

Tesis Doctoral

Efecto de la salinidad y la temperatura
sobre el ciclo de vida de cangrejos
estuariales (Decapoda, Grapsidae)

Tesista: Claudia Bas

Director: Dr. Eduardo Spivak

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

Año 2001

Indice

Agradecimientos	i
Resumen	ii
Capítulo 1: Introducción general	
Ontogenia de los crustáceos braquiuros	1
Distribución de los crustáceos braquiuros	5
Efecto de las variables ambientales	5
Características de las especies en estudio	10
Áreas de estudio	11
Distribución de las especies en las áreas de estudio	12
Objetivos	14
Figuras	15
Capítulo 2: Materiales y métodos generales aplicados al estudio de los embriones y la eclosión larval	
Obtención de embriones y larvas	17
Preparación del agua	18
Cultivo <i>in vitro</i> de los embriones	18
Desarrollo larval completo	19
Alimentación	19
Figuras	20
Capítulo 3: Desarrollo embrionario de <i>Chasmagnathus granulata</i>	
Introducción	21
Objetivos	21
Materiales y métodos	21
Resultados	22
Tablas y figuras	24
Discusión	27
Capítulo 4: Efecto de la salinidad sobre embriones de cangrejos grápsidos	
Introducción	30
Objetivos	30
Materiales y métodos	31
Resultados	33
Tablas y figuras	36
Discusión	43

Capítulo 5: Variación estacional e interpoblacional del desarrollo	
Introducción	47
Objetivos	48
Materiales y métodos	48
Resultados	51
Tablas y figuras	60
Discusión	73
Capítulo 6: Efecto de la salinidad experimentada durante el desarrollo embrionario sobre las larvas recién eclosionadas	
Introducción	80
Objetivos	81
Desarrollo embrionario en una única salinidad y exposición aguda de las larvas	
Materiales y métodos	82
Resultados	84
Discusión	89
Tiempo necesario para la aclimatación y efecto de la exposición gradual de las larvas a diferentes salinidades	
Materiales y métodos	93
Resultados	94
Tablas y figuras	97
Discusión	108
Capítulo 7: Desarrollo larval completo de <i>Chasmagnathus granulata</i> en distintas salinidades	
Introducción	110
Objetivos	110
Materiales y métodos	111
Resultados	112
Tablas y figuras	115
Discusión	123
Capítulo 8: Discusión general	127
Bibliografía	131

Agradecimientos

Quiero agradecer especialmente a mi director Eduardo Spivak, por su dedicación, aliento y preocupación por mi futuro.

A mis otros amigos del laboratorio, especialmente Tomás por su ayuda durante todos estos años (largas horas entre el barro y el microscopio).

A mi familia, espero que haya valido la pena el tiempo que les robé por el trabajo.

Y a todos los que, de distintas formas, contribuyeron para completar esta etapa.

Muchas gracias

Este trabajo se desarrolló parcialmente con una beca de perfeccionamiento del CONICET, y parcialmente con una beca de la Fundación Antorchas, instituciones a las que agradezco.

Resumen

El ciclo de vida de los cangrejos verdaderos (Crustacea, Brachyura) incluye en la mayoría de los casos cuatro etapas. Una etapa embrionaria, en la cual los huevos en desarrollo protegidos por una membrana de varias capas, se mantienen adheridos a los pleópodos de la hembra, expuestos a las mismas condiciones ambientales que el adulto. Posteriormente una etapa larval planctónica y finalmente una fase juvenil y una adulta, ambas bentónicas en igual o diferente ambiente.

Muy frecuentemente las historias de vida de los organismos son referidas como rígidamente definidas para cada especie, sin embargo existen numerosos ejemplos en invertebrados donde las características del desarrollo y la reproducción de una especie son ampliamente influenciadas y modificadas por las condiciones del ambiente.

El objetivo general de este estudio fue evaluar el efecto de dos variables ambientales claves en el ambiente estuarial y marino costero, salinidad y temperatura, sobre algunas características del desarrollo y la reproducción en tres especies de cangrejos grápsidos: *Chasmagnathus granulata*, *Cyrtograpsus angulatus* y *Cyrtograpsus altimanus*.

En particular se estableció la relación entre el efecto de estas variables y el grado de penetración de las especies en un ambiente estuarial, la Laguna Mar Chiquita, (Buenos Aires, Argentina). Además se evaluó la variación intra e interpoblacional de la reproducción y el desarrollo de *C. Granulata*, evaluando las variaciones encontradas a lo largo de la estación reproductiva en la población de Mar Chiquita y en la de San Antonio Oeste (Río Negro, Argentina), donde esta especie es también sumamente abundante y las características del medio marcadamente diferentes.

Al menos en las poblaciones de Mar Chiquita, el desarrollo embrionario de *Chasmagnathus granulata* y *Cyrtograpsus angulatus* en salinidades por debajo de 12‰, es posible sólo después de alcanzada la fase naupliar del embrión en condiciones de salinidad normal. Luego de ésta el desarrollo es posible al menos entre 3 y 50‰. En *C. altimanus* en cambio, el desarrollo en 5‰ de salinidad no fue posible aún después de superada esa etapa del desarrollo.

Tanto *Chasmagnathus granulata* como *Cyrtograpsus angulatus* presentaron una importante capacidad de aclimatación a la salinidad durante la etapa embrionaria que se manifestó en la supervivencia de las zoeas I en diferentes condiciones de salinidad. Además ambas especies exhibieron una gran variabilidad entre camadas de diferentes hembras en la talla y supervivencia de las zoeas I.

Para *C. granulata* se estudió también el desarrollo larval completo en distintas salinidades y temperaturas en individuos provenientes de ambas poblaciones hallándose una mayor

tolerancia a baja salinidad (10‰) y baja temperatura (16°C) en los individuos de Mar Chiquita, así como una mayor variación en la respuesta de distintas camadas.

Las dos poblaciones de *C. granulata* mostraron variaciones a lo largo de la estación reproductiva en la talla de embriones y larvas. Los embriones y zoeas I del primer grupo de hembras ovígeras de la estación resultaron mas grandes que los de las camadas posteriores. Ambas poblaciones difirieron en la duración del período reproductivo y en las tallas promedio de embriones y larvas para un momento dado.

Se concluye que la distribución de todas las etapas del ciclo de vida de las tres especies dentro de la laguna Mar Chiquita reponde a la tolerancia de cada una a la baja salinidad, siendo en todos los casos las etapas embrionaria y larval las menos tolerantes.

Por otra parte, algunas de las diferencias halladas entre las poblaciones de *C. granulata* de Mar Chiquita y San Antonio Oeste son explicadas a partir de las diferentes condiciones enfrentadas por cada una. La variabilidad e impredecibilidad ambiental característica de Mar Chiquita determina poblaciones con gran plasticidad fenotípica que produce un gran espectro de características morfológicas y fisiológicas a partir de las condiciones presentes durante el desarrollo de los individuos. En San Antonio Oeste por su parte, la homogeneidad ambiental así como la predictibilidad de las variaciones estacionales produce una población con poca variación fenotípica, que ofrece una respuesta uniforme a una determinada condición ambiental.

Las diferencias halladas en ambas poblaciones de *C. granulata* entre la primera y las restantes camadas de embriones de un estación reproductiva podrían deberse a las condiciones en las cuales maduraron los ovocitos de esa primera camada durante el período invernal, y los de las restantes durante la primavera y verano con mayor temperatura y una condición nutricional diferente.

Capítulo 1.

Introducción general

Ontogenia de los crustáceos braquiuros

El desarrollo de los cangrejos verdaderos (Crustacea: Decapoda: Brachyura) puede ser tanto mixto como directo. El primer caso incluye a la mayoría de las especies e implica un desarrollo embrionario encapsulado, protegido por el abdomen de la hembra, y la posterior liberación de una larva planctónica (típicamente una zoea) que dará lugar a una postlarva (megalopa) y finalmente al juvenil a través de un proceso metamórfico. En el desarrollo directo las etapas larvales transcurren dentro de la cubierta embrionaria y la eclosión ocurre en la fase juvenil. Estas variaciones en las estrategias de desarrollo implican diferencias en el tamaño de los huevos y la segmentación, y reflejan la heterogeneidad en el estilo de vida de las especies.

Desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario de los braquiuros, en particular con referencia a los eventos iniciales del mismo: clivaje, formación de áreas presuntivas, gastrulación y desarrollo inicial de los rudimentos de órganos, no ha sido estudiado en detalle en la mayoría de las especies, a diferencia de los que ocurre con otros decápodos. Hasta donde se conoce, los huevos grandes y cargados de vitelo de muchos decapodos Pleocyemata retienen el clivaje total en las primeras etapas, aunque posteriormente éste se modifica procediendo la formación del blastodermo alrededor de una masa central de vitelo. En cambio, las etapas posteriores de la organogénesis se conocen con bastante detalle en algunas especies (ver Anderson, 1982, para revisión). Se han descrito los eventos relacionados con la aparición de las distintas capas del huevo, desde su formación en el ovario, incluyendo la fecundación, adhesión a los pleópodos y el desarrollo completo en *Carcinus maenas* (Portunidae) (Cheung, 1966; Goudeau y Lachaise, 1983). En esta especie, el ovocito sale del oviducto rodeado por una membrana vitelina de dos capas a la que se adiciona una tercera capa en el momento de la fertilización. El conjunto forma la membrana de fertilización.

Los huevos recién fecundados se unen, durante las primeras horas posteriores a la extrusión, a una serie de sedas ovígeras desarrollados en los pleópodos de las hembras durante el período reproductivo. Sólo la membrana vitelina toma parte en la unión a las sedas ovígeras de la hembra, sufriendo un cambio de elasticidad que le permite formar los funículos. Éstos se enrollan junto con los de otros huevos alrededor de cada pelo formando racimos fuertemente adheridos (Cheung, 1966; Goudeau and Lachaise, 1983).

Posteriormente se adicionan otras 4 capas generadas por el embrión. Tres de ellas corresponden a las sucesivas mudas que transcurren dentro del huevo desde la formación de la larva nauplius hasta la prezoa (Goudeau and Lachaise, 1983).

Eclosión

La eclosión de las larvas al final del período embrionario es un proceso que no está totalmente dilucidado. Algunos elementos comunes durante la eclosión de diferentes especies son el aumento de volumen de los huevos inmediatamente antes de la ruptura de la cubierta, vigorosos movimientos larvales y un característico “batido” del abdomen de la hembra. El conjunto de estas observaciones han servido para postular mecanismos de eclosión puramente osmóticos, mecánicos o una combinación de ambos (Davis, 1981), en distintas especies. Sin embargo, otros elementos relacionados con la eclosión, como la sincronización observada en la mayoría de los casos, donde todas las larvas eclosionan en un breve período y en determinadas condiciones ambientales, requieren explicaciones adicionales. En efecto, la eclosión larval no es un evento aleatorio dentro de una población sino que por el contrario se encuentra precisamente sincronizado con ciclos de diversos factores ambientales. Se han encontrado diferentes ritmos de liberación de larvas sincronizados con uno o más factores ambientales que pueden mantenerse, al menos por algún tiempo, en condiciones de laboratorio (Forward, 1987). En relación con las fases lunares, los ritmos poblacionales de eclosión son frecuentemente semilunares (14,5 días). Los ciclos de marea también pueden relacionarse estrechamente con la eclosión; ésta ocurre preferentemente durante la alta marea. Finalmente, el ciclo diario de luz- oscuridad es un factor ambiental que suele sincronizar ciclos de liberación de larvas; éstas eclosionan preferentemente durante la noche. Cuando los tres ciclos ambientales influyen en la sincronización de la eclosión en una especie, aquella ocurrirá

preferentemente durante la luna llena o nueva, durante las primeras horas de la noche y con la alta marea. Otras combinaciones dependen de la importancia de cada factor en los distintos ambientes. Por ejemplo en algunos estuarios, las mareas son irregulares, y los cangrejos no pueden desarrollar un ciclo sincronizado, o la turbidez del agua hace que la luz sea un factor poco importante (Forward, 1987).

Un mecanismo de control endógeno de ritmos de eclosión sincronizados por ciclos ambientales ha sido claramente demostrado al menos en algunas especies de Ocypodidae (Salmon *et al.*, 1986), Portunidae (deVries *et al.*, 1983) y Grapsidae (Saigusa, 1980). Esto implica que el momento de la eclosión es controlado por la hembra, los embriones en desarrollo o ambos. Rittschof *et al.* (1985) demostraron la existencia de un factor proteico liberado por los embriones de *Rhithropanopeus harrisi* (Xanthidae) en el momento de la eclosión, que estimula el comportamiento de liberación de larvas por parte de las hembras (pumping behavior). En varias especies han sido detectadas enzimas proteolíticas que degradan la cubierta del huevo, producidas por los embriones antes de la eclosión en un período que varía según la especie (DeVries *et al.*, 1991). Se postuló que el factor proteico mencionado proviene de la hidrólisis de la cubierta del huevo. A su vez, en algunas especies es la hembra quien controla el momento de la eclosión, posiblemente mediante algún estímulo químico no caracterizado, que induce el mecanismo de eclosión de los embriones en un momento definido. Si este estímulo falta, por ejemplo separando los embriones de la hembra, la eclosión no se produce u ocurre sólo parcialmente (DeVries *et al.*, 1991; deVries and Forward, 1991b; Saigusa, 1992).

Desarrollo larval

La eclosión del huevo de los crustáceos con desarrollo mixto da lugar algún tipo de larva de vida libre, que difiere según el grupo de que se trate. Existen gran diversidad de nombres para definir los estadios larvales de cada grupo en particular pero son tres los que se usan ampliamente: nauplius, zoea y megalopa. Las nauplius, se caracterizan por propulsarse sólo con sus apéndices cefálicos y tener un único ojo medio, transcurren dentro del huevo en todos los braquiuros. Las zoeas, nombre que define a las larvas que nadan con sus apéndices torácicos, tienen ojos compuestos, sésiles en la primera etapa y pedunculados en las

siguientes. Son las larvas que típicamente eclosionan de los huevos de braquiuros. Las megalopas, están caracterizadas por propulsarse con sus apéndices abdominales, de hábito más bentónico, este estadio se alcanza luego de un número variable de mudas de zoea. El cambio de zoea a megalopa implica profundos cambios fisiológicos, anatómicos y de comportamiento, de igual modo que la siguiente muda, que da lugar al primer cangrejo juvenil. Ambas, la primera, o sólo la última, son consideradas mudas metamórficas según diferentes autores (Williamson, 1982; Felder *et al.*, 1985).

Las zoeas pueden ser planctotróficas, o lecitotróficas en uno o todos sus estadios. El número de estadios de zoea que incluye cada desarrollo larval varía con la especie; es en general fijo para cada una y depende en buena medida del hábitat de los adultos. Un número de cuatro ó cinco zoeas es común en la mayoría de las especies marinas pero existen algunas con siete como *Callinectes sapidus* (Adiyodi, 1988).

Desarrollo juvenil:

La fase juvenil está comprendida entre el primer estadio de cangrejo y la madurez sexual. Es una de las menos estudiadas dentro del ciclo de vida de crustáceos decápodos, ya que son escasos los trabajos sobre cangrejos mantenidos individualmente en condiciones controladas durante una larga serie de estadios (Mohameeden y Hartnoll, 1989). Sin embargo, existen varias contribuciones recientes sobre el crecimiento y bioenergética durante el desarrollo juvenil inicial (Anger, 1996; Anger *et al.*, 1992; Anger e Ismael, 1997; Anger *et al.*, 2000).

Adultos

Por lo general, los individuos son considerados adultos una vez alcanzada la madurez sexual. El crecimiento en esta etapa puede detenerse luego de un número fijo o variable de estadios en las especies con crecimiento definido, o puede continuar a lo largo de toda la vida del individuo en las especies con crecimiento indefinido. En las primeras, la muda terminal puede ser la muda de madurez o alguna posterior (Hartnoll, 1982). En cualquier caso es ésta etapa la que tiene el máximo potencial de supervivencia. Normalmente el rango de tolerancia de los adultos de una especie a variaciones en las condiciones ambientales es el más amplio dentro del ciclo de vida.

Distribución de los crustáceos braquiuros

Si bien se encuentran crustáceos prácticamente en cualquier tipo de ambiente, en general tienen una preferencia definida por las condiciones marinas. Dentro de los decápodos, innumerables especies han colonizado exitosamente el medio dulceacuícola y muchos braquiuros y anomuros se encuentran también en el medio terrestre con diferente grado de independencia del mar (Hartnoll, 1988).

El desarrollo larval en agua dulce o fuera del agua presenta grandes problemas fisiológicos relacionados principalmente con la temperatura, la desecación y el equilibrio iónico y osmótico. En aquellas familias de braquiuros con representantes semiterrestres, terrestres o dulceacuícolas existen dos estrategias de desarrollo larval: exportación de las larvas al medio marino, por una migración de las hembras ovígeras o de las larvas recién eclosionadas, o disminución de los estadios larvales. El caso más extremo de esta última estrategia lo representa la superfamilia Potamoidea con desarrollo directo. Dentro de la familia Grapsidae, un gran número de especies han colonizado el medio terrestre o dulceacuícola con diversos grados de independencia del medio marino. En aquellas especies totalmente independientes del mar para su desarrollo se conservan aún dos zoeas y una megalopa que se desarrollan en agua dulce. La tendencia a la lecitotrofia larval (total o facultativa) y el cuidado parental de las larvas son dos rasgos que acompañan la adaptación de los braquiuros al medio dulceacuícola y terrestre (Anger, 1995).

Efecto de las variables ambientales

Dos de los factores ambientales de mayor influencia en la vida de los organismos acuáticos son la temperatura y la salinidad del agua.

La temperatura limita la distribución de los animales y por lo general influye en su índice de actividad. Su efecto es a la vez directo sobre la velocidad y coordinación de las funciones metabólicas del organismo e indirecto a través de la desecación por evaporación.

Existe un rango de temperatura bien definido dentro del cual un individuo puede sobrevivir y desarrollarse normalmente. Éste dependerá de la especie, edad y condición fisiológica, además de la historia térmica previa experimentada por el mismo (aclimatación).

La salinidad adquiere importancia para aquellos organismos enfrentados a ambientes de salinidad variable como estuarios o con salinidad constantemente baja como el agua dulce. Los factores que deben ser controlados por los organismos que viven en un medio con una salinidad diferente a la de su medio interno son la pérdida y ganancia de agua y el flujo de sales en ambos sentidos. Los organismos que pueden sobrevivir y desarrollarse en estos ambientes caen dentro de dos categorías: osmoconformadores y osmoreguladores. Los primeros minimizan la pérdida o ganancia de agua y sales por reducir el gradiente osmótico entre el medio externo y la hemolinfa y entre ésta y el fluido intracelular. Los aminoácidos libres son los principales solutos osmóticamente activos cuya concentración varía de acuerdo al medio externo. Las especies con este tipo de comportamiento fisiológico generalmente se encuentran en ambientes de marinos a mesohalinos (no menos de 9 ‰ de salinidad) pero no sobreviven en salinidades menores. Los segundos tienen la capacidad de mantener el medio interno constante independientemente de las variaciones del medio externo. Esto implica la existencia de mecanismos que permitan eliminar agua y captar sales activamente en un medio hiposmótico y lo contrario en uno hiperosmótico así como disminuir al máximo la superficie de intercambio con el medio. Las principales estructuras involucradas son los epitelios especializados de branquias y órganos excretores, teniendo a la cutícula como barrera. La mayor parte de los crustáceos con capacidad de regular, son reguladores hiperosmóticos en medios diluidos pero osmoconformadores en medios concentrados. Sólo unas pocas especies como el camarón *Palaemonetes varians* (Caridea, Palaemonidae) son buenos hipo-hiper reguladores (Gilles y Jeuniaux, 1979; Mantel y Farmer, 1983). La conquista del agua dulce y el medio terrestre depende entre otros factores de la adquisición de la capacidad de osmoregular.

Además de la capacidad fisiológica de tolerar cambios en la salinidad, los cangrejos que habitan medios que producen un importante estrés osmótico han desarrollado comportamientos que les permiten seleccionar las características más favorables de su ambiente evitando las más extremas. Estos individuos muestran migraciones, construcción o

utilización de refugios naturales, ritmos de actividad sincronizados con las variables ambientales, etc.

Efectos de la temperatura y la salinidad sobre el crecimiento

El crecimiento discontinuo de los crustáceos puede caracterizarse por medio de dos factores: el tiempo entre dos mudas o período intermuda y el incremento de tamaño por muda. Dentro del rango de valores en los que los individuos pueden desarrollarse normalmente, el efecto más general de un aumento en la temperatura es el de acortar el período intermuda. Indirectamente este acortamiento puede disminuir el incremento por muda como resultado de la escasa acumulación de reservas en un periodo intermuda muy corto. La salinidad por su parte suele tener un efecto menos marcado en el período intermuda y mayor sobre el incremento por muda (Hartnoll, 1982).

Efectos de la temperatura y la salinidad sobre la reproducción

Dado que la reproducción ocurre dentro de un rango ambiental mas estrecho que aquél que permite la supervivencia de los adultos o aún su crecimiento (Sastry, 1983), es ésta actividad la más estrechamente sincronizada con los ciclos ambientales. Al menos es así en aquellos hábitat que presentan condiciones limitantes como el intermareal, estuarios o ambientes terrestres o dulceacuícolas. Las condiciones del medio, principalmente temperatura, salinidad en los ambientes salobres, disponibilidad de alimento y parámetros poblacionales como la densidad, afectan la reproducción en distinto modo, desde la producción misma de gametas hasta el desarrollo y la eclosión larval. Por ello, aún muchas especies cuyos adultos y juveniles presentan un alto grado de adaptación a la vida en ambientes no marinos requieren del mar para su reproducción (Wolcott, 1988; Adiyodi, 1988).

Por otra parte la intensidad y tasa de cambio en la interacción de los factores ambientales varía con la latitud, pero puede a su vez ser modificada por los patrones predominantes de circulación de agua en los océanos. Así, poblaciones de una especie que viven en diferentes latitudes, o en la misma pero con distinta circulación oceánica, pueden variar en sus patrones reproductivos. La respuesta de diferentes especies a un ambiente determinado en un sitio

geográfico dado, dependerá también de sus propias tolerancias y requerimientos, los que se hallan genéticamente determinados (Sastry, 1983).

Efectos de la temperatura y la salinidad sobre el desarrollo embrionario

El efecto de la temperatura durante el desarrollo embrionario de los braquiuros ha sido objeto de numerosos estudios. Se refleja principalmente en la duración de esta etapa, que se acorta a mayores temperaturas y se alarga a medida que ésta descende (Wear, 1974; Hartnoll y Paul, 1982; Valdés *et al.*, 1991). El rango de tolerancia a la temperatura, dentro del cual son posibles estas variaciones, es diferente para cada especie. Por otra parte, las características de los huevos producidos en distintas etapas de la estación reproductiva, que difieren principalmente en la temperatura del agua y disponibilidad de alimento pueden variar. En consecuencia, su respuesta será también diferente para una misma condición de desarrollo (O'Leary Amsler y George, 1984a). Las temperaturas extremas, fuera del rango de tolerancia, finalmente producen la muerte de los embriones.

El efecto de la salinidad por su parte ha sido menos estudiado. En especies estuarinas, normalmente expuestas a variaciones amplias de la salinidad, la resistencia de los embriones a estos cambios será uno de los factores determinantes de su distribución y/o comportamiento, dado que los adultos poseen generalmente un rango más amplio de tolerancia (Kinne, 1971). Por ejemplo en *Macrophthalmus hirtipes* (Ocypodidae) la salinidad entre 18 y 36 ‰ no afecta en forma apreciable a los embriones, mientras en 11 ‰ el desarrollo se ve retardado y la eclosión no se produce (Jones y Simons, 1982). También pueden verse afectadas las características de las larvas provenientes de embriones desarrollados en diferentes salinidades o en distintas combinaciones de salinidad y temperatura (Jones y Simons, 1982; Laughlin y French, 1989a).

Efectos de la temperatura y la salinidad sobre el desarrollo larval

Existen numerosos estudios del efecto de la salinidad y temperatura, por separado y combinados, sobre las larvas de braquiuros. La mayoría de ellos son trabajos de laboratorio sobre especies estuariales y costeras, y establecen las condiciones óptimas y límites para el desarrollo, las que varían intra e interespecíficamente (Sastry, 1983). El principal efecto de la

temperatura, dentro del rango tolerado por los individuos es el de acortar o alargar el período intermuda cuando el desarrollo ocurre a altas o bajas temperaturas, respectivamente. También el crecimiento puede ser afectado dentro del mismo rango, siendo máximo en las temperaturas intermedias y disminuyendo hacia los extremos (Johns, 1981). La salinidad en cambio, no suele mostrar efectos dentro del rango óptimo, el cual puede ser muy amplio. El alargamiento del período intermuda por efecto de la salinidad está siempre asociado a una alta mortalidad, es decir que es causado por salinidades altas o bajas cerca de los límites del rango tolerado por la especie. El desarrollo en una temperatura óptima aumenta la tolerancia a la salinidad (Costlow, 1967; Johns, 1981; Anger *et al.*, 1990; Anger, 1991; Brown *et al.*, 1992; Schuh y Diesel, 1995)

El desarrollo larval completo ocurre dentro de un bien definido rango de condiciones ambientales, característico de la especie y de la historia previa experimentada por la población. El rango de condiciones óptimas o tolerables para cada estadio larval puede ser diferente y se relaciona generalmente con las condiciones del ambiente normalmente ocupado por la población y la estrategia de desarrollo y posterior reclutamiento de las postlarvas (Díaz y Bevilaqua, 1986; Anger, 1985; Anger *et al.*, 1990; Charmantier y Charmantier Daures, 1991; Anger, 1996). La tolerancia a la salinidad se relaciona con la capacidad de osmoregulación alcanzada por cada estadio en particular. Las larvas de la mayoría de las especies estudiadas son osmoconformadoras o debilmente reguladoras, aún cuando los adultos tengan una marcada capacidad de regulación. En ese caso tal capacidad se adquiere luego de la metamorfosis. Sin embargo en algunas especies confrontadas con muy bajas salinidades en su ambiente natural, las larvas pueden regular eficientemente la concentración osmótica de su hemolinfa (Charmantier *et al.*, 1988, Anger, 1996; Anger *et al.*, 1998; Anger *et al.*, 2000).

Efectos de la temperatura y la salinidad sobre el desarrollo juvenil

Como en otras fases del ciclo de vida, la salinidad y la temperatura son dos de las variables mas importantes que afectan el desarrollo de los juveniles. En general su efecto no difiere del encontrado en los adultos de la misma especie, salvo por la relación de tamaño y superficie corporal. La capacidad de regulación durante la fase juvenil sólo se ha estudiado en unas

pocas especies, y al menos en algunos casos presenta el mismo patrón de regulación que el adulto (Charmantier *et al.*, 1988).

Características de las especies en estudio

Chasmagnathus granulata (Brachyura, Grapsidae, Sesarminae), es un cangrejo semiterrestre cavador. Es una especie endémica de la región templado-cálida del Atlántico sudoccidental, entre Río de Janeiro en Brasil y el golfo San Matías en Argentina (Boschi, 1964). Su distribución se restringe a áreas intermareales de salinidad muy variable, con vegetación enraizada, principalmente *Spartina* spp., y alternativamente inundadas y drenadas por las mareas (salt marshes). Las poblaciones tienen densidades elevadas: hasta 60 ind/m² en el intermareal (mediolitoral superior) de la bahía de Samborombón (Botto & Irigoyen, 1980). Ellas otorgan una especial fisonomía a las regiones donde se encuentran, denominadas “cangrejales” en Argentina y “carangueijais” en Brasil. Su alimentación es básicamente omnívora-detritívora (Olivier *et al.*, 1972b; D’Incao *et al.*, 1990). Mañé-Garzón *et al.* (1974) demostraron que los adultos son osmoreguladores hiper-hiposmóticos. Se comprobó su capacidad de hiper e hiporegular iones sodio y potasio (Luquet *et al.*, 1992), así como de seleccionar entre salinidades de acuerdo a su aclimatación previa (Cervino *et al.*, 1996). Su desarrollo larval, descrito por Boschi *et al.* (1967) incluye 4 zoeas y una megalopa y tiene una duración promedio de 30 días en agua de mar entre 18 y 24 °C. Sin embargo, puede aparecer un quinto estadio zoea en condiciones de estrés (Pestana y Ostrenski, 1995). Se han descrito variaciones en algunos de sus rasgos reproductivos con la latitud (Valero *et al.*, 1997).

Cyrtograpsus angulatus (Brachyura, Grapsidae, Varuninae), vive tanto en el mar como en aguas salobres, en el intermareal y submareal. Se distribuye entre Río de Janeiro, Brasil y Puerto Deseado, Argentina en el Atlántico (Boschi, 1964), y desde Talcahuano (Chile) hasta Isla de San Lorenzo (Perú) en el Pacífico (Retamal, 1981). En el mar, adultos y juveniles suelen encontrarse en ambientes rocosos intermareales. En los estuarios, los adultos se encuentran en fondos blandos y fangosos caracterizados por poblaciones de poliquetos detritívoros, principalmente de los géneros *Heteromastus* y *Laeonereis*. La especie es omnívora. En Mar

Chiquita es anelidófaga y carroñera (Olivier *et al.* 1972b). En fondos blandos de Lagoa dos Patos ingiere principalmente vegetales, sobre todo *Ruppia maritima*, pero también moluscos, ostrácodos y tanaidáceos; en fondos duros del mismo sistema *Balanus improvisus* (Capítoli & Ortega, 1993). Su desarrollo larval incluye 5 zoeas y una megalopa con una duración total promedio de 27 días en agua de mar a 23 °C de temperatura (Rieger y Vieira, 1997).

Cyrtograpsus altimanus (Brachyura, Grapsidae, Varuninae), se distribuye desde Rio Grande do Sul (Brasil) hasta Chubut (Argentina) (Spivak, 1997). Estos cangrejos, de pequeño tamaño, habitan el intermareal rocoso de las costas oceánicas e invaden los estuarios cuando existen habitats apropiados: sustratos duros con espacios donde ocultarse. Su desarrollo larval, al igual que la otra especie del mismo género, incluye 5 zoeas y una megalopa, con una duración similar (Scelzo y Lichtschein de Bastida, 1978). Los estadios larvales de *C. angulatus* y *C. altimanus* son distinguibles entre sí sólo en base a varias estructuras sólo observables a partir de disecciones, y con gran magnificación, consideradas en conjunto (Rieger y Vieira, 1997).

El crecimiento de los juveniles de *C. altimanus* y *C. angulatus* en diferentes condiciones de salinidad fue estudiado por Spivak (1999). La primera especie mostró ser más afectada por las bajas salinidades tanto en el incremento por muda como en el período intermuda.

Areas de estudio

Mar Chiquita (Figura 1.1) es una albufera o laguna costera que abarca unos 46 km², desde los 37°32' hasta los 37° 45' Sur, y desde los 57° 19' hasta los 57° 26' Oeste. Se divide en una parte ancha al norte y una angosta al sur que se abre al mar a unos 35 km al norte de Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires. Algunos arroyos la alimentan con agua dulce mientras que el agua de mar entra y sale periódicamente con las altas mareas semidiurnas, pasando sobre una barra de arena existente en la desembocadura. La intensidad del intercambio de agua depende de la amplitud de marea y de la dirección e intensidad del viento. La laguna se caracteriza generalmente en primavera por tener condiciones físicas altamente variables y aguas oligohalinas por períodos prolongados (Anger *et al.*, 1994). En el verano presenta frecuentemente zonas hipersalinas de hasta 52 ‰ en las aguas mas someras debido a su poca

profundidad, la importante evaporación que ocurre en esa época y el sustrato de origen estuárico y marino, (Olivier et al., 1972b; Fasano et al., 1982).

San Antonio Oeste es una localidad situada sobre la margen oriental de la Bahía de San Antonio (Figura 1.2) (40° 45' S), la que se abre a su vez en el Noroeste del Golfo de San Matías, provincia de Río Negro. Tiene un régimen de mareas semidiurno con una amplitud que varía entre 6.5 y 9.3 m en las mareas de sicigia y cuadratura respectivamente, y carece de aporte de agua dulce. Los canales que forman la bahía, son descubiertos casi en su totalidad con las bajas mareas, dejando expuesto un amplio intermareal. La mayor parte del sustrato esta formada por arena y cantos rodados, con algo de material mas fino. En las márgenes de los canales, la parte superior del intermareal que solo se cubre con las mareas de sicigia, se desarrolla una abundante vegetación de *Spartina densiflora* y *Salicornia ambigua*. La salinidad dentro de la bahía es cercana a la del agua en el interior del golfo, variando entre 34,6 y 35,4 ‰ en marea creciente y bajante respectivamente (Esteves et al. 1996).

Distribución de las especies en las áreas de estudio

En Mar Chiquita, *C. granulata* y *C. angulatus* coexisten regularmente en los 5 a 8 km más cercanos a la desembocadura. En la parte norte donde las condiciones oligohalinas son permanentes sólo se encuentran adultos no reproductivos de *C. angulatus* (Bas, tesis de licenciatura). Dentro de las poblaciones de *C. granulata*, los adultos y juveniles muestran segregación espacial dentro de los cangrejales de acuerdo a su talla y estado reproductivo (Spivak et al., 1994). En *C. angulatus* por su parte, las distintas clases de talla se encuentran claramente segregadas en el ambiente: los adultos sobre el fondo limo-arenoso y las tallas menores bajo restos de conchilla o dentro de formaciones calcáreas de poliquetos (*Ficopomatus enigmaticus*), abundantes en el lugar (Spivak et al., 1994). Ocasionalmente los adultos se encuentran en altas densidades en la playa fuera del agua (Boschi, 1964; Spivak y Politis, 1989). En este ambiente, los adultos presentan un elevado grado de autotomía de sus apéndices (Spivak & Politis, 1989) y de parasitosis por trematodes y acantocéfalos (Martorelli, 1989).

En Mar Chiquita, *C. altimanus* ocupa espacios proporcionados especialmente por las perforaciones que practican bivalvos (*Lithophaga* sp. y *Cyrtopleura* sp.) en sedimentos consolidados y en los intersticios de las mencionadas formaciones de *Ficopomatus enigmaticus* (Obs.pers.).

Las larvas de las tres especies se desarrollan en el mar, siguiendo una "estrategia de exportación" Al igual que muchas especies de cangrejos estuariales, dejan la laguna inmediatamente después de la eclosión y regresan una vez alcanzado el estadio de megalopa (Anger *et al.*, 1994). Hay evidencias de que al menos las larvas de *Chasmagnathus granulata* tienen menor resistencia que los adultos a bajas salinidades (Anger, comunicación personal)

Dentro de la laguna Mar Chiquita, las hembras ovígeras de *Chasmagnathus granulata* y *Cyrtograpsus angulatus* tienen una distribución mas restringida que el resto de los adultos y los juveniles, encontrándose ausentes en sitios donde sí se observan machos y hembras vacías y/o juveniles. Además, estas hembras seleccionan condiciones de salinidad alta en el laboratorio, cuando pueden optar entre agua de mar diluída (3 ‰) o normal (34‰) (Bas, tesis de licenciatura). Algunas diferencias en el peso seco y la supervivencia de embriones encontrados en el mismo estudio parecen indicar que existen restricciones en las condiciones de salinidad en las cuales puede ocurrir desarrollo embrionario de estas especies.

En San Antonio Oeste, si bien coexisten también las tres especies mencionadas, solo se ha evaluado parcialmente la población de *C. granulata*. Ésta alcanza un gran desarrollo, formando cangrejales en toda la extensión del intermareal de la bahía y en el de los márgenes del golfo adyacentes a la misma. Las densidades han sido estimadas entre 20 y 60 individuos/m², con los mayores valores en la zona de espartillar , y los menores en el intermareal desnudo (López, N., Scasso, L. y C. Laureda, informe no publicado).

Objetivos

El objetivo general de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes condiciones de salinidad y temperatura sobre las etapas embrionaria y larval de *Chasmagnathus granulata*, *Cyrtograpsus angulatus* y *Cyrtograpsus altimanus* .

En particular se buscó establecer las posibles relaciones entre el efecto de las variables ambientales mencionadas y la distribución de las especies en los ambientes estuariales en los que penetran en distinto grado.

Para *C. granulata*, además, se evaluó la variación latitudinal de los parámetros reproductivos y de desarrollo embrionario y larval, así como el origen de las posibles diferencias entre poblaciones.

Figuras



Figura 1.1: Imagen satelital de la laguna Mar Chiquita, Buenos Aires, Argentina.



Figura 1.2: Imagen satelital de la Bahía de San Antonio y parte del Golfo San Matías, Río Negro, Argentina.

Capítulo 2

Materiales y métodos generales aplicados al estudio de los embriones y la eclosión larval

Obtención de embriones y larvas

Los machos y las hembras maduros de *Chasmagnathus granulata*, *Cyrtograpsus angulatus* y *Cyrtograpsus altimanus* de la Laguna Mar Chiquita fueron capturados manualmente en los distintos ambientes ocupados por cada uno cerca de la desembocadura de la misma (para detalles ver: Distribución de las especies en el área de estudio, capítulo 1). En San Antonio Oeste, los ejemplares de *C. granulata* fueron colectados de igual modo en Punta Verde, cerca de la desembocadura del canal en la bahía . Los ejemplares fueron mantenidos en el laboratorio en agua de 23‰, a temperatura y fotoperíodo ambiente durante la estación reproductiva (octubre a marzo) o a 20°C y 14 horas de luz y 10 de oscuridad fuera de éste período. En esas condiciones se consiguió la cópula y posterior extrusión de los huevos en las hembras.

Diariamente se revisaron los acuarios para detectar la presencia de hembras ovígeras cuyos embriones fueron usados en los distintos experimentos. También se utilizaron hembras ovígeras cuyos huevos, extruídos en el campo, no tuvieran más de 5 a 7 días de desarrollo para los experimentos con larvas.

Luego de la extrusión de los huevos en laboratorio, las hembras ovígeras se colocaron en acuarios individuales con aproximadamente 1 litro agua de 23‰ de salinidad durante 24 horas donde se identificaron con un número adherido al caparazón con pegamento instantáneo. Dado que los huevos recién extruídos no han desarrollado aún el funículo que los une entre sí y a los pleópodos de las hembras, se esperó al menos 24 horas luego de detectada la extrusión para iniciar los experimentos.

Posteriormente, las hembras ovígeras destinadas a producir larvas se colocaron en acuarios de 30x40x25 cm (*C. angulatus* y *C. granulata*) o 12x20x10 cm (*C. altimanus*), con una densidad no mayor de 5 individuos, con refugio y fondo de arena para asegurar el éxito del desarrollo hasta la eclosión.

Cuando la salinidad experimental de cultivo fue de 32‰, las hembras se transfirieron directamente a ésta. En cambio, para la salinidad experimental de cultivo de 41‰, las hembras se mantuvieron primero 4 a 5 días en 32‰. Finalmente, para la salinidad experimental de 5‰, las hembras se mantuvieron primero 4 a 5 días en 32‰ y un día en 17‰ antes de colocarlas en la salinidad definitiva.

Preparación del agua

El agua de diferentes salinidades se obtuvo a partir de agua de mar filtrada. Para obtener las salinidades menores se diluyó con agua destilada y para las mayores de 34‰ se evaporó por calor.

Cultivo *in vitro* de los embriones

En los experimentos de desarrollo embrionario (capítulos 3 y 4), los huevos (embriones en desarrollo) fueron cultivados *in vitro*. Esto permitió exponer embriones de una misma camada a diferentes condiciones experimentales separando los efectos del factor en estudio de las diferencias entre camadas. Por otra parte, las hembras en cautiverio solían perder sus huevos durante el desarrollo. Se utilizó un método similar al de las ampollas de decantación descrito por Cassels y Krebs (1983) reemplazando éstas por conos plásticos de 150 ml de capacidad cubiertos con film plástico. Los huevos se mantenían en movimiento dentro de la masa de agua por la aireación desde la parte inferior (figura 2.1). Los cultivos fueron mantenidos en incubadora a 20°C de temperatura y fotoperíodo de 14 horas de luz:10 horas de oscuridad. Para los cultivos de embriones *in vitro* el agua de todas las salinidades se esterilizaron por calor para disminuir al máximo la posibilidad de contaminación por hongos y bacterias por esta vía (Johnson et al., 1971; Fisher, 1976). Con el mismo fin se adicionó a este agua Verde de Malaquita (1:1.000.000) y Nystatin (5 mg/l), al inicio de los cultivos y en cada cambio de agua semanal.

Desarrollo larval completo

Para obtener desarrollos larvales completos en diferentes salinidades, las zoeas I eclosionadas en diferentes condiciones de temperatura y/o salinidad, generalmente durante la noche, fueron colocadas en frascos individuales de 25 ml con 20 ml de agua filtrada a la temperatura y salinidad requerida, en la mañana siguiente a la eclosión. Aquellas larvas eclosionadas en alta salinidad (34, 41‰), que debían desarrollarse en baja salinidad (30‰ de agua de mar, aproximadamente 10‰) fueron colocadas previamente en salinidades intermedias, disminuyendo aproximadamente 10‰ en cada paso, a intervalos de 1,5 hs. Una vez que todas las larvas de un lote estuvieron en la salinidad final correspondiente se las alimentó. El agua de cada frasco se cambió día por medio, renovándose al mismo tiempo el alimento.

Alimentación

Los adultos se alimentaron diariamente con alimento balanceado en pellets para peces. Las larvas, en los experimentos de más de 48 horas de duración, fueron alimentadas diariamente desde el momento de la eclosión con nauplii de *Artemia salina* recién eclosionadas o de no más de 24 horas de vida.

Figuras

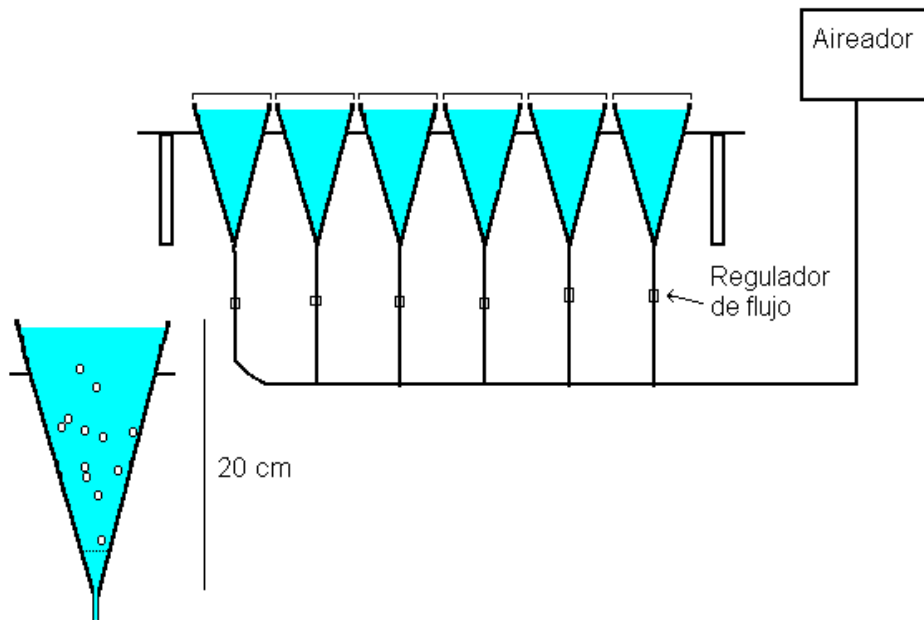


Figura 2.1: Esquema de los conos de cultivo de embriones (modificado de Cassels y Krebs, 1983)

Capítulo 3

Desarrollo embrionario de *Chasmagnathus granulata*

Introducción

A diferencia de lo que ocurre con el desarrollo larval de muchas especies de Brachyura, su desarrollo embrionario no ha sido descrito. Este es el caso de *Chasmagnathus granulata*, *Cyrtograpsus angulatus* y *Cyrtograpsus altimanus*. Esta descripción es un requisito previo para evaluar la respuesta embrionaria a diferentes condiciones de salinidad y temperatura.

Para describir el desarrollo embrionario en invertebrados, se utilizan frecuentemente sistemas de estadíos, basados en eventos particulares del desarrollo fácilmente reconocibles, aunque también se han utilizado sistemas con índices morfométricos continuos (ver Helluy and Beltz, 1991 para una revisión). Dentro del primer caso los estadíos de los crustáceos Brachyura incluyen principalmente cantidad de vitelo, aparición de apéndices embrionarios, ojos, cromatóforos, latido cardíaco, tamaño relativo de dichas estructuras, entre otras, y se refieren a una condición de cultivo particular (especialmente temperatura).

Objetivos

El objetivo de esta sección fue el de describir el desarrollo embrionario de *Chasmagnathus granulata*, como punto de partida para la comparación entre especies y diferentes condiciones de cultivo.

Materiales y Métodos

Se utilizaron embriones provenientes de cuatro hembras, extruídos 24 hs antes en agua de 23‰ de salinidad. El cultivo se desarrolló *in vitro* según la metodología ya detallada, en 24‰ de salinidad, 20°C y 14 hs de luz: 10 de oscuridad. Día por medio se tomaron submuestras de entre 50 y 100 huevos de cada cultivo midiéndose los diámetros mayor y menor de 10 huevos con un microscopio equipado con un ocular micrométrico (precisión 0.01 mm), registrando además, en cada caso, la parte del volumen total de los huevos ocupada por vitelo, y todas las modificaciones visibles dentro de los mismos. Estas observaciones se efectuaron bajo microscopio con un aumento de 100X. El desarrollo se siguió hasta la detección de larvas

dentro del cultivo o la muerte de la totalidad de los individuos registrados en una submuestra. El volumen se calculó como $V = d^2 \times D \times \pi / 6$. Donde D es el diámetro mayor de cada huevo y d el diámetro menor.

Resultados

Desarrollo embrionario de *Chasmagnathus granulata*

En base a las observaciones realizadas en las cuatro camadas de huevos, se establecieron 9 estadios de desarrollo que abarcan todos los cambios observados en la totalidad de las muestras y permiten establecer comparaciones.

En el momento de la extrusión los huevos, carentes de funículo, son de forma irregular con frecuentes "aplastamientos" de la membrana. Con el paso de las horas se van uniendo a los pleópodos de la hembra, tomando la definitiva forma ovoide. Este proceso se completa 24 horas después de extruídos.

Respecto de los cambios observados en el interior de los mismos se pudo establecer que un día después de la extrusión, los huevos fecundados están ocupados totalmente por vitelo (Estadio 1). Luego de 2 a 3 días aparecen dos comisuras blancas (Estadio 2), las que un día después se unen formando una medialuna (Estadio 3). Esta zona continúa creciendo mientras el vitelo se consume. Al cabo de la primera semana de desarrollo ya se distinguen los rudimentos de apéndices; el vitelo ocupa aproximadamente un 60% del volumen del huevo (Estadio 4). Alrededor del noveno día aparecen los ojos como líneas rojizas (Estadio 5), las que se van agrandando y oscureciendo hasta alcanzar su tamaño definitivo pocos días después. También los cromatóforos se desarrollan en este período. Para el día 15 se distinguen todas las partes del embrión, que se mueve, y se observan latidos cardíacos claros. El vitelo se reduce a una pequeña masa central que ocupa menos del 20% del volumen del huevo (Estadio 8). Alrededor del día 20, los embriones están listos para la eclosión (Estadio 9), lo que ocurre en promedio al cabo de 23 días de desarrollo. El porcentaje de larvas vivas detectadas en ese momento fue siempre sumamente pequeño, permaneciendo el resto de los embriones en estadio 9 durante varios días hasta que finalmente murieron. Posteriormente se evaluaron las posibles causas de ese fenómeno (ver más adelante).

Estos resultados se resumen en la tabla 1. Esos estadios fueron utilizados posteriormente en la comparación del desarrollo en otras condiciones de salinidad y temperatura.

La figura 3.1 muestra el desarrollo de los embriones de las cuatro camadas expresado según los estadios de desarrollo determinados, a lo largo del tiempo. La variación entre camadas para alcanzar cada estadio fue pequeña.

El volumen de los huevos fue diferente entre camadas desde el inicio del desarrollo. En todas ellas se registró un incremento del mismo a lo largo del tiempo, aunque no continuo ya que, en casi todas las camadas, excepto la de huevos más pequeños, apareció una caída en el volumen hacia el día 5 de desarrollo, y otra al final del mismo entre los días 18 y 24 (según las camadas) (figura 3.2).

Eclosión de los embriones de *Chasmagnathus granulata*

Para verificar si la ausencia de eclosión de embriones cultivados *in vitro* se debía a la falta de contacto de los huevos con la hembra en los días previos a la eclosión, se seleccionaron 4 hembras de *Chasmagnathus granulata* con huevos en el fin del desarrollo (entre tres y seis días antes de la eclosión). Diariamente se tomaron fracciones de huevos de cada una cultivando los embriones *in vitro* a la misma salinidad y temperatura a la que permanecían en las hembras (20°C, 23‰). Cuando se produjo la eclosión *in vivo*, se observó el estado de las fracciones correspondientes a la misma hembra separadas entre 6 y 1 día antes. Se determinó que sólo los huevos separados 1 y 2 días antes de la eclosión eclosionaban también con éxito. En el resto, separados entre 3 y 6 días antes, no se registró eclosión aunque los embriones permanecieron vivos, sin reservas de vitelo y con movimientos durante varios días, hasta que finalmente murieron (Figura 3.3).

Tablas y figuras

Tabla 3.1. Estadios del desarrollo embrionario de *Chasmagnathus granulata*. El tiempo indica los días que tardan los embriones en alcanzar cada estadio, a partir del inicio del cultivo, 24 hs después de la extrusión de los huevos.

Estadio	tiempo (días)	Características
E1:	1	El vitelo ocupa el 100 % del volumen, no se observan estructuras.
E2:	2-3	Aparecen dos comisuras blancas en un extremo, primer indicio de embrión.
E3:	3-4	Las comisuras se unen formando una media luna blanca. 95-90 % del volumen ocupado por vitelo.
E4:	7	Se distinguen rudimentos de apéndices. 80-60 % del volumen ocupado por vitelo.
E5:	9	Aparecen los ojos, como líneas rojizas. 50 % del volumen ocupado por vitelo.
E6:	10	El vitelo tiene forma de trébol, aparecen cromatóforos, los ojos comienzan a redondearse. Latido cardíaco claro. 40 % del volumen ocupado por vitelo
E7:	11-12	El vitelo está distribuido en dos masas centrales 30 % del volumen ocupado por vitelo.
E8:	15	Hay movimientos larvales. Los ojos y cromatóforos están totalmente formados. < 20 % del volumen ocupado por vitelo.
E9:	20	Sin vitelo, listos para eclosionar.

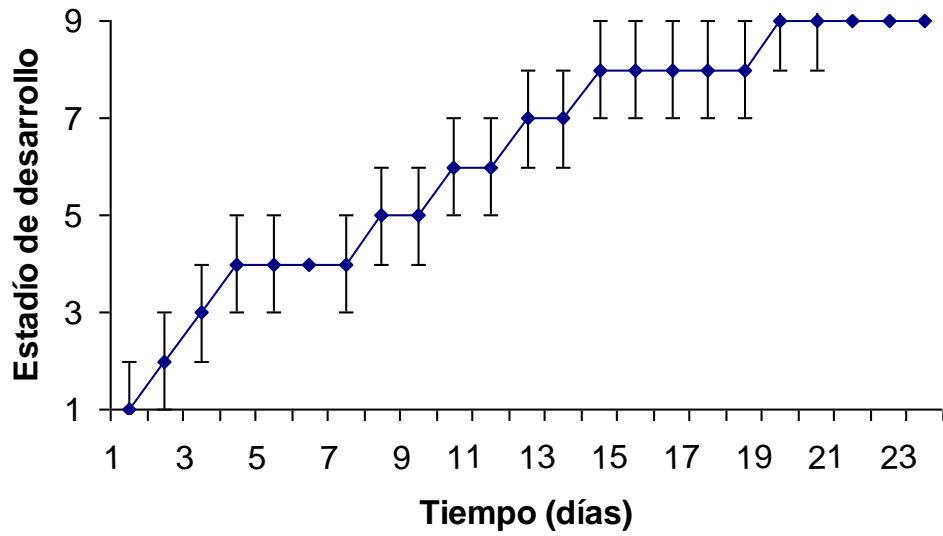


Figura 3.1. Desarrollo de los embriones de *Chasmagnathus granulata* provenientes de cuatro hembras y cultivados *in vitro* en 24 ‰. Se representó la moda y rango de los estadios de desarrollo caracterizados en la Tabla 3.1.

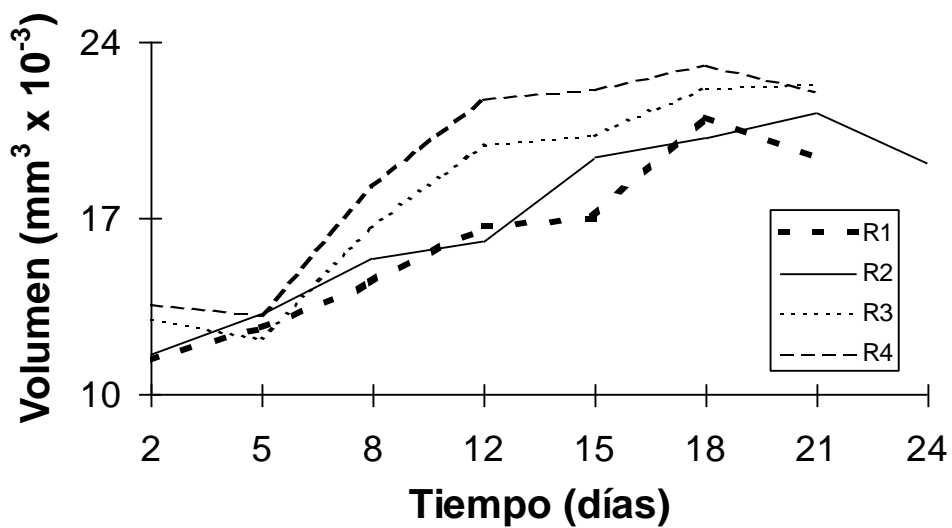


Figura 3.2. Variaciones del volumen ($\text{mm}^3 \cdot 10^{-3}$) durante el desarrollo de los huevos de *Chasmagnathus granulata* cultivados en 24 ‰ de salinidad. Cada punto es el promedio de diez valores. Los huevos fueron obtenidos de 4 hembras (R1 a R4).



Figura 3.3: Diagrama del resultado del experimento de eclosión de los embriones cultivados *in vitro*, separados de la hembra entre 1 y 6 días antes de la eclosión *in vivo*.

Discusión

La descripción del desarrollo embrionario en distintos grupos de crustáceos decápodos, utilizando características observables similares como tamaño relativo y color de la masa de vitelo, aparición de segmentación, ojos, cromatóforos, latido cardíaco y desarrollo de los ojos, ha llevado a definir un número de estadios entre 4 y 10. De esta forma se caracterizó esta etapa ontogenética en Caridea (Dupré et al., 1992), Astacidea (Pandian, 1970; Helluy and Beltz, 1991), Talassinidea (Rodrigues, 1976), Anomura (Subramoniam, 1979; Vinuesa, 1987) y Brachyura (Hiatt, 1948; Jones and Simons, 1982; O'Leary Amsler and George, 1984a; Okamoto, 1991; Petersen, 1995). A pesar de las similitudes entre los distintos sistemas, cada uno incorporó algunos atributos de la especie en particular. La secuencia de eventos observados a lo largo del desarrollo embrionario de *Chasmagnathus granulata*, concordó en general con la de otras especies. El primer día luego de la extrusión la forma de los huevos fue irregular, como observó Hiatt (1948) en *Pachygrapsus crassipes*, alcanzándose la forma ovoide definitiva luego de haberse completado la formación del funículo.

Wear (1974, fig. 1 y 2) comparó la aparición de cromatóforos, pigmentos oculares y latido cardíaco durante el desarrollo embrionario en 21 especies de decápodos. Estos caracteres "aparecieron casi simultáneamente" en todas las especies estudiadas. En cambio, la pigmentación de los ojos apareció antes que el latido cardíaco en *Chasmagnathus granulata* (este estudio), *Callichirus major* (Rodrigues, 1976), *Emerita asiatica* (Subramoniam, 1979), *Homarus americanus* (Helluy and Beltz, 1991) y *H. gammarus* (Pandian, 1970), pero después de éste en *Rhynchocinetes typus* (Dupré et al, 1992). En *C. granulata*, el pigmento de los ojos fue visible en 24 ‰ cuando había transcurrido entre el 40 y 50 % del tiempo total de desarrollo. Este tiempo fue más corto que el calculado por Wear (1974, fig.2) para *Ebalia tuberosa*, *Carcinus maenas* y *Macropipus depurator*, donde varió entre 60 y 75 %.

Los cambios en el volumen de los huevos durante el desarrollo también han sido estudiados en varios decápodos. Wear (1974) observó un incremento continuo del volumen en 12 especies de cangrejos pertenecientes a distintas familias (aunque Grapsidae no fue incluida en ese estudio). El rango de volúmenes iniciales fue de 0.0125 a 0.23 mm³ y los finales estuvieron entre 0.029 y 0.38 mm³. El incremento de volumen fue desde 65% en los huevos más grandes

hasta 130% en los más pequeños. *Chasmagnathus granulata* tiene huevos pequeños (según Wear, 1974) ($0.012-0.014 \text{ mm}^3$) pero su volumen se incrementó entre 43 y 66%. Además se observó frecuentemente una caída en el volumen cerca del inicio del desarrollo y otra cerca del final del mismo. En *Ebalia tuberosa*, *Carcinus maenas* y *Macropipus depurator*, el pigmento de los ojos apareció cuando el volumen se incrementó entre 33 y 50 % (Wear, 1974, fig. 2). Este autor encontró una relación lineal entre el porcentaje de vitelo consumido hasta la aparición de los ojos y el volumen original. En *M. depurator*, cuyos huevos tienen un volumen inicial similar al de *C. granulata*, este porcentaje fue de alrededor de 60% (Wear, 1974, fig. 1). En *C. granulata* el volumen se incrementó un 25 a 30% hasta la aparición de los ojos, y el vitelo ocupaba en ese momento un 50% del volumen. El volumen inicial varió entre camadas y las diferencias se mantuvieron a lo largo de todo el desarrollo. Lo mismo fue observado para *Macrocheira kaempferi* (Okamoto, 1991).

El número de zoeas eclosionadas en cultivos *in vitro* de varias especies de cangrejos enteramente acuáticos fue alta: 100% en *Macrocheira kaempferi* (Okamoto, 1991) y en algunos portunidae, xanthidae y calappidae (Coslow and Bookhout, 1960); 88% en *Carcinus maenas* (Hartnoll and Paul, 1982) y 79% en *Geryon quinquedens* (Cassels and Krebs, 1983). A pesar de que la mayoría de los embriones de *C. granulata* fueron capaces de completar su desarrollo embrionario, se observaron escasas eclosiones exitosas. Esto parece estar relacionado con la falta de contacto con algún factor materno 48 hs antes de la eclosión. Saigusa (1992) encontró que los huevos de *Sesarma haematocheir*, un cangrejo estuarial semiterrestre, no eclosionaban si eran separados de la hembra 48 hs o más antes del momento de la eclosión. Este autor sugirió que la hembra desencadenaba el proceso de eclosión en ese momento por un mecanismo no determinado. Los cangrejos terrestres y semiterrestres con desarrollo indirecto migran a la costa para la eclosión y liberación sincrónica de las larvas en aguas someras (Dunham and Gilchrist, 1988; Wolcott, 1988). Consecuentemente, algún control del momento de la eclosión por parte de la hembra parece razonable en estas especies. deVries y Forward (1991a) compararon el control de la eclosión de los huevos entre *Neopanope sayi* (submareal), *Uca pugilator* (intermareal) y *Sesarma cinereum* (supramareal). Postularon que la degradación enzimática de la membrana de los huevos era controlada por ritmos en el embrión en *N. sayi*, pero que la hembra señalaba al embrión la liberación de la enzima en *U. pugilator* y

S. cinereum. La posibilidad de que las hembras de *C. granulata* presenten tal tipo de control debe ser investigada.

Capítulo 4

Efecto de la salinidad sobre embriones de *cangrejos grápsidos*

Introducción

La mayor parte de los estudios ecofisiológicos en crustáceos se han realizado sobre los adultos, juveniles, larvas, y es poco lo que se conoce del efecto de las variables ambientales sobre los embriones. Es esperable que aquellos factores que actúan sobre las otras etapas del ciclo de vida también tengan influencia sobre ellos.

Si bien existen estudios que describen el efecto de la temperatura sobre el desarrollo embrionario, principalmente su duración, en anfípodos (Sutcliffe y Carrick, 1981), macruros (Branford, 1978) y braquiuros (O'Leary Amsler y George, 1984a; Wild, 1983; Shirley et al., 1987; Valdés et al., 1991), el efecto de la salinidad está menos estudiado. La capacidad de respuesta a variaciones de la salinidad en esa etapa del ciclo de vida es fundamental para los organismos que se desarrollan o reproducen en ambientes estuariales, entre ellos muchas especies de decápodos de interés comercial.

La tolerancia a cambios en la salinidad hallada en huevos en desarrollo de cirripedios (Crisp y Costlow, 1963; Barnes y Barnes, 1974), isópodos (Kelley y Burnbanck, 1976) y macruros (Pandian, 1970; Charmantier y Aiken, 1987; Greenwood et al., 1989) es diferente a la de otros estadios del ciclo de vida de las mismas especies, lo cual parece ser una generalidad en los invertebrados marinos (Kinne, 1971). Broekhuisen (1936) halló importantes diferencias entre la tolerancia de los huevos y los adultos de *Carcinus maenas* (Brachyura, Potunidae) a altas y bajas salinidades, teniendo los primeros un rango mucho más restringido.

La tolerancia a la salinidad en embriones de grápsidos fue objeto de escasos trabajos (Hartnoll y Paul, 1982; Jones y Simons, 1982) y en ninguno de ellos se estudiaron los cambios que ocurren durante los primeros días del desarrollo.

Objetivos

Uno de los objetivos de esta parte del trabajo fue establecer las condiciones límites de salinidad para el desarrollo embrionario de *Chasmagnathus granulata* y *Cyrtograpsus*

angulatus a temperatura constante. Además, se evaluaron las diferencias en el desarrollo ocasionadas por distintas salinidades en embriones recién eclosionados y, finalmente, los posibles cambios en la tolerancia a la salinidad en distintos momentos del desarrollo.

Materiales y Métodos

Desarrollo embrionario completo en distintas salinidades

Se utilizaron embriones de 24 horas de desarrollo de ambas especies. Cada masa de huevos se retiró del abdomen de la hembra con una pinza de puntas finas cuidando de no dañar los pleópodos. Se separó en 6 fracciones y cada una se transfirió directamente a un recipiente de cultivo *in vitro* con una de las siguientes salinidades: 12, 16, 24, 32, 40 y 44 ‰. Se realizaron al menos cuatro réplicas de la serie de salinidades, cada una correspondiente a una camada de una hembra diferente. Luego de 24 horas, se tomaron submuestras de cada fracción y se observaron al microscopio; se tomaron submuestras adicionales cada 3 días. El desarrollo se evaluó asignando los embriones a alguna de las 9 categorías establecidas a partir de observaciones previas (Tabla 3.1, capítulo anterior). Se seleccionaron al azar 10 huevos de cada muestra, en buen estado, para medir el diámetro mayor (D) y menor (d), con un ocular micrométrico (precisión 0.01 mm). El volumen se calculó como el de un elipsoide con la fórmula:

$$V = d^2 \times D \times \pi / 6.$$

Las diferencias de volumen entre salinidades se analizaron mediante un ANOVA de dos vías, con salinidad y camada como factores (Zar, 1984).

Limites de tolerancia a la salinidad de embriones de 24 horas de desarrollo

Los huevos de 24 horas de desarrollo fueron retirados de las hembras del mismo modo que en el caso anterior, separándolos en seis grupos aproximadamente iguales que se colocaron en 6 salinidades experimentales (3, 6, 12, 24, 44 y 50 ‰). Se tomaron huevos de 5 hembras de *Chasmagnathus granulata* y 6 de *Cyrtograpsus angulatus*. La transferencia a cada salinidad fue gradual (Tabla 4.1).

El estado de los huevos fue verificado día por medio, extrayendo una submuestra de aproximadamente 100 huevos y observandola al microscopio. Al cabo de 5 días de cultivo, los grupos de huevos fueron asignados a cada una de las siguientes clases:

- Embriones muertos: la masa de huevos presenta un color amarillo y las células aparecen lisadas.
- Desarrollo detenido: los embriones permanecen en estado de mórula.
- Desarrollo escaso: menos de 1/3 de los huevos observados tienen indicios de desarrollo (consumo de vitelo y aparición de una región clara correspondiente al embrión).
- Desarrollo bueno: entre 1/3 y 2/3 de los huevos observados tienen indicios de desarrollo.
- Desarrollo muy bueno: más de 2/3 de los huevos observados tienen indicios de desarrollo.

Variaciones de la tolerancia con el tiempo de desarrollo.

Se evaluó el efecto de las salinidades más extremas del experimento anterior (3, 6 y 44 ‰) sobre embriones de 48 y 72 horas de desarrollo. Se utilizaron 6 hembras de cada especie. Cada masa de huevos se separó en 6 partes y se cultivaron *in vitro* en agua de 23 ‰ durante las primeras 24 horas. Transcurrido ese período, tres de las fracciones se colocaron en 3, 6 y 44 ‰ en los mismos recipientes. La transferencia fue gradual en tres réplicas para cada especie (según el mismo esquema indicado antes) y directa en las otras tres. Las otras tres fracciones se colocaron en las mismas salinidades 24 horas después. Al cabo de 5 días de cultivo, los grupos de huevos fueron asignados a una de las categorías expuestas más arriba.

Desarrollo de las membranas embrionarias hasta las 72 hs.

Se observaron con microscopio electrónico de transmisión (Hitachi HU 11C1) las membranas embrionarias de huevos de *C. granulata* de 24, 48 y 72 hs de desarrollo en agua de mar. Para ello los huevos fueron fijados 24 hs en una solución Karnovsky modificada, en buffer cacodilato 0.2M, pH 7.4, luego fueron pinchados con una munucia y dejados en la solución durante dos horas más para favorecer la penetración del fijador. La postfijación se realizó con O₄Os al 1%, en el mismo buffer 2 hs a 4°C. La deshidratación se realizó en una serie creciente de alcoholes, y la inclusión en Spurr grado hard a 67°C durante 36 hs. Los

cortes ultradelgados se contrastaron con acetato de uranilo en solución alcohólica y citrato de plomo.

Resultados

Desarrollo embrionario completo en distintas salinidades

Los embriones de *Chasmagnathus granulata* se desarrollaron *in vitro* en diferentes salinidades, aunque los resultados variaron entre camadas provenientes de distintas hembras. Los embriones de una de las hembras fueron capaces de completar su desarrollo en las 6 salinidades experimentales, los de la segunda no se desarrollaron en la salinidad mayor (44 ‰), los de la tercera se desarrollaron en las salinidades más altas pero no en 12 y 16 ‰ y los embriones de la cuarta sólo completaron su desarrollo en 24, 32 y 40 ‰. En los casos en que no se completó el desarrollo, la muerte de los embriones se produjo entre los días 15 y 20 de desarrollo, en un estadio entre 6 y 8 (Tabla 3.1); pocos días antes podía notarse la presencia de algunos embriones menos desarrollados y un aumento de la mortalidad. Sólo en una hembra los huevos cultivados a 44 ‰ tuvieron un desarrollo nulo desde el comienzo.

El desarrollo de todas las camadas fue más rápido en 24 ‰, y fue mínima la variación entre ellas (ver figura 3.1 en la sección anterior). En las restantes salinidades las diferencias entre camadas fueron mayores y la tendencia en todas ellas fue la de un desarrollo más lento hacia ambos extremos de salinidad. La figura 4.1 muestra el tiempo en días transcurrido hasta la aparición de los ojos (Estadio 5) en las distintas salinidades para todas las camadas. Los mayores retardos aparecieron en los embriones de la hembra 1 en 12, 16 y 44 ‰ y en la hembra 4 en 12 y 16 ‰; en todos estos casos esos embriones murieron sin completar el desarrollo. Las diferencias entre salinidades se mantuvieron hasta alcanzar el estadio 8. Los embriones de las diferentes camadas estuvieron un tiempo variable en ese estadio, con lo cual las diferencias entre ellos desaparecieron. En los casos en que se detectó eclosión, la misma ocurrió el mismo día en todas las salinidades para una misma camada.

Los cambios de volumen a lo largo del desarrollo observados en todas las salinidades fueron similares, excepto en los valores alcanzados en cada una. El volumen, desde su valor inicial, hasta alcanzar un máximo en el estadio 8 ó 9. En 24 ‰ se registró una caída del volumen el día 5 de desarrollo en dos de las réplicas, cuando los embriones se encontraban

aproximadamente en el estadio 3, pero en otras salinidades como 32 o 40 ‰, ésta caída se verificó en la totalidad de las réplicas. En algunos casos se registró otra disminución, más leve, del volumen durante los últimos días de desarrollo.

El volumen de los huevos fue diferente tanto entre salinidades como entre camadas. Para una misma camada, los mayores volúmenes se alcanzaron en la salinidad más baja y decrecieron hasta un mínimo en 44 ‰ (figura 4.2). Los volúmenes registrados en el día 2, cuando los embriones tenían un grado similar de desarrollo en todas las salinidades, fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre salinidades ($\alpha=0.05$, $p<0.0001$) y entre hembras ($\alpha=0.05$, $p<0.0001$).

Los cultivos de *Cyrtograpsus angulatus* se infectaron, al cabo de pocos días, con bacterias filamentosas y hongos, y nunca se logró el desarrollo completo. Los cultivos de *Chasmagnathus granulata*, en cambio, no mostraron evidencias de infección.

Limites de tolerancia a la salinidad de embriones de 24 horas de desarrollo

Al cabo de 5 días de cultivo *in vitro*, los embriones de ambas especies sólo continuaban su desarrollo a 24 y 12 ‰ (figuras 4.3 y 4.4), aunque en el experimento anterior, embriones de dos de las réplicas (dos camadas) de *Chasmagnathus granulata* lograron también desarrollarse en 44 ‰. Dado que no se observaron diferencias en el desarrollo de los huevos transferidos gradual o directamente, los resultados se consideraron agrupados. El desarrollo de *C. granulata* en 12 ‰ fue algo mejor que el de *Cyrtograpsus angulatus* en la misma salinidad. Al menos parte de los huevos de *C. granulata* continuaban vivos en 6, 44 y 50 ‰ pero habían detenido su desarrollo (figura 4.3). En 6 ‰, los huevos presentaban numerosas divisiones celulares y un aspecto granuloso, posiblemente correspondiente a un estadio mórula avanzado. En 44 y 50 ‰, en cambio, los huevos tenían pocas células grandes como en una mórula inicial. Los embriones de *C. angulatus* estaban muertos en 3, 6 y 50 ‰ (figura 4.4). Los huevos de *C. angulatus* desarrollaron parásitos (*Lagenidium sp.* y bacterias filamentosas) en algunas salinidades a pesar del tratamiento con Nistatina. La infección afectó a 4 de las 6 réplicas y apareció primero en 12 ‰, encontrándose también en 24 ‰ en dos de los casos y en 6 ‰ en uno de ellos.

Variaciones de la tolerancia con el tiempo de desarrollo

Cuando el cambio de salinidad fue a las 48 horas de desarrollo se obtuvo buena supervivencia de los embriones (5 días después de la transferencia) de *Chasmagnathus granulata* en 44 ‰ y escasa (sólo una de las réplicas) en 6 ‰. Cuando la exposición fue a partir de las 72 horas se logró desarrollo en todas las salinidades (figura 4.5, A y B). En *Cyrtograpsus angulatus* se obtuvo desarrollo de los embriones en las tres salinidades experimentales cuando la exposición fue a partir de las 48 horas pero la supervivencia mejoró cuando fue a partir de las 72 horas (figura 4.6, A y B). Sólo una de las réplicas, colocadas a las 48 horas de desarrollo en 3 ‰ resultó contaminada.

Desarrollo de las membranas embrionarias hasta las 72 hs

Las fotografías tomadas con MET de huevos de 24 hs de desarrollo muestran una membrana externa (1, Figura 4.7) formada a su vez por dos capas, y una gruesa membrana interna (2, Figura 4.7) que limita con el citoplasma embrionario. A las 48 hs de desarrollo se observa la aparición de otra membrana, delgada, por debajo de las anteriores (3, Figura 4.8). Entre ésta y la capa 2 de la membrana de fertilización se observa la aparición de estructuras vesiculares (flecha en la figura 4.8) La membrana externa es ahora más delgada, pasando de 0.41 a 0.21 μm de espesor, mientras que la capa 2 tiene un espesor de 1 μm , similar al que presentaba a las 24 hs. Finalmente para las 72 hs de desarrollo se observa un cambio en estructura y tamaño de la capa 2. La misma consta ahora de dos partes, una banda clara más interna (2c) y una oscura externa (2o) de espesor similar. El espesor total de esta capa es ahora de 2.3 μm . La membrana 3 por su parte se observa más definida (Figura 4.9).

Tablas y figuras

Tabla 4.1. Procedimiento de aclimatación de los huevos a salinidades bajas y altas, previo a iniciar el cultivo *in vitro*

Salinidad final	Aclimatación : 1,5 horas en:		
3 y 6 ‰	18 ‰	12 c	
12 ‰	18 ‰		
24 ‰	Directo		
44 ‰	30 ‰	36 ‰	
50 ‰	30 ‰	36 ‰	44 ‰

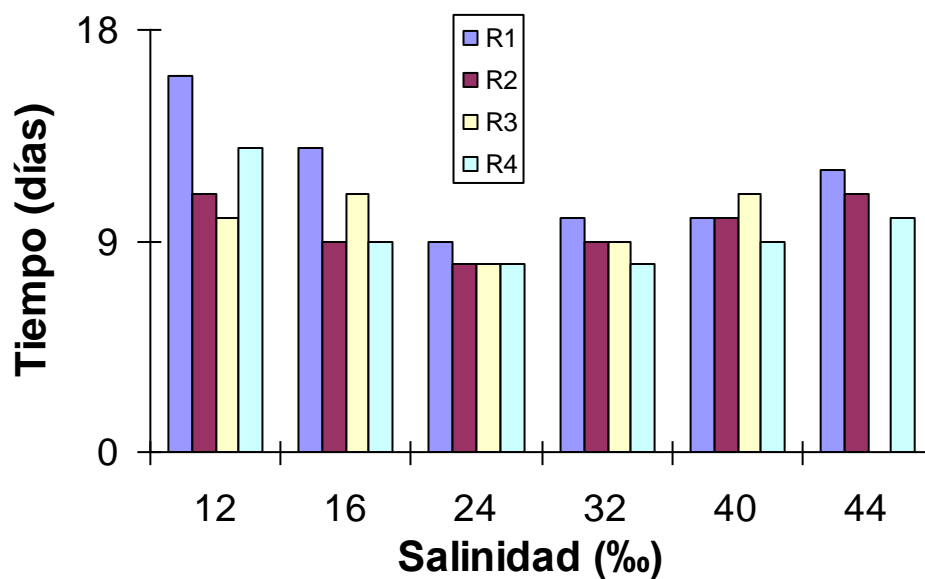


Figura 4.1: Tiempo de desarrollo hasta alcanzar el estadio 5 (aparición de los ojos, Tabla 3.1) en embriones de *Chasmagnathus granulata* provenientes de cuatro hembras (R1 a R4) y cultivados *in vitro* en seis condiciones de salinidad (12, 16, 24, 32, 40 y 44 ‰).

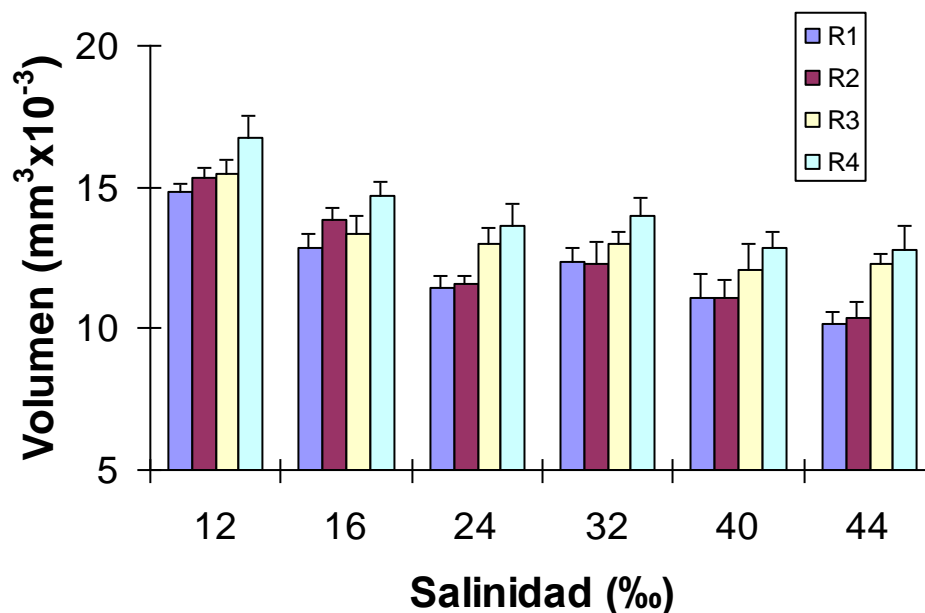


Figura 4.2: Volumen ($\text{mm}^3 \cdot 10^{-3}$) (promedio \pm de) registrado al segundo día de desarrollo en los huevos de *Chasmagnathus granulata* provenientes de cuatro hembras, cultivados *in vitro* en seis condiciones de salinidad (12, 16, 24, 32, 40 y 44 ‰).

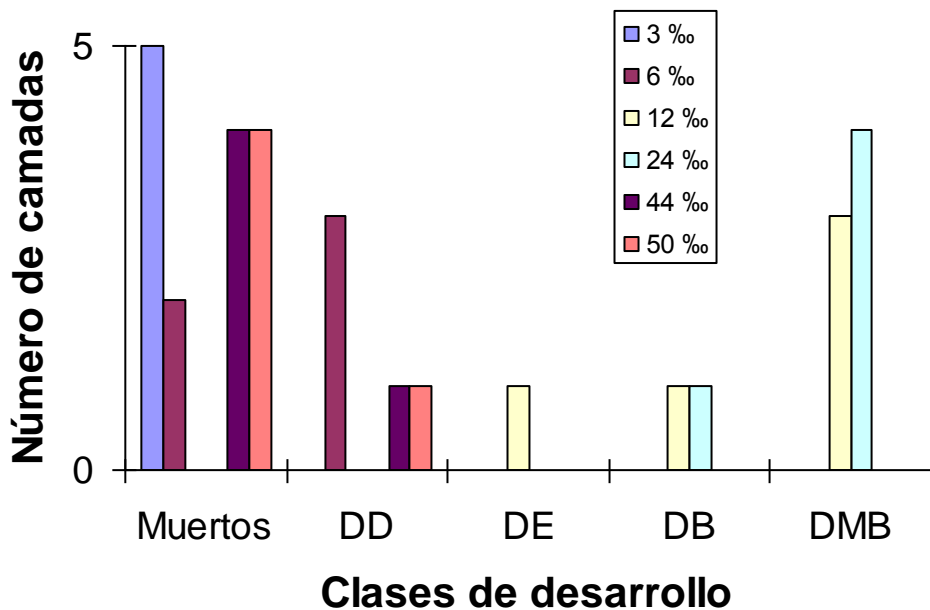


Figura 4.3: Desarrollo alcanzado por los embriones de *Chasmagnathus granulata* en seis salinidades (3, 6, 12, 24, 44 y 50 ‰) en el día 5 de observación. Los huevos, provenientes de 5 hembras, fueron transferidos a las distintas salinidades 24 horas después de extruídos. M: todos los embriones muertos; DD: desarrollo detenido; DE: desarrollo escaso; DB: desarrollo bueno; DMB: desarrollo muy bueno (ver texto).

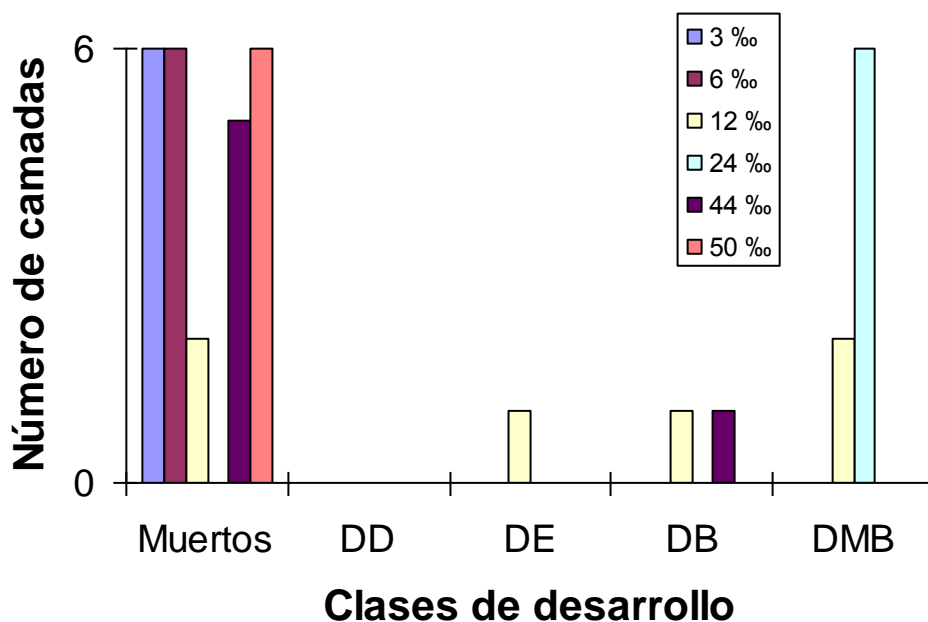


Figura 4.4: Desarrollo alcanzado por los embriones de *Cyrtograpsus angulatus* en seis salinidades (3, 6, 12, 24, 44 y 50 ‰) en el día 5 de observación. Los huevos, provenientes de 6 hembras, fueron transferidos a las distintas salinidades 24 horas después de extruídos. M: todos los embriones muertos; DD: desarrollo detenido; DE: desarrollo escaso; DB: desarrollo bueno; DMB: desarrollo muy bueno (ver texto).

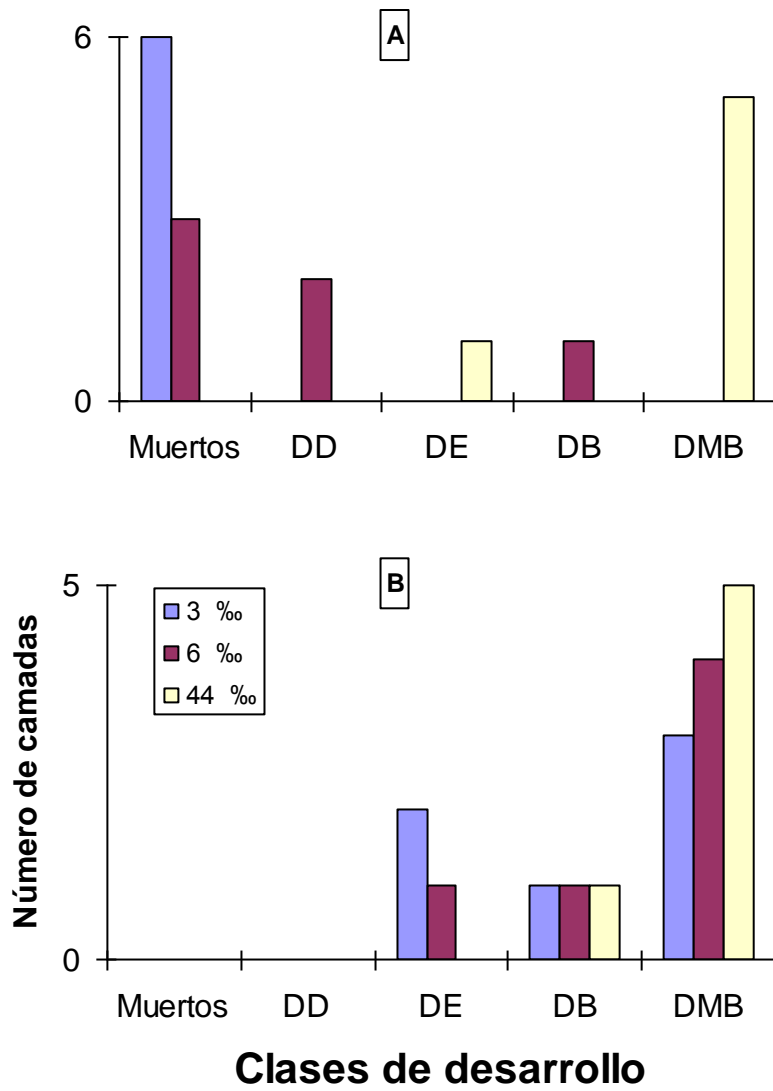


Figura 4.5: Desarrollo alcanzado por los embriones de *Chasmagnathus granulata* en tres salinidades diferentes (3, 6 y 44‰) en el día 5 de observación. Los huevos, provenientes de 6 hembras, fueron transferidos a las distintas salinidades 48 horas (A) y 72 horas (B) después de extruídos. M: todos los embriones muertos; DD: desarrollo detenido; DE: desarrollo escaso; DB: desarrollo bueno; DMB: desarrollo muy bueno (ver texto).

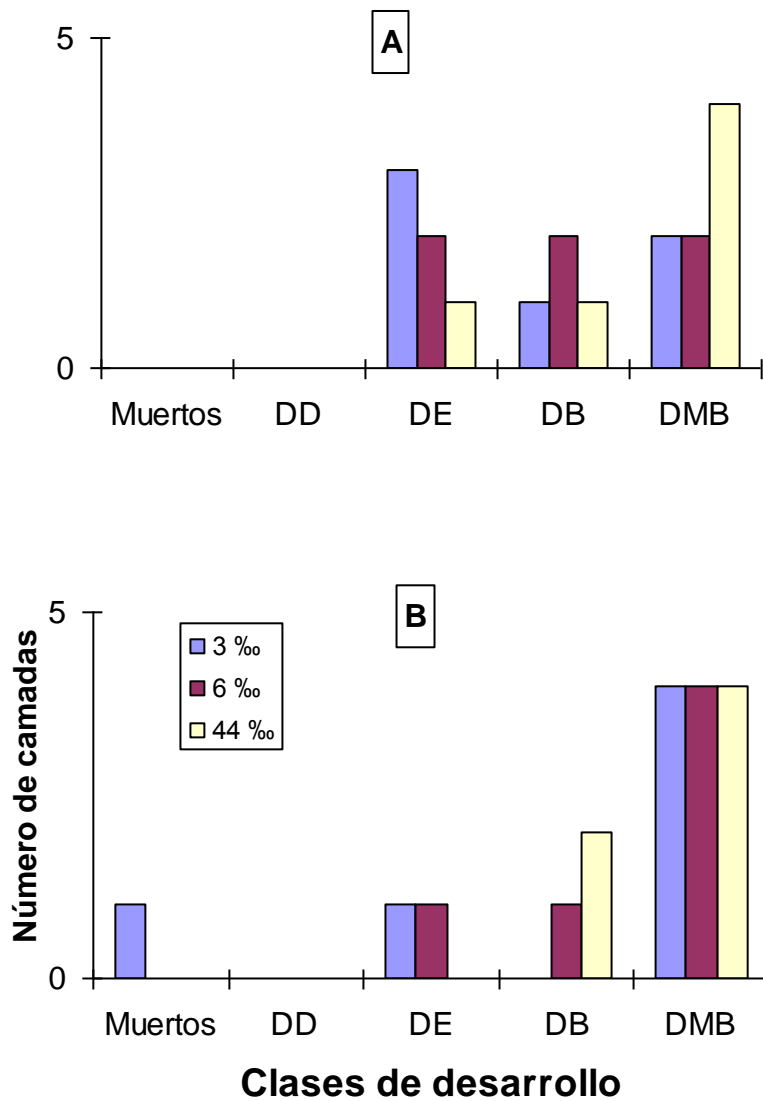


Figura 4.6: Desarrollo alcanzado por los embriones de *Cyrtograpsus angulatus* en tres salinidades diferentes (3, 6 y 44‰) el día 5 de observación. Los huevos, provenientes de 6 hembras, fueron transferidos a las distintas salinidades 48 horas (A) y 72 horas (B) después de extruídos. M: todos los embriones muertos; DD: desarrollo detenido; DE: desarrollo escaso; DB: desarrollo bueno; DMB: desarrollo muy bueno (ver texto).

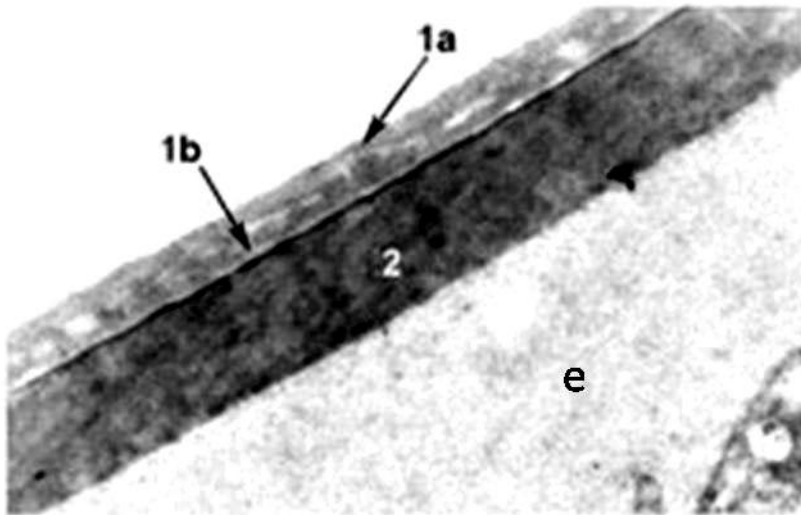


Figura 4.7: Cubierta del huevo de los embriones de *C. granulata* de 24hs de desarrollo (en agua de mar a 20 °C). Se observa la membrana de fertilización, formada por la membrana vitelina, secretada por la hembra (1), donde se distinguen dos partes (a y b) y una capa formada luego de la fertilización (2). e: embrion. 20.000X

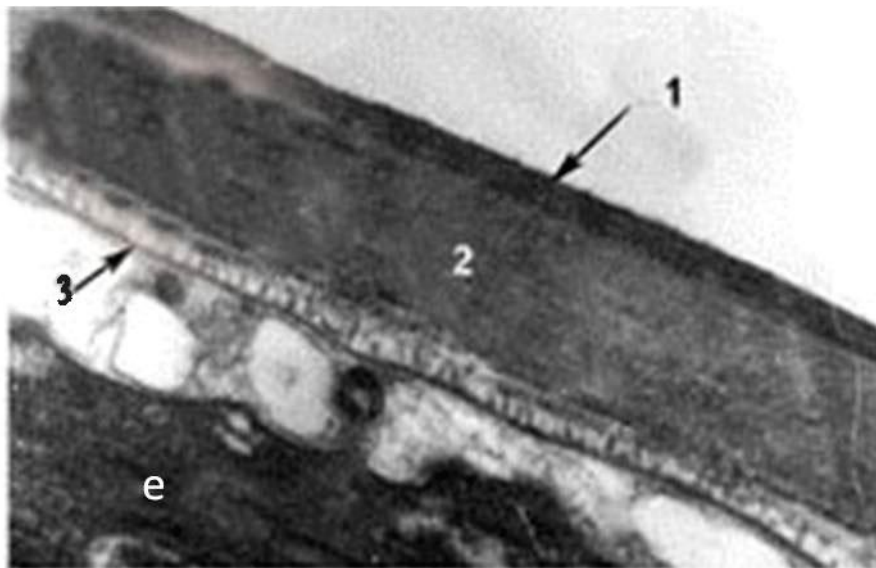


Figura 4.8: Cubierta del huevo de los embriones de *C. granulata* de 48hs de desarrollo (en agua de mar a 20 °C). Se observa la aparición de una nueva capa embrionaria (3) por debajo de la membrana de fertilización (1+2). Una serie de vesículas aparecen entre ésta nueva capa y la capa 2 preexistente (flecha). La membrana vitelina (1) es ahora mucho más delgada. e: embrion. 20.000X

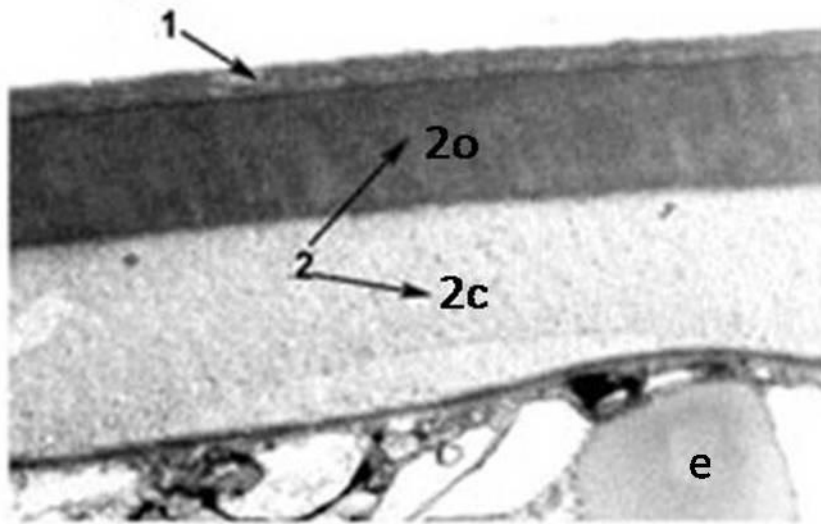


Figura 4.9: Cubierta del huevo de los embriones de *C. granulata* de 72hs de desarrollo (en agua de mar a 20 °C). La capa 2 de la membrana de fertilización se observa formada por una banda externa oscura (2o) y una interna clara (2c), y su espesor total duplica el observado 24 hs antes. La capa 3 aparece bien definida. 1: membrana vitelina secretada por la hembra.e: embrión 20.000X

Discusión

La distribución de los adultos de *Chasmagnathus granulata* y *Cyrtograpsus angulatus* en la laguna Mar Chiquita sugiere una amplia tolerancia a los cambios de la salinidad. La primera especie puede encontrarse en altas densidades en zonas con variaciones amplias e irregulares de la salinidad. *C. angulatus* por su parte, una especie marina litoral, se encuentra prácticamente en toda la laguna y al menos un pequeño porcentaje de hembras ovígeras ocupa áreas que alcanzan salinidades de alrededor de 2 ‰ (Spivak et al., 1994)

En condiciones de laboratorio, los embriones de *Chasmagnathus granulata* y *Cyrtograpsus angulatus* de 24 horas de vida pueden desarrollarse a 20°C en un rango de salinidades entre 12 y 44‰, aunque la mortalidad varía notablemente entre las camadas provenientes de distintas hembras.

Fuera de las salinidades que permiten el desarrollo, los embriones de *Cyrtograpsus angulatus* mueren. En *Chasmagnathus granulata*, en cambio, el efecto de las salinidades altas y bajas no es el mismo. Mientras que la salinidad experimental más baja utilizada (3‰) produce la muerte del embrión, las más altas (44 y 50‰) y una baja menos extrema (6‰), parecen detener el desarrollo sin producir su muerte. Una diferencia similar entre el efecto de salinidades altas y bajas fue encontrada por Barnes y Barnes (1974) en algunos cirripedios comunes en el intermareal. En ellos, mientras las salinidades bajas provocaron la muerte de los embriones, las salinidades altas menos extremas causaban retraso y malformaciones en el desarrollo, pero éste era aún posible. El volumen de los huevos, al menos para *C. granulata*, fue notablemente diferente entre camadas pero los cambios durante el desarrollo, a excepción de las caídas registradas, fueron similares a los reportados para otras especies de decápodos (Wear, 1974).

La fase inicial del desarrollo parece ser crítica en el éxito posterior de los embriones. La tolerancia a diferentes salinidades se logra en los embriones de las dos especies luego de un período variable a partir del momento de la extrusión de los huevos. En *Chasmagnathus granulata*, a las 48 horas de desarrollo en 23‰, los embriones ya son capaces de tolerar condiciones hipersalinas, mientras que para tolerar condiciones muy hiposalinas requieren primero desarrollarse en esa salinidad intermedia al menos 72 horas. *Cyrtograpsus angulatus*

es capaz de tolerar condiciones tanto hiper como hiposalinas ya a partir de las 48 horas de desarrollo en 23 ‰, aunque tal capacidad parece quedar totalmente establecida recién luego de 72 horas de desarrollo en esa salinidad intermedia, principalmente para las bajas salinidades. La diferencia entre ambas especies se debe posiblemente a que el desarrollo de *C. angulatus* es algo más rápido que el de *C. granulata* para una misma temperatura (Bas, datos no publicados) en concordancia con un tamaño de los huevos algo menor (Luppi et al., 1997).

La capacidad de tolerar concentraciones osmóticas diferentes de las del medio interno parece estar relacionada con la existencia de la membrana externa del huevo en los embriones de *Homarus americanus*. Esta membrana consiste de una capa externa formada durante el desarrollo del ovocito y una interna generada inmediatamente después de la fertilización. Si esta membrana está intacta, es muy impermeable a los iones y al agua, de modo que los embriones se mantienen hiperosmóticos en agua de mar o luego de varias horas en medios diluidos. Cuando estas capas se rompen, el embrión, rodeado por las envolturas generadas en las sucesivas etapas embrionarias, no es capaz de osmoregular (Charmantier y Aiken, 1987). La formación de la membrana externa es un proceso que abarca las primeras horas o días de desarrollo del embrión (Cheung, 1966). En el cangrejo *Carcinus maenas*, Goudeau y Lachaise (1983) diferenciaron, además de la membrana externa y de la serie de membranas que genera el embrión entre el estadio de metanauplius y zoea, una primera capa formada por el embrión en el estadio de nauplius, que es diferente de las posteriores en estructura y espesor. El estadio de nauplius se corresponde aproximadamente con el estadio E3 establecido en el presente trabajo, el cual aparece alrededor de las 72 horas de desarrollo en 24‰. Embriones colocados luego de ese momento en una serie de salinidades experimentales sobreviven y se desarrollan (figuras 4.5 y 4.6). Cuando son colocados antes de las 72 horas, las posibilidades de desarrollo de los embriones se restringen a un rango estrecho de salinidades "intermedias" (aunque existen algunas camadas excepcionales) (figuras 4.3 y 4.4). Es posible postular que existe una correlación entre la adquisición de la resistencia a la salinidad de los embriones en desarrollo luego de un período crítico de 3 días y la formación de la membrana externa (*sensu* Cheung, 1966) y/o la capa embrionaria naupliar (*sensu* Goudeau y Lachaise, 1983). Las fotografías de las membranas embrionarias tomadas con MET a los huevos de *C. Granulata*

durante las primeras 72 hs de desarrollo en agua de mar muestran cambios en las mismas similares a los descritos para *Carcinus maenas* (Goudeau y Becker, 1982; Goudeau y Lachaise, 1983). La membrana externa correspondería a la membrana vitelina secretada por la hembra, y la membrana 2 a la capa formada inmediatamente después de la fertilización a partir de la reacción cortical. Ambas forman en conjunto la membrana de fertilización. La capa 3 que aparece posteriormente se corresponde con la membrana naupliar secretada por el embrión en desarrollo. Otros cambios, como el engrosamiento y diferenciación de la capa 2, observados en *C. granulata*, no han sido descritos previamente. Sería de interés conocer en detalle los eventos celulares involucrados en el cambio de aspecto observado, así como evaluar los cambios de permeabilidad de la membrana asociados al mismo. Al menos la velocidad de penetración del fijador utilizado para procesar este material, disminuyó notablemente entre los huevos de 24, 48 y 72 hs de desarrollo (Opeddisano, com. pers.) Si la disminución en el volumen de los huevos registrada el día 5 de desarrollo está de algún modo relacionada con los eventos anteriores es aún una pregunta a responder. Sin embargo, el conjunto de observaciones apoya la idea de que es un cambio en las membranas embrionarias durante los primeros días del desarrollo, lo que determina la capacidad de los embriones de tolerar bajas salinidades.

En cirripedios, los embriones de especies eurihalinas van aumentando su capacidad de regulación durante el desarrollo (Barnes y Barnes, 1974). En *Chasmagnathus granulata* en cambio, los embriones de algunas hembras que se desarrollaban normalmente en salinidades bajas o altas murieron en una fase avanzada del desarrollo, es decir cuando sería esperable que su tolerancia fuera mayor. Esto podría indicar que existe algún otro momento crítico dentro del desarrollo embrionario en cuanto a la susceptibilidad a la salinidad, pero también podría ser el resultado de daños causados por las salinidades extremas en las primeras etapas.

El tipo de membrana externa de los embriones de *Homarus americanus* reduce el impacto de los cambios de salinidad asociados a un ambiente estuarial (Charmantier y Aiken, 1987) y es posible que sea similar al de otras especies que enfrentan condiciones semejantes, como *Cyrtograpsus angulatus* y *Chasmagnathus granulata*. La ausencia de diferencias entre la transferencia gradual y la aguda a las distintas salinidades concuerda con la hipótesis de una membrana poco permeable. De todos modos, aún cuando esta membrana pueda considerarse

una barrera eficiente, los embriones no están osmóticamente aislados del medio externo, como lo demuestran los cambios de volumen en diferentes salinidades, y la existencia de salinidades en las que el desarrollo no es posible.

Si la susceptibilidad de los embriones a salinidades muy altas o muy bajas es grande sólo durante los primeros días de desarrollo, las hembras fecundadas podrían seleccionar un ambiente favorable donde extruir sus huevos y mantenerse en él por algún tiempo. Un comportamiento de selección de salinidad fue detectado al menos en hembras ovígeras con embriones avanzados en ambas especies (Bas, datos no publicados).

En *Chasmagnathus granulata*, el tratamiento con antibióticos en el agua de cultivo resultó efectivo para evitar la infestación *in vitro*; no ocurrió lo mismo en *Cyrtograpsus angulatus*, lo que posiblemente indique una mayor susceptibilidad natural de esta especie. En la laguna Mar Chiquita es frecuente encontrar hembras de *C. angulatus* portando pequeñas masas de huevos con su desarrollo detenido o muertos pero no así de *C. granulata*.

Existió una importante diferencia en la tolerancia a la de diferentes camadas en ambas especies, como también en el tamaño inicial de los huevos de *Chasmagnathus granulata* provenientes de distintas hembras mencionado anteriormente. Tal variabilidad podría relacionarse con la historia previa experimentada por las hembras (diferencias en la salinidad de desarrollo, disponibilidad de alimento, edad, temperatura de crecimiento, etc.) pero no puede descartarse un origen genético de la misma.

Capítulo 5

Variación estacional e interpoblacional del desarrollo

Introducción

La historia de vida de los organismos está definida por una serie de caracteres relacionados directamente con la reproducción y supervivencia de la especie. Los principales son: el tamaño al nacer, el patrón de crecimiento, edad y talla de madurez reproductiva, número y relación de sexos de la descendencia, mortalidad e inversión reproductiva en relación con la talla y la edad, y período de vida (Stearns, 1992). Todos estos rasgos, y el equilibrio entre ellos, están sujetos a presiones de selección que varían en el espacio y en el tiempo, dando como resultado de ese balance, para cada momento y lugar, una optimización del *fitness* o adecuación de esa especie al conjunto de condiciones que enfrenta.

En un buen número de especies de crustáceos han sido descritas variaciones en las características de los huevos y/o larvas a lo largo de la estación reproductiva (ER) y entre diferentes localidades. En el primer caso, tales variaciones han sido atribuidas a diferencias en las condiciones ambientales (temperatura, disponibilidad de alimento) durante la ER, tanto para las hembras madurando sus huevos como para las larvas que se desarrollarán a partir de éstos (Landry, 1975; Lawlor, 1976; Díaz, 1980; Boddeke, 1982; O'Leary Amsler y George, 1982; Willows, 1987). En el segundo caso, las diferencias interpoblacionales en los rasgos reproductivos de muchas especies respondieron a las condiciones físicas y ecológicas de los microhábitats de cada sitio, a las variaciones ambientales relacionadas con diferencias latitudinales, de las cuales las más notorias fueron la temperatura y el fotoperíodo, o a una combinación de variaciones latitudinales y locales (Mashiko, 1982, 1987, 1990; Lonsdale y Levinton, 1985; Laughlin y French, 1989b; Clarke et al., 1991; Hancock et al, 1998). A su vez, tales diferencias pueden estar determinadas genéticamente o ser variaciones fisiológicas inducidas por las condiciones ambientales predominantes en cada sitio.

Objetivo

El objetivo de esta parte del trabajo fue establecer si existen variaciones en los caracteres de la historia de vida de *Chasmagnathus granulata*, tales como el tamaño de los huevos y las larvas, a lo largo de la estación reproductiva y entre poblaciones de distintas latitudes. También se estudió la respuesta de los embriones y larvas de cada época y lugar a dos condiciones de temperatura en laboratorio, considerando a la temperatura como uno de los principales factores ambientales que varían, tanto temporal como espacialmente. Las respuestas se midieron como mortalidad, duración de los períodos embrionario y larval, y talla de los cangrejos resultantes en cada caso.

Materiales y métodos

Las hembras ovígeras fueron colectadas manualmente en Mar Chiquita (37°45'S) y San Antonio Oeste (40°72'S). El inicio y final de la estación reproductiva (ER) se verificó mediante inspecciones en el campo para detectar la aparición de las primeras hembras ovígeras, a partir de finales del invierno (principio de setiembre), y desaparición de las mismas a finales del verano e inicios del otoño (marzo/abril). En Mar Chiquita el estudio abarcó 2 estaciones reproductivas, 1998/99 (ER98/99) y 1999/2000 (ER99/00), en San Antonio Oeste, sólo la segunda.

Las variaciones en el volumen de los huevos durante el desarrollo y a lo largo de la ER se estimaron tomando muestras de 20 hembras, con una frecuencia aproximadamente quincenal en Mar Chiquita y en dos oportunidades (octubre y enero) en San Antonio Oeste. Las hembras se colocaron 24 horas en agua de mar para luego extraer una muestra de huevos para medir volumen. Se midieron los diámetros mayor (D) y menor (d) de 10 huevos en microscopio binocular con un ocular graduado (precisión 0.01 mm), con una magnificación de 100 x (este número se eligió en base a la experiencia con esta especie, en la que prácticamente no existe variación en el volumen de los huevos dentro de una misma camada). Se calculó su volumen como $V = d^2 \times D \times \pi/6$. También se determinó su estadio de desarrollo según la escala establecida previamente (ver escala de desarrollo, capítulo 3). Las rectas de las regresiones

estimadas entre el estadio de desarrollo y el volumen de los huevos se comparó entre todos los muestreos mediante un ANCOVA.

La estimación del volumen de los huevos de principio y fin de la ER en el estadio 1 de desarrollo se realizó con hembras ovígeras que llevaban embriones en ese estadio, o con hembras “vacías” que extruyeron sus huevos luego de dos o tres días en laboratorio. Los embriones de estas últimas fueron utilizados posteriormente para el estudio de los desarrollos embrionarios y larvales completos a distintas temperaturas. En Mar Chiquita estas hembras fueron colectadas a fin de setiembre y principios de octubre (inicio de la ER) y a fin de febrero (final de la ER). Para San Antonio sólo se contó con hembras de principios de noviembre (inicio de la ER).

Para evaluar el efecto de la temperatura, los embriones se cultivaron *in vivo*, es decir en el abdomen de las hembras, en laboratorio en agua de mar a 16 y 20°C, hasta su eclosión. Estas temperaturas se seleccionaron debido a que, por una parte, el desarrollo embrionario ya había sido observado a 20°C (para los embriones esta temperatura es habitual en el campo y el desarrollo es óptimo en laboratorio), y por otra, la temperatura del agua dentro de la laguna donde se encuentran las hembras ovígeras, no está por debajo de los 16°C durante la estación reproductiva (obs.pers.). Dentro de cada grupo, además del volumen inicial de los huevos, se registró la talla de la hembra portadora, medida como ancho de caparazón entre los extremos de las espinas laterales, con calibre, con una precisión de 0.1 mm. Con estos datos se estimó la significación de la correlación entre la talla de las hembras y el volumen inicial de los huevos mediante un ANOVA (H_0 : pendiente=0).

También se registró la duración del desarrollo embrionario. De las zoeas I resultantes de cada tratamiento se fijaron muestras en formol al 4% para ser tomadas luego algunas medidas morfométricas con microscopio binocular con ocular graduado (figura 5.1)

Además, se cultivaron lotes de 15 o 18 larvas provenientes de cada hembra mantenida en 16 y 20°C, en recipientes individuales con agua de mar desde zoea I hasta cangrejo I. La temperatura de cultivo larval fue de 20°C para las larvas provenientes de embriones mantenidos en esa temperatura. Las larvas provenientes de embriones mantenidos a 16°C, por su parte, se cultivaron en dos grupos, uno a 16°C y otro a 20°C, excepto para Mar Chiquita durante el inicio de la ER98/99 cuando las larvas eclosionadas en 16°C sólo se cultivaron en

20°C (ver resultados) . Las temperaturas de cultivo larval utilizadas fueron, por una cuestión práctica las mismas que las embrionarias, ya que se mantuvieron en las mismas cámaras de temperatura controlada.

De este modo se obtuvieron tres grupos de larvas:

- Alta temperatura de desarrollo embrionario (20 °C) y alta temperatura de desarrollo larval (20 °C): **A/A**.
- Baja temperatura de desarrollo embrionario (16 °C) y alta temperatura de desarrollo larval (20 °C): **B/A**.
- Baja temperatura de desarrollo embrionario (16 °C) y baja temperatura de desarrollo larval (16 °C): **B/B**.

Los dos últimos grupos corresponden a larvas provenientes de las mismas camadas de embriones, separadas y colocadas luego en dos temperaturas de desarrollo larval. Por lo tanto, comparten la variabilidad entre camadas.

En cada caso se registró la mortalidad, duración de cada período intermuda y talla de los cangrejos I resultantes. Los cangrejos I fueron congelados 24 hs después de la muda y se midió, bajo lupa con un ocular graduado (precisión = 0.05 mm), el largo de su caparazón entre el extremo distal del rostro y la sutura abdominal.

Aún cuando el análisis estadístico más apropiado para comparar estos datos hubiera sido un ANOVA anidado teniendo en cuenta las diferencias entre hembras, los diferentes números de réplicas de cada condición y la heterogeneidad de varianzas y/o el desvío de la normalidad no lo permitieron (las transformaciones realizadas no modificaron estos parámetros en todos los casos). Por ello se realizaron test de t comparando pares de condiciones ($\alpha=0.05$). Cuando el número de datos era elevado (volúmenes de los huevos, tallas de las zoeas y cangrejos, períodos intermuda), los resultados de los test de t se consideraron válidos aún cuando no se cumpliera el supuesto de normalidad, dado que en estas condiciones el test continúa siendo robusto, no así en el caso de heterogeneidad de varianzas (Underwood, 1997). Los datos de mortalidad porcentual se transformaron (como arcoseno de x) para lograr homogeneidad de varianza y normalidad, pero dado el bajo número de datos (número de camadas por tratamiento) el poder estadístico de los tests fue bajo y los resultados se discuten en cada caso. No se realizaron tests no paramétricos debido a que según Underwood (1997), este tipo

de análisis tampoco es válido en esas condiciones y no mejora por ello la calidad de las estimaciones.

Resultados

1. Variación en el volumen de los huevos durante la estación reproductiva

1.1. Embriones de Mar Chiquita

Se colectaron hembras ovígeras al inicio y al final de la ER98/99 y al inicio de la ER99/00. Se encontraron diferencias para el inicio de las dos estaciones sucesivas, siendo más grandes los huevos en la ER98/99 que en la siguiente (volúmenes promedio para el estadio 1: 0.014 y 0.011 mm³ para las estaciones 98/99 y 99/00 respectivamente).

La comparación de los volúmenes promedio de los huevos del inicio y final de la ER 1998/99, para el estadio 1 (entre 1 y 4 días después de la extrusión), dió como resultado una diferencia significativa (t test, $p < 0.0001$), siendo los primeros 24% más grandes (figura 5.2).

La pendiente de la regresión entre el volumen inicial de los huevos y la talla de la hembra correspondientes al inicio de la ER98/99 y de la ER99/00 no fue significativamente diferente de cero ($r^2 = 0.0012$, $F = 0.007$, $p = 0.93$ para el inicio de la ER98/99; $r^2 = 0.04$, $F = 0.7$, $p = 0.4$ para el inicio de la ER99/00) (figura 5.3).

Para la población de Mar Chiquita, la ER99/00 se inició aproximadamente el 15 de setiembre y concluyó alrededor del 30 de marzo. En ese período se tomaron 9 muestras de 20 hembras ovígeras cada una. La primera de ellas el 4 de noviembre, aproximadamente 50 días después de detectadas las primeras hembras ovígeras, y la última el 23 de marzo, cuando el porcentaje de hembras ovígeras en la población muestreada fue menor del 10%. Cuando se observaron las variaciones del volumen de los huevos en todos los estadios de desarrollo registrados a lo largo de toda la ER, se encontró que la disminución del volumen no fue paulatina (figura 5.4). Los huevos de las primeras hembras ovígeras de la ER (hembras que extruyeron sus huevos durante los primeros 50 días de la ER) se diferenciaron de todos los restantes. Así por ejemplo, la comparación del volumen de huevos en estadio 3 de desarrollo, (el primero representado en todas las muestras), a lo largo de la ER, mediante un ANOVA, dió como resultado una diferencia significativa entre los muestreos ($p < 0.0001$). Las comparaciones de medias efectuadas a posteriori (test de Student-Newman-Keuls) indicaron que los

volúmenes de los huevos en estadio 3 correspondientes al primer muestreo (4 de noviembre) fueron mayores que todos los restantes, mientras que los demás no se diferenciaron entre sí excepto en un caso (26 de noviembre vs. 29 de diciembre (figura 5.4). Esta diferencia se mantuvo cuando se compararon los volúmenes de los huevos en estadio 8 ($p=0.001$). Si bien en este caso el número de datos es menor, porque este estadio estuvo menos representado en los muestreos ($n=6$), las únicas diferencias significativas que aparecieron en las comparaciones a posteriori, permitieron separar los huevos correspondientes al primer muestreo de cuatro de las cinco restantes muestras. Las pendientes de las rectas de los nueve muestreos por su parte, no difirieron estadísticamente entre sí (ANCOVA, $F=1.79$, $p=0.081$), indicando que los incrementos relativos del volumen durante el desarrollo embrionario no cambiaron a lo largo de la ER.

1.2. Embriones de San Antonio Oeste

Para la población de San Antonio Oeste, la ER99/00 se inició aproximadamente un mes más tarde que en Mar Chiquita y concluyó antes del 15 de marzo. En efecto, en esa fecha ya no se encontraron hembras ovígeras y, por lo tanto, no se pudo estimar el volumen de los huevos al fin de la ER. El volumen promedio de los huevos en estadio 1 de principio de la ER fue de 0.0207 mm^3 , 41% mayor que el de Mar Chiquita para el mismo período (t test, $p=0.0003$) (figura 5.5)

Para esta población tampoco fue significativamente diferente de cero la pendiente de la regresión entre la talla de las hembras y el volumen de los huevos portados por ellas ($r^2=0.0156$, $F=0.22$, $p=0.64$) (figura 5.6).

El rango de tallas de las hembras ovígeras de San Antonio Oeste fue más restringido que el observado en Mar Chiquita, posiblemente debido a diferencias latitudinales en el crecimiento de la especie. Las tallas máximas observadas, tanto de machos como de hembras maduras, son sensiblemente menores que en la otra población (observación personal), por lo que las tallas muestreadas pueden ser consideradas representativas del rango de tallas poblacionales.

Ya que sólo se obtuvieron dos muestras de huevos durante la ER, una en el principio (noviembre) y una en la mitad (enero), no se pudieron evaluar los cambios de volumen a lo largo de todo el período. Sin embargo, sí fue posible notar que se produjo, como en Mar

Chiquita, una importante disminución del volumen en todos los estadios de desarrollo (figura 5.7). Cuando se comparó mediante un ANOVA el volumen de los huevos en estadio 4 (el primero representado en ambas muestras) entre noviembre y enero, las diferencias fueron significativas ($F=6.59$, $p=0.03$). Los estadios de desarrollo más avanzados estuvieron escasamente representados en las muestras y no fue posible analizarlos estadísticamente. Sin embargo la tendencia se mantuvo hasta el estadio 9.

A diferencia de Mar Chiquita, aquí la comparación de las pendientes de ambas rectas indicó una diferencia significativa ($F=49.7$, $p<0.000$), con un incremento de volumen menor durante el desarrollo de los huevos de mitad de la ER.

2. Efecto de la temperatura sobre el desarrollo embrionario y larval

2.1. Embriones y larvas de Mar Chiquita

Para la población de Mar Chiquita, se obtuvieron los desarrollos embrionarios y larvales de cuatro camadas (de cuatro hembras diferentes) del inicio y cuatro del final de la ER98/99, en cada una de las dos temperaturas experimentales de desarrollo embrionario (16 y 20°C). Posteriormente se obtuvieron tres camadas más en 20°C y cuatro en 16°C al principio de la ER99/00.

2.1.1. Duración del desarrollo embrionario.

La duración del desarrollo de estos embriones mantenidos en las dos temperaturas debió ser estimada, ya que los experimentos no se iniciaron en el momento de extrusión de los huevos sino cuando los mismos se encontraban en estadio 1 a 3. Así, de acuerdo al estadio de los huevos en el momento de iniciarse el experimento, se adicionó en el cálculo final el número promedio de días necesario para alcanzar dicho estadio a partir de la extrusión a 20 °C (según los experimentos previos, capítulo 3), cuando el desarrollo fue a esa temperatura. Cuando el desarrollo fue a 16 °C, se adicionó el doble de los días necesarios a 20 °C, en base al retardo observado en los estadios posteriores respecto al desarrollo a mayor temperatura.

Los tiempos totales estimados para el desarrollo de las camadas de Mar Chiquita al inicio de la ER, tanto en 20 como en 16 °C, no fueron diferentes entre los dos años sucesivos

muestreados (t test, $p=0.15$), por lo que se consideraron en conjunto. El tiempo de desarrollo embrionario en 20 °C fue de 19.7 ± 1.5 días, y en 16 °C 37.3 ± 2.3 días. Para el fin de la ER, los valores fueron similares, con 20.2 ± 1.2 días y 37.6 ± 2.1 días para 20 y 16 °C respectivamente. Esto es, un retardo promedio de 88% con una disminución de 4°C.

2.1.2. Tamaño de las zoeas I.

Cuando se analizó el tamaño de las larvas zoea I resultantes de cada desarrollo se encontró, por una parte, que en concordancia con la disminución en el tamaño de los huevos, el tamaño de las larvas del fin de la ER fue menor que el de las larvas del inicio de la misma, para ambas temperaturas de desarrollo embrionario (t test, $p<0.0001$ en ambos casos).

Para el inicio de la ER, donde se contó con muestras de dos años sucesivos, se vieron diferencias interanuales en el tamaño larval. Aún cuando las hembras correspondieron en ambos casos al primer grupo de ovígeras de la estación, las larvas de 1998 fueron significativamente más grandes que las de 1999 considerando las medidas lateral y dorsal (ANOVA, $p=0.000$ para las medidas lateral y dorsal), por ello los dos grupos se analizaron separadamente (medida lateral figura 5.8 A). Las otras dos medidas, (dorsoventral y rostral) resultaron ser, a diferencia de las primeras, muy variables dentro de cada camada y por ello poco útiles para describir la talla larval. La observación de los promedios y desvíos de las tallas de las zoeas I originadas de embriones desarrollados a distintas temperaturas en cada época (inicio de ER98, final de ER98, inicio de ER99) no mostró diferencias notables (figura 5.8 A y B). Sin embargo, la significación estadística de estos resultados no pudo estimarse debido a la falta de normalidad y/u homogeneidad de varianzas (las transformaciones no mejoraron la distribución de los datos)

Se comparó el tamaño de los huevos, medido como volumen o como diámetro de los mismos, con el de las larvas resultantes durante la ER98/99 en la que se contaba con muestras de principio y fin de la misma ER. Se encontró que ambos grupos de datos tuvieron varianzas diferentes, siendo mayores las de los huevos sometidos a baja temperatura durante el desarrollo embrionario. Es decir, el tratamiento tuvo, al menos, el efecto de aumentar la varianza de las tallas de las larvas resultantes (figura 5.9). El bajo número de puntos no permitió establecer la significación estadística de la posible correlación entre las variables.

2.1.3. Desarrollo larval

Todas las camadas de larvas eclosionadas a 20°C fueron cultivadas a la misma temperatura durante el desarrollo larval completo, hasta cangrejo 1 (AA). Las larvas eclosionadas en 16°C al principio de la ER98/99 se cultivaron a 20°C (BA) mientras que las del segundo año (ER99/00) se cultivaron tanto a 20°C (B/A) como a 16°C (B/B). Las larvas eclosionadas a 16°C al fin de la ER98/99 se cultivaron a 20°C (B/A) y a 16°C (B/B).

En algunos de los cultivos aparecieron zoeas supernumerarias (zoeas V). Este estadio extra se encontró en 8 individuos de tres camadas distintas de B/B, y en 2 individuos de dos camadas distintas de B/A, del inicio de la ER. Para el fin de la ER totalizaron 10 individuos de tres camadas distintas, todos de B/B. Las zoeas V mudaron a megalopa en el 75% de los casos y cuando estas megalopas mudaron a cangrejo 1 produjeron individuos normales de mayor talla que el resto de los individuos de la misma camada (tabla 5.1).

2.1.3.1. Supervivencia larval

La mortalidad observada en todas las condiciones experimentales fue sumamente variable entre camadas. También varió entre los dos años sucesivos muestreados a inicio de la ER. Ésto produjo que en la mayoría de las comparaciones el poder estadístico de los test de t fuera muy bajo. Por ello se indican a continuación sólo aquellas tendencias claras evidenciadas en las comparaciones entre temperaturas de desarrollo embrionario, larval y ER. La totalidad de las comparaciones realizadas y los resultados de los test correspondientes se resumen en la tabla 5.2. Para la comparación de los valores de mortalidad, éstos fueron transformados (transformación arcoseno).

Se encontraron dos picos de mortalidad durante el desarrollo larval: la fase de zoea I, especialmente los dos primeros días de cultivo, y la de megalopa. En el primer caso la mortalidad porcentual frecuentemente alcanzó valores de 10 o 20 %, en ambas temperaturas experimentales (aunque los máximos valores se dieron en camadas cultivadas a baja temperatura durante el desarrollo embrionario y/o larval). En las etapas intermedias, entre zoea II y zoea IV, la mortalidad fue siempre baja (menor de 10%). Finalmente, durante la fase de

megalopa, se dio una alta mortalidad (mayor del 80%) en tres de las camadas del lote B/A de principio de la ER del primer año (Figura 5.10 A y B).

La mortalidad larval total (acumulada hasta el estadio de megalopa) fue menor cuando tanto los embriones como las larvas se cultivaron a 20°C (lote A/A) al inicio de la ER. El test sólo fue válido para la comparación entre temperaturas de desarrollo embrionario (A/A vs. B/A), y cuando se consideraron los datos de las dos estaciones reproductivas sucesivas en conjunto ($p=0.03$), pero la tendencia se observó en los dos años sucesivos (Figura 5.10A).

También al inicio de la ER, la mortalidad total del lote B/B fue aparentemente mayor que la del lote B/A (figura 5.10A), aunque no pudieron aplicarse test estadísticos.

Llamativamente, para el fin de la ER la mortalidad total no varió entre temperaturas de desarrollo embrionario ni larval (diferencias no significativas: $p=0.93$ para la comparación A/A-B/A; $p=0.93$ para la comparación A/A-B/B; $p=0.39$ para la comparación B/A-B/B;Figura 5.10B).

2.1.3.2. Duración del desarrollo larval

En este caso, como con la mortalidad, se indican sólo las tendencias más claras de los resultados y la totalidad de las comparaciones realizadas se resumen en la tabla 5.3.

La duración total del desarrollo larval (acumulada entre la eclosión y la muda a cangrejo 1 no difirió entre larvas provenientes de embriones desarrollados a 16°C o a 20°C cuando las larvas se cultivaron en alta temperatura (comparación A/A-B/A), aunque el test estadístico sólo fue aplicable para los datos de fin de la ER98/99 ($p=0.15$).

En cambio, la duración del desarrollo larval fue mucho mayor a 16°C que a 20°C, independientemente de la temperatura de desarrollo embrionario (comparaciones B/B-B/A y B/B-A/A, figura 5.11) . El test estadístico sólo fue válido para la comparación B/A-B/B para el inicio de la ER99/00 ($p<0.0001$). El alargamiento del desarrollo larval total se produjo por un aumento de aproximadamente 100% en todos los períodos intermuda desde zoea I a megalopa.

2.1.3.3. Talla de los cangrejos 1

La comparación de la talla de los cangrejos 1 resultantes de cada condición de cultivo embrionario y larval también se vio dificultada por la variabilidad entre camadas. En este caso

también se presentan las tendencias más claras y la totalidad de las comparaciones se resumen en la tabla 5.4.

Los cangrejos provenientes de embriones cultivados a 16°C fueron significativamente menores que los provenientes de embriones cultivados a 20°C al comienzo de la primera estación reproductiva pero no al fin de la misma ni al comienzo de la segunda (Figura 5.12). Sin embargo, casi la totalidad de los cangrejos que conforman el lote B/A del primer año provienen de una única camada, ya que en las restantes la mortalidad fue muy alta, y ese resultado debe considerarse con cuidado.

Por su parte los cangrejos 1 del lote B/B fueron significativamente más pequeños que los de los lotes A/A ($p=0.003$) y B/A ($p=0.002$), para el fin de la ER, pero no al principio de la misma. En este caso la sobrevivencia sí fue buena y el número de cangrejos en todos los lotes comparable, por lo que el resultado no presenta dudas.

2.2. Embriones y larvas de San Antonio Oeste

Para la población de San Antonio Oeste sólo se obtuvieron los desarrollos embrionarios y larvales de tres camadas A/A, cuatro B/A y cuatro B/B del principio de la ER.

2.2.1. Duración del desarrollo embrionario

La estimación de la duración del desarrollo embrionario se hizo del mismo modo que en la población de Mar Chiquita. El mismo insumió en promedio 22.3 ± 4.1 días en 20°C y 41 ± 3.2 días en 16°C. Eso significa un 83.7% más de tiempo para una diferencia de 4°C de temperatura.

2.2.2. Tamaño de las zoeas I

La comparación de las medidas corporales de las larvas resultantes de cada temperatura de desarrollo embrionario indicó una diferencia significativa para las medidas lateral y dorsal ($p=0.004$ y $p=0.000$ respectivamente), siendo en ambos casos mayores las larvas eclosionadas a 20 °C. Para las medidas dorsoventral y rostral las diferencias no fueron significativas ($p=0.66$ y $p= 0.16$ respectivamente). El poder de los test de t fue muy bajo para estas últimas medidas, pero los promedios de cada grupo fueron muy similares y en ambos ligeramente mayores los

de las larvas provenientes de baja temperatura. Como ejemplo se muestran las medidas laterales promedio de zoeas I de cada camada (figura 5.13). En comparación con las medidas promedio de las larvas de Mar Chiquita del inicio de la ER, las de la población de San Antonio Oeste fueron más grandes. Las diferencias fueron aproximadamente 4% en las eclosionadas a 20°C, y entre 2.8 y 7.4% las eclosionadas a 16°C (comparadas con las de inicio de la ER 98/99 y 99/00 respectivamente).

La relación entre el tamaño inicial de los huevos y la medida lateral de las larvas resultantes no pareció variar con la temperatura de desarrollo embrionario, si bien en este caso tampoco se pudo estimar un valor de r para cada grupo por el bajo número de puntos (figura 5.14.)

2.2.3. Desarrollo larval

No se encontraron estadios de zoea supernumerarios (zoea V) en ninguno de los cultivos. Todos los desarrollos siguieron la vía normal de cuatro zoeas.

2.2.3.1. Supervivencia larval

Se evaluó la mortalidad durante el desarrollo larval a 16 y 20°C de larvas provenientes de ambas temperaturas de desarrollo embrionario. Para esta población también se registró una alta mortalidad inicial en el estadio de zoea I. Cuando hubo mortalidad al final del desarrollo, ésta ocurrió principalmente en zoea IV (especialmente durante la muda a megalopa) (figura 5.15). Se observó poca variabilidad en la mortalidad entre camadas.

En este caso también los datos porcentuales se transformaron con la transformación arcoseno para llevar a cabo los test estadísticos. La comparación de la mortalidad total entre temperaturas de desarrollo embrionario indica que ésta fue menor en A/A (22.7%) que en B/A (35%) aunque el test de t no dió diferencias significativas ($p=0.18$); el poder estadístico del test fue muy bajo y por ello ese resultado debe considerarse con cuidado. La temperatura de desarrollo larval (comparación B/A, B/B) por su parte no afectó diferencialmente la mortalidad entre los estadios de zoea I a zoea III. Sin embargo tuvo un efecto muy importante al final del desarrollo, ya que ninguna larva desarrollada en 16 °C alcanzó el estadio de cangrejo 1, muriendo como zoeas IV (la mayoría) o megalopa (figura 5.15). Cuando se compararon A/A y B/B se obtuvo el mismo resultado.

2.2.3.2. Duración del desarrollo larval

La duración del desarrollo larval dependió de la temperatura, tanto de desarrollo embrionario como larval. La respuesta de las distintas camadas fue menos variable que en Mar Chiquita. La duración total del desarrollo larval fue significativamente menor en B/A que en A/A ($P=0.005$) (21.9 días y 22.8 días en promedio respectivamente). Cuando se analizaron los estadios por separado, se encontró que el período intermuda de las zoeas I fue significativamente mayor para B/A, mientras que para los restantes estadios la relación se invirtió (entre zoea III y megalopa, intermudas 3 y 4, las diferencias no fueron significativas pero hubo un bajo poder de los test de t). Esto dió como resultado un desarrollo total más corto. La comparación entre temperaturas de desarrollo larval (B/A-B/B), indicó un alargamiento significativo del desarrollo en B/B para todos los estadios intermuda alcanzados por estas larvas, es decir en los intermuda 1 a 4 (figura 5.16).

2.2.3.3. Talla de los cangrejos 1

El análisis de las tallas de los cangrejos 1 indicó que no hubo diferencias significativas entre A/A y B/A ($p=0.056$). En B/B ningún individuo llegó a cangrejo 1. Existió poca variación entre camadas (figura 5.17).

2.3. Comparación entre poblaciones

La mortalidad, cuando el desarrollo larval transcurrió en alta temperatura (lotes A/A y B/A), fue siempre menor en las larvas de San Antonio Oeste, donde la supervivencia en zoea IV y megalopa fue de 100% en todas las camadas (Figuras 5.10 y 5.15).

La duración del desarrollo (total y por estadios) fue menor en las larvas de San Antonio Oeste que en las de Mar Chiquita para los lotes A/A (diferencia en el total del 16%) y B/A (diferencia del 21%). Para el lote B/B, donde las larvas de San Antonio Oeste alcanzaron sólo al estadio de Zoea IV, la duración de cada intermuda fue algo mayor que para las de Mar Chiquita.

La talla de los cangrejos 1 de San Antonio Oeste fue alrededor de 10% mayor que los de Mar Chiquita.

Tablas y figuras

Tabla 5.1: Largo de caparazón promedio (LC) en mm, de las megalopas provenientes de zoeas V (M₅) y de zoeas IV (M₄), de los cultivos de inicio y fin de la ER. BA: lote de larvas provenientes de embriones desarrollados en baja temperatura (16°C) y cultivados en alta temperatura; BB: lote de larvas cuyo desarrollo embrionario y larval transcurrió en baja temperatura.

	LOTE			
	B/A		B/B	
	LC M ₅	LC M ₄	LC M ₅	LC M ₄
INICIO	1.53	1.41	1.42	1.38
FINAL	---	---	1.51	1.38

Tabla 5.2: Comparaciones realizadas con los datos de mortalidad total (acumulativa hasta megalopa) de las larvas de *C. granulata* de Mar Chiquita. Se comparó entre temperaturas de desarrollo embrionario y larval, entre el inicio de dos estaciones reproductivas sucesivas (ER 98/99 y ER 99/00), y entre principio y fin de la ER 98/99. Se indica la tendencia observada en los datos, el resultado del test de t correspondiente y/o la limitación para realizar dicho test. AA: lote de larvas cuyo desarrollo embrionario y larval transcurrió en alta temperatura (20°C); BA: lote de larvas provenientes de embriones desarrollados en baja temperatura (16°C) y cultivados en alta temperatura; BB: lote de larvas cuyo desarrollo embrionario y larval transcurrió en baja temperatura. NS: no significativo.

valores de:	comparación	significación estadística
AA	inicio ER98/99 > inicio ER 99/00	NS, bajo poder estadístico
BA	inicio ER98/99 > inicio ER 99/00	NS, bajo poder estadístico
AA	inicio ER98/99 < fin ER 98/99	NS, bajo poder estadístico
BA	inicio ER98/99 > fin ER 98/99	NS, bajo poder estadístico
inicio ER98/99	entre temperaturas de desarrollo embrionario	BA>AA
inicio ER99/00		BA>AA
inicio (ambas ER)		BA>AA
fin ER 98/99		BA~AA
inicio ER99/00	entre temperaturas de desarrollo embrionario y larval	BB>AA
fin ER 98/99		BB~AA
inicio ER99/00	entre temperaturas de desarrollo larval	BA~BB
fin ER98/99		BA~BB

Tabla 5.3: Comparaciones realizadas con los datos de duración total del desarrollo larval (acumulativa hasta cangrejo 1) de las larvas de *C. granulata* de Mar Chiquita. Se comparó entre temperaturas de desarrollo embrionario y larval, entre el inicio de dos estaciones reproductivas sucesivas (ER 98/99 y ER 99/00), y entre principio y fin de la ER 98/99. Se indica la tendencia observada en los datos, el resultado del test de t correspondiente y/o la limitación para realizar dicho test. AA: lote de larvas cuyo desarrollo embrionario y larval transcurrió en alta temperatura (20°C); BA: lote de larvas provenientes de embriones desarrollados en baja temperatura (16°C) y cultivados en alta temperatura; BB: lote de larvas cuyo desarrollo embrionario y larval transcurrió en baja temperatura. NS: no significativo.

valores de:	comparación	significación estadística	
AA	inicio ER98/99 > inicio ER 99/00	varianzas heterogéneas	
BA	inicio ER98/99 > inicio ER 99/00	varianzas heterogéneas	
AA	inicio ER98/99 ~ fin ER 98/99	NS, p=0.2	
BA	inicio ER98/99 > fin ER 98/99	varianzas heterogéneas	
inicio ER98/99	entre temperaturas de desarrollo embrionario	BA~AA	NS, bajo poder estadístico
inicio ER99/00		BA~AA	varianzas heterogéneas
inicio (ambas ER)		BA~AA	NS, bajo poder estadístico
fin ER 98/99		BA~AA	NS, p=0.15
inicio ER99/00	entre temperaturas de desarrollo embrionario y larval	BB>AA	varianzas heterogéneas
fin ER 98/99		BB>AA	varianzas heterogéneas
inicio ER99/00	entre temperaturas de desarrollo larval	BA<BB	p<0.0001
fin ER98/99		BA<BB	varianzas heterogéneas

Tabla 5.4: Comparaciones realizadas con los datos de talla de los cangrejos 1 (medido como largo de caparazón) de *C. granulata* de Mar Chiquita, provenientes de diferentes condiciones de cultivo. Se comparó entre temperaturas de desarrollo embrionario y larval, entre el inicio de dos estaciones reproductivas sucesivas (ER 98/99 y ER 99/00), y entre principio y fin de la ER 98/99. Se indica la tendencia observada en los datos, el resultado del test de t correspondiente y/o la limitación para realizar dicho test. AA: lote de C1 resultantes de larvas cuyo desarrollo embrionario y larval transcurrió en alta temperatura (20°C); BA: lote de C1 resultantes de larvas provenientes de embriones desarrollados en baja temperatura (16°C) y cultivadas en alta temperatura; BB: lote de C1 resultantes larvas cuyo desarrollo embrionario y larval transcurrió en baja temperatura. NS: no significativo.

valores de:	comparación		significación estadística
AA	inicio ER98/99 ~ inicio ER 99/00		NS p=0.7
BA	inicio ER98/99 < inicio ER 99/00		p<0.0001
AA	inicio ER98/99 ~ fin ER 98/99		varianzas heterogéneas
BA	inicio ER98/99 < fin ER 98/99		p<0.0001
inicio ER98/99	entre temperaturas de desarrollo embrionario	BA<AA	p<0.0001
inicio ER99/00		BA~AA	NS
fin ER 98/99		BA~AA	varianzas heterogéneas
inicio ER99/00	entre temperaturas de desarrollo embrionarioy larval	AA BB	NS, bajo poder estadístico
fin ER 98/99		AA>BB	p=0.003
fin ER 98/99	entre temperaturas de desarrollo larval	BA>BB	p=0.002
inicio ER99/00		BA~BB	NS, bajo poder estadístico

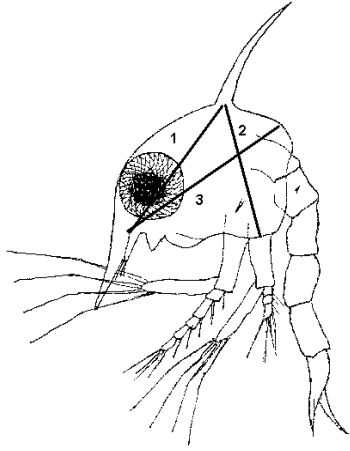


Figura 5.1. Dimensiones medidas en las zoeas 1 de *Chasmagnathus granulata*. 1: dorsal; 2: dorsoventral; 3: lateral

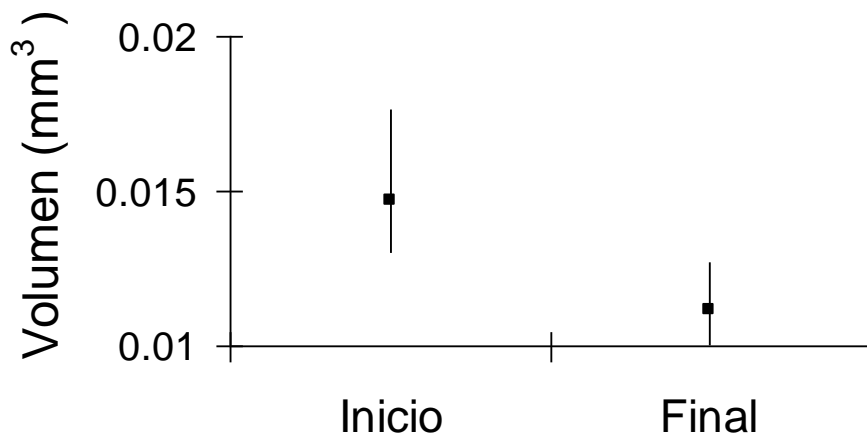


Figura 5.2. Volúmen (promedio y rango de variación) de los huevos en estadio I de hembras de *Chasmagnathus granulata* de Mar Chiquita, al inicio y final de la estación reproductiva 1998/99.

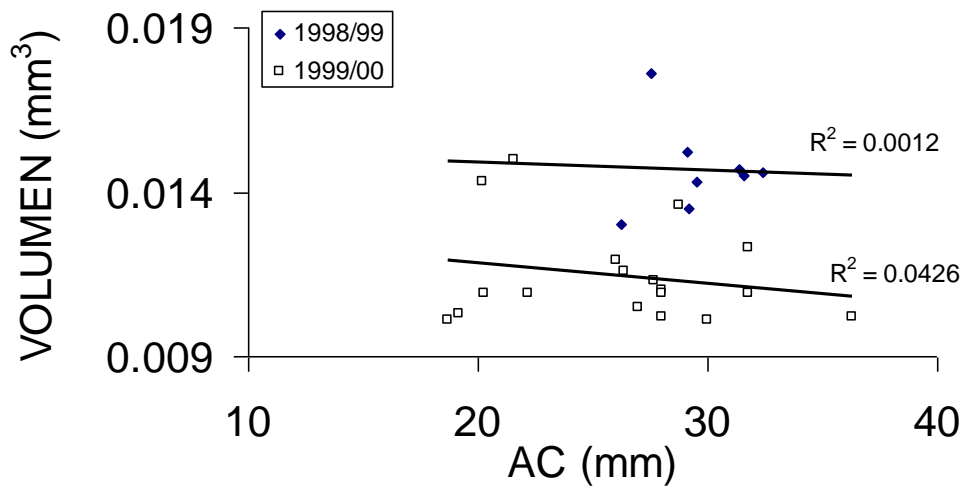


Figura 5.3. Relación entre la talla de las hembras de *Chasmagnathus granulata* (medida como ancho de caparazón, AC), y el volúmen de los huevos en estadio 1, al inicio de dos estaciones reproductivas sucesivas.

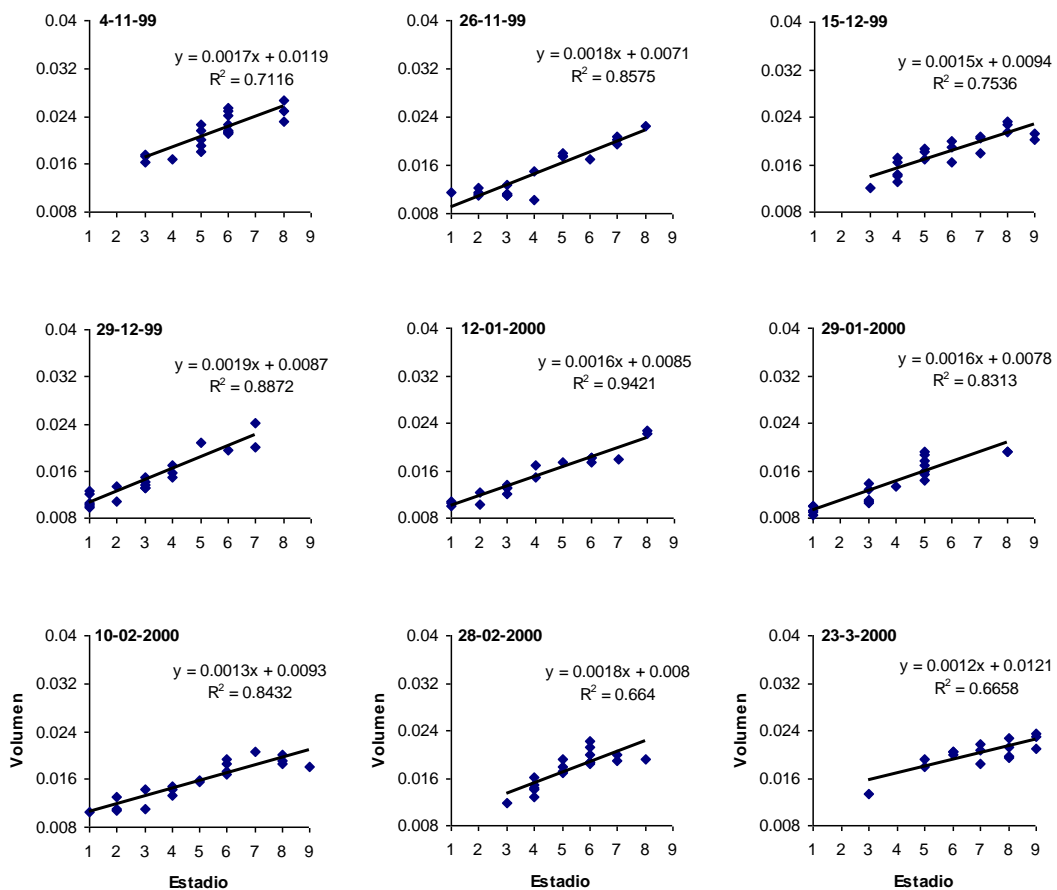


Figura 5.4. Volúmen (mm³) y estadio de desarrollo de los huevos (tabla 3.1) de hembras de *Chasmagnathus granulata* de Mar Chiquita durante la estación reproductiva 1999/2000. Cada punto representa el promedio de 20 medidas de los huevos de una hembra. Se estimó el valor de r² de la regresión lineal.

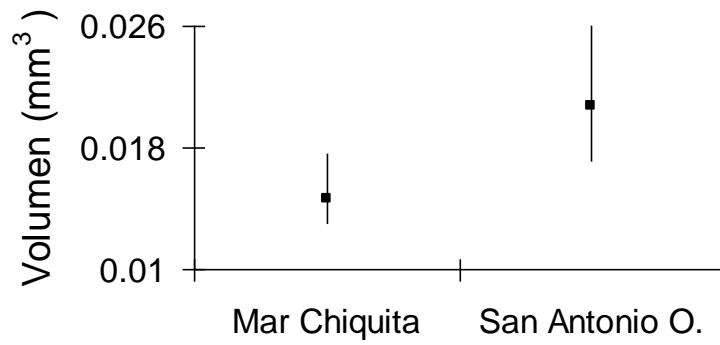


Figura 5.5. Volúmen (promedio y rango de variación) de los huevos en estadio I de hembras de *Chasmagnathus granulata* de Mar Chiquita y San Antonio Oeste, al inicio de la estación reproductiva 1999/2000.

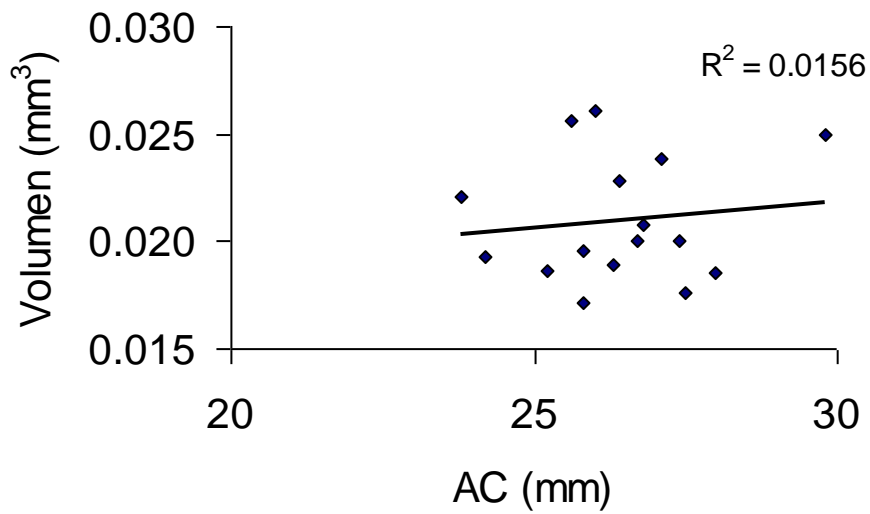


Figura 5.6. Relación entre la talla de las hembras de *Chasmagnathus granulata* de San Antonio Oeste (medida como ancho de caparazón, AC), y el volúmen de los huevos en estadio 1, al inicio de la estación reproductiva 1999/2000. Se estimó el valor de r^2 de la regresión lineal.

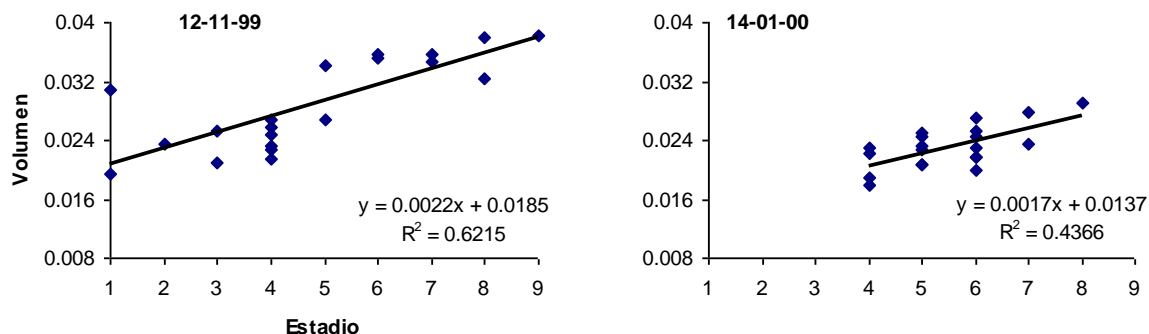


Figura 5.7. Volúmenes (mm^3) y estadio de desarrollo de los huevos (tabla 3.1) de hembras de *Chasmagnathus granulata* de San Antonio Oeste durante la estación reproductiva 1999/2000. Cada punto representa el promedio de 20 medidas de los huevos de una hembra. Se estimó el valor de r^2 de la regresión lineal.

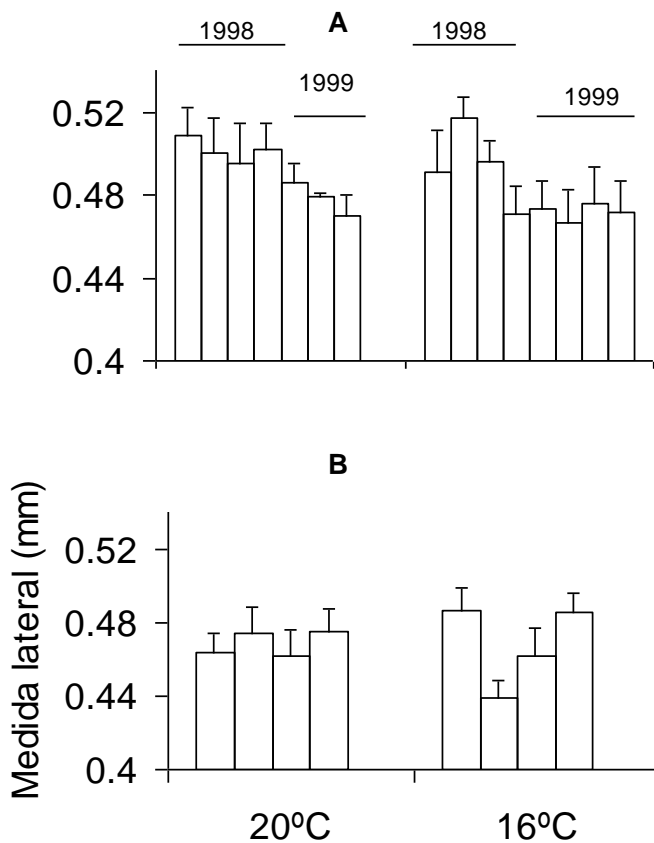


Figura 5.8. Medida lateral de las zoeas I de *Chasmagnathus granulata* de Mar Chiquita, eclosionadas de embriones cultivados en dos temperaturas y provenientes de hembras de principio (A) y fin (B) de la ER. Cada barra corresponde al promedio de 20 medidas de larvas de una misma hembra. Para el principio de estación reproductiva se utilizaron hembras de dos años sucesivos, 1998 y 1999.

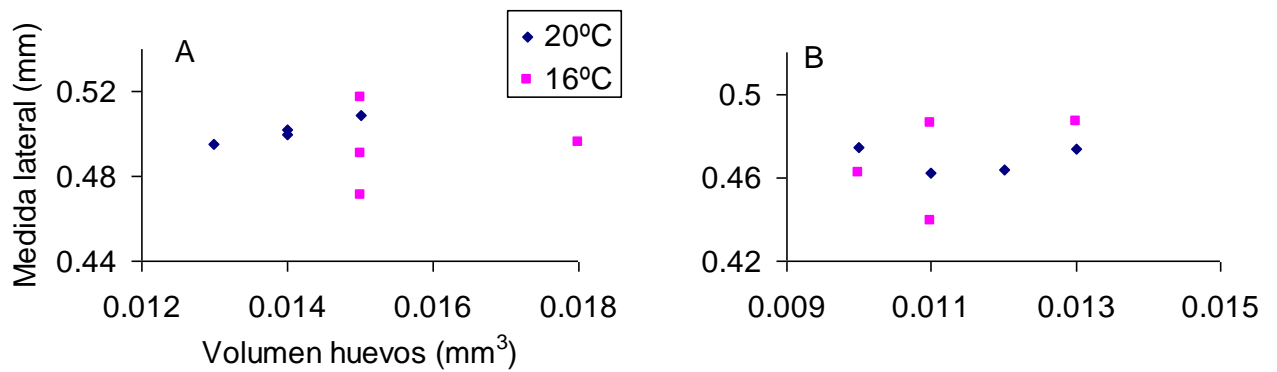


Figura 5.9. Relación entre el volumen inicial de los huevos y la medida lateral de las larvas de *Chasmagnathus granulata* de Mar Chiquita, resultantes del desarrollo de los embriones en 20 y 16 °C, para individuos del principio (A) y fin (B) de la estación reproductiva 1998/99. Cada punto corresponde a embriones y larvas de una hembra diferente.

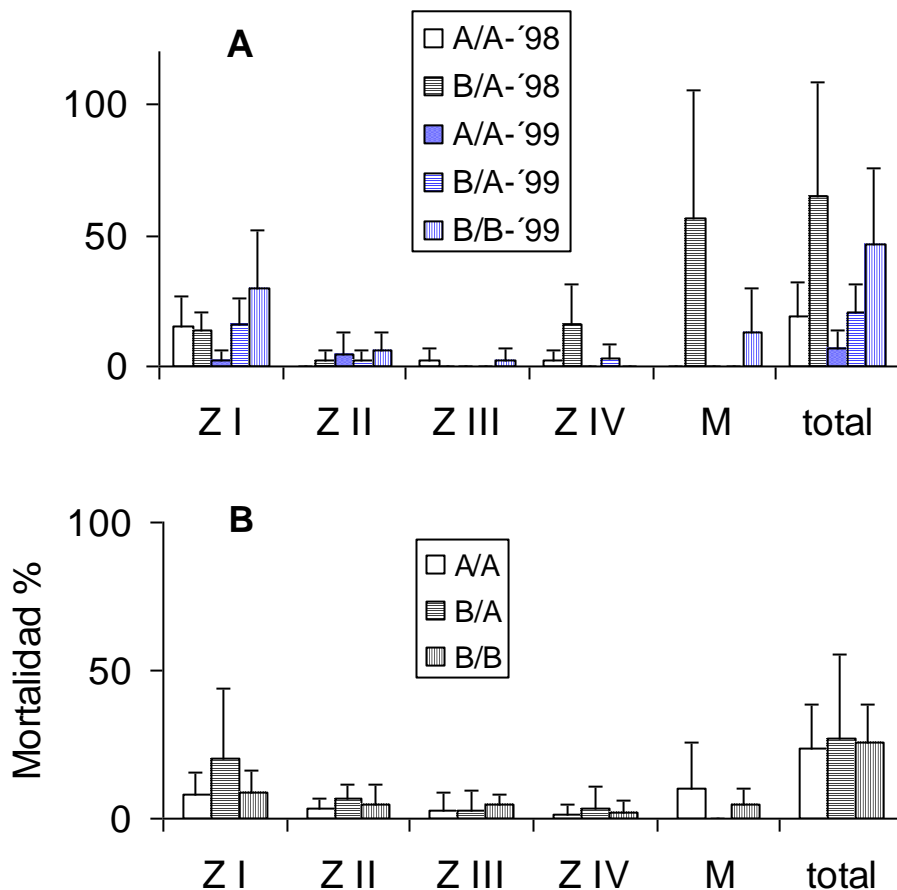


Figura 5.10. Mortalidad porcentual promedio y su desvío standard, en cada etapa larval, de las distintas camadas de *Chasmagnathus granulata* de Mar Chiquita, al inicio de las estaciones reproductivas 98/99 y 99/00 (A) y al final de la estación reproductiva 98./99 (B), cultivadas en dos temperaturas y provenientes de embriones desarrollados en dos temperaturas A/A: alta temperatura de desarrollo embrionario y larval (20/20°C). B/A: baja temperatura de desarrollo embrionario y alta temperatura de desarrollo larval(16/20°C).B/B: baja temperatura de desarrollo embrionario y larval (16/16°C).

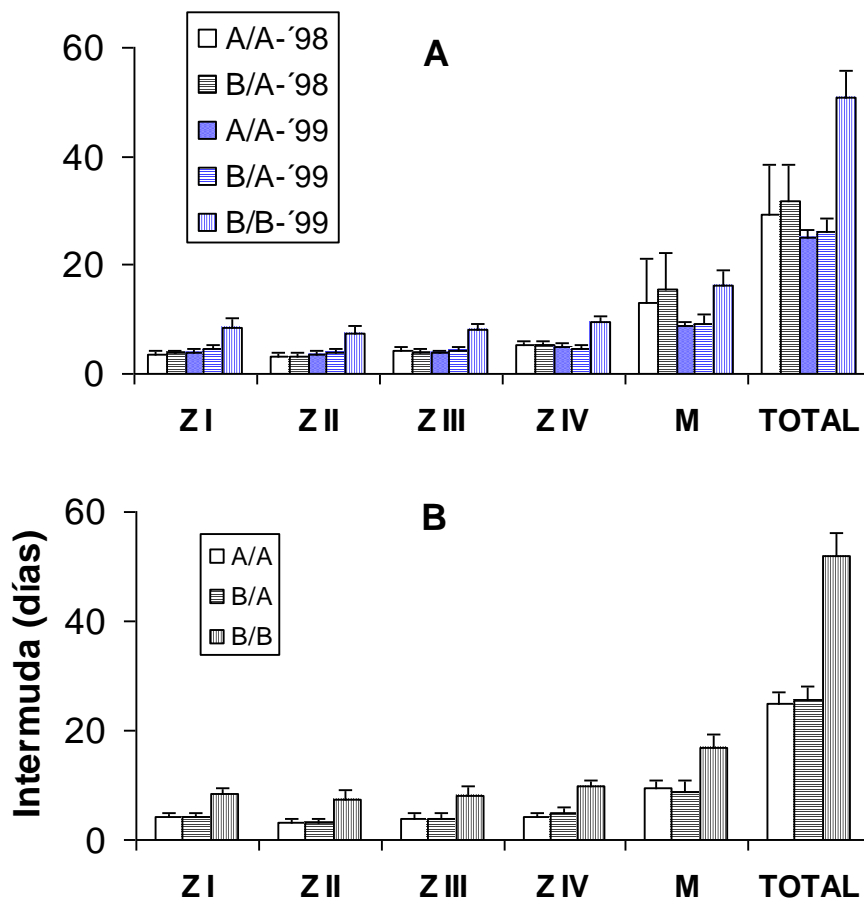


Figura 5.11. Duración de los estadios de intermuda (y su desvío standard) de las diferentes etapas larvales y duración total del período larval de *Chasmagnathus granulata* de Mar Chiquita al inicio de las estaciones reproductivas 98/99 y 99/00 (A) y al final de la estación reproductiva 98./99 (B), cultivadas en dos temperaturas y provenientes de embriones desarrollados en dos temperaturas. A/A: alta temperatura de desarrollo embrionario y larval (20/20°C). B/A: baja temperatura de desarrollo embrionario y alta temperatura de desarrollo larval(16/20°C).B/B: baja temperatura de desarrollo embrionario y larval (16/16°C).

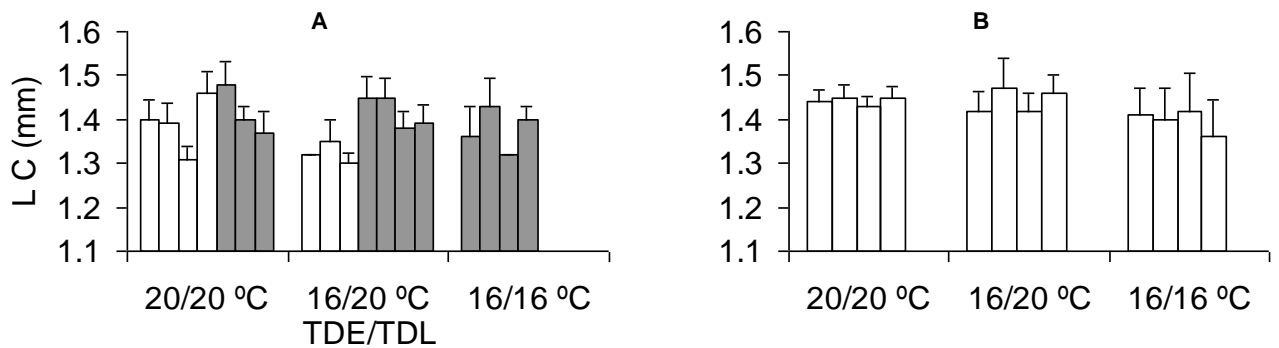


Figura 5.12. Talla (medida como largo de caparazón) de los cangrejos 1 de *Chasmagnathus granulata* de Mar Chiquita resultantes de los distintos desarrollos larvales del inicio (A) y fin (B) de la estación reproductiva. TDE: temperatura de desarrollo embrionario; TDL: temperatura de desarrollo larval. Las barras blancas representan las camadas de la estación reproductiva 98/99, las grises las de la estación reproductiva 99/00.

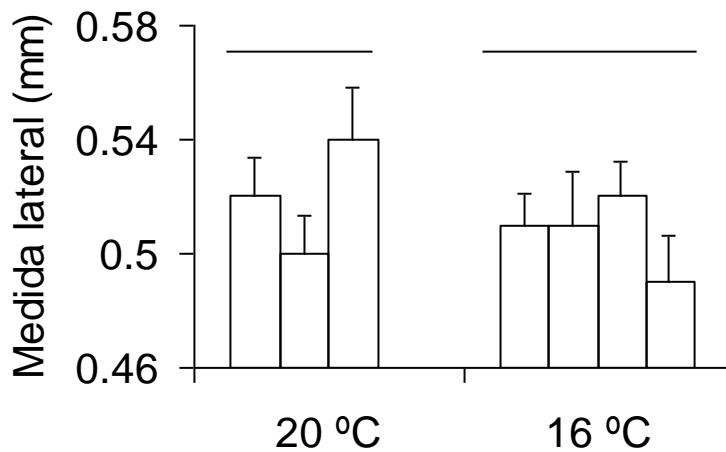


Figura 5.13. Medida lateral de las zoeas I de *Chasmagnathus granulata* de San Antonio Oeste de principio de la estación reproductiva, provenientes de embriones desarrollados en 20 y 16 °C. Cada barra corresponde al promedio de 10 medidas de larvas de una misma hembra. Las líneas horizontales indican el resultado del test de t entre temperaturas

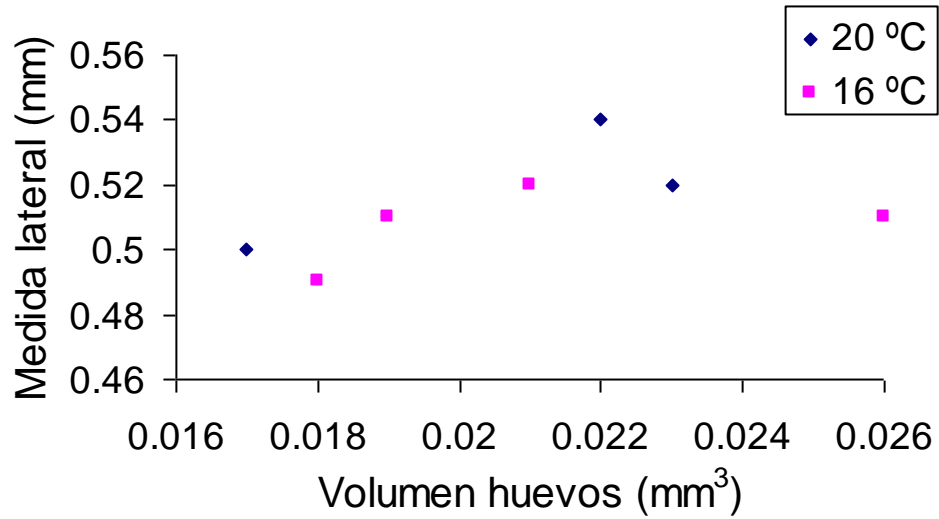


Figura 5.14. Relación entre el volumen inicial de los huevos y la medida lateral de las larvas de *Chasmagnathus granulata* de San Antonio Oeste, resultantes del desarrollo de los embriones en 20 y 16 °C, para individuos del principio de la estación reproductiva. Cada punto corresponde a embriones y larvas de una hembra diferente.

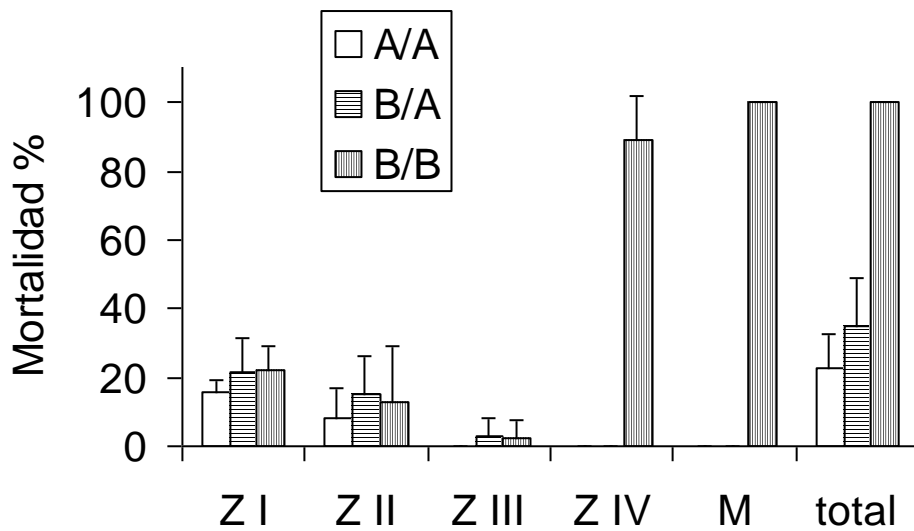


Figura 5.15. Mortalidad porcentual promedio y su desvío standard, en cada etapa larval, de las distintas camadas de larvas de *Chasmagnathus granulata* de San Antonio Oeste, cultivadas en dos temperaturas y provenientes de dos temperaturas de desarrollo embrionario. A/A: alta temperatura de desarrollo embrionario y larval (20/20°C). B/A: baja temperatura de desarrollo embrionario y alta temperatura de desarrollo larval(16/20°C).B/B: baja temperatura de desarrollo embrionario y larval (16/16°C).

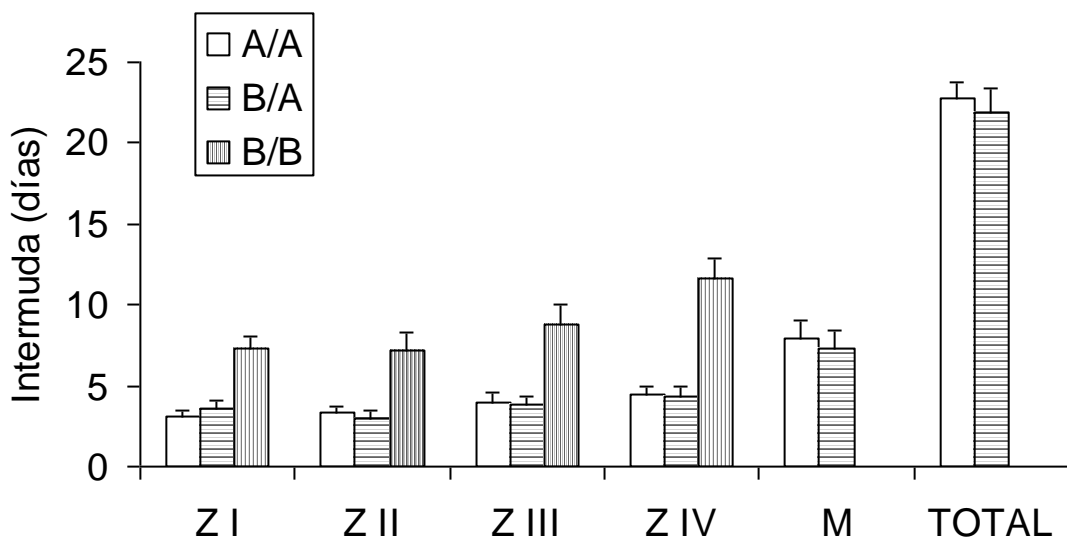


Figura 5.16. Duración de los estadios de intermuda (y su desvío standard) de las diferentes etapas larvales y duración total del período larval de *Chasmagnathus granulata* de San Antonio Oeste. Cada serie corresponde a una condición de temperatura de cultivo embrionario y larval. A/A: alta temperatura de desarrollo embrionario y larval (20/20°C). B/A: baja temperatura de desarrollo embrionario y alta temperatura de desarrollo larval(16/20°C).B/B: baja temperatura de desarrollo embrionario y larval (16/16°C).

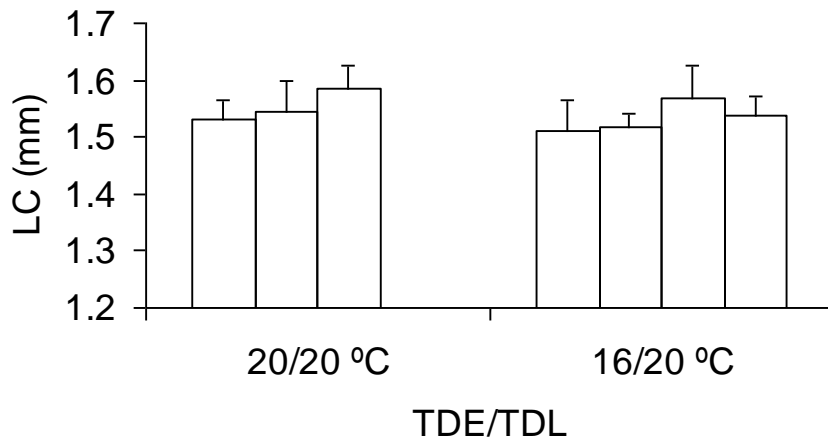


Figura 5.17. Talla (medida como largo de caparazón) de los cangrejos 1 de *Chasmagnathus granulata* de San Antonio Oeste, resultantes de los distintos desarrollos larvales. TDE: temperatura de desarrollo embrionario; TDL: temperatura de desarrollo larval.

Discusión:

Los resultados del presente capítulo ponen en evidencia que algunos caracteres que definen la historia de vida de los organismos, como el tamaño de embriones y larvas, varían a lo largo de la estación reproductiva (ER), así como entre individuos dentro de una población y entre poblaciones, en *Chasmagnathus granulata*. Del mismo modo, aunque sin una correlación evidente con esos caracteres, varía la respuesta larval de esta especie a la temperatura.

Variación en la talla de huevos y larvas.

Para la población de Mar Chiquita, la evaluación del volumen de los huevos, tanto al inicio del desarrollo como a lo largo del mismo, mostró una importante variabilidad entre camadas de diferentes hembras, para un mismo momento dentro del ciclo anual de reproducción de la especie. Tal variación no se relaciona con la talla de las hembras, por lo que otra serie de posibles factores experimentados por las hembras, tanto genéticos como ambientales, (condiciones de temperatura, salinidad, alimentación, etc.) deben ser considerados como base de esta variabilidad. Para San Antonio Oeste por su parte, el volumen inicial tampoco se correlaciona con la talla de las hembras, pero a diferencia de la primera población la variación entre camadas fue escasa y el volumen promedio de cada estadio mayor que el de Mar Chiquita para una misma etapa de la ER.

Las hembras de *C. granulata* se reproducen repetidamente a lo largo de cada ER (entre setiembre y marzo en Mar Chiquita y entre octubre y febrero en San Antonio Oeste), con intervalos aproximados de 15 días entre la eclosión de una camada de larvas y la extrusión de la siguiente (en laboratorio, a 20 °C; Bas, obs. pers.). En ambas poblaciones se observó un cambio en el volumen promedio de los huevos de cada estadio particular a lo largo de la ER. En Mar Chiquita existió una disminución abrupta del mismo a partir de los 50 días aproximadamente de iniciada la misma, esto es, a partir de la segunda camada de huevos de cada hembra (excepto las primíparas que se incorporen al pool reproductivo en ese momento).

En San Antonio Oeste, no se determinó si tal cambio ocurría también abruptamente o era más gradual pero las diferencias en los volúmenes promedio entre principio y mitad de la ER fueron también importantes. Varios son los factores que podrían determinar este cambio en el

volumen de los huevos. Si la disminución del tamaño de huevos está asociada a una disminución del esfuerzo reproductivo, uno de tales factores es la duración de la vitelogénesis. Si ésta se iniciara durante el invierno, antes de que comience la actividad reproductiva, el primer ciclo ovárico sería más largo y con mayor posibilidad de acumulación de vitelo que los restantes. Otro es el estado nutricional de las hembras, considerando que la actividad (incluida la alimentación) de las hembras parece estar disminuida mientras portan sus huevos (obs. pers.), sería esperable que la acumulación de reservas de las hembras, de la que depende la subsecuente producción de huevos (Harrison, 1990), fuera menor a partir de la extrusión de la primera camada de huevos. Sin embargo, el cambio en el volumen no necesariamente implica un esfuerzo reproductivo menor ya que podrían estar produciéndose un número mayor de huevos más pequeños a partir de la segunda camada, con un esfuerzo reproductivo igual o mayor, y en tal caso la respuesta debería buscarse posiblemente en relación a las condiciones ambientales y nutricionales a enfrentar por las larvas resultantes, como fue planteado por Willows (1987) para los huevos de *Ligia oceanica* y por Boddeke (1982) para los huevos y larvas de *Crangon crangon*. En este caso no se cuenta con la información necesaria para contrastar cualquiera de las hipótesis.

El tamaño de las zoeas eclosionadas de los huevos del principio y el resto de la temporada estuvo relacionado directamente con el tamaño de los huevos, larvas más grandes en promedio, eclosionaron de los huevos más grandes de principio de temporada. Las diferencias encontradas entre años sucesivos en el tamaño, tanto de huevos como de larvas de Mar Chiquita, podría indicar que este carácter está sujeto a las condiciones ambientales presentes dentro y fuera del período reproductivo, las cuales no son idénticas cada año. Para San Antonio Oeste, se han observado huevos y larvas de principio de la estación reproductiva 97/98 que resultaron ser notablemente mayores que los hallados en este estudio (Bas, Obs. pers.), lo que indicaría la misma variación interanual para ésta población.

Efecto de la temperatura sobre el desarrollo embrionario.

El efecto de la temperatura sobre la duración del desarrollo embrionario ha sido ampliamente estudiado en los braquiuros (Wear, 1974). Dentro de cierto límite de temperaturas no letales, un incremento de la misma acelera el desarrollo embrionario y una disminución lo

retarda. Lo mismo se encuentra para *C. granulata* en las dos temperaturas analizadas. El retardo ocasionado por una disminución de 4 °C en la temperatura de incubación parece ser mayor para los huevos de la población de Mar Chiquita aunque las imprecisiones en la estimación de la duración del período embrionario no permiten ser concluyentes. Por otra parte, los valores estimados coinciden con los resultados hallados para otros invertebrados y vertebrados así como crustáceos copépodos (para referencias ver Wear, 1974) donde huevos más grandes (de diferentes poblaciones de una misma especie) se desarrollan más lentamente a una misma temperatura. Las diferencias, si existieran, en la velocidad de desarrollo en relación con la temperatura de aclimatación de las hembras de principio y fin de temporada no han sido detectadas en este caso. Variaciones de este tipo han sido halladas en copépodos donde hembras de invierno y verano producen huevos de igual tamaño que se desarrollan a diferente velocidad para una temperatura dada en relación a la temperatura experimentada por las hembras (Landry, 1975) o, en otros casos, se suma el efecto de distintos tamaños de huevos para cada estación (Hart y Mc Laren, 1978). Aún otro efecto no considerado podría estar variando a lo largo de la estación reproductiva, como es la composición y metabolización de reservas de los huevos, la cual mostró ser diferente entre principio y fin de la estación en *Callinectes sapidus* (O'Leary Amsler y George, 1984b). Presumiblemente en relación con la temperatura experimentada por los embriones en cada momento, la proporción de lípidos, proteínas e hidratos de carbono así como su metabolización, varió en cada caso alcanzando al fin del desarrollo proporciones similares. Sería de interés entonces evaluar este conjunto de posibilidades abarcando el desarrollo embrionario desde la extrusión de los huevos en el laboratorio.

El tamaño larval parece estar influenciado por la temperatura de desarrollo embrionario, al menos en la población de Mar Chiquita. Si bien el número de muestras es bajo, parece encontrarse una diferencia en el rango de variación de la talla de las larvas respecto al volumen inicial de los huevos, comparando el desarrollo a 16 y 20°C, tanto al inicio como al fin de la ER. Para el desarrollo embrionario a 16 °C, se encuentra una mayor dispersión en el tamaño de las larvas resultantes tanto para los huevos más grandes del inicio como para los más pequeños del final de la ER (Figura 5.9). Las tallas de las zoeas I, para un volumen embrionario dado, fueron en algunos casos mayores y en otros más pequeñas que las resultantes del

desarrollo a 20°C. La baja temperatura estaría produciendo la aparición de diferentes fenotipos, en relación al menos al tamaño larval, diferenciación que no aparece cuando el desarrollo ocurre a una temperatura óptima. Pechenik (1984) encontró para el molusco *Crepidula fornicata* que el crecimiento larval a 18 °C producía mayor variabilidad en las tallas resultantes que cuando éste ocurría a 24 °C.

En las muestras de San Antonio Oeste, el tamaño inicial de los huevos de todas las camadas fue muy similar y, tanto para el desarrollo en 20 como en 16 °C de los embriones, la talla de las larvas resultantes varió independientemente del mismo. En este caso, otro factor, distinto de la temperatura de desarrollo embrionario estaría determinando la talla alcanzada por las larvas.

Efecto de la temperatura sobre el desarrollo larval.

El efecto de la temperatura sobre las larvas de *C. granulata* fue evaluado en laboratorio por Ismael *et al.* (1997) en individuos provenientes de Mar Chiquita. La temperatura óptima para todos los estadíos larvales fue 18 °C, aumentando la mortalidad con una disminución o un aumento de 3 °C. A 12 °C ya no se alcanzó el estadío de megalopa. Este estadío por su parte tuvo su máxima supervivencia a 24 °C, la mayor temperatura experimental utilizada. El tiempo de desarrollo de cada estadío disminuyó exponencialmente con la temperatura y la tasa respiratoria aumentó. Se concluyó que el patrón de tolerancia térmica de la especie coincide con su rango de distribución geográfica (región templada y subtropical, y en menor medida tropical) y las diferencias entre los estadíos larvales y la megalopa se relacionan con la estrategia de exportación larval y reingreso de megalopas a los estuarios. La temperatura actuaría como una pista para lograr ambas migraciones.

Las larvas sobrevivieron mejor cuando tanto el desarrollo embrionario como larval transcurrieron a 20°C al final de la ER en Mar Chiquita. Al comienzo de la misma, tanto en Mar Chiquita como en San Antonio Oeste, la temperatura de desarrollo embrionario no tuvo efecto significativo sobre la mortalidad en la etapa larval a 20 °C (pero el bajo poder de los test estadísticos no permite ser concluyentes). La mortalidad producida por la baja temperatura en la etapa larval fue sumamente variable entre camadas para la población de Mar Chiquita. Para San Antonio Oeste por su parte, la supervivencia fue siempre alta , excepto a partir de la fase

de megalopa, en baja temperatura (lote B/B), donde ningún individuo mudó a cangrejo 1, ya sea por efecto de la baja temperatura de desarrollo larval o de su combinación con la baja temperatura embrionaria.

La duración del desarrollo fue siempre menor en las larvas de San Antonio Oeste. En esta población la baja temperatura durante la fase embrionaria aceleró significativamente el desarrollo larval total. Este efecto no fue significativo en Mar Chiquita, aunque en este caso la variación entre camadas se superpuso a las diferencias entre tratamientos impidiendo conclusiones seguras. La baja temperatura durante la etapa larval por su parte, duplicó el tiempo necesario para alcanzar el primer juvenil en los individuos de Mar Chiquita, y produjo un retardo similar en el desarrollo hasta zoea IV alcanzado por las larvas de San Antonio Oeste.

Al fin de la ER, la talla alcanzada por los cangrejos 1 del lote B/B de Mar Chiquita fue significativamente menor que en los restantes, ya sea por efecto de la baja temperatura en la fase larval o por su combinación con la baja temperatura en la fase embrionaria. Al principio de la estación las diferencias no fueron significativas, aunque nuevamente la gran variación entre camadas impidió conclusiones seguras. Para las larvas de San Antonio Oeste por su parte, no se alcanzó la fase de cangrejo 1 en esa condición y los lotes B/A y A/A no difirieron entre sí en la talla de los cangrejos. Esa talla fue alrededor de 10% mayor que el promedio para Mar Chiquita al inicio de la ER.

El desarrollo normal de *Chasmagnathus granulata* incluye cuatro zoeas y una megalopa. En Mar Chiquita, pero no en San Antonio Oeste, aparecieron zoeas V, un estadio supernumerario, principalmente en camadas del lote B/B y en menor número del B/A. Estas zoeas fueron descritas por Pestana y Ostrensky (1995) en larvas provenientes de la Lagoa Dos Patos, Brasil, y atribuidas a condiciones de alimentación insuficiente o altas densidades de cultivo en laboratorio, las zoeas IV que dieron lugar a este nuevo estadio larval fueron más pequeñas que las que mudaron directamente a megalopa. En el presente estudio, si bien no se midieron las diferentes zoeas IV, cuando las zoeas V mudaron exitosamente a megalopa, éstas resultaron ser de una talla mayor que las provenientes de zoeas IV de la misma camada. Es posible que una disminución de la talla alcanzada por la zoea IV, por condiciones desfavorables (falta de alimento, stress osmótico o térmico, etc.), sea el disparador de un estadio supernumerario que produciría una megalopa con la talla mínima necesaria para desarrollarse exitosamente en

condiciones desfavorables, o un alargamiento del período larval aumentaría las chances de encontrar un ambiente más adecuado donde asentarse (Hadfield y Strathmann, 1996).

Son evidentes varias diferencias en el comportamiento frente a distintas temperaturas durante la etapa embionaria y larval entre las dos poblaciones estudiadas. Es posible que otras diferencias hayan quedado oscurecidas por efecto de la variación entre camadas presente en Mar Chiquita, rasgo que a su vez representa una diferencia muy notable entre ambas poblaciones. La temperatura es uno de los factores clave en el desarrollo y supervivencia de los invertebrados (Kinne, 1971), y es considerado el elemento rector de la variación latitudinal de diversos caracteres en poblaciones de amplia distribución. Sin embargo, si bien puede generalizarse que existe una disminución de la temperatura con un aumento de la latitud, pueden darse condiciones locales inversas. Este parece ser el caso para las dos poblaciones de *C. granulata* seleccionadas, ya que la mayor latitud de San Antonio Oeste no se correlaciona con una temperatura media del agua más baja sino que, por el contrario, los datos disponibles de temperatura promedio de la superficie del agua de San Antonio Oeste para algunos meses dentro de la ER 1994/95 (Estéves et al., 1996), indican que en aquella localidad es aproximadamente 4°C superior dentro de la bahía y algo más de un grado superior dentro del Golfo San Matías, que los promedios registrados para las costas de Mar del Plata. Al mismo tiempo, los promedios históricos de temperaturas máximas y mínimas del aire en las dos localidades muestran que, tanto las máximas como las mínimas, son más altas en San Antonio Oeste entre agosto y diciembre; esta relación se invierte entre febrero y junio y en enero son similares en ambos sitios. La menor tolerancia de las larvas de San Antonio Oeste a la baja temperatura seguramente refleja el hecho de que deben enfrentar temperaturas superiores durante su desarrollo, asumiendo que el mismo tenga lugar dentro de la bahía o de las aguas semicerradas del golfo. Otros rasgos poblacionales, como la menor duración de la estación reproductiva y la mayor talla de los huevos y larvas siguen el patrón normalmente asociado a la disminución de la latitud. Por su parte, la variabilidad encontrada en la respuesta de diferentes camadas en Mar Chiquita se encuentra posiblemente asociada con la heterogeneidad espacial y temporal de las condiciones ambientales en ese lugar, a diferencia de la homogeneidad presente en la otra localidad.

Finalmente, las diferencias detectadas entre larvas de principio y fin de la ER de Mar Chiquita, merecen ser estudiadas en detalle en ambas poblaciones, ya que el presente trabajo no permite establecer conclusiones al respecto.

Capítulo 6

Efecto de la salinidad experimentada durante el desarrollo embrionario sobre las larvas recién eclosionadas.

Introducción

Una de las características que permiten a una especie tolerar cambios en su medio ambiente es su capacidad de aclimatación, es decir de lograr una compensación de las alteraciones fisiológicas introducidas por la modificación de una o más variables ambientales, estableciendo un nuevo estado de equilibrio fisiológico (Prosser y Brown, 1968). A menudo se utiliza el término adaptación fisiológica para referirse a esta capacidad compensatoria que es resultado de la plasticidad fenotípica de una especie. Sin embargo parece más apropiado dejar el término adaptación exclusivamente para referirse al proceso evolutivo por el cual se seleccionan los individuos de una especie con una carga genética dada capaces de sobrevivir y reproducirse mejor bajo unas determinadas condiciones ambientales. También se suele diferenciar, aunque de un modo poco riguroso, entre *acclimatization*, la respuesta compensatoria a un conjunto dado de condiciones naturales, y *acclimation*, el mismo proceso en el laboratorio, en respuesta a condiciones experimentalmente impuestas (Willmer et al., 2000). La aclimatación lograda puede ser total o parcial de acuerdo a si el nuevo estado de equilibrio es igual o diferente del existente antes del cambio.

El fenómeno de aclimatación hace que la respuesta de un organismo ante un cambio en las condiciones de su ambiente dependa de su historia previa, esto es del conjunto de condiciones a las cuales estuvo sometido anteriormente y a las que se aclimató. En general, y dentro de ciertos límites, la aclimatación previa a condiciones por encima y por debajo del óptimo de una cierta variable permite a los individuos aumentar el rango de tolerancia desplazando los límites letales de esa variable hacia arriba y hacia abajo respectivamente. Tal capacidad puede ser fundamental en especies que se desarrollan en ambientes muy variables como un estuario o laguna costera.

El proceso de aclimatación puede dividirse en tres etapas: una respuesta inmediata, una fase de estabilización y un nuevo estado de equilibrio. Puede ser importante para alcanzar un nuevo estado de equilibrio que la exposición a las nuevas condiciones sea gradual en lugar de aguda, durante el proceso de estabilización (Kinne, 1964).

El estudio de la adaptación a la salinidad y temperatura durante el desarrollo embrionario y larval de cangrejos es un campo prácticamente inexplorado (Rosenberg y Costlow, 1979). Laughlin y French (1989a) encontraron que la aclimatación de embriones de *Rhithropanopeus harrisi* (Xanthidae) a salinidades altas y bajas en tres temperaturas daba como resultado larvas con diferencias de peso de hasta un 25 %, siendo la salinidad el factor dominante. Por su parte la supervivencia a lo largo de todo el desarrollo se vio afectada tanto por la temperatura como por la salinidad. Para cada temperatura, la supervivencia fué más alta en las salinidades de 15 a 20‰, óptimas para la especie y en aquella en que había ocurrido el desarrollo embrionario y la eclosión. Finalmente, la duración del desarrollo larval y el peso de las megalopas resultantes se vieron afectados por la temperatura y por la salinidad de cultivo de las larvas pero no por la salinidad de desarrollo y eclosión de los embriones.

Si los embriones de *Chasmagnathus granulata*, *Cyrtograpsus angulatus* y *C. altimanus* fueran capaces de aclimatarse a diferentes condiciones de salinidad, ésto debería verse reflejado en los límites de tolerancia a la salinidad de las larvas resultantes. Del mismo modo podrían encontrarse diferencias de peso o talla entre las larvas eclosionadas en distintas condiciones. Por su parte el efecto de la aclimatación podría verse reflejado en etapas posteriores del desarrollo larval. A su vez, la capacidad de aclimatación de individuos provenientes de poblaciones de latitudes diferentes podría ser distinto, respondiendo a las diferencias en las condiciones habitualmente experimentadas en cada sitio.

Objetivos

El primer objetivo de esta parte del trabajo fue el de evaluar la existencia de aclimatación en los embriones de *Cyrtograpsus angulatus*, *C. altimanus* y *Chasmagnathus granulata* de Mar Chiquita. Para ello, se estudió la supervivencia de larvas provenientes de embriones

desarrollados en tres condiciones de salinidad (baja, intermedia y alta), cuando fueron colocadas sin alimento durante 24 y 48 horas en una serie amplia de salinidades.

Por otra parte se estimaron los pesos secos y algunas medidas corporales de las zoeas I provenientes de los embriones desarrollados en distintas salinidades para determinar posibles diferencias morfológicas entre ellos.

En una segunda etapa se intentó establecer el tiempo necesario para lograr la aclimatación, cultivando embriones en una salinidad y cambiándolos a otra uno o pocos días antes de la eclosión. También se estimó la importancia de que la exposición a una salinidad diferente sea gradual en lugar de aguda, como en los experimentos anteriores.

Finalmente se intentó detectar si existen diferencias interpoblacionales en la respuesta a la salinidad de las larvas de *Chasmagnathus granulata*, comparando las provenientes de Mar Chiquita con las de San Antonio Oeste, dos sitios geográficamente distantes y con distintas condiciones ambientales

Desarrollo embrionario en una única salinidad y exposición aguda de las larvas.

Materiales y métodos

Las hembras con embriones, tanto extruídos en laboratorio como en el campo, de *Cyrtograpsus angulatus*, *C. altimanus* y *Chasmagnathus granulata* provenientes de Mar Chiquita se mantuvieron durante todo el desarrollo en una de las tres salinidades experimentales: 5, 32 ó 41 ‰. Cuando los huevos se encontraban cercanos al fin del desarrollo, las hembras eran revisadas diariamente y las que se hallaban a punto de eclosionar separadas en recipientes individuales con agua de la misma salinidad. Las eclosiones ocurrieron siempre entre las 18 horas y las 10 horas del día siguiente, presumiblemente durante la noche, lo que ocurre con mayor frecuencia en estas especies (Anger, com. pers.). Las larvas recién eclosionadas fueron separadas y divididas en tres grupos: 1) Larvas para medir supervivencia a distintas salinidades durante 24 y 48 horas (las tres especies), 2) Larvas para tomar medidas corporales (sólo *C. angulatus* y *C. granulata*) y 3) Larvas para medir el peso seco (sólo *C. angulatus* y *C. granulata*).

Las larvas del grupo 1 fueron colocadas inmediatamente en las diferentes salinidades según el siguiente esquema: 10 larvas por salinidad por frasco, en una serie que abarcaba 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 % de agua de mar (aproximadamente 3.4, 6.8, 10.4, 13.6, 17, 20.4, 23.8, 27.4, 30.6 y 34‰), y 5 réplicas de la serie.

Se utilizaron en total 550 larvas para *Chasmagnathus granulata*. En algunas réplicas de *Cyrtograpsus angulatus* y en todas las de *C. altimanus* el número de larvas disponibles fue menor, por lo que se usaron un mínimo de 5 larvas por recipiente y de tres réplicas de cada serie. Ésto se indica en cada caso en los resultados.

Las larvas se dispusieron en recipientes de 100 ml, con 75 ml de agua de la salinidad correspondiente, que fueron mantenidos en incubadora a 24 °C y con un fotoperíodo de 14 de luz y 10 de oscuridad. A las 24 y 48 horas las larvas de cada recipiente se observaron bajo lupa registrándose el número de individuos vivos y retirando los muertos.

Los porcentajes de supervivencia de las larvas, provenientes de todas las réplicas para cada salinidad de desarrollo embrionario, se graficaron en función de la salinidad a la que se expusieron las larvas. Los valores se ajustaron a un modelo de curva sigmoidea del tipo dosis-respuesta y se calculó el valor de salinidad letal 50 (SL₅₀), es decir la salinidad en la cual morían el 50 % de las larvas luego de 24 y 48 horas por medio de la siguiente fórmula:

$$y = m \times \frac{M - m}{1 + 10^{\frac{\log SL_{50} - x}{\log SL_{50} - x}}}$$

donde m es el valor de y en el plateau inferior y M el valor de y en el plateau superior .

Las larvas del grupo 2 fueron lavadas con agua destilada y conservadas a -20 °C hasta ser contadas y pesadas. De cada hembra se separaron varios grupos de 400 larvas. Cada grupo se colocó en una cápsula de aluminio previamente pesada y se llevó a estufa durante 24 horas a 80 °C; luego se pesó (precisión: 0.00001 g). Las diferencias entre salinidades y entre camadas para cada salinidad se evaluaron con un ANOVA anidado (Zar, 1984).

Las larvas del grupo 3 fueron conservadas en formol al 4% para tomar luego las cuatro medidas corporales que se indican en la figura 5.1 con un microscopio equipado con un ocular micrométrico. Se midieron 20 larvas de cada una de las hembras mantenidas en las tres salinidades experimentales. Los promedios de cada una de las cuatro medidas se compararon

entre salinidades y entre hembras con un ANOVA anidado. En caso de haber diferencias significativas se utilizó un test a posterior (Tukey) para verificar su procedencia (Zar, 1984).

Un esquema experimental similar se utilizó para zoeas I obtenidas de hembras de *Chasmagnathus granulata* provenientes de San Antonio Oeste, cuyo desarrollo embrionario transcurrió en laboratorio en 5, 32 y 41%. A diferencia del experimento anterior, las zoeas I no se pesaron, sólo se midieron.

Abreviaturas: S_e (salinidad de desarrollo embrionario), S_l (salinidad a la que fueron mantenidas las larvas durante 24 o 48 horas) y %AM (porcentaje de agua de mar).

Resultados

1. Supervivencia larval de *Chasmagnathus granulata* provenientes de Mar Chiquita

Los embriones eran llevados por hembras cuya maduración ovárica ocurrió en el campo, aproximadamente en la mitad del período reproductivo anual (enero-febrero). La extrusión de los huevos ocurrió en el campo o a los pocos días de cautiverio. Los embriones se desarrollaron con éxito en las distintas salinidades, y eclosionaron aproximadamente en el día previsto mediante la observación de los mismos. Se obtuvieron cuatro réplicas (larvas de cuatro hembras diferentes) por salinidad.

La supervivencia de las larvas en las salinidades más bajas durante las primeras 48 horas de vida fue fuertemente dependiente de la salinidad en la cual tuvo lugar el desarrollo embrionario. Los porcentajes de supervivencia de las larvas en todos los casos aumentaron desde 0%, en 0 ‰ S_l , hasta un máximo cercano a 100 % (figura 6.1, A-C).

El mayor rango de tolerancia se registró en las larvas que eclosionaron en 5‰ S_e , con valores de prácticamente 100 % de supervivencia en todas las salinidades entre 10 y 100 %AM, una variación casi nula entre réplicas y el mejor ajuste al modelo (24 horas: $R^2=0,989$). La SL_{50} a las 24 horas fue de 9,03 %AM (aproximadamente 3 ‰ S_l).

Las larvas eclosionadas en la salinidad de 32 ‰ S_e mostraron una menor tolerancia a salinidades bajas, con una SL_{50} de 29,11 %AM (aproximadamente 9,5 ‰ S_l) a las 24 horas, y mayor variación entre las réplicas, dando un ajuste bueno, pero con un coeficiente menor (24 horas: $R^2=0,822$). Finalmente las larvas eclosionadas en 41 ‰ S_e fueron las menos tolerantes a

las salinidades inferiores, con una SL_{50} de 39,11%AM (aproximadamente 13 ‰ S_1) a las 24 horas y un ajuste intermedio entre 5 y 32 ‰ S_e (24 horas: $R^2=0,921$).

Para los ensayos con 32 y 41 ‰ S_e la actividad de las larvas en la salinidad más baja en la cual había supervivencia era mínima: los individuos quedaban en el fondo sin capacidad de nadar. Los individuos activos se encontraban en salinidades más altas (flechas en la figura 6.1). En los embriones desarrollados en 5 ‰ S_e , en cambio, la mayoría de las larvas en la salinidad más baja en la que había supervivencia nadaban activamente.

En los tres casos el valor de la SL_{50} fué mayor a las 48 horas, indicando que la tendencia observada no se revirtió.

2. Peso seco y medidas corporales de las zoeas I de *Chasmagnathus granulata* de Mar Chiquita

El mayor peso seco de las larvas (promedio de las cuatro hembras para cada salinidad) fue hallado en 32 ‰ S_e , luego siguió el de 5 ‰ y el más pequeño en 41 ‰. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre las salinidades de desarrollo ($p=0,318$) pero sí entre larvas de distintas hembras para cada salinidad ($p=0,000$) (figura 6.2).

En tres de las cuatro medidas corporales consideradas se observaron diferencias estadísticamente significativas entre salinidades y en dos de ellas también entre camadas de distintas hembras (Tabla 6.1). Como ejemplo se muestra la medida dorsal (figura 6.3).

Cuando las diferencias de talla fueron estadísticamente significativas entre salinidades, se observó que las larvas de 5 y 41 ‰ S_e eran iguales entre sí y distintas de 32 ‰ para las medidas dorsal y lateral. Para la medida dorso ventral, el test a posteriori no discriminó las diferencias entre grupos. Siempre las medidas promedio de las larvas de 32 ‰ S_e fueron mayores que las de 5 ‰ y éstas a su vez mayores que las de 41 ‰, es decir, la misma relación que el peso seco.

3. Supervivencia larval de *Cyrtograpsus angulatus* de Mar Chiquita

En esta especie, la eclosión de los embriones no se alcanzó en todas las hembras colocadas inicialmente, ya que en todas las salinidades algunas de ellas perdieron la totalidad

de la masa de huevos. Finalmente se obtuvieron cuatro réplicas de cada salinidad de desarrollo.

También la supervivencia de las larvas de esta especie en las salinidades más bajas hasta las 48 horas de desarrollo fue dependiente de la salinidad en la cual transcurrió el desarrollo embrionario, aunque las diferencias entre 5 y 32 ‰ S_e no fueron tan grandes como en *Chasmagnathus granulata*.

Luego de 24 horas de cultivo, la menor supervivencia en bajas salinidades se registró en las larvas cuyo desarrollo embrionario transcurrió en 41 ‰ S_e . La SL_{50} fue de 38,8 ‰AM (aproximadamente 13,2 ‰ S_i). Pudo observarse en este caso que una de las réplicas tuvo baja supervivencia también en las salinidades mayores del 50 ‰AM (figura 6.4, C1).

La SL_{50} de las larvas eclosionadas en 32 ‰ S_e fue de aproximadamente 7 ‰ S_i con una supervivencia cercana al 100 % en las salinidades mayores a 30 ‰AM (10.2‰) (figura 6.4, B1).

Finalmente, para las larvas que eclosionaron en 5 ‰ S_e la SL_{50} fue de 9 ‰AM (aproximadamente 3 ‰ S_i). Notablemente, en este caso cinco larvas provenientes de una misma hembra lograron sobrevivir 24 horas en agua destilada (figura 6.4, A1).

El patrón de actividad de las larvas fue similar al observado en *C. granulata* (flechas en la figura). Las SL_{50} a las 48 horas fueron siempre mayores con una disminución de la supervivencia en todas las salinidades.

4. Peso seco y medidas corporales de las zoeas I de *Cyrtograpsus angulatus* de Mar Chiquita.

Para las larvas de *Cyrtograpsus angulatus* eclosionadas en las distintas salinidades se siguió el mismo procedimiento que con *C. granulata*. Los pesos secos de algunas muestras debieron descartarse por errores de pesada o instrumental, obteniéndose finalmente los pesos de las larvas provenientes de dos hembras desarrolladas en 5‰ S_e , tres de 32‰ y cuatro de 41‰. Las diferencias entre los pesos secos no fueron significativas entre salinidades ($p=0.058$) pero sí entre hembras para cada salinidad ($p=0.0006$) (figura 6.5).

Las medidas corporales obtenidas para esta especie indicaron diferencias significativas en todos los casos entre hembras para cada salinidad (Tabla 6.2). Como ejemplo se muestran los datos referidos a la medida dorsal (figura 6.6).

Entre salinidades sólo la medida dorsal y la lateral fueron significativamente diferentes, encontrándose en un test a posteriori que las larvas de 32 y 41‰ S_e eran iguales entre sí y diferentes de las de 5‰. Los mayores valores promedio de las medidas dorsal y lateral correspondieron a 5‰ S_e.

5. Supervivencia larval de *Cyrtograpsus altimanus*

Para esta especie sólo se logró la eclosión en 32‰ S_e. Se obtuvieron larvas de 4 hembras, totalizando 980 larvas repartidas entre las 11 salinidades. Los resultados muestran una SL₅₀ de 30.4%AM (10,3‰ S_i), similar a la de *C. angulatus*. A las 48 hs de cultivo la mortalidad aumentó sólo ligeramente (figura 6.7).

En 5‰ S_e los embriones completaron su desarrollo en alguno de los casos (4 camadas de 11 colocadas inicialmente), pero prácticamente no lograron eclosionar, obteniéndose sólo prezoas. No están descritas prezoas en condiciones normales de desarrollo y eclosión en laboratorio para el género. Sólo se obtuvieron 12 larvas de una de las hembras, las que se colocaron en 10 y 20 %AM (6 en cada salinidad) sobreviviendo 1 larva en 10 %AM (3.4‰) y una en 20%AM (6.8‰) a las 24 horas y 1 en 20 %AM a las 48 horas pero sin capacidad de nadar. No se realizó el cultivo en 41‰ S_e.

6. Supervivencia larval de *Chasmagnathus granulata* de San Antonio Oeste

El mismo esquema experimental utilizado para calcular la SL₅₀ anteriormente se utilizó para larvas de *Chasmagnathus granulata* provenientes de San Antonio Oeste. Se logró el desarrollo embrionario en las tres S_e. Sin embargo, 2 hembras murieron en 5‰ S_e y otras dos perdieron sus huevos al cabo de una semana de cultivo, habiéndose contaminado con *Lagenidium sp.* Finalmente se obtuvieron 6 replicas de larvas eclosionadas en 32‰ S_e, seis en 41‰ y cuatro en 5‰.

Para las larvas que eclosionaron en 5‰ S_e, los resultados fueron similares a los provenientes de Mar Chiquita en la misma condición, con una supervivencia cercana al 100% en todas las salinidades a partir de 10 %AM (3.4‰), con muy poca variación entre réplicas. Aunque a diferencia de las de Mar Chiquita, en una de las camadas se registró un 30% de sobrevivientes en agua destilada luego de 24 hs y un 13% luego de 48 hs. (figura 6.8, A1 y A2).

De las cuatro camadas utilizadas en este caso, dos provinieron de hembras ovígeras de la mitad del período reproductivo (enero) y otras dos, aunque fueron colectadas aproximadamente un mes antes, sin huevos, sólo se pusieron ovígeras al cabo de unos 20 días de cautiverio.

Para 32 y 41‰ S_e se contó con hembras de principio de la estación (noviembre) de 1997 y 1999, y hembras colectadas fuera de la estación reproductiva (principio de setiembre). La maduración ovárica y extrusión de los huevos de estas últimas ocurrió en el laboratorio, con condiciones de temperatura e iluminación de verano. Se encontraron marcadas diferencias en la respuesta (supervivencia larval) entre ambos grupos. Tanto para las provenientes de 32 como de 41‰, cuando sobrevivieron larvas en salinidades menores a 30‰AM (10.2‰), éstas correspondieron casi sin excepción (sólo una camada de 32‰ S_e de fuera de la estación) a camadas de inicio de la estación. En 30‰AM, la supervivencia de esas camadas fue en promedio más alta en ambas S_e . En las restantes salinidades (S_l) la supervivencia no guardó relación con el origen de las camadas, mostrando muy poca variación (entre 80 y 100%) (figura 6.8).

Las flechas en la figura 6.8 indican la salinidad en la cual la mayoría de las larvas nadaban activamente. En 6.8A y 6.8C (5 y 41 ‰ S_e) las diferencias entre camadas respecto a su actividad no fueron mayores a un 10 %, por lo que se indicó el promedio. En 32 ‰ S_e en cambio, la salinidad mínima de actividad de las diferentes camadas fue muy variable (entre 0% y 40% AM) por lo que no se indicó un promedio en la figura. Aún con estas diferencias, la variabilidad de la mortalidad entre camadas, a partir de 30‰AM de S_l (10.2‰) fue menor que la hallada para esta especie y para *C. angulatus* en Mar Chiquita.

7. Medidas corporales de las larvas de *Chasmagnathus granulata* de San Antonio Oeste.

Se obtuvieron las medidas corporales sólo de algunas de las camadas de larvas eclosionadas en 32 y 41‰ S_e y ninguna de 5‰, por inconvenientes con el material fijado. Las zoeas I obtenidas a partir de hembras recolectadas en setiembre, antes de la estación reproductiva, y que se pusieron ovígeras en el laboratorio, fueron significativamente más pequeñas que las provenientes de hembras recolectadas ovígeras en el campo en noviembre, en ambas salinidades ($p=0.02$ y $p<0.000$ para 32 y 41‰ S_e , respectivamente para la medida

dorsal). Para los dos grupos sin embargo se encontró que, como en Mar Chiquita, la talla de las larvas eclosionadas de embriones desarrollados en 32‰ S_e era mayor que la de los de 41‰ S_e. Se muestran como ejemplo las diferencias en la medida dorsal (figura 6.9).

La comparación entre salinidades utilizando la totalidad de las camadas medidas mostró diferencias no significativas para todas las medidas corporales y diferencias significativas entre camadas (hembras) (Tabla 6.3). No fue posible comparar los grupos por separado debido al bajo y diferente número de camadas en cada uno.

Discusión

1. Respuesta de las poblaciones de Mar Chiquita.

A partir de los resultados obtenidos se observa claramente que existe capacidad de aclimatación de los embriones de *Chasmagnathus granulata* y *Cyrtograpsus angulatus* a la salinidad. Así, las posibilidades de supervivencia de una larva en condiciones de baja salinidad serán mayores si su desarrollo embrionario ocurrió en las mismas condiciones. Este tipo de aclimatación podría ser sumamente importante en un ambiente como la laguna Mar Chiquita, donde se encuentran los adultos. Allí, es frecuente que las masas de agua de distinta salinidad no se mezclen y que las larvas deban permanecer más de 24 horas en una masa de agua dulce que no logra abandonar la laguna aún durante la bajamar (Anger *et al.*, 1994). Sin embargo, se observan variaciones en la supervivencia, las medidas corporales y el peso seco entre larvas provenientes de distintas hembras desarrolladas en una misma salinidad. Con referencia a la supervivencia, si bien la salinidad letal 50 (SL₅₀) fue calculada en base a la totalidad de puntos de las cuatro réplicas para cada condición de desarrollo, existió una importante variación entre las respuestas de cada camada individual, incluso en las salinidades (S_i) más altas (figuras 6.1 y 6.4).

Una excepción a esta variación entre camadas se observó en larvas de *Chasmagnathus granulata* provenientes de embriones desarrollados en 5 ‰S_e, ya que todas mostraron una supervivencia muy cercana a 100 % en todas las concentraciones mayores a 0‰AM. Existen al menos dos posibles interpretaciones para ese resultado: i) El desarrollo embrionario en la salinidad más baja "beneficia" a los embriones de modo tal que al eclosionar las larvas son más

vigorosas y más aptas para sobrevivir en cualquier salinidad, o ii) la eclosión de las larvas en 5‰ S_e daría origen a una "selección", de modo que sólo sobrevivirían los individuos más vigorosos de cada camada, eliminándose la variabilidad antes de iniciar el experimento. Los resultados sobre desarrollo embrionario no proporcionan evidencias de un supuesto "beneficio" de las bajas salinidades. Sin embargo, no se observó una disminución en la masa final de huevos que se desarrollaron a 5‰ S_e, lo que sugiere una baja mortalidad embrionaria, y tampoco se detectó una mortalidad de larvas en el momento de la eclosión, que fuera mayor a la observada en otras salinidades. Giménez (2000) encontró que el tiempo letal 50 (Lt₅₀) de las zoeas I de *C. granulata* provenientes de Mar Chiquita, en diferentes salinidades entre 5 y 32‰, era más variable entre camadas cuando éstas habían sido cultivadas durante el desarrollo embrionario en baja salinidad (15‰). Además encontró también aclimatación a la salinidad, evidenciada por el corrimiento del Lt₅₀ de acuerdo a la salinidad de desarrollo durante la etapa embrionaria.

La supervivencia de las larvas de *Cyrtograpsus altimanus* provenientes de embriones desarrollados en 32‰ S_e, en las diferentes salinidades también presentó una importante variación entre camadas. La imposibilidad casi total de obtener larvas a partir de embriones desarrollados en 5‰ S_e mostró claramente que esta especie tiene una tolerancia menor a las bajas salinidades, lo cual coincide con su aparición menos frecuente y en zonas de mayor salinidad promedio en la laguna Mar Chiquita (Spivak, 1999).

Sólo recientemente se han realizado algunas investigaciones sobre la capacidad de regulación durante la etapa embrionaria en crustáceos y los resultados son aún muy escasos, especialmente en decápodos. En *Homarus americanus* se determinó que es el aislamiento logrado por la cubierta embrionaria lo que permite a los embriones de esta especie continuar su desarrollo a bajas salinidades. Otros estudios sobre decápodos no son concluyentes respecto de la capacidad de regulación en esta etapa del desarrollo, aunque zoeas I de varias especies son capaces de hiperregular al momento de la eclosión. En anfípodos por su parte, se ha encontrado capacidad de osmoregulación especialmente en las últimas etapas del desarrollo embrionario (para revisión ver Charmantier, 1998).

La respuesta a la salinidad de los embriones en desarrollo, medida como talla y peso seco de la zoea I resultante, parece ser diferente en *Chasmagnathus granulata* y *Cyrtograpsus*

angulatus, al menos en lo referente a las salinidades bajas (5‰ S_e). En *C. granulata*, independientemente de las variaciones entre camadas, las larvas eclosionadas en 32‰ S_e son más grandes, luego le siguen las de 5‰ y, por último, las desarrolladas en 41‰ son las más pequeñas. Los pesos secos promedio no fueron estadísticamente diferentes. Para *C. angulatus* en cambio, las larvas provenientes de la salinidad más baja fueron las más grandes, y las de 32‰ y 41‰ S_e no difirieron entre sí. Los pesos secos, como en *C. granulata*, no fueron significativamente distintos entre salinidades. Esta mayor talla de las zoeas I de *C. angulatus* en una salinidad muy inferior a la experimentada normalmente por una especie marina, sin correlación con un peso mayor podría relacionarse con la absorción de agua por la larva, es decir con una menor capacidad del embrión y/o la larva de regular su volumen, mientras que el tamaño menor las zoeas I de *C. granulata* en salinidades altas y bajas parece indicar una capacidad de regulación osmótica de los embriones en baja salinidad y una osmoconformación en alta, sin embargo esto debería ir acompañado de cambios en el peso seco. Serían necesarias determinaciones más precisas y con un gran número de camadas para establecer si realmente existen tales diferencias. Giménez (2000), encontró que adultos de *C. granulata* mantenidos en agua de 15‰ de salinidad producían huevos más grandes que al eclosionar daban lugar a larvas más grandes que las producidas en agua de mar. Sin embargo, el aumento de volumen y peso seco de los embriones en la salinidad más baja, era proporcionalmente menor. Se postula por una parte que la exposición prolongada de los adultos a baja salinidad de algún modo podría estimular la producción de huevos más grandes, pero por otra, el menor incremento relativo en talla y peso de los embriones estaría indicando que el desarrollo en esa salinidad estaría dificultando la absorción de sales, produciendo un gasto metabólico extra en osmoregulación y/o desequilibrios metabólicos que disminuyeran la eficiencia. Laughlin y French (1989a) encontraron que el proceso de aclimatación de los embriones de *Rithropanopeus harrisi* a bajas salinidades involucraba una importante pérdida de peso (hasta un 25%) de las larvas zoea I resultantes, esto no está ocurriendo, al menos con igual magnitud, en ninguna de las especies estudiadas en este caso.

La capacidad de regulación osmótica de las larvas está directamente relacionada con su tamaño. Dada su relación superficie volumen, el stress, para una misma salinidad, será mayor cuanto más pequeña sea la larva y así cuanto mayor sea su superficie expuesta respecto de su

volumen. Las larvas de *C. angulatus* (y de *C. altimanus*) son, para cualquier salinidad, más pequeñas que las de *C. granulata*, y se esperaría que se vieran más afectadas por salinidades diferentes de la del agua de mar, considerando similares cubiertas corporales. Aún cuando *Chasmagnathus granulata* puede suponerse, por su distribución, como una especie más adaptada a ambientes estuariales que *Cyrtograpsus angulatus*, ésta última presenta una capacidad de aclimatación de los embriones a baja salinidad similar a la primera (con el mismo valor de SL_{50} para las zoeas I, y con larvas sobreviviendo excepcionalmente en agua destilada durante 24 hs. Además sus larvas tienen mejor supervivencia durante la primeras 48 hs en salinidades bajas, cuando eclosionaron en 32‰ S_e . Sin embargo, sería necesario evaluar la supervivencia larval a largo plazo, es decir durante todo el desarrollo larval, para establecer los posibles efectos de la baja salinidad durante esta primera etapa larval.

2. Respuesta de la población de *Chasmagnathus granulata* de San Antonio Oeste.

Las larvas de *Chasmagnathus granulata* provenientes de San Antonio Oeste mostraron también una alta capacidad de aclimatación a la salinidad en la cual transcurrió el desarrollo embrionario y la eclosión. Sin embargo, se evidenciaron diferencias en las respuestas respecto de las obtenidas en Mar Chiquita. En primer lugar, el tamaño de las larvas, cualquiera sea su época de origen, es mayor en San Antonio Oeste. Esta diferencia se acentúa considerando sólo las larvas de principio de temporada. Por otra parte, la supervivencia larval en todas las salinidades experimentales fue mayor, para una misma S_e , con una variación menor entre camadas fuera de las salinidades críticas (en salinidades mayores de 30 o 40 ‰; 10.2 o 13.6‰). Esta capacidad de tolerar bajas salinidades no está en concordancia con las condiciones ambientales a las que habitualmente están expuestos los organismos, que son una salinidad marina o agua hipersalina. El único rasgo que puede relacionarse con esas condiciones de vida es la mortalidad (y/o la pérdida de sus embriones) de algunas hembras colocadas en 5‰ de salinidad. En Mar Chiquita no se han detectado hembras incapaces de tolerar las bajas salinidades utilizadas en los experimentos, que hayan muerto o perdido sus embriones. Posiblemente la mayor tolerancia de las larvas de San Antonio Oeste se relacione en gran medida con la diferencia de tamaño entre ambas poblaciones, (Spicer y Gaston, 1999). La talla de las zoeas I en relación a la salinidad de cultivo embrionaria por su parte, mostró

como en Mar Chiquita, que cuando el desarrollo transcurre en 32‰, se obtienen larvas más grandes que en 41‰, sugiriendo ya sea un gasto energético mayor en osmoregular a altas salinidades, o una menor eficiencia metabólica a esa condición.

Por otra parte, existe una importante variabilidad en la respuesta de larvas de distintas camadas a las salinidades críticas de cultivo (0 a 30%AM), que no es explicable por diferencias en el tamaño, y que lleva a considerar otras interesantes cuestiones, tales como las diferencias estacionales y genéticas en las características de estos organismos.

Tiempo necesario para la aclimatación y efecto de la exposición gradual de las larvas a diferentes salinidades

Materiales y métodos

Tiempo de aclimatación

Se determinó el tiempo aproximado para lograr la aclimatación con embriones de *Chasmagnathus granulata* y *Cyrtograpsus angulatus* provenientes de hembras de Mar Chiquita, mantenidas en 5 y 32‰ de salinidad desde el principio del desarrollo embrionario. Las mismas se observaron diariamente hasta que se encontró que los embriones estaban próximos a la eclosión, cuando contaban con aproximadamente un 20% de vitelo sin consumir. En ese momento las hembras eran cambiadas de salinidad de 5 a 32‰ ó de 32 a 5‰ pasando por una salinidad intermedia (17‰) durante 24 horas. Los embriones eclosionaron entre 1 y 5 días después de colocarse en la salinidad final. Luego de la eclosión, las larvas se colocaron en diluciones entre 10 y 50% AM, rango donde se produjo la variación del valor de SL_{50} en el experimento anterior.

Aclimatación gradual

El efecto de la aclimatación gradual a las distintas salinidades experimentales se determinó con embriones de *Chasmagnathus granulata*, *Cyrtograpsus angulatus* y *C. altimanus* provenientes de Mar Chiquita, desarrollados en 32‰. Después de la eclosión las larvas fueron colocadas en grupos de 10, en salinidades de 10 a 50% AM, con 5 réplicas por hembra, pero pasando por una serie de salinidades hasta alcanzar la final según el siguiente esquema:

Salinidad final	Aclimatación 1,5 horas en salinidades de:			
50 % AM	25 ‰			
40 % AM	25 ‰	19 ‰		
30 % AM	25 ‰	19 ‰		
20 % AM	25 ‰	19 ‰	12 ‰	
10 % AM	25 ‰	19 ‰	12 ‰	5 ‰

Posteriormente se determinó la SL_{50} como en los anteriores experimentos.

Resultados

Chasmagnathus granulata

Cuatro hembras con embriones desarrollados en 32‰ de salinidad fueron colocadas en 5‰ entre 2 y 4 días antes de la eclosión. Igual cantidad de hembras, con embriones desarrollados en 5‰, fueron colocadas en 32‰ entre 1 y 4 días antes de la eclosión. En principio las réplicas (grupos de larvas provenientes de cada hembra) con distinto tiempo de desarrollo en la última salinidad fueron analizadas por separado. Sin embargo, como no se observaron diferencias entre las curvas individuales de SL_{50} , finalmente se trataron juntas. El valor de SL_{50} resultó entonces, como en el experimento anterior, del ajuste de los datos de las cuatro hembras para cada condición (figura 6.10, A y B). Los valores de SL_{50} en ambos casos fueron muy similares a los obtenidos en el experimento anterior de aclimatación a 5‰ de salinidad, aunque la dispersión de los datos fue mayor (figuras 6.10, A y B, y 6.1, A).

Para el experimento de aclimatación gradual de las larvas a las distintas salinidades experimentales se obtuvieron también cuatro réplicas. El valor de SL_{50} obtenido fue algo más alto que el correspondiente al de las larvas provenientes de embriones desarrollados en 5‰, aunque la supervivencia de las larvas aclimatadas gradualmente fue baja o nula en las cuatro réplicas en 10% AM (3.4‰). La supervivencia mejoró con respecto a los resultados obtenidos en el desarrollo embrionario a 32‰ y exposición aguda de las larvas. Sin embargo, la salinidad en la que la mayoría de las larvas fueron capaces de nadar prácticamente no varió entre las aclimatadas gradualmente y las expuestas directamente (figuras 6.10, C y 6.1, B).

En todos los casos la supervivencia a las 48 horas de exposición disminuyó y el valor de SL_{50} fué levemente mayor.

Cyrtograpsus angulatus

Se obtuvieron larvas de cinco hembras diferentes, cuyos embriones se desarrollaron en 32‰ de salinidad y eclosionaron en 5‰, entre 1 y 3 días después del cambio. Todas las réplicas se trataron juntas por no encontrarse diferencias entre ellas. El valor de SL_{50} fue similar al calculado para la aclimatación a 5‰ del experimento anterior pero la mortalidad en 10 y 20 % AM fue mayor (figuras 6.11, A1 y A2 y 6.4).

Se obtuvieron larvas de cuatro hembras cuyos embriones se desarrollaron en 5‰ y eclosionaron en 32‰. Varias hembras perdieron sus huevos en distintas etapas del desarrollo. La eclosión se produjo entre 2 y 5 días después del cambio. Las diferencias de supervivencia entre camadas fueron importantes. La mas baja supervivencia en 20% AM correspondió a las larvas que permanecieron 5 días en 32‰ antes de la eclosión, sin embargo esta camada presentó la más baja supervivencia en todas las salinidades. La curva se ajustó a la totalidad de puntos de las cuatro réplicas y el valor de SL_{50} fue de 19,6 % AM (6,7‰), similar al obtenido para el desarrollo y eclosión en 32‰, ya que prácticamente no hubo supervivencia en 10% AM (3.4‰) (figura 6.11, B1 y 2).

Finalmente para los huevos desarrollados en 32‰ y aclimatados gradualmente se obtuvieron cuatro réplicas. La aclimatación gradual no produjo cambios notorios en el valor de la SL_{50} respecto del obtenido para el desarrollo en 32 ‰ y exposición aguda a las salinidades experimentales (figuras 6.11, C y 6.4). Sin embargo la supervivencia en 20% AM (6.8‰) mejoró notoriamente en todas las réplicas cuando se aclimataron gradualmente, aunque la salinidad en la que fueron capaces de nadar no varió. La mortalidad a las 48 horas en todas las salinidades fue mayor para las aclimatadas gradualmente (figuras 6.11, C1 y 6.1).

Cyrtograpsus altimanus

Para esta especie sólo se estimó el efecto de la aclimatación gradual respecto de la exposición aguda a las diferentes salinidades. Se obtuvieron cuatro réplicas que totalizaron 600

larvas desarrolladas en 32‰ y aclimatadas gradualmente. La supervivencia a las 24 hs de cultivo mejoró notablemente respecto de la exposición aguda, siendo muy alta en 20 y 30‰ AM. Sin embargo, a las 48 hs la mortalidad en esas salinidades aumentó mucho acercándose el valor de SL_{50} al obtenido en las larvas expuestas directamente (figura 6.12, A y B y 6.7)

Tablas y figuras

Tabla 6.1. Resultado del Anova anidado para las cuatro medidas corporales tomadas a *Chasmagnathus granulata* de Mar Chiquita. *** diferencias significativas; ns no significativo

	Valor de p para cada medida corporal ($\alpha=0.05$)			
	Dorsal	Lateral	Dorso-ventral	Rostral
Entre salinidades	0.007 ***	0.004 ***	0.039 ***	0.53 ns
Entre hembras	0.001 ***	0.1 ns	0.000 ***	0.000 ***

Tabla 6.2. Resultado del anova anidado para las cuatro medidas corporales tomadas a *Cyrtograpsus angulatus*. *** diferencias significativas; ns no significativo

	Valor de p para cada medida corporal ($\alpha=0.05$)			
	Dorsal	Lateral	Dorso-ventral	Rostral
Entre salinidades	0.04 ***	0.008 ***	0.23 ns	0.81 ns
Entre hembras	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***

Tabla 6.3. Resultado del anova anidado para las cuatro medidas corporales tomadas a *Chasmagnathus granulata* de San Antonio Oeste.*** diferencias significativas; ns no significativo

	Valor de p para cada medida corporal ($\alpha=0.05$)			
	Dorsal	Lateral	Dorso-ventral	Rostral
Entre salinidades	0.26 ns	0.48 ns	0.39 ns	0.68 ns
Entre hembras	0.000 ***	0.000 ***	0.013 ***	0.000 ***

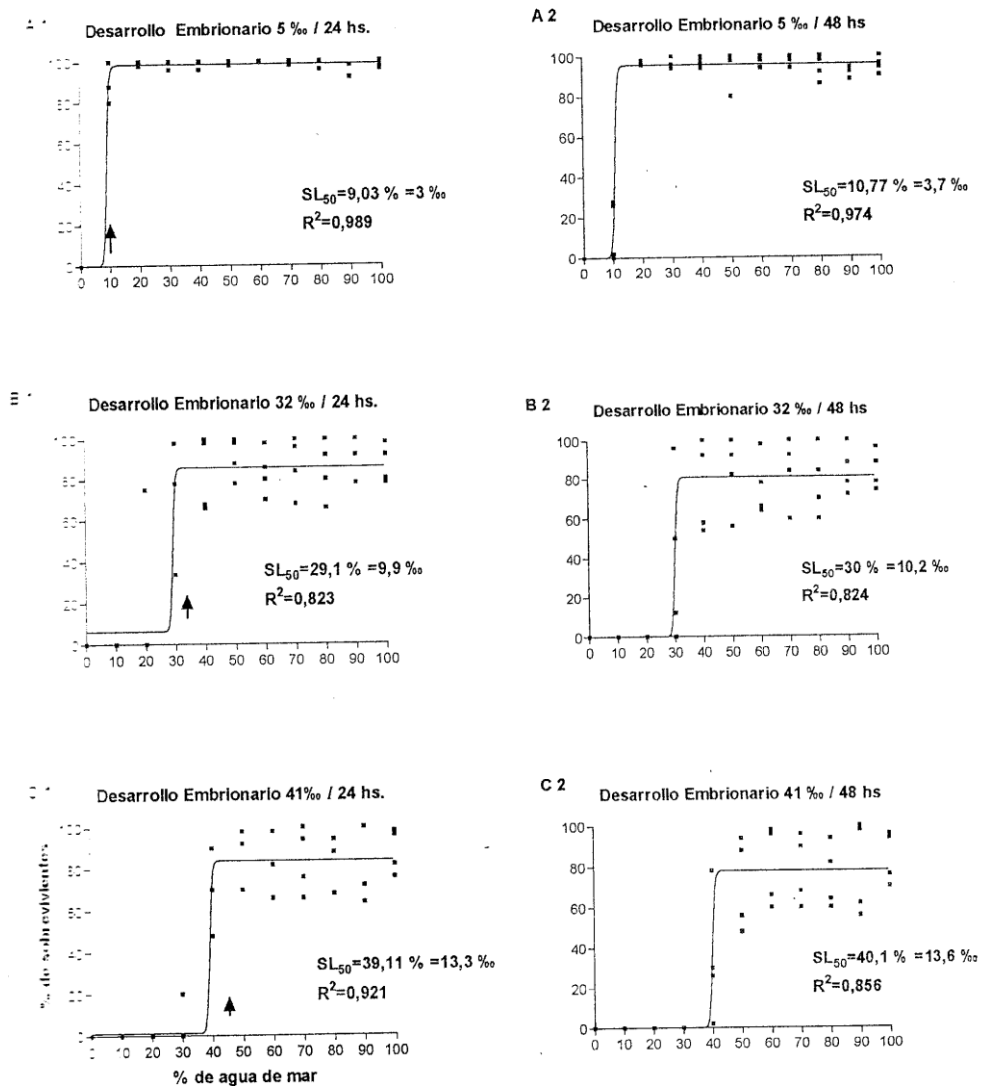


Figura 6.1. Porcentaje de supervivencia de las larvas de *Chasmagnathus granulata* de Mar Chiquita, provenientes de embriones desarrollados en 3 condiciones de salinidad (5, 32 y 41‰, A, B y C respectivamente), 24hs (1) y 48hs (2) después de la eclosión, en 11 salinidades diferentes (0 a 100% de agua de mar). Para cada salinidad de desarrollo embrionario se obtuvieron 4 réplicas correspondientes a larvas de 4 hembras diferentes. Los datos se ajustaron a una curva sigmoidea del tipo dosis-respuesta, de la que se calculó el valor de SL_{50} como la salinidad a la cual murieron el 50 % de los individuos. Las flechas indican la salinidad a partir de la cual la mayoría de los individuos nadaba activamente.

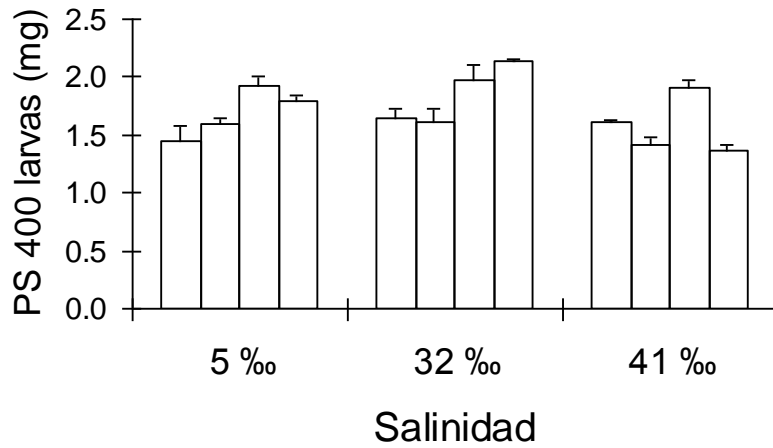


Figura 6.2. Peso seco de 400 zoeas I de *Chasmagnathus granulata* de Mar Chiquita, provenientes de embriones desarrollados en 5, 32 y 41 ‰ de salinidad. Cada barra corresponde al promedio de tres muestras provenientes de una misma hembra, con su correspondiente desvío.

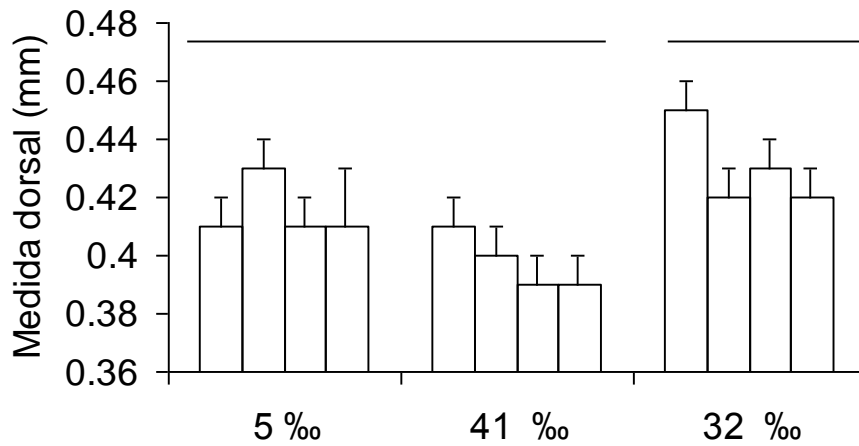


Figura 6.3. Medida dorsal tomada en zoeas I de *Chasmagnathus granulata* de Mar Chiquita, provenientes de embriones desarrollados en tres salinidades. Cada barra corresponde al promedio de 20 larvas de una misma hembra con su correspondiente error. Las líneas horizontales indican el resultado del test de Tukey para este caso.

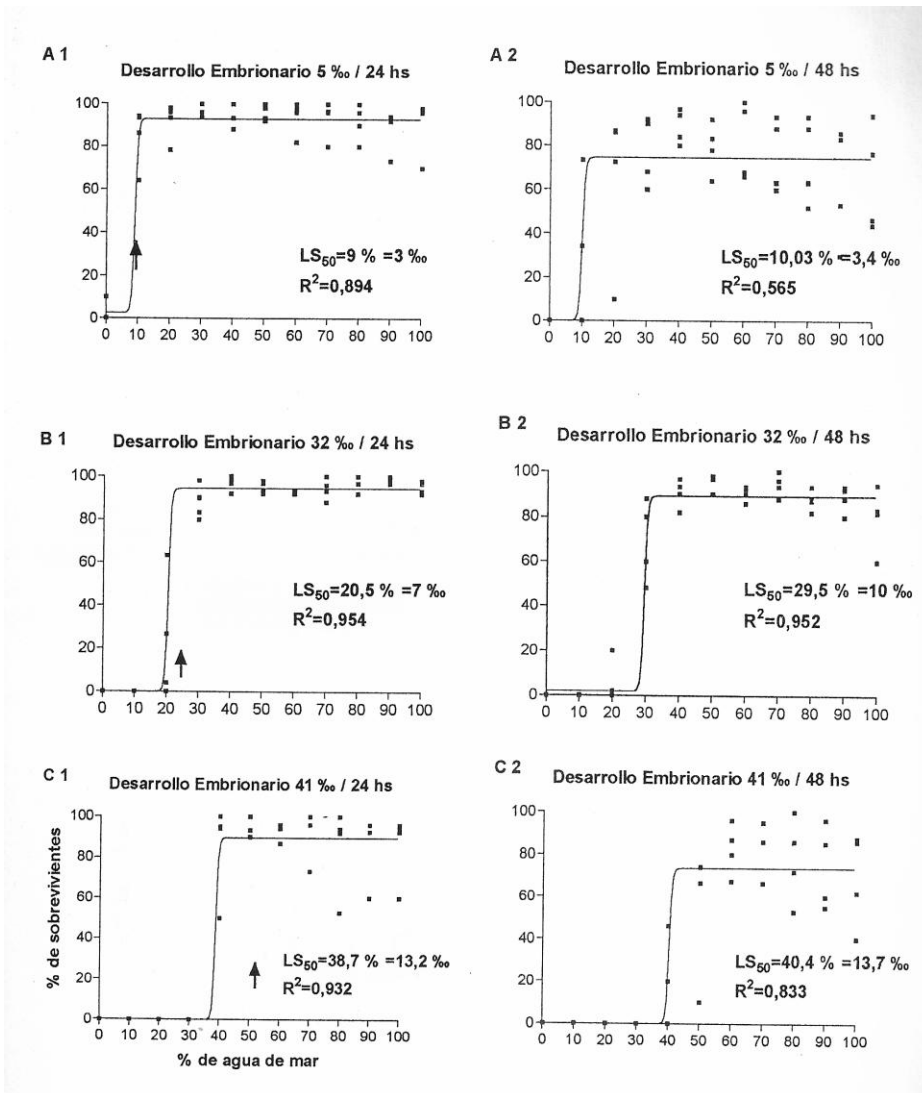


Figura 6.4. Porcentaje de supervivencia de las larvas de *Cyrtograpsus angulatus*, provenientes de embriones desarrollados en 3 condiciones de salinidad (5, 32 y 41 ‰, A, B y C respectivamente), 24hs (1) y 48hs (2) después de la eclosión, en 11 salinidades diferentes (0 a 100% de agua de mar). Para cada salinidad de desarrollo embrionario se obtuvieron 4 réplicas correspondientes a larvas de 4 hembras diferentes. Los datos se ajustaron a una curva sigmoidea del tipo dosis-respuesta, de la que se calculó el valor de SL_{50} como la salinidad a la cual murieron el 50 % de los individuos. Las flechas indican la salinidad a partir de la cual la mayoría de los individuos nadaba activamente.

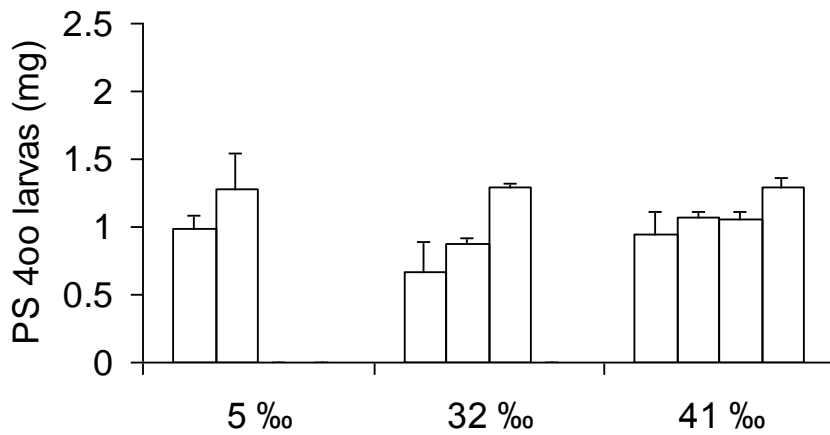


Figura 6.5. Peso seco de 400 zoeas I de *Cyrtograpsus angulatus* provenientes de embriones desarrollados en 5, 32 y 41 ‰ de salinidad. Cada barra corresponde al promedio de tres muestras provenientes de una misma hembra, con su correspondiente desvío.

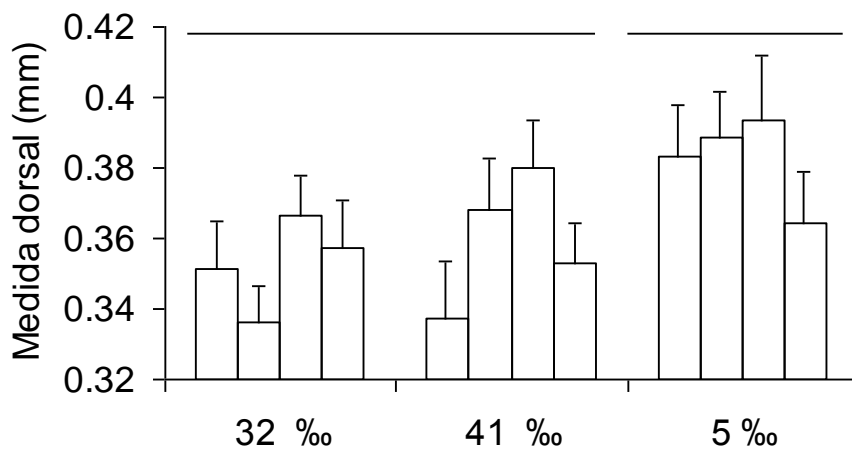


Figura 6.6. Medida dorsal tomada en larvas zoea I de *Cyrtograpsus angulatus* provenientes de embriones desarrollados en tres salinidades. Cada barra corresponde al promedio de 20 larvas de una misma hembra con su correspondiente error. Las líneas horizontales indican el resultado del test de Tukey para este caso.

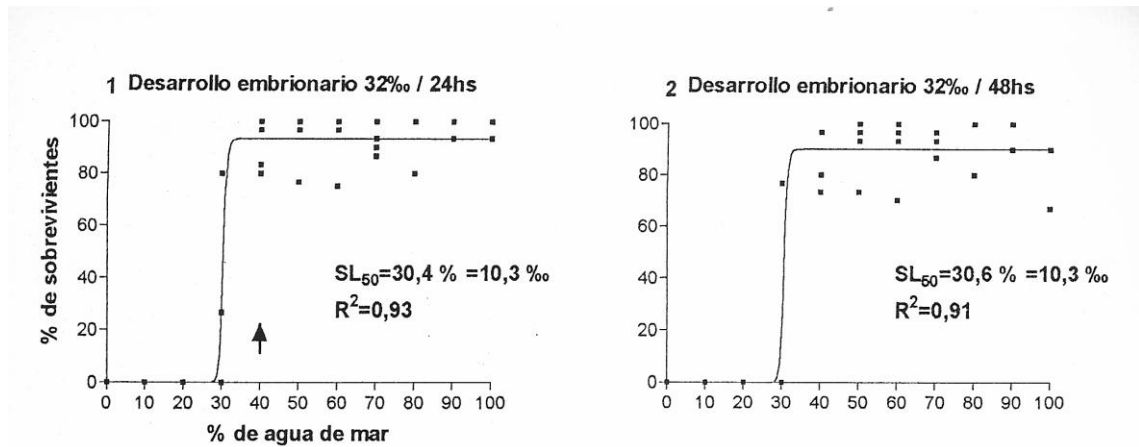


Figura 6.7. Porcentaje de supervivencia de las larvas de *Cyrtograpsus altimanus*, provenientes de embriones desarrollados en 32 ‰ de salinidad, 24hs (1) y 48hs (2) después de la eclosión, en 11 salinidades diferentes (0 a 100% de agua de mar). Se obtuvieron cuatro réplicas correspondientes a larvas de 4 hembras diferentes. Los datos se ajustaron a una curva sigmoidea del tipo dosis-respuesta, de la que se calculó el valor de SL_{50} como la salinidad a la cual murieron el 50 % de los individuos. Las flechas indican la salinidad promedio a partir de la cual los individuos nadaban activamente.

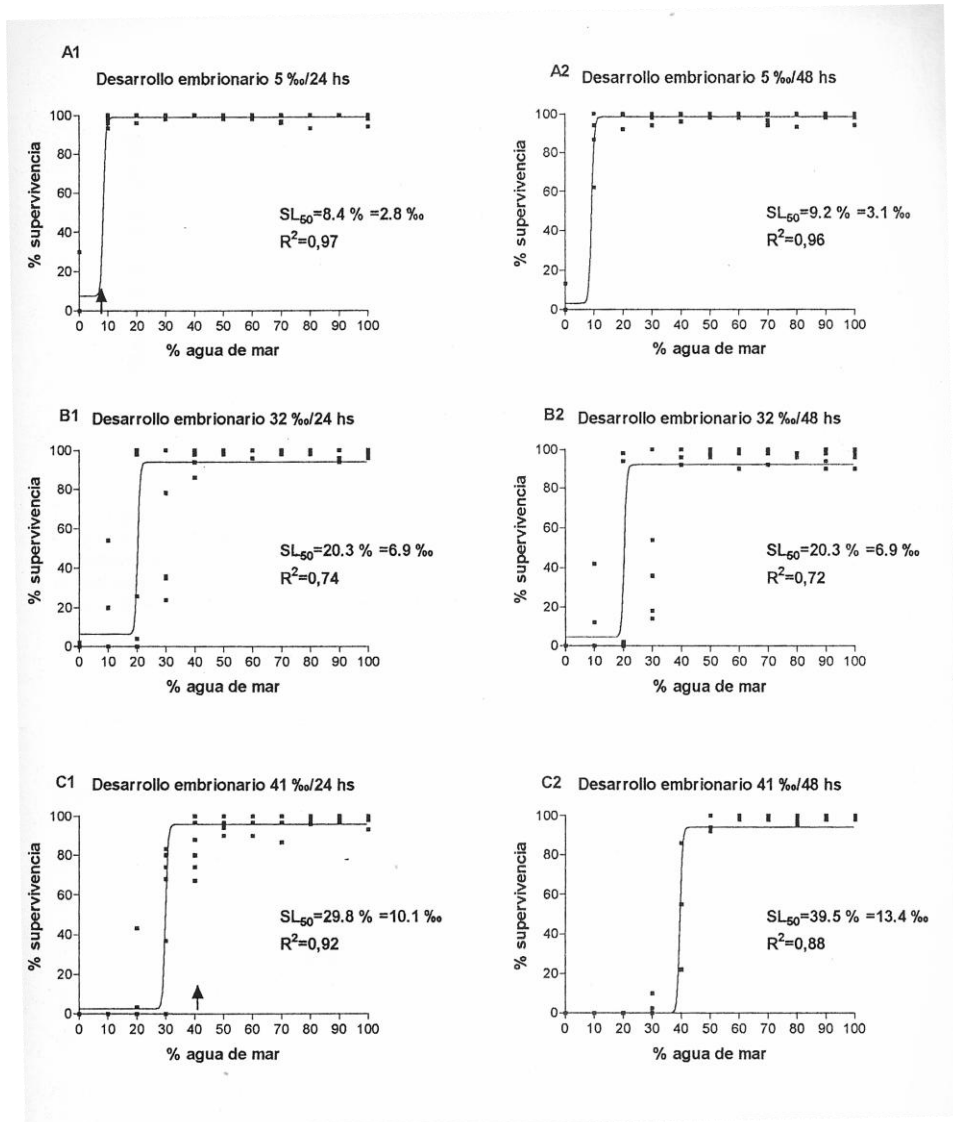


Figura 6.8. Porcentaje de supervivencia de las larvas de *Chasmagnathus granulata* de San Antonio Oeste, provenientes de embriones desarrollados en 3 condiciones de salinidad (5, 32 y 41 ‰, A, B y C respectivamente), 24hs (1) y 48hs (2) después de la eclosión, en 11 salinidades diferentes (0 a 100% de agua de mar). Para cada salinidad de desarrollo embrionario se obtuvieron entre 3 y 6 réplicas correspondientes a hembras diferentes. Los datos se ajustaron a una curva sigmoidea del tipo dosis-respuesta, de la que se calculó el valor de SL_{50} como la salinidad a la cual murieron el 50 % de los individuos. Las flechas indican la salinidad a partir de la cual la mayoría de los individuos nadaba activamente.

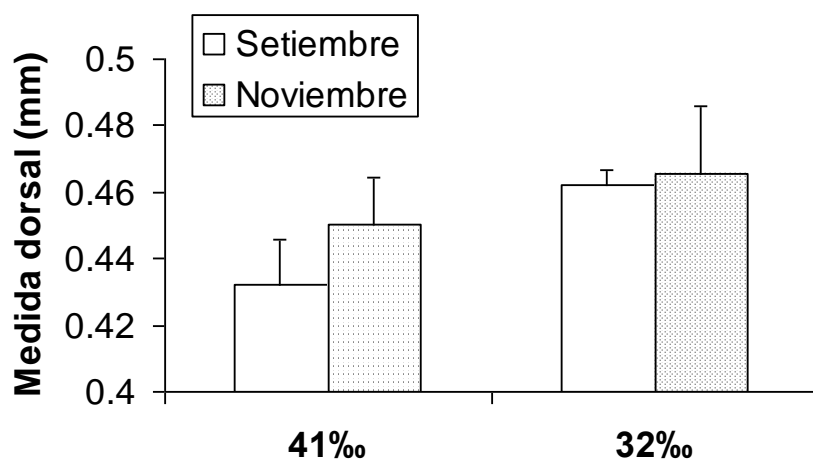


Figura 6.9. Medida dorsal (promedio de todas las camadas para cada condición) tomada en zoeas I de *Chasmagnathus granulata* de San Antonio Oeste, provenientes de hembras colectadas antes de la estación reproductiva y cuya maduración ovárica transcurrió en laboratorio (setiembre), y de hembras colectadas al principio de la estación reproductiva (noviembre), desarrolladas en 32 y 41‰ de salinidad.

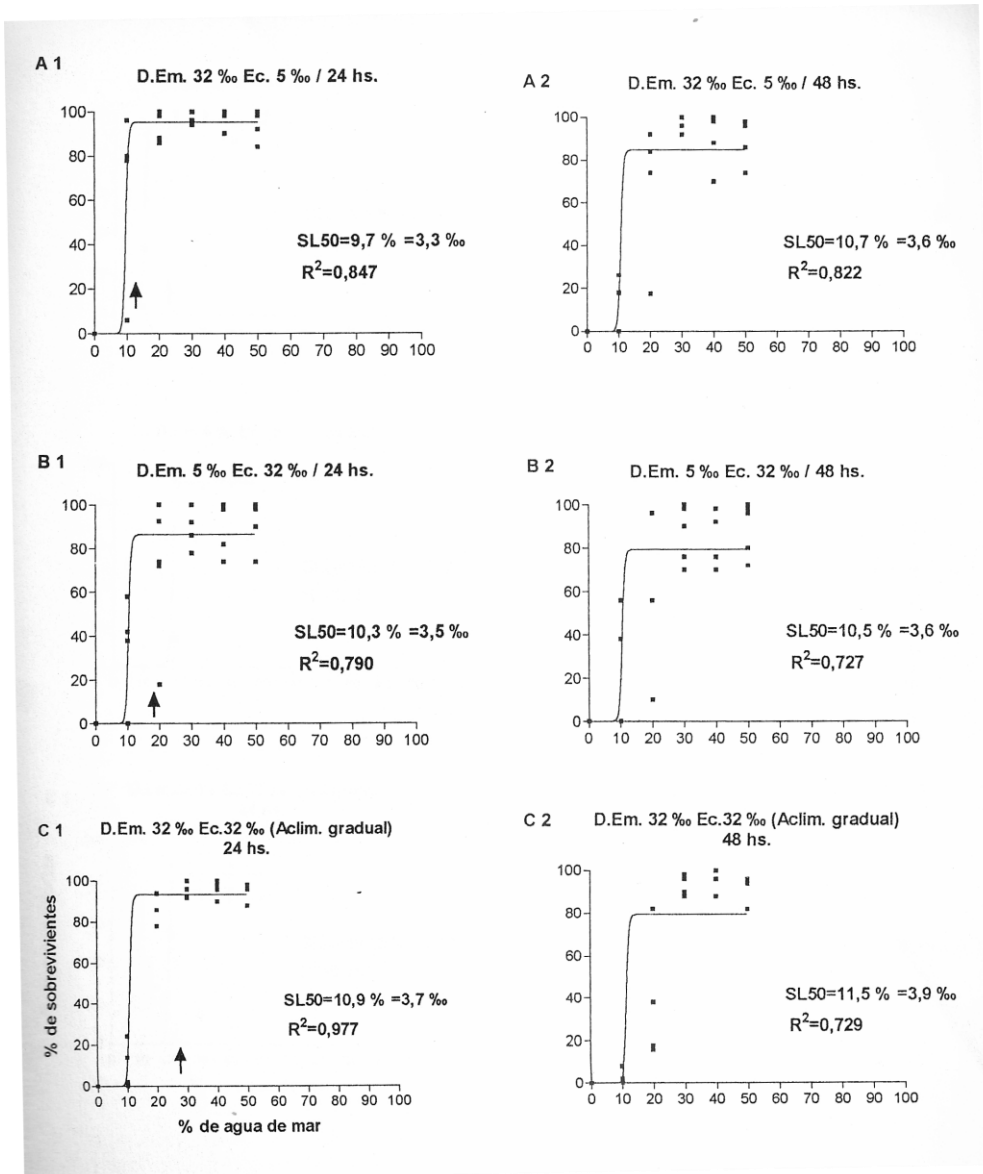


Figura 6.10. Porcentaje de supervivencia de las larvas de *Chasmagnathus granulata* de Mar Chiquita, provenientes de embriones desarrollados (d.em.) en 32 ‰ y eclosionados (ec.) en 5 ‰ (A), desarrollados en 5 ‰ y eclosionados en 32 ‰ (B) y desarrollados totalmente en 32 ‰ con aclimatación gradual a las distintas salinidades experimentales (C), medido 24hs (1) y 48hs (2) después de la eclosión. Para cada salinidad de desarrollo embrionario se usaron larvas de 4 hembras diferentes. Los datos se ajustaron a una curva sigmoidea del tipo dosis-respuesta, de la que se calculó el valor de SL_{50} como la salinidad a la cual mueren el 50 % de los individuos. Las flechas indican la salinidad promedio a partir de la cual los individuos nadaban activamente.

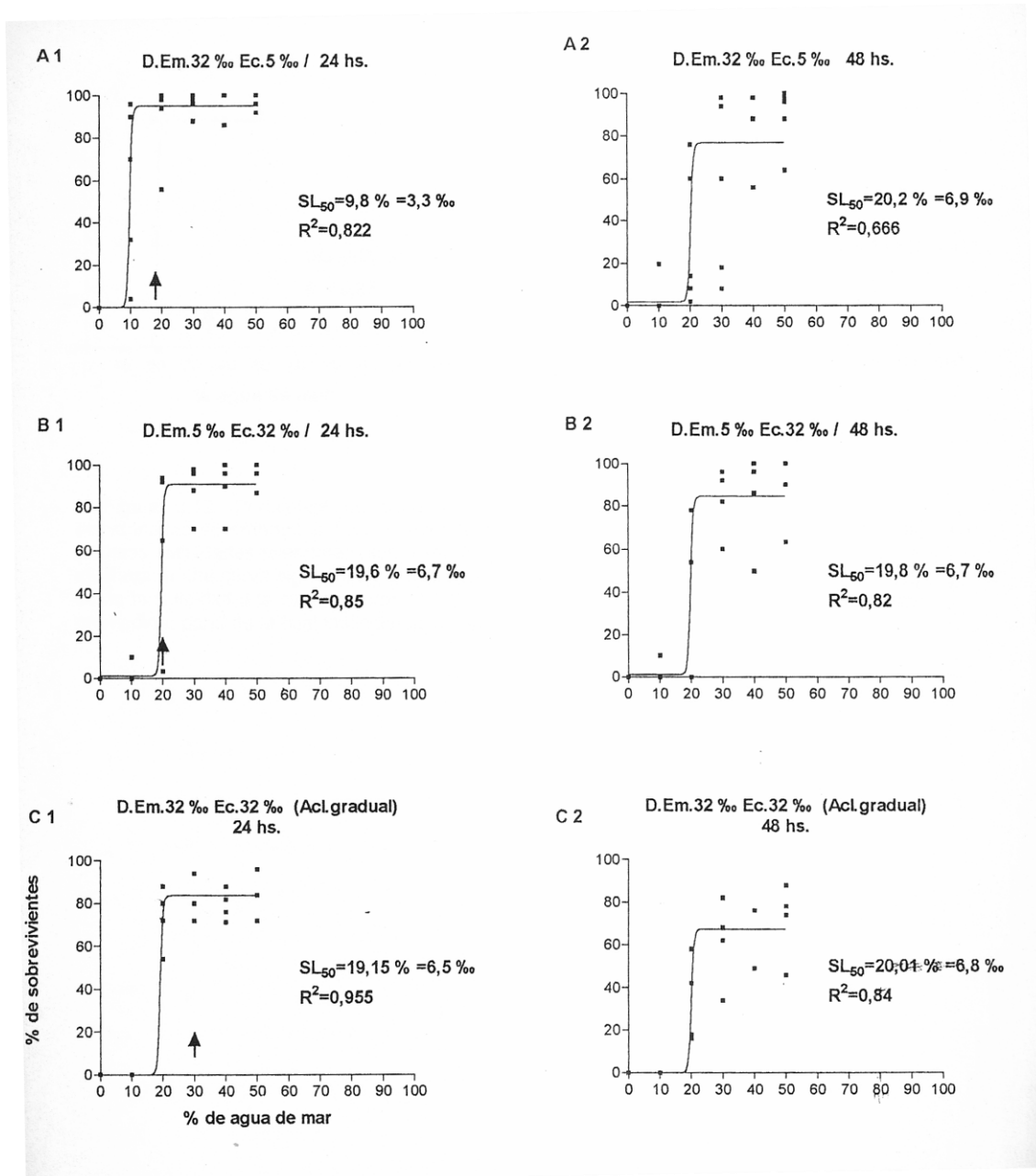


Figura 6.11. Porcentaje de supervivencia de las larvas de *Cyrtograpsus angulatus* eclosionadas de embriones desarrollados (d.em.) en 5‰ y eclosionados (ec.) en 32‰ (A); desarrollados en 32‰ y eclosionados en 5‰ (B); y desarrollados totalmente en 32‰ con aclimatación gradual a las distintas salinidades experimentales (C), medido 24hs (1) y 48 hs (2) después de la eclosión. Los datos se ajustaron a una curva sigmoidea del tipo dosis-respuesta, de la que se calculó el valor de SL_{50} como la salinidad a la cual murieron el 50% de los individuos. Las flechas indican la salinidad promedio a partir de la cual los individuos nadaban activamente.

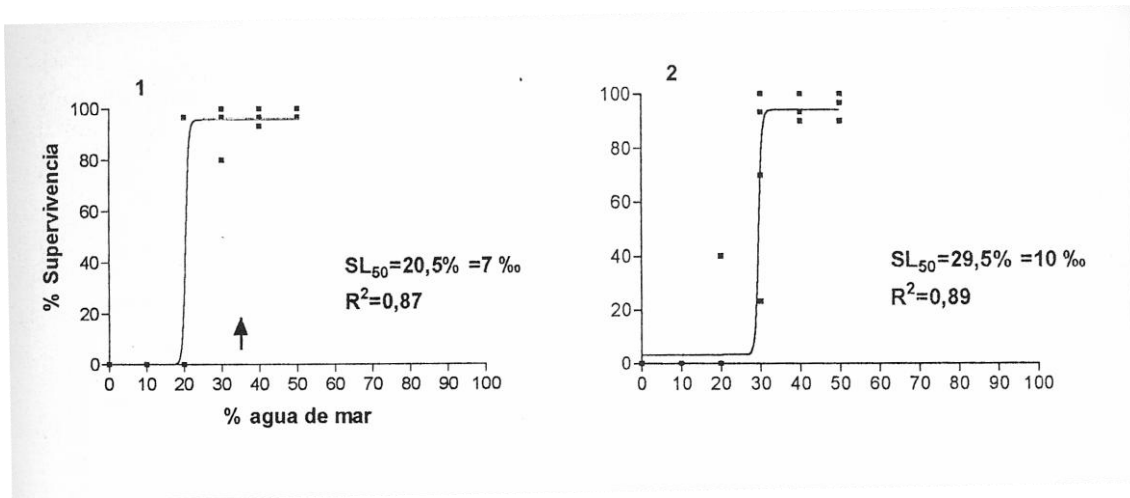


Figura 6.12. Porcentaje de supervivencia de las larvas de *Cyrtograpsus altimanus* eclosionadas de embriones desarrollados totalmente en 32‰ con aclimatación gradual a las distintas salinidades experimentales, 24hs (1) y 48hs (2) después de la eclosión. Los datos se ajustaron a una curva sigmoidea del tipo dosis-respuesta, de la que se calculó el valor de SL_{50} como la salinidad a la cual murieron el 50% de los individuos. Las flechas indican la salinidad promedio a partir de la cual los individuos nadaban activamente.

Discusión

La aclimatación a la baja salinidad lograda al producirse el desarrollo embrionario completo en esa condición no es alcanzada por exponer los embriones sólo uno o pocos días antes de la eclosión. Si bien tal exposición mejora la supervivencia en bajas salinidades, (principalmente en *Chasmagnathus granulata* y en menor grado en *Cyrtograpsus angulatus*), la vitalidad de las larvas resultantes es muy escasa en salinidades por debajo de 30% AM (10.2‰).

Cuando los embriones se aclimatan desde el inicio del desarrollo a baja salinidad, y son transferidos a 32‰ uno o pocos días antes de la eclosión la respuesta de *Chasmagnathus granulata* y *Cyrtograpsus angulatus* es diferente. En *C. granulata* la tolerancia a bajas salinidades parece mantenerse, sobreviviendo las larvas como si hubiera transcurrido todo el desarrollo en 5‰, en *C. angulatus*, en cambio, la aclimatación parece perderse casi por completo luego de unos pocos días de exposición a 32‰ de salinidad.

La aclimatación a bajas salinidades permite por una parte aumentar el rango de salinidades donde es posible el desarrollo embrionario, pero además aumentar la tolerancia lograda por las larvas recién eclosionadas, especialmente durante las primeras 24 hs. Ésto asegura que las larvas puedan alcanzar las condiciones marinas requeridas para su desarrollo aún cuando la salinidad de la laguna esté muy reducida.

Las diferencias en la aclimatación entre *Cyrtograpsus angulatus* y *Chasmagnathus granulata* pueden reflejar diferencias en los sistemas de regulación fisiológica de cada uno, como lo hacen suponer las diferencias halladas en el peso y tamaño de las larvas resultantes de desarrollos en baja y alta salinidad mencionadas anteriormente.

La supervivencia larval, en ausencia de aclimatación embrionaria, mejoró cuando la transferencia de las mismas a salinidades bajas fue gradual. En *Chasmagnathus granulata* (figura 6.1) la supervivencia en 10 y 20% AM fue prácticamente nula luego de la exposición súbita y aumentó cuando la transferencia fue gradual (figura 6.10, C). Sin embargo si se observa la salinidad en la que las larvas son capaces de nadar, la diferencia no es tan notoria. Por otra parte la supervivencia en salinidades mayores de 20% AM (6.8‰) es mejor en todas las réplicas cuando la exposición es gradual. Para *Cyrtograpsus angulatus* (figuras 6.4 y 6.11,

C), la exposición gradual mejora algo la supervivencia de las larvas expuestas a salinidades más bajas (20% AM; 6.8‰) con respecto a la súbita, aunque la condición fisiológica en esa salinidad sigue siendo mala (incapacidad de nadar). En las salinidades superiores no se nota mejoría.

Así, la transferencia gradual de las larvas a bajas salinidades, al menos en la serie de salinidades y los tiempos utilizados, no produce una aclimatación similar a la lograda durante el desarrollo embrionario, ya que no se observaron en ningún caso individuos activos en salinidades por debajo de 30% AM (10.2‰), pero sí parece disminuir parcialmente el estrés fisiológico producido por el cambio.

Es evidente que tanto para *Cyrtograpsus angulatus*, considerada una especie marina, como para *Chasmagnathus granulata*, considerada semiterrestre estuarial, las principales adaptaciones a condiciones de salinidad variable están dadas en la tolerancia de los adultos y juveniles y en menor grado de los embriones, mientras que el desarrollo larval, tanto por el número de estadíos como por la sensibilidad de las zoeas a variaciones en la salinidad, reúne las características de una especie marina.

Desarrollo larval completo de *Chasmagnathus granulata* en distintas salinidades

Introducción:

La salinidad es uno de los principales factores ambientales que ejercen una presión de selección sobre los organismos acuáticos. El éxito del establecimiento de una especie dependerá, entre otras cosas, de su capacidad de enfrentar la salinidad del medio, y sus variaciones. Algunos organismos desarrollan todo su ciclo de vida en el mismo ambiente, mientras que otros sufren migraciones ontogenéticas que hacen que las condiciones enfrentadas por cada etapa sean diferentes; su éxito como especie dependerá en este caso de la capacidad de cada una de las etapas de sobrevivir en tales condiciones. En crustáceos, se han hallado cambios en la capacidad de osmorregulación de las diferentes fases del ciclo de vida de los individuos, que se correlacionan con las condiciones ambientales enfrentadas por cada uno (Charmantier, 1998; Charmantier et. al, 1998; Anger y Charmantier, 2000).

Otro elemento, además de los cambios ontogenéticos en la regulación, está siendo considerado recientemente como clave para el éxito de una especie en un ambiente particular. Se trata de la adaptación fisiológica de los individuos, que condicionará la respuesta en cada momento en función de las condiciones experimentadas previamente (Spicer y Gaston, 1999). En braquiuros existen evidencias de que, al menos en algunos casos, las condiciones de temperatura y salinidad enfrentadas durante la etapa embrionaria modifican la respuesta observada durante la etapa larval (Rosenberg y Costlow, 1979; Laughlin y French, 1989a; capítulos 5 y 6).

Objetivo

El objetivo en esta parte del trabajo fue establecer el efecto de diferentes condiciones de salinidad durante el desarrollo de *Chasmagnathus granulata*, desde el embrión hasta el primer juvenil, y las posibles diferencias interpoblacionales en la respuesta.

Materiales y Métodos

Se colectaron hembras de *Chasmagnathus granulata* con huevos en el inicio de su desarrollo en Mar Chiquita y San Antonio Oeste en diferentes épocas del año entre diciembre de 1997 y febrero de 1998. Las mismas se colocaron en acuarios con agua de 32‰ o de 5‰ de salinidad. En éste último caso las hembras eran dejadas en agua de mar hasta que los embriones estuvieran en estadio 2 (ver capítulo 3) y se transferían gradualmente a la salinidad final pasando por dos salinidades intermedias (20 y 10‰, 24 hs en cada una).

Cada una de las camadas de larvas se dividió en dos grupos: un lote se cultivó en alta salinidad (34‰, 100% agua de mar), y uno en baja (10‰, 30% agua de mar). De este modo se consideraron cuatro condiciones experimentales de acuerdo a la salinidad de cultivo: baja salinidad embrionaria-baja salinidad larval (BB); baja salinidad embrionaria-alta salinidad larval (BA); alta salinidad embrionaria-alta salinidad larval (AA); alta salinidad embrionaria-baja salinidad larval (AB).

Pocas horas después de ocurrida la eclosión, la cual se produjo siempre después de las 18 horas de un día y antes de las 10 del siguiente, se colocaron 15 o 30 larvas de una misma hembra en cada una de las salinidades experimentales de desarrollo en frascos individuales con 20 ml de agua. Estas larvas se cultivaron en incubadora a 20 °C y con un régimen diario de iluminación de 14 horas de luz : 10 horas de oscuridad. Diariamente se registró la mortalidad y/o muda en cada una, y cada 48 hs se cambió el agua, proporcionando alimento nuevo (nauplii de *Artemia salina* recién eclosionadas). Una vez alcanzado el estadio de cangrejo I, los ejemplares fueron congelados a -15 °C para posteriormente medir su largo de caparazón (LC).

Dado el diferente número de muestras para cada condición y la falta de normalidad y/o heterogeneidad de varianzas en algunos casos, no se realizaron comparaciones múltiples. Es por ello que las posibles interacciones no fueron analizadas. Se comparó la mortalidad total y por estadios, período intermuda de cada estadio y duración total del desarrollo larval, y LC de los cangrejos 1, entre pares de condiciones experimentales (AA Vs. BB; AA Vs. AB; AA Vs. BA; BA Vs. BB; AB Vs. BB y AB Vs. BA) por medio del test de t de Student cuando fue posible, esto es, cuando las varianzas fueron homogéneas y la distribución de los datos normal o, en caso de que no lo fuera el número de datos grande. Debe tenerse en cuenta que AA Vs. AB y BB

Vs. BA son comparaciones entre larvas originadas de las mismas camadas, y que sólo difieren en la salinidad de desarrollo larval. Se aplicó la transformación arcoseno a los porcentajes de mortalidad.

Resultados

Chasmagnathus granulata de Mar Chiquita:

Se obtuvieron siete réplicas (provenientes de siete hembras diferentes) de larvas cuyos embriones se desarrollaron en 5‰ de salinidad y otras seis provenientes de embriones desarrollados en 32‰, cuyo desarrollo larval hasta cangrejo 1 se siguió en las dos condiciones experimentales de salinidad (10 y 34‰).

Mortalidad

En general, la supervivencia hasta cangrejo 1 fue buena en alta salinidad tanto para larvas eclosionadas en 32‰ como en 5‰ (lotes AA y BA), con promedios de mortalidad total de alrededor del 30%. Para las larvas desarrolladas en 10‰, en cambio, la mortalidad total alcanzó valores de 80 y 90% en los lotes BB y AB respectivamente.

Las etapas larvales más críticas fueron zoea I y megalopa, registrándose una mortalidad muy escasa en las restantes (Figura 7.1). Los resultados de los test de t se resumen en la tabla 7.1 para todas las comparaciones.

Períodos intermuda:

Un rasgo sobresaliente de la duración del período larval es la gran variabilidad entre camadas, independientemente de la condición de desarrollo (Figura 7.2). La duración del desarrollo larval, total y por estadios, difiere significativamente cuando se comparan los lotes AA Vs. AB siendo mayor en la salinidad más baja. Cuando se comparan los lotes AB Vs. BB y AB Vs. BA, en cambio, la duración total y por estadios es menor en el lote BB y BA respectivamente. La duración total no difiere significativamente cuando se comparan los lotes BA Vs. BB, AA Vs. BA y AA Vs. BB. En estos tres casos, existe una mayor duración del primer o primeros períodos intermuda en los lotes con mayor tiempo de exposición a la baja salinidad, que luego es compensada en el período intermuda 5 (Tabla 7.1 y Figura 7.2).

Durante el desarrollo larval de algunas de las camadas se detectó un estadio extra de zoea (zoea V) en algunos individuos. Para las camadas eclosionadas en 32‰ se encontraron 7

zoeas V (provenientes de 2 camadas) en la salinidad de 10‰. Para las camadas eclosionadas en 5‰, se detectaron 5 zoeas V (provenientes de 2 camadas diferentes) en 10‰ y 1 en 34‰.

Tallas de los cangrejos 1

Las tallas de los cangrejos I medidas como largo de caparazón (LC), considerando una misma condición de desarrollo larval, variaron significativamente entre camadas individuales en los lotes AA y BA (Figura 7.3).

El LC promedio de los cangrejos 1 originados de larvas BB (1.51 mm), fue significativamente mayor que el de los originados en el lote AB (1.43 mm), AA (1.41 mm) y BA (1.44 mm) (test de t. $p=0.0069$, $p<0.0001$, $p=0.0004$ respectivamente). Por otra parte no se encontraron diferencias significativas entre las tallas de los cangrejos 1 cuando se compararon los lotes AA Vs. AB, AA Vs. BA y AB Vs. BA. (Tabla 7.1).

Chasmagnathus granulata de San Antonio Oeste:

Se obtuvieron 3 camadas de larvas provenientes de embriones desarrollados en 5‰ y 5 de embriones desarrollados en 32‰.

Mortalidad

La supervivencia hasta cangrejo I fue buena (alrededor del 90% en todas las camadas) sólo cuando las larvas provinieron de embriones desarrollados en 32‰ y se cultivaron en agua de mar pura. Cuando estas mismas camadas se cultivaron en 10‰ se produjo una alta mortalidad, principalmente en los estadios de zoea I, zoea IV y megalopa, alcanzando valores de mortalidad total entre 80 y 100%. Cuando las larvas provinieron de embriones desarrollados en 5‰ de salinidad la supervivencia fue buena hasta zoea III o IV, tanto en 10‰ como en 34‰, pero prácticamente todas murieron en el estadio de megalopa. Sólo en una camada se alcanzó el estadio de cangrejo 1 en 34‰ (11 ejemplares) pero sólo tres, morfológicamente anormales, sobrevivieron a esta última muda, mientras los restantes murieron durante la misma (Figura 7.4).

Los resultados de las comparaciones entre los diferentes lotes se resumen en la tabla 7.2.

Período intermuda

La duración del período intermuda total fue muy similar en las cinco camadas provenientes de embriones desarrollados en alta salinidad, aún cuando tres de ellas fueron de mediados de la estación reproductiva y las dos restantes maduraron en laboratorio antes del comienzo de la misma (promedio 22.6 ± 1.1 días). Sólo una de las 3 camadas provenientes de embriones desarrollados en baja salinidad alcanzó el estadio de cangrejo 1, con un período intermuda total promedio más largo que las anteriores (25.1 ± 2.5 días), (figura 7.5). Las comparaciones entre pares de condiciones experimentales indican que la duración total y de cada estadio fueron menores en las camadas AA respecto de las AB. Cuando se compararon los lotes AA Vs. BA, la duración total, y de los períodos intermuda 1, 4 y 5 fue significativamente menor en el primero. La comparación del lote BB (Sólo intermudas 1 a 4) con los lotes BA, AB y AA indicó que siempre son más largos los período intermuda en el BB, aún cuando en algunos casos las diferencias no fueron significativas. Finalmente cuando comparamos las larvas del lote AB con las del BA, encontramos que la duración total y de los períodos intermuda 1 a 4 fue menor en éste último (aunque para el intermuda 4 la diferencia es NS). Para el período intermuda 5, en cambio, la diferencia se invirtió aunque no fue significativa (debido a que son sólo tres ejemplares del lote BA los que alcanzaron este intermuda) (Tabla 7.2).

No se registró la presencia de estadios de zoea supernumerarios (zoeas V) en ninguno de los cultivos.

Tallas de los cangrejos 1

No se encontraron variaciones significativas entre camadas del lote AA, y la talla promedio fue 1.55 mm de largo de caparazón. Por su parte los representantes de las mismas camadas que completaron su desarrollo en 10‰ fueron significativamente más pequeños (test de t, $p < 0.0001$) (Figura 7.3).

Tablas y figuras

AA x AB	AA x BA
<p>mortalidad total PP t=5.26 gl=12 ***p=0.0002 (29.36-89.04%; 0.557-1.272) mortalidad Z1 PP t=1.76 gl=12 NS BAJO PODER (17.62-38.01%; 0.411-0.693) mortalidad Z2 PP t=0.407 gl=11 NS BAJO PODER (7.36-4.96%; 0.267-0.229) mortalidad Z3 FP t=1.32 gl=11 NS BAJO PODER (1.43-8.33%; 0.156-0.274) mortalidad Z4 PP t=4.18 gl=11 *** p=0.0015 (0.49-10.65%; 0.145-0.357) mortalidad megalopa PP t=5.96 gl=11 *** p<0.0001 (8.03-77.69%; 0.283-1.117) duración total FP t=3.86 gl=130 ***p=0.0002 (26.2-31.8 DIAS) intermuda 1 FF t=13.7 gl=227 *** p<0.0001 (4.26-6.23 DIAS) intermuda 2 FP t=9.98 gl=208 *** p<0.0001 (3.55-4.86 DIAS) intermuda 3 FP t=6.61 gl=198 *** p<0.0001 (4.13-5.07 DIAS) intermuda 4 FP t=4.15 gl=193 *** p<0.0001 (4.97-5.58 DIAS) intermuda 5 FP t=0.334 gl=130 NS BAJO PODER (9.42-9.15 DIAS) CI del cangrejo FP t=0.936 gl=89 NS BAJO PODER (1.41-1.43 mm)</p>	<p>mortalidad total PP t=0.260 g=11 NS BAJO P. (29.36-31.01%; 0.557-0.591) mortalidad Z1 PP t=0.751 gl=11 NS BAJO PODER (17.62-22%; 0.411-0.492) mortalidad Z2 PP t=1.14 gl=11 NS BAJO PODER (7.36-2.56%; 0.267-0.167) mortalidad Z3 FP t=0.286 gl=11 NS BAJO PODER (1.43-1.65%; 0.156-0.171) mortalidad Z4 PP t=0.808 gl=11 NS BAJO PODER (0.49-1.74%; 0.145-0.173) mortalidad megalopa PP t=0.382 gl=11 NS BAJO P. (8.03-7.07%; 0.283-0.243) duración total FP t=0.630 gl=208 NS BAJO PODER (26.2-25.8 DIAS) intermuda 1 FP t=5.11 gl=246 ***p<0.0001 (4.26-4.86 DIAS) intermuda 2 FP t=1.01 gl=232 NS BAJO PODER (3.55-3.44 DIAS) intermuda 3 FP t=0.514 gl=228 NS BAJO PODER (4.13-4.06 DIAS) intermuda 4 FF t=0.238 gl=225 NS BAJO PODER (4.97-4.93 DIAS) intermuda 5 FP t=2.88 gl=208 *** p=0.0044 BAJO PODER (9.42-8.37 DIAS) CI del cangrejo FF t=2.82 gl=175 NS BAJO PODER (1.41-1.44 mm)</p>
BA x BB	AB x BB
<p>mortalidad total PP t=4.26 gl=10 ***p=0.0017 (31.01-82.14%; 0.591-1.184) mortalidad Z1 PF t=0.961 gl=10 NS BAJO PODER (22.00-37-74%; 0.492-0.637) mortalidad Z2 FP t=1.16 gl=10 NS BAJO PODER (2.56-6.67%; 0.167-0.267) mortalidad Z3 PF t=1.90 gl=10 NS BAJO PODER (1.65-12.19%; 0.171-0.347) mortalidad Z4 PP t=1.67 gl=10 NS BAJO PODER (1.74-17.95%; 0.173-0.392) mortalidad megalopa FP t=6.47 gl=10 *** p<0.0001 (7.07-76.38%; 0.243-1.056) duración total FP t=0.0853 gl=111 NS BAJO PODER (25.8-25.9 DIAS) intermuda 1 FP t=4.99 gl=194 ***p<0.0001 (4.86-5.66 DIAS) intermuda 2 FF t=6.88 gl=182 ***p<0.0001 (3.44-4.46 DIAS) intermuda 3 FF t=2.60 gl=171 ***p=0.0102 BAJO PODER (4.06-4.49 DIAS) intermuda 4 FP t=2.31 gl=163 ***p=0.0220 BAJO PODER (4.93-5.53 DIAS) intermuda 5 FP t=1.45 gl=111 NS BAJO PODER (8.37-7.54 DIAS) CI del cangrejo FP t=3.66 gl=109 ***p=0.0004 (1.44-1.51 mm)</p>	<p>mortalidad total PP t=0.609 gl=11 NS BAJO PODER (89.04-82.14%; 1.27-1.18) mortalidad Z1 PP t=0.285 gl=11 NS BAJO PODER (38.01-37.74%; 0.693-0.637) mortalidad Z2 PP t=0.409 gl=10 NS BAJO PODER (4.96-6.67%; 0.220-0.267) mortalidad Z3 FP t=0.591 gl=10 NS BAJO PODER (8.33-12.19%; 0.274-0.347) mortalidad Z4 PP t=0.250 gl=10 NS BAJO PODER (10.65-17.95%; 0.357-0.392) mortalidad megalopa PP t=0.382 gl=10 NS BAJO P. (77.69-76.38%; 1.12-1.06) duración total PP t=2.89 gl=33 ***p=0.0068 BAJO PODER (31.8-25.9 DIAS) intermuda 1 FP t=2.96 gl=175 ***p=0.0035 (6.23-5.63 DIAS) intermuda 2 FP t=2.34 gl=158 ***p=0.0207 BAJO PODER (4.86-4.43 DIAS) intermuda 3 FF t=3.33 gl=141 ***p=0.0011 (5.07-4.49 DIAS) intermuda 4 FP t=0.184 gl=131 NS BAJO PODER (5.58-5.53 DIAS) intermuda 5 FF t=1.87 gl=33 NS BAJO PODER (9.15-7.55 DIAS) CI del cangrejo FP t=2.97 gl=23 ***p=0.0069 BAJO PODER (1.43-1.51 mm)</p>

Tabla 7.1: Resultado de los test de t para las larvas de *C. granulata* de Mar Chiquita. comparando cada par de condiciones experimentales de salinidad de desarrollo embrionario/larval. A: alta salinidad; B: baja salinidad (ver texto). Para cada uno se indica: resultado del test de normalidad + test de igualdad de varianzas: P: pasa; F: falla. Valor del estadístico t. Grados de libertad (gl). Nivel de significación para $\alpha=0.05$: ***: significativo; NS: no significativo. Para *** se muestra el valor de p correspondiente. Cuando el poder del test es menor del esperado de 0.8 se indica BAJO PODER. Entre paréntesis se indican los promedios y desvío estándar de cada grupo de datos (para la mortalidad se da este valor en porcentaje y luego de la transformación arcoseno utilizada para normalizar).

AA x BB

mortalidad total PP t=4.13 gl=11 ***p=0.0017 (29.36-82.14%; 0.557-1.184)
 mortalidad Z1 PP t=1.43 gl=11 NS BAJO PODER (17.62-37-74%; 0.411-0.637)
 mortalidad Z2 PP t=0.002 gl=11 NS BAJO PODER (7.36-6.67%; 0.267-0.267)
 mortalidad Z3 PP t=2.11 gl=11 NS BAJO PODER (1.43-12.19%; 0.156-0.347)
 mortalidad Z4 FP t=2.09 gl=11 NS BAJO PODER (0.49-17.95%; 0.145-0.392)
 mortalidad megalopa PP t=6.90 gl 11 ***p<0.0001 (8.03-76.38%; 0.283-1.056)
 duración total FP t=0.286 gl=139 NS BAJO PODER (26.2-25.9 DIAS)
 intermuda 1 FF t=10.2 gl=220 ***p<0.0001 (4.26-5.66 DIAS)
 intermuda 2 FP t=6.54 gl=206 ***p<0.0001 (3.55-4.46 DIAS)
 intermuda 3 FF t=2.29 gl=193 NS BAJO PODER (4.13-4.49 DIAS)
 intermuda 4 FF t=2.53 gl=188 NS BAJO PODER (4.97-5.53 DIAS)
 intermuda 5 FP t=3.16 gl=139 ***p=0.0020 (9.42-7.55 DIAS)
 Cl del cangrejo FP t=6.89 gl=102 ***p<0.0001 (1.41-1.51 mm)

AB x BA

mortalidad total PP t=5.54 gl=11 ***p=0.0002 (89.04-31.01%; 1.272-0.591)
 mortalidad Z1 FP t=1.28 gl=11 NS BAJO PODER (38.01-22%; 0.492-0.637)
 mortalidad Z2 FP t=0.734 gl=10 NS BAJO PODER (4.96-2.56%; 0.229-0.167)
 mortalidad Z3 PP t=1.13 gl=10 NS BAJO PODER (8.33-1.65%; 0.357-0.173)
 mortalidad Z4 PP t=3.02 gl= 10 ***p=0.0128 B. P. (10.65-1.74%; 0.357-0.173)
 mortalidad megalopa PP t=5.63 gl=10 ***p=0.0002 (77.69-7.07%; 1.117-0.243)
 duración total FP t=3.89 gl=102 ***p=0.0002 (31.8-25.8 DIAS)
 intermuda 1 FP t=8.21 gl=201 ***p<0.0001 (6.23-4.86 DIAS)
 intermuda 2 FP t=10.2 gl=184 ***p<0.0001 (4.86-3.44 DIAS)
 intermuda 3 FP t=6.83 gl=176 ***p<0.0001 (5.07-4.06 DIAS)
 intermuda 4 FP t=3.62 gl=168 ***p=0.0004 (5.58-4.93 DIAS)
 intermuda 5 FP t=1.00 gl=102 NS BAJO PODER (9.15-8.37 DIAS)
 Cl del cangrejo FP t=0.151 gl=94 NS BAJO PODER (1.44-1.43 mm)

AA x AB	AA x BA
<p>mortalidad total PP t=7.51 gl=8 p<0.0001*** (16.3-88%; 0.414-1.209) mortalidad Z1 PP t=3.43 gl=8 p=009*** (10.9-53.3%; 0.349-0.827) mortalidad Z2 PP t=1.55 gl=8 NS BAJO PODER (5-9.9%; 0.238-0.384) mortalidad Z3 PP t=1.96 gl=8 NS BAJO PODER (1.4-6.9%; 0.177-0.336) mortalidad Z4 PP t=6.83 gl=8 p=0.0001*** (0-20.5%; 0.140-0.527) mortalidad megalopa FF t=6.72 gl=8 p=0.0001*** (0-61.9%; 0.140-0.884) duración total FP t=12.9 gl=68 p<0.0001*** (22.6-28 DIAS) intermuda 1 FP t=11.9 gl=98 p<0.0001*** (3.42-5.11 DIAS) intermuda 2 FF t=6.72 gl=91 p<0.0001*** (3.34-4.35 DIAS) intermuda 3 FP t=3.09 gl=88 p=0.0026*** (3.85-4.31 DIAS) intermuda 4 FP t=6.26 gl=83 p<0.0001*** (4.52-5.42 DIAS) intermuda 5 FP t=3.07 gl=68 p=0.0031*** (7.43-8.67 DIAS) CI del cangrejo FP t=4.95 gl=63 p<0.0001*** (1.56-1.46 mm)</p>	<p>mortalidad total PP t=7.31 gl=6 p=0.0003*** (16.3-95.6%; 0.414-1.352) mortalidad Z1 PP t=0.689 gl=6 NS BAJO PODER (10.9-6.7%; 0.349-0.279) mortalidad Z2 FP t=0.419 gl=6 NS BAJO PODER (5-2.6%; 0.238-0.195) mortalidad Z3 FP t=0.931 gl=6 NS BAJO PODER (1.4-0%; 0.177-0.132) mortalidad Z4 FF t=2.59 gl=6 p=0.0415*** BAJO PODER (0-6.8%; 0.140-0.288) mortalidad megalopa FP t=12.4 gl=6 p<0.0001*** (0-92.3%; 0.140-1.305) duración total FF t=5.56 gl=70 p<0.0001*** (22.6-25.1 DIAS) intermuda 1 FP t=3.39 gl=105 p=0.0010*** (3.42-3.81 DIAS) intermuda 2 FP t=2.48 gl=101 p=0.0149***BAJO PODER (3.34-3.07 DIAS) intermuda 3 FP t=0.828 gl=100 NS BAJO PODER (3.85-3.76 DIAS) intermuda 4 FP t=5.68 gl=97 p<0.0001*** (4.52-5.16 DIAS) intermuda 5 FF t=6.36 gl=70 p<0.0001*** (7.43-10.18 DIAS)</p>
BA x BB	AB x BB
<p>mortalidad total FP t=1.00 gl=4 NS BAJO PODER (95.6-100%; 0.135-1.44) mortalidad Z1 PP t=0.00 gl=4 NS BAJO PODER (6.7-6.7%; 0.279-0.279) mortalidad Z2 PP t=1.947 gl=4 NS BAJO PODER (2.6-8.3%; 0.195-0.269) mortalidad Z3 PP t=1.87 gl=4 NS BAJO PODER (0-6.3%; 0.132-0.283) mortalidad Z4 PP t=1.23 gl= 4 NS BAJO PODER (6.8-34.2%; 0.288-0.614) mortalidad megalopa PP t=0.431 gl=4 NS BAJO PODER (92.3-100%; 1.30-1.36)</p> <p>intermuda 1 FP t=5.04 gl=82 p<0.0001*** (3.81-4.55 DIAS) intermuda 2 FP t=3.29 gl=77 p=0.0015*** (3.07-3.55 DIAS) intermuda 3 FP t=3.64 gl=73 p=0.0005*** (3.76-4.65 DIAS) intermuda 4 FP t=3.83 gl=65 p=0.0003 *** (5.16-5.90 DIAS)</p>	<p>mortalidad total PP t=2.62 gl=6 p=0.0396*** (88-100%; 1.21-1.44) mortalidad Z1 PP t=3.10 gl=6 p=0.0212*** B. P. (53.3-6.7%; 0.827-0.279) mortalidad Z2 PP t=0.865 gl=6 NS BAJO PODER (9.9-8.3%; 0.384-0.269) mortalidad Z3 PP t=0.468 gl=6 NS BAJO PODER (6.7-6.3%; 0.336-0.283) mortalidad Z4 PP t=0.430 gl=6 NS BAJO PODER (20.5-34.2%; 0.527-0.614) mortalidad megalopa PP t=3.16 gl=6 p=0.0197*** B. P. (61.9-100%; 0.884-1.364)</p> <p>intermuda 1 FP t=3.16 gl=75 p=0.0023*** (5.11-4.55 DIAS) intermuda 2 FP t=3.98 gl=67 p=0.0002*** (4.35-3.55 DIAS) intermuda 3 FP t=1.12 gl=61 NS BAJO PODER (4.31-4.65 DIAS) intermuda 4 FP t=1.95 gl=51 NS BAJO PODER (5.42-5.90 DIAS)</p>

Tabla 7.2: Resultado de los test de t para las larvas de *C. granulata* de San Antonio Oeste comparando cada par de condiciones experimentales de salinidad de desarrollo embrionario/larval. A: alta salinidad; B: baja salinidad (ver texto). Para cada uno se indica: resultado del test de normalidad + test de igualdad de varianzas: P: pasa; F: falla. Valor del estadístico t. Grados de libertad (gl). Nivel de significación para $\alpha=0.05$: ***: significativo; NS: no significativo. Para *** se muestra el valor de p correspondiente. Cuando el poder del test es menor del esperado de 0.8 se indica BAJO PODER. Entre paréntesis se indican los promedios y desvío estándar de cada grupo de datos (para la mortalidad se da este valor en porcentaje y luego de la transformación arcoseno utilizada para normalizar).

AA x BB

mortalidad total FP t=9.46 gl=6 ***p<0.0001 (16.3-100%; 0.414-1.444)
mortalidad Z1 PP t=0.689 gl=6 NS BAJO PODER (10.9-6.7%; 0.349-0.279)
mortalidad Z2 FP t=0.227 gl=6 NS BAJO PODER (5-8.3%; 0.238-0.269)
mortalidad Z3 PP t=1.41 gl=6 NS BAJO PODER (1.4-8.3%; 0.177-0.283)
mortalidad Z4 FP t=2.55 gl=6 NS BAJO PODER (0.34%; 0.140-0.614)
mortalidad megalopa FP t=31.5 gl 6 ***p<0.0001 (0-100%; 0.140-1.364)

intermuda 1 FP t=9.24 gl=105 ***p<0.0001 (3.42-4.55 DIAS)
intermuda 2 FP t=1.84 gl=98 NS BAJO PODER (3.34-3.55 DIAS)
intermuda 3 FP t=3.92 gl=93 ***p=0.0002 (3.85-4.65 DIAS)
intermuda 4 FP t=8.42 gl=88 ***p<0.0001 (4.52-5.90 DIAS)

AB x BA

mortalidad total PP t=1.27 gl=6 NS BAJO PODER (88-95.6%; 1.21-1.35)
mortalidad Z1 PP t=3.10 gl=6 p=0.0212 BAJO PODER (53.3-6.7%; 0.827-0.279)
mortalidad Z2 PP t=1.88 gl=6 NS BAJO PODER (9.9-2.6%; 0.384-0.195)
mortalidad Z3 PP t=2.08 gl=6 NS BAJO PODER (6.7-0%; 0.336-0.132)
mortalidad Z4 PP t=2.54 gl=6 ***p=0.0440 B. P. (20.5-6.8%; 0.527-0.288)
mortalidad megalopa PP t=2.41 gl=6 NS BAJO P. (61.9-92.3%; 0.884-0.222)
duración total PP t=2.95 gl=18 ***p=0.0087 BAJO PODER (28-25.1 DIAS)
intermuda 1 FP t=7.62 gl=75 ***p<0.0001 (5.11-3.81 DIAS)
intermuda 2 FP t=6.80 gl=70 ***p<0.0001 (4.35-3.07 DIAS)
intermuda 3 FP t=3.15 gl=68 ***p=0.0024 (4.31-3.76 DIAS)
intermuda 4 FP t=1.61 gl=60 NS BAJO PODER (5.42-5.16 DIAS)
intermuda 5 PP t=1.69 gl=18 NS BAJO PODER (8.67-10.18 DIAS)

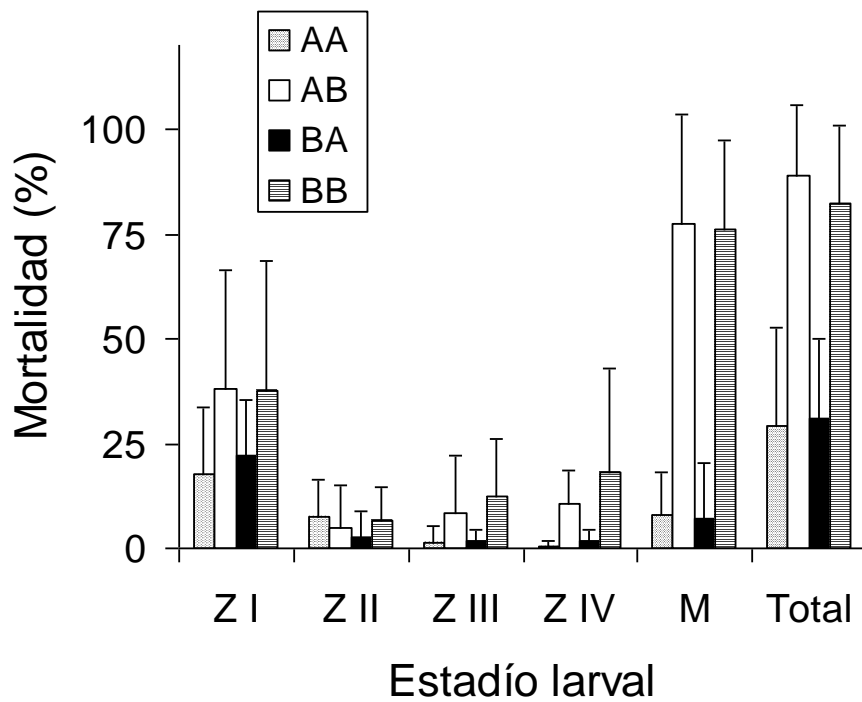


Figura 7.1: Porcentaje de mortalidad de las larvas de *C. granulata* de Mar Chiquita (promedio de todas las camadas \pm d.s.) para cada estadío de desarrollo larval, respecto al número de individuos en cada uno, y porcentaje de mortalidad total. A/A: alta salinidad de desarrollo embrionario y larval. A/B: alta salinidad de desarrollo embrionario, baja salinidad de desarrollo larval. B/A: baja salinidad de desarrollo embrionario, alta salinidad de desarrollo larval. B/B: baja salinidad de desarrollo embrionario y larval.

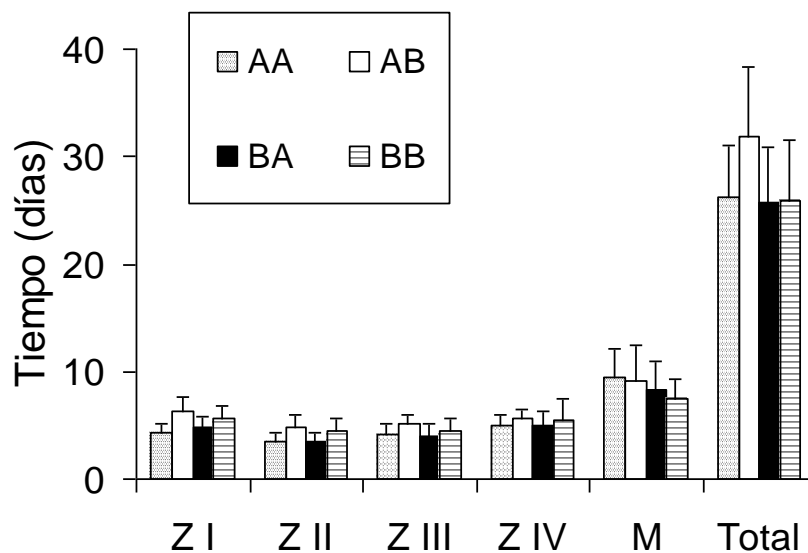


Figura 7.2: Duración de los estadíos de intermuda (y su desvío standard) de las diferentes etapas larvales y duración total del período larval de *C. granulata* de Mar Chiquita. . A/A: alta salinidad de desarrollo embrionario y larval. A/B: alta salinidad de desarrollo embrionario, baja salinidad de desarrollo larval. B/A: baja salinidad de desarrollo embrionario, alta salinidad de desarrollo larval. B/B: baja salinidad de desarrollo embrionario y larval.

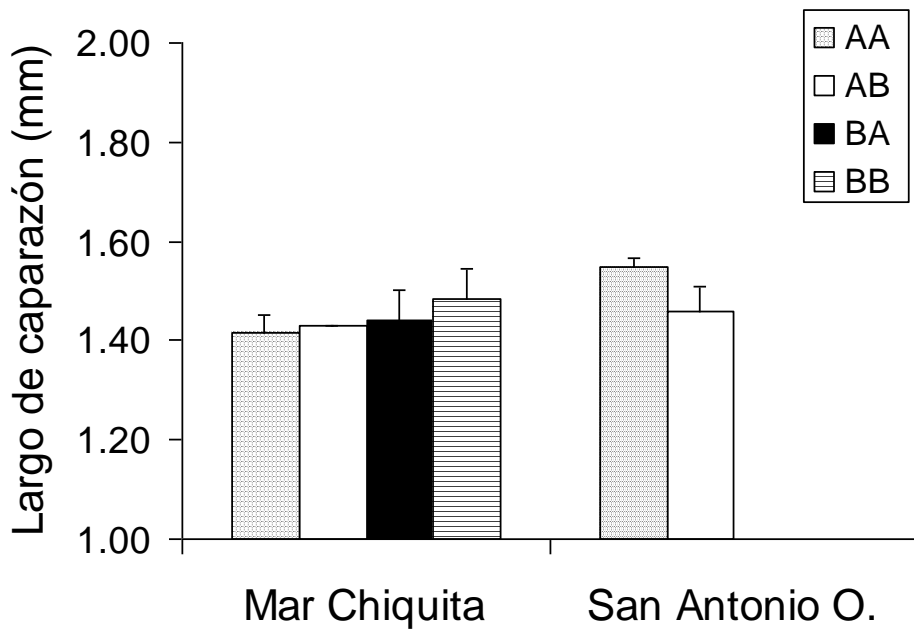


Figura 7.3: Talla de los cangrejos 1 de *C. granulata* de Mar Chiquita y San Antonio Oeste, medida como largo de caparazón. (promedio de todas las camadas \pm d.s.). A/A: alta salinidad de desarrollo embrionario y larval. A/B: alta salinidad de desarrollo embrionario, baja salinidad de desarrollo larval. B/A: baja salinidad de desarrollo embrionario, alta salinidad de desarrollo larval. B/B: baja salinidad de desarrollo embrionario y larval.

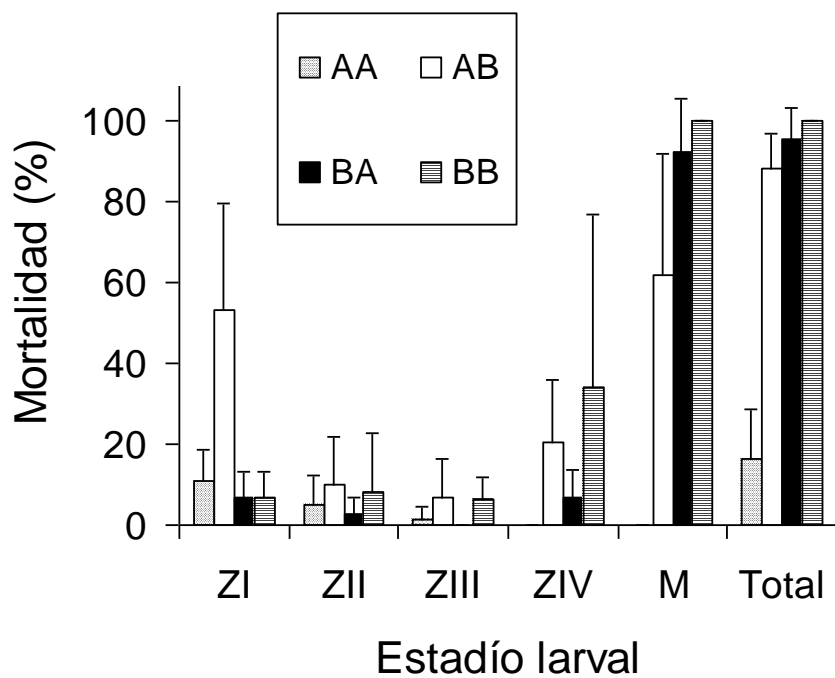


Figura 7.4: Porcentaje de mortalidad de las larvas de *C. granulata* de San Antonio Oeste (promedio de todas las camadas \pm d.s.) para cada estadio de desarrollo larval, respecto al número de individuos en cada uno, y porcentaje de mortalidad total. . A/A: alta salinidad de desarrollo embrionario y larval. A/B: alta salinidad de desarrollo embrionario, baja salinidad de desarrollo larval.

B/A: baja salinidad de desarrollo embrionario, alta salinidad de desarrollo larval. B/B: baja salinidad de desarrollo embrionario y larval.

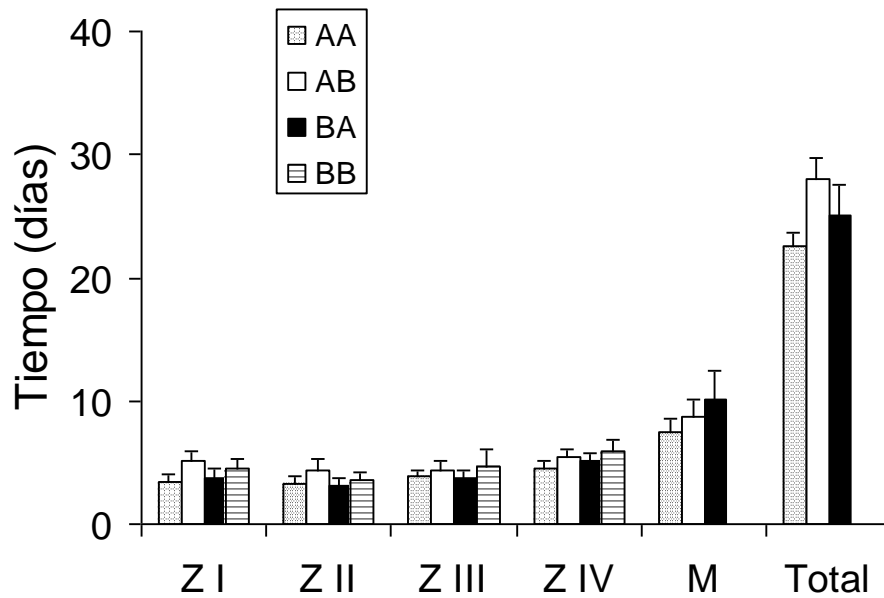


Figura 7.5: Duración de los estadios de intermuda (y su desvío standard) de las diferentes etapas larvales y duración total del período larval de *C. granulata* de San Antonio Oeste. . A/A: alta salinidad de desarrollo embrionario y larval. A/B: alta salinidad de desarrollo embrionario, baja salinidad de desarrollo larval. B/A: baja salinidad de desarrollo embrionario, alta salinidad de desarrollo larval. B/B: baja salinidad de desarrollo embrionario y larval.

Discusión

El desarrollo larval de *Chasmagnathus granulata* muestra, tanto por su duración como por su bioenergética, las características de una especie marina (Anger e Ismael, 1997). Esto concuerda con la estrategia de exportación de las larvas descrita para la población de la albufera de Mar Chiquita (Anger et al., 1994). A partir del momento en que las zoeas I alcanzan el mar, el desarrollo puede transcurrir en condiciones típicamente marinas. Sin embargo es esperable que, al menos éste primer estadio de zoea, muestre una capacidad importante de tolerar bajas salinidades, condición frecuentemente encontrada durante la eclosión en el interior de la laguna. Por su parte, la exposición a diferentes condiciones de salinidad en una etapa del desarrollo puede evidenciarse en etapas posteriores a través de la expresión de diferentes fenotipos. Por ello, un estudio del desarrollo larval completo, hasta el primer estadio juvenil, de individuos expuestos a diferentes condiciones de una variable ambiental clave (como lo es la salinidad para individuos estuariales) desde la etapa embrionaria, puede aportar importante información sobre la respuesta global de una población a tales condiciones (Rosenberg y Costlow, 1979; Laughlin y French, 1989a).

La respuesta a altas y bajas salinidades durante el desarrollo larval completo fue notablemente diferente en las poblaciones de Mar Chiquita y San Antonio Oeste, tanto en la mortalidad de los diferentes estadios, como en la duración de los períodos intermuda y la talla de los cangrejos resultantes. Esto podría estar en directa relación con las diferentes condiciones experimentadas por las poblaciones de ambos sitios. Tales condiciones están dadas tanto por factores que actúan localmente como por aquellos que varían de forma continua con la latitud.

Cuando los embriones son mantenidos en agua de mar durante todo el período embrionario, la supervivencia larval durante todo el desarrollo hasta cangrejo 1 en condiciones marinas es mejor en las larvas de *C. granulata* de San Antonio Oeste, con mortalidades cercanas a cero en todas las camadas, en comparación con una mortalidad de alrededor del 30 % en las de Mar Chiquita. Esto concuerda con un tamaño mayor de las zoeas (ver capítulo 5) y un desarrollo larval más rápido para una misma condición de cultivo (Figuras 7.2 y 7.5), factores ambos que contribuirían a mejorar la supervivencia.

La exposición a baja salinidad sólo en la etapa larval (lotes AB) parece tener un efecto menos negativo en las zoeas I de Mar Chiquita, con supervivencias mayores (aunque muy variables entre camadas) que las de San Antonio Oeste. Sin embargo, la mortalidad total es finalmente similar en ambas poblaciones. Cuando la exposición es desde la fase embrionaria (lotes BB) algunas camadas de zoeas I de Mar Chiquita muestran muy buena supervivencia, pero también la mortalidad total es alta. Las 3 camadas del lote BB de San Antonio Oeste por su parte mostraron muy buena supervivencia pero al igual que las del lote BA, no llegaron a cangrejo 1. La exposición a baja salinidad durante la etapa embrionaria parece tener en esta población efectos deletéreos que se manifiestan recién durante la etapa de megalopa.

Las fases de zoea II y III son las menos sensibles, con la mortalidad más baja en ambas poblaciones. En particular las zoeas II no muestran diferencias significativas de mortalidad en ningún caso entre el cultivo en 100 y 30% de agua de mar, con supervivencias no menores al 90%. Las zoeas III de San Antonio Oeste presentan el mismo patrón, mientras que en las de Mar Chiquita se nota ya en esta etapa un efecto significativo de la baja salinidad de cultivo larval (Figuras 7.1 y 7.4). Anger e Ismael (1997) encontraron que las zoeas II de Mar Chiquita, en condiciones de laboratorio, eran la etapa larval con menor crecimiento durante el período intermuda (40% contra 90% de las restantes etapas larvales medido como diferencia de peso seco). Es posible que esta menor actividad metabólica se traduzca en una menor sensibilidad larval a las condiciones de su ambiente. Finalmente, la fase de megalopa es la más crítica en cuanto a su tolerancia a bajas salinidades, principalmente durante la muda a este estadio o en la premuda a cangrejo1. Este período que abarca las dos mudas metamórficas de los braquiuros es típicamente el más crítico del desarrollo larval, ya que implica cambios morfológicos y fisiológicos sumamente importantes.

La duración de la fase larval varió entre las camadas provenientes de Mar Chiquita, para cualquier condición de desarrollo, mientras que fue mucho más uniforme entre las de San Antonio Oeste. El efecto de la baja salinidad en la duración de la fase larval también varió entre poblaciones. Para Mar Chiquita, la exposición a baja salinidad en larvas provenientes de embriones aclimatados a alta salinidad (lote AB) alarga la fase larval total y todos los períodos intermuda. En cambio, cuando los embriones son aclimatados a baja salinidad, el desarrollo es más corto (lote BB) o igual (lote BA) que en el lote AA. En la condición BA hay una mayor duración del intermuda 1 que luego es compensada por una menor duración del intermuda 5 (Figura 7.2). Aparecieron zoeas V en algunas de las

camadas provenientes de Mar Chiquita, expuestas a baja salinidad durante el desarrollo larval. Giménez (2000), en un estudio sobre el efecto de la salinidad y la biomasa inicial en el desarrollo larval de esta especie, describe la aparición de esta vía de desarrollo alternativa en larvas provenientes de la población de Mar Chiquita, en correlación con una baja salinidad de cultivo (15‰) y baja biomasa de la zoea I.

Para los individuos provenientes de San Antonio Oeste, por su parte, la exposición a baja salinidad, tanto en la fase embrionaria como larval produce un alargamiento de la fase larval total y de todos los estadios. Cuando la exposición es en la fase embrionaria y larval (lote BB) el alargamiento es más pronunciado en todos los períodos intermuda alcanzados en esa condición (intermudas 1 a 4) (Figura 7.5)

Finalmente, cuando se compara la talla de los cangrejos 1 resultantes de cada condición de desarrollo embrionario y larval para las dos poblaciones consideradas, nuevamente encontramos diferencias en las respuestas. En las provenientes de Mar Chiquita, el desarrollo embrionario y larval en baja salinidad produjo cangrejos más grandes que cualquiera de las otras condiciones de cultivo. Ésto podría deberse a que la aclimatación a baja salinidad durante la etapa embrionaria produce alguna modificación del desarrollo, si éste continúa en baja salinidad, que permite alcanzar una mayor talla. O simplemente ser el resultado de la menor duración del desarrollo larval en esta condición. Giménez (2000) encontró que sólo aparecían tallas mayores de cangrejos 1 en los cultivos cuando tanto el desarrollo embrionario como larval transcurría en baja salinidad (15‰). En estos experimentos no se encontró una duración menor del desarrollo larval en esa condición por lo cual la mayor talla debe responder a cambios metabólicos. Para los de San Antonio Oeste, por su parte, la baja salinidad de desarrollo larval, disminuyó la talla alcanzada por los cangrejos 1, resultando éstos significativamente más pequeños que los de la mismas camadas cultivados en agua de mar (Figura 7.3), posiblemente debido a la mayor duración del desarrollo.

Resulta evidente que las dos poblaciones estudiadas presentan características sumamente diferentes en varios aspectos de su fisiología larval, en relación con la salinidad (así como en relación con la temperatura, capítulo 5). Las bases de tales diferencias se deben encontrar relacionadas, al menos en parte, con las condiciones del ambiente donde transcurre el desarrollo embrionario y larval. Si bien el desarrollo entre zoea II y megalopa ocurre en el mar en ambas poblaciones, tanto los embriones como las zoeas I y las megalopas de *C. granulata* están frecuentemente expuestos a

bajas salinidades en Mar Chiquita, pero no en San Antonio Oeste. Así, la variabilidad entre camadas de diferentes hembras que aparece en la población de Mar Chiquita podría ser resultado de variaciones en el desarrollo producidas por exposición a diferentes condiciones de salinidad, y esta población estaría mostrando una mayor plasticidad. Por otra parte, también en Mar Chiquita, el desarrollo embrionario en baja salinidad parece producir una compensación de modo que el desarrollo larval es más corto y los cangrejos 1 resultantes mas grandes en esa condición. Parámetros que podrían favorecer la supervivencia en condiciones poco favorables. Cuando la exposición a la baja salinidad es durante la etapa larval aparece, aunque en baja proporción y en relación con una baja biomasa de la zoea I, un estadio larval extra, que aumentaría las posibilidades de sobrevivir a las condiciones desfavorables dado que por una parte, el ciclo larval se alarga aumentando las chances de hallar un sitio mas favorable y por otra, las megalopas que se producen son de mayor talla. Dado que el retraso en la metamorfosis que pueden experimentar las megalopas de *C. granulata* hasta hallar un sustrato adecuado para asentarse produce una disminución de la talla y la supervivencia del primer juvenil (Gebauer et al., 1999) una megalopa de mayor tamaño en condiciones desfavorables podría ser adaptativo. En San Antonio Oeste por su parte, dado que la salinidad nunca se encuentra por debajo de 34‰, tales compensaciones no aparecen y, por el contrario, la baja salinidad durante la fase embrionaria tiene efectos nocivos que se manifiestan posteriormente, así como la baja salinidad durante la fase larval disminuye las chances posteriores de supervivencia por disminuir la talla de los cangrejos 1.

Sería de interés evaluar estos mismos parámetros en poblaciones de *C. granulata* como la de Bahía Blanca, donde las condiciones son similares a las de San Antonio Oeste en relación a la salinidad, y donde todo el desarrollo larval transcurre dentro del estuario (Cervellini, 1999), y en la Bahía Samborombón, con condiciones de baja salinidad, donde las larvas son exportadas aunque se encuentran algunos estadios dentro del estuario (Spivak y Garrido, 2000). Podría esperarse que la respuesta larval a la salinidad fuera similar a la hallada para San Antonio Oeste en Bahía Blanca y similar a Mar Chiquita en Bahía Samborombón.

Capítulo 8

Discusión general

La respuesta fisiológica de los individuos de una especie a una condición dada del ambiente, varía en tres niveles jerárquicos simultáneos: el individual, el intrapoblacional y entre poblaciones. A nivel individual, la respuesta de un organismo (sin considerar las diferentes respuestas de las partes que lo integran), variará durante el desarrollo dependiendo por una parte de las características fisiológicas de cada estadio, y por otra de las condiciones experimentadas por las etapas previas en relación con la plasticidad fenotípica de los individuos (entendiendo como plasticidad fenotípica a la capacidad de un genotipo individual de producir una variedad de fenotipos en respuesta a diferentes conjuntos de condiciones ambientales). A nivel poblacional, una población dada presentará un cierto grado de variabilidad fisiológica determinada a su vez por la diversidad de genotipos, plasticidad fenotípica de los mismos, desarrollo de los individuos y efectos ambientales pasados y presentes. Finalmente las diferencias interpopulacionales estarán dadas por diferencias genéticas y/o ambientales entre poblaciones (Hadfield y Strathmann, 1996).

Generalmente los estudios fisiológicos se centran en alguna etapa de desarrollo dentro del ciclo de una especie, y menos frecuentemente abarcan la variación en la respuesta a lo largo de todas las etapas. Aún en este último caso, la variación entre individuos es considerada como “ruido” en los resultados y en pocos casos es evaluada en su amplitud. Desde el punto de vista ecológico sin embargo, la variación individual a lo largo del desarrollo, así como la variación intra e interpopulacional pueden ser claves al momento de evaluar la relación de una especie con el ambiente y de predecir su comportamiento ante un conjunto dado de condiciones. Es evidente por otra parte, que este tipo de consideraciones hace mucho más difícil la evaluación de los resultados y frecuentemente no es posible separar los efectos de los distintos niveles (Spicer y Gaston, 1999)..

Teniendo en consideración la variabilidad intrapoblacional en la respuesta a la salinidad, esa variabilidad fue muy alta en las tres especies estudiadas en Mar Chiquita (*Chasmagnathus granulata*, *Cyrtograpsus angulatus* y *Cyrtograpsus altimanus*), y se evidenció en la variación de algunos

caracteres de su historia de vida y en todas las etapas ontogenéticas observadas, (talla y/o peso de huevos, larvas y juveniles), así como en la tolerancia de cada una.

Considerando la respuesta poblacional a la salinidad, más allá de la variabilidad demostrada, la mortalidad de los embriones y zoeas I de cada especie concuerda con la distribución de los adultos en la laguna. *C. angulatus*, aún cuando en general se la refiere como una especie marina litoral, penetra ampliamente en ambientes salobres estuariales (Spivak, 1997) y en Mar Chiquita se la encuentra en toda la laguna, incluso en las zonas más alejadas de la influencia marina, con salinidades de 2‰ (Spivak et al, 1994). Sus embriones fueron capaces de sobrevivir en salinidades muy bajas (hasta 3‰ a partir de los 3 días de desarrollo) y las zoeas I aclimatadas a baja salinidad durante la etapa embrionaria soportaron el mismo rango de salinidades durante 48 hs. y hasta toleraron agua destilada 24 hs. El resto de los estadíos larvales, si bien no pudieron cultivarse en laboratorio, no se encuentran nunca dentro de la laguna (como tampoco los de las otras dos especies), por lo que presumiblemente requieren de condiciones marinas para desarrollarse (Anger et al., 1994). *C. granulata*, si bien penetra varios kilómetros dentro de la laguna, no se halla en sustratos aparentemente aptos de las regiones más dulceacuícolas de la misma (Spivak et al., 1994). Los embriones de esta especie mostraron una tolerancia a la baja salinidad similar a la de *C. angulatus* y aparentemente una mayor tolerancia a altas salinidades (44‰ o más). Ésto último debe relacionarse con el hábito excavador y semiterrestre de esta especie, que la enfrenta habitualmente con condiciones hiperhalinas por evaporación dentro de las cuevas. Las larvas por su parte mostraron también capacidad de tolerar bajas salinidades, en menor grado que *C. angulatus* y sólo durante el primer estadío (ya que la supervivencia hasta juvenil en baja salinidad (10‰) fue muy pobre, cualquiera fuera la salinidad de aclimatación embrionaria). Finalmente, *C. altimanus* evidenció escasa tolerancia embrionaria y larval a la baja salinidad, en concordancia con una población adulta de baja densidad y sólo en los sitios con mayor influencia marina de la laguna.

Desde el punto de vista ontogenético, las etapas embrionaria y larval representan las fases más sensibles, o con un rango más estrecho de tolerancia, en el ciclo de vida de las tres especies. Al menos en relación con la distribución conocida de juveniles y adultos dentro de la laguna (Spivak et al., 1994), y con la tolerancia en condiciones de laboratorio (Spivak, 1999), los embriones pueden mostrar una tolerancia similar a la de aquellas etapas sólo luego de algunos días de desarrollo (*C. angulatus* y *C. granulata*), o son marcadamente menos tolerantes (*C. altimanus*). Las larvas por su

parte son marcadamente menos tolerantes que los adultos, al menos las de *C. granulata* y *C. altimanus*. Si bien las zoeas I de *C. angulatus* fueron extremadamente tolerantes a la baja salinidad cuando se aclimataron previamente a esa condición, la dificultad de su cultivo en cualquier condición, unida a la ausencia de cualquier estadio posterior a la zoea I dentro de la laguna Mar Chiquita, parecen indicar que tal tolerancia no se mantiene a lo largo del desarrollo larval, del mismo modo que en *C. granulata*.

La respuesta de *C. granulata* de Mar Chiquita a la temperatura, medida como mortalidad y duración del desarrollo larval, también mostró una alta variabilidad intrapoblacional. Aquí además, la temperatura mostró una influencia directa, produciendo parte de esa variabilidad (la talla de las zoeas I varió ampliamente en relación con el cultivo de los embriones en baja temperatura (16°C)). Gran variabilidad se registró también en el tamaño inicial de los huevos de diferentes hembras, lo cual no se correlacionó con la talla de las mismas ni con la respuesta posterior a la temperatura.

Cuando se analiza la variabilidad interpoblacional de *C. granulata* en relación con la temperatura y la salinidad, a partir de la comparación de los resultados de Mar Chiquita con los de San Antonio Oeste, se encuentra en primer término, que la variabilidad de respuestas evidenciada en Mar Chiquita no aparece, o es mucho menos marcada, en la población de San Antonio Oeste. En segundo término, la respuesta global o promedio a estas variables ambientales difiere en varios aspectos entre las poblaciones, siendo los más relevantes sin duda que la baja salinidad de desarrollo embrionario (5‰) y la baja temperatura de desarrollo larval (16°C), impiden que las larvas de San Antonio Oeste alcancen la fase juvenil en condiciones de laboratorio (aún cuando la aclimatación embrionaria a la baja salinidad mejoró la supervivencia de las zoeas I en esa condición).

Tanto el tipo de respuesta encontrada en las poblaciones *Chasmagnathus granulata*, *Cyrtograpsus angulatus* y *C. altimanus* de Mar Chiquita, como la diferencia entre las poblaciones de *C. granulata* de Mar Chiquita y San Antonio Oeste, puede ser explicada en gran medida por las condiciones del ambiente físico en cada sitio. En Mar Chiquita existe una enorme variación espacial y temporal de la temperatura y la salinidad. Esta laguna costera está marcadamente influenciada por las mareas y los vientos que determinan el grado y duración de la penetración de agua salada. Unido a ello, su escasa profundidad y un aporte variable de agua dulce a partir de pequeños cursos de agua y de las lluvias, es prácticamente imposible predecir las condiciones presentes en diferentes zonas de la laguna en un momento dado, más allá de un cierto patrón marcado por la distancia al mar y la estacionalidad del

clima. San Antonio Oeste por su parte presenta mucha mayor uniformidad ambiental debido tanto a la falta de aportes importantes de agua dulce (no recibe cursos de agua y la precipitación es sumamente escasa), como a la predictibilidad y extensión del efecto de las mareas que cubren y descubren periódicamente los cangrejales en un ciclo semidiurno muy poco afectado por los vientos.

Dados dos ambientes tan diferentes, es esperable la aparición de respuestas fisiológicas distintas en cada uno, ya sea que las mismas respondan a diferencias genéticas entre poblaciones o sean sólo consecuencia de una adaptación fisiológica reversible (Hadfield y Strathmann, 1999).

La variabilidad espacio-temporal e impredecibilidad de las condiciones ambientales en la laguna de Mar Chiquita parecen el escenario adecuado para la selección de plasticidad fenotípica en sus poblaciones, que provea para un momento dado una serie de fenotipos diferentes capaces, al menos algunos de ellos, de enfrentar exitosamente las condiciones prevalecientes en dicho momento (Si bien los mecanismos y bases de tal tipo de selección no están totalmente formalizados, existen evidencias ecológicas de su ocurrencia en ambientes de este tipo; Travis, 1994; Willmer et al, 2000).

Esta evaluación de los resultados, si bien no puede ser concluyente en muchos aspectos, presenta un panorama interesante para futuras investigaciones. Por otra parte plantea la cuestión de la validez de las consideraciones acerca de la caracterización ecológica o fisiológica de una especie sin considerar las variaciones dentro de y entre sus poblaciones.

Bibliografía

- Adiyodi, R.** (1988). Reproduction and development. *In* Biology of land crabs. W. Burggren and B. McMahon, eds. Cambridge University Press: 139-185.
- Anderson, D.** (1982). Embriology. *In* The Biology of Crustacea, D. E. Bliss, gen. ed., Vol. 2: Embryology, morphology and genetics, L. G. Abele, ed. Academic Press: 1-41.
- Anger, K.** (1991). Effects of temperature and salinity on the larval development of the chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (Decapoda: Grapsidae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 72: 103-110.
- Anger, K.** (1995). The conquest of freshwater and land by marine crabs: adaptations in life-history patterns and larval bioenergetics. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 193: 119-145.
- Anger, K.** (1996). Salinity tolerances of the larvae and first juveniles of a semiterrestrial grapsid crab, *Armases miersi* (Rathbun). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 202: 205-223
- Anger, K. and D. Ismael.** (1997) Growth and elemental composition (C, N, H) in larvae and early juveniles of a South American salt marsh crab, *Chasmagnathus granulata* (Decapoda: Grapsidae). *Mangroves and Salt Marshes*, 1 :219-227.
- Anger, K. and G. Charmantier** (2000). Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in a mangrove crab, *Sesarma curacaoense* (Decapoda: Grapsidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 251:265-274.
- Anger, K., Harms, J., Christiansen, M. E., Süsens, U. and B. Wilmes.** (1992). Growth patterns, chemical composition and oxygen consumption in early juvenile *Hyas araneus* (Decapoda: Majidae) reared in the laboratory. *Helgoländer Meeresunters.* 46: 9-28
- Anger, K., Harms, J., Montú , M. and C. de Bakker.** (1990). Effects of salinity on the larval development of a semiterrestrial tropical crab, *Sesarma angustipes* (Decapoda: Grapsidae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 62: 89-94.
- Anger, K., Riesebeck K. and Püschel C.** (2000). Effects of salinity on larval and early juvenile growth of an extremely euryhaline crab species, *Armases miersii* (Decapoda: Grapsidae). *Hydrobiologia* 426 :161-168.

- Anger, K., Spivak, E. and T. Luppi,** (1998). Effects of reduced salinities on development and bioenergetics of early larval shore crab, *Carcinus maenas*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 220 287-304.
- Anger, K., Spivak, E., Bas, C., Ismael, D. and T. Luppi** (1994). Hatching rhythm and dispersion of decapod crustacean larvae in a brackish coastal lagoon in Argentina. Helgoländer Meeresunters. 48: 445-466.
- Barnes, H. and M. Barnes.** (1974). The response during development of the embryos of some common cirrepedes to wide changes in salinity. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 15: 197-202.
- Boddeke, R.** (1982). The occurrence of winter and summer eggs in the brown shrimp (*Crangon crangon*) and the pattern of recruitment. Netherlands Journal of Sea Research 16, 151-162.
- Boschi, E. E.** (1964). Los crustáceos decápodos Brachyura del litoral bonaerense (R. Argentina). Bol. Inst. Biol. Mar., Mar del Plata (Argentina) 6: 1-99.
- Boschi, E., Scelzo, M. y B. Goldstein.** (1967). Desarrollo larval de dos especies de crustáceos decápodos en el laboratorio. *Pachycheles haigae* Rodrigues Da Costa (Porcellanidae) y *Chasmagnathus granulata* Dana (Grapsidae). Bol. Inst. Biol. Mar., Mar del Plata (Argentina), 12: 1-46.
- Botto, J. L. y H. R. Irigoyen.** (1980). Bioecología de la comunidad del cangrejal. I. Contribución al conocimiento biológico del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del Rio Salado, Provincia de Buenos Aires. Seminario Latinoamericano de Ecología Bentónica y Sedimentología de la Plataforma Continental del Atlántico Sur. UNESCO, Montevideo: 161-169.
- Branford, J. R.** (1978). Incubation period for the lobster *Homarus gammarus* at various temperatures. Mar. Biol. 47: 363-368.
- Broekhuysen, G. J.** (1936). On development, growth and distribution of *Carcinides maenas* (L.). Archs Néerls. Zool. 2: 257-399.
- Brown, S., Bert, T., Tweedale, W., Torres, J. and W. Lindberg.** (1992). The effect of temperature and salinity on survival and development of early life stage florida stone crabs *Mennippe mercenaria* (Say). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 157: 115-136.

- Capitoli, R. R. and E. L. Ortega.** (1993). Contribuição ao conhecimento do espectro trófico de *Cyrtograpsus angulatus* Dana da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. Nauplius, Rio Grande, Brasil, 1: 81-88.
- Cassels, F. and C. Krebs** (1983). A comparison of artificial incubation methods using ova of the red crab *Geryon quinqueidens* Smith (Decapoda, Brachyura). J. Crust. Biol. 3(4): 565-574.
- Cervellini, P.** (1999). Retención y transporte de larvas de crustáceos decápodos en el estuario de Bahía Blanca, Argentina. Resúmenes I Jornadas Argentinas de Carcinología. Buenos Aires, Argentina.
- Cervino, C., Luquet, C., Haut, G. and E. Rodriguez.** (1996). Salinity preferences of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 after long-term acclimation to different salinities. Atlántica, Río Grande 18: 69-75.
- Charmantier, G.** (1998). Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: a review. Invertebrate Reproduction and Development 33(2-3):177-190.
- Charmantier, G. and D. E. Aiken.** (1987). Osmotic regulation in late embryos and prelarvae of the American lobster *Homarus americanus* H. Milne-Edwards, 1837 (Crustacea, Decapoda). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 109: 101-116.
- Charmantier, G. and M. Charmantier-Daures.** (1991). Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in *Cancer irroratus*. Elements of comparison with *C. borealis* (Crustacea, Decapoda). Biol. Bull. 180: 125-134.
- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M. and K. Anger** (1998). Ontogeny of osmoregulation in the grapsid crab *Armases miersii* (Crustacea, Decapoda). Mar. Ecol. Prog. Ser. 164: 285-292.
- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Bouaricha, N., Thuet, P., Aiken, D. and J. Trilles.** (1988). Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in two decapod crustaceans: *Homarus americanus* y *Penaeus japonicus*. Biol. Bull. 175: 102-110.
- Cheung, T.** (1966). The development of egg-membranes and egg attachment in the shore crab, *Carcinus maenas*, and some related decapods. J. mar. biol. Ass. U. K. 46: 373-400.
- Clarke, A., Hopkins, C. and E. Nilssen** (1991). Egg size and reproductive output in the deep-water prawn *Pandalus borealis* Krøyer, 1838. Functional ecology 5: 724-730.
- Costlow Jr., J. and C. Bookhout** (1960). A method for developing brachyuran eggs *in vitro*. Limnol. Oceanogr. 5: 212-215.

- Costlow, Jr., J.** (1967). The effect of salinity and temperature on survival and metamorphosis of megalops of the blue crab *Callinectes sapidus*. Helgoländer Meeresunters. 15: 84-97.
- Crisp, J. J., and J. D. Costlow.** (1963). The tolerance of developing cirripede embryos to salinity and temperature. Oikos 14: 22-34.
- Davis, C.** (1981). Mechanisms of hatching in aquatic invertebrate eggs II. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 19: 95-123.
- De Vries, M. and R. Forward** (1991a). Control of egg-hatching time in crabs from different tidal heights. J. Crust. Biol. 11: 29-39.
- DeVries, M. and R. Forward.** (1991b). Mechanisms of crustacean egg hatching: evidence for enzyme release by crab embryos. Mar. Biol. 110: 281-291.
- DeVries, M., Epifanio, C. and A. Dittel.** (1983). Lunar rhythms in the egg hatching of the subtidal crustacean *Callinectes arcuatus* Ordway. Estuar. Coastal Shelf Sci. 17: 717-724.
- DeVries, M., Rittschof, D. and R. B. Forward.** (1991). Chemical mediation of larval release behaviors in the crab *Neopanope sayi*. Biol. Bull. 180: 1-11.
- Díaz, H.** (1980). The mole crab *Emerita talpoida* (Say): a case of changing life history pattern. Ecol. Mon. 50(4): 437-456.
- Díaz, H. and M. Bevilaqua.** (1986). Larval development of *Aratus pisonii* (Milne Edwards) (Brachyura, Grapsidae) from marine and estuarine environments reared under different salinity conditions. J. Coast. Res. 2: 43-49.
- D'Incao, F., Da Silva, K., Ruffino, M. and A. Da Costa Braga.** (1990). Hábito alimentario do caranguejo *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 na barra do Rio Grande, R. S. (Decapoda, Grapsidae). Atlántica, Río Grande 12: 85-93.
- Dunham, D. and S. Gilchrist (1988).** Behavior. In W. Burggren and B. McMahon, eds, Biology of land crabs. Cambridge University Press, Cambridge: 97-138
- Dupre, E., G. Bellolio and K. Lohrmann.** (1992). Desarrollo embrionario del camarón de roca *Rhynchocinetes typus*, H. Milne Edwards 1837, en condiciones de laboratorio. Rev. Chilena Hist. Nat. 65: 435-
- Esteves, J., Solís, M., Sastre, V., Santinelli, N., Gil, M., Commendatore, M. y C. González Raies.** (1996). Evaluación de la contaminación urbana de la Bahía de San Antonio. Informe técnico

- del plan de manejo integrado de la zona costera patagónica. Fundación Patagonia Natural (Puerto Madryn, Argentina) 20: 1-26.
- Fasano, J., Hernández, M., Isla, F. y E. Schnack.** (1982). Aspectos evolutivos y ambientales de la laguna Mar Chiquita (Provincia de Buenos Aires, Argentina). *Oceanologica Acta* N° sp: 285-292.
- Felder, D., Martin, J. and J. Goy.** (1985). Patterns in early postlarval development of decapods. *In* Crustacean Issues 2. Larval growth. A. M. Wenner, ed. A. A. Balkema, Rotterdam: 163-225
- Fisher, W.** (1976). Relationships of epibiotic fouling and mortalities of eggs of the Dungeness Crab (*Cancer magister*). *J. Fish. Res. Board Can.* 33: 2849-2853.
- Forward Jr., R.** (1987). Larval release rhythms of decapod crustaceans: an overview. *Bull. Mar. Sci.* 41: 165-176.
- Gebauer, P., Paschke, K. and K. Anger** (1999). Costs of delayed metamorphosis: reduced growth and survival in early juveniles of an estuarine grapsid crab, *Chasmagnathus granulata*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 238: 271-281.
- Gilles, R. and C. Jeuniaux.** (1979). Osmoregulation and ecology in media of fluctuating salinity. *In* Mechanisms of osmoregulation in animals. R. Gilles ed. Wiley-Interscience: 581-608.
- Giménez, L.** (2000). El efecto de la salinidad y la biomasa inicial en el desarrollo larval del cangrejo estuarino *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda). Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, 2000, pp. 1-145.
- Goudeau, M. and J. Becker** (1982). Fertilization in a crab II. Cytological aspects of the cortical reaction and fertilization envelope elaboration. *Tissue & Cell* 14: 273-282.
- Goudeau, M. and F. Lachaise.** (1983). Structure of the egg funiculus and deposition of embryonic envelopes in a crab. *Tissue & Cell* 15: 47-62.
- Greenwood, J. G., Jones, M. B. and J. Greenwood** (1989). Salinity effects on brood maturation of the mysid crustacean *Mesopodopsis slabberi*. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 69: 683-694.
- Hadfield, M. and M. Strathmann** (1996). Variability, flexibility and plasticity in life histories of marine invertebrates. *Oceanologica Acta* 19 (3-4): 323-334.
- Hancock, M., Hughes, J. and S. Bunn** (1998). Influence of genetic and environmental factors on egg and clutch sizes among populations of *Paratya australiensis* Kemp (Decapoda: Atyidae) in upland rainforest streams, south-east Queensland. *Oecología* 115: 483-491.

- Harrison, K.** (1990). The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. *J. Shellfish Res.* 9(1): 1-28.
- Hart, R. and I. McLaren** (1978). Temperature acclimation and other influences on embryonic duration in the copepod *Pseudocalanus* sp. *Mar. Biol.* 45: 23-30.
- Hartnoll, R.** (1982). Growth. *In The Biology of Crustacea*, D. E. Bliss, gen. ed., Vol. 2: Embryology, morphology y genetics, L. G. Abele, ed., Academic Press: 111-196.
- Hartnoll, R.** (1988). Evolution, systematics, and geographical distribution. *In Biology of land crabs*. W. Burggren y B. McMahon, eds. Cambridge University Press: 6-54.
- Hartnoll, R. and R. Paul.** (1982). The embryonic development of attached and isolated eggs of *Carcinus maenas*. *Int. J. Invert. Repr.* 5: 247-252.
- Helluy, S. and B. Beltz** (1991). Embryonic development of the american lobster (*Homarus americanus*): quantitative staging and characterization of an embryonic molt cycle. *Biol. Bull.* 180: 355-371.
- Hiatt, R. W.** (1948). The biology of the lined shore crab *Pachygrapsus crassipes* Randall. *Pacific Sci.* 2: 135-212.
- Ismael, D., Anger, K and G. Moreira.** (1997). Influence of temperature on larval survival, development and respiration in *Chasmagnathus granulata* (Crustacea Decapoda). *Helgolander Meeresunters* 51: 463-475.
- Johns, D.** (1981). Physiological studies on *Cancer irroratus* larvae. I. Effects of temperature and salinity on survival, development rate and size. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 5: 75-83.
- Johnson, P., Siebhurt, McN. J., Sastry, A., Arnold; C. and M. Doty.** (1971). *Leucothrix mucor* infestation of benthic crustacea, fish eggs, and tropical algae. *Limnol. Oceanogr.* 16: 962-969.
- Jones, M. and M. Simons.** (1982). Responses of embryonic stages of the estuarine mud crab, *Macrophthalmus hirtipes* (Jacquinot), to salinity. *Int. J. Invert. Rep.* 4: 273-279.
- Kelley, Jr., B. J. and W. D. Burbanck.** (1976). Responses of embryonic *Cyathura polita* (Stimpson) (Isopoda: Anthuridea) to varying salinities. *Chesapeake Sci.* 17: 159-167.
- Kinne, O.** (1964). Non genetic adaptation to temperature and salinity. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresunters.* 9 (1-4), 433-458.
- Kinne, O.** (1971). Salinity. *Marine Ecology*, Vol. 1, Part 2, Otto Kinne, ed. Wiley-Interscience: 821-995.

- Landry, M.** (1975). Seasonal temperature effects and predicting development rates of marine copepod eggs. *Limnol. Oceanogr.* 20(3): 434-440.
- Laughlin, R. B. and W. French.** (1989a). Interactions between temperature and salinity during brooding on subsequent zoeal development of the mud crab *Rhithropanopeus harrisi*. *Mar. Biol.* 102: 377-386.
- Laughlin, R. B. and W. French** (1989b) Differences in responses to factorial combinations of temperature and salinity by zoeae from two geographically isolated populations of the mud crab *Rhithropanopeus harrisi*. *Mar. Biol.*, 102 387-395.
- Lawlor, L.** (1976). Molting, growth and reproductive strategies in the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*. *Ecology* 57: 1179-1194.
- Lonsdale, D. and J. Levinton** (1985). Latitudinal differentiation in embryonic duration, egg size, and newborn survival in a harpacticoid copepod. *Biol. Bull.* 168: 419-431.
- Luppi, T., Bas, C., Spivak, E. and K. Anger.** (1997). Fecundity of two grapsid crab species in the Laguna Mar Chiquita, Argentina. *Arch. Fish. Mar. Res.* 45: 149-166
- Luquet, C. M., Ford, P., Rodríguez, E., Ansaldo, M. and V. Stella.** (1992). Ionic regulation patterns in two species of estuarine crabs. *Com. Biol.*, 10: 315-325.
- Mañé-Garzón, F., Dei-Cas, E., Holcman-Spector, B. and J. Leymonie.** (1974). Estudios sobre la biología del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. I. Osmoregulación frente a cambios de salinidad. *Physis, Buenos Aires* 33A: 163-171.
- Mantel, L. and L. Farmer.** (1983). Osmotic and ionic regulation. *In The Biology of Crustacea*, D. E. Bliss, gen. ed., Vol.5 Internal anatomy and Physiological regulation. L. Mantel, ed. Academic Press: 53-161.
- Martorelli, S. R.** (1989). El rol de *Cyrtograpsus angulatus* (Crustacea; Brachyura) en los ciclos de vida de *Microphallus szidati* (Digenea; Microphallidae) y *Falsifilicollis chasmagnathi* (Acanthocephala; Filicollidae). Algunos aspectos de su ecología parasitaria. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 84: 567-574.
- Mashiko, K.** (1982). Differences in both the egg size and the clutch size of the freshwater prawn *Palaemon paucidens* De Haan in the Sagami river. *Jap. J. Ecol.* 32: 445-451.
- Mashiko, K.** (1987). Relationships between egg size and incubation time among the populations of two freshwater prawns. *Ecol. Res.* 2: 97-99.

- Mashiko, K.** (1990). Diversified egg and clutch sizes among local populations of the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense* (De Haan) Journal of Crustacean Biology 10(2):306-314.
- Mohamedeen, H. and R. G. Hartnoll.** (1989). Larval and postlarval growth of individually reared specimens of the common shore crab *Carcinus maenas* (L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 134: 1-24
- Okamoto, K.** (1991). On the development, hatch and culture of eggs of the giant spider crab, *Macrocheira kaempferi*. Bull. Shizuoka Prefectural Fish. Exp. St. 26: 21-33.
- O'Leary Amsler, M. and R. George.** (1984a). The effect of temperature on the oxygen consumption and developmental rate of embryos of *Callinectes sapidus* Rathbun. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 82: 221-229.
- O'Leary Amsler, M. and R. George** (1984b). Seasonal variation in the biochemical composition of the embryos of *Callinectes sapidus* Rathbun. J. Crust. Biol. 4(4): 546-553.
- Olivier, S.R., Escofet, A., Penchaszadeh, P. y J.M. Orensanz.** (1972a). Estudios ecológicos de la región estuarial de Mar Chiquita. I. Las comunidades bentónicas. An. Soc. Cient. Arg. 193: 237-262.
- Olivier, S. R., Escofet, A., Penchaszadeh, P. y J.M. Orensanz.** (1972b). Estudios ecológicos de la región estuarial de Mar Chiquita. II. Relaciones tróficas interespecíficas. An. Soc. Cient. Arg. 194: 89-104.
- Pandian, T. J.** (1970). Ecophysiological studies on the developing eggs and embryos of the European lobster *Homarus gammarus*. Mar. Biol. 5: 154-167.
- Pechenik, J.** (1984) The relationship between temperature, growth rate, and duration of planktonic life for larvae of the gastropod *Crepidula fornicata* (L.) J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 74: 241-257.
- Pestana, D. and A. Ostrenski** (1995) Occurrence of an alternative pathway in the larval development of the crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851, under laboratory conditions. Hydrobiologia 306: 33-40
- Petersen, S.** (1995). The embryonic development of *Hyas araneus* L. (Decapoda, Majidae): effects of temperature. Sarsia 80: 193-198.
- Prosser, C. L. and F. Brown, Jr.** (1968). Fisiología comparada. Editorial Interamericana. 2da. edición. 728 pp.
- Retamal, M.A.** (1981). Catálogo ilustrado de los Crustáceos Decápodos de Chile. Gayana, Zoología, Universidad de Concepción, Chile, 44: 1-110.

- Rieger, P. J. and R. R. Vieira.** (1997). Desenvolvimento larval de *Cyrtograpsus angulatus* Dana (Crustácea, Decápoda, Grápsidae) em laboratório. *Revta. bras. Zool.* 14: 601-623.
- Rittschof, D., Forward, R. and D. Mott.** (1985). Larval release in the crab *Rhithropanopeus harrisi* (Gould): chemical cues from hatching eggs. *Chemical Senses* 10: 567-577.
- Rodrigues S. de A. (1976).** Sobre a reprodução, embriologia e desenvolvimento larval de *Callichirus major* Say, 1818 (Crustacea, Decapoda, Thalassinidea). *Bol. Zool., Univ. São Paulo* 1: 85-104.
- Rosenberg, R. and J. Costlow Jr.** (1979). Delayed response to irreversible non - genetic adaptation to salinity in early development of the brachyuran crab *Rhithropanopeus harrisi*, and some notes on adaptation to temperature. *Ophelia* 18 (1): 97-112.
- Saigusa, M.** (1980). Entrainment of a semilunar rhythm by a simulated moonlight cycle in the terrestrial crab, *Sesarma haematocheir*. *Oecologia* 46: 38-44.
- Saigusa, M.** (1992). Control of hatching in an estuarine terrestrial crab. I. Hatching of embryos detached from the female and emergence of mature larvae. *Biol. Bull.* 183: 401-408.
- Salmon, M., Seiple, W. and S. Morgan.** (1986). Hatching rhythms of fiddler crabs and associated species at Beaufort, North Carolina. *J. Crust. Biol.* 6: 24-36.
- Sastry, A.** (1983). Ecological aspects of reproduction. *In* The Biology of Crustacea, D. E. Bliss, gen. ed., Vol. 8. Environmental adaptations. F. Vernberg y W. Vernberg, eds. Academic Press: 179-270.
- Scelzo, M. y V. Lichtschein de Bastida.** (1978). Desarrollo larval y metamorfosis del cangrejo *Cyrtograpsus altimanus* Rathbun, 1914 (Brachyura, Grapsidae) en laboratorio, con observaciones sobre la ecología de la especie. *Physis, Buenos Aires* 38A: 103-126.
- Schuh, M. and R. Diesel.** (1995). Effects of salinity, temperature y starvation on the larval development of *Armases* (= *Sesarma*) *miersii* (Rathbun, 1897), a semiterrestrial crab with abbreviated development (Decapoda: Grapsidae). *J. Crust. Biol.* 15: 205-213.
- Shirley, S. M., Shirley, T. C. and S. D. Rice.** (1987). Latitudinal variation in the Dungeness crab, *Cancer magister*: zoeal morphology explained by incubation temperature. *Mar. Biol.* 95: 371-376.
- Spicer, J.I. and K.J. Gaston.** (1999). Physiological diversity and its ecological implications. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, pp. 1-241.

- Spivak, E.** (1997) Cangrejos estuariales del Atlántico sudoccidental (25°-41° S) (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Investigaciones Marinas* 25: 105-120.
- Spivak, E.** (1999). Effect of reduced salinity on juvenile growth of two co-occurring congeneric grapsid crabs. *Mar. Biol.* 134(2):249-257.
- Spivak, E. and M. A. Politis.** (1989). High incidence of limb autotomy in a crab population from a coastal lagoon in Buenos Aires province, Argentina. *Can. J. Zool.*, 67: 1976-1985.
- Spivak, E., Anger, K., Luppi, T., Bas, C. and D. Ismael.** (1994). Distribution and habitat preferences of two grapsid crab species in Mar Chiquita Lagoon (Province of Buenos Aires, Argentina). *Helgoländer Meeresunters.* 48: 59-78.
- Spivak, E. y L. Garrido** (1999). Retención de larvas de cangrejos (Brachyura, Grapsidae) en el sistema estuarial de Samborombón, Argentina. Resúmenes I Congresso Brasileiro sobre Crustáceos. São Pedro, SP. Brasil.
- Stearns, S.** (1992). *The evolution of life histories.* Oxford University Press. Oxford. New York. pp.1-249.
- Subramoniam, T.** (1979). Some aspects of reproductive ecology of a mole crab *Emerita asiatica* Milne Edwards. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 36: 259-268.
- Sutcliffe, D. W. and T. R. Carrick.** (1981). Effect of temperature on the duration of egg development, and moulting and growth in juveniles of *Crangonyx pseudogracilis* (Crustacea: Amphipoda) in the laboratory. *Freshwater Biol.* 11: 511-522.
- Travis, J.** (1994). The adaptive role of morphological plasticity. In: *Ecological Morphology. Integrative Organismal Biology.* P.C. Wainwright and S.M. Reilly, eds., The University of Chicago Press. Chicago, USA, pp. 99-122.
- Underwood, A.** (1997). *Experiments in ecology.* Cambridge University press. Cambridge, pp. 1-504.
- Valdes, L., Alvarez-Osorio, M. T. and E. Gonzalez-Gurriaran.** (1991). Influence of temperature on embryonic and larval development in *Necora puber* (Brachyura, Portunidae). *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 71: 787-798.
- Valero, J., Iribarne, O. and M. Narvarte.** (1997). Geographic variation in fecundity, reproductive investment and egg size in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. VII Congresso Latino-Americano sobre Ciencias do Mar. Resumos expandidos Vol.II, 514-516.

- Vinuesa, J.** (1987). Embryonary development of *Lithodes antarcticus* Jacquinot (Crustacea, Decapoda, Lithodidae) developmental stages, growth and mortality. *Physis* 45A: 21-29.
- Wear, R.** (1974). Incubation in british decapod crustacea, and the effect of temperature on the rate and success of embryonic development. *J. mar. biol. Ass. U. K.* 54: 745-762.
- Wild, P.** (1983). The influence of sea water temperature on spawning, egg development, and hatching success of the dungeness crab, *Cancer magister*. *Fish. Bull.* 172: 097-213.
- Williamson, D.** (1982). Larval morphology and diversity *In* The Biology of Crustacea, D. E. Bliss, gen. ed., Vol. 2: Embryology, morphology y genetics, L. G. Abele, ed., Academic Press: 43-110.
- Willmer, P., Stone, G. and I Johnston** (2000). Environmental physiology of animals. Blackwell Science Ltd. Oxford, UK, pp 1-644.
- Willows, R.** (1987). Intrapopulation variation in the reproductive characteristics of two populations of *Ligia oceanica* (Crustacea: Oniscidea). *J. Anim. Ecol.* 56: 331-340.
- Wolcott, T.** (1988). Ecology. *In* Biology of land crabs. W. Burggren y B. McMahon, eds. Cambridge University Press: 55-96.
- Zar, J.** (1984). Biostatistical analysis. 2nd. Ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 718 pp.