con juveniles de trucha arco iris, los cuales se sabe que cuentan con receptores de UV en sus retinas. Sin embargo, nuestros experimentos produjeron resultados negativos. La falta de utilización de longitudes de onda dentro del UV para la localización de presas no resulta llamativa, dado que en ambientes transparentes, tanto los peces, como sus presas evitan las aguas superficiales, refugiándose en aguas relativamente profundas donde no penetra la RUV.

Palabras claves: zooplancton, estadios juveniles de peces, radiación ultravioleta, lagos andinos

SUMMARY

In this work, we investigated the effects of ultraviolet radiation on aquatic organisms. Particularly, we studied the effects on zooplankton and their main predators, namely larval fish, as well as on the interactions between preys and predators. This work was performed on various environments and at different scales. The study sites included a number of lakes located in North-western Patagonia and the Antarctic Peninsula. The scales ranged from laboratory experiments to whole-lake field samplings.

The results show that ultraviolet radiation has negative effects on both zooplankton and their predators. Such effects are remarkably dependant on the doses to which the organisms are exposed, and consequently vary with lake depth and water transparency.

The study also considered the different counteracting strategies used by the organisms to cope with high ultraviolet radiation levels. The results suggest that such strategies are strongly constrained by the physical environment and the ecological assembly. For example, in the large lakes typical of low elevation valleys of Patagonia, the zooplankton appears to seek a deep refuge during summertime. In contrast, in more shallow lakes, many organisms use other strategies, such as photoprotection through the accumulation of sun blocking compounds, or photorecovery through photoenzymatic repair. In turn, the extent of photorecovery appears to be very limited in cold habitats, presumably because of the low efficiency of the photolyase enzyme at low temperatures. On the other hand, the use of photoprotective compounds appears to be constrained by the presence of visual predators, such as the early life stages of fish. We also explored the possibility that fish predators could take advantage of ultraviolet radiation wavelengths to locate their preys. These experiments were conducted using

rainbow trout juveniles, which are known to possess retinal UV detectors. However, our investigation produced negative results. The lack of reliance on UV wavelength to locate preys is not completely unexpected, given that in transparent habitats both fish and their preys avoid the surface waters and seek refuge at depth where UV radiation has already been depleted by the absorption of the water.

Keywords: zooplankton, early life history stages of fish, ultraviolet radiation, Andean lakes

Índice

Introducción General	11
Naturaleza de la radiación ultravioleta	11
El ozono atmosférico	12
Efectos biológicos de la RUV	13
Clima óptico en el ambiente acuático	16
RUV y la interacción peces-zooplancton	17
Mecanismos de mitigación del daño por UV:	19
Efectos benéficos de la RUV	20
Los ambientes estudiados	21
Objetivos generales	24
Objetivos específicos y organización de esta tesis	24
Capítulo I: "Tolerancia a la radiación ultravioleta en tres poblaciones de <i>Boeckella gracilipes</i> (Copepoda, calanoida)"	33
Introducción	33
Materiales y Métodos	35
Resultados	39
Discusión	42
Capítulo II: "Daños producidos por UV y mecanismos de mitigación en el copépodo <i>Boeckella poppei</i> , de la Península Antártica"	47
Introducción	47
Materiales y Métodos	49
Resultados	56
Discusión	64
Capítulo III: "Efectos de la Radiación ultravioleta sobre huevos de <i>Galaxias maculatus</i> (Galaxiidae) y <i>Odontheistes hatcheri</i> (Atherinidae) en el noroeste patagónico"	75
Introducción	75
Materiales y Métodos	77
Resultados	80
Discusión	85
Capítulo IV: ¿Cuánto contribuye la radiación ultravioleta a aumentar la localización de presas en los juveniles de truchas arco iris?	91
Introducción	91
Materiales y Métodos	93
Resultados	97
Discusión	100
Conclusiones Generales	106
Efectos de RUV sobre el zooplancton:	106
Diversidad de mecanismos en el género <i>Boeckella</i>	107
Efectos de RUV sobre estadios tempranos de peces	111
Efectos benéficos del UV	111

Introducción General

La investigación que se desarrolló durante este trabajo de tesis doctoral, se basó en el estudio de los efectos de la radiación ultravioleta (RUV) sobre zooplancton y estadios tempranos de peces, en ambientes de agua dulce ubicados en el Noroeste Patagónico y la Península Antártica.

La radiación UV tiene marcados efectos sobre la vida en la Tierra. La magnitud de su influencia sobre los seres vivos, hoy en día se ve exacerbada por los cambios que alteran la atmósfera. La Tierra está siendo afectada, en las últimas décadas, por diversos eventos que ponen de manifiesto la existencia de un profundo proceso de cambio climático. En este sentido, el calentamiento global y la destrucción de la capa de ozono, son considerados los dos eventos más significativos y que mayores consecuencias podrían ocasionar al planeta. En la década de los 80, se detectó una importante reducción de la capa protectora de ozono (Farman et al. 1985), conocido como agujero de ozono. Esto tiene como consecuencia, sustanciales aumentos en el flujo de RUV a nivel de la superficie terrestre, particularmente en la región del ultravioleta-B del espectro solar (Madronich 1994). A partir de entonces, se han incrementado en gran medida las investigaciones sobre los efectos que la RUV ejerce sobre los seres vivos. Esta radiación es altamente energética y tiene la capacidad de alterar moléculas esenciales para la vida, principalmente el material genético de las células, pudiendo constituir un factor de gran relevancia en la selección natural.

Naturaleza de la radiación ultravioleta

La RUV natural comprende una porción del espectro electromagnético emitido por el sol, correspondiente a las longitudes de onda menores que las visibles por el ojo

humano, y que abarca aproximadamente desde los 180 a los 400 nm (Orce, 1990). El espectro UV se divide a su vez en tres porciones: la banda UVA o UV cercano (320 a 400 nm), la banda UVB o UV medio (280 a 320 nm) y la banda UVC o UV lejano (< 280 nm). Como lo expresa la siguiente ecuación: $E = h\nu$, y considerando que la relación entre la frecuencia y la longitud de onda es $\nu = c / \lambda$, puede deducirse fácilmente que cuanto menor es la longitud de una onda, mayor es la energía que esta posee. En otras palabras energía y longitud de onda están inversamente relacionadas. Si bien cualquiera de las tres bandas puede resultar perjudicial para los organismos, la franja del UVC es la que posee mayor energía y por ende resulta extremadamente dañina para la vida. Ésta es absorbida totalmente por el ozono, el oxígeno y otros gases atmosféricos, que no permiten su llegada a la superficie terrestre. La franja UVB también posee efectos nocivos, aunque en menor grado que el UVC. Sin embargo, es la que mayor peligro representa para la vida, dado que un pequeño porcentaje de ella sí alcanza la superficie terrestre. La banda UV-A atraviesa la atmósfera en un 90 %, pero, dada su baja energía, es en general la menos dañina de las tres (Orce, 1990).

El ozono atmosférico

Las concentraciones normales de ozono en la atmósfera se mantienen en un equilibrio dinámico entre procesos de destrucción y de generación de dicho gas que ocurren permanentemente. Se genera ozono cuando al incidir radiación del tipo UVC ($\lambda < 240$ nm) sobre las moléculas de oxígeno en la estratósfera, estas se escinden en radicales libres que reaccionan luego con otras moléculas de oxígeno para formar el ozono. Asimismo, si la radiación UV ($\lambda < 310$ nm) incide sobre el ozono, éste puede disociarse para convertirse nuevamente en oxígeno molecular y radicales libres (Orce, 1990).

La destrucción química antropogénica del ozono se produce en la estratosfera. Tiene lugar a través de reacciones catalíticas con los llamados halocarburos (compuestos de carbono con halógenos, i.e. Cl, Br, F) o más conocidos como CFCs (clorofluorocarburos). Los CFCs son gases inertes sumamente estables que se han usado ampliamente como propelentes de aerosoles, gases refrigerantes y extinguidores de incendio, entre otros usos. Dada su gran estabilidad permanecen inalterados hasta llegar a la alta atmósfera, allí son alcanzados por la radiación UVC, desencadenándose una reacción en la cual se liberan átomos de Cl. Estos radicales libres reaccionan con el ozono produciendo monóxido de cloro y oxígeno. El monóxido de cloro, reacciona con átomos de oxígeno y se vuelve a generar cloro atómico reiniciándose la reacción de destrucción. Estas reacciones se suceden repetidas veces; se estima que un solo átomo de cloro puede catalizar la destrucción de unas 100.000 moléculas de ozono (Orce, 1990).

Lo que se conoce como agujero de ozono es el resultado del proceso recién descrito, que bajo condiciones especiales, se produce de forma aguda y concentrada tanto temporal como espacialmente, i.e. en la primavera austral y sobre el continente antártico. Esta localización espacio-temporal particular está relacionada con la dinámica atmosférica polar.

Efectos biológicos de la RUV

Existen numerosas evidencias de diferentes tipos de daño, provocados por la radiación UV-B sobre distintos organismos (Tartarotti et al. 2000, Browman et al. 2000, Zagarese et al. 1997, Rousseaux et al. 1999). Entre los daños se encuentran lesiones tales como mutaciones del genoma, modificación de proteínas y lípidos, formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). La lesión más común que

se produce en el ADN es la formación de dímeros de pirimidina (~75% de los fotoproductos). Como consecuencia del efecto sobre estas moléculas orgánicas esenciales, se generan diversos daños, a nivel de las membranas celulares, limitación de la motilidad, inmunosupresión, etc., pudiendo llegar a producirse la muerte del organismo.

Los animales terrestres, por lo general, están cubiertos por gruesos tegumentos, pelos o plumas que los protegen de los efectos nocivos de la radiación solar; los organismos acuáticos, en cambio, tienen epidermis mucho más descubiertas, delgadas y translúcidas, lo que los hace mucho más susceptibles a los efectos de la radiación (Cockell 1999).

La cantidad y composición espectral de la radiación UV que alcanza el nivel del suelo depende de la concentración de ozono atmosférico, el ángulo del sol, la nubosidad, las condiciones troposféricas (i.e. estado de contaminación del aire), la elevación del sitio sobre el nivel del mar y la latitud del sitio. En los ambientes acuáticos, además de todos estos factores que controlan el nivel de radiación en el medio, se suman el agua y particularmente la materia orgánica disuelta (MOD), que actúan como filtro, regulando el ambiente UV subacuático. La atenuación de la radiación solar con la profundidad genera un pronunciado gradiente vertical que determina la distribución de los organismos y de sus fuentes de alimento, el perfil térmico, y la disponibilidad de gases y nutrientes. En los ambientes con gran concentración de MOD, la radiación se atenúa rápidamente en los primeros centímetros. Por ende, en ese tipo de ambiente, la radiación ultravioleta no representa un peligro directo para los seres vivos que los habitan (aunque indirectamente sí pueden verse afectados por la formación de Especies Reactivas de Oxígeno en el ambiente). El otro extremo lo representan los ambientes acuáticos muy transparentes (como los lagos de

altura o las aguas abiertas marinas u oceánicas, todos ambientes ultraoligotróficos) que tienen una limitada capacidad de atenuación de la radiación ultravioleta. Así, los organismos que habitan este tipo de aguas, están potencialmente expuestos a altos niveles de RUV a lo largo de su ciclo vital, de modo que para ellos, este factor podría representar una conspicua presión de selección.

Se sabe que tanto los huevos como los estadios tempranos de peces y anfibios, son altamente vulnerables a la radiación ultravioleta natural; esto es debido a su gran transparencia y a la ocurrencia frecuente de los mismos en aguas someras (Hunter y Taylor 1982, Crowder y Crawford 1984, Blaustein et al. 1998). Se ha demostrado que la radiación UV artificial resulta letal en embriones de vida libre de anchoa (*Engraulis mordax*) (Hunter et al. 1979, Hunter et al. 1981) y de salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*) (Bell y Hoar 1950). Williamson y colaboradores (1997) observaron alta mortalidad en huevos de perca amarilla (*Perca flavescens*) incubados en un lago transparente. El fracaso de la eclosión y la mortalidad larval inducida por RUV se asocian a menudo con varios grados de malformación embrionaria (Zagarese y Williamson 2000).

En relación al zooplancton, se encontraron niveles significativos de mortalidad al exponer individuos de *Daphnia pulicaria* a una fuente de radiación UVB artificial (Zagarese y Williamson 1994). Sin embargo, estos autores concluyeron que, en su hábitat natural, los efectos de la RUV debían ser despreciables dado que *Daphnia* permanece en profundidad debido a la presencia de predadores visuales. Otros estudios con zooplancton realizados en costas canadienses (Golfo de St. Lawrence), sugieren que el 50% de los huevos del copépodo *Calanus finmarchicus*, incubados dentro de los 10 cm superficiales del océano, resultarían muertos luego de sólo 2,5 h de exposición a los niveles

actuales de radiación en esa zona a medio día (Kowemberg et al. 1999). En poblaciones naturales de zooplancton antártico, se reportó que las mismas mantienen niveles elevados de daño en el ADN, durante los períodos de incremento del flujo UVB registrados en primavera (Malloy et al. 1997).

Clima óptico en el ambiente acuático

Los cambios climáticos que están teniendo lugar a escala regional o global afectan de forma significativa el clima óptico de la zona pelágica. La disminución en la concentración del ozono estratosférico, se traduce directamente en un aumento de la radiación ultravioleta incidente en la superficie (Madronich 1994). Otros dos procesos, la lluvia ácida y el efecto invernadero provocan cambios en el clima óptico, mediados a través de la concentración de materia orgánica disuelta (MOD). En las zonas más industrializadas del hemisferio norte, la disminución del pH por efecto de la lluvia ácida ha provocado la disminución de la concentración de MOD en lagos y consiguientemente el aumento de la transparencia del agua (Schindler et al. 1996; Williamson et al. 1999). Por otra parte, el aumento de temperatura debido a la intensificación del efecto invernadero puede tener efectos opuestos sobre el clima óptico de la zona pelágica, dependiendo de las características de cada lago: (1) En algunos lagos canadienses se ha observado que el aumento de temperatura estuvo acompañado de una disminución de las precipitaciones, lo cual se tradujo en un menor aporte de materia orgánica desde la cuenca terrestre hacia los lagos. Esta disminución de la concentración de materia orgánica disuelta dio como resultado un aumento de la transparencia del agua, particularmente para las longitudes de onda más cortas del espectro ultravioleta (Schindler et al. 1996; Yan et al. 1996). (2) En la

mayoría de los lagos de montaña, altamente transparentes a la radiación UV, suelen registrarse concentraciones muy bajas de MOD. Los bajos niveles de MOD se deben fundamentalmente al pequeño tamaño de sus cuencas y a que los suelos de estas últimas se encuentran muy poco desarrollados debido a la escasa vegetación. Un aumento de la temperatura probablemente provocaría un desplazamiento de la línea de vegetación hacia mayores alturas y, de manera contraria a lo que ocurre en lagos canadienses, un mayor aporte de materia orgánica hacia los lagos con la consiguiente disminución de la transparencia del agua (Zagarese y Williamson 2000).

RUV y la interacción peces-zooplankton

Los cambios en el clima óptico de los lagos tienen importantes consecuencias sobre las comunidades pelágicas. Por un lado, la radiación UV tiene efectos directos negativos sobre muchas especies (Siebeck et al. 1994, Williamson et al. 1994, Zagarese y Williamson 2000). Pero lo que tal vez sea más importante es la posibilidad de que los cambios en el clima óptico tengan efectos indirectos sobre las poblaciones, a través del efecto sobre las interacciones entre los distintos componentes del ecosistema (Bothwell et al. 1994, de Lange 1999). Una de las relaciones inter-específicas más interesantes y mejor documentadas en las comunidades pelágicas es la que existe entre el zooplankton y sus principales depredadores, los peces planctófagos. Esta es una relación con consecuencias fundamentales tanto para el depredador como para la comunidad de presas (Northcote 1988). La depredación por parte de los peces es uno de los principales factores que modelan la estructura y función de las comunidades planctónicas. Recíprocamente, la disponibilidad de presas (a través de su efecto sobre el

crecimiento y la supervivencia) es uno de los factores principales que determina el reclutamiento de las poblaciones de peces.

Los peces, y en particular los primeros estadios de desarrollo (ictioplancton), son depredadores visuales, por lo que la relación entre estos y el zooplancton está condicionada de forma fundamental por el clima óptico del ambiente. La depredación potencial (o Riesgo de Predación, RP) puede definirse como el producto entre dos factores $RP = DR \times VP$ (Williamson 1993; Williamson et al. 1989). Donde DR (Riesgo debido a la densidad) es un factor dependiente de la densidad y VP es un factor que establece la Vulnerabilidad de la Presa, para un determinado depredador, en un cierto medio. El factor DR depende no sólo de la densidad de presas y depredadores, sino también del grado de solapamiento de sus respectivas distribuciones espaciales; el término VP es afectado por variables tales como el tamaño, coloración y reacciones de escape de la presa, agudeza visual del depredador, cantidad y calidad de luz, etc.

Muchos organismos, que habitan cuerpos de agua cuya morfometría lo permite, realizan migraciones verticales. Así, en las horas de mayor insolación, los organismos se desplazan hacia zonas más profundas de la columna de agua, donde la intensidad de la radiación se haya atenuada. Este comportamiento afecta el grado de solapamiento entre las distribuciones espaciales de los distintos habitantes de la zona pelágica, lo que, volviendo a la ecuación, afectaría en gran medida al componente DR.

Puede suceder que esta "estrategia" no resulte efectiva, es decir, que no sea posible para los organismos hallar un refugio en profundidad. Esto puede ocurrir en un cuerpo de agua poco profundo, o cuando se genera una intensa mezcla de la columna de agua (a causa del viento) que les impide mantener una posición estable, forzándolos a estar cerca de la superficie periódicamente. En estos casos, la exposición es inevitable, y

los organismos sólo evitarán un daño irreversible si cuentan con otras estrategias de mitigación, como la fotoprotección o la reparación del daño.

Mecanismos de mitigación del daño por UV:

La **fotoprotección** consiste en la protección a través de compuestos que absorben en la región UV, como los llamados MAAs (por sus siglas en inglés: Mycosporine like Amino Acids) o la melanina. Otra forma de fotoprotección se debe a un tipo distinto de compuestos, como los carotenoides, que poseen función antioxidante por neutralizar la acción de las especies reactivas de oxígeno generadas por la RUV. El término MAAs, es un nombre genérico que se usa para denominar a un conjunto de compuestos solubles en agua, de estructura química similar (consistente en un anillo aromático conjugado con un aminoácido o un aminoalcohol) (Karentz et al. 1991). Los MAAs presentan gran capacidad de absorción en el rango entre los 309 y los 360 nm. Su estructura básica, probablemente derive de la vía de síntesis del ácido shiquímico, que está presente solamente en bacterias, hongos, algas y plantas superiores. Se han encontrado MAAs en diversos organismos que, sin embargo, no poseen esta vía de síntesis, en cuyo caso, se encontró que incorporan los pigmentos a través de la dieta (Shick et al. 1992).

La **foto-reparación** consiste en la reparación del daño genético a través de un mecanismo enzimático. En presencia de radiación foto-reparadora (luz visible azul o UVA) se induce la activación de la enzima fotoliasa, responsable de llevar a cabo este proceso. Ésta se une a los dímeros de pirimidina en un paso independiente de la luz, y luego, en presencia de luz UVA o visible, absorbe un fotón y utiliza esta energía para romper el enlace y devolver los nucleótidos a su forma original monomérica. La actividad de la enzima fotoliasa, puede verse afectada por la temperatura. Hay estudios de larga data, que demuestran la influencia de la temperatura en este proceso. La unión

específica entre la fotoliasa de levaduras y el ADN dañado resulta disminuida cuando se ensaya a 5°C, en vez de a 37°C (Harm y Rupper 1970). Además, la tasa del paso dependiente de la luz para esta enzima, disminuye considerablemente cuando la reacción tiene lugar a temperaturas por debajo de los -2 °C (Harm 1969). Estas observaciones sugieren que la reparación del daño en el ADN por foto-reactivación podría estar limitada a bajas temperaturas. Del mismo modo, se ha encontrado una eficiencia reducida en la remoción de dímeros por reparación fotoenzimática a bajas temperaturas en varios sistemas biológicos, que incluyen a: un mutante *phrB* de *Escherischia coli* K12 (Dorrell et al. 1995), *Halobacterium cutirrubrum* (Eker et al. 1991), cotiledones de *Cucumis sativus* (Takeuchi et al. 1996), tejidos de aletas y piel del pez *Fundulus heteroclitus* (Malloy et al. 1997) y el alga roja *Palmaria palmata*, para los cuales la efectividad de la foto-reactivación fue casi imperceptible a 0°C comparada con lo que se encontraba a 15 o 25°C (Pakker et al. 2000).

Otro mecanismo de reparación menos eficiente, es la reparación por excisión. Esta es llevada a cabo por varias enzimas que se encargan de cortar y resintetizar el fragmento dañado sin necesidad de luz, por lo que también se la llama, reparación oscura (Britt 1996; Pakker et al. 2000).

Efectos benéficos de la RUV

Los estudios sobre radiación ultravioleta se han concentrado mayormente en sus efectos negativos. Sin embargo, existen situaciones en las que la radiación ultravioleta resulta beneficiosa. Quizás, el ejemplo más paradigmático del rol benéfico de la RUV, sea la síntesis de Vitamina D (Carpenter y Zhao 1999). Otra función positiva, es la relacionada con la visión: es ampliamente reconocido el hecho de que las longitudes de onda mayores del UV (UVA) contribuyen a la orientación y al reconocimiento de

patrones en insectos (von Frisch 1967, Wehner 1992). La visión UV también ha sido demostrada en varios invertebrados acuáticos (Smith y Macagno 1990, Martin et al. 2000) y en vertebrados (Jacobs 1992). Se ha propuesto que la visión UV en peces ayuda en la orientación (Hawryshyn 1992), como así también en la detección de presas, al aumentar el contraste entre las presas y la radiación de fondo (Browman y Hawryshyn 1992, Loew et al. 1993, Browman et al. 1994, Losey et al. 1999). En aguas de gran transparencia, esta capacidad podría conferir importantes ventajas a los predadores visuales que la posean.

Los ambientes estudiados

Los ambientes en los que se han realizado trabajos para esta tesis comprenden cuerpos de agua dulce (lagos y lagunas) de dos grandes regiones: El Parque Nacional Nahuel Huapi (PNNH), en las cercanías de la Ciudad de San Carlos de Bariloche (41°S, 71°O) y la Península Antártica, en las cercanías de la Base Esperanza (63°S, 57°O).

La primera región se localiza al noroeste de la Patagonia, con una extensa superficie abarcada por la Cordillera de los Andes. Durante el Pleistoceno, este área ha sido sometida repetidamente a glaciaciones en grandes extensiones (Flint y Fidalgo 1964). La corriente predominante de aire, del Pacífico Sur, es la principal fuente de humedad. La interposición de los Andes en esta corriente, produce un muy marcado gradiente O-E de precipitaciones. Otro elemento climático característico es la persistencia de fuertes vientos del Oeste. Numerosos cuerpos de agua dulce de origen glacial se distribuyen en la zona cordillerana; dichos ambientes pueden dividirse en dos grandes grupos: lagos de montaña y lagos pedemontanos.

Se define como lagos de montaña o lagos de altura a los lagos que se encuentran a la altura de, o por sobre, la línea de vegetación. Los lagos de montaña suelen ser extremadamente transparentes y típicamente someros (< 25 m) (Zagarese et al. 2000).

Los lagos pedemontanos de esta región también son, en general, extremadamente transparentes debido a su condición oligotrófica y suelen alcanzar profundidades que superan los 100m. En caso de ser someros, son típicamente mucho menos transparentes, con riberas muy vegetadas. Durante el invierno, estos lagos se llegan a congelar sólo excepcionalmente (Zagarese et al. 2000). Las comunidades planctónicas, al igual que en los lagos de altura, son de estructura simple. En muchos de estos lagos pedemontanos, la especie dominante es un copépodo calanoideo del género *Boeckella*: *B. gracilipes*, el cual es muy vulnerable a la RUV (Zagarese et al. 1997). Los vertebrados planctívoros que se destacan en estos lagos corresponden a larvas y juveniles de *Galaxiidae* y *Atherinidae* (Cervellini et al. 1993). También ejercen la planctivoría los estadios más tempranos de especies que durante la ontogenia cambian de hábitos alimenticios; en este grupo se encuentra la especie nativa *Percichthys colhuapiensis* (perca patagónica) y salmónidos introducidos de los géneros *Salmo*, *Salvelinus* y *Oncorhynchus*. (Balseiro y Modenutti, 1999).

La base antártica Esperanza se localiza sobre la Bahía Esperanza, en la punta norte de la Península Antártica, y es la base antártica continental, más boreal que existe (63° 23' S, 56° 59'O). El área incluye varios lagos, lagunas y arroyos. Similarmente a como ocurre en otras regiones antárticas, el estado trófico de los diferentes lagos y lagunas de la zona de Bahía Esperanza, depende principalmente de su tamaño y la cercanía de colonias de aves. Bahía Esperanza se incluye en la provincia norte de la región marítima antártica, de clima frío húmedo marítimo (Lewis Smith 1984). El

margen sudoeste de la bahía, se caracteriza por la presencia de numerosos cuerpos de agua, de origen glacial en su mayoría. Algunos de los lagos pueden considerarse lagos típicos, dado que no se llegan a congelar en su totalidad, y permanecen sin cobertura de hielo durante el verano. Por otro lado, se encuentran los que son muy someros y que permanecen cubiertos de hielo todo el año. Esta zona alberga una de las mayores colonias de pingüinos del continente antártico (Myrcha et al. 1987) lo que condiciona fuertemente las propiedades del suelo. Todos los lagos estudiados son monomícticos, con periodos variables de descongelamiento total en verano (Izaguirre et al 1998). La principal y casi exclusiva especie que compone el zooplancton de estos lagos, es *Boeckella poppei*, un copépodo calanoideo robusto y notoriamente pigmentado. Otros planctontes que se pueden encontrar son los rotíferos: *Notholca walterkosteii* (José de Paggi 1982, Paggi 1986), *Philodina gregaria*, y algunas especies no identificadas. En estos lagos de Esperanza, no habita ningún vertebrado acuático, de modo que *Boeckella poppei* no tiene predadores (tampoco los hay invertebrados). En lagos de las islas Shetland y otras islas subantárticas, en cambio, *B. poppei* sí tiene predadores invertebrados: un coleóptero de la familia Dytiscidae (larvas y adultos son predadores) (Hansson y Tranvik 1996) y un Anostraco filtrador (*Branchinecta gaini*) que podría ser predador facultativo, aunque no está demostrado (Paggi 1996).

Objetivos generales

- Caracterizar la sensibilidad a la radiación ultravioleta en distintas especies y poblaciones de zooplancton e ictioplancton del Parque Nacional Nahuel Huapi y la Península Antártica.
- Evaluar la influencia de la RUV en la interacción trófica entre el zooplancton e ictioplancton.

Objetivos específicos y organización de esta tesis

- 1) Evaluar los efectos de la RUV sobre crustáceos planctónicos e identificar las estrategias para contrarrestar el daño potencial utilizadas por distintas especies sometidas a diferentes presiones ambientales, tales como mayor o menor transparencia y profundidad del cuerpo de agua, presencia o ausencia de depredadores visuales, etc. A este objetivo corresponden los siguientes estudios:
 - a) Evaluación de la sensibilidad a la RUV del copépodo *Boeckella gracilipes* a lo largo de un ciclo anual. Este estudio se llevó a cabo en tres cubetas del lago Moreno, que difieren en su transparencia y morfología, pero están caracterizadas por la presencia de depredadores visuales (Capítulo I).
 - b) Evaluación de la sensibilidad a la RUV del copépodo *Boeckella poppei*. Este estudio se llevó a cabo en distintos lagos de la Península Antártica caracterizados por la ausencia de depredadores. Al igual que en el caso anterior se relacionó la tolerancia a la RUV con las distintas condiciones de exposición determinadas por la transparencia y la profundidad. En este caso, se analizó

particularmente la efectividad de los mecanismos de fotoprotección y foto-reparación (Capítulo 2).

- 2) Evaluar la tolerancia a la RUV de los peces planctívoros más abundantes en los lagos del Parque Nacional Nahuel Huapi (*Galaxias maculatus* y *Odontheistes hatcheri*). Para el desarrollo de este objetivo se trabajó con embriones de las mencionadas especies de peces (Capítulo 3).
- 3) Evaluar la hipótesis de que la visión UV de los peces contribuye a aumentar las tasas de depredación sobre el zooplancton (Capítulo 4).
- 4) Ofrecer una visión sintética de los efectos de la RUV sobre el zooplancton y sus depredadores. En Conclusiones Generales se discuten los resultados de esta tesis en relación a información complementaria obtenida por el conjunto de nuestro grupo de investigación.

Referencias

- Balseiro E. y B. Modenutti. 1998. Pelagic communities and ecosystem processes in Andean Patagonian lakes. *Ecología Austral*. 8: 183-189.
- Bell G.M. y W.S. Hoar. 1950. Some effects of ultraviolet radiation on sockeye salmon eggs and alevins. *Canadian Journal of Research*. 28: 35-43.
- Blaustein A.R., J.M. Kiesecker, D.P. Chivers, D.G. Hokit, A. Marco, L.K. Belden y A. Hatch. 1998. Effects of ultraviolet radiation on amphibians: Field experiments. *American Zoologist*. 38: 199-812.
- Bothwell M.L., D.M.J. Sherbot y C.M. Pollock. 1994. Ecosystem response to solar ultraviolet-B radiation: Influence of trophic-level interactions. *Science*. 265: 97-100.

- Britt A.B. 1996. DNA damage and repair in plants. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 47: 75-100
- Browman H.I. y C.W. Hawryshyn. 1992. Thyroxine induces a precocial loss of ultraviolet photosensitivity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Teleostei). *Vision Research* 32: 2303-2312.
- Browman H.I., I. Novales-Flamerique y C.W. Hawryshyn. 1994. Ultraviolet photoreception contributes to prey search behaviour in two species of zooplanktivorous fishes. *J. Exp. Biol.* 186: 187-198.
- Browman H.I., C. Alonso Rodriguez, F. Beland, J.J. Cullen, R.F. Davis, J.H.M. Kouwenberg, P.S. Kuhn, B. McArthur, J.A. Runge, J.F. St-Pierre y R.D. Vetter. 2000. Impact of ultraviolet radiation on marine crustacean zooplankton and ichthyoplankton: a synthesis of results from estuary and Gulf of St. Lawrence, Canada. *Marine Ecology Progress Series* 199: 293-311.
- Carpenter K.J. y L. Zhao. 1999. Forgotten mysteries in the early history of vitamin D. *Journal of Nutrition* 129: 923-927.
- Cervellini P.V., M. Battini y V. Cussac. 1993. Ontogenetic shifts in the diet of *Galaxias maculatus* (Galaxiidae) and *Odonthestes microlepidotus* (Atherinidae). *Environ. Biol. Fishes* 36: 283-290.
- Cockell C.S. 1999. Crises and extinction in the fossil record- a role for ultraviolet radiation?. *Paleobiology* 25(2): 212-225.
- Crowder L.B. y H.L. Crawford. 1984. Ecological shifts in resource use by bloaters in Lake Michigan. *Transactions of the American Fisheries Society*. 113: 694-700.
- de Lange H.J. 1999. Effects of ultraviolet-B Radiation on Phytoplankton-Zooplankton Interactions. Wageningen., Landbouwniversiteit Wageningen.: 187pp.

- Dorrell N., D.J.G. Davies y S.H. Moss. 1995. Evidence of photoenzymatic repair due to the *phrA* gene in a *phrB* mutant of *Escherichia coli* K12. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 28: 87-92.
- Eker A.P.M., L. Formenoy y L.E.A. de Wit. 1991. Photoreactivation in the extreme halophilic archaeobacterium *Halobacterium cutirubrum*. Photochem. Photobiol. 53: 643-651.
- Farman J.C., B.G. Gardiner y J.D. Shanklin. 1985. Large losses of total ozone in the Antarctica reveal seasonal ClOx/NOx interaction. Nature 315: 207-210.
- Flint R.F. y F. Fidalgo. 1964. Glacial geology of the east flank of the Argentine Andes between latitude 39° 10'S and latitude 41° 20'S. Geol. Soc. Am. Bull. 75: 335-352.
- Hansson L.-A. y L.J. Tranvik. 1996. Quantification of invertebrate predation and herbivory in food chains of low complexity. Oecologia. 108: 542-551.
- Harm H. 1969. Analysis of photoenzymatic repair of UV lesions in DNA by single light flashes III. Comparison of the repair effects at various temperatures between +37° and -196°. Mutation Res. 7: 261-271.
- Harm H. y C.S. Rupert. 1970. Analysis of photoenzymatic repair of UV lesions in DNA by single light flashes VI. Rate constants for enzyme-substrate binding *in vitro* between yeast photoreactivating enzyme and ultraviolet lesions in *Haemophilus* transforming DNA. Mutation Res. 10: 291-306.
- Hawryshyn C.W. 1992. Polarization vision in fish. Amer. Sci. 80: 164-175.
- Hunter J.R., S.E. Kaupp y J.H. Taylor. 1981. Effects of solar and artificial ultraviolet-B radiation on larval northern anchovy, *Engraulis mordax*. Photochemistry and Photobiology. 34: 477-486.

- Hunter J.R. y J.H.Taylor. 1982. Assessment of the effects of UV radiation on marine fish larvae. *The Role of Ultraviolet Radiation in Marine Ecosystems.. NATO Conference Series IV.* (Ed. J. Calkins). pp. 459-497. Plenum Press, New York.
- Hunter J.R., J.H. Taylor y H.G. Moser. 1979. Effect of ultraviolet irradiation on eggs and larvae of the northern anchovy, *Engraulis mordax*, and the pacific mackerel, *Scomber japonicus*, during the embryonic stage. *Photochemistry and Photobiology.* 29: 325-338.
- Izaguirre I., A. Vinocour, G. Mataloni y M. Pose. 1998. Phytoplankton communities in relation to trophic status in lakes from Hope Bay (Antarctic Peninsula). *Hydrobiologia.* 369/370: 73-87.
- Jacobs G.H. 1992. Ultraviolet vision in vertebrates. *Amer. Zool.* 32: 544-554.
- José de Paggi S. 1982. *Notholca walterkosteii* sp. nov. y otros rotíferos dulceacuícolas de la península Potter, isla 25 de Mayo (Shetland de Sur, Antártida). *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral.* 13: 81-95.
- Karentz D., F.S. Mc Euen, M.C. Land y W.C. Dunlap. 1991. Survey of mycosporine-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. *Marine Biology* 108: 157-166.
- Kowemberg J.H.M., H.I. Browman, J.A. Runge, J.J. Cullen, R.F. Davis y J.F. St. Pierre. 1999. Biological weighting of ultraviolet (280-400 nm) induced mortality in marine zooplankton and fish.II. *Calanus finmarchicus* (Copepoda) eggs. *Marine Biology* 134: 285-293.
- Lewis Smith R.Y. 1984. Terrestrial plant biology of the sub-Antarctic and Antarctic. In R. Laws (ed.), *Antarctic Ecology* 1. Academic Press, London. 61-162.

- Loew E.R., W.N. McFarland, E.L. Mills y D. Hunter. 1993. A chromatic action spectrum for planktonic predation by juvenile yellow perch, *Perca flavescens*. Can. J. Zool. 71: 384-386.
- Losey G.S., T.W. Cronin, T.H. Goldsmith, D. Hyde, N.J. Marshall y W.N. McFarland. 1999. The UV visual world of fishes: a review. J. Fish Biol. 54: 921-943.
- Madronich S. 1994. Increases in biologically damaging UV-B radiation due to stratospheric ozone reductions: a brief review. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 43: 17-30.
- Malloy K.D., M.A. Holman, D. Mitchell, y H.W. Detrich III. 1997. Solar UVB-induced DNA damage and photoenzymatic DNA repair in antarctic zooplankton. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 94:1258-1263.
- Martin G.G., C. Speckmann y S. Beidler. 2000. Photobehavior of the harpacticoid copepod *Tigriopus californicus* and the fine structure of its nauplius eye. Invertebrate Biology 119: 110-124.
- Myrcha A., A. Tatur y R. del Valle. 1987. Numbers of Adélie penguins breeding at Hope Bay and Seymour Island rookeries (West Antarctica) in 1985. Polar Research.8: 411-422.
- Northcote T.G. 1988. Fish in the structure and function of freshwater ecosystems: A 'top-down' view. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45:361-379.
- Orce L.V. 1990. Radiación ultravioleta y ozono atmosférico. Ciencia Hoy. 2(9): 41-48.
- Paggi J.C. 1986. Limnological studies in the Potter Peninsula, 25 de Mayo Island, South Shetland Islands: Biomass and spatial distribution of zooplankton. BIOMASS Scientific Series (Antarct. Aquat. Biol.). 7: 175-191.
- Paggi J.C. 1996. Feeding ecology of *Branchinecta gaini* (Crustacea: Anostraca) in ponds of South Shetland Islands, Antarctica. Polar Biol. 16: 13-18.

- Pakker H., R.S.T. Martins, P. Boelen, A.G.J. Buma, O. Nikaido y A.M. Breeman. 2000. Effects of temperature on the photoreactivation of ultraviolet-B-induced DNA damage in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 36: 334-341.
- Rousseaux C.M., C.L. Ballaré, C.V. Giordano, A.L. Scopel, A.M. Zima y M. Szwarcberg-Bracchitta. 1999. Ozone depletion and UVB radiation: Impact on plant DNA damage in southern South America. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96(26): 15310-15315.
- Schindler D.W., P.J. Curtis, B.R. Parker y M.P. Stainton. 1996. Consequences of climate warming and lake acidification for UV-B penetration in North American boreal lakes. *Nature.* 379: 705-708
- Shick M.J., W.C. Dunlap, B.E. Chalker, A.T. Banaszak y T.K. Rozenweig. 1992. Survey of ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in organs of coral reef holothuroids. *Marine Ecology Progress Series* 90: 139-148.
- Siebeck O., T. Vail, C.E. Williamson, R. Vetter, D. Hessen, H.E. Zagarese, E. Little, E.G. Balseiro, B. Modenutti y J. Seva. 1994. Impact of UV-B radiation on zooplankton and fish in pelagic freshwater ecosystems. *Archiv für Hydrobiologie, Beiheft See Ergebnisse der limnologie* 43: 101-104.
- Smith K.C. y E.R. Macagno. 1990. UV photoreceptors in the compound eye of *Daphnia magna* (Crustacea: Branchiopoda). A fourth spectral class in single ommatidia. *J. Comp. Physiol. A* 166: 597-606.
- Takeuchi Y., M. Murakami, N. Nakajima, N. Kondo, y O. Nikaido. 1996. Induction and repair of damage to DNA in cucumber cotyledons irradiated with UV-B. *Plant Cell. Physiol.* 37:181-187.
- Tartarotti B., W. Cravero y H. Zagarese. 2000. Biological weighting function for the mortality of *Boeckella gracilipes* (Copepoda, Crustacea) derived from

- experiments with natural solar radiation. *Photochemistry and Photobiology*. 72(3): 314-319.
- von Frisch K. 1967. The dance language and orientation of bees. Belknap Press, Cambridge. 580 pp.
- Wehner R. 1992. Homing in arthropods. pp. 45-144. In: D.R. Papaj (ed.) *Animal Homing*, Chapman & Hall, London.
- Williamson C.E., M.E. Stoeckel y L.J. Schoeneck. 1989. Predation risk and structure of freshwater zooplankton communities. *Oecologia* 79: 76-82.
- Williamson C.E. 1993. Linking predation risk models with behavioral mechanisms identifying population bottlenecks. *Ecology* 74(2): 320-331.
- Williamson C.E., H.E. Zagarese, P.C. Schulze, B.R. Hargreaves y J. Seva. 1994. The impact of short-term exposure to UV-B radiation on zooplankton communities in north temperate lakes. *Journal of Plankton Research*. 16(3): 205-218.
- Williamson C.E., S.L. Metzgar, P.A. Lovera y R.E. Moeller. 1997. Solar ultraviolet radiation and the spawning habitat of yellow perch, *Perca flavescens*. *Ecological Applications*. 7: 1017-1023.
- Williamson C.E., B.R. Hargreaves, P.S. Orr y P.A. Lovera .1999. Does UV play a role in changes in predation and zooplankton community structure in acidified lakes? *Limnology and Oceanography* 44: 774-783.
- Yan N.D., W. Keller, N.M. Scully, D.R.S. Lean y P.J. Dillon. 1996. Increased UV-B penetretion in a lake owing to drought-induced acidification. *Nature*. 381: 141-143.
- Zagarese H.E. y C.E. Williamson. 1994. The vulneravility of *Daphnia* to UV-B radiation in the northeastern United States. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 43: 207-216.

- Zagarese H.E., M. Feldman y C.E. Williamson. 1997. UV-B-induced damage and photoreactivation in three species of *Boeckella* (Copepoda, calanoida). *Journal of Plankton Research*. 19(3): 357-367.
- Zagarese H.E., M. Díaz, F. Pedrozo y C. Úbeda. 2000. Mountain lakes in northwestern Patagonia. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 27: 533-538.
- Zagarese H.E. y C.E. Williamson. 2000. Impact of UV radiation on zooplankton and fish. *The effects of UV Radiation in the Marine Environment*. (Eds. De Mora S., Demers S. And Vernet M.). Cambridge University Press, Cambridge. 324 pp.
- Zellmer I.D. 1995. UV-B tolerance of alpine and arctic *Daphnia*. *Hydrobiologia* 307, 153-159.

Capítulo I: “Tolerancia a la radiación ultravioleta en tres poblaciones de *Boeckella gracilipes* (Copepoda, calanoida)”

Introducción

La exposición a la radiación ultravioleta (RUV) resulta dañina para la mayoría de los organismos acuáticos (Williamson 1996; Newman et al. 1999). Los efectos de una exposición prolongada incluyen alteraciones foto-químicas de biomoléculas esenciales, tales como el ADN y proteínas, lesiones en tejidos y órganos, depresión del sistema inmune, etc. (Malloy et al. 1997; Salo et al. 2000).

Kowemberg et al. (1999) estimaron que el 50% de los huevos del copépodo *Calanus finmarchicus*, incubados dentro de los 10 cm superficiales del océano en el Golfo de St. Lawrence, resultarían muertos luego de sólo 2,5 hr. de exposición a los niveles normales de radiación para esa zona en horas cercanas al medio día. En poblaciones naturales de zooplancton antártico, se reportó que las mismas mantienen niveles elevados de daño en el ADN, durante los períodos de incremento del flujo UVB, que se registran en la primavera antártica (Malloy et al. 1997). Por otra parte, Zagarese y colaboradores (1994) encontraron niveles significativos de mortalidad al exponer individuos de *Daphnia pulicaria* a una fuente de radiación UVB artificial. Sin embargo, concluyeron que los efectos de la RUV natural debían ser despreciables dada la permanencia en profundidad de esos organismos, a causa de la presencia de predadores visuales en superficie.

Para contrarrestar los efectos dañinos de la RUV, los organismos acuáticos pueden utilizar tres estrategias básicas, las cuales ya fueron expuestas en la introducción general de esta tesis y que aquí sintetizaré brevemente.

La **Evitación** que permite que los organismos permanezcan en lugares poco expuestos a la radiación solar durante las horas de mayor intensidad. Por ejemplo, en experimentos de campo se observó que los individuos del copépodo harpaticoideo *Tigriopus californicus*, se agregaban en las zonas más sombreadas al mediodía (Martin et al. 2000).

La **Fotoprotección** a través del empleo de compuestos fotoprotectores, que actúan como 'pantallas solares' (i.e., melaninas, MAAs) o bien como antioxidantes (i.e., carotenoides).

La **Reparación**, última instancia de defensa contra el daño por UV, permite la corrección de alteraciones producidas en las moléculas de ADN a través de mecanismos enzimáticos. Uno de los mecanismos de reparación más eficientes es la foto-reparación, mediado por la enzima fotoliasa. Esta enzima necesita absorber fotones de entre 350 y 450 nm y utiliza esa energía para revertir el daño en el ADN.

El grado de exposición a la RUV de los organismos en el agua, es determinado por la transparencia y por la posición que ocupen dentro de la columna. La transparencia del agua, a su vez, depende principalmente del contenido de materia orgánica disuelta (Morris et al. 1995).

Muchos organismos responden a los cambios de exposición a la RUV incrementando la efectividad de alguna de las estrategias anteriores. Si distintas poblaciones de una misma especie, habitan ambientes con diferentes grados de exposición al UV, cabría esperar que su tolerancia varíe de acuerdo al régimen lumínico al que cada población se halla adaptada. Asimismo, las variaciones estacionales en los niveles de radiación podrían verse reflejadas en variaciones de la tolerancia dentro de una misma población.

La especie de copépodo estudiada, *Boeckella gracilipes*, es frecuentemente la especie dominante en muchos lagos de la región andina (Menu-Marque et al. 2000). Se trata de un copépodo calanoideo de la familia *Centropagidae*. Las especies del género *Boeckella*, se distribuyen ampliamente por los cuerpos de agua dulce de América del sur a lo largo de la región andina. Las especies que hoy se agrupan bajo el género *Boeckella*, anteriormente estaban divididas en dos géneros, *Boeckella* y *Pseudoboeckella*. Bayly (1992) unificó ambos géneros argumentando que las mismas representaban simplemente los extremos de un gradiente morfológico y de tamaño, de formas más grandes y robustas (*Pseudoboeckella*) a formas pequeñas y gráciles (*Boeckella*) (Menu-Marque et al. 2000).

En este capítulo se estimó la tolerancia a la RUV a lo largo de un año, en tres poblaciones de *Boeckella gracilipes*. Los ambientes estudiados fueron los lagos Moreno Este, Moreno Oeste y Morenito (41° 05'S, 71° 30'O). Simultáneamente, fueron realizados estudios de distribución vertical de zooplancton e ictioplancton en colaboración con otros integrantes del laboratorio (Alonso et al. 2004). Los mismos aportan valiosas evidencias a la hora de interpretar y discutir los resultados, por este motivo se los incluye en este capítulo, si bien no constituyen formalmente parte de la presente tesis.

Materiales y Métodos

Con el objetivo de evaluar la tolerancia de *Boeckella gracilipes* a la RUV, se eligieron tres poblaciones provenientes de ambientes con características ópticas diferentes, las cuales fueron estudiadas a lo largo de un ciclo anual. El estudio consistió en la evaluación periódica de la tolerancia al UV, por medio de ensayos de laboratorio, de exposición a la RUV artificial.

Área de estudio

Los lagos estudiados se hallan conectados entre sí; sin embargo poseen características físicas, ópticas y morfométricas diferentes. Se trata de los lagos Moreno Este (área: 5.42 km²), Moreno Oeste (área: 5.22 km²) y Morenito (área: 0.83 km²). Los dos primeros son profundos ($Z_{media} > 50$ m), oligotróficos (Carbono Orgánico Disuelto: 0.5-0.7 g m⁻³) y muy transparentes (K_{dPAR} : 0.21-0.29 m⁻¹, K_{d320} : 0.52-0.68 m⁻¹), en tanto que el Lago Morenito es mucho menos profundo ($Z_{media} \sim 10$ m), con mayor contenido de COD (2.4 g m⁻³) y de menor transparencia (K_{dPAR} : 0.55 m⁻¹, K_{d320} : 5.5 m⁻¹). El término $K_{d(\lambda)}$ se refiere al coeficiente de atenuación difusa y es una medida de la atenuación de la radiación con la profundidad. Se puede estimar para una longitud de onda específica o para un intervalo (como en el caso del PAR (400-700nm), Photosintetic Active Radiation). Se calcula despejando el término de la ecuación de atenuación (derivada de la Ley de Lamber-Beer): $I_{(\lambda)0} = I_{(\lambda)z} e^{-k \cdot z}$, donde I_0 es la irradiancia en superficie, e I_z la irradiancia a la profundidad z . En este caso, las irradiancias se midieron con un radiómetro sumergible PUV-500 (de Biospherical Instruments).

Los tres lagos se encuentran dentro del Parque Nacional Nahuel Huapi, en las cercanías de la ciudad de Bariloche (41° 08' S, 71° 25' O), Provincia de Río Negro.

Al comparar las tolerancias de tres poblaciones entre sí, y al analizar las variaciones en la tolerancia de cada población a lo largo del tiempo, se intentó detectar diferencias tanto espaciales (entre las poblaciones de los distintos lagos) como temporales (entre estaciones, dentro de cada población).

Las colectas de zooplancton para los ensayos se repitieron en cada población con una frecuencia quincenal. Sin embargo, el número de ejemplares colectados no siempre fue suficiente para iniciar un ensayo; fue posible realizar entre 1 y 3 ensayos por estación del año, para cada población (Tabla 1-1). Para los muestreos se realizaron arrastres oblicuos desde una embarcación con motor fuera de borda, utilizando una red cónica de 32 cm de diámetro de boca x 105 cm de largo, con malla de 270 μ m de poro. Los arrastres abarcaron aproximadamente la franja entre los 4 y 15 m de profundidad, dependiendo del caso.

Tabla 1-1. Fechas de inicio de los experimentos de exposición a la RUV artificial realizados con 3 poblaciones de *Boeckella gracilipes* durante 1999.

	Morenito		Moreno Este		Moreno Oeste	
	Oscuridad	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad	Luz
Verano	13/1/99 25/1/99		5/2/99		15/2/99 26/2/99 2/3/99	
Otoño	22/4/99 31/5/99	1/6/99	9/4/99 25/4/99	12/4/99 26/4/99	15/5/99 7/6/99	16/5/99 8/6/99
Invierno	7/7/99	4/7/99	14/7/99		7/7/99	4/7/99
Primavera	23/9/99	26/9/99	14/9/99 26/10/99	16/9/99 28/10/99	6/9/99 7/10/99 31/10/99	7/9/99 12/10/99 28/10/99

Protocolo de exposición a la RUV

En ausencia de radiación foto-reparadora (i.e., en oscuridad):

Para evaluar la vulnerabilidad de los organismos a la RUV se realizaron ensayos (de 48 h. de duración) de exposición a la RUV artificial en un incubador. La fuente de UV utilizada fue una lámpara fluorescente Spectroline XX15-B (de Spectronics Corp.), la cual se cubrió, al inicio de cada ensayo, con una lámina de diacetato de celulosa para eliminar la radiación de longitud de onda menor a 295 nm, dado que la radiación de longitud de onda menor a 295 nm no atraviesa la alta atmósfera y por lo tanto no llega a la superficie de la tierra (Orce, 1990). Cada ensayo consistió en la exposición a la RUV de adultos (30 individuos por unidad experimental; 3 réplicas por tratamiento) por un lapso de 4 h., a diferentes dosis de radiación ultravioleta (0.1, 0.3, 0.4, 0.5 J. cm⁻² de UV-B (295-320 nm)) y un control sin UV. Las distintas dosis se lograron variando el número filtros de densidad neutra sobre la parte superior de cada unidad experimental (Cajas de Petri). La lámpara estuvo suspendida a 30 cm de las cajas, las cuales se

hallaban dispuestas sobre una bandeja giratoria con el fin de obtener dosis uniformes. A partir de estos ensayos se pudo establecer una función Dosis-Respuesta (mortalidad) que permitió caracterizar la tolerancia de cada una de las poblaciones de *Boeckella gracilipes*. El parámetro considerado para esa caracterización fue el valor de la dosis a la cual se alcanza el 50% de mortalidad, Dosis Letal $_{50}$ (DL $_{50}$).

En presencia de radiación foto-reparadora (i.e., con Luz visible):

El mismo protocolo realizado en presencia de luz visible permitió evaluar la capacidad de foto-reparación, ya que como se mencionara anteriormente, la presencia de luz es necesaria para el funcionamiento de la enzima fotoliasa. Con los datos obtenidos se calculó el Factor Modificador de la Dosis (FMD), como el cociente entre la DL $_{50}$ en presencia de radiación reparadora (luz visible) y la DL $_{50}$ en ausencia de dicha radiación. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA en regresión.

Resultados

Las tres poblaciones de *Boeckella gracilipes* estudiadas, mostraron una alta sensibilidad a la RUV durante todo el ciclo anual. La DL $_{50}$ obtenida promediando todos los ensayos de las tres poblaciones fue de 0.42 J cm^{-2} y en ningún caso particular fue mayor de 1.02 J cm^{-2} .

Se detectaron diferencias significativas entre los tres ambientes en cuanto a la resistencia a la RUV artificial (ANOVA, $p < 0.001$). La población del Lago Morenito resultó ser más tolerante que las poblaciones de los lagos Moreno Este y Oeste, las cuales no mostraron diferencias significativas entre sí (prueba de Bonferroni, $p < 0.001$).

La mayor tolerancia de la población del Morenito, se mantuvo a lo largo de todo el año (Figura 1-1).

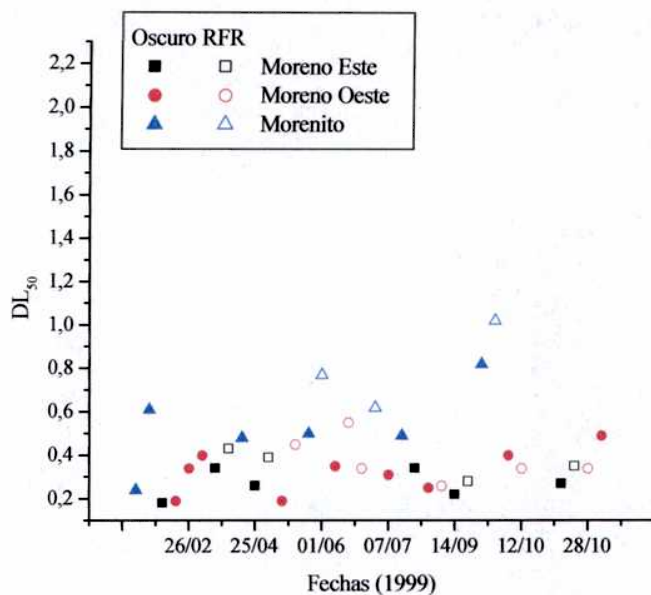


Figura 1-1. Dosis Letales (50) de los experimentos realizados en las tres poblaciones a lo largo del año. Los símbolos llenos corresponden a los tratamientos realizados en oscuridad y los vacíos a los tratamientos con radiación foto-reparadora (RFR).

Considerando únicamente los ensayos en oscuridad, los individuos del lago Morenito mostraron una tolerancia a la RUV ($DL_{50} = 0,59 \text{ J.cm}^{-2}$), es decir, aproximadamente dos veces mayor que la de los individuos de los lagos Moreno Este ($DL_{50} = 0,27 \text{ J.cm}^{-2}$) y Moreno Oeste ($DL_{50} = 0,32 \text{ J.cm}^{-2}$) (Figura 1-2). Ocasionalmente se detectaron diferencias significativas entre 'fechas'. Sin embargo, no se observó una tendencia definida con la estacionalidad.

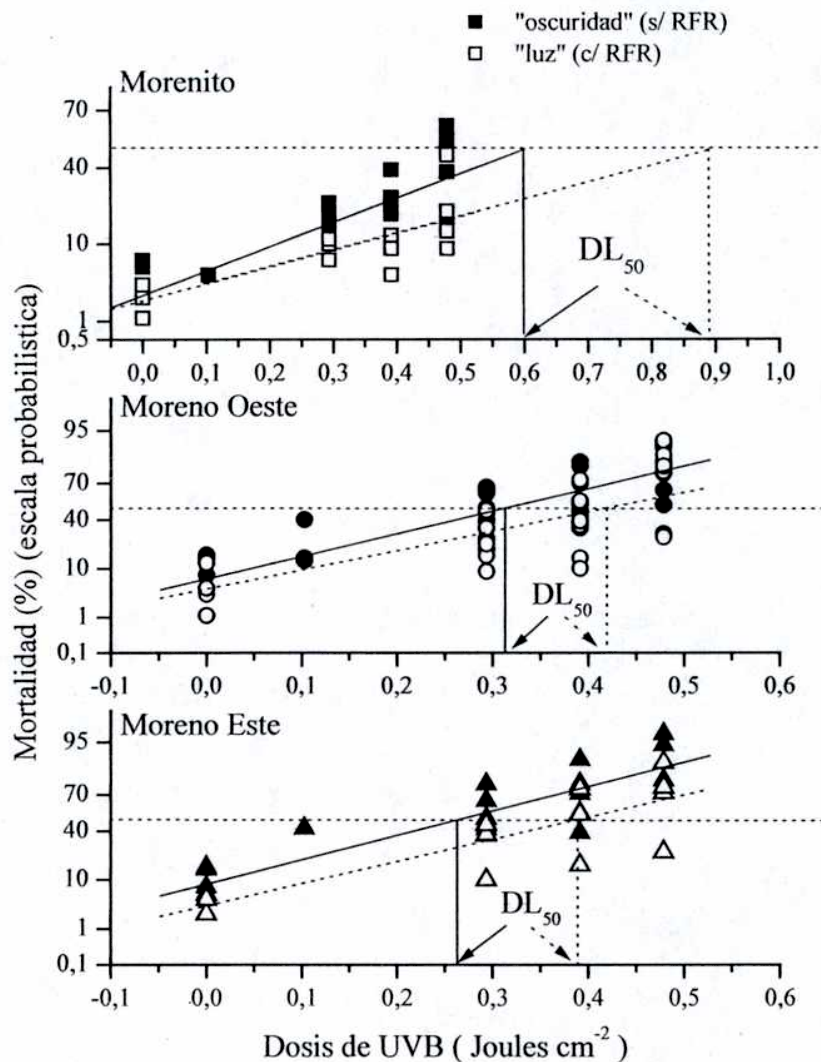


Figura 1-2. Tolerancia de *B. gracilipes* a la radiación UVB artificial. Símbolos llenos: exposición UVB en ausencia de radiación RFR (i.e. PAR), Símbolos abiertos: exposición UVB en presencia de PAR. Para cada población, los datos incluidos son los resultados de, al menos, cuatro experimentos independientes realizados en diferentes estaciones. Las líneas corresponden a un ajuste lineal de las tasas de mortalidad transformada a logit, versus la dosis de UVB. Las flechas indican la dosis que produce el 50 % de mortalidad (i.e. valor de DL₅₀).

En los tres lagos estudiados, los copépodos resultaron más resistentes a la RUV en los experimentos en presencia de luz visible (ANOVA, $p < 0.001$). Sin embargo el FMD varió sólo entre 1.35 y 1.49. Estos valores son muy inferiores a los que presentan las especies cuyos mecanismos de foto-reparación se consideran importantes (FMD ~ 4-14) (Siebeck and Böhm, 1991).

Discusión

Los resultados obtenidos confirman la noción de que el copépodo *Boeckella gracilipes* es altamente susceptible a la radiación ultravioleta, considerando el bajo valor de las DL_{50} obtenidas en los distintos ensayos. La limitada tolerancia de *B. gracilipes* a la RUV ya había sido detectada en estudios anteriores, donde se la comparaba con otras especies del género *Boeckella* (Zagarese et al. 1997). Su escasa tolerancia a la RUV se debe tanto a la baja concentración de compuestos foto-protectores (Tartarotti et al. 2004), como a su limitada capacidad de foto-reparación (Figura 1-2). A pesar de la alta sensibilidad encontrada, estas poblaciones logran sobrellevar niveles importantes de RUV incidente en su medio natural. Esto puede explicarse teniendo en cuenta las características de cada uno de estos ambientes y las posibles estrategias para evitar el daño por exposición a la RUV.

La tolerancia a la RUV de los individuos del lago Morenito duplica aproximadamente a la de los individuos de los lagos Moreno Este y Moreno Oeste. En base a los valores de FMD (1.49 para la población del Morenito, 1.47 para la del M. Este y 1.35 para la del M. Oeste) puede afirmarse que las tres poblaciones poseen una capacidad de foto-reparación similar y muy limitada.

Dada la escasa profundidad del lago Morenito, es probable que los organismos no consigan ajustar su posición vertical de manera efectiva, debido a la mezcla vertical inducida por los fuertes vientos de la región. De modo que esta población, a pesar de contar con la ventaja de vivir en el ambiente menos transparente (por ser el de mayor concentración de materia orgánica), podría ser la que mayor exposición a la RUV soporta. De confirmarse que la exposición efectiva a la RUV resulta mayor en el lago Morenito, se podría explicar la mayor tolerancia

como una respuesta de aclimatación. Sin embargo, otras explicaciones son igualmente probables. Por ejemplo, el hecho de que esta población presente un mayor grado de tolerancia podría estar relacionado con un mejor estado nutricional dado que los individuos del Morenito tenían un tamaño ligeramente mayor (observación personal) a los individuos de las otras poblaciones. Estudios en *Daphnia pulex* (Zellmer 1996) demuestran una mayor tolerancia a la RUV en función de un mejor estado nutricional.

Las poblaciones del Moreno Este y Oeste, que presentan una baja tolerancia a la radiación ultravioleta y ninguna evidencia de aclimatación, resisten en el medio natural por la posibilidad de evitar la exposición. Esta estrategia de evitación se consigue ajustando la distribución vertical en la columna de agua, según las condiciones de irradiación (Alonso et al. 2004.)

Los estudios de distribución vertical de zooplancton revelaron que la ocupación de la capa superficial fue mínima durante las estaciones de mayor irradiación (primavera-verano), en los ambientes más profundos y transparentes (lagos Moreno Este y Moreno Oeste); por su parte, en el lago de menor transparencia, Morenito, no se observó un cambio sistemático en el grado de ocupación de la superficie (Figura 2 de Alonso et al. 2004). Los patrones de distribución vertical del zooplancton encontrados por Alonso y colaboradores, no se ajustan a lo predicho según la hipótesis de evasión de predadores visuales, ya que teniendo en cuenta las densidades de ictioplancton por estrato en los tres ambientes (Figura 5 de Alonso et al. 2004), la evitación de la superficie del zooplancton tendería a incrementar (en lugar de disminuir) la superposición con los predadores.

Por otra parte, se encontró una correlación inversa entre la ocupación del estrato superficial y los niveles de radiación UVB promedios en dicho estrato: a bajos niveles

de RUV el porcentaje de ocupación es variable, pero a medida que se incrementan los niveles de radiación, el porcentaje de ocupación parece ir restringiéndose progresivamente hacia valores más bajos. En cambio, los gráficos de porcentaje de ocupación del estrato superficial versus PAR promedio (i.e., I_{media}) dentro del estrato, no muestran ninguna tendencia definida (Alonso et al. 2004).

Finalmente concluimos que en algunos lagos patagónicos, la RUV parecería ser la causa de la distribución en profundidad del zooplancton. Los resultados de este capítulo en combinación con los presentados por Alonso et al. (2004) constituyen la primera demostración no manipulativa de que el zooplancton puede migrar en profundidad como una estrategia para evitar la exposición a la RUV y no en respuesta a depredadores visuales. Más aún, el estudio de la tolerancia a la RUV presentado en este capítulo confirma que la evitación de los niveles superficiales de RUV es una estrategia eficaz que le permite a *B. gracilipes* habitar en los lagos patagónicos. Indirectamente, estos resultados aportan valiosa información para interpretar la ausencia de *B. gracilipes* en los lagos transparentes de altura (e.g. Laguna Tonckek, Schmol) aún cuando se encuentra presente en lagos de altura menos transparentes (e.g. Lago Verde) (Zagarese et al 2000).

Referencias

- Alonso C., Rocco V., Barriga J.P., Battini M.A. y Zagarese H. (2004). Surface avoidance by freshwater zooplankton: field evidence on the role of ultraviolet radiation. *Limnology & Oceanography*. 49(1): 225-232.
- Bayly I.A.E. (1992). Fusion of the genera *Boeckella* and *Pseudoboeckella* (Copepoda, Calanoida) and revision of their species from South America and sub-Antarctic islands. *Revista Chilena de Historia Natural*. 65: 17-63.

- Kowemberg J.H.M., Browman H.I., Cullen J.J., Davis R.F., St. Pierre, J.F. & Runge J.A. (1999). Biological weighting of ultraviolet (280-400 nm) induced mortality in marine zooplankton and fish.II. *Calanus finmarchicus* (Copepoda) eggs. *Marine Biology* 134: 285-293.
- Malloy K.D., Holman M.A., Mitchell D., Detrich III W.H. (1997). Solar UVB-induced DNA damage and photoenzymatic DNA repair in antarctic zooplankton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1258-1263.
- Martin G.G., Speckmann C. & Beideler S. (2000). Photobehaviour of the harpacticoid copepod *Tigriopus californicus* and the fine structure of its nauplius eye. *Invertebrate Biology* 119(1): 110-124.
- Menu-Marque S., Morrone J.J. & Locascio de Mitrovich C. (2000). Distributional Patterns of the south american species of *Boeckella* (Crustacea: Copepoda: Centropagidae): A track analysis. *Journal of Crustacean Biology* 20(2): 262-272.
- Morris, D. P., H. E. Zagarese, C. E. Williamson, E. G. Balseiro, B. R. Hargreaves, B. Modenutti, R. Moeller, C. Queimaliños. (1995) The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnol. Oceanogr.* 40: 1381-1391.
- Newman S.J., Nicol S., Ritz D. & Marchant H. (1999). Susceptibility of Antarctic krill (*Euphasia superba* Dana) to ultraviolet radiation. *Polar Biology* 22: 50-55.
- Orce, L. V. 1990. Radiación ultravioleta y ozono atmosférico. *Ciencia Hoy*. 2(9): 41-48.
- Salo H.M., Jokinen I.E., Markkula E.S., Aaltonen T.M. (2000). Ultraviolet B irradiation modulates the immune system of fish (*Rutilus rutilus*, Cyprinidae).II: Blood. *Photochemistry and Photobiology* 71(1): 65-70.
- Siebeck, O. and Böhm, U. (1991) UV-B effects on aquatic animals. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 24, 2773-2777.

- Tartarotti, B., G Baffico, P. Temporetti, and H. E. Zagarese. 2004. Mycosporine-like amino acids in planktonic organisms living under different UV exposure conditions in Patagonian lakes. *Journal of Plankton Research* 26 (7):753-762.
- Williamson C.E. (1996). Effects of UV radiation on freshwater ecosystems. *Intern. J. Environmental Studies*. 51: 245-256.
- Zagarese, H.E., Feldman, M. and Williamson, C.E. (1997) UV-B induced damage and photoreactivation in three species of *Boeckella* (Copepoda, Calanoida). *J. Plankton Res.* 19, 357-367.
- Zagarese H.E., Williamson C.E., Mislivets M. & Orr P. (1994). The vulneravility of *Daphnia* to UV-B radiation in the northeastern United States. *Arch. Hydrobiol. Beih* 43: 207-216.
- Zagarese, H. E., M. Diaz, F. Pedrozo, and C. Úbeda. (2000). Mountain lakes in Northwestern Patagonia. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 27:533-538.
- Zellmer, I.D. (1996). The impact of food quantity on UV-B tolerance and recovery from UV-B damage in *Daphnia pulex*. *Hydrobiologia* 319 (2):87-92.

Capítulo II: “Daños producidos por UV y mecanismos de mitigación en el copépodo *Boeckella poppei*, de la Península Antártica”

Introducción

El adelgazamiento de la capa de ozono sobre el continente antártico (Farman et al. 1985) tiene como consecuencia, sustanciales aumentos en el flujo de radiación ultravioleta que llega a la superficie de la tierra, particularmente en la región del ultravioleta-B (UVB: 290-320 nm) del espectro solar. Numerosos estudios han documentado los efectos inhibitorios del aumento de la radiación ultravioleta (RUV) sobre organismos marinos de aguas antárticas (Vernet y Kozlowski 2001). En cambio, hay solamente unos pocos trabajos referidos a los efectos de la RUV sobre organismos dulceacuícolas de lagos antárticos (Cabrera y Pizarro 1994; Kepner et al. 2000).

Como se describió en la introducción general, los organismos acuáticos han desarrollado tres estrategias básicas para mitigar los efectos negativos de la RUV solar (Zagarese y Williamson 1994). En muchas situaciones los organismos pueden evitar la exposición a los flujos dañinos de RUV, permaneciendo en las profundidades de la columna de agua durante las horas del día. Adoptar esta estrategia no siempre es factible, por ejemplo en casos en que el cuerpo de agua es relativamente somero y de aguas muy transparentes a la RUV. Otro factor que disminuiría la efectividad de la estrategia de evitación es cuando, en la columna de agua, tiene lugar una fuerte mezcla por la turbulencia que genera el viento (Zagarese et al. 1998). Los lagos de la Península antártica se encuentran altamente expuestos a la RUV (Izaguirre et al. 1998) debido a los efectos combinados de la transparencia, poca profundidad y la exposición a vientos extremadamente fuertes.

Un segundo mecanismo para poder convivir con una alta exposición a la RUV, es la síntesis o incorporación (a través de la dieta) de compuestos protectores contra el UV, que actúan como pantallas solares o como antioxidantes. Dentro de este tipo de compuestos, los llamados MAAs (por sus siglas en inglés: Micosporyne-like amino acids), están ampliamente distribuidos en organismos marinos planctónicos y bentónicos (Roy 2000). Los MAAs son compuestos solubles en agua y tienen una alta eficiencia de absorción en el rango ultravioleta (máxima absorción a 309-360 nm). Recientemente, los MAAs se han identificado en copépodos y rotíferos de agua dulce, pero no en cladóceros (Sommaruga y García Pichel 1999; Tartarotti et al. 2001).

La última alternativa de defensa contra la exposición al UV, consiste en la reparación del daño una vez que este se produjo. El daño más común e importante producido en el ADN por los rayos UVB y UVC, es la formación de dímeros de ciclobutano-pirimidina (o CPDs por sus siglas en inglés) y de fotoproductos (6-4) pirimidina-pirimidona (Friedberg et al. 1995). Estas lesiones bloquean los procesos de replicación y transcripción del ADN, generando mutaciones y a veces hasta efectos letales. Los organismos vivientes han desarrollado un mecanismo para la reparación de los dímeros de pirimidina. En este mecanismo (foto-reactivación) interviene una sola enzima (fotoliasa) que, mediante el uso de la energía del UV cercano (UVA) y de la luz visible, revierte directamente los dímeros de pirimidina a dos nucleótidos de pirimidina (Todo et al. 1993; Friedberg et al. 1995). La actividad fotoliasa está ampliamente distribuida en la naturaleza, se ha encontrado foto-reparación en representantes de todos los reinos. Sin embargo este mecanismo está ausente en algunas especies (Sancar 1994).

En este trabajo se describen los mecanismos empleados por *Boeckella poppei* para tolerar los niveles de RUV que se registran en diversos lagos de la península antártica. El género *Boeckella* tiene una distribución circumpolar (Menu Marque et al.

2000) y es una de las especies dominantes en lagos de Australasia, Antártida y América del Sur.

Materiales y Métodos

El área de estudio incluyó varios lagos y lagunas cercanas a la base Esperanza (63°S, 57°O) (Figura 2-1), en la Península Antártica. Estos cuerpos de agua se encuentran cubiertos por una gruesa capa de hielo durante la mayor parte del año. Bajo la cobertura de hielo, la luz es tenue (Kepner et al. 2000), pero luego del deshielo, los organismos se ven expuestos repentinamente a mayor radiación y a fotoperíodos mucho más largos. De este modo, aunque el flujo instantáneo de RUV no es muy alto, la dosis total puede llegar a ser alta, dada la duración del día (Merilä et al. 2000). Un grupo de siete lagos fue muestreado durante el verano del año 2000. Los experimentos de exposición al UV fueron realizados sobre poblaciones de copépodos de cuatro lagos (Boeckella, Chico, Esperanza y Flora) de los siete estudiados.



Figura 2-1: Mapa del sitio mostrando la localización de los lagos estudiados.

La radiación a nivel del suelo, se midió durante el período de estudio usando un radiómetro IL-1700 (International Light) equipado con cuatro sensores (PAR, UVA, UVB, y actínico). Las mediciones 'in situ' (bajo el agua) se tomaron con el mismo radiómetro (una descripción detallada del instrumento se encuentra en Kirk et al. 1994). El coeficiente de atenuación difusa (K_d) se calculó como la pendiente de la relación entre el $\ln$ (irradiancia) vs. Profundidad (m^{-1}). Paralelamente a la medición de datos radiométricos, se colectaron muestras de agua para análisis químicos y ópticos. Las determinaciones de Clorofila a (Chl a) se realizaron mediante el método espectrofotométrico de Nusch (1980) y Marker et al. (1980). Las muestras se filtraron a través de filtros Whatman GF/F y los pigmentos se extrajeron luego con etanol (90%) caliente. La corrección para feopigmentos se llevó a cabo mediante

acidificación con HCl 0.1 N. El mismo protocolo de filtrado fue usado para la colección de muestras de seston para análisis de MAAs (ver abajo). La concentración del Carbono Orgánico Disuelto (COD) fue medida por el método de oxidación catalítica de Pt a alta temperatura (Shimadzu TOC-5000), siguiendo las recomendaciones de Sharp (1993). Los coeficientes de absorción espectrofotométrica (a_d) de muestras filtradas (filtros Sterivex, 0.22 μ m) fueron determinados entre 250 y 750 nm, cada 1 nm. Se usó un espectrofotómetro Hewlet-Packard 8453 con cubetas de cuarzo (Suprasil) de 1 ó 10 cm. Estas mediciones fueron referenciadas contra agua destilada, deionizada. Los coeficientes de absorción fueron calculados como $a_d = \ln(10^A)$ y se reportaron para un paso óptico de 1 m a 320 y 380 nm.

Las muestras de zooplancton se colectaron usando una red con malla de 55- μ m de poro. Los individuos de *Boeckella poppei* fueron contados y separados usando una lupa. Las muestras se preservaron en formol al 4% para su caracterización taxonómica. Además, un número determinado de individuos por muestra se conservó en freezer a -20° C para posteriores análisis de MAAs (Micosporine-like Amino Acids) y determinaciones de actividad de la enzima fotoliasa. Para determinar la presencia de compuestos que absorben radiación UV en *B. poppei*, se realizó un extracto con 100 individuos colocados en agua-metanol 20% (v:v; MeOH) por 2h en baño de agua a 45° C (García Pichel and Castenholtz 1993; Sommaruga and García Pichel 1999). Los extractos se escanearon en un espectrofotómetro UV-visible de arreglo de diodos (Hewlet-Packard 8453) entre 250 y 750 nm, usando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Para una caracterización más fina de estos compuestos presentes en los copépodos y en el seston, se realizaron análisis con cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) sobre muestras secas y congeladas (-20° C). A estas muestras (i.e., filtros GF/F con seston, y copépodos) se les realizaron consecutivamente tres

extracciones, como la descrita anteriormente. En el caso de los copépodos, se realizó la extracción por dos réplicas de 30 individuos cada una. Los extractos provenientes de las tres extracciones se juntaron y fueron posteriormente evaporados hasta sequedad, en vacío, en tubos Eppendorf para microcentrifuga de 2 ml, usando una bomba de vacío (SpeedVac concentrator, Savant) a 45°C. A partir de este último paso, los análisis, identificación y cuantificación de MAAs fueron hechos como se describe en Tartarotti et al. (2001), excepto porque se usaron una columna Phenomenex C-8 (4.6 mm i.d. x 25 cm) de 5 µm de tamaño de poro, protegida por una pre-columna RP-8, y un detector arreglo de diodo (Dionex). Las muestras fueron eluidas con una fase móvil de ácido acético al 1% en MeOH acuoso al 25% o 55% (v:v). La concentración de MAAs se normalizó respecto del peso seco del zooplancton, el cual fue estimado por la relación entre largo del cuerpo y peso seco calculada para esta especie (Paggi 1983).

La actividad de la enzima fotoliasa fue determinada midiendo la cinética de disminución del sustrato (ADN irradiado con UV, para inducir la producción de dímeros de pirimidina). El ADN se obtuvo a partir de *Escherichia coli* B3 cultivada en medio suplementado con [metil-3H]- timidina (Johnson 1994). Luego de la extracción, el ADN fue expuesto a UV-C (254 nm, 8.4 kJ m⁻²). Los copépodos fueron suspendidos en 2x10⁻² M tris-(hidroximetil)-aminometano/HCl pH 7.4, NaCl 10⁻¹ M, ácido etilenediamin tetraacético 10⁻³ M, ditiotreitól 10⁻² M, fenilmetilsulfonilfluoruro 10⁻³ M y homogeneizados con ultrasonido. Luego se eliminó el material suspendido mediante centrifugación. El sustrato se agregó a los extractos y las mezclas fueron expuestas a la radiación emitida por un tubo Phillips TDL 18W/08 y por otro Narva LT18W/010 SS a temperatura ambiente. Para medir el contenido de dímeros de pirimidina durante la incubación, se obtuvo DNA de las mezclas de reacción por extracción con fenol y precipitación con etanol, luego se hidrolizó como se describe en Carrier y Setlow

(1971), y se analizó por HPLC de fase reversa, siguiendo a Niggli y Cerutti (1982). La actividad enzimática se calculó de acuerdo al método descrito por Cook y Worthy (1972).

La tolerancia de *B. poppei* a la radiación UV artificial se determinó usando dos tipos de diseño experimental: 'Dosis a tiempo preestablecido' y 'Dosis hasta mortalidad' (Newman 1995). Los copépodos fueron colectados de los lagos dentro de las 72 h. previas a los experimentos y se mantuvieron en oscuridad a 4°C en agua del mismo lago. Los experimentos también se realizaron utilizando el agua de los lagos de origen, sirviendo el seston natural como fuente de alimento.

Para los ensayos de 'Dosis a tiempo preestablecido', la unidad experimental consistió de 30 individuos que fueron ubicados en cajas de petri de 5cm de diámetro cubiertas con tapas de cuarzo, para evitar la evaporación. Las cajas se ubicaron sobre una bandeja giratoria para obtener dosis uniformes, dentro de una caja térmicamente aislada entre 1 y 5°C. La fuente de UV, ubicada a 26 cm de la bandeja, fue una lámpara Spectroline XX15-B fluorescente (de Spectronics Corp.) cubierta con una lámina de diacetato de celulosa que elimina las longitudes de onda menores que 295nm (para una mejor descripción del espectro, ver Zagarese et al. 1997). Para cada experimento, se realizaron cuatro tratamientos (93, 76, 57 y 20 % de la irradiancia total = $60.2 \mu\text{W cm}^{-2}$) y un control oscuro. Los distintos tratamientos se lograron cubriendo las cápsulas con un número variable de filtros de densidad neutra. Cada tratamiento fue replicado tres veces. Al iniciar los experimentos, se evaluaron distintos tiempos de exposición (6, 10 y 14 h) de modo de obtener un amplio rango de mortalidad, pero a medida que se fue ganando experiencia con la especie, se pudo elegir la duración apropiada con un menor número de ensayos preliminares. El número total de experimentos y las duraciones de exposición al UV fueron los siguientes: *L. Boeckella*: 1x6 h (es decir, 1 experimento de

6 h de exposición) y 2x10 h; L. Chico: 1x 6 h, 1x10 h y 1x14 h; L. Esperanza: 1x10 h; y L. Flora: 1x14 h. Sin embargo, para realizar el análisis estadístico y la Figura 2-2, todos los resultados fueron combinados, ya que la duración de la exposición no afectó significativamente a la respuesta dosis - mortalidad (Regresión lineal múltiple, usando la mortalidad transformada a logit, como variable dependiente, el UVB como variable independiente continua y la duración de la exposición como variable categórica independiente). Los copépodos fueron mantenidos en la incubadora, en oscuridad hasta 24 h después de iniciada la exposición al UV (18, 14, o 10 h dependiendo de la duración de la exposición al UV). Durante las 24 h siguientes, los animales fueron sujetos a un fotoperíodo de 14:10, luz: oscuridad. El número de sobrevivientes se contabilizó 48 h después del inicio del experimento.

Para estimar el potencial efecto de la foto-reactivación, se realizaron experimentos similares, en los cuales se expuso a los copépodos, simultáneamente, a luz visible (foto-reactivadora) y a RUV. En todos los casos, la irradiación con luz visible fue suministrada un fotoperíodo de 14:10 luz: oscuridad, comenzando al mismo tiempo la exposición a UVR. El valor de irradiancia emitido por la fuente de luz blanca (YZEL TL301411 W) fue de $1.094 \times 10^{-3} \mu\text{E cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. El número total de experimentos y las duraciones de exposición al UV correspondientes, fueron de la siguiente manera: L. Boeckella: 1x10 h (es decir, un experimento de 10 h de exposición); L. Chico: 1x10 h y 1x14 h; y L. Flora: 1x14 h. El factor de modificación de la dosis (FMD) fue calculado como el cociente entre la DL_{50} obtenida en presencia de luz visible y la obtenida en ausencia de esta radiación foto-reparadora (RFR). Los valores de DL_{50} se calcularon gráficamente por regresión lineal de la mortalidad (transformada a logit) vs. dosis de UVB.

Con el diseño experimental 'dosis hasta mortalidad' se llevaron a cabo dos tipos de experimentos. En un caso, se usó una fuente artificial de UVB, mientras que en el otro la fuente de radiación fue natural. El experimento en el cual se usó la fuente artificial comenzó el 14 de Marzo del 2000. Se llevó a cabo dentro de una estructura térmicamente aislada, lo que permitió mantener la temperatura entre 1 y 5 °C. Las fuentes de luz (tanto visible como UV) y las condiciones experimentales fueron las mismas ya descritas en los párrafos anteriores. La lámina de acetato se reemplazó diariamente para evitar la fotodegradación. Los copépodos se colectaron de los lagos Chico, Boeckella y Flora, dos días antes de comenzar el experimento. Cada unidad experimental consistió de 30 copépodos ubicados en una caja de Petri (de 5cm de diámetro), cubierta con una tapa de cuarzo. Los animales se expusieron diariamente al UV (irradiancia = $55.8 \mu\text{W cm}^{-2}$) por un periodo de 6 h y simultáneamente a luz visible (irradiancia = $1.094 \times 10^{-3} \mu\text{E cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 14 h, es decir que, después de apagarse la lámpara de UV, la luz visible continuó encendida por 8 h más, de modo de extender el período potencial de foto-reactivación. Para cada población, hubo dos tratamientos: 1) expuestos al UV (tapados con cuarzo) y 2) Controles oscuros (tapados con papel de aluminio). Cada combinación (lago x "tratamiento") tuvo tres réplicas. El número de sobrevivientes se fue registrando diariamente, inmediatamente después de finalizada la irradiación al UV. Las dosis de UV suministradas, se calcularon a partir de mediciones de la emisión de la lámpara, hechas con el radiómetro IL-1700.

El experimento en el que se usó radiación natural, fue realizado en un estanque colocado en el exterior, a pocos metros del laboratorio. Se usaron individuos de los lagos Boeckella, Chico y Esperanza. La unidad experimental consistió de 30 individuos colocados en un tubo de cuarzo (de 20 cm de largo, y 1,7 cm de diámetro). Un extremo del tubo fue cerrado con un tapón de silicona, mientras que el otro se cubrió con una

reddecilla de 20 μm de poro, para permitir la difusión de oxígeno. Estos experimentos incluyeron dos tratamientos para cada lago: 1) Espectro solar completo (cuarzo) y 2) Espectro solar, sin el componente UV (cubriendo los tubos con acrílico, que transmite menos del 1% por debajo de los 374 nm). Cada combinación (lago x tratamiento) estuvo replicada 4 veces. El tanque donde se colocaron los tubos, era de 1 x 0.6 x 0.4 m, con paredes térmicamente aisladas con telgopor de 15 cm de espesor. El mismo se llenó con agua del lago Boeckella (sin filtrar) y se alineó en dirección E-O. Para maximizar la exposición, los tubos se ubicaron justo bajo la superficie, del lado sur. El experimento comenzó el 1^o de Marzo del 2000. Los organismos permanecían expuestos durante las horas del día, y al atardecer se los cubría con una tapa aislante (del mismo material que las paredes del tanque) para prevenir la congelación. En algunas ocasiones en que se registraron temperaturas extremadamente frías, los tubos debieron ser llevados al laboratorio. Diariamente, al atardecer, se registraba el número de sobrevivientes. El experimento finalizó el 19 de Marzo del 2000. Las dosis diarias se calcularon a partir de las mediciones efectuadas con el radiómetro.

Resultados

Los lagos incluidos en este estudio son todos relativamente pequeños y someros ($Z_{\text{máx}}$: 7 m), y están ubicados a baja altura (<100 m s.n.m.). Están regularmente expuestos a fuertes vientos. Por ejemplo, aproximadamente el 50% de los días que duró el estudio, la velocidad del viento, excedió los 70 km h^{-1} , y el valor máximo registrado en ese lapso fue de 144 km h^{-1} . Los lagos varían entre sí en relación a la transparencia (K_d y a_d), concentración de Clorofila a , y concentración de COD (Tabla 2-1). Se detectó la presencia de MAAs en las muestras de seston de todos los lagos muestreados.

Tabla 2-1: Resumen de características de los lagos estudiados. Los valores de altitud, profundidad máxima, y temperatura han sido tomados de Izaguirre et al. (1998).

	Boeckella	Chico	Encantado	Escondido	Esperanza	Flora	Pingüi
Altitud							
(m s.n.m.)	49	100	55	50	52	52	20
Prof. máxima							
(m)	4	5.5	~1	~1	4.8	7	~1
T° de superficie							
(°C)	0.5-4.7	0-2.5	0-10.9	0-1.1	0.3-11.1	0-6.4	0-17
Kd PAR (m ⁻¹)	4.4	0.96	7.1	2.22	nd	nd	nd
Kd UVA (m ⁻¹)	7.24	1.44	0.74	2.99	0.92	0.64	nd
Kd UVB (m ⁻¹)	8	1.74	0.5	2.92	0.68	0.5	nd
Coef. de Absor.							
λ = 320 nm							
(m ⁻¹)	1.39	0.91	0.72	0.42	0.67	0.42	102.63
Coef. de Absor.							
λ = 380 nm							
(m ⁻¹)	0.68	0.46	0.27	0.18	0.32	0.18	46.1
[MOD]							
(mg L ⁻¹)	0.68	0.48	0.87	0.48	0.48	0.38	41.9
[Chl a] (µg L ⁻¹)	0.30	0.78	0.31	0.46	0.27	nd	2403.52
[MAA] en							
seston (µg L ⁻¹)	0.0016	0.027	nd	nd	0.009	0.0058	nd
[MAA]/[Chl a]							
(µg µg ⁻¹ Chl a)	0.0053	0.035	nd	nd	0.034	nd	nd
Presencia de							
<i>Boeckella</i>							
<i>poppei</i>	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No
nd: no determinado							

El copépodo *B. poppei* habita sólo en cinco de los siete lagos en los que se trabajó (Boeckella, Chico, Encantado, Esperanza y Flora). Esta especie mostró ser muy

tolerante a la exposición a RUV, según lo indican los valores de DL_{50} que se obtuvieron de los experimentos de exposición aguda a RUV artificial, tanto en ausencia de radiación foto-reparadora (1,18- 2,47 Jcm^{-2}) como en presencia de esta (2,2-2,78 Jcm^{-2} , Tabla 2-2).

Tabla 2-2: Valores medios (ES) de longitud total del cuerpo, peso seco, concentración de MAAs, densidad óptica de los extractos metanólicos acuosos, actividad fotoliasa, LD₅₀ con y sin actividad de radiación foto-reparadora (RFR) y factor de modificación de la dosis (FMD) para las poblaciones de *B. poppei* de 5 lagos antárticos.

	Boeckella	Chico	Encantado	Esperanza	Flora
Longitud total (mm)	1.88(0.027)	1.81(0.035)	1.75(0.028)	1.69(0.029)	1.77(0.028)
Peso seco (µg) *	55.2	46.8	42.9	39.3	44.4
[MAA] (% d.w.)	0.02(0.0004)	0.11(0.006)	nd	0.05(0.0003)	nd
Densidad óptica media 335-338 (por 100 ind)	0.099(0.006)	0.26(0.007)	0.11	0.26	0.14
Actividad de Fotoliasa (h ⁻¹)	b.l.d.	Entre 0.24 y b.l.d.	b.l.d.	b.l.d.	b.l.d.
DL ₅₀ sin RFR (Joules cm ⁻²)	1.18(0.07)	2.28(0.10)	nd	2.47(0.35)	2.28(0.11)
DL ₅₀ con RFR (Joules cm ⁻²)	2.2(0.12)	2.78(0.16)	nd	nd	2.55(0.13)
F.M.D.	1.86	1.24	nd	nd	1.11
'Exposición hasta la muerte' (UV artificial) LD ₅₀ (Joules cm ⁻²)	2.4(0.04)	4.9(0.11)	nd	nd	4.3(0.04)

- * Estimado a partir de la relación Peso- Largo (Paggi 1983).
- b.l.d. : bajo el límite de detección.
- nd: no determinado.

Los individuos del lago Boeckella, fueron los menos tolerantes a la exposición a la RUV. Esta tendencia fue consistente a lo largo de los experimentos de 'Dosis a tiempo preestablecido' (Figura 2-2, Tabla 2-2; [ANOVA] $P < 0,001$), en los de 'dosis hasta mortalidad' con UV artificial (Figura 2-3, Tabla 2-2; ANOVA de medidas repetidas $P < 0,001$) y con radiación natural (Figura 2-4, ANOVA de medidas repetidas $P < 0,001$). Las longitudes de onda del UVA (mayores de 374 nm) o incluso el visible podrían haber sido responsables, en parte, de la alta mortalidad en los controles sin UV, particularmente en los individuos del L. Boeckella.

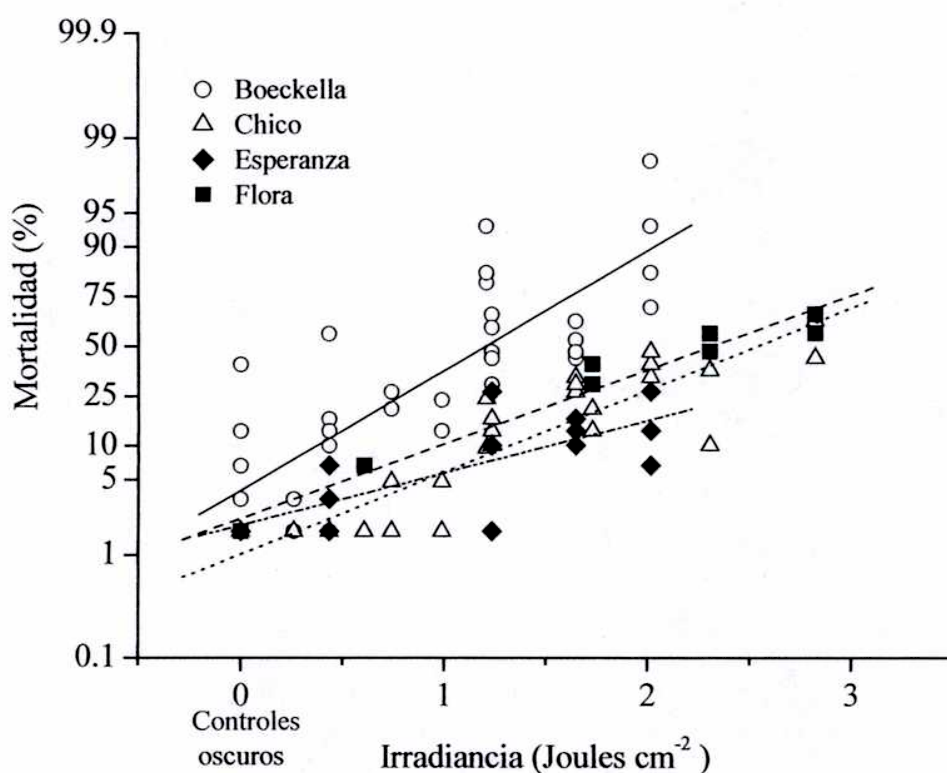


Figura 2-2: Curvas de mortalidad versus dosis para las poblaciones de *B. poppei* de diferentes lagos expuestas al UVB en ausencia de radiación foto-reparadora (RFR). La escala del eje y es logit ($\ln(P/(1-P))$, donde P es la proporción de muertos). Las líneas fueron ajustadas por regresión lineal de los valores de mortalidad (transformados a logit) versus irradiancia de UVB.

La presencia de luz foto-reparadora (374-700 nm) generó un incremento significativo de la supervivencia (ANOVA $P < 0,001$). Sin embargo, el FMD se estimó siempre en el rango de 1,11 – 1,86 (estos valores podrían ser considerados como modestos, si se los compara con especies consideradas de alta capacidad de foto-reparación, que generalmente tienen FMDs mayores de 4). Además la actividad de la enzima fotoliasa fue baja y sólo pudo detectarse en una muestra del lago Chico (Tabla 2-2).

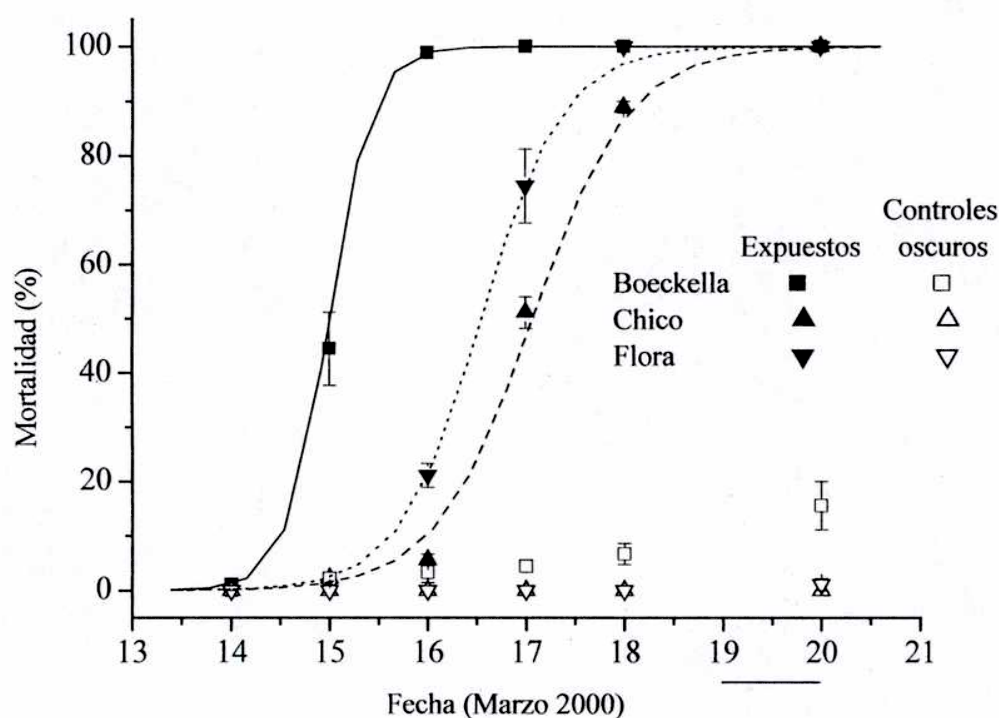


Figura 2-3: Experimento de 'dosis hasta mortalidad' de copépodos expuestos simultáneamente a UVB artificial y radiación visible. La línea horizontal bajo el eje x indica los días (19 y 20 de Marzo) en los cuales los copépodos no fueron irradiados. Las líneas fueron ajustadas por regresión lineal de la mortalidad (transformada a logit) versus tiempo.

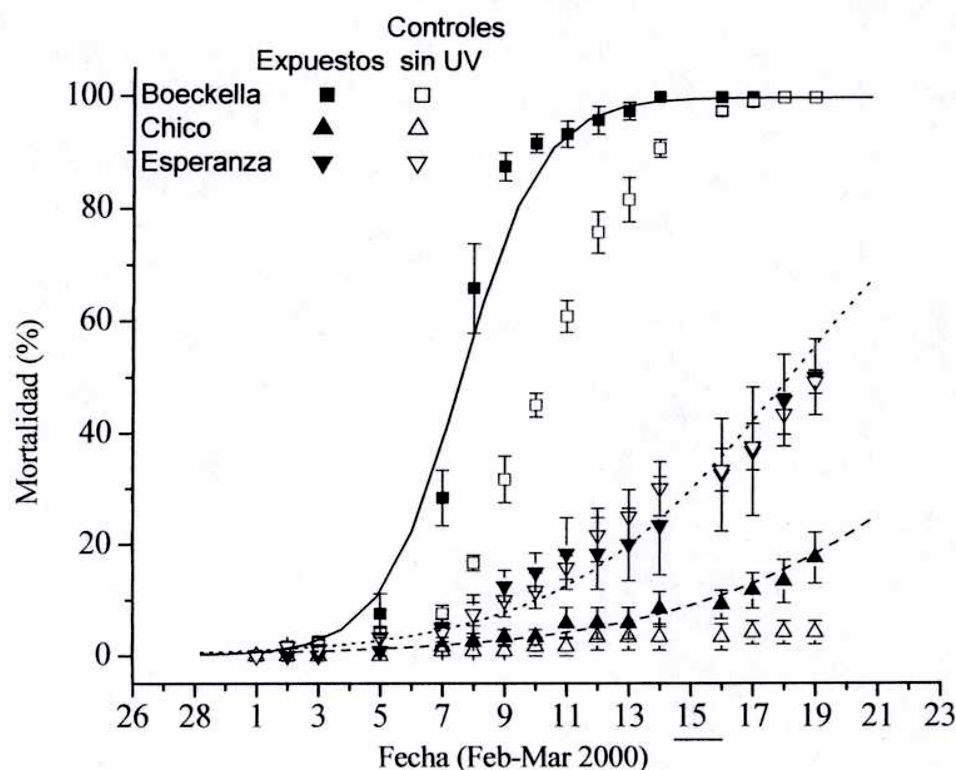


Figura 2-4: Experimento de 'dosis hasta mortalidad' de copépodos expuestos a radiación solar natural. La línea horizontal bajo el eje x indica los días (15 y 16 de Marzo) en los cuales los copépodos no fueron expuestos a la RUV natural. Las líneas fueron ajustadas por regresión lineal de la mortalidad (transformada a logit) versus tiempo.

Los espectros de absorción de los extractos metanólicos de copépodos, de los distintos lagos, revelaron la presencia de compuestos con absorbancia en la región UV con picos de absorción en 332 y 338 nm (Figura 2-5). El menor valor de densidad óptica en el pico lo presentaron los copépodos de la población del lago Boeckella (Tabla 2-2). Los análisis de HPLC, confirmaron la presencia de tres tipos de MAAS, todos detectados tanto en las muestras de copépodos como en el fitoplancton (porfira-334, glicin-micosporina y shinorina, Figura 2-6). Porfira-334 fue el compuesto presente en mayor concentración. La

concentración total de MAAs, también fue la más baja en los copépodos del lago Boeckella (Tabla 2-2).

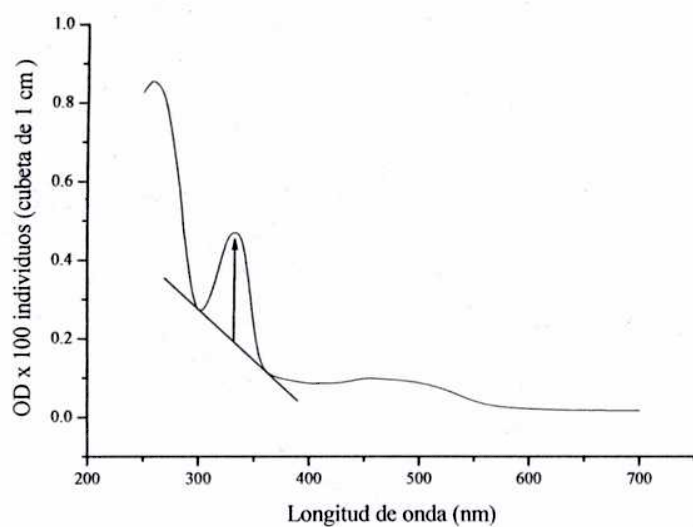


Figura 2-5: Barrido espectrofotométrico de un extracto metanólico acuoso (20%) de 100 individuos de *B. poppei* del Lago Chico. Densidad óptica (DO) medida en cubeta de 1 cm. La altura de la flecha corresponde a la DO estimada luego de sustraer la línea base (línea punteada).

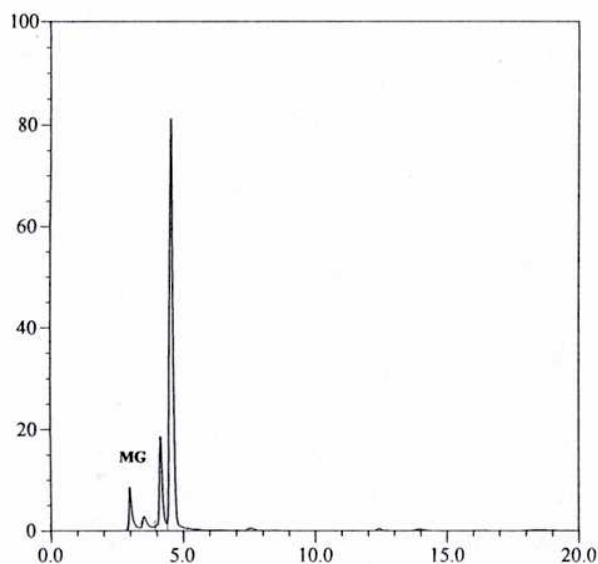


Figura 2-6: Cromatograma HPLC de un extracto metanólico acuoso de *B. poppei* del Lago Chico. MG: Glicin-micosporina; SH: Shinorina; PR-334: Porfira-334.

Discusión

La tolerancia a la RUV ha sido estimada previamente para algunas otras especies del género *Boeckella*, usando la misma fuente de radiación y similares protocolos experimentales. Al examinar y comparar los DL_{50} (Tabla 2-3), se destaca *Boeckella poppei* como una especie altamente tolerante. Por ejemplo, los valores de DL_{50} que se miden en ausencia de radiación foto-reparadora se encuentran entre los mayores conocidos dentro del género. En presencia de radiación foto-reparadora, solamente *B. antiqua* muestra mayor tolerancia. Estos resultados sugieren que *B. poppei* debe experimentar rutinariamente un alto grado de exposición a la radiación solar, lo que indicaría que la estrategia de evitación no sería factible, o al menos que no resultaría suficiente. Como se mencionó anteriormente, este resultado era previsible teniendo en cuenta la información preliminar sobre los lagos que se incluyeron en este estudio en cuanto a que son altamente transparentes, de poca profundidad (Tabla 2-1) y están muy expuestos a fuertes vientos, típicos de estas latitudes.

Tabla 2-3: Comparación de valores de LD₅₀ con y sin radiación foto-reparadora (RFR) para varias especies del género *Boeckella*.

	LD ₅₀ (J.cm ⁻²)		Hábitat	Ubicación geográfica	Fuente de información
	Con RFR	Sin RFR			
B. antiqua	1,8	>3.9	Lagunas temporarias	Estepa patagónica	Zagarese et al. 1997
B. gibbosa	0,11	0,83	Lagos de altura transparentes	Noroeste patagónico	Zagarese et al. 1997
B. gracilipes	0.13	0.13	Lagos pedemontanos	Noroeste patagónico	Zagarese et al. 1997
B. poppei	1.18-2.47	2.20-2.78	Lagos y lagunas antárticas	Península antártica	Rocco et al. 2002

Es interesante detenerse en el hecho de que el potencial de foto-reparación fue mínimo en todos los lagos. Aunque la presencia de luz visible resultó en una mortalidad significativamente menor (ANOVA, $P < 0,001$), el incremento en tolerancia fue relativamente bajo (FMD entre 1,11 y 1,86) si se lo compara con el de especies con gran capacidad de foto-reparación. Estos valores son comparables con los de *B. gracilipes*, una especie que presenta una capacidad de foto-reparación casi despreciable (Zagarese et al. 1997). Los FMDs de especies con capacidad de foto-reparación significativa son típicamente > 4 (Siebeck y Böhm; Zagarese et al. 1997). Además, aunque la presencia de fotoliasa pudo demostrarse en una de las muestras, su actividad fue muy baja o no detectable (Tabla 2-2). En conjunto, estos hallazgos indican una muy baja capacidad de foto-reparación en *B. poppei*.

En todos los lagos estudiados se confirmó la presencia de compuestos que actúan como 'pantalla solar', tanto en muestras de sestón, como en copépodos. Con los análisis de HPLC pudieron identificarse tres MAAs (porfira-334, shinorina y glicin-micosporina). Los resultados sugieren una relación directa entre la tolerancia a la RUV y la concentración de MAAs en *B. Poppei*. Por ejemplo, los individuos del lago Boeckella mostraron menor nivel de tolerancia, y más baja concentración de MAAs que las poblaciones de los otros lagos (Tabla 2-2). En otra especie del género (*B. titicacae*) que habita el lago Titicaca (16°S, 68°O, 3810 m s.n.m. Helbling et al. 2002), se ha observado una relación similar, sugiriendo que la acumulación de MAAs es una respuesta frecuente a la exposición a RUV dentro de las especies del género *Boeckella*.

Se encontraron diferencias significativas en la tolerancia a la RUV, entre las poblaciones de copépodos de los distintos lagos. Como ya se mencionó, los copépodos del lago Boeckella fueron consistentemente menos tolerantes que los individuos de los otros

lagos (Figuras 2-2 a 2-4). Este hecho puede ser consecuencia de la mayor atenuación del UV y por ende, menor exposición al UV en el lago Boeckella (Tabla 2-1).

En las poblaciones de *B. poppei* de los lagos antárticos estudiados, sólo pudo constatarse la presencia de fotoprotección como una de las tres alternativas posibles (evitación, fotoprotección y reparación) de defensa contra los efectos potencialmente dañinos de la RUV. La estrategia de evitación, a priori, parecía improbable dada la gran transparencia y escasa profundidad de estos ambientes regularmente expuestos a fuertes vientos (de hasta 144 km h^{-1}). Esta predicción recibe soporte adicional a partir de los experimentos de exposición que revelaron una alta tolerancia a la RUV.

La baja capacidad de foto-reparación y los bajos niveles de actividad fotoliasa encontrados, indicarían un uso más bien limitado de los mecanismos de reparación. Una posible explicación podría estar relacionada con las bajas temperaturas que prevalecen en los lagos antárticos, lo cual podría limitar la eficiencia de los mecanismos enzimáticos de reparación. Este mismo argumento ha sido utilizado para explicar bajos niveles de foto-reparación enzimática encontrados en bacterioplancton (Huot et al. 2000) y algas (Pakker et al. 2000) de ambientes fríos. La fotoliasa se une a los CPDs en el ADN en un paso que es independiente de la luz. Luego de absorber un fotón de la región visible o del UV cercano, rompe el anillo de ciclobutano para restaurar las pirimidinas. Estudios previos demuestran la influencia de la temperatura en este proceso. La unión específica entre la fotoliasa de levaduras y el ADN dañado resultaba disminuida cuando era ensayada a 5°C , en vez de a 37°C (Harm y Rupper 1970). Además, la tasa del paso dependiente de la luz para esta enzima, disminuye considerablemente cuando la reacción tiene lugar a temperaturas por debajo de los -2°C (Harm 1969). Estas observaciones sugieren que la reparación del daño en el ADN por foto-reactivación podría estar limitada por las bajas temperaturas. Del

mismo modo, se ha encontrado una eficiencia reducida en la eliminación de dímeros por reparación fotoenzimática a bajas temperaturas, en varios sistemas biológicos que incluyen un mutante *phrB* de *Escherischia coli* K12 (Dorrel et al. 1995), *Halobacterium cutirrubrum* (Eker et al. 1991), cotiledones de *Cucumis sativus* (Takeuchi et al. 1996), tejidos de aletas y piel del pez *Fundulus heteroclitus* (Malloy et al. 1997) y el alga roja *Palmaria palmata*, para los cuales la efectividad de la foto-reactivación fue casi imperceptible a 0°C comparada con lo que se encontraba a 15 ó 25°C (Pakker et al. 2000).

Los resultados de este estudio, indican que la presencia de compuestos fotoprotectores podría ser la estrategia más eficiente en hábitats altamente expuestos a la radiación y de baja temperatura ambiente. Estos resultados son consistentes con la existencia de una relación directa entre transparencia de agua y concentración de MAAs, así como se encontró en poblaciones del copépodo *Cyclops abyssorum* de los Alpes (Tartarotti et al. 2001). Además son consistentes con una relación directa entre concentración de MAAs y tolerancia a la RUV, tal como fue encontrada para varios organismos pertenecientes a distintos reinos (Adams y Shick 1996) y particularmente para otras especies del género *Boeckella* (por ejemplo *B. Titicacae*; Helbling et al. 2002). Incluso, la postulación de una baja eficiencia de mecanismos de reparación enzimáticos a bajas temperaturas, podría contribuir a explicar la relación inversa entre la concentración de compuestos fotoprotectores y la temperatura (Byron 1982).

Por otra parte, este estudio confirma la gran plasticidad del género *Boeckella* para adaptarse a la RUV según los distintos escenarios ambientales. Por ejemplo, *B. poppei* de los lagos antárticos, parece contar casi exclusivamente con la fotoprotección, mientras que *B. gibbosa* de lagos de altura en los andes, depende fundamentalmente de la foto-reparación (Zagarese et al. 1997). Y *B. gracilipes*, la cual es muy sensible, depende exclusivamente de

la evitación, permaneciendo en la profundidad de la columna de agua. Otras especies, como por ejemplo, *Boeckella antiqua* (anteriormente denominada *B. brevicaudata*) parece beneficiarse de la combinación de mecanismos (fotoprotección y foto-reparación; Zagarese et al. 1997). Probablemente esta gran variedad de estrategias para sobrellevar la exposición a la RUV que se ve desplegada en el género *Boeckella*, haya sido clave en su éxito al colonizar una gran variedad de ambientes, desde grandes lagos oligotróficos hasta lagunas efímeras y desde el nivel del mar hasta lagos de altura cordilleranos (Menu Marque et al. 2000).

Referencias

- Adams, N. L., and J.M. Shick. 1996. Mycosporine-like amino acids provide protection against ultraviolet radiation in eggs of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. Photochem. Photobiol. 64:149-158.
- Byron, E R. 1982. The adaptive significance of calanoid copepod pigmentation: A comparative and experimental analysis. Ecology 63: 1871-1886.
- Cabrera, S., and G. Pizarro. 1994. Changes in chlorophyll a concentration, copepod abundance and UV and PAR penetration in the water column during the ozone depletion in Antarctic Lake Kitiash, 1992. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 43:123-134.
- Carrier, W.L., and R.B. Setlow. 1971. The excision of pyrimidine dimers. (The detection of dimers in small amounts). Meth. Enzimol. 21: 230-237.

- Cook, J.S., and T.E. Worthy. 1972. Deoxyribonucleic acid photoreactivating enzyme. A quantitative chemical assay and estimation of molecular weight of the yeast enzyme. *Biochemistry* 11: 388-393.
- Dorrell, N., D.J.G. Davies, and S.H. Moss. 1995. Evidence of photoenzymatic repair due to the *phrA* gene in a *phrB* mutant of *Escherichia coli* K12. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 28: 87-92.
- Eker, A. P. M., L. Formenoy, and L.E.A. de Wit. 1991. Photoreactivation in the extreme halophilic archaeobacterium *Halobacterium cutirubrum*. *Photochem. Photobiol.* 53: 643-651.
- Farman, J. C., B. G. Gardiner, and J. D. Shanklin. 1985. Large losses of total ozone in the Antarctica reveal seasonal ClOx/NOx interaction. *Nature* 315: 207-210.
- Friedberg, E. C., G. C. Walker, and W. Siede. 1995. DNA repair and mutagenesis. *Am. Soc. Microbiol.*
- García Pichel, F., and Castenholtz, R. W. 1993. Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:163-169.
- Harm, H. 1969. Analysis of photoenzymatic repair of UV lesions in DNA by single light flashes III. Comparison of the repair effects at various temperatures between +37° and -196°. *Mutation Res.* 7: 261-271.
- Harm, H., and C.S. Rupert. 1970. Analysis of photoenzymatic repair of UV lesions in DNA by single light flashes VI. Rate constants for enzyme-substrate binding *in vitro* between yeast photoreactivating enzyme and ultraviolet lesions in *Haemophilus* transforming DNA. *Mutation Res.* 10: 291-306.

Helbling, E. W., F. Zaratti, L. O. Sala, E. R. Palenque, C. F. Menchi, and V. E. Villafañe.

Mycosporine like aminoacids protect the copepod *Boeckella titicacae* (Harding) against high levels of solar UVR. J. Plankton Res.: en prensa.

Huot, Y., W. H. Jeffrey, R. F. Davis, and J. J. Cullen. 2000. Damage to DNA in bacterioplankton: a model of damage by ultraviolet radiation and its repair as influenced by vertical mixing. Photochem. Photobiol. 72: 62-74.

Izaguirre, I., A. Vinocur, G. Mataloni, and M. Pose. 1998. Phytoplankton communities in relation to trophic status in lakes from Hope Bay (Antarctic Peninsula). Hydrobiologia 369/370: 73-87.

Johnson, J. 1994. Chapter 26, p. 655-682. In P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood and N.R Krieg [eds.], Similarity analysis of DNAs in Methods for general and molecular bacteriology. Am. Soc. Microbiol.

Kepner, R.L., R.A. Wharton, R.D. Collier, C.S. Cockell, and W.H. Jeffrey. 2000. UV radiation and potential biological effects beneath the perennial ice cover of an Antarctic lake. Hydrobiologia 427: 155-165.

Kirk, J. T. O., B. R. Hargreaves, D. P. Morris, R. B. Coffin, B. David, D. Frederickson, D. Karentz, D. R. S. Lean, M. P. Lesser, S. Madronich, J. H. Morrow, N. B. Nelson, and N. M. Scully. 1994. Measurements of UV-B radiation in two freshwater lakes: an instrument intercomparison. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 43:71-99.

Malloy, K. D., M. A. Holman, D. Mitchell, and H. W. Detrich III. 1997. Solar UVB-induced DNA damage and photoenzymatic DNA repair in antarctic zooplankton. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 94:1258-1263.

- Marker, A. F. H., E. A. Nusch, H. Rai, and B. Riemann. 1980. The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: conclusions and recommendations. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 14: 91-106.
- Menu Marque, S., J. J. Morrone, and C. Locascio de Mitrovich. 2000. Distributional patterns of the South American species of *Boeckella* (Crustacea: Copepoda: Centropagidae): a track analysis. *J. Crust. Biol.* 20:262-272.
- Merilä, J., M. Pahkala, and U. Johanson. 2000. Increased ultraviolet-B radiation, climate change and latitudinal adaptation - a frog perspective. *Annal. Zool. Fenn.* 37: 129-134.
- Newman, M. C. 1995. Quantitative methods in aquatic ecotoxicology. Lewis Publishers.
- Niggli, H.J., and Cerutti P.A. 1982. Nucleosomal distribution of thymine photodimers following far- and near- ultraviolet irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 105: 1215-1223.
- Nusch, E. A. 1980. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 14:14-36.
- Paggi, J C. 1983. Estudios limnológicos en la Península Potter, Isla 25 de Mayo, (Shetland del Sur, Antártida): morfología y taxonomía de *Pseudoboeckella poppei* Mrazek 1901, (Crustacea, Copepoda). *Contr. Cient. Inst. Antártico Argentino* 303:1-34.
- Pakker, H., R.S.T. Martins, P. Boelen, A.G.J. Buma, O. Nikaido, and A.M. Breeman. 2000. Effects of temperature on the photoreactivation of ultraviolet-B-induced DNA damage in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 36: 334-341.
- Roy, S. 2000. Strategies for the minimization of UV-induced damage, p. 177-205. *In* S. de Mora, S. Demers and M. Vernet [eds.], *The effect of UV radiation in the marine environment*. Cambridge University Press.

- Sancar, A. 1994. Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* 33: 2-9.
- Sharp, J. H. 1993. Procedures subgroup report. *Mar. Chem.* 41: 37-49.
- Siebeck, O., and U. Böhm. 1991. UV-B effects on aquatic animals. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 24: 2773-2777.
- Sommaruga, R., and F. Garcia Pichel. 1999. UV-absorbing mycosporine-like compounds in planktonic and benthic organisms from a high-mountain lake. *Arch. Hydrobiol.* 144: 255-269.
- Takeuchi, Y., M. Murakami, N. Nakajima, N. Kondo, and O. Nikaido. 1996. Induction and repair of damage to DNA in cucumber cotyledons irradiated with UV-B. *Plant Cell. Physiol.* 37:181-187.
- Tartarotti, B., I. Laurion, and R. Sommaruga. 2001. Large variability in the concentration of mycosporine-like amino acids among zooplankton from lakes located accross an altitude gradient. *Limnol. Oceanogr.* 46:1546-1552.
- Todo, T., H. Tafemori, H. Ryo, M. Ihara, T. Matsunaga, O. Nikaido, K. Sato, and T. Nomura. 1993. A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4) photoproducts. *Nature* 361: 371-374.
- Vernet, M., and W. Kozlowski. 2001. Ultraviolet radiation and the Antarctic coastal marine ecosystem, p. 170-194. *In* C. S. Cockell and A. R. Blaustein [eds.], *Ecosystems, evolution, an ultraviolet radiation*. Springer.
- Zagarese, H. E., M. Feldman, and C. E. Williamson. 1997. UV-B induced damage and photoreactivation in three species of *Boeckella* (Copepoda, Calanoida). *J. Plankton Res.* 19: 357-367.
- Zagarese, H.E., B. Tartarotti, W. Cravero, and P. Gonzalez. 1998. UV damage in shallow lakes: the implications of water mixing. *J. Plankton Res.* 20: 1423-1433.

Zagarese, H. E., and C. E. Williamson. 1994. Modeling the impacts of UV-B radiation on ecological interactions in freshwater and marine ecosystems, p. 315-328. *In* R. H. Biggs and M. E. B. Joyner [eds.], Stratospheric ozone depletion/UV-B radiation in the biosphere. Springer-Verlag.

Capítulo III: “Efectos de la Radiación ultravioleta sobre huevos de *Galaxias maculatus* (Galaxiidae) y *Odontheistes hatcheri* (Atherinidae) en el noroeste patagónico”

Introducción

Los estadios tempranos de peces, son altamente vulnerables a la radiación ultravioleta (RUV) natural, por su gran transparencia y por su ocurrencia frecuente en aguas someras (Hunter y Taylor 1982, Crowder y Crawford 1984). Se ha demostrado que la radiación UV artificial resulta letal en embriones de anchoa (*Engraulis mordax*) (Hunter et al. 1979, Hunter et al. 1981) y de salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*) (Bell y Hoar 1950). Más recientemente, Williamson y colaboradores (1997) observaron alta mortalidad en huevos de perca amarilla (*Perca flavescens*) incubados en un lago transparente. El fracaso de la eclosión y la mortalidad larval inducida por RUV se asocian a menudo con varios grados de malformación embrionaria (Zagarese y Williamson 2000). En el presente trabajo, se realizaron experimentos de exposición de huevos a radiación UV natural para investigar la sensibilidad de los estadios tempranos de peces.

Galaxias maculatus (Jenyns 1842), comúnmente llamado puyen, es un pez catádrómo pequeño, con formas encerradas presentes en varios lagos, a lo largo de la región sur de la cordillera de los Andes. Las larvas y juveniles de puyen se alimentan de plancton. La distribución de esta especie, es el resultado de la combinación de varios factores, tales como depredación, competencia y temperatura. Además la evidencia existente es consistente con la idea de que la RUV jugaría un papel importante en

determinar la ocurrencia de *G. maculatus* en varios lagos, así como su distribución vertical dentro de los lagos. El puyen se halla comúnmente en elevaciones moderadas (600 – 800 m s.n.m.) pero está ausente en lagos de alta montaña (de más de 1500 m s.n.m.). Los lagos de altura, se diferencian de los de menor elevación en que los primeros son típicamente muy transparentes y someros (Zagarese et al. 2000) mientras que los lagos de menor elevación son generalmente o bien profundos y transparentes, o cuando son someros sus aguas presentan mayor color. El periodo de desove del puyen, se extiende desde Agosto hasta fines de Diciembre. Los huevos son demersales y adhesivos, y se ha reportado que soportan la desecación (McDowall 1968). Se sabe que las larvas evitan los primeros metros cerca de la superficie, en lagos transparentes (Barriga 1999), pero en lagos de menor transparencia, es común encontrarlas justo por debajo de la superficie (Cussac et al. 1992).

El pejerrey patagónico (*O. hatcheri*) es la única especie de la familia Atherinidae que habita lagos y lagunas patagónicos. El período de desove se extiende de Octubre a Noviembre. Los huevos son demersales y están provistos de filamentos coriónicos.

En este estudio, se investigó la vulnerabilidad de los huevos de *G. maculatus* y *O. hatcheri* al exponerlos a RUV natural. Se realizaron incubaciones *in situ*, en dos lagos del Noroeste Patagónico, ambos dentro del Parque Nacional Nahuel Huapí, el lago Trébol y el lago Moreno Este. Los resultados se discuten en relación a la ocurrencia de estas especies en distintos tipos de lago.

Materiales y Métodos

Se capturaron individuos adultos de *Galaxias maculatus* en la zona litoral, usando una red de arrastre (con malla de 6 mm de abertura). Las capturas se realizaron dentro de la temporada reproductiva, entre fines de Octubre y fines de Noviembre. Los ovocitos obtenidos mediante masaje abdominal, fueron colocados por separado (por hembra) y luego fertilizados en cajas de Petri.

Las capturas de adultos de pejerrey (*O. hatcheri*) se realizaron al igual que las de puyen, entre fines de Octubre y fines de Noviembre, para ello se calaron trenes de redes agalleras de 20, 30 y 50 mm de distancia entre nudos. Se capturaron ejemplares del lago Morenito y de la Laguna Carrilafquen Chica. El procedimiento de obtención y fertilización de los ovocitos fue el mismo que se utilizó con adultos de puyen.

Fueron fertilizados solamente los ovocitos maduros, pero como el masaje abdominal fuerza la expulsión de ovocitos tanto maduros como inmaduros, se debió proceder de la siguiente manera para evitar las mortalidades típicamente altas por fallas en la fertilización. En el campo, al momento de extraer los ovocitos, no es posible distinguir entre maduros e inmaduros, pero los huevos no fertilizados mueren en pocas horas, tornándose opacos, entonces se los separa de los de aspecto saludable, que permanecen translúcidos, y sólo estos fueron utilizados para el experimento.

Los huevos se expusieron a la RUV natural en dos lagos ópticamente distintos: El lago Moreno Este, está situado a 41° 05'S, 71° 30'O, a una elevación de 758 m s.n.m. Es un lago oligotrófico muy transparente ($K_{d320} = 0,52 \text{ m}^{-1}$) con una superficie de 5,63 km² y una profundidad máxima de 112 m. El lago Trébol está 600 m al norte del primero y a la misma elevación s.n.m., es mucho más pequeño (superficie de 0,3 km² y

12 m de profundidad máxima) y de menor transparencia ($K_{d320} = 3,29 \text{ m}^{-1}$). Durante los periodos de exposición las temperaturas se mantuvieron entre los 12 y 13°C en el Moreno, y entre 14 y 16 °C en L. Trébol.

Se realizaron dos experimentos en el lago Moreno y uno en lago Trébol con huevos de puyen (*G.maculatus*), mientras que con huevos de pejerrey (*O. hatcheri*) se realizaron dos experimentos en el lago Moreno. En cada uno de los experimentos, se colocaron grupos de 30 huevos en tubos de cuarzo (transparentes a la RUV) de 1,6 cm de diámetro x 20 cm de largo). Los tubos controles fueron envueltos en papel de aluminio, de modo que no penetrase radiación UV ni visible. Uno de los extremos de cada tubo se cerró con un tapón de silicona, y el otro se cubrió con malla de 20µm para evitar el escape de los huevos, pero permitir la difusión de oxígeno. En la Tabla 3-1 se resumen los arreglos experimentales para cada incubación realizada.

Tabla 3-1. Arreglo espacial y fechas de las incubaciones de campo (la 'o' indica los controles oscuros).

A: Incubaciones con huevos de puyen (*Galaxias maculatus*)

Puyen	Trébol		Moreno (Noviembre)		Moreno (Diciembre)	
Fecha de fertilización	30 de Octubre		10 de Noviembre		24 de Noviembre	
Período de Exposición	2-14 de Noviembre (12 días)		12-24 de Noviembre (12 días)		27 de Nov. al 10 de Dic.(13 días)	
	Profundidad (cm)	Réplicas	Profundidad (m)	Réplicas	Profundidad (m)	Réplicas
Tratamientos	5	5	0,73	6	2,56	4
	14	5	1,34	6	3,17	4
	25	4	1,95	6	3,78	4
	43	4	2,56	6	3,78 ^O	3
	43 ^O	4	2,56 ^O	6	-	-

B: Incubaciones con huevos de pejerrey (*Odonthestes hatcheri*)

Pejerrey		Moreno		Moreno	
Fecha de fertilización		29 de Octubre		30 de Noviembre	
Período de Exposición		2-22 de Noviembre 99 (21 días)		3-24 de Diciembre 99 (21 días)	
		Profundidad (m)	Réplicas	Profundidad (m)	Réplicas
Tratamientos		0,24	6	0,24	6
		0,85	6	0,85	6
		1,46	6	1,46	6
		2,07	6	2,07	6
		2,68	6	2,68	6
		2,68 ⁰	6	2,68 ⁰	6

Los tubos fueron inspeccionados al menos una vez por semana. En cada inspección los huevos muertos fueron registrados y retirados (los huevos viables conservan un color ámbar claro, distinguiéndose de los muertos que se vuelven blancuzcos y opacos). Cada exposición *in situ* se dio por finalizada cuando comenzaron a eclosionar los primeros embriones. En ese momento, los huevos restantes (aún no eclosionados) se transfirieron al laboratorio, se colocaron en un incubador a 15°C con un fotoperíodo de 14:10 luz:oscuridad. El número de nacimientos se registró diariamente hasta que todos los huevos terminaron de eclosionar o murieron.

La radiación a nivel del suelo se registró continuamente a intervalos de 1 minuto con un radiómetro GUV 511. También se realizaron perfiles de la radiación en la columna de agua, utilizando un radiómetro PUV 500. Ambos radiómetros (de Biospherical Instruments, San Diego, CA) poseen cuatro canales de banda angosta en la región UV, centrados a 305, 320, 340 y 380 nm y un canal de banda ancha en la región visible del espectro (Canal PAR, por Photosynthethic Active Radiation). Para cada experimento, se calculó la irradiancia acumulada a nivel de la superficie, como la suma de las integrales diarias de irradiancia durante el período experimental. A cada

profundidad, se calculó luego la irradiancia recibida por los huevos, usando la ecuación de atenuación:

$$E_z = E_0 e^{-kz}$$

Siendo E_z , la irradiancia a la profundidad z ; E_0 , la irradiancia en superficie; y k , el coeficiente de extinción (al λ correspondiente). Los datos de radiación fueron utilizados para calcular la dosis ADN, como sigue:

$$D_{ADN} = E_z(305) \times a_1 + E_z(320) \times a_2 + E_z(340) \times a_3$$

Siendo $a_1 = 0.0008351$; $a_2 = -0.00216$ y $a_3 = 0.07226$.

(Biospherical Instruments Inc. GUV 511C, Users Manual, 1998)

La D_{ADN} representa la dosis de RUV biológicamente efectiva, es decir, pesada por la función biológica del ADN (Setlow 1974).

Resultados

La exposición a RUV natural causó varios grados de mortalidad, dependiendo de la transparencia del agua y de la profundidad de incubación. En un ambiente transparente como el Lago Moreno, la mortalidad fue muy alta incluso a varios metros de profundidad. En cambio en el lago Trébol, de menor transparencia, los efectos dañinos de la RUV se atenuaron dentro de los primeros 30-40 cm.

Galaxias maculatus (Puyen):

En el lago Trébol, la mortalidad fue casi total en los tubos incubados a 5, 14 y 25 cm, pero decreció abruptamente a 43 cm. En el Lago Moreno, hubo una mortalidad casi total en todos los tubos incubados a 2.56 m o menor profundidad. En el experimento que se realizó en diciembre, se puede apreciar cómo a partir de los 2.56 m, la mortalidad fue decreciendo gradualmente hasta los tubos incubados a 3.78 m. Por otro lado, la mortalidad en los controles oscuros varió entre 4.4 y 37% (Figura 3-1).

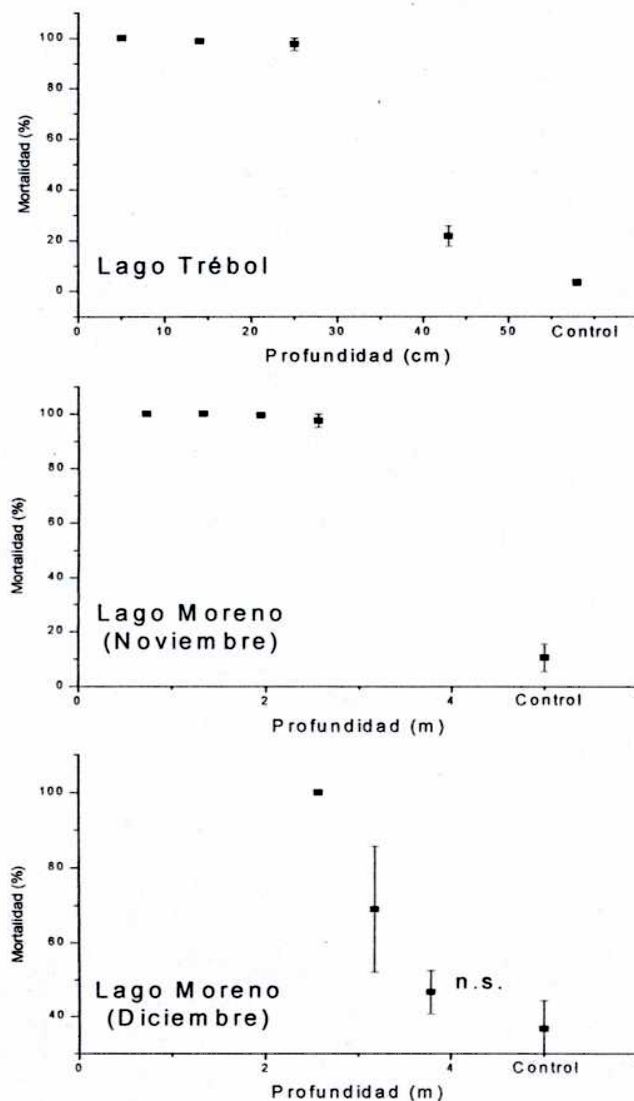


Figura 3-1. Mortalidad de huevos, en función de la profundidad de incubación, para huevos de *Galaxias maculatus* expuestos a la RUV natural. La marca n.s. significa que ese valor no difiere significativamente de su control ($p = 0.44$); todos los demás valores, en cambio, sí difieren significativamente de sus respectivos controles. ($p < 0.05$) (Test de Dunnet, luego de realizar un ANOVA de una cola). Las barras verticales corresponden a los errores estándar.

Cuando se combinan los datos de mortalidad en un sólo gráfico, y se los grafica contra la irradiancia acumulada a 320 nm, los tres experimentos independientes conforman una única curva (Figura 3-2).

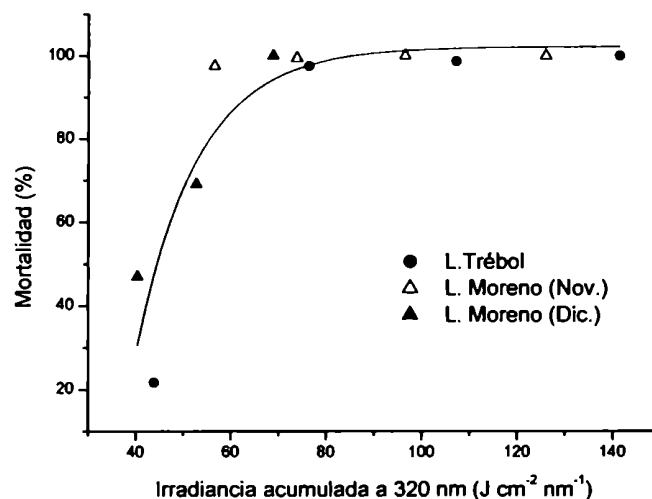


Figura 3-2. Mortalidad de huevos de *G. maculatus* en función de la irradiancia integrada a 320 nm. El gráfico combina los resultados de los tres experimentos independientes mostrados en la Figura 3-1. La línea fue ajustada como la regresión lineal de la mortalidad (transformada a logit) vs el Log de la irradiancia integrada. Nótese que luego, las variables fueron convertidas nuevamente a sus escalas aritméticas tradicionales. Las barras verticales corresponden a los errores standard.

Odontheistes hatcheri (Pejerrey patagónico):

Ambos experimentos fueron realizados en el Lago Moreno Este, a las mismas profundidades. Sin embargo, en diciembre la mortalidad alcanzada fue cercana al 100% en todos los tratamientos (incluso a 2,68 m de profundidad) excepto en los controles oscuros (Figura 3-3); mientras que en el experimento realizado en noviembre la mortalidad fue total en los tubos incubados a 24 y 85 cm y comienza a decrecer

gradualmente a partir de los tubos incubados a 1,46 m de profundidad, hasta un 46% de mortalidad en los tubos a 2,68 y un 25 % en los controles (Figura 3-4).

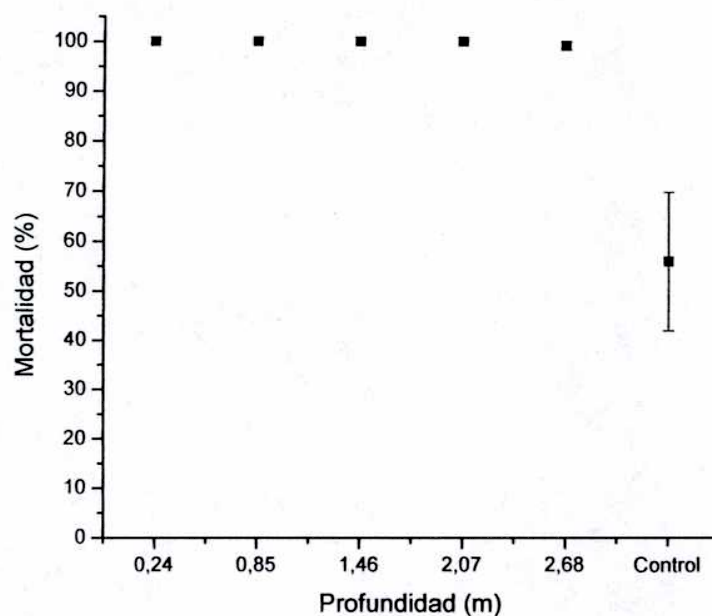


Figura 3-3. Mortalidad de huevos, en función de la profundidad de incubación, para huevos de *Odonthestes hatcheri* expuestos a la RUV natural.

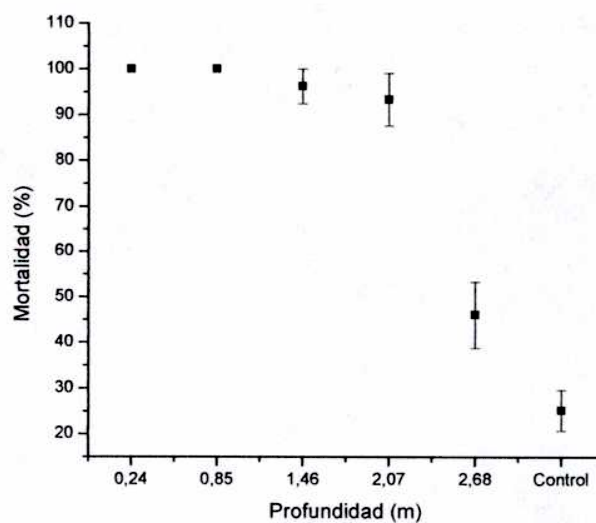


Figura 3-4. Mortalidad de huevos, en función de la profundidad de incubación, para huevos de *Odonthestes hatcheri* expuestos a la RUV natural.

En la Figura 3-5 se combinan los datos de mortalidad de los dos experimentos, en un mismo gráfico, en función de la irradiancia acumulada a 320 nm. Si bien parecería haber diferencias, en ambos experimentos se observa mortalidad total para dosis mayores que $10 \text{ J.cm}^2.\text{nm}^{-1}$.

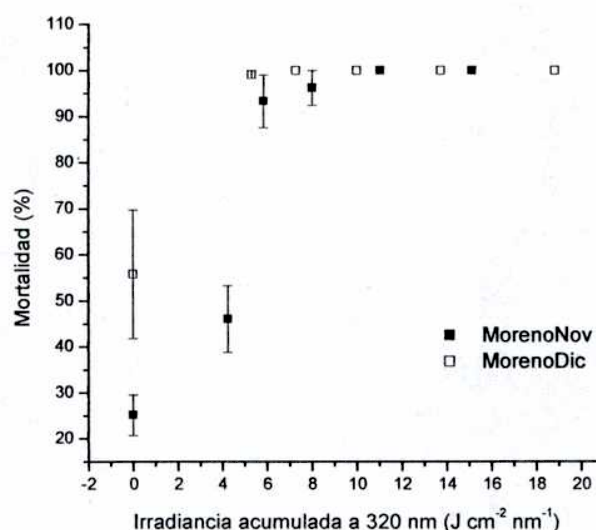


Figura 3-5. Mortalidad de huevos de *O. hatcheri* en función de la irradiancia integrada a 320 nm. El gráfico combina los resultados de los tres experimentos independientes mostrados en las Figuras 3-3 y 3-4. La línea fue ajustada como la regresión lineal de la mortalidad (transformada a logit) vs el Log de la irradiancia integrada. Nótese que luego, las variables fueron convertidas nuevamente a sus escalas aritméticas tradicionales. Las barras verticales corresponden a los errores estándar.

En la Figura 3-6 se incluyeron los cinco experimentos realizados con ambas especies, allí se relacionan los datos de mortalidad con la dosis DNA, expresadas para cada profundidad y para todos los momentos en los que se evaluó el estado de los huevos. Se puede observar una relación monótonica entre mortalidad y exposición al UV para cada especie. Si bien ambas mostraron sensibilidad a los niveles presentes de

RUV, *O. hatcheri* resultó ser más resistente que *G. maculatus* para todas las dosis experimentadas.

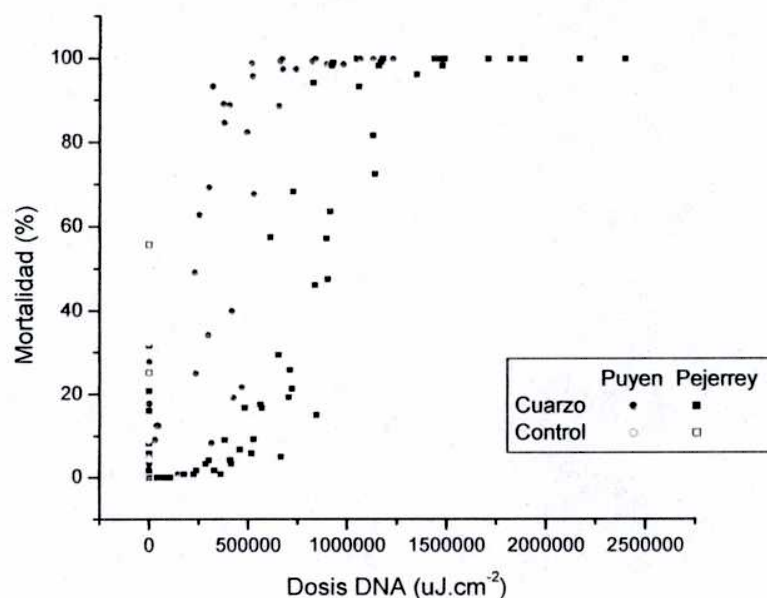


Figura 3-6. Mortalidad de huevos de *G. maculatus* y *O. hatcheri* en función de las dosis DNA calculadas para la totalidad de los experimentos realizados.

Discusión

La exposición al espectro solar completo provocó distintos grados de mortalidad en los huevos de *Galaxias maculatus*. Solamente la radiación dentro del rango UV parece responsable de este efecto, dado que en pruebas preliminares se demostró que los huevos se desarrollan normalmente al ser expuestos a radiación visible natural a nivel de superficie (Battini, Tartarotti y Zagarese, datos no publicados). La mortalidad de los huevos se asoció con varios grados de malformación en los embriones. Se observaron malformaciones desde ligeras hasta severas de la espina dorsal. Se ha probado que los

niveles naturales de radiación solar, son potencialmente dañinos para los huevos de *G. maculatus*. La magnitud del efecto, sin embargo, depende fuertemente de la transparencia del agua y de la profundidad de incubación. En un ambiente transparente como el lago Moreno, la mortalidad por UVB fue muy alta hasta varios metros de profundidad. Por otro lado, en el ambiente menos transparente, el lago Trébol, los efectos dañinos de la RUV se atenuaron dentro de los primeros 30 a 40 cm.

La relación entre mortalidad y dosis de RUV (estimada aquí como irradiancia acumulada) resultó ser bastante abrupta, es decir que pequeñas variaciones de dosis, producen grandes variaciones en la mortalidad. De hecho, fue necesario combinar los resultados de tres experimentos para producir una descripción razonable de la relación (ver Figura 3-2). Esto se refleja en el medio natural, de modo que uno encuentra las regiones de mortalidad total y de baja mortalidad separadas por una capa muy delgada, a veces de pocos centímetros. De aquí, que la profundidad a la cual se alcanza la DL_{50} (en el lapso de tiempo hasta la eclosión) podría considerarse un buen estimador del límite entre el éxito o fracaso de la eclosión.

Usando la DL_{50} deducida gráficamente de la figura 3-2 y los coeficientes de extinción provistos por Morris y colaboradores (1995), se calculó la profundidad a la cual ocurriría el 50% de la mortalidad en una serie de lagos dentro de la distribución geográfica de *G. maculatus*. Para facilitar la comparación, se asumió para todos los lagos, temperaturas similares y la misma irradiancia a nivel del suelo que la registrada en Lago Moreno, en Diciembre de 1998. La figura 3-7 muestra un gráfico de dispersión de las profundidades de DL_{50} ($Z_{DL_{50}}$), contra la concentración de carbono orgánico disuelto (que es el principal factor que controla la atenuación del UV (Morris et al 1995). Es interesante destacar que para algunos lagos claros de montaña, como lago

Schmoll, la Z_{DL50} calculada, excede en más del doble, la profundidad máxima. Además es probable que, la temperatura afecte aún más la relación entre mortalidad y Z_{DL50} . Temperaturas más bajas extenderán el tiempo de desarrollo, y por ende el período en que los huevos están expuestos a la RUV. En otras palabras, se esperaría que las temperaturas bajas (como las que se registran en lagos de montaña) generen Z_{DL50} todavía más profundos que los que se calcularon en la Figura 3-7.

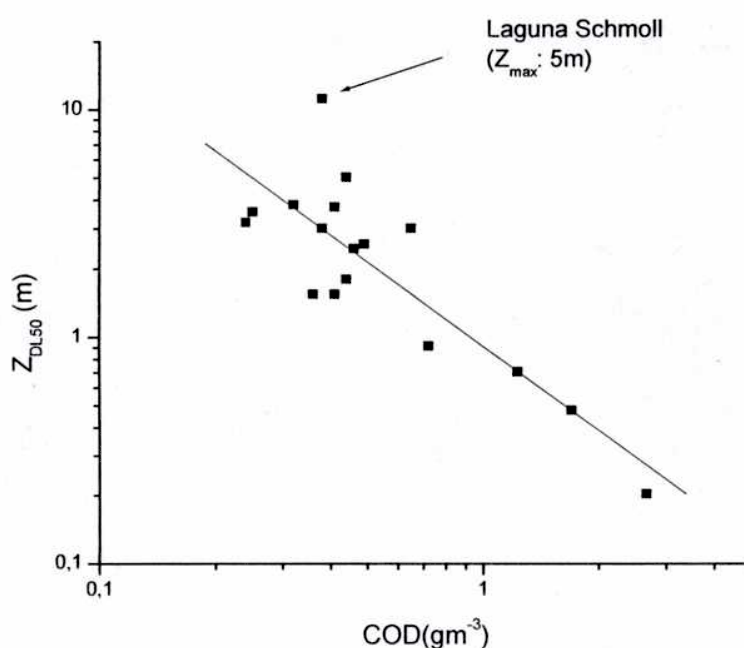


Figura 3-7. Gráfico de dispersión en escala logarítmica del Z_{DL50} calculado para varios lagos del noroeste patagónico, en función de la concentración de carbono orgánico disuelto (COD). Para calcular los Z_{DL50} se asumió una DL_{50} de $2,5 \text{ J cm}^{-2} \text{ nm}^{-1}$.

La información recabada en este estudio es consistente con la idea de que la RUV puede afectar potencialmente el reclutamiento en poblaciones de *G. maculatus*. En algunos casos extremos (de mucha transparencia y escasa profundidad, como Laguna Schmoll, donde $Z_{\text{max}} = 5 \text{ m}$ y $Z_{DL50} = 12 \text{ m}$) la RUV podría ser una razón suficiente

para explicar la ausencia de poblaciones de estas especies. Sin embargo, para la mayoría de los lagos, la RUV es probablemente uno más, entre varios factores ambientales que determinan, en conjunto, que un ambiente sea o no habitable.

El espectro de acción del ADN describe satisfactoriamente la relación entre mortalidad de los huevos y las dosis de UV recibidas. Este resultado es consistente con los trabajos de Hunter et al. (1979, 1981) y Kowemberg et al. (1999), quienes también encontraron un buen ajuste entre el éxito en la eclosión y la dosis ADN pesada por la función de Setlow, en huevos de anchoa, bacalao y caballa del pacífico, sugiriendo que la mortalidad es un resultado directo del daño en el ADN.

Se dice que hay reciprocidad cuando los efectos de cierta dosis acumulada, son los mismos, sin importar la tasa a la cual se fue acumulando esa dosis. En los casos aquí presentados, parece darse esta reciprocidad, ya que todos los datos planteados (Figura 3-6), a pesar de estar allí reunidas distintas dosis acumuladas y a diferentes tasas, siguen una curva simple para cada especie.

Es interesante notar cómo la RUV parece determinar que tanto el zooplancton como los huevos de estas especies deban ocupar los estratos profundos de los lagos para evitar los efectos dañinos de esta radiación.

Referencias

Barriga J.P. (1999) Las larvas del género *Galaxias* (Pisces, Galaxiidae) del Lago Gutiérrez. Parque Nacional Nahuel Huapi, Argentina. Tesis de Licenciatura, Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche.

- Béland F., Browman H. I., Rodriguez C.A. & StPierre J.F. (1999) Effect of solar ultraviolet radiation (280-400 nm) on the eggs and larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 56: 1058-1067.
- Bell G.M. & Hoar W.S. (1950). Some effects of ultraviolet radiation on sockeye salmon eggs and alevins. *Canadian Journal of Research*. 28: 35-43.
- Crowder L.B. & Crawford H.L. (1984). Ecological shifts in resource use by bloaters in Lake Michigan. *Transactions of the American Fisheries Society*. 113: 694-700.
- Cussac V.E., Cervellini P. & Battini M. (1992) Intralacustrine movements of *Galaxias maculatus* (Galaxiidae) and *Odontesthes microlepidotus* (Atherinidae) during their early life history. *Environmental Biology of Fishes*. 35: 141-148.
- Hunter J.R., Kaupp S.E. & Taylor J.H. (1981) Effects of solar and artificial ultraviolet-B radiation on larval northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Photochemistry and Photobiology*. 34: 477-486.
- Hunter J.R. & Taylor J.H. (1982). Assessment of the effects of UV radiation on marine fish larvae. *The Role of Ultraviolet Radiation in Marine Ecosystems.. NATO Conference Series IV*. (Ed. J. Calkins). pp. 459-497. Plenum Press, New York.
- Hunter, J.R., Taylor, J.H., & Moser, H.G. (1979). Effect of ultraviolet irradiation on eggs and larvae of the northern anchovy, *Engraulis mordax*, and the pacific mackerel, *Scomber japonicus*, during the embryonic stage. *Photochemistry and Photobiology*. 29: 325-338.
- McDowall R.M. (1968) *Galaxias maculatus* (Jenyns), the New Zeland Whitebait. *Fisheries Research Bulletin*. 2: 84.

- Morris D.P., Zagarese, H.E., Williamson C.E., Balseiro E.G, Modenutti B., Moeller R. & Queimaliños C. (1995). The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnology & Oceanography*. 40: 1381-1391.
- Setlow R.B. 1974. The wavelenghts in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71:3363-3366.
- Williamson C.E., Metzgar S.L., Lovera, P.A. & Moeller, R.E. (1997). Solar ultraviolet radiation and the spawning habitat of yellow perch, *Perca flavescens*. *Ecological Applications*. 7: 1017-1023.
- Zagarese H.E., Diaz M., Pedrozo F. & Úbeda C. (2000). Mountain lakes in northwestern Patagonia. *Verhandlungen der Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewante Limnologie*. 27: 533-538.
- Zagarese H.E. & Williamson C.E. (2000) Impact of UV radiation on zooplankton and fish. *The effects of UV Radiation in the Marine Environment*. (Eds. De Mora S., Demers S. And Vernet M.). Cambridge University Press, Cambridge. 324pp.

Capítulo IV: ¿Cuánto contribuye la radiación ultravioleta a aumentar la localización de presas en los juveniles de truchas arco iris?

Introducción

Las investigaciones sobre los efectos ambientales de la radiación ultravioleta (RUV) han incrementado, en gran medida, desde que se descubrió la disminución de la capa de ozono (Farman et al 1985) y consecuentemente, el incremento en el flujo de UVB sobre la superficie terrestre (Madronich 1994). Retrospectivamente, parece razonable que en esos primeros años, la investigación se haya concentrado en los efectos negativos de la RUV (Worrest 1986, Häder et al. 1995). Sin embargo, la RUV también puede resultar beneficiosa para diversos organismos vivientes. Quizás, el ejemplo más paradigmático sea el rol benéfico de la RUV en la síntesis de la Vitamina D (Carpenter y Zhao 1999). Otra función positiva de la RUV está relacionada con la visión. Es ampliamente reconocido el hecho de que, en insectos, las longitudes de onda mayores del UV (UVA) contribuyen a la orientación y al reconocimiento de patrones (von Frisch 1967, Wehner 1992). La visión UV también ha sido demostrada en varios invertebrados acuáticos (Smith y Macagno 1990, Martin et al. 2000) y en vertebrados (Jacobs 1992). Se ha propuesto que la visión UV en peces, ayuda en la orientación (Hawryshyn 1992) y en la detección de presas, al aumentar el contraste entre las presas y el fondo (Browman y Hawryshyn 1992, Loew et al 1993, Browman et al. 1994, Losey et al. 1999).

Los juveniles de la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, poseen un fotoreceptor retinal, el cual es sensible a la RUV entre 360 y 370 nm. En truchas juveniles, se ha propuesto que la visión UV, ayudaría a mejorar la detección de presas, durante los estadios

tempranos, cuando éstas son principalmente planctívoras. Browman y Hawryshyn (1992) demuestran que la capacidad de percibir la luz UV se pierde en el curso de la ontogenia, en coincidencia con un cambio en los hábitos alimenticios, de planctivoría a ictiofagia.

Típicamente, las investigaciones para demostrar la visión UV en peces se han hecho bajo condiciones controladas de laboratorio y utilizando fuentes artificiales de UV. Este tipo de diseño experimental, permite un control muy fino de la composición espectral a la cual se exponen los animales. Sin embargo, por la misma razón, la radiación artificial usada, es a menudo muy distinta de la que se presenta en la naturaleza. Por ejemplo, niveles similares a los emitidos por una lámpara de tungsteno, como la utilizada por Browman et al. (1994) pueden registrarse en verano a las 4 a.m. en la región de Bariloche. Además, esos niveles rápidamente son excedidos en dos órdenes de magnitud, durante la siguiente media hora. En la naturaleza, los peces se exponen simultáneamente a la RUV y a la luz visible. Asimismo, los altísimos niveles de radiación visible que se encuentran en la naturaleza son muy difíciles de reproducir en laboratorio. Es concebible que la RUV pueda ser usada para detectar presas en condiciones de iluminación monocromática, e incluso que pueda mejorar la detección, cuando los niveles de luz visible son bajos, tal como se usa en los experimentos de laboratorio. Sin embargo, con los altos niveles de luz típicos de hábitats naturales, la contribución de la RUV en la detección de presas podría ser mucho menos significativa. En este estudio, se expusieron juveniles de trucha arco iris, en experimentos de alimentación, al espectro completo de radiación solar, o a este mismo pero excluyendo el componente UV mediante el uso de filtros. La idea fue determinar la contribución de la RUV en la detección de presas, contra un fondo de luz visible natural.

Los experimentos fueron realizados con juveniles de trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, que fueron provistos por el Centro de Salmonicultura de la Universidad Nacional del Comahue. Todos los peces tenían entre 30 y 60 días de edad, y entre 24 y 29 mm de longitud total. Se realizaron los experimentos desde fines del invierno hasta la primavera temprana (Agosto – Noviembre 1999), en la ciudad de San Carlos de Bariloche (41° 08' S, 71° 25' W 778 m s.n.m.). Se llevaron a cabo en exteriores, siempre entre las 10 y las 13 h (hora local), usando como fuente de luz al sol. La radiación se registró permanentemente en el sitio experimental, con un radiómetro GUV 510 (de Biospherical Instruments, Inc.). En la Figura 4-1 se muestran las condiciones de radiación (UV y visible) para cada uno de los días de experimentación. Estos niveles de radiación, son comparables a los de la mañana temprana (7-8:00h) de un día de verano. Además, cabe destacar, que estos niveles se encuentran dentro del rango de condiciones lumínicas bajo las cuales se ha reportado que truchas juveniles se alimentan efectivamente en hábitats naturales (Angradi & Griffith 1990, Boisclair 1992, Riehle & Griffith 1993). La fuente de agua utilizada fue el arroyo Gutiérrez, un efluente del lago Gutiérrez, el cual es altamente transparente a la luz tanto visible ($K_{dPAR} = 0.12 m^{-1}$) como UV ($K_{d320} = 0.41 m^{-1}$). La temperatura de agua fue medida al principio y al final de cada experimento. Se usaron tres tipos de diseños experimentales (Tabla 4-1). Todos tuvieron en común dos tratamientos: Transparentes al UV (cubiertos con Aclar) y opacos al UV (cubiertos con acrílico transparente) (Figura 4-2). Los peces se mantuvieron en ayunas durante 24 h antes de cada ensayo. Para evitar un 'efecto techo' el monto total de alimento ofrecido, estuvo siempre algunos órdenes de magnitud por debajo de los niveles de saciedad reportados para truchas juveniles de tamaño similar (Elliott 1975

a, b y c). Al final de cada experimento, los peces fueron fijados en formol al 4% para posterior análisis del contenido estomacal. Los datos se analizaron mediante test-t de Student (paramétrico) o test-U de Mann-Whitney (no paramétrico), en los casos en que no se encontraron condiciones de normalidad. En la Tabla 4-1 se muestran algunos datos sobre las condiciones de cría de los peces utilizados y sobre las condiciones experimentales. A continuación se describen cada uno de los tres protocolos.

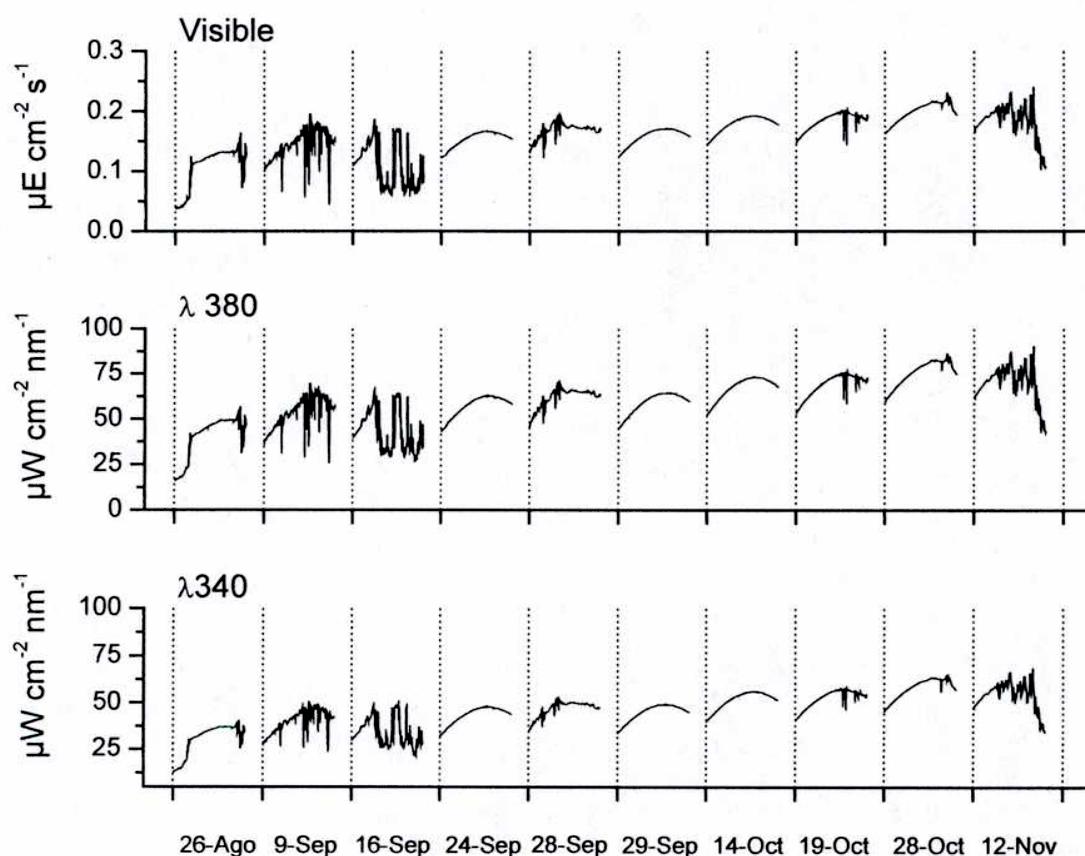


Figura 4-1: Irradiancia registrada a $\lambda = 340, 380 \text{ nm}$ y visible (380- 750 nm) entre las 9 y 13h horario local, para cada una de las fechas de experimentación.

Tabla 4-1. Resumen de experimentos.

Historia de cría				Resumen de las condiciones experimentales						
Experimento #	Fecha de eclosión	Comienzan a alimentarse	Edad (días)	Color de Fondo	Ensayo fecha	Tiempo (min)		Réplicas		Se inicia la alimentación
						Aclimatación	Alimentación	Aclar	Acrílico	
1	8.7.1999	20.8.1999	49	Negro	26.8.1999	30	15	4	4	12:00
	9.8.1999	9.9.1999	31	Blanco	9.9.1999	30	15	2	2	12:30
	9.8.1999	9.9.1999	39	Blanco	16.9.1999	30	15	4	4	12:30
	21.8.1999	20.9.1999	34	Blanco	24.9.1999	30	15	4	4	10:47
	21.8.1999	20.9.1999	38	Gris	28.9.1999	30	15	4	4	10:53
	21.8.1999	20.9.1999	39	Gris	29.9.1999	37	20	4	4	13:18
2	14.9.1999	12.10.1999	30	--	14.10.1999	30	15	1	1	10:15
	14.9.1999	19.10.1999	35	--	19.10.1999	45	15	1	1	12:45
	14.9.1999	19.10.1999	44	--	28.10.1999	53	15	2	2	10:58
	14.9.1999	19.10.1999	59	--	12.11.1999	30	15	1	1	10:30
3	14.9.1999	12.10.1999	30	--	14.10.1999	40	30	2	2	12:00

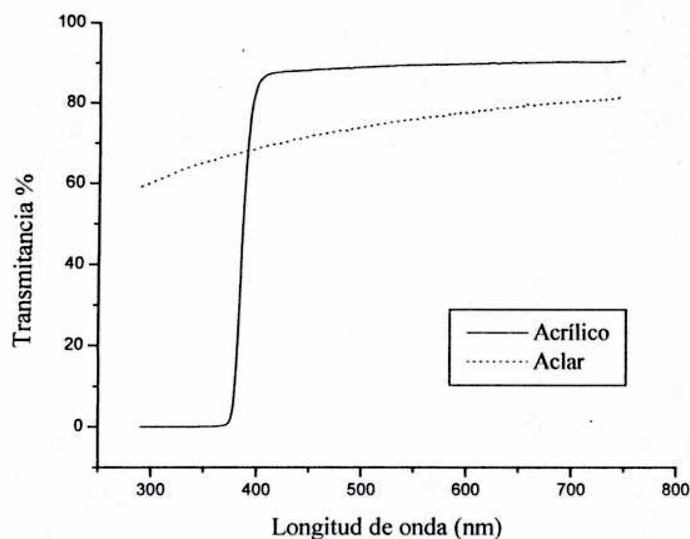


Figura 4-2: Transmitancia (%) de los materiales usados para cubrir los recipientes experimentales: Aclar (transparente al UV) y acrílico claro (opaco al UV).

Experimento 1: Este experimento se llevó a cabo en seis ocasiones (Tabla 4-1). En cada unidad experimental, un pez era ubicado en 200 ml de agua dentro de una caja de Petri grande (diámetro 14.5 cm, altura 1.7 cm). Luego se dejaba aclimatar durante un período de al menos 30', antes de agregar 20 individuos de *Ceriodaphnia dubia* como presas (peso seco medio por individuo 2,1µg). Luego se dejaba alimentar a los individuos durante 15' a 30' (Tabla 4-1). Cada experimento fue replicado cuatro veces (excepcionalmente dos). Para estimar el efecto del contraste con el fondo, el mismo protocolo fue repetido con fondos blanco, gris y negro.

Experimento 2: Se colocaron tres peces, en 5 l de agua, dentro de una bolsa de polietileno. Las bolsas, a su vez, estaban dispuestas suspendidas, abiertas a la superficie, en tanques rectangulares de 200 l, de paredes azules, opacas. El hecho de suspender las bolsas dentro del tanque tuvo dos propósitos: por un lado, mantener la temperatura

constante durante el experimento, y por otro, producir un ambiente lumínico más similar al natural, al reducirse el efecto pared, pues así, la radiación alcanzaba al pez no sólo por la superficie abierta de la bolsa, sino también desde los costados. Estos rayos atravesaban las paredes de polietileno (más del 96% de transmitancia en el UV) y eran, a su vez, atenuados por el agua circundante. Luego de la aclimatación, se adicionaron 250 individuos de *Ceriodaphnia dubia* en cada bolsa, y se permitió a los peces que se alimentaran por 15 minutos.

Experimento 3: En este experimento, se colocaron 5 peces por bolsa (del mismo tipo del exp.2), en 10 litros de agua. Se los dejó 40 minutos para que se aclimatasen. Luego, se agregaron 100 ml de una mezcla concentrada de zooplancton y se les permitió alimentarse por 30 minutos. La mezcla era un ensamble natural de especies (*Boeckella gracilipes*, *Mesocyclops araucanus*, *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia sp.* y *Bosmina longirostris*) colectadas del lago Morenito. Se cuantificó la concentración de cada especie en las bolsas antes y después de cada ensayo, para luego comparar con los contenidos estomacales.

Resultados

En el primer experimento, el número de individuos de *Ceriodaphnia dubia* consumidas, no fue significativamente diferente entre los tratamientos con o sin UV, para ninguno de los colores de fondo que se evaluaron (Test-t, fondo blanco: $p = 0.494$, $N = 20$; fondo gris $p = 0.223$, $N = 16$; fondo negro $p = 0.114$, $N = 8$, Figura 4-3). Del mismo modo, tampoco se encontraron diferencias significativas en el número de

Ceriodaphnia dubia ingeridas en los tratamientos con o sin UV, en el segundo tipo de experimento (Test de Mann-Witney $p = 0.755$, $N = 30$) (Figura 4-4).

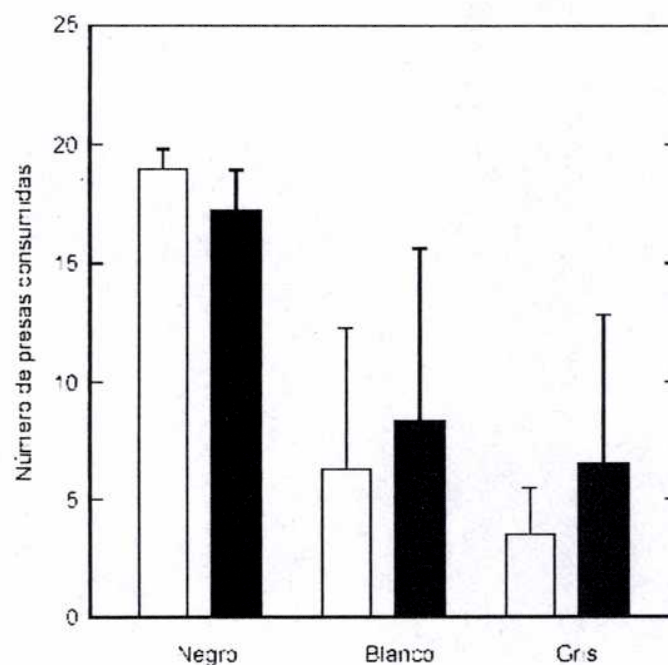


Figura 4-3: Número de *Ceriodaphnia dubia* ingeridas por truchas arco iris juveniles bajo distintos colores de fondo, durante el experimento 1. Con UV: columnas rayadas; sin UV: columnas vacías. Las barras verticales indican la desviación estándar.

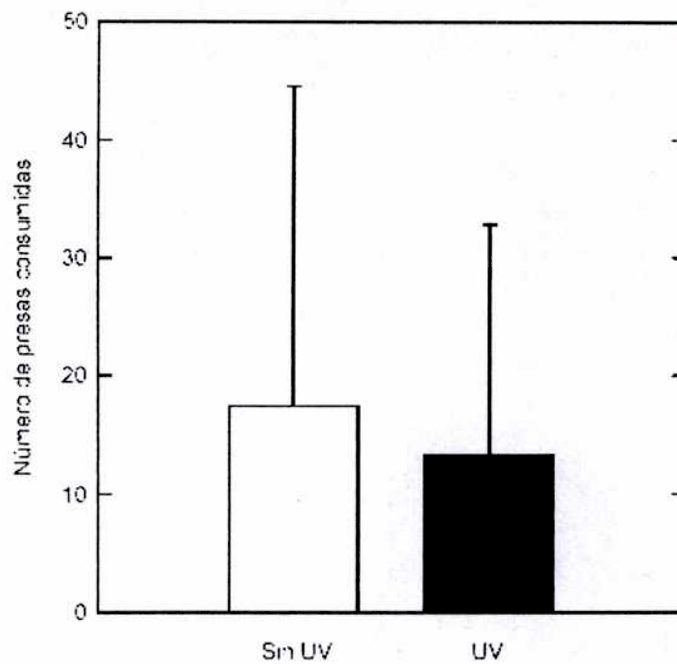


Figura 4-4: Número de *Ceriodaphnia dubia* ingeridas por truchas arco iris juveniles durante el experimento 2. Con UV: columna rayada; sin UV: columna vacía. Las barras verticales indican la desviación estándar.

Finalmente, en el tercer experimento, tampoco se encontraron diferencias significativas en el número de presas ingeridas con o sin UV (Figura 4-5), para ninguno de los ítems alimentarios: *Boeckella gracilipes* (Test-t, $p = 0,35$, $N = 20$), *Mesocyclops sp.* (Test-t, $p = 0,196$, $N = 20$), *Ceriodaphnia dubia* (Test-t, $p = 0,58$, $N = 20$), *Daphnia sp* (Mann-Whitney, $p = 0,52$, $N = 20$) y *Bosmina longirostris* (Test-t, $p = 0,22$, $N = 20$) (Figura 4-5). Incluso, los peces del tratamiento sin UV consumieron mayor número total de presas (95 presas en promedio por pez) que lo que consumieron los peces del tratamiento con UV (66 presas en promedio por pez), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

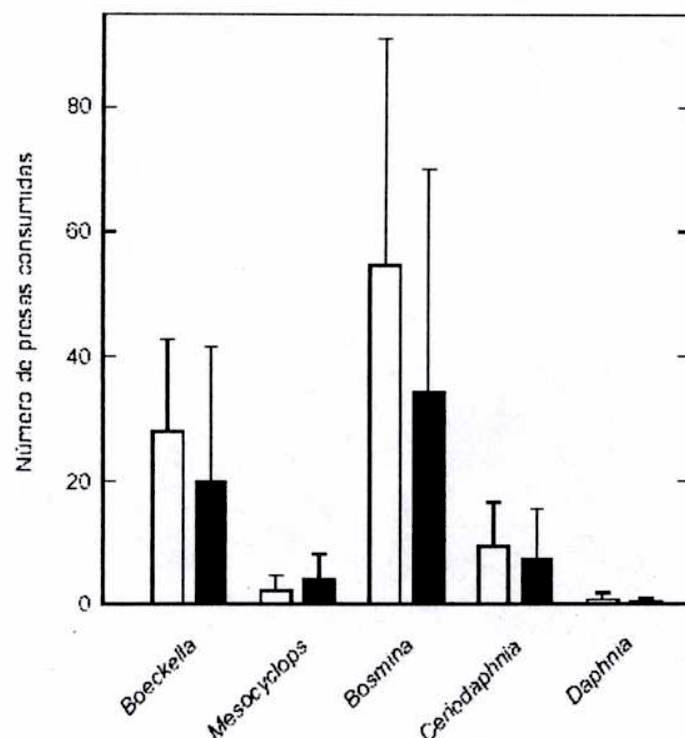


Figura 4-5: Número de presas ingeridas por truchas arco iris juveniles durante el experimento 3. Con UV: columnas rayadas; sin UV: columnas vacías. Las barras verticales indican la desviación estándar.

Discusión

La capacidad de percibir la radiación UV ha sido demostrada en varias especies de peces (Downing et al. 1986, Hawryshyn 1992, Jacobs 1992, Losey et al. 1999), y sobre todo en las etapas tempranas del desarrollo (Bowmaker y Kunz 1987, Browman y Hawryshyn 1992). Sin embargo, aún sigue siendo objeto de especulación la función potencial que este tipo de visión podría tener. En experimentos de laboratorio, usando fuentes de radiación monocromática, se ha visto que los peces utilizan la visión en la región UV, para localizar y capturar exitosamente las presas (Loew et al. 1993). Tales

experimentos demuestran que, en ausencia de luz visible, el UVA puede ayudar en la detección de presas. Otros investigadores detectaron una mejora en la actividad predatoria en presencia de UV al usar una lámpara de tungsteno en combinación con filtros de interferencia para obtener los tratamientos: visible con UV y visible sin UV (Browman et al. 1994). En este caso, quedó demostrado que la visión UV contribuye en la detección de presas en un nivel bajo de luz visible, como el generado por la lámpara de tungsteno. En cambio, en condiciones naturales de iluminación, el flujo de fotones en la banda del visible alcanza siempre mayores órdenes de magnitud que en la región UV. Siendo así, cabe cuestionarse si en condiciones naturales la radiación UV realmente puede mejorar la detección de presas, por encima de los niveles de resolución que se alcanzan solamente con los receptores de luz visible. Se ha sugerido que, bajo ciertas circunstancias, la visión UV aumentaría el contraste contra un fondo brillante de refracción de UV en el espacio subacuático (Losey et al. 1999), y así contribuiría a la detección de presas muy transparentes (en el visible). Sin embargo, todavía no existen evidencias directas que de que la visión UV contribuya realmente a incrementar la detección de presas bajo condiciones naturales.

En este estudio, no se encontraron evidencias que soporten la idea de que la RUV mejore la detección de presas en truchas arco iris, bajo el espectro solar completo. La eliminación experimental de las longitudes de onda UV, no tuvo ningún efecto en el número de presas ingeridas o en la preferencia por algún ítem alimentario en particular. Se debe admitir que en este experimento, las condiciones no fueron completamente naturales dado que los peces estuvieron confinados en volúmenes relativamente pequeños, y tanto ellos como las presas, no tenían manera de evitar la exposición solar. Sin embargo, se probaron distintas formas de contenedores y distintos colores de fondo para evitar errores metodológicos sistemáticos. En dos de los experimentos se usó un

sólo tipo de presa (*Ceriodaphnia dubia*), pero en el último se ofreció a los peces una mezcla natural de zooplancton, de manera que tuviesen a disposición rangos naturales de tamaño, conspicuidad y comportamientos de evasión. Sin embargo, a pesar de la diversidad de variantes ensayadas experimentalmente, en todos los casos fue imposible detectar diferencias en la actividad de alimentación de peces expuestos vs. no expuestos a la RUV.

Debe destacarse que el interés primario de este trabajo no fue saber si los peces son capaces de detectar el UV en condiciones particulares de luz, sino más bien si la presencia de RUV se traduce en mayores tasas de ingestión durante períodos significativos de actividad alimenticia. Los niveles de luz utilizados en este estudio corresponden a los registrados a mediodía en invierno y son equivalentes a los que se registran temprano en la mañana durante el verano. Tales niveles coinciden con registrados por Boisclair (1992) en verano cuando los juveniles de trucha comienzan a alimentarse, alcanzando un máximo de actividad al mediodía. Un estudio hecho por Angradi y Griffith (1990) reveló que el contenido estomacal de juveniles de trucha arco iris se incrementaba abruptamente entre las 10 y las 12 a.m. y que aparentemente no se alimentaban una vez transcurrido el crepúsculo.

Este estudio también difiere de otros trabajos en relación a la variable elegida para cuantificar la actividad alimenticia. En la mayoría de los estudios previos la actividad de alimentación se cuantificó indirectamente, evaluando las diferencias comportamentales (distancia de reacción, ángulos de ataque, etc.) (Browman et al. 1994) o a través del número de movimientos de ataque (Loew et al. 1993). Aquí, se utilizó el conteo directo de presas ingeridas, mediante el análisis de los contenidos estomacales o por la diferencia entre el número inicial y final de presas. Considero más correcta la adopción de esta variable, ya que es directa y más objetiva que las usadas en estudios

anteriores. En síntesis, este trabajo no refuta la existencia de visión UV en juveniles de trucha arco iris, pero sí arroja dudas sobre la relevancia ecológica de la radiación ultravioleta, como factor que mejora la actividad alimenticia en el medio natural.

Referencias

- Angradi, T.R. & S.J. Griffith. 1990. Diel feeding chronology and diet selection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Henry's Fork of the Snake River, Idaho. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47: 199-209.
- Boisclair, D. 1992. Relationship between feeding and activity rates for actively foraging juvenile brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49: 2566-2573.
- Bowmaker, J.K. & Y.L. Kunz. 1987. Ultraviolet receptors, tetrachromatic colour vision and retinal mosaics in brown trout (*Salmo trutta*): age dependent changes. Vision Research 27: 2101-2108.
- Browman, H.I. & C.W. Hawryshyn. 1992. Thyroxine induces a precocial loss of ultraviolet photosensitivity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Teleostei). Vision Research 32: 2303-2312.
- Browman, H.I., I. Novales-Flamerique & C.W. Hawryshyn. 1994. Ultraviolet photoreception contributes to prey search behaviour in two species of zooplanktivorous fishes. J. Exp. Biol. 186: 187-198.
- Carpenter, K.J. & L. Zhao. 1999. Forgotten mysteries in the early history of vitamin D. Journal of Nutrition 129: 923-927.
- Downing, J.E.G., M.B.A. Djamgoz & J.K. Bowmaker. 1986. Photoreceptors of a cyprinid fish, the roach: morphological and spectral characteristics. J. Comp. Physiol. A 159: 859-868.

- Elliott, J.M. 1975a. The growth of brown trout (*Salmo trutta* L.) fed on reduced rations. J. Animal Ecology 44: 823-842.
- Elliott, J.M. 1975b. The growth rate of brown trout, *Salmo trutta* L., fed on maximum rations. J. Animal Ecology 44: 805-821.
- Elliott, J.M. 1975c. Number of meals in a day, maximum weight of food consumed in a day and maximum rate of feeding for brown trout, *Salmo trutta* L. Freshwater Biology 5: 287-303.
- Farman, J.C., B.G. Gardiner & J.D. Shanklin. 1985. Large losses of total ozone in the Antarctica reveal seasonal ClOx/NOx interaction. Nature 315: 207-210.
- Häder, D.-P., R.C. Worrest, H.D. Kumar & R.C. Smith. 1995. Effects of increased solar ultraviolet radiation on aquatic ecosystems. Ambio 24: 174-180.
- Hunter J.R. & Taylor J.H. (1982). Assessment of the effects of UV radiation on marine fish larvae. *The Role of Ultraviolet Radiation in Marine Ecosystems.. NATO Conference Series IV*. (Ed. J. Calkins). pp. 459-497. Plenum Press, New York.
- Hunter, J.R., Taylor, J.H., & Moser, H.G. (1979). Effect of ultraviolet irradiation on eggs and larvae of the northern anchovy, *Engraulis mordax*, and the pacific mackerel, *Scomber japonicus*, during the embryonic stage. *Photochemistry and Photobiology*. 29: 325-338.
- Hawryshyn, C.W. 1992. Polarization vision in fish. Amer. Sci. 80: 164-175.
- Jacobs, G.H. 1992. Ultraviolet vision in vertebrates. Amer. Zool. 32: 544-554.
- Loew, E.R., W.N. McFarland, E.L. Mills & D. Hunter. 1993. A chromatic action spectrum for planktonic predation by juvenile yellow perch, *Perca flavescens*. Can. J. Zool. 71: 384-386.
- Losey, G.S., T.W. Cronin, T.H. Goldsmith, D. Hyde, N.J. Marshall & W.N. McFarland. 1999. The UV visual world of fishes: a review. J. Fish Biol. 54: 921-943.

- Madronich, S. 1994. Increases in biologically damaging UV-B radiation due to stratospheric ozone reductions: a brief review. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 43: 17-30.
- Martin, G.G., C. Speckmann & S. Beidler. 2000. Photobehavior of the harpacticoid copepod *Tigriopus californicus* and the fine structure of its nauplius eye. Invertebrate Biology 119: 110-124.
- Riehle, M.D. & J.S. Griffith. 1993. Changes in habitat use and feeding chronology of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fall and the onset of winter in Silver Creek, Idaho. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 50: 2119-2128.
- Smith, K.C. & E.R. Macagno. 1990. UV photoreceptors in the compound eye of *Daphnia magna* (Crustacea: Branchiopoda). A fourth spectral class in single ommatidia. J. Comp. Physiol. A 166: 597-606.
- Von Frisch, K. 1967. The dance language and orientation of bees. Belknap Press, Cambridge. 580 pp.
- Wehner, R. 1992. Homing in arthropods. pp. 45-144. In: D.R. Papaj (ed.) Animal Homing, Chapman & Hall, London.
- Worrest, R.C. 1986. The effect of solar UV-B radiation on aquatic systems: an overview. pp. 175-191. In: J.G. Titus (ed.). Effects of Changes in Stratospheric Ozone and Global Climate, U.S.E.P.A., Washington D.C.

Conclusiones Generales

La investigación que se desarrolló durante este trabajo de tesis doctoral sobre los efectos de la radiación ultravioleta (RUV) en zooplancton y estadios tempranos de peces, en ambientes de agua dulce ubicados en el Noroeste Patagónico y la Península Antártica ha demostrado que la radiación ultravioleta (RUV) es un factor ambiental importante en estos sistemas biológicos. Una característica común a la mayoría de los ambientes acuáticos estudiados, es la elevada transparencia de sus aguas. Este hecho permite una penetración de las radiaciones a profundidades de hasta varios metros. De este modo, las diferentes poblaciones de zooplancton y peces que habitan estos ambientes, podrían resultar expuestas diariamente a niveles dañinos de RUV.

Más allá de la transparencia de sus aguas, los lagos que se incluyeron en la investigación, presentan particularidades que los diferencian. Las diferentes características de cada ambiente condicionan el tipo de respuesta desplegada por los organismos frente a la RUV.

Efectos de RUV sobre el zooplancton:

Las estrategias de mitigación utilizadas por especies del género *Boeckella* se estudiaron en dos grandes áreas geográficas que presentan características distintivas, i.e. los lagos del Parque Nacional Nahuel Huapi (41° S, 71° O) y los lagos Antárticos (63° S, 57° O). Al comparar ambos ambientes encontramos que en los lagos antárticos las temperaturas son más frías y los vientos que soplan en esta zona alcanzan velocidades extremas. Además, las cubetas de los lagos antárticos son, en general, menos profundas y no poseen predadores. Contrariamente, los lagos norpatagónicos poseen predadores, principalmente peces planctófagos.

Analizando las estrategias de mitigación de daños por RUV en el marco de estos escenarios, se observan situaciones en las que una estrategia se ve favorecida frente a las otras. Por ejemplo, para que la **evitación** sea posible, es condición indispensable que el ambiente sea profundo y que la mezcla de la columna de agua no exceda la velocidad crucero de los organismos; de esa manera los organismos pueden mantener un refugio estable en profundidad. Por el contrario, en lagos someros de zonas ventosas se genera una intensa mezcla de la columna de agua, que arrastra a los organismos del plancton intermitentemente hacia la superficie, donde no pueden evitar la exposición a niveles altos de radiación. La segunda estrategia, **fotoprotección**, se ve limitada por la presencia de predadores, pues un mayor contenido de pigmentos, aumenta a su vez la conspicuidad y consecuentemente el riesgo de predación. Los pigmentos fotoprotectores conocidos son: Carotenoides, Melanina y MAAs. Los dos primeros absorben radiación visible y por ende, las presas que tengan mayor contenido de estos pigmentos resultarán más conspicuas. Por el contrario, los MAAs son transparentes en la región del visible y absorben sólo radiación UV. En consecuencia, es posible que las presas con MAAs sean más conspicuas frente a predadores que poseen capacidad de visión en el UV. En ausencia de predadores, la fotoprotección sería quizás la estrategia más conveniente, cuando no es posible la evitación.

Por último, para que la **foto-reparación** sea posible, las temperaturas no deben ser extremadamente bajas dado que este proceso depende de sistemas enzimáticos, i.e. requiere temperaturas relativamente altas.

Diversidad de mecanismos en el género Boeckella.

Boeckella coexistiendo con depredadores visuales (PNNH)

En los lagos Moreno Este, Moreno Oeste y Morenito del Parque Nacional Nahuel Huapi, los copépodos calanoideos de la especie *Boeckella gracilipes* cohabitan con especies de peces (*Odontheistes hatcheri* y *Galaxias maculatus*), cuyos primeros estadios se alimentan de zooplancton. Dado que los peces son predadores visuales, el zooplancton encontraría limitaciones en adoptar una estrategia de fotoprotección a través de pigmentos. La pigmentación les brindaría protección contra la radiación UV, pero aumentaría el riesgo de predación. De este modo, las poblaciones de *B. gracilipes* en estos lagos se encuentran enfrentadas a dos presiones selectivas contrapuestas. Estudios previos han demostrado que *B. gracilipes* presenta niveles despreciables de pigmentación (Tartarotti y Zagarese, com. pers.). En experimentos de exposición a radiación UV artificial, las poblaciones de *B. gracilipes* demostraron ser muy susceptibles a esta radiación, además, se detectaron variaciones inter-poblacionales. Por otra parte, se observó una mayor tolerancia en presencia de luz visible, aunque este hecho no sería una prueba de fotoreparación dado que el aumento de la tolerancia fue pequeño. En este caso, podría haber ocurrido que la luz disminuyera el stress del organismo volviéndolo más tolerante a la RUV.

Boeckella en lagos profundos (PNNH)

Se encontró que las poblaciones de *B. gracilipes* que habitan los lagos Moreno Este y Moreno Oeste ($Z_{media} \sim 50$ m) son muy poco tolerantes a la RUV y mantienen ese bajo nivel de tolerancia todo el año. Para contrarrestar la mayor incidencia de radiación en primavera y verano, recurren a la evitación, migrando a mayor profundidad, durante

el día. Dado que cuentan con esta estrategia comportamental de protección frente a la RUV, no presentan desarrollo de ningún mecanismo fisiológico.

Boeckella en lagos poco profundos (PNNH)

El lago Morenito posee una cubeta poco profunda ($Z_{media} \sim 10$ m), donde los vientos predominantes inducen una intensa mezcla vertical, hecho que no permite la estratificación de la columna de agua. De esta manera, el plancton no puede adoptar la estrategia de evitación, ya que no logra mantener una posición estable en profundidad. Las aguas del Morenito son menos transparentes que las otras dos cubetas del Moreno, sin embargo la imposibilidad de evitar la radiación resulta en una mayor exposición de los individuos. Esta población resultó más tolerante a la RUV que las poblaciones de lagos profundos. Esto podría vincularse también al hecho que el morfotipo de esta población es más grande y robusto.

Boeckella en ambientes sin predación (lagos antárticos)

En los cuerpos de agua dulce de Bahía Esperanza (63° S, 57° O), Península Antártica, los copépodos de la especie *Boeckella poppei* son los únicos representantes del zooplancton crustáceo. Comparten el ambiente con algunas especies de rotíferos, pero no tienen predadores. Las temperaturas son extremadamente frías, los lagos permanecen congelados gran parte del año. Al descongelarse por cortos períodos en verano, los organismos se ven repentinamente expuestos a niveles muy importantes de RUV. Esto responde a varias causas, i.e., el hecho de que el agujero de ozono aún sea importante en esa época permitiendo el paso de Radiación UV-B con mayor intensidad que la normal. A esto se suman los efectos combinados de la transparencia, poca

profundidad y la exposición a vientos extremadamente fuertes. Estas tres últimas características condicionan negativamente la posibilidad de adoptar la estrategia de evitación. Tampoco se encontró desarrollada la capacidad de foto-reparación, esto podría adjudicarse a que las bajísimas temperaturas limitan los mecanismos enzimáticos. La ausencia de predadores los exime del problema asociado de la conspicuidad. De hecho se encontró que se valen exclusivamente de la fotoprotección como estrategia de protección contra la RUV. En los individuos de todas las poblaciones se hallaron altos contenidos de MAAs y carotenos.

Variaciones inter-poblacionales

Los ambientes antárticos estudiados presentaron variaciones en cuanto al clima óptico. Si bien la turbidez determina en gran medida la exposición a la RUV, hay otros parámetros como la profundidad del ambiente o la exposición al viento, que en conjunto terminan definiendo el clima óptico que experimentan (y al cual se deben adaptar) los organismos. Asimismo, encontramos poblaciones con capacidades variables de tolerancia a la RUV correlacionadas positivamente con la concentración de MAAs. La Población del Lago Boeckella refleja claramente estas relaciones; del conjunto de lagos cuyas poblaciones fueron estudiadas, el Boeckella posee la mayor concentración de COD, a la vez que los mayores coeficientes de atenuación (K_d) y absorción (a_d) de la radiación (mayor turbidez). De este modo, los copépodos experimentan menor exposición en comparación con las otras poblaciones, lo cual se traduce en una menor capacidad de tolerancia, que se confirmó en los menores valores de LD_{50} y los más bajos niveles de pigmentos fotoprotectores. En el otro extremo, los copépodos de Lago

Chico demostraron la mayor tolerancia y los mayores contenidos de MAAs, reflejando una situación de máxima exposición.

Efectos de RUV sobre estadios tempranos de peces

Se ha probado que los niveles naturales de radiación solar, son potencialmente dañinos para los huevos de ambas especies (*O.hatcheri* y *G.maculatus*). La magnitud del efecto, sin embargo, depende fuertemente de la transparencia del agua y de la profundidad de incubación.

Cuando se agruparon los datos de mortalidad vs. dosis ADN se pudo ver que los huevos de *O.hatcheri* poseen una mayor tolerancia a la RUV que *G.maculatus*. El espectro de acción del ADN describe satisfactoriamente la relación entre mortalidad de los huevos y las dosis de UV recibidas, sugiriendo que la mortalidad es un resultado directo del daño en el ADN.

Efectos benéficos del UV

Existen numerosos organismos que poseen visión en el rango del espectro ultravioleta. Entre ellos, se ha encontrado que los juveniles de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) son capaces de captar RUV por medio de foto-receptores en sus retinas. La funcionalidad de los foto-receptores coincide con el período en que esta especie tiene hábitos planctófagos. A partir de este conocimiento, se ha postulado que este tipo de visión mejoraría la detección de presas, al verse más contrastadas con respecto al fondo, mejorándose así la eficiencia predatoria. Los experimentos conducidos durante esta tesis para poner a prueba esta última hipótesis, se han llevado a cabo utilizando al sol como fuente de RUV natural. Se ha demostrado que, al contrario

de lo esperado, la presencia o ausencia de RUV, no altera significativamente las tasas de predación. Esto no implica que no haya efectos benéficos, ni refuta el hecho de que los juveniles de trucha arcoiris poseen visión UV, sólo que ésta no parecería aumentar la eficiencia de predación en el medio natural.



Horacio E. Zagarese



Mariana Lozada

Effects of ultraviolet radiation on the eggs of landlocked *Galaxias maculatus* (Galaxiidae, Pisces) in northwestern Patagonia

M. BATTINI*, V. ROCCO*, M. LOZADA*,†, B. TARTAROTTI*,‡, AND H. E. ZAGARESE*,†

*Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, U.P. Universidad, 8400 Bariloche, Argentina

†Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina

SUMMARY

1. Ultraviolet radiation (UVR) damages early life stages of several fish species. *Galaxias maculatus* is a small catadromous fish, with landlocked forms occurring in many lakes within the Nahuel Huapi National Park (Patagonia, Argentina). In this work, the vulnerability of *G. maculatus* eggs exposed to both natural and artificial UVR was investigated in relation to water transparency.
2. Field experiments were performed in two lakes differing in UVR attenuation. *Galaxias maculatus* eggs were exposed to *in situ* levels of UVR in quartz tubes incubated at various depths. For laboratory experiments, the eggs were exposed to five levels of artificial UVB radiation.
3. Exposure to natural UVR causes various degrees of egg mortality depending on water transparency and incubation depth. In the less transparent lake ($K_{d320} = 3.08 \text{ m}^{-1}$), almost complete mortality was observed near the surface. At a depth of 43 cm the observed mortality was only 22%, but was still significantly different from the dark control. In the most transparent lake ($K_{d320} = 0.438 \text{ m}^{-1}$), almost total mortality was observed in tubes incubated at 2.56 m or shallower. A gradual decline in mortality was recorded from that depth to 3.78 m where the values approached those in the dark control treatments.
4. A monotonic relationship between mortality and UV exposure could be observed both in field and laboratory experiments. Using the results from field incubations, a LD_{50} of $2.5 \text{ J cm}^{-2} \text{ nm}^{-1}$ was estimated. In a few mountain lakes, this value would be exceeded even if the eggs were laid at the maximum depth of the lake. Thus UVR seems a sufficient cause to explain the absence of *G. maculatus* populations in some mountain lakes. For most lakes, however, UVR is probably one of several important environmental factors, which together determine the habitat suitability.

Keywords: Argentina, fish, ozone depletion, ultraviolet radiation

Introduction

Early life stages of fishes might be highly vulnerable to natural ultraviolet radiation (UVR), given their transparency and frequent occurrence in shallow waters (Hunter & Taylor 1982, Crowder & Crawford 1984). Artificial UV light has been shown to induce mortality in free embryos of anchovy (*Engraulis mordax*) (Hunter, Taylor & Moser 1979, Hunter, Kaupp & Taylor 1981) and sockeye salmon (*Oncor-*

Correspondence: H. E. Zagarese, Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, U.P. Universidad, 8400 Bariloche, Argentina.

E-mail: zagarese@crub.uncoma.edu.ar

‡Present address: Institute for Zoology and Limnology, University of Innsbruck, Technikerstrasse 25, 6020 Innsbruck, Austria.

hynchus nerka (Bell & Hoar 1950). More recently, Williamson *et al.* (1997) observed high mortality in yellow perch eggs (*Perca flavescens*) incubated in a transparent lake. Hatching failure and larval mortality induced by UVR are often associated with various degrees of embryonic malformations (Zagarese and Williamson 2000).

Galaxias maculatus (Jenyns 1842), locally called 'puyen', is a small catadromous fish, with land-locked forms occurring along the Andean range of Southern Argentina. The distribution of this species is likely the result of a combination of several environmental factors, such as predation, competition and temperature. In addition, the existing evidence is consistent with the idea that UVR may also play a role in determining the occurrence of *G. maculatus* in different lakes, as well as its vertical distribution within lakes. The species is common at lower elevations (~ 600–800 m a.s.l.), but is absent from mountain lakes (above ~ 1500 m a.s.l.). Mountain lakes differ from lower elevation lakes in that they are typically highly transparent and shallow (Zagarese, *et al.* 2000). On the other hand, lakes at lower elevations are either deep and transparent, or shallow and relatively coloured. The spawning period of *G. maculatus* extends from August to late December. The eggs are demersal and adhesive, and have been reported to withstand desiccation (McDowall 1968). The larvae are known to avoid the upper meters of transparent lakes (Barriga 1999), but in less transparent lakes, they are commonly found just beneath the surface (Cussac, Cervellini & Battini 1992).

In this study, we investigate the vulnerability of *G. maculatus* eggs when exposed to either natural or artificial UVR. The results are discussed in relation to the occurrence of the species in different lake types.

Methods

Ripe *Galaxias maculatus* were caught in the littoral zone using a seine net (mesh 6 mm) from late October until the end of November. Ova from individual females were obtained through stripping, and subsequently fertilised in a Petri dish. In order to be fertilised the ova have to be mature, but stripping may produce a mixture of mature and immature ova. It is not possible to distinguish between mature and immature ova in the field, but unfertilised eggs die within the next few hours. Thus, to avoid the high and variable mortality associated with fertilisation failure, dead eggs were removed a few days after fertilisation, and only seemingly healthy eggs were sorted into the experimental containers.

The eggs of *G. maculatus* were exposed to natural ultraviolet radiation in two optically different lakes. Lake Moreno (east side) is situated at 41°05'S, 71°30'W and at an elevation of 758 m a.s.l. Moreno is an oligotrophic and transparent lake ($K_{d320} = 0.438 \text{ m}^{-1}$) with a surface area of 5.63 km² and a maximum depth of 112 m. Lake Trébol, situated 600 m to the north, is smaller (surface area 0.3 km² and maximum depth 12 m) and considerably less transparent ($K_{d320} = 3.08 \text{ m}^{-1}$). During the exposure periods, temperature ranged from 12 to 13°C in Lake Moreno and from 14 to 16°C in Lake Trébol.

Two experiments were performed in Lake Moreno, and one in Lake Trébol. In each experiment, groups of 30 eggs were placed in quartz tubes (16 mm in diameter, 200 mm in length). Dark controls were shielded from UV and visible radiation by wrapping the tubes with several layers of aluminum foil. One end of each tube was closed with a silicon stopper, while the other end was covered with a 20-µm plankton mesh to permit the diffusion of oxygen. The experimental setup is summarised in Table 1.

Table 1 Experimental setup in field incubations (dark controls are labeled with a 'd')

Fertilisation date Exposure period	Moreno (Nov)		Moreno (Dec)		Trébol	
	10 Nov 98		24 Nov 98		30 Oct 98	
	12–24 Nov		27 Nov to 10 Dec		2–14 Nov	
	Depth (m)	Replicates	Depth (m)	Replicates	Depth (cm)	Replicates
Treatments	0.73	6	2.56	4	5	5
	1.34	6	3.17	4	14	5
	1.95	6	3.78	4	25	4
	2.56	6	3.78 ^d	3	43	4
	2.56 ^d	6	–	–	43 ^d	4

The tubes were inspected at least once a week, and dead eggs were recorded and removed (healthy eggs have a distinct clear amber colour, while dead eggs become whitish and foggy). Exposure to UV radiation was ended when the first embryos started hatching. At that moment, the remaining eggs were transferred to the laboratory and placed inside an incubator at 15°C and a 14:10 light: dark photoperiod. The number of newborns was recorded daily until all eggs had hatched or died.

Ground level solar radiation was continuously monitored at 1 min intervals with a GUV 511. Underwater radiation profiles were performed with a PUV 500 instrument. Both radiometers (from Biospherical Instruments, San Diego, CA) have four narrow band channels in the UV region centered at 305, 320, 340, and 380 nm and a broad band channel in the visible region (referred as PAR channel). For each experiment the accumulated irradiance at ground level was calculated (sum of daily irradiance integrals over the experimental period.). The irradiance at each depth was calculated using the attenuation equation:

$$E_z = E_0 e^{-kz}$$

where E_z is the irradiance at depth z ; E_0 , the irradiance at the surface; and k , the extinction coefficient for $\lambda = 320$ nm.

In addition to the in situ incubations, eggs of *G. maculatus* were exposed to an artificial source of UV-B radiation (Spectrolux XX15-B fluorescent lamp from Spectronics Corp. Westbury, New York). The lamp emission was filtered with a sheet of cellulose triacetate to remove wavelengths below about 295 nm. Fifteen groups of 40 eggs were placed in 5 cm Petri dishes. Five different radiation treatments were assayed by covering the dishes with different numbers of layers of plastic window screen. The UVB irradiance under each treatment was measured with an IL-1700 (Newburyport, MA) radiometer. Each treatment was run in 3 replicates. The experiment began on the 3rd of November 1997, with eggs that had been fertilised on the 29th of October. The photoperiod was set at 12:12 light:dark. The eggs were irradiated once a day with UV radiation for a period of 3 h simultaneously with visible light (two Philips daylight fluorescent tubes, TLT 40W/54RS Brazil). The dishes were inspected daily under dissecting scope and the number of death or hatches recorded.

Results

Exposure to natural UVR causes various degrees of egg mortality depending on water transparency and

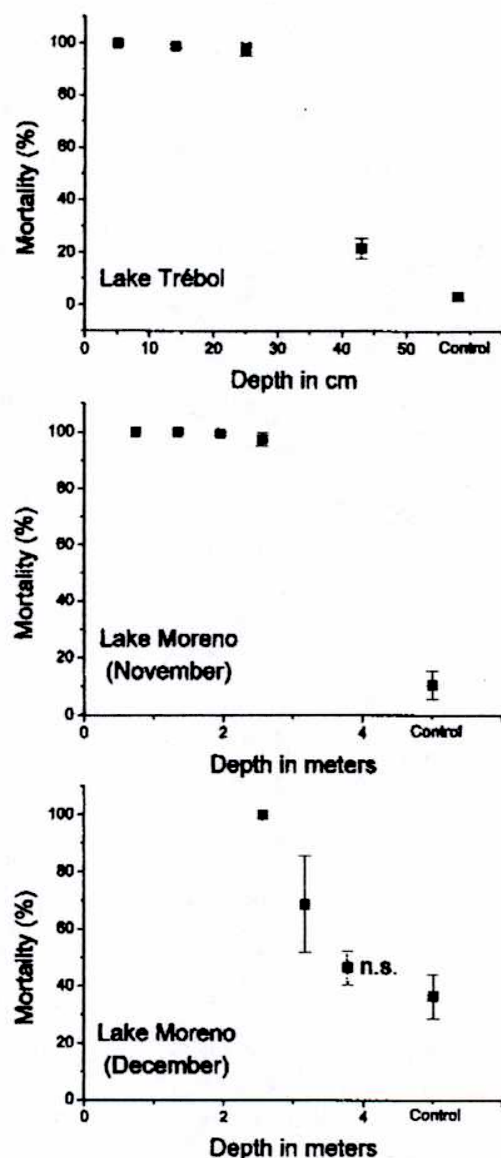


Fig. 1 Egg mortality as a function of incubation depth for *Galaxias maculatus* exposed to solar radiation. The value labeled with n.s. is not significantly different from its control ($P = 0.44$); all other values differ from their respective controls at $P < 0.05$ (Dunnett test after one-way ANOVA). Vertical bars are standard errors.

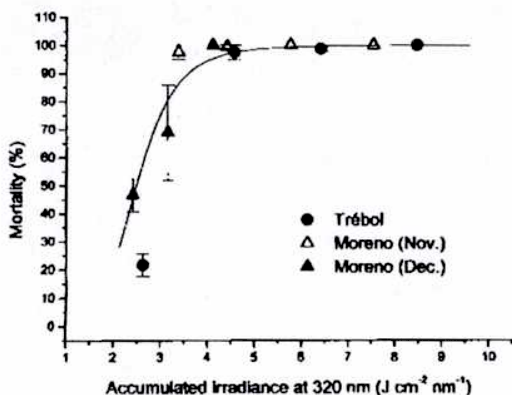


Fig. 2 Egg mortality of *G. maculatus* as a function of the integrated irradiance at 320 nm. The graph combines the results of the three independent experiments shown in Fig. 1. The line was fitted by computing a linear regression of Logit (mortality) vs. $\log$ (integrated irradiance). Note that the variables were back transformed to their original arithmetic scales. Vertical bars are standard errors.

incubation depth. In Lake Trébol, egg mortality was almost complete in the tubes incubated at 5, 14, and 25 cm, but mortality decreased sharply at 43 cm (Fig. 1). In Lake Moreno, almost total mortality was observed in the tubes incubated at 2.56 m or shallower, and a gradual decline in mortality was recorded from that depth to 3.78 m (Fig. 1). On the other hand, the mortality in the dark control tubes ranged between 4.4 and 37%. When plotted against the accumulated irradiance at 320 nm, the mortality

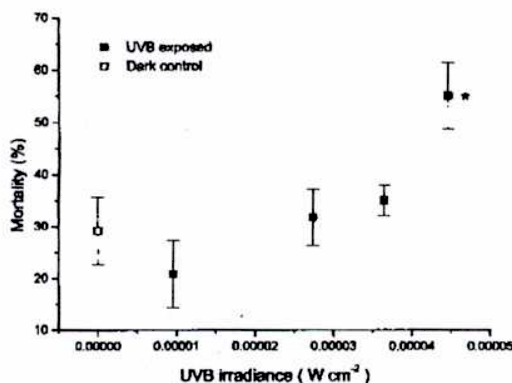


Fig. 3 Egg mortality of *G. maculatus* exposed to different levels of artificial UVB radiation. Only the treatment labeled with the star (*) resulted significantly different from the dark control (Dunnett test after one-way anova, $n = 15$, $P < 0.05$). Vertical bars are standard errors.

values observed in the three independent experiments appear to conform to a single curve (Fig. 2).

Exposure to artificial UVB radiation also resulted in high egg mortality. However, only the treatment exposed to the highest UVB irradiance produced a result significantly different from the dark control (Dunnett test after one-way anova, $n = 15$, $P < 0.05$) (Fig. 3).

Discussion

Exposure to the full solar spectrum promoted various degrees of egg mortality in *Galaxias maculatus*. Only radiation within the UV range seems responsible for this effect, since preliminary trials demonstrated that eggs develop normally when exposed to ground levels of natural visible radiation (M. Battini, B. Tartarotti and H. E. Zagarese, unpublished data). Egg mortality was associated with various degrees of embryo malformation, including more or less severe deformations of the back spine, which were observed both in laboratory and field incubations. Natural levels of solar ultraviolet radiation have proven to be potentially damaging to the eggs of *G. maculatus*. The magnitude of the effect, however, is strongly dependent on water transparency and incubation depth. In transparent environments, such as Lake Moreno, UVR mortality was high even at several meters depth. On the other hand, in a less transparent environment, such as Lake Trébol, the damaging effects of UVR were attenuated within the first 30–40 cm.

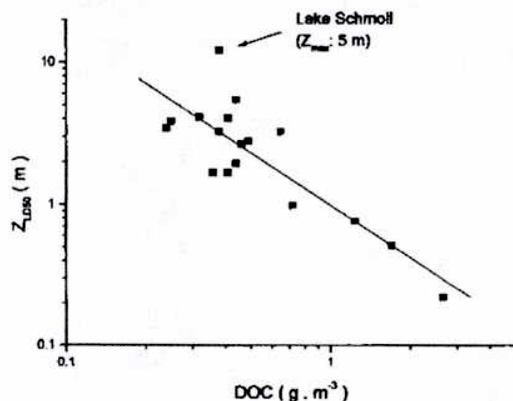


Fig. 4 A log-log scatter plot of LD_{50} depth against the concentration of dissolved organic carbon (DOC) in several lakes from Northwestern Patagonia. The $Z_{LD_{50}}$ estimates were computed assuming a LD_{50} of $2.5 \text{ J cm}^{-2} \text{ nm}^{-1}$.

The relationship between mortality and UVR dose (here estimated as accumulated irradiance) was found to be rather steep. In fact, three independent experiments were required to produce a reasonable description of this relationship (see Fig. 2). In the natural medium, one of the implications of such a steep relationship is that the region of total mortality is separated from the region of background mortality by a rather thin layer. Thus, the depth at which the LD₅₀ occurs may be considered a good estimate of the boundary between hatching success or failure.

Using the LD₅₀ estimated from Fig. 2 and the extinction coefficients provided by Morris *et al.* (1995), we calculated the depth at which 50% of the mortality would occur in a series of lakes within the geographic distribution of *G. maculatus*. For the sake of comparison we assumed similar temperature and ground level irradiance conditions to those recorded in Lake Moreno during December 1998. Fig. 4 shows a scatter plot of the LD₅₀ depth against the concentration of dissolved organic carbon (the main factor controlling UV attenuation (Morris *et al.* 1995)). It is interesting to note that for some clear mountain lakes, such as Lake Schmoll, the LD₅₀ depth is more than twice the maximum lake depth. Moreover, we suspect that temperature might further affect the relationship between mortality and LD₅₀ depth. Lower temperatures can be expected to increase the development time, therefore extending the period during which the eggs are exposed to UVR. In other words, lower temperatures (e.g., as in mountain lakes) can be expected to be associated with deeper LD₅₀ depths as compared to those depicted in Fig. 4.

The information collected in this study is consistent with the idea that UV radiation can potentially affect the recruitment of *G. maculatus* populations. In a few extreme cases (i.e. highly transparent and relatively shallow lakes, such as Lake Schmoll) UVR may be a sufficient cause to explain the absence of *G. maculatus* populations (LD₅₀ depth = 12 m vs. maximum depth = 5 m). However in most other lakes, UVR is probably one of several important environmental factors that together determine the suitability of the habitat. Similarly, Béland *et al.* (1999) suggested that UVB radiation must be viewed as only one amongst many environmental factors that produce the very high levels of mortality typically observed in the planktonic early life stages of marine fishes.

Acknowledgments

We thank Walter Cravero, Chris Osburn, Bruce Hargreaves, Don Morris, Marcela Beveraggi, Enrique Molina, Victor Baez, Damasia Lozada, Andrew Schwartz and Walter Helbling. The manuscript benefited from the comments from two anonymous reviewers. This work was supported by Universidad Nacional del Comahue (Proyecto B922), International Foundation for Science (grant H/2325-2), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina (Convenio de Cooperación Internacional CONICET-NSF), and Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 01/00002/00066).

References

- Barriga J.P. (1999) *Las larvas del género Galaxias (Pisces, Galaxiidae) del lago Gutiérrez. Parque Nacional Nahuel Huapi, Argentina*. Licenciatura Thesis, Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche.
- Béland F., Browman H.L., Rodríguez C.A. & StPierre J.F. (1999) Effect of solar ultraviolet radiation (280–400 nm) on the eggs and larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **56**, 1058–1067.
- Bell G.M. & Hoar W.S. (1950) Some effects of ultraviolet radiation on sockeye salmon eggs and alevins. *Canadian Journal of Research*, **28**, 35–43.
- Crowder L.B. & Crawford H.L. (1984) Ecological shifts in resource use by bloaters in Lake Michigan. *Transactions of the American Fisheries Society*, **113**, 694–700.
- Cussac V.E., Cervellini P. & Battini M. (1992) Intralacustrine movements of *Galaxias maculatus* (Galaxiidae) and *Odontesthes microlepidotus* (Atherinidae) during their early life history. *Environmental Biology of Fishes*, **35**, 141–148.
- Hunter J.R., Kaupp S.E. & Taylor J.H. (1981) Effects of solar and artificial ultraviolet-b radiation on larval northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Photochemistry and Photobiology*, **34**, 477–486.
- Hunter J.R. & Taylor J.H. (1982) Assessment of the effects of UV radiation on marine fish larvae. *The Role of Ultraviolet Radiation in Marine Ecosystems. NATO Conference Series IV*. (Ed. J. Calkins). pp. 459–497. Plenum Press, New York.
- Hunter J.R., Taylor J.H. & Moser H.G. (1979) Effect of ultraviolet irradiation on eggs and larvae of the northern anchovy, *Engraulis mordax*, and the pacific mackerel, *Scomber japonicus*, during the embryonic stage. *Photochemistry and Photobiology*, **29**, 325–338.

- McDowall R.M. (1968) *Galaxias maculatus* (Jenyns), the New Zealand Whitebait. *Fisheries Research Bulletin*, 2, 84.
- Morris D.P., Zagarese H.E., Williamson C.E., Balseiro E.G., Hargreaves B.R., Modenutti B., Moeller R. & Queimaliños C. (1995) The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnology and Oceanography*, 40, 1381–1391.
- Williamson C.E., Metzgar S.L., Lovera P.A. & Moeller R.E. (1997) Solar ultraviolet radiation and the spawning habitat of yellow perch, *Perca flavescens*. *Ecological Applications*, 7, 1017–1023.
- Zagarese H.E., Diaz M., Queimaliños C., Pedrozo F., Ubeda C. (2000) Mountain lakes in Northwestern Patagonia. *Verhandlungen der Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewante Limnologie*, in press.
- Zagarese H.E., Williamson C.E. (2000) Impact of UV radiation on zooplankton and fish. *The Effects of UV Radiation in the Marine Environment*. (Eds. de Mora S., Demers S. and Vernet M.). Cambridge University Press, Cambridge (in press).

(Manuscript accepted 12 January 2000)

How much does ultraviolet radiation contribute to the feeding performance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, juveniles under natural illumination?

Vanina Rocco^{a,b}, Juan Pablo Barriga^b, Horacio Zagarese^a & Mariana Lozada^a

Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad del Comahue, U.P. Universidad, 8400 Bariloche, Argentina (e-mail: vrocco@crub.uncoma.edu.ar)

^a*Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Argentina*

^b*Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Argentina*

Received 22 September 2000

Accepted 6 June 2001

Key words: UV vision, planktivory, predation, prey detection

Synopsis

Most research on environmental effects of ultraviolet radiation (UVR) has focused on its potential negative consequences. However, natural UVR can also be beneficial to living organisms (e.g., vitamin D synthesis, UV vision, germicide activity). UV vision has been demonstrated in a variety of animals including several invertebrates and vertebrates. Juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, has a retinal photoreceptor, which is sensitive to UVR between 360 and 370 nm. Among other functions, UV vision has been proposed to contribute to prey detection by enhancing the contrast between the prey and its background. We performed a series of feeding experiments with juvenile rainbow trout and several zooplankters as prey. The fish were allowed to feed either under full solar radiation, or under solar radiation from which the UV component had been removed using a long-pass cut off filter. We found that the removal of UV wavelengths had no effect on the number of prey eaten or on the preference for particular food items. This is contrary to published studies reporting prey detection enhancement mediated by UV vision in rainbow trout. This disparity in the results may be due to our use of natural radiation instead of artificial UV sources, in which the visible component is poorly represented. Although our results do not disprove the presence of UV vision in juvenile rainbow trout, they do cast doubts about its significance in enhancing feeding performance in a natural light environment.

Introduction

Most recent research on the environmental effects of ultraviolet radiation (UVR) has been stimulated by the realization of stratospheric ozone layer thinning (Farman et al. 1985), and consequent increases in UVB fluxes (Madronich 1994). Retrospectively, it seems reasonable that research in the early years had primarily focused on the negative effects of UVR (Worrest 1986, Häder et al. 1995). However, natural UVR can also be beneficial to several living organisms. Perhaps, the most paradigmatic example of a beneficial role of UVR is the synthesis of vitamin D (Carpenter & Zhao 1999). Another positive function of UVR is related

to vision: it has long been known that the longest wavelengths within the UV spectrum (UVA) contribute to orientation and pattern recognition in insects (von Frisch 1967, Wehner 1992). UV vision has also been demonstrated for various aquatic invertebrate (Smith & Macagno 1990, Martin et al. 2000) and vertebrate (Jacobs 1992) animals. In fish, UV vision has been proposed to help in orientation (Hawryshyn 1992) and prey detection by enhancing contrast between the prey and its background (Browman & Hawryshyn 1992, Loew et al. 1993, Browman et al. 1994, Losey et al. 1999).

Juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, has a retinal photoreceptor, which is sensitive to UVR between 360 and 370 nm. UV vision in juvenile trout

has been proposed to increase the detection of prey during the early life history intervals (Browman & Hawryshyn 1992), when trout is mainly planktivorous. Browman & Hawryshyn (1992) shown that UV perception is lost during the course of ontogeny, coinciding with a change in feeding habits from planktivory to ichthyophagy.

In order to demonstrate UV vision in fish, researchers have typically used controlled laboratory conditions and artificial UV sources. Such an approach permits a fine control of the spectral composition to which the animals are exposed. However, by the same token, the artificial radiation used is often very different from that found in natural environments. For example, the levels of radiation delivered by a tungsten lamp, such as that used by Browman et al. (1994), can be measured in nature at about 4:00 h during summertime at our location. Moreover, such levels are rapidly exceeded by as much as two orders of magnitude in the course of the following half an hour. In nature, fish are simultaneously exposed to UV and visible radiation. The high levels of visible radiation found in nature are difficult to reproduce in the laboratory. It is conceivable that UVR could be used to detect prey under monochromatic illumination, or that it could even enhance prey detection at the low levels of visible radiation used in laboratory experiments. However at the high levels of light,

typical of natural habitats, the contribution of UVR to prey detection could be less significant. In this study we exposed rainbow trout juveniles to the full spectrum of solar radiation, or to natural radiation from which the UV component has been filtered out. Our aim was to assess the contribution of UVR to prey detection, against a background of natural visible light.

Materials and methods

The experiments were carried out with rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* juveniles provided by the Aquaculture Center of Universidad Nacional del Comahue. All fish were between 30 and 60 days old, and between 24 and 29 mm total length. The experiments were performed during winter and early spring (August–November 1999), in San Carlos de Bariloche city, Patagonia, Argentina (41° 08' S, 71° 25' W, 778 m a.s.l.). The experiments were run outdoors between 10:00 and 13:00 h local time. Radiation was continuously recorded at the experimental site with GUV 510 from Biospherical Instruments, Inc. Figure 1 shows the radiation conditions (UV and visible) for each day of experimentation. Because the experiments were conducted around noon during winter-spring time, the radiation levels used were comparable to early

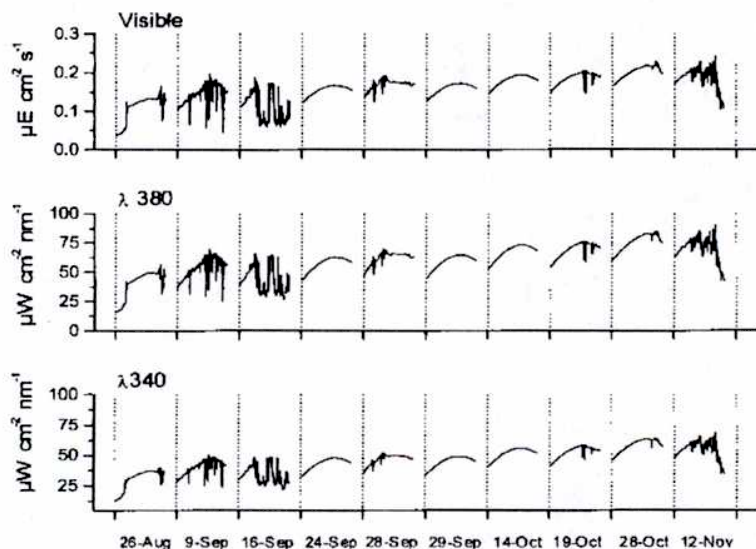


Figure 1. Irradiance at $\lambda = 340, 380$ nm and visible (380–750 nm) between 9:00 h and 13:00 h local time for each experimental day.

Table 1. Summary of experiments.

Experiment #	Rearing history		Summary of experimental conditions							Fish started feeding at
	Hatching date	Onset of feeding	Age (days)	Background colour	Trial date	Time (min)		Replicates		
						Acclimation	Feeding	Aclar	Acrylic	
1	8.7.1999	20.8.1999	49	Black	26.8.1999	30	15	4	4	12:00
	9.8.1999	9.9.1999	31	White	9.9.1999	30	15	2	2	12:30
	9.8.1999	9.9.1999	39	White	16.9.1999	30	15	4	4	12:30
	21.8.1999	20.9.1999	34	White	24.9.1999	30	15	4	4	10:47
	21.8.1999	20.9.1999	38	Grey	28.9.1999	30	15	4	4	10:53
	21.8.1999	20.9.1999	39	Grey	29.9.1999	37	20	4	4	13:18
2	14.9.1999	12.10.1999	30	—	14.10.1999	30	15	1	1	10:15
	14.9.1999	19.10.1999	35	—	19.10.1999	45	15	1	1	12:45
	14.9.1999	19.10.1999	44	—	28.10.1999	53	15	2	2	10:58
	14.9.1999	19.10.1999	59	—	12.11.1999	30	15	1	1	10:30
3	14.9.1999	12.10.1999	30	—	14.10.1999	40	30	2	2	12:00

morning (7–8:00h) levels during mid summertime. These radiation levels are within the range of light conditions at which trout juveniles have been reported to effectively feed in natural habitats (Angradi & Griffith 1990, Boisclair 1992, Riehl & Griffith 1993). The water source was River Gutierrez, an outflow of Lake Gutierrez, which is highly transparent to visible ($K_d \text{ PAR} = 0.12 \text{ m}^{-1}$) and UV ($K_d 320 \text{ nm} = 0.41 \text{ m}^{-1}$) radiation. Water temperature was recorded at the beginning and end of each experimental trial. We used three different experimental designs (Table 1). They all have in common two radiation treatments: UV transparent (covered with Aclar) and UV opaque (covered with clear acrylic) (Figure 2). The fish were starved for about 24 h before each experiment. In order to avoid a ceiling effect, the total amount of food offered was always orders of magnitude below reported satiation levels for trout juveniles of similar size (Elliott 1975a,b,c). At the end of each trial, all fish were fixed in 4% formalin for gut content analyses. Data were analyzed using parametric Student t-test or non-parametric Mann-Whitney U-test when normality was not satisfied. Table 1 summarizes the experimental design for the three types of experiments. Specific information about the experiments is provided below.

Experiment 1

This experiment was performed on 6 occasions (Table 1). Each experimental unit consisted of one fish placed in 200 ml river water within a large (diameter 14.5 cm, height 1.7 cm) glass dish. The fish were

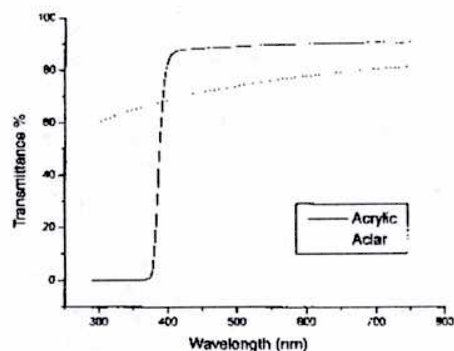


Figure 2. Transmittance (%) of the materials used to cover the experimental containers: aclar (UV transparent) and clear acrylic (UV opaque).

allowed to acclimate for at least 30 min, before adding 20 *Ceriodaphnia dubia* individuals as prey (mean individual dry weight 2.1 μg). The fish were subsequently permitted to feed for a prescribed period of time. Each experiment was run in four (exceptionally two) replicates. In order to assess the effect of background contrast, the same protocol was assayed with different background colors (dish's bottom): white, grey and black.

Experiment 2

Three individuals were placed within a polyethylene bag containing 5 l of river water. The bags were

suspended with their mouth open at the surface of a 200 l rectangular tank with opaque blue walls. The purpose of suspending the bags in a larger container was twofold. First, it helped to keep temperature constant during the experiment. Second, it produced a more natural radiation environment by reducing the 'wall' effect: radiation not only reached the fish from the top of the open bag, but also from its sides. The radiation passing through the bag walls (over 96% transmittance in the UV range) was attenuated by the surrounding water. After the acclimation period, 250 *Ceriodaphnia dubia* were added to each bag, and the fishes allowed to feed for 15 min. The experiment was repeated a total of five times, on four different occasions (see Table 1).

Experiment 3

In this experiment, five fishes were allowed to acclimate for 40 min in a 10 l polyethylene bag (transmittance in the UV range over 96%). After the acclimation period, the fish could prey for 30 min on natural zooplankton. In order to provide a variety of natural preys, 100 ml of a concentrated live zooplankton sample from nearby Lake Morenito was added to each bag. The zooplankton contained the following species: *Boeckella gracilipes*, *Mesocyclops araucanus*, *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia* sp. and *Bosmina longirostris*. Their concentration in the bags was sampled before and after each trial, in order to compare it with gut contents.

Results

In the first type of experiment, the number of *Ceriodaphnia* individuals ingested was not significantly different between treatments with and without UV radiation, regardless of the background color (t-test, white bottom: $N = 20$, $p = 0.494$; grey bottom: $p = 0.223$, $N = 16$; and black bottom $p = 0.114$, $N = 8$, Figure 3). Similarly, no significant differences were found between the number of *Ceriodaphnia dubia* ingested with and without UV radiation (Mann-Whitney, $p = 0.755$, $N = 30$) in the second type of experimental design (Figure 4).

In the third type of experiment, the number of prey ingested with and without UV radiation was not significantly different: *Boeckella gracilipes* (t-test, $p = 0.35$, $N = 20$), *Mesocyclops* sp. (t-test, $p = 0.196$, $N = 20$), *Ceriodaphnia dubia* (t-test, $p = 0.58$, $N = 20$).

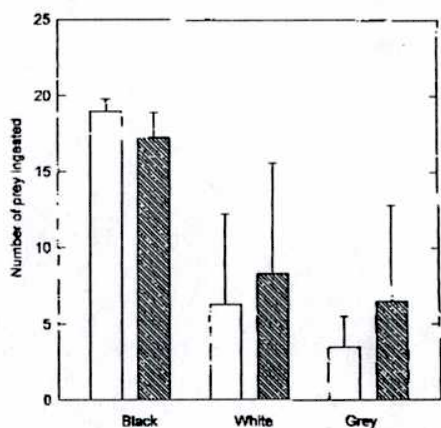


Figure 3. Number of *Ceriodaphnia dubia* ingested by rainbow trout juveniles under the different background colors in the first experiment. With UV = striped bars; without UV = empty bars. Vertical bars are one standard deviation.

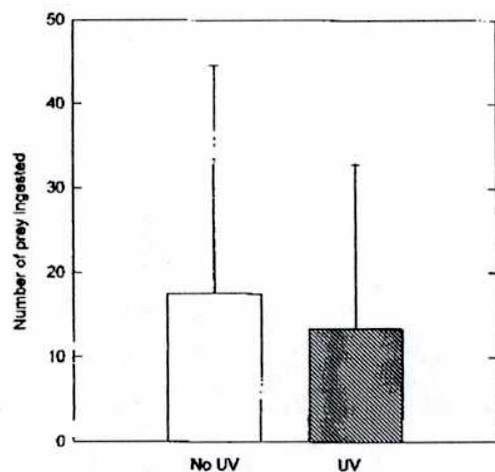


Figure 4. Number of *Ceriodaphnia dubia* ingested by rainbow trout juveniles in the second experiment. With UV = striped bars; without UV = empty bars. Vertical bars are one standard deviation.

Daphnia sp. (Mann-Whitney, $p = 0.52$, $N = 20$) and *Bosmina longirostris* (t-test, $p = 0.22$, $N = 20$) (Figure 5). Overall, the fish consumed more prey in the UV opaque treatment (mean 95 prey) than in the UV transparent (mean 66 prey). This difference, however, was statistically non-significant.

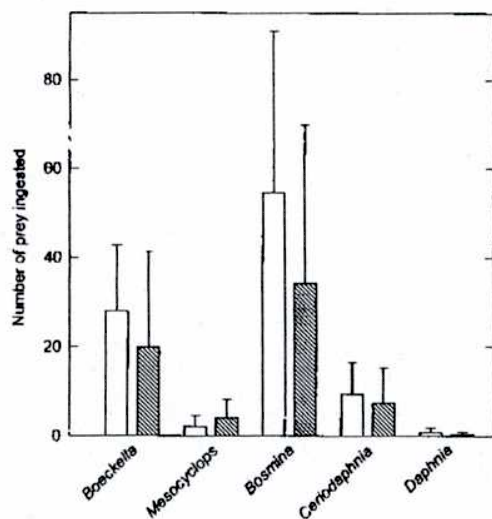


Figure 5. Number of prey ingested by rainbow trout juveniles in the third experiment. With UV = striped bars; without UV = empty bars. Vertical bars are one standard deviation.

Discussion

UV vision has been demonstrated for several species of fishes (Downing et al. 1986, Hawryshyn 1992, Jacobs 1992, Losey et al. 1999), particularly during the early developmental intervals (Bowmaker & Kunz 1987, Browman & Hawryshyn 1992). However the potential function of extended vision into the UV region is still a matter of speculation. In laboratory experiments using monochromatic radiation sources, fish have been shown to use UV wavelengths to successfully locate and capture prey (Loew et al. 1993). Such experiments demonstrated that in the absence of visible light, UVA might help in the detection of prey. Other researchers have used a tungsten lamp in combination with interference filter to obtain two treatments: visible with UV and visible without UV (Browman et al. 1994). Such experiments demonstrated that UV vision might contribute to prey detection at the relatively low levels of visible light delivered by the tungsten lamp. Under natural conditions however, the photon fluxes within the visible region are always orders of magnitude higher than those in the UV region. Thus, one may question if under natural conditions UV radiation does really improve prey detection beyond the resolution levels attained by visible receptors alone. It has been suggested that

under certain circumstances, UV vision may improve the contrast against a bright UV underwater space light (Losey et al. 1999), thus contributing to the detection of highly transparent (to the visible) prey. However, direct evidence that UV vision does actually contribute to increase prey detection under natural conditions is still lacking.

In this study, we found no evidence supporting the claim that UVR enhances prey detection in rainbow trout under the full solar spectrum. The experimental removal of UV wavelengths had no effect on the number of prey eaten or on the preference for particular food items. Admittedly, the conditions in our experiments were not completely natural: the fish were confined to relatively small volumes, and both they and their prey had no possibility of avoiding being exposed to sunlight. But, by using different container shapes and background colors, we attempted to avoid a systematic methodological error. For most experiments we used a single prey type, *Ceriodaphnia dubia*, but in the last experiment we offered the fish a natural mixture of zooplankton prey, encompassing the natural range of size, conspicuity and avoidance behaviors. However, regardless of the particular experimental conditions, we always failed to detect differences in feeding performance between fish exposed vs. not exposed to UVR.

It should be noted that our primary interest is not whether fish can detect UV under particular light conditions, but rather if the presence of UV radiation translates into higher ingestion rates at periods of significant feeding activity. The light levels used in this study correspond to noon conditions in winter, which are similar to early morning conditions during summertime. Such levels coincide with the onset of juvenile trout feeding activity, which have been shown to reach a maximum at noon in summertime (Boisclair 1992). Angradi & Griffith (1990) also found that stomach content of juvenile rainbow trout sharply increased between 10:00 and 12:00 h and that feeding apparently did not occur after twilight. Our study also differs from others in the operational variable chosen to quantify feeding performance. Previous studies used differences in detection field (i.e., reaction distance, location angles) (Browman et al. 1994) or a measure of feeding activity (a prescribed number of strikes) (Loew et al. 1993). Here we used direct counts of prey eaten, by analyzing gut contents or by difference between the initial and final number of prey in each trial. We feel that our choice of the variable is more direct and objective than the ones used previously. In summary, our results do not

disproof the presence of UV vision in juvenile rainbow trout, but they do cast doubts about the ecological significance of ultraviolet radiation in enhancing feeding performance in the natural environment.

Acknowledgements

This work was supported partially by Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Pict No. 01-00002-00066), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) and International Foundation for Science (Grant A/2325-3F). We thank Miguel Battini for his help in the experimental work and Víctor Bucz for providing rainbow trout juveniles.

References cited

- Angradi, T.R. & S.J. Griffith. 1990. Diel feeding chronology and diet selection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Henry's Fork of the Snake River, Idaho. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47: 199-209.
- Boisclair, D. 1992. Relationship between feeding and activity rates for actively foraging juvenile brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49: 2566-2573.
- Howmaker, J.K. & Y.L. Kunz. 1987. Ultraviolet receptors, tetrachromatic colour vision and retinal mosaics in brown trout (*Salmo trutta*): age dependent changes. *Vision Research* 27: 2101-2108.
- Browman, H.I. & C.W. Hawryshyn. 1992. Thyroxine induces a precocial loss of ultraviolet photosensitivity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Teleostei). *Vision Research* 32: 2303-2312.
- Browman, H.I., I. Novales-Flamerique & C.W. Hawryshyn. 1994. Ultraviolet photoreception contributes to prey search behaviour in two species of zooplanktivorous fishes. *J. Exp. Biol.* 186: 187-198.
- Carpenter, K.J. & L. Zhao. 1999. Forgotten mysteries in the early history of vitamin D. *J. Nutri.* 129: 923-927.
- Downing, J.E.G., M.B.A. Djangoz & J.K. Howmaker. 1986. Photoreceptors of a cyprinid fish, the roach: morphological and spectral characteristics. *J. Comp. Physiol. A* 159: 859-868.
- Elliott, J.M. 1975a. The growth of brown trout (*Salmo trutta* L.) fed on reduced rations. *J. Anim. Ecol.* 44: 823-842.
- Elliott, J.M. 1975b. The growth rate of brown trout, *Salmo trutta* L., fed on maximum rations. *J. Anim. Ecol.* 44: 805-821.
- Elliott, J.M. 1975c. Number of meals in a day, maximum weight of food consumed in a day and maximum rate of feeding for brown trout, *Salmo trutta* L. *Freshwater Biol.* 5: 287-303.
- Farman, J.C., B.G. Gardiner & J.D. Shanklin. 1985. Large losses of total ozone in the Antarctica reveal seasonal ClOx/NOx interaction. *Nature* 315: 207-210.
- Häder, D.-P., R.C. Worrest, H.D. Kumar & R.C. Smith. 1995. Effects of increased solar ultraviolet radiation on aquatic ecosystems. *Ambio* 24: 174-180.
- Hawryshyn, C.W. 1992. Polarization vision in fish. *Amer. Sci.* 80: 164-175.
- Jacobs, G.H. 1992. Ultraviolet vision in vertebrates. *Amer. Zool.* 32: 544-554.
- Loew, E.R., W.N. McFarland, E.L. Mills & D. Hunter. 1993. A chromatic action spectrum for planktonic predation by juvenile yellow perch, *Perca flavescens*. *Can. J. Zool.* 71: 384-386.
- Loew, E.R., T.W. Cronin, T.H. Goldsmith, D. Hyde, N.J. Marshall & W.N. McFarland. 1999. The UV visual world of fishes: a review. *J. Fish Biol.* 54: 921-943.
- Madronich, S. 1994. Increases in biologically damaging UV-B radiation due to stratospheric ozone reductions: a brief review. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 43: 17-30.
- Martin, G.G., C. Speckmann & S. Beidler. 2000. Photobehavior of the harpacticoid copepod *Tigriopus californicus* and the fine structure of its nauplius eye. *Invert. Biol.* 119: 110-124.
- Richle, M.D. & J.S. Griffith. 1993. Changes in habitat use and feeding chronology of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fall and the onset of winter in Silver Creek, Idaho. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 2119-2128.
- Smith, K.C. & E.R. Macagno. 1990. UV photoreceptors in the compound eye of *Daphnia magna* (Crustacea: Branchiopoda). A fourth spectral class in single ommatidia. *J. Comp. Physiol. A* 166: 597-606.
- von Frisch, K. 1967. The dance language and orientation of bees. Belknap Press, Cambridge. 580 pp.
- Wehner, R. 1992. Homing in arthropods. pp. 45-144. In: D.R. Papaj (ed.) *Animal Homing*. Chapman & Hall, London.
- Worrest, R.C. 1986. The effect of solar UV-B radiation on aquatic systems: an overview. pp. 175-191. In: J.G. Titus (ed.) *Effects of Changes in Stratospheric Ozone and Global Climate*. U.S.E.P.A., Washington D.C.

Ultraviolet damage and counteracting mechanisms in the freshwater copepod *Boeckella poppei* from the Antarctic Peninsula

Vanina E. Rocco

Laboratorio de Fotobiología, Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina

Oscar Oppezzo and Ramón Pizarro

Comisión Nacional de Energía Atómica, Departamento de Radiobiología, Av General Paz 1499, 1650 Buenos Aires, Argentina

Ruben Sommaruga

Institute of Zoology and Limnology, University of Innsbruck, Technikerstr. 25, 6020 Innsbruck, Austria

Marcela Ferraro

Laboratorio de Fotobiología, Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, Argentina

Horacio E. Zagarese¹

Laboratorio de Fotobiología, Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, U.P. Universidad, 8400 Bariloche and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina

Abstract

The process of ozone depletion over the Antarctic continent has resulted in the increase of incident ultraviolet-B (UVB) radiation, whose effects may be damaging to living organisms. To counteract the negative effects of ultraviolet radiation (UVR), aquatic organisms may display one or more strategies: (1) avoidance (i.e. deep distribution); (2) photoprotection through the use of "sunscreen" compounds, such as mycosporine-like amino acids (MAAs); and (3) enzymatic repair of the damage. The effects of UVR were assessed on four populations of the copepod *Boeckella poppei* from Antarctic lakes using laboratory and field experiments. The results were related to measurements of DNA enzymatic repair activity and MAA concentration. This is the first study that combines these measurements in zooplankton. *Boeckella poppei* was highly tolerant to UVR ($LD_{50} = 2.2\text{--}2.78 \text{ J cm}^{-2}$). However, measurements of photorecovery (comparison of UVB mortality in the presence and absence of photoreactivating light) and dosage of photolyase activity indicated low rates of enzymatic repair, which may be the result of low temperatures typical of Antarctic lakes. Three different MAAs were identified, both in phytoplankton and copepods: porphyra-334, mycosporine-glycine, and shinorine. The population of *B. poppei* from Lake Boeckella had the lowest MAA concentration, as well as the lowest tolerance to artificial and natural UVR. These findings support the idea that UV tolerance in this species is related to the accumulation of MAAs. A comparison of the strategies used to cope with potentially damaging levels of UVR by different species of *Boeckella* indicates a high degree of plasticity in this genus, which has probably been key for its success to colonize a wide range of UV environments.

The thinning of the ozone layer over the Antarctic continent (Farman et al. 1985) resulted in substantial increases in ground level fluxes of ultraviolet radiation, particularly within the ultraviolet-B (UVB) region (290–320 nm) of the solar spectrum. Many studies have documented the inhibi-

tory effect of enhanced ultraviolet radiation (UVR) on marine organisms from Antarctic waters (Vernet and Kozlowski 2001). However, fewer studies have assessed the effect of UVR on freshwater organisms from Antarctic lakes (Cabrera and Pizarro 1994; Kepner et al. 2000).

Aquatic organisms have evolved three basic strategies to counteract the negative effects of solar UVR (Zagarese and

¹ Corresponding author.

Acknowledgments

We thank Guillermo Tell and Irina Izaguirre from the group of limnology at FCEyN (Universidad de Buenos Aires) and the Instituto Antártico Argentino for their kind invitation to participate in the research project at Hope Bay. Special thanks to Haydée Pizarro, Rodrigo Sinistro, Mayor Drews, Mario Pérez Cometo, Adrian Claude, Raúl Acosta, Mr. Montiel, and the rest of the crew at Esperanza Station for their support. Don Morris from Lehigh University performed the DOC analysis, and Adrián Inchaurrea from

CRUB-UNC provided technical advice on radiation measurements. This research was supported by Universidad Nacional del Comahue (Proyecto B940), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de Argentina (PICT 01-00002-00066), International Foundation for Science (grant H/2325-2), InterAmerican Institute for Global Change Research (CRN-016), and Instituto Antártico Argentino. Analyses of mycosporine-like amino acids were done within the framework of a project granted by the Austrian Science Foundation (FWF grant I4153-BIO) to R.S.

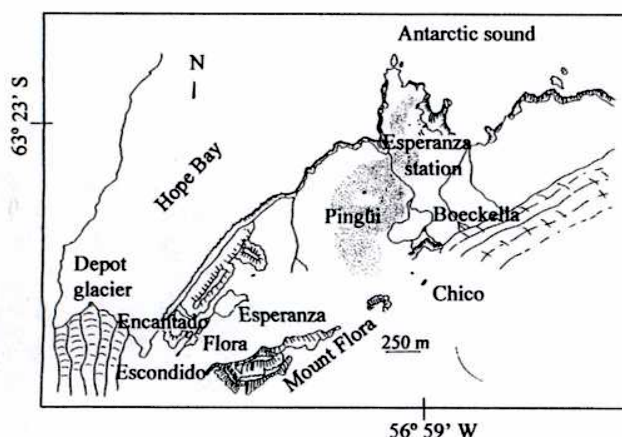


Fig. 1. Site map showing the location of the studied lakes.

Williamson 1994). In many instances, the organisms may avoid being exposed to damaging fluxes of UVR by remaining deep in the water column during the day. Such an avoidance strategy may not be feasible in cases where the waterbody is relatively shallow and the water is highly transparent to UVR. Strong vertical mixing of the water column driven by wind-induced turbulence is an additional factor that may lower the effectiveness of the avoidance strategy (Zagarese et al. 1998). Preliminary search of the available literature on lakes located in the Antarctic Peninsula (Izaguirre et al. 1998) suggested that they are in fact highly exposed to UVR due to the combined effects of shallowness, transparency, and exposure to extremely strong winds.

A second mechanism to cope with high UVR exposure is the synthesis or acquisition of UV-protective compounds that act either as UV sunscreens or as antioxidants. Among these compounds, the so-called mycosporine-like amino acids (MAAs) are widespread among benthic and planktonic marine organisms (Roy 2000). MAAs are water-soluble compounds having high absorption efficiency in the UV range (absorption maxima 309–360 nm). Recently, MAAs have also been found in freshwater copepods and rotifers, but not in cladocerans (Sommaruga and Garcia Pichel 1999; Tartarotti et al. 2001).

The last line of defense against UVR exposure consists in repairing the damage after it has occurred. By far, the most common type of DNA damage induced by ultraviolet-C (UVC) and UVB is the formation of cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts (Friedberg et al. 1995). These lesions block DNA replication and transcription leading to mutagenic or lethal effects. Living organisms have evolved a specific mechanism for the repair of pyrimidine dimers, called photoreactivation. This mechanism involves a single enzyme (photolyase), which directly reverses the pyrimidine dimers into the two pyrimidine nucleotides by using the energy of near ultraviolet and visible light (Todo et al. 1993; Friedberg et al. 1995). Photolyase activity is widely distributed in nature, and photoreactivation has been found in members of all kingdoms of life. Nevertheless, this mechanism is absent in many species (Sancar 1994).

This paper reports on the mechanisms used by *Boeckella poppei* to cope with increased levels of UVR in shallow freshwater lakes located in the Antarctic Peninsula. The genus *Boeckella* has a circumpolar distribution (Menu Marque et al. 2000) and is one of the dominant species in lakes from Australasia, Antarctica, and South America.

Materials and methods

The study area includes several freshwater lakes and ponds near Base Esperanza (Argentina) in the Antarctic Peninsula at Hope Bay (63°S, 57°W; Fig. 1). These waterbodies (hereinafter referred to as "lakes" for simplicity) are covered by a thick layer of ice and snow during most parts of the year. Light conditions below the ice cover are dim (Kepner et al. 2000), but after ice-break, the organisms are suddenly exposed to higher UVR and long photoperiods. Thus, even if the instantaneous fluxes of UVR are not too high, the total dose may be high because of the duration of the daylight (Merilä et al. 2000). A group of seven lakes were sampled during summer 2000 (Table 1). UV exposure experiments were performed on copepods from four lakes (Boeckella, Chico, Esperanza, and Flora).

Ground-level solar radiation was measured during the study period using an IL-1700 radiometer (International

Table 1. Summary of characteristics of the studied lakes. Values of lake altitude, maximum depth, and temperature are from Izaguirre et al. (1998).

	Boeckella	Chico	Encantado	Escondido	Esperanza	Flora	Pingüi
Altitude (m a.s.l.)	49	100	55	50	52	52	20
Maximum depth (m)	4	5.5	~1	~1	4.8	7	~1
Surface temperature (°C)	0.5–4.7	0–2.5	0–10.9	0–1.1	0.3–11.1	0–6.4	0–17
K_d PAR (m^{-1})	4.4	0.96	7.1	2.22	na	na	na
K_d UVA (m^{-1})	7.24	1.44	0.74	2.99	0.92	0.64	na
a_d at 320 nm (m^{-1})	1.39	0.91	0.72	0.42	0.67	0.42	102.63
a_d at 380 nm (m^{-1})	0.68	0.46	0.27	0.18	0.32	0.18	46.1
DOC ($mg L^{-1}$)	0.68	0.48	0.87	0.48	0.48	0.38	41.9
Chl <i>a</i> ($μg L^{-1}$)	0.30	0.78	0.31	0.46	0.27	na	2,403.5
Seston MAA ($μg L^{-1}$)	0.0016	0.027	na	na	0.009	0.0058	na
MAA/Chl <i>a</i> ($μg μg^{-1}$ Chl <i>a</i>)	0.0053	0.035	na	na	0.034	na	na
Occurrence of <i>Boeckella poppei</i>	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No

Light) equipped with four sensors (PAR, UVA, UVB, and actinic). In situ underwater measurements of solar radiation were taken using the IL-1700 radiometer (for a detailed description of the instrument see Kirk et al. 1994). The diffuse attenuation coefficient (K_d) was calculated as the slope of the relationship $\ln(\text{irradiance})$ versus depth (m^{-1}). Concurrent with field optical data, samples of water were collected for chemical and optical analyses. Chlorophyll *a* (Chl *a*) was determined by the spectrophotometric method of Nusch (1980) and Marker et al. (1980). Briefly, samples were filtered onto Whatman GF/F filters and the pigments were extracted with hot 90% ethanol. Correction for pheopigments was performed by acidification with 0.1 N HCl. The same filtering protocol was used for the collection of seston samples for MAA analysis (see below). Dissolved organic carbon (DOC) concentration was measured by the high-temperature Pt catalyst oxidation method (Shimadzu TOC-5000) following the recommendations of Sharp (1993). Spectrophotometric absorption coefficients (a_d) of filtrated samples (Sterivex, 0.22- μm filters) were determined every 1 nm from 250 to 750 nm using 1- or 10-cm quartz (Suprasil) cuvettes and a Hewlett-Packard 8453 spectrophotometer. These measurements were referenced against deionized distilled water. Absorption coefficients were calculated as $a_d = \ln(10^A)$ and reported for a 1-m path (m^{-1}) at 320 and 380 nm.

Zooplankton was collected using a 55- μm -mesh plankton net. *Boeckella poppei* individuals were counted and sorted under a dissecting scope. Samples were preserved in 4% formalin for taxonomic identification. In addition, a prescribed number of individuals were stored at $-20^\circ C$ for MAA analysis and photolyase activity determinations (see below).

To determine the presence of UV-absorbing compounds in *B. poppei*, 100 individuals were extracted in 20% aqueous methanol (v/v; MeOH) for 2 h in a water bath at $45^\circ C$ (García Pichel and Castenholtz 1993; Sommaruga and García Pichel 1999). The extracts were scanned in a diode array, UV-visible (UV-Vis) spectrophotometer (Hewlett-Packard 8453) between 250 and 750 nm using a 1-cm-pathlength quartz cuvette. For further characterization of the MAAs, freeze-dried samples were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). These samples (i.e., GF/F filters containing MAAs in seston and copepods) were extracted three times consecutively as described above. In the case of copepods, two replicates of 30 individuals each were extracted. The extracts from the three extractions were pooled and subsequently evaporated to dryness under vacuum in 2-ml eppendorf microcentrifugation tubes, using a SpeedVac concentrator (Savant) at $45^\circ C$. Afterwards, MAA analysis, identification, and quantification was as described in Tartarotti et al. (2001), except that a Phenomenex C-8 column (5- μm pore size, 4.6 mm i.d. $\times$ 25 cm) protected with a Brownlee RP-8 guard column and a diode array detector (Dionex) were used. Samples were run with a mobile phase of 0.1% acetic acid in 25% or 55% aqueous MeOH (v/v). Concentrations of MAAs were normalized to the dry weight of zooplankton, which was estimated by the relationship between body length and dry weight calculated for this species (Paggi 1983).

The activity of DNA photolyase was assessed by measur-

ing the light-dependent loss of thymine containing pyrimidine dimers from UV-irradiated DNA. DNA was obtained from *Escherichia coli* B3 grown in a medium supplemented with [methyl- 3H]-thymidine (Johnson 1994). After extraction, the radiolabeled DNA was exposed to UVC (254 nm, $8.4 kJ m^{-2}$) and used as substrate. The organisms under study were suspended in 2×10^{-2} M tris-(hydroxymethyl)-aminomethane/HCl pH 7.4, 10^{-1} M NaCl, 10^{-3} M ethylenediamine tetraacetic acid, 10^{-2} M dithiothreitol, and 10^{-3} M phenylmethylsulfonylfluoride and disrupted by ultrasonic treatment; debris was eliminated by centrifugation. Substrate was added to the extracts, and the mixtures were exposed to the radiation emitted by a Philips TDL 18W/08 tube and a Narva LT18W/010 SS tube at room temperature. To measure the content of pyrimidine dimers during incubation, DNA was obtained from the reaction mixtures by phenol extraction and ethanol precipitation, hydrolyzed as described by Carrier and Setlow (1971) and analyzed by reversed-phase HPLC following Niggli and Cerutti (1982). The enzyme activity was calculated from the data according to the method described by Cook and Worthly (1972).

The tolerance of *B. poppei* to artificial UV radiation was assessed using two experimental designs: dose response at a set end point and time-to-death (Newman 1995). The copepods were collected from the lakes within 72 h prior to the experiments and kept in the dark at $4^\circ C$ on unfiltered lake water. The experiments were run using water from the original lakes containing natural seston as food.

For the assays that measured dose response at a set end point, the experimental unit consisted of 30 individuals that were placed in 5-cm-diameter petri dishes covered with quartz lids. The dishes were placed on a turntable to obtain a uniform dose inside a thermally isolated box between 1 and $5^\circ C$. The UV source, located at 26 cm above the turntable, was a Spectrolite XX15-B fluorescent lamp (Spectronics Corp.) covered with a new sheet of cellulose diacetate to remove wavelengths shorter than ~ 295 nm (for description of the spectrum, see Zagarese et al. 1997). Four UV irradiance treatments (93, 76, 57, and 20% of full exposure [$=60.2 \mu W cm^{-2}$]) and a dark control were assayed on each experiment. The different irradiance treatments were obtained by covering the dishes with a variable number of layers of neutral-density filters (plastic window screen). Each treatment was run in three replicates. Initially, three different exposure times (6, 10, and 14 h) were assayed to obtain a wide range of mortality rates, but as we gained experience with this species, an appropriate exposure duration could be chosen with fewer trials. The total number of experiments and their exposure duration were as follows: Lake Boeckella, 1×6 h (i.e., one experiment of 6 h exposure) and 2×10 h; Lake Chico, 1×6 h, 1×10 h, and 1×14 h; Lake Esperanza, 1×10 h; and Lake Flora, 1×14 h. However in Fig. 2 and the statistical analysis, all results for the same lake were combined because exposure duration did not significantly affect the mortality versus dose response (multiple linear regression using logit-transformed mortality as dependent variable, UVB dose as a continuous independent variable, and exposure duration as a categorical independent variable). The copepods were kept in the dark until 24 h after the beginning of UV exposure (i.e., 18, 14, or 10 h depend-

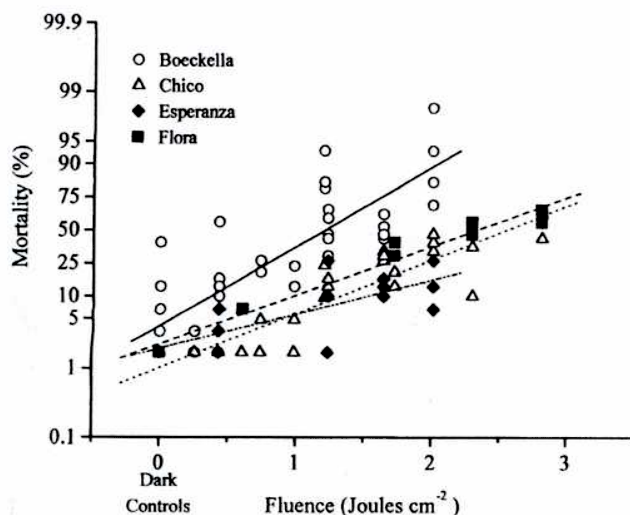


Fig. 2. Mortality versus dose curves for populations of *B. poppei* from different lakes exposed to UVB in the absence of recovery radiation. Note the logit scale of the y-axis. The lines were fitted by linear regression of logit-transformed mortality versus UVB fluence.

ing on UV exposure duration). During the following 24 h, the copepods were exposed to a 14:10 light:dark (LD) photoperiod. The number of survivors was counted after 48 h from the start of exposure.

To assess the potential effect of photorecovery, similar experiments were run in which the copepods were exposed simultaneously to UVR and photoreactivating (visible) light. In all cases, irradiation with visible light was done in a 14:10 LD photoperiod, starting at the same time as the UV exposure. The white light source (YZEL TL301411 W) irradiance was $1.094 \times 10^{-3} \mu\text{E cm}^{-2} \text{s}^{-1}$. For additional details of the experimental protocol, see Zagarese et al. (1997). The total number of experiments and their exposure duration were as follows: Lake Boeckella, 1×10 h (i.e., one experiment of 10 h exposure); Lake Chico, 1×10 h and 1×14 h; and Lake Flora, 1×14 h. The dose modification factor (DMF) was calculated as the quotient between the LD_{50} obtained in experiments in the presence and absence of recovery radiation. The LD_{50} values were calculated by linear regression of logit-transformed mortality rates versus UVB dose.

Two different sets of time-to-death experiments were performed. The first used an artificial source of UVB radiation, whereas the second used natural solar radiation. The experiment using artificial radiation started on 14 March 2000. It was run in a thermally isolated box between 1 and 5°C . The radiation sources and experimental conditions were the same as described above. The cellulose diacetate sheet was replaced daily to avoid photodegradation. The copepods were collected from Lakes Chico, Boeckella, and Flora 2 d before the beginning of the experiment. Each experimental unit consisted of 30 copepods placed in a petri dish (5 cm diameter), which was covered with a quartz lid. The animals were exposed daily to UV irradiance ($55.8 \mu\text{W cm}^{-2}$) and photoreactivating light (irradiance = $1.094 \times 10^{-3} \mu\text{E cm}^{-2}$

s^{-1}) for a period of 6 h. Exposure to photoreactivating light continued for an additional period of 8 h after UV exposure to extend the period of potential photorepair beyond the finalization of UV exposure. Two different treatments were assayed for each lake: (1) UV-exposed (covered with quartz lids) and (2) dark controls (covered with aluminum foil). Each combination (lake $\times$ treatment) had three replicates. The number of survivors was recorded daily, immediately after UV irradiation. Daily doses were calculated from measurements of the lamp made with the IL-1700 radiometer.

The experiment using natural radiation was performed outdoors with individuals from Lakes Boeckella, Chico, and Esperanza. Thirty individuals were placed in quartz tubes (20 cm long, 1.7 cm diameter). One end of the tubes was closed with a silicon stopper, and the other end was covered with a 20- μm mesh gauze to allow diffusion of oxygen. Two treatments were run for each lake: (1) a full solar spectrum (quartz) and (2) a no-UV control (i.e., solar spectrum without the UV component, covered with UV-opaque acrylic with $<1\%$ transmittance below 374 nm). Each combination (lake $\times$ treatment) has four replicates. A rectangular tank ($1 \times 0.6 \times 0.4$ m), whose walls were thermally isolated with a 15-cm layer of Styrofoam, was used as a water bath to incubate the tubes. The tank, filled with unfiltered water from Lake Boeckella, had an east-west alignment. In order to maximize solar exposure, the tubes were arranged just below the surface on the south side. The experiment started on 1 March 2000. The organisms were exposed daily during daytime hours and covered with a thermal isolating lid at night to avoid freezing. On few occasions of extremely cold temperatures, the tubes had to be kept inside the laboratory. Survivors were recorded daily at dusk. The experiment ended 19 March. The daily doses were calculated from radiation measurements as above.

Results

The lakes included in this study are relatively small and shallow (max. depth: 7 m) and occur at low elevation (<100 m a.s.l.). They are regularly exposed to very strong winds. For example, about 50% of the days during the study period had wind speeds above 70 km h^{-1} , and the maximum value during the study was 144 km h^{-1} . The lakes vary greatly in water transparency (K_d and a_d), Chl *a*, and DOC concentration (Table 1). The presence of MAAs in seston samples was confirmed in all the lakes assayed.

The copepod *B. poppei* occurred only in five out of the seven surveyed lakes (Boeckella, Chico, Encantado, Esperanza, and Flora). This species was highly tolerant to UVR exposure, as indicated by the LD_{50} values obtained for acute exposure to artificial UVR in the absence of photorecovery radiation (range: 1.18 – 2.47 J cm^{-2}), and in the presence of recovery radiation (range: 2.2 – 2.78 J cm^{-2} , Table 2). The individuals from Lake Boeckella exhibited the lowest tolerance to UVR exposure. Such a trend was consistent in the set-end-point exposure experiments (Fig. 2, Table 2; analysis of variance [ANOVA] $P < 0.001$), in the time-to-death experiments with artificial UVB radiation (Fig. 3, Table 2; repeated measures ANOVA $P < 0.001$), and in the time-to-

Table 2. Mean (SE) values of body length, dry weight, MAA concentration and optical density (OD) of aqueous methanolic extracts, photolyase activity, lethal doses with and without photoenzymatic repair (PER), and dose modification factor (DMF) for populations of *B. poppei* from five Antarctic lakes.

	Boeckella	Chico	Encantado	Esperanza	Flora
Length (mm)	1.88(0.027)	1.81(0.035)	1.75(0.028)	1.69(0.029)	1.77(0.028)
Dry weight (μg)*	55.2	46.8	42.9	39.3	44.4
MAAs (% dry wt)	0.02(0.0004)	0.11(0.006)	na	0.05(0.0003)	na
OD mean 335–338 per 100 individuals	0.099(0.006)	0.26(0.007)	0.11	0.26	0.14
Photolyase activity (h^{-1})	b.d.l.	b.d.l.–0.24	b.d.l.	b.d.l.	b.d.l.
LD ₅₀ without PER (J cm^{-2})	1.18(0.07)	2.28(0.10)	na	2.47(0.35)	2.28(0.11)
LD ₅₀ with PER (J cm^{-2})	2.2(0.12)	2.78(0.16)	na	na	2.55(0.13)
DMF	1.86	1.24	na	na	1.11
Time-to-death (artificial radiation) LD ₅₀ (J cm^{-2})	2.4(0.04)	4.9(0.11)	na	na	4.3(0.04)

* Estimated from the weight versus length relationship (Paggi 1983). b.d.l., Below detection limit.

death experiment with natural radiation (Fig. 4; repeated measures ANOVA $P < 0.001$). Long-wave UVA (over 374 nm) or even visible light could have been partly responsible for the high mortality observed in the no-UV controls, particularly in the individuals from Lake Boeckella.

Overall, the presence of photoreactivating light resulted in a significant increase in survival (ANOVA $P < 0.001$). However, the DMF always ranged between 1.11 and 1.86. (Such values may be considered modest when compared to species with higher photoreactivation capabilities, which usually display DMF higher than 4.) In addition, the activity of the enzyme photolyase was low and could only be detected in one sample from Lake Chico (Table 2).

Spectrophotometric scans of methanolic extracts of copepods from the different lakes revealed the presence of UV-absorbing compounds with absorption peaks between 335 and 338 nm (Fig. 5). The optical density at peak was lowest in copepods from Lake Boeckella (Table 2). The HPLC analysis confirmed the presence of three MAAs, which were de-

tected both in phytoplankton and copepod samples (porphyra-334, mycosporine glycine, and shinorine, Fig. 6). The highest concentration corresponded to porphyra-334. The concentration of total MAAs was also lowest in copepods from Lake Boeckella (Table 2).

Discussion

The tolerance to UVR has been estimated previously for a few other species of the genus *Boeckella* using the same radiation source and similar experimental protocols. From a comparison of LD₅₀ estimates (Table 3), *Boeckella poppei* stands out as a highly tolerant species. For example, the LD₅₀ values measured in the absence of photorecovery radiation rank among the highest of the genus. On the other hand, in the presence of photorecovery radiation, only *B. antiqua* displayed higher tolerance. Such results suggest that *B. poppei*

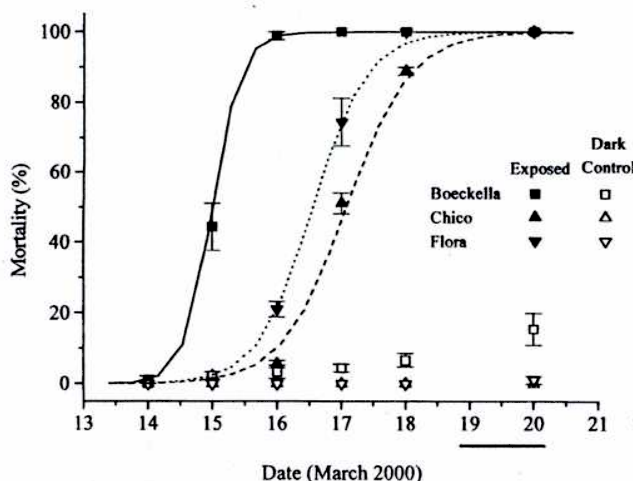


Fig. 3. Time-to-death experiment of copepods exposed simultaneously to artificial UVB and visible radiation. The horizontal line under the x-axis indicates days (19–20 March) on which the copepods were not exposed to artificial UVR. The lines were fitted by linear regression of logit-transformed mortality versus time.

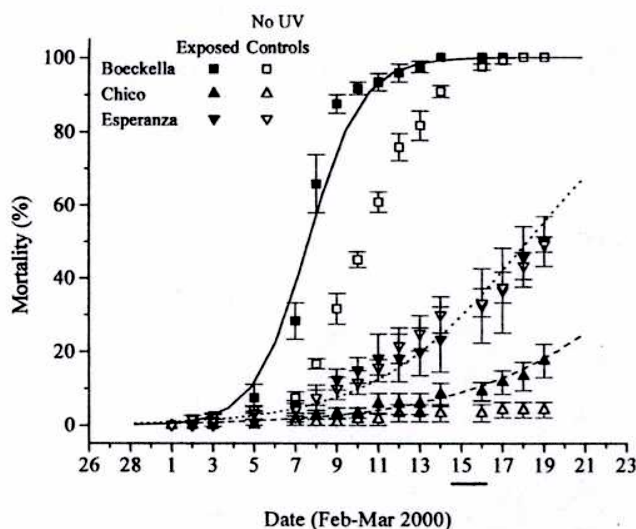


Fig. 4. Time-to-death experiment of copepods exposed to natural solar radiation. The horizontal line under the x-axis indicates days (15–16 March) on which the copepods were not exposed to natural UVR. The lines were fitted by linear regression of logit-transformed mortality versus time.

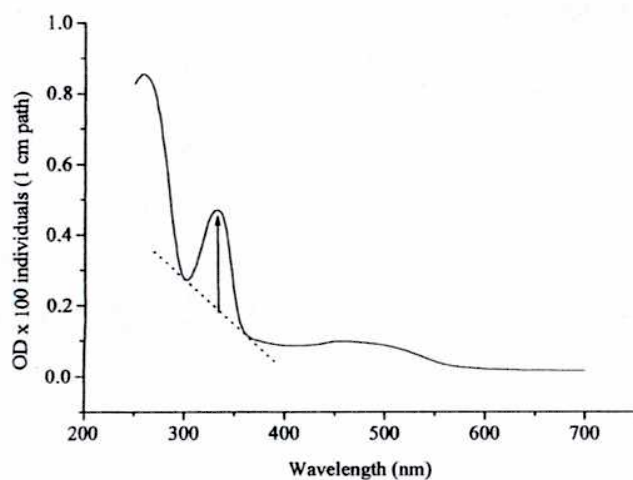


Fig. 5. Spectrophotometric scan of an aqueous methanolic (20%) extract of 100 individuals of *B. poppei* from Lake Chico. OD, optical density measured on a 1-cm cuvette. The height of the arrow corresponds to the estimated OD after subtraction of the baseline (dotted line).

routinely experiences high doses of solar radiation in its natural habitats, indicating that the avoidance strategy may not be feasible, or at least not reliable. As already mentioned, this result was anticipated on the grounds of preliminary information suggesting that the Antarctic lakes included in this study were relatively transparent and shallow (Table 1) and highly exposed to the strong winds typical of those latitudes.

Interestingly, the potential for photorepair was minimal in all studied lakes. Although the presence of visible light resulted in statistically significant lower mortality (ANOVA, $P < 0.001$, data not shown), the increase in tolerance was relatively low (DMFs ranging from 1.11 to 1.86) when compared to species with strong photorecovery capabilities. These values are comparable to that of *B. gracilipes*, a species with almost negligible photorecovery capacity (Zagarese et al. 1997). In contrast, the DMFs for species with significant photorecovery are typically >4 (Siebeck and Böhm 1991; Zagarese et al. 1997). Moreover, although the presence of photolyase could be demonstrated in one of the samples, its activity ranged from low to undetectable (Table 2). Collectively, these two findings indicate a very low capacity for photorepair in *B. poppei*.

The presence of screening compounds in seston samples and copepods was confirmed in all the studied lakes. Furthermore, three MAAs could be identified by HPLC analysis

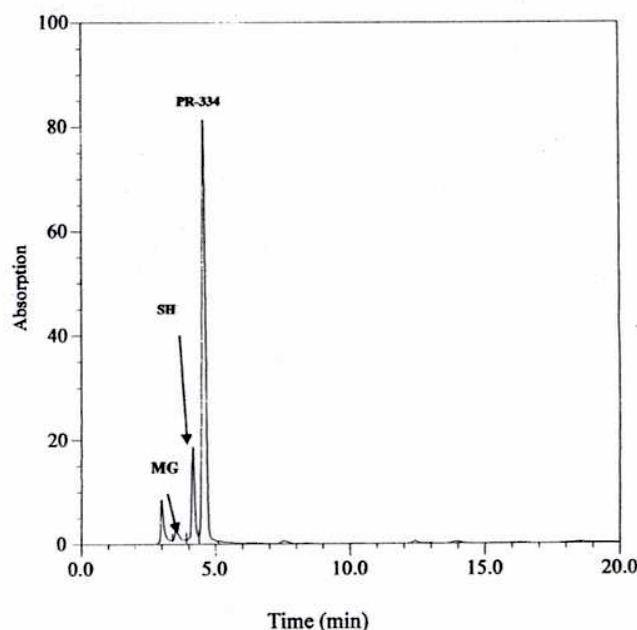


Fig. 6. HPLC chromatogram from an aqueous methanolic extract of *B. poppei* from Lake Chico. MG, mycosporine-glycine; SH, shinorine; PR-334, porphyra-334.

(i.e., porphyra-334, shinorine, and mycosporine glycine). The results suggest a direct relationship between UVR tolerance and MAA concentration in *B. poppei*, since the individuals from Lake Boeckella showed lower tolerance and lower MAA concentration than their conspecifics from the other lakes (Table 2). A similar relationship has been observed in another species of this genus (*B. titicacae*) from Lake Titicaca (16°S, 68°W, 3,810 m a.s.l.; Helbling et al. in press), suggesting that the accumulation of MAAs is a frequent response to UV exposure within the genus *Boeckella*.

Significant differences in the tolerance to UVR were detected between copepod populations from different lakes. As already mentioned, the copepods from Lake Boeckella were consistently less tolerant to UVR than the individuals from the other lakes (Figs. 2–4). This result may be the consequence of the higher UV attenuation and, presumably, lower UV exposure in Lake Boeckella (Table 1).

Out of the three possible strategies to cope with potentially damaging doses of UVR (i.e., avoidance, photoprotection, and repair), only the presence of photoprotection could be demonstrated in the populations of *B. poppei* from the studied Antarctic lakes. A priori, avoidance appeared as an

Table 3. Comparison of LD₅₀ values with and without photoenzymatic repair (PER) for several *Boeckella* species.

Species	LD ₅₀ (J cm ⁻²)		Habitat	Location	Source
	Without PER	With PER			
<i>B. antiqua</i>	1.8	>3.9	Shallow temporary ponds	Patagonian steppe	Zagarese et al. 1997
<i>B. gibbosa</i>	0.11	0.83	Clear mountain lakes	Northwestern Patagonia	Zagarese et al. 1997
<i>B. gracilipes</i>	0.13	0.13	Foothill lakes	Northwestern Patagonia	Zagarese et al. 1997
<i>B. poppei</i>	1.18–2.47	2.20–2.78	Antarctic lakes and ponds	Antarctic Peninsula	This study

unlikely strategy in these shallow and transparent environments regularly exposed to strong winds (up to 144 km h^{-1}). This prediction received further support from the exposure experiments that revealed high tolerance to UVR.

The low photorecovery capacity and low levels of photolyase activity indicates a rather limited use of repair mechanisms. An explanation for this may be related to the low temperatures prevailing in Antarctic lakes, which may limit the efficiency of enzymatic repair mechanisms. The same explanation has been offered to explain the low levels of photo enzymatic repair in bacterioplankton (Huot et al. 2000) and algae (Pakker et al. 2000) from cold environments. Photolyase binds to CPDs in DNA in a light-independent step. After absorbing a near-UV or visible photon, it splits the cyclobutane ring to restore the pyrimidines. Early studies demonstrated the influence of temperature on this process. The specific binding of yeast photolyase to damaged DNA was found to be impaired when assayed at 5°C instead of 37°C (Harm and Rupert 1970). Moreover, the rate of the light-dependent step for this enzyme decreases considerably when the reaction takes place at temperatures below -2°C (Harm 1969). These observations suggest that repair of DNA damage by photoreactivation would be limited at low temperatures. Similarly, a reduced efficiency of dimer removal by photoenzymatic repair was found at low temperatures in several biological systems, including a *phrB* mutant of *Escherichia coli* K12 (Dorrell et al. 1995), *Halobacterium cutirubrum* (Eker et al. 1991), cotyledons of *Cucumis sativus* (Takeuchi et al. 1996), fin and skin tissues of *Fundulus heteroclitus* (Malloy et al. 1997), and *Palmaria palmata*, for which photoreactivation effectiveness was almost negligible at 0°C compared to that found at 15 or 25°C (Pakker et al. 2000).

The results from this study indicate that the presence of photoprotective compounds may be the most efficient strategy in highly exposed habitats under low ambient temperatures. These results are consistent with the existence of a direct relationship between water transparency and MAA concentration, such as that found for populations of the copepod *Cyclops abyssorum* in mountain lakes of the Alps (Tartarotti et al. 2001). Moreover, they are also consistent with a direct relationship between MAA concentration and UVR tolerance, such as that found for several different kinds of organisms (Adams and Shick 1996), and particularly for another species of the genus *Boeckella* (i.e., *B. titicacae*; Helbling et al. 2002). Moreover, the postulated low efficiency of the enzymatic repair mechanisms at low temperatures may contribute to explain the inverse relationship between the concentration of photoprotective compounds and temperature (Byron 1982).

This study also confirms the tremendous plasticity of the genus *Boeckella* to cope with UVR under different environmental scenarios. For example, *B. poppei* from Antarctic lakes appear to rely almost exclusively on photoprotection, whereas *B. gibbosa* from high elevation lakes in the Andes depend fundamentally on photorepair (Zagarese et al. 1997) and *B. gracilipes*, which is highly sensitive, depend exclusively on avoidance by remaining deep in the water column of foothill lakes. Yet, other species, such as *Boeckella anti-gua* (previously identified as *B. brevicaudata*), seem to take

advantage of a combination of mechanisms (i.e., photoprotection and photorepair; Zagarese et al. 1997). The varied strategies to cope with UV radiation displayed by the genus *Boeckella* has probably been key to its success at colonizing a great variety of UV environments, ranging from large oligotrophic lakes to ephemeral pools, and from sea level to high-elevation habitats (Menu Marque et al. 2000).

References

- ADAMS, N. L., AND J. M. SHICK. 1996. Mycosporine-like amino acids provide protection against ultraviolet radiation in eggs of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Photochem. Photobiol.* 64: 149–158.
- BYRON, E. R. 1982. The adaptive significance of calanoid copepod pigmentation: A comparative and experimental analysis. *Ecology* 63: 1871–1886.
- CABRERA, S., AND G. PIZARRO. 1994. Changes in chlorophyll *a* concentration, copepod abundance and UV and PAR penetration in the water column during the ozone depletion in Antarctic Lake Kitiash, 1992. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 43: 123–134.
- CARRIER, W. L., AND R. B. SETLOW. 1971. The excision of pyrimidine dimers. (The detection of dimers in small amounts). *Methods Enzymol.* 21: 230–237.
- COOK, J. S., AND T. E. WORTHY. 1972. Deoxyribonucleic acid photoreactivating enzyme. A quantitative chemical assay and estimation of molecular weight of the yeast enzyme. *Biochemistry* 11: 388–393.
- DORRELL, N., D. J. G. DAVIES, AND S. H. MOSS. 1995. Evidence of photoenzymatic repair due to the *phrA* gene in a *phrB* mutant of *Escherichia coli* K12. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 28: 87–92.
- EKER, A. P. M., L. FORMENOY, AND L. E. A. DE WIT. 1991. Photoreactivation in the extreme halophilic archaeobacterium *Halobacterium cutirubrum*. *Photochem. Photobiol.* 53: 643–651.
- FARMAN, J. C., B. G. GARDINER, AND J. D. SHANKLIN. 1985. Large losses of total ozone in the Antarctica reveal seasonal ClOx/NOx interaction. *Nature* 315: 207–210.
- FRIEDBERG, E. C., G. C. WALKER, AND W. SIEDE. 1995. DNA repair and mutagenesis. *Am. Soc. Microbiol.*
- GARCÍA PICHEL, F., AND R. W. CASTENHOLTZ. 1993. Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 163–169.
- HARM, H. 1969. Analysis of photoenzymatic repair of UV lesions in DNA by single light flashes III. Comparison of the repair effects at various temperatures between $+37^\circ$ and -196° . *Mutation Res.* 7: 261–271.
- HARM, H., AND C. S. RUPERT. 1970. Analysis of photoenzymatic repair of UV lesions in DNA by single light flashes VI. Rate constants for enzyme–substrate binding in vitro between yeast photoreactivating enzyme and ultraviolet lesions in *Haemophilus* transforming DNA. *Mutation Res.* 10: 291–306.
- HELBLING, E. W., F. ZARATTI, L. O. SALA, E. R. PALENQUE, C. F. MENCHI, AND V. E. VILLAFANE. 2002. Mycosporine like aminoacids protect the copepod *Boeckella titicacae* (Harding) against high levels of solar UVR. *J. Plankton Res.* 24: 225–234.
- HUOT, Y., W. H. JEFFREY, R. F. DAVIS, AND J. J. CULLEN. 2000. Damage to DNA in bacterioplankton: A model of damage by ultraviolet radiation and its repair as influenced by vertical mixing. *Photochem. Photobiol.* 72: 62–74.
- IZAGUIRRE, I., A. VINOCUR, G. MATALONI, AND M. POSE. 1998. Phytoplankton communities in relation to trophic status in

- lakes from Hope Bay (Antarctic Peninsula). *Hydrobiologia* 369/370: 73–87.
- JOHNSON, J. 1994. Similarity analysis of DNAs, chap. 26, p. 655–682. *In* P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, and N. R. Krieg [eds.], *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society of Microbiology.
- KEPNER, R. L., R. A. WHARTON, R. D. COLLIER, C. S. COCKELL, AND W. H. JEFFREY. 2000. UV radiation and potential biological effects beneath the perennial ice cover of an Antarctic lake. *Hydrobiologia* 427: 155–165.
- KIRK, J. T. O., AND OTHERS. 1994. Measurements of UV-B radiation in two freshwater lakes: An instrument intercomparison. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 43: 71–99.
- MALLOY, K. D., M. A. HOLMAN, D. MITCHELL, AND H. W. DETRICH III. 1997. Solar UVB-induced DNA damage and photoenzymatic DNA repair in antarctic zooplankton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1258–1263.
- MARKER, A. F. H., E. A. NUSCH, H. RAI, AND B. RIEMANN. 1980. The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: Conclusions and recommendations. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 14: 91–106.
- MENU MARQUE, S., J. J. MORRONE, AND C. LOCASCIO DE MITROVICH. 2000. Distributional patterns of the South American species of *Boeckella* (Crustacea: Copepoda: Centropagidae): A track analysis. *J. Crustac. Biol.* 20: 262–272.
- MERILÄ, J., M. PAHKALA, AND U. JOHANSON. 2000. Increased ultraviolet-B radiation, climate change and latitudinal adaptation—a frog perspective. *Ann. Zool. Fenn.* 37: 129–134.
- NEWMAN, M. C. 1995. *Quantitative methods in aquatic ecotoxicology*. Lewis Publishers.
- NIGGLI, H. J., AND P. A. CERUTTI. 1982. Nucleosomal distribution of thymine photodimers following far- and near-ultraviolet irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 105: 1215–1223.
- NUSCH, E. A. 1980. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 14: 14–36.
- PAGGI, J. C. 1983. Estudios limnológicos en la Península Potter, Isla 25 de Mayo, (Shetland del Sur, Antártida): Morfología y taxonomía de *Pseudoboeckella poppei* Mrazek 1901, (Crustacea, Copepoda). *Contrib. Cient. Inst. Antart. Argent.* 303: 1–34.
- PAKKER, H., R. S. T. MARTINS, P. BOELEN, A. G. J. BUMA, O. NIKAIKO, AND A. M. BREEMAN. 2000. Effects of temperature on the photoreactivation of ultraviolet-B-induced DNA damage in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 36: 334–341.
- ROY, S. 2000. Strategies for the minimization of UV-induced damage, p. 177–205. *In* S. de Mora, S. Demers, and M. Vernet [eds.], *The effect of UV radiation in the marine environment*. Cambridge University Press.
- SANCAR, A. 1994. Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* 33: 2–9.
- SHARP, J. H. 1993. Procedures subgroup report. *Mar. Chem.* 41: 37–49.
- SIEBECK, O., AND U. BÖHM. 1991. UV-B effects on aquatic animals. *Verh. Int. Ver. Limnol.* 24: 2773–2777.
- SOMMARUGA, R., AND F. GARCIA PICHEL. 1999. UV-absorbing mycosporine-like compounds in planktonic and benthic organisms from a high-mountain lake. *Arch. Hydrobiol.* 144: 255–269.
- TAKEUCHI, Y., M. MURAKAMI, N. NAKAJIMA, N. KONDO, AND O. NIKAIKO. 1996. Induction and repair of damage to DNA in cucumber cotyledons irradiated with UV-B. *Plant Cell Physiol.* 37: 181–187.
- TARTAROTTI, B., I. LAURION, AND R. SOMMARUGA. 2001. Large variability in the concentration of mycosporine-like amino acids among zooplankton from lakes located across an altitude gradient. *Limnol. Oceanogr.* 46: 1546–1552.
- TODO, T., AND OTHERS. 1993. A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6–4) photoproducts. *Nature* 361: 371–374.
- VERNET, M., AND W. KOZŁOWSKI. 2001. Ultraviolet radiation and the Antarctic coastal marine ecosystem, p. 170–194. *In* C. S. Cockell and A. R. Blaustein [eds.], *Ecosystems, evolution, an ultraviolet radiation*. Springer.
- ZAGARESE, H. E., M. FELDMAN, AND C. E. WILLIAMSON. 1997. UV-B induced damage and photoreactivation in three species of *Boeckella* (Copepoda, Calanoida). *J. Plankton Res.* 19: 357–367.
- ZAGARESE, H. E., B. TARTAROTTI, W. CRAVERO, AND P. GONZALEZ. 1998. UV damage in shallow lakes: The implications of water mixing. *J. Plankton Res.* 20: 1423–1433.
- ZAGARESE, H. E., AND C. E. WILLIAMSON. 1994. Modeling the impacts of UV-B radiation on ecological interactions in freshwater and marine ecosystems, p. 315–328. *In* R. H. Biggs and M. E. B. Joyner [eds.], *Stratospheric ozone depletion/UV-B radiation in the biosphere*. Springer.

Received: 21 August 2001

Accepted: 11 December 2001

Amended: 15 January 2002

Surface avoidance by freshwater zooplankton: Field evidence on the role of ultraviolet radiation

Cristina Alonso

Laboratorio de Fotobiología, Universidad Nacional del Comahue, Centro Regional Universitario Bariloche, U.P. Universidad, 8400 Bariloche, Argentina

Vanina Rocco and Juan Pablo Barriga

Laboratorio de Fotobiología, Universidad Nacional del Comahue, Centro Regional Universitario Bariloche, U.P. Universidad, 8400 Bariloche, Argentina; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Buenos Aires, Argentina

Miguel Ángel Battini

Laboratorio de Fotobiología, Universidad Nacional del Comahue, Centro Regional Universitario Bariloche, U.P. Universidad, 8400 Bariloche, Argentina

Horacio Zagarese¹

Laboratorio de Fotobiología, Universidad Nacional del Comahue, Centro Regional Universitario Bariloche, U.P. Universidad, 8400 Bariloche, Argentina; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Buenos Aires, Argentina

Abstract

The avoidance of surface waters by crustacean zooplankton is a common phenomenon both in marine and freshwaters. The contemporary paradigm interprets such behavior as an antipredator strategy. However, the phenomenon has also been reported in predator-free environments, which suggests that other variables may contribute to this depth-selection behavior. We investigated the possibility that ultraviolet radiation (UVR) could influence the avoidance of surface waters in three interconnected lakes differing in their transparency. Each lake was sampled 17 or 18 times. In the two most transparent lakes, the percentage of the population occurring in the surface layer decreased during spring and summer, but this pattern was not observed in the less transparent lake. Such differences in the patterns of surface-water avoidance were unrelated to the abundance and vertical distribution of the dominant planktivores (early stages of galaxiid fishes) as well as to temperature and food availability. They were inversely related, however, to the average UVR levels within the surface layer. A UV avoidance strategy was predicted for the copepod *Boeckella gracilipes*, on account of its low UV tolerance and lack of photoprotective compounds. Our results support this prediction and strongly suggest that surface avoidance by freshwater Patagonian zooplankton is not just a byproduct benefit of an antipredator behavior but is a direct response to high UVR levels.

Many zooplankton species avoid the upper surface waters of lakes and oceans during daytime. Such a depth-selection behavior may or may not be associated with the more specific pattern of diel vertical migration (DVM). Over the years, a number of different hypotheses have been proposed to explain the deep vertical distribution of zooplankton dur-

ing the day. Indisputably, the most widely accepted explanation for this phenomenon is the avoidance of visually oriented predators (De Meester et al. 1999). The predator avoidance hypothesis is not only supported by circumstantial field evidence but also, and more importantly, by experimental studies that have shown that fish kairomones enhance (or even trigger) the negative phototaxis of zooplankton (Dodson 1988; De Meester et al. 1999). However, in spite of the importance of predator-induced migration, predation alone does not explain the variety of DVM patterns observed in nature. For example, DVM has been observed in organisms inhabiting fishless systems (Hairston 1980; Williamson et al. 2001).

Ultraviolet radiation (UVR, 280–400 nm) may also pose a risk for zooplankton organisms in the surface waters of transparent aquatic ecosystems (Zagarese and Williamson 2000). Thus, UVR could potentially induce a surface avoidance reaction similar to that documented for visual predators. In fact, the possibility that UVR could be responsible for the deep vertical distribution of zooplankton has long been sug-

¹ Corresponding author. Present address: Laboratorio de Ecología y Fotobiología Acuática, (IIB-INTECH) CONICET-Universidad Nacional de General San Martín, Camino de Circunvalación Laguna Km. 6 CC 164, (B7130IWA) Chascomús, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Acknowledgments

We thank Virginia Villafañe and two anonymous reviewers for their comments on early versions of the manuscript.

Financial support was provided by Fundación Antorchas (project 14156-82), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 01-00002-00066), CONICET (PIP 02135), Universidad Nacional del Comahue (program B940), and Inter-American Institute for Global Change Research (grant CRN-026).

Table 1. Optical parameters and PAR and UVR conditions in the surface layer (see the text).

Surface layer lower limit (SLLL) (m)	Lake					
	Morenito		Moreno West		Moreno East	
	2		10		10	
	k_d (m ⁻¹)	I (%) at SLLL	k_d (m ⁻¹)	I (%) at SLLL	k_d (m ⁻¹)	I (%) at SLLL
PAR (400–700 nm)	0.55	33.287	0.21	12.246	0.29	5.500
Blue (at 484 nm)*	0.59	30.605	0.16	20.598	n/a	n/a
Green (at 520 nm)*	0.40	44.933	0.14	24.171	n/a	n/a
Red (>600 nm)	0.53	34.438	0.22	11.080	n/a	n/a
UV at 320 nm	5.50	0.002	0.52	0.552	0.68	0.111

* Data from Pérez et al. (2002).

n/a: data not available.

gested (Huntsman 1924; Klugh 1930), but conclusive experimental evidence (particularly under realistic irradiance conditions) has only recently been produced (Storz and Paul 1998; Leech and Williamson 2001; Rhode et al. 2001). Quite interestingly, Rhode et al. (2001) have recently suggested that UVR could have had an initial role in the evolution of the predator-induced daytime sinking in DVM.

Although there is now experimental evidence available that demonstrates that *Daphnia* can adjust its vertical position in response to UVR (Storz and Paul 1998; Leech and Williamson 2001; Rhode et al. 2001), complementary non-manipulative, whole-lake-scale evidence is still lacking. One of the difficulties of studying the behavioral responses to UVR under field conditions is determining whether a behavior is in response to UVR or visible light (photosynthetically active radiation [PAR], 400–700 nm) (Leech and Johnsen 2003). This is because, within the same environment, UVR and PAR covary in time. Manipulative experiments use artificial filters to break out the correlation between UVR and PAR (Leech and Williamson 2001; Rhode et al. 2001). Similarly, we speculated that a field survey could take advantage of the differences in UVR transparency between lakes to separate the effects of UVR and PAR.

Here, we present the results of a 1-yr survey of a system consisting of three interconnected lakes that differ in UVR and PAR transparency. The three lakes share the same crustacean and fish communities, which simplifies the comparisons between environments. Our objective was to obtain nonmanipulative, whole-lake-scale evidence that could allow us to discriminate between the predator avoidance and the UVR avoidance hypotheses.

Materials and methods

Study area and rationale for the sampling design—The study area is composed of three basins of the lake Moreno complex (45°04'S, 71°31'W, 770 m a.s.l.) within Nahuel Huapi National Park (Patagonia, Argentina), which, in spite of being part of an interconnected system, are customarily referred to as three independent lakes: Moreno West, Moreno East, and Morenito. Moreno West (area: 5.22 km²) and Moreno East (area: 5.42 km²) are deep ($z_{\text{mean}} > 50$ m) oligotrophic lakes, with low levels of dissolved organic carbon (DOC; 0.5–0.7 g m⁻³) and corresponding high PAR and

UVR transparency ($k_{d\text{PAR}}$: 0.21–0.29 m⁻¹, k_{d320} : 0.52–0.68 m⁻¹). On the other hand, Morenito (area: 0.83 km²) is comparatively shallow ($z_{\text{mean}} \sim 10$ m) and has higher levels of DOC (2.4 g m⁻³) and lower transparency ($k_{d\text{PAR}}$: 0.55 m⁻¹, k_{d320} : 5.5 m⁻¹) (Hargreaves et al. unpubl. data).

The above differences in transparency allowed us to arbitrarily define two layers within the water column of each lake: surface and deep. The surface layer in lakes Moreno East and West was defined between 0 and 10 m, and the deep layer extended from 10 to 50 m (i.e., from 10 m to z_{mean}). The limit at 10 m for the surface layer was set on the basis of a preliminary summer survey, which suggested that very few zooplankton occurred at noon within the upper 10 m in these highly transparent lakes. In addition, available UVR-tolerance data for two common zooplankton species of Patagonian lakes (*Boeckella gracilipes* and *Ceriodaphnia dubia*) indicated that virtually no UVR damage could be expected below 10 meters (Zagarese et al. 1998; Tartarotti et al. 2000). The lower limit of the surface layer in Morenito (set at 2 m) was defined so that the amount of PAR reaching the bottom of this layer were similar (actually, a little higher, to be conservative) than that at the bottom of the surface layer of Moreno East and West. (Notice that such relationship applies not only to the total amount of PAR but also to each of the main regions within this waveband, i.e., blue, green, and red; Table 1.) However, because of the differential absorption within the UVR range, the amount of UVR in the surface layer of Morenito would be much lower than that in the other two lakes. The deep layer in Morenito extended from 2 to 10 m (i.e., $\sim z_{\text{mean}}$). For each waveband (305, 320, 340, and 380 nm and PAR), the average irradiance within the surface layers was computed according to the method of Helbling et al. (1994)

$$I_{\text{mean}} = I_0 \times \frac{1 - e^{(-k_d \times z)}}{k_d \times z}$$

where I_0 is the irradiance at the surface, k_d is the diffuse attenuation coefficient (for the corresponding wave band), and z is the lower limit depth of the surface layer (i.e., 2 m in Morenito and 10 m in Moreno East and West).

The rationale for this sampling design was that if PAR was used as a cue to avoid the surface layer, then the organisms from Morenito should avoid the upper 2 m as much as those from Moreno East and West should avoid the upper 10 m.

But if the organisms migrate down in response to UVR (but not PAR), then they would avoid the upper 10 m of Moreno East and West but not the upper 2 m of Morenito (Table 1). Clearly, the success of such a sampling design depends heavily on the proper selection of the surface layer lower limit. Despite the obvious risk of failure (i.e., not detecting differences even when they exist), we favored this sampling design over a traditional vertical profile (i.e., samples taken every n m from surface to bottom) on the basis of considerations about sample collection and processing time.

Visual planktivores in Patagonian lakes are mostly restricted to larval and juvenile fish (ichthyoplankton) usually galaxiid fishes *Galaxias maculatus*; *Galaxias platei* (Barriga et al. 2002). As mentioned above, a major advantage of the studied environments is that they share the same crustacean zooplankton and ichthyoplankton assemblages. In addition, one of the dominant species (*B. gracilipes*) is known to be present year around (Balseiro and Modenutti 1990), which made it a convenient choice for investigating its tolerance to UVR during the survey period (see below). Moreover, this species has very limited photorepair capacity (Zagarese et al. 1997) and very low levels of photoprotective compounds (Tartarotti et al. unpubl. data). The latter two characteristics suggested that this species could be a good candidate for displaying a UVR avoidance response.

Sampling and data collection—Solar radiation was continuously recorded with a GUV 511 radiometer (Biospherical Instruments) with four channels for UVR (305, 320, 340, and 380 nm) and PAR (400–700 nm) measurements. This instrument is located at the laboratory of photobiology (Universidad Nacional del Comahue), ~10 km southeast of the sampling sites. Underwater profiles were performed with a submersible version of the radiometer (PUV 500) on several occasions. Each lake was sampled on 17–18 occasions between November 1998 and November 1999. Sampling frequency was every 2–3 weeks in summer and roughly monthly in winter. Sample collection took place as close to 1200 h as possible (always between 1100 and 1500 h). For this reason, it was not possible to sample the three lakes on the same day; instead, we sampled two lakes one week and the remaining lake the next week. Variables included (1) temperature profile every 1 m in Morenito and every 5 m in Moreno East and West, (2) zooplankton vertical tows in two strata (surface and deep layers, as defined above), and (3) ichthyoplankton horizontal tows at discrete depths.

Zooplankton were sampled with a 25-cm diameter Wisconsin-type closing net (54 μ m mesh). Samples were then preserved in 4% formalin and counted in 5-ml Bogorov chambers under a dissecting scope. Ichthyoplankton were collected using two conical nets of different size, to cover a wider range of fish larvae size. The smallest net was 32 cm diameter $\times$ 105 cm length, 270 μ m mesh, and the largest was 50 cm diameter $\times$ 260 cm length, 1,500 μ m mesh. Sampling depth could be adjusted by using a 5-kg depressor and varying the length of the towing line. To maintain the sampling depth constant, the towing angle was continually monitored and adjusted as required. Sampling depths were 0, 3, and 5 m in Morenito and 0, 3, 5, 7.5, and 20 m in Moreno East and West. The sampling order was from the

surface to the bottom using the first net and from the bottom to the surface using the second net (the order of nets was arbitrary). For each depth-net combination, horizontal tows were done at a constant speed of ~ 0.65 m s^{-1} for 2 min in Morenito and for 5 min in Moreno East and West, which represents distances of ~ 80 and ~ 200 m, respectively. Trawls were done along a straight line in a deep limnetic area of each lake. Each depth-net combination was sampled along consecutive segments of that line, to avoid sampling on an already disturbed area.

Tolerance to UV-B radiation—A standardized protocol (Zagarese et al. 1997) was used to assess the tolerance to UVB radiation of zooplankton during the study period. *B. gracilipes* was chosen for this assessment because it was the only species that could be assumed a priori to occur year around. All experiments were run in an incubator at 15°C. Each experimental unit consisted of 30 adult individuals placed in a 55-mm Pyrex Petri dish filled with 15 ml of filtered (0.2 μ m) water. The Petri dishes were placed on a built-in, clear acrylic turntable rotating at 1 r.p.m. A Spectrolite XX15-B fluorescent lamp (Spectronics) provided the source of UV-B radiation (280–315 nm). The lamp was covered with a new sheet of cellulose diacetate, to remove wavelengths shorter than ~ 295 nm (see Zagarese et al. 1997 for lamp output spectra). The duration of the UV-B exposure was 4 h in all experiments. Differing UV-B intensities (0, 0.1, 0.29, 0.39, and 0.48 J cm^{-2}) were obtained by covering the individual Petri dishes with a variable number of layers of plastic window screen.

Dark experiments—The objective of these experiments was to assess the tolerance of the three *B. gracilipes* populations (i.e., from the three lakes) in the absence of recovery radiation (i.e., no photorepair). After exposure to UV-B radiation for 4 h, the animals remained in the dark for 20 additional h and then were moved inside a second incubator with a 14:10 light:dark cycle for an additional 24-h period.

Photorepair experiments—The objective of the photorepair experiments was to assess the potential for photoreactivation of the three populations of *B. gracilipes*. The experimental setup was similar to that of the experiments in the dark, except that the copepods received UV-B and PAR simultaneously for 4 h. After UV-B exposure, the animals continued receiving PAR for at least 10 more h. The following 24-h period was identical to that of the dark experiments. The number of dead individuals was recorded at the end of each experiment. The dose modification factor was calculated for each experiment as the quotient between the LD_{50} (i.e., the UV-B dose at which 50% of individuals died) obtained in the presence and absence of recovery radiation, respectively. The LD_{50} values were calculated by linear regression of logit-transformed mortality rates versus UVB dose.

Results

Moreno East and West showed stable temperature stratification during summer, with thermoclines at ~ 35 and 30 m,

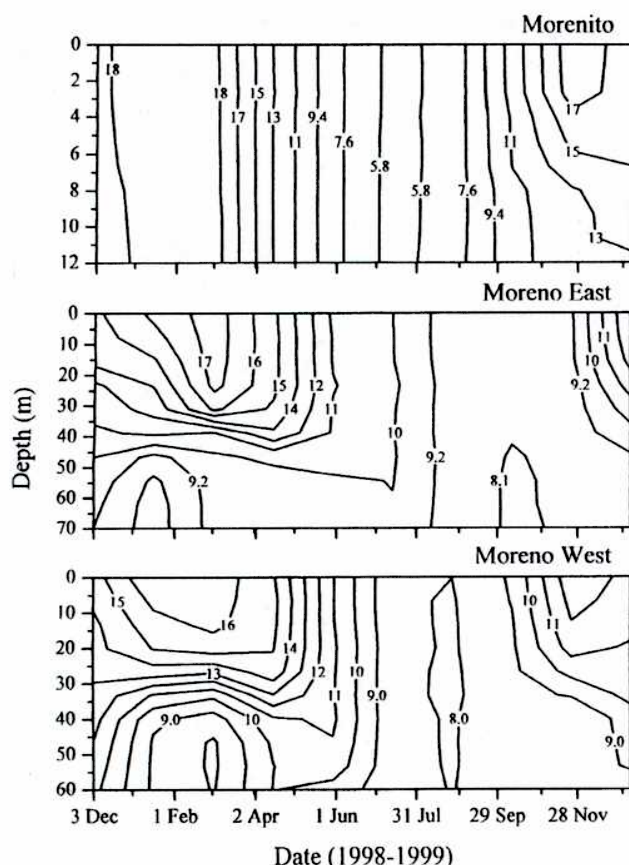


Fig. 1. Thermal profiles (°C) of the three lakes during the annual study period.

respectively. In contrast, Morenito usually did not exhibit such thermal stratification (Fig. 1).

The composition of crustacean zooplankton was similar in the three lakes and included the cladocerans *C. dubia*, *B. chilensis*, *B. longirostris*, *Daphnia* sp. and *Diaphanosoma* sp., the calanoid copepod *B. gracilipes*, and an unidentified cyclopoid copepod. The discussion of the results is limited to the three most abundant species that were present during the whole period of study (*B. gracilipes*, *C. dubia*, and *Bosmina* spp.), because the remaining species appeared only sporadically and at low densities. Abundance (on a volume basis) was much higher in Morenito than in Moreno East and West (Table 2).

In Moreno East and West, the percentage of occupancy of the surface layer (upper 10 m) was minimal during spring

and summer and increased gradually during fall and winter (Fig. 2), resembling a sinusoidal shape (particularly for *B. gracilipes* and *C. dubia*). More rigorously, the degree of occupancy of the surface layer was significantly lower during the high radiation season (i.e., between 21 September and 20 March) than during the low radiation season (i.e., 21 March to 20 September) for the three species in Moreno East and for *B. gracilipes* and *C. dubia* (but not *Bosmina longirostris* + *B. chilensis*) in Moreno West (Table 3). In contrast, in Morenito, the occupancy percentage of the surface layer (upper 2 m) did not show any obvious seasonal trend and tended to be higher than in the other two lakes during spring and summer (Table 3 and Fig. 2).

The plots of the percentage of occupancy of the surface layers versus the average radiation (i.e., I_{mean}) within the strata do not show any trend when the radiation band was PAR (Fig. 3). However, when considering the same data but plotted against the average radiation at 305 nm, a definite trend became apparent: most data points plotted below the imaginary diagonal that divides the graph into a lower left and upper right triangle. In other words, at low levels of UVR, the percentage of occupancy appeared to be variable, but, as radiation increased, the percentage of occupancy seemed to be restricted to progressively lower values (Fig. 3). In addition, we used stepwise multiple regression analysis to develop linear models of occupancy percentage versus average radiation in the surface layer. The best models always included one or two radiation bands within the UVR range but left out PAR. The models were *B. gracilipes* (adults and copepodites): predictor variable $UV_{305\text{nm}}$, $r^2 = 0.186$, $P = 0.008$; *Bosmina* spp. predictor variables $UV_{305\text{nm}}$ and $UV_{380\text{nm}}$, $r^2 = 0.425$, $P = 0.001$; *C. dubia*: predictor variable $UV_{380\text{nm}}$, $r^2 = 0.456$, $P = 0.001$. Moreover, forcing the inclusion of PAR into the multiple regression model never resulted in a significant increase of the explained variance for any zooplankton species.

B. gracilipes individuals from Morenito consistently showed higher tolerance to UVB exposure than those from either Moreno East or Moreno West (Fig. 4; analysis of variance [ANOVA], Bonferroni test $P < 0.001$). The simultaneous exposure to PAR during UVB exposure resulted in a significant increase in survival (ANOVA, $P < 0.001$) for copepods from the three lakes. But the dose modification factor was low (between 1.35 and 1.49) compared with species that have a strong photorecovery capacity (DMF ~ 4–14) (Siebeck and Böhm 1991; Rocco et al. 2002).

Ichthyoplankton abundance varied seasonally in the three studied lakes, showing a noticeable maxima during spring and early summer (Fig. 5). During the period of maximal abundance, there were important differences among lakes. In Morenito, the catches were >10 ind. min^{-1} on several oc-

Table 2. Summary statistics on the abundance of zooplankton (individuals m^{-3}) in the three lakes during the study period.

Species	Morenito					Moreno West					Moreno East				
	Mean	SD	SE	Min	Max	Mean	SD	SE	Min	Max	Mean	SD	SE	Min	Max
<i>B. gracilipes</i>	3,012	5,848	1,418	27	19,776	136	125	29	6	434	111	95	22	0	352
<i>Bosmina</i> (<i>longirostris</i> + <i>chilensis</i>)	8,755	9,033	2,191	401	35,844	79	222	52	0	946	74	117	28	0	471
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	1,002	2,437	591	0	9,466	85	108	26	1	399	25	22	5	0	77

max = maximum, min = minimum.

Table 3. Kruskal-Wallis comparisons on the proportion of the population occurring in the surface layer between samples collected during spring-summer (21 September–20 March) and fall-winter (21 March–20 September).

Species	Morenito		Moreno West		Moreno East	
	n	P	n	P	n	P
<i>B. gracilipes</i>	17	0.435	17	0.015*	17	0.019*
<i>Bosmina</i> (<i>longirostris</i> + <i>chilensis</i>)	17	1	14	0.847	16	0.015*
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	17	0.916	16	0.001*	17	0.003*

* Statistically significant.

casions, whereas they never exceeded 5 ind. min⁻¹ in Moreno East or 1 ind. min⁻¹ in Moreno West. Even more important from the perspective of the present study is the fact that the maximum density of juvenile fish occurred well below our definition of the surface layer (i.e., 2 m in Morenito and 10 m in Moreno East and West), particularly during spring and summer (Fig. 5).

Discussion

Seasonal trends in surface layer occupancy (or avoidance)—For the two most transparent lakes, the results show a clear seasonal pattern in the percentage of surface layer occupancy by the crustacean zooplankton. The occupancy was lower during spring-summer (high radiation season) than

during fall-winter (low radiation season). The species displaying this pattern were Moreno East: *B. gracilipes*, *C. dubia*, and *B. longirostris* + *B. chilensis* and Moreno West: *B. gracilipes* and *C. dubia*. Such results confirm that our simplified sampling design was able to capture a critical aspect of zooplankton ecology—namely, the avoidance of the surface waters during the day—and agree with our preliminary observations of the scarcity of individuals in the upper layer of deep, transparent Patagonian lakes during summertime. In contrast, in the less transparent Morenito, we did not observe a systematic change in the degree of occupancy of the surface layer. More specifically, the proportion of individuals occu-

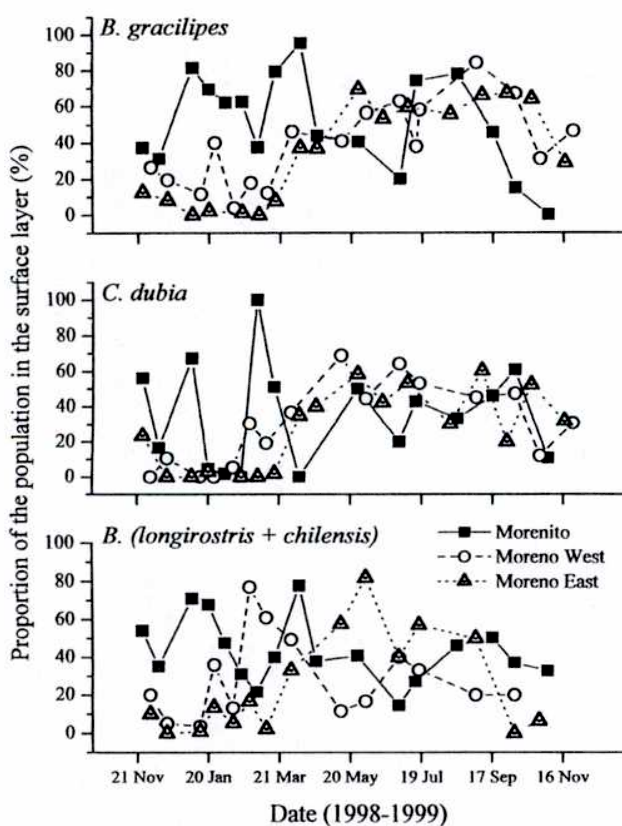


Fig. 2. Percentage of occupancy of the surface layer (see text) during the study period.

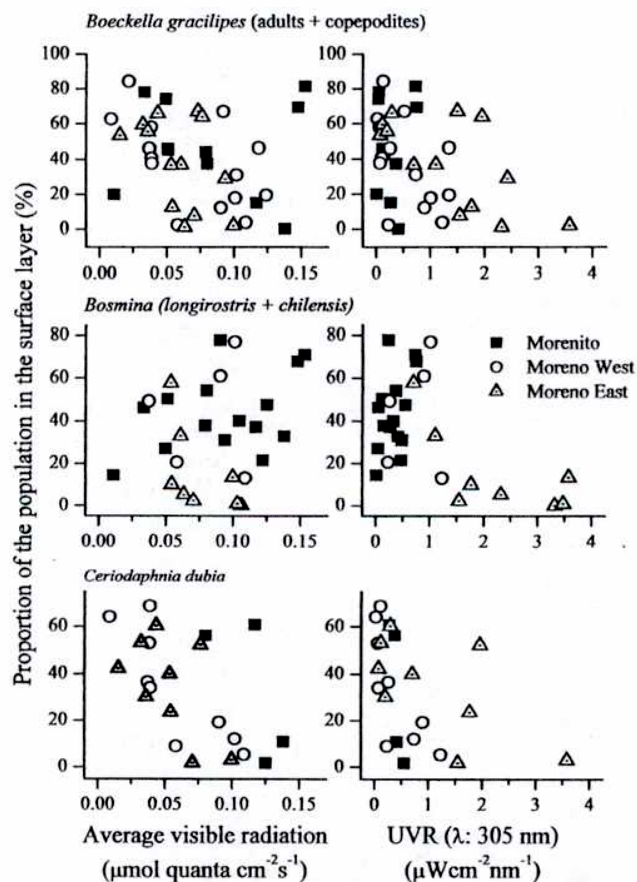


Fig. 3. Percentage of occupancy of the surface layer (same data as in Fig. 2), plotted against the average level of PAR within the stratum (left) or the average level of UVR (right).

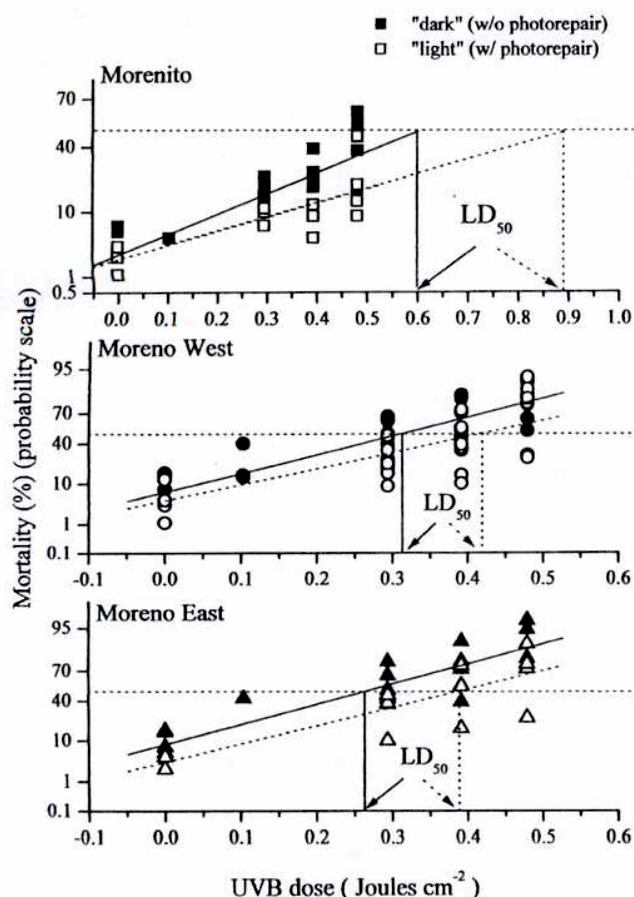


Fig. 4. Tolerance of *B. gracilipes* to artificial UVB radiation. Filled symbols: UVB exposure in the absence of recovery radiation (i.e., PAR), open symbols: UVB exposure in the presence of PAR. For each species, the results of at least four independent test conducted in different seasons were pooled. The lines correspond to a linear fit of logit-transformed mortality rates vs. UVB dose. Arrows indicate the LD_{50} value.

pying the surface layer did not significantly differ between high (spring-summer) and low (fall-winter) radiation seasons. Collectively, these results suggest that the individuals from Moreno East and West avoid the surface layer during the period of higher solar irradiance by adjusting their vertical position at a deeper depth. On the other hand, the individuals from the less transparent Morenito did not avoid the similar (but always slightly higher) PAR levels present in the upper 2 m of the water column. It seems apparent that PAR alone is insufficient to explain the disparities in the responses between lakes. We will briefly examine alternative environmental factors that could contribute to explain the different responses observed under similar PAR levels.

Temperature—The thermal patterns displayed by the lakes were different. Moreno East and West exhibited a typical warm monomictic regime, with thermal stratification during spring and summer. In contrast, Morenito did not show stable stratification. Thus, on most sampling dates, the

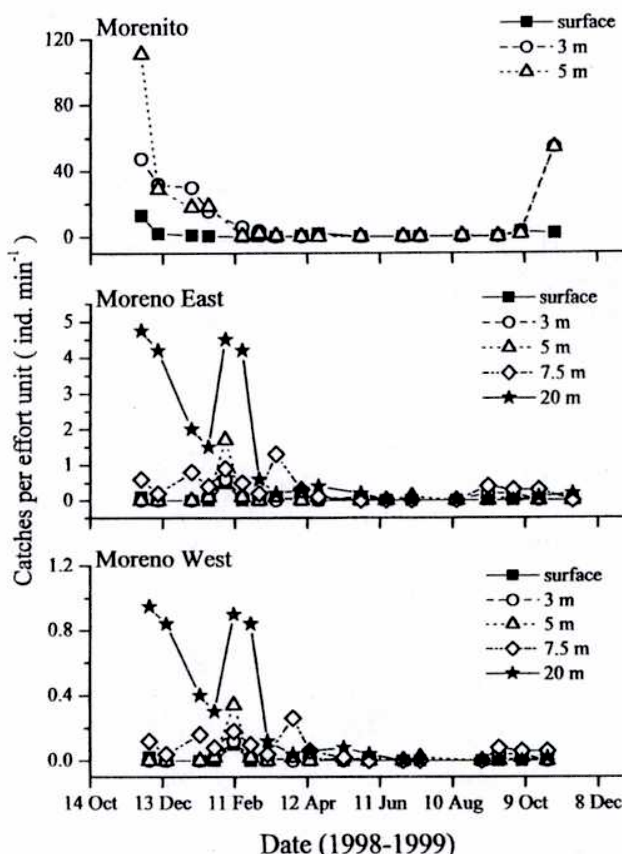


Fig. 5. Fish larvae relative abundance (CPEU) at different depth during the study period.

temperature in Morenito was homogeneously distributed through the water column. Such thermal patterns have been previously documented for this set of lakes (Quirós and Drago 1985; Pérez et al. 2002) and result from geographic location (latitude) and lake morphology. However, such differences in thermal regime cannot contribute to an explanation of the differences in vertical distributions. Temperature should not have prevented migration into deep water in Morenito because it was homogeneously distributed through the water column during most of the time. The same would be true for Moreno East and West, as long as migrations were restricted to the epilimnion. However, from bioenergetic considerations, it would presumably have tended to reduce the vertical displacement beyond the thermocline (Dawidowicz and Loose 1992). Thus, the temperature gradients observed, particularly during summertime, should not have had an effect on vertical displacements or should have acted in opposition to the observed patterns.

Fish predation—The main visual planktivores in the group of studied lakes are larval stages of galaxiid fishes (*G. maculatus* and *G. platei*). Ichthyoplankton abundance showed a distinct seasonal pattern with maximum in spring and early summer. This kind of seasonal pattern in planktivorous fish abundance is often assumed to induce the vertical migration of crustacean zooplankton into deep waters (De

Meester et al. 1999). However, in the present study, two important pieces of evidence do not provide support to the predator avoidance hypothesis. First, ichthyoplankton density (and, in fact, the overall fish density; Battini pers. obs.) was much higher in Morenito. However, the degree of occupancy of the surface layer did not vary seasonally and, in fact, tended to be higher than in the other two lakes. It is interesting to note that, according to our surface layer definition (see "Materials and methods"), the overall levels of PAR, as well as the amount of red, green, and blue light, were actually higher in Morenito than in Moreno East and West. Second, the vertical distribution of ichthyoplankton in the three lakes is clearly in conflict with the visual predation avoidance hypothesis, because the highest catches always occurred below what we defined to be the surface layers. In other words, surface avoidance by zooplankton would tend to increase (instead of decrease) the overlap between prey and predators.

Food availability—Although we have not explicitly included a phytoplankton component in our survey, the study by Balseiro et al. (2001) on the vertical distribution of phytoplankton in Moreno West overlapped our study period during summertime (November 1998 to April 1999). In Moreno West, they found a deep chlorophyll maximum at ~30 m. This maximum was mainly due to the distribution of the symbiotic alga bearing ciliate, *Ophrydium naumanni*, which accounted for most of the chlorophyll present at the deep maximum. Such association between the symbiotic *Chlorella* and the ciliate has been previously reported in Moreno West (Queimaliños et al. 1999), which suggests a repeatable event during daytime in summer. However, this ciliate (equivalent spherical diameter: 53 μm) is too large to be eaten by *B. gracilipes*, whose diet include particles up to ~33 μm (Balseiro et al. 2001). On the other hand, the vertical distribution of potential food particles (particularly the nanoplanktonic fraction) was more or less homogeneously distributed from surface to 50 m (Balseiro et al. 2001). Thus, the available evidence, although partial, does not support the idea that avoidance of the surface layer by *B. gracilipes* in Moreno West is related to the vertical distribution of food items.

UVR—We believe that the data presented in Fig. 3 (as well as the multiple regression analyses) provides crucial support to the UVR avoidance hypothesis. By combining lakes that differed in the concentration of DOC, we were able to distinguish the effects of PAR and UVR on the degree of occupancy of the surface layer. When considering the data from the three lakes together, there is no relationship between the percentage of occupancy in the surface layer and the average level of PAR within that same stratum. However, when the same data are plotted against UVR, the pattern that emerges is one in which there is very low occupancy of the surface layer at high UV levels. In other words, at times of high UV irradiance, the zooplankton appear to avoid the surface stratum. This strongly suggests some sort of boundary condition imposed by the levels of UVR.

Although the radiation waveband that produced the best statistically fit corresponded to 305 nm, we do not claim that

the organisms respond to this specific wavelength. Moreover, the actual perceptual mechanism that elicits the observed avoidance patterns in the species included in our study remains unknown. Many aquatic organisms have extended vision into the UV range (Leech and Johnsen 2003), but very few, if any, have visual receptors below ~350 nm. However, UV vision is not necessarily the only possible mechanism by which an organism can perceive that is being exposed to UVR. As has already been mentioned, UVR and PAR covary within the same environment. Thus, populations adapted to their environment could use longer wavelengths of UVA or even wavelengths within the PAR region as proxy signals for the more damaging, shorter wavelengths within the UVA and UVB. In addition, it is also conceivable that the proprioception of early tissue damage may elicit an unspecific avoidance reaction from the damaging source, as has recently been suggested for rainbow trout (Alemanni et al. 2003).

Physiological and behavioral responses to PAR and UVR—The results from the UVR tolerance test consistently showed significantly higher UV tolerance in *B. gracilipes* individuals from the less transparent but shallower Morenito. UV tolerance has been shown to increase as an adaptation to elevated UV exposure (Stutzman 1999). Of interest, the assumption that this higher tolerance is an adaptation to higher exposure to UVR would lead us to the counterintuitive conclusion that the copepods from the less transparent Morenito are the most exposed to UVR. Moreover, the differential patterns of surface occupancy between the three lakes appear to provide additional support for this previous statement. Considering these arguments, we suggest that UVR avoidance by vertical displacement may be more efficiently achieved in deep, stratified lakes than in shallow, continuously mixed ones. Of course, such a conclusion remains to be tested, and we acknowledge the fact that other factors, such as a better nutritional status, may contribute to UVR tolerance (Zellmer 1996).

Planktonic organisms have evolved three basic mechanisms to counteract the risk of UVR exposure: avoidance (e.g., deep distribution), photoprotection (e.g., the presence of sunscreen compounds and antioxidant mechanisms), and photorepair (e.g., enzymatic DNA repair systems) (Zagarese and Williamson 1994). *B. gracilipes* has been reported to have a very limited capacity for photorepair (Zagarese et al. 1997), and our results confirm this. On the other hand, the individuals of *B. gracilipes* from these lakes have very low levels of photoprotective compounds (i.e., mycosporine-like amino acids) (Tartarotti and Zagarese unpubl. data). For these reasons, it has been already suggested that this species must rely almost exclusively on the avoidance strategy (i.e., deep vertical distribution) as the sole mechanism to counteract summer UVR levels (Zagarese et al. 1997). However, it was not clear whether the deep vertical distribution that protects *B. gracilipes* from UV damage in highly transparent lakes was a direct response to UV levels or was elicited by the presence of visual hunting predators, such as ichthyoplankton, and only indirectly resulted in UV protection. In other words, was the deep vertical distribution a direct response to UVR or just a byproduct of a predator avoidance behavior, such as has been speculated for *Daphnia* from

North American lakes (Zagarese et al. 1994)? On the grounds of the present results, we are inclined to believe that the zooplankton form deep and transparent lakes in Patagonia avoid the upper portion of the water column in response to high UVR levels.

A few experimental studies have recently demonstrated that *Daphnia* can adjust its vertical position in a water column in response to UVR (Hessen 1994; Storz and Paul 1998; Leech and Williamson 2001; Rhode et al. 2001). However, to our knowledge, this is the first field evidence of such behavior observed at the whole-lake scale. If one considers that early stages of fish, including the embryos of one of the dominant ichthyoplankton species, *G. maculatus*, are highly sensitive to UVR (Battini et al. 2000; Zagarese and Williamson 2001), then the picture that emerges is that not only the crustacean zooplankton but also their potential predators are excluded from surface layer of the most transparent lakes because of the risk of UV damage.

References

- ALEMANNI, M. E., M. LOZADA, AND H. E. ZAGARESE. 2003. Assessing sublethal effects of ultraviolet radiation in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Photochem. Photobiol. Sci.* 2: 867–870.
- BALSEIRO, E. G., AND B. E. MODENUTTI. 1990. Zooplankton dynamics of Lake Escondido (Rio Negro, Argentina), with special reference to a population of *Boeckella gracilipes* (Copepoda, Calanoida). *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.* 75: 475–491.
- , AND C. QUEIMALIÑOS. 2001. Feeding of *Boeckella gracilipes* (Copepoda, Calanoida) on ciliates and phytoflagellates in an ultraoligotrophic Andean lake. *J. Plankton Res.* 23: 849–857.
- BARRIGA, J. P., M. A. BATTINI, P. J. MACCHI, D. MILANO, AND V. E. CUSSAC. 2002. Spatial and temporal distribution of landlocked *Galaxias maculatus* and *Galaxias platei* (Pisces: Galaxiidae) in a lake in the South Andes. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 36: 345–359.
- BATTINI, M., V. ROCCO, M. LOZADA, B. TARTAROTTI, AND H. E. ZAGARESE. 2000. Effects of ultraviolet radiation on the eggs of landlocked *Galaxias maculatus* (Galaxiidae, Pisces) in Northwestern Patagonia. *Freshw. Biol.* 44: 547–552.
- DAWIDOWICZ, P., AND C. J. LOOSE. 1992. Metabolic costs during predator-induced diel vertical migration of *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* 37: 1589–1595.
- DE MEESTER, L., P. DAWIDOWICZ, E. VAN GOOL, AND C. J. LOOSE. 1999. Ecology and evolution of predator-induced behavior of zooplankton: Depth selection behavior and diel vertical migration, p. 160–176. *In* R. Tollrian and C. D. Harvell [eds.], *The ecology and evolution of inducible defenses*. Princeton Univ. Press.
- DODSON, S. I. 1988. The ecological role of chemical stimuli for the zooplankton: Predator-avoidance behavior in *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* 33: 1431–1439.
- HAIRSTON, N. G. 1980. The vertical distribution of diaptomid copepods in relation to body pigmentation, p. 98–110. *In* W. C. Kerfoot [ed.], *Evolution and ecology of zooplankton communities*. Univ. Press of New England.
- HELBLING, E. W., O. HOLM-HANSEN, AND V. VILLAFANE. 1994. Effects of ultraviolet radiation on Antarctic marine phytoplankton photosynthesis with particular attention to the influence of mixing. *Antarct. Res. Ser.* 62: 207–227.
- HESSEN, D. O. 1994. *Daphnia* responses to UV-B light. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 43: 185–195.
- HUNTSMAN, A. G. 1924. Limiting factors for marine animals. I. The lethal effect of sunlight. *Contrib. Can. Biol.* 2: 83–88.
- KLUGH, A. B. 1930. The effect of the ultra-violet component of sun's radiation upon some aquatic organisms. *Can. J. Res.* 2: 312–317.
- LEECH, D. M., AND S. JOHNSEN. 2003. Behavioural responses—UVR avoidance and vision, p. 455–481. *In* E. W. Helbling and H. E. Zagarese [eds.], *UV effects on aquatic organisms and ecosystems*. Royal Society of Chemistry.
- , AND C. E. WILLIAMSON. 2001. In situ exposure to ultraviolet radiation alters the depth distribution of *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* 46: 416–420.
- PÉREZ, G. L., C. P. QUEIMALIÑOS, AND B. E. MODENUTTI. 2002. Light climate and plankton in the deep chlorophyll maxima in North Patagonian Andean lakes. *J. Plankton Res.* 24: 579–589.
- QUEIMALIÑOS, C. P., B. E. MODENUTTI, AND E. G. BALSEIRO. 1999. Symbiotic association of the ciliate *Ophrydium naumanni* with *Chlorella* causing a deep chlorophyll maximum in an oligotrophic South Andes lake. *J. Plankton Res.* 21: 167–178.
- QUIRÓS, R. AND E. DRAGO. 1985. Relaciones entre variables físicas, morfológicas y climáticas en lagos patagónicos. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral.* 16: 181–199.
- RHODE, S. C., M. PAWLOWSKI, AND R. TOLLRIAN. 2001. The impact of ultraviolet radiation on the vertical distribution of zooplankton of the genus *Daphnia*. *Nature* 412: 69–72.
- ROCCO, V. E., O. OPPEZZO, R. PIZARRO, R. SOMMARUGA, M. A. FERRARO, AND H. E. ZAGARESE. 2002. Ultraviolet damage and counteracting mechanisms in the freshwater copepod *Boeckella poppei* from the Antarctic Peninsula. *Limnol. Oceanogr.* 47: 829–836.
- SIEBECK, O., AND U. BÖHM. 1991. UV-B effects on aquatic animals. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 24: 2773–2777.
- STORZ, U. C., AND R. J. PAUL. 1998. Phototaxis in water fleas (*Daphnia magna*) is differently influenced by visible and UV light. *J. Comp. Physiol. A* 183: 709–717.
- STUTZMAN, P. J. 1999. A comparative study of ultraviolet radiation tolerance in different populations of *Diaptomus minutus*. *J. Plankton Res.* 21: 387–400.
- TARTAROTTI, B., W. CRAVERO, AND H. E. ZAGARESE. 2000. Biological weighting function for the mortality of *Boeckella gracilipes* (Copepoda, Crustacea) derived from experiments with natural solar radiation. *Photochem. Photobiol.* 72: 314–319.
- WILLIAMSON, C. E., O. G. OLSON, S. E. LOTT, N. D. WALKER, D. R. ENGSTROM, AND B. R. HARGREAVES. 2001. Ultraviolet radiation and zooplankton community structure following deglaciation in Glacier Bay, Alaska. *Ecology* 82: 1748–1760.
- ZAGARESE, H. E., M. FELDMAN, AND C. E. WILLIAMSON. 1997. UV-B induced damage and photoreactivation in three species of *Boeckella* (Copepoda, Calanoida). *J. Plankton Res.* 19: 357–367.
- , B. TARTAROTTI, W. CRAVERO, AND P. GONZALEZ. 1998. UV damage in shallow lakes: the implications of water mixing. *J. Plankton Res.* 20: 1423–1433.
- , AND C. E. WILLIAMSON. 1994. Modeling the impacts of UV-B radiation on ecological interactions in freshwater and marine ecosystems, p. 315–328. *In* R. H. Biggs and M. E. B. Joyner [eds.], *Stratospheric ozone depletion/UV-B radiation in the biosphere*. Springer-Verlag.
- , AND ———. 2000. Impact of UV radiation of zooplankton and fish, p. 279–309. *In* S. de Mora, S. Demers, and M. Vernet [eds.], *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge Univ. Press.
- , AND ———. 2001. The implications of solar UV radiation exposure for fish and fisheries. *Fish. Fish.* 2: 250–260.
- , M. MISLIVETS, AND P. ORR. 1994. The vulnerability of *Daphnia* to UV-B radiation in the Northeastern United States. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 43: 207–216.
- ZELLMER, I. D. 1996. The impact of food quantity on UV-B tolerance and recovery from UV-B damage in *Daphnia pulex*. *Hydrobiologia* 319: 87–92.

Received: 7 May 2003

Accepted: 28 July 2003

Amended: 2 September 2003