

**EFFECTOS DE LA SALINIDAD SOBRE LA REPRODUCCIÓN Y
EL DESARROLLO DEL “CAMARÓN DE AGUA DULCE”**
Palaemonetes argentinus

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS (ÁREA BIOLOGÍA)
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA
MAR DEL PLATA, ARGENTINA**

**POR
ROMINA BELÉN ITUARTE**

**DIRECCIÓN:
DR. KLAUS ANGER,
BIOLOGISCHE ANSTALT HELGOLAND,
STIFTUNG ALFRED-WEGENER-INSTITUT FÜR MEERES- UND POLARFORSCHUNG,
HELGOLAND, ALEMANIA.**

**CO-DIRECCIÓN:
DR. EDUARDO DANIEL SPIVAK,
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES,
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA,
MAR DEL PLATA, ARGENTINA**

SEPTIEMBRE DE 2008

*La evolución es una teoría. También es un hecho. Y los hechos y las teorías son cosas distintas, no escalones en una jerarquía de certeza creciente.
Los hechos son los datos acerca del mundo.
Las teorías son estructuras de ideas que explican e interpretan los hechos.
Los hechos no desaparecen cuando los científicos debaten teorías rivales para interpretarlos.
La teoría de la gravitación de Einstein reemplazó la de Newton en este siglo, pero las manzanas no se quedaron suspendidas en el aire esperando el resultado.
Y los humanos evolucionaron de ancestros simioscos ya sea por medio del mecanismo propuesto por Darwin o por otro que falte por descubrirse.*

Stephen Jay Gould (1941-2002)

CONTENIDOS

	PÁGINA
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABLAS	xii

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
I Las rutas hacia el agua dulce	4
II La conquista evolutiva de los ambientes de agua dulce.....	11
III Los camarones de la familia Palaemonidae	13
IV <i>Palaemonetes argentinus</i> (Nobili, 1901).....	16
V Estructura de la tesis	19
VI Objetivo general	21
VII Hipótesis generales.....	22

CAPÍTULO II

VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA EN LOS RASGOS DE HISTORIA DE VIDA DEL “CAMARÓN DE AGUA DULCE” <i>Palaemonetes argentinus</i>	23
INTRODUCCIÓN.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS	26
RESULTADOS	32
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	54

CAPÍTULO III

LA SALINIDAD Y EL CICLO REPRODUCTIVO DE LAS HEMBRAS DEL “CAMARÓN DE AGUA DULCE” <i>Palaemonetes argentinus</i>	55
INTRODUCCIÓN.....	56

MATERIALES Y MÉTODOS	58
RESULTADOS	63
DISCUSIÓN	71
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	76

CAPÍTULO IV

TAMAÑO DE HUEVOS, INCUBACIÓN E INVERSIÓN REPRODUCTIVA DEL “CAMARÓN DE AGUA DULCE” *Palaemonetes argentinus*:

DIFERENCIAS INTERPOBLACIONALES Y EFECTOS DE LA SALINIDAD.....	77
INTRODUCCIÓN.....	78
MATERIALES Y MÉTODOS	81
RESULTADOS	83
DISCUSIÓN	97
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	104

CAPÍTULO V

EFECTOS DE LA SALINIDAD SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO *in vitro* DEL “CAMARÓN DE AGUA DULCE” *Palaemonetes argentinus*.....

INTRODUCCIÓN.....	106
INTRODUCCIÓN.....	107
MATERIALES Y MÉTODOS	109
RESULTADOS	111
DISCUSIÓN	127
VARIABILIDAD INTERPOBLACIONAL EN LAS RESPUESTAS EMBRIONARIAS	133
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	139

CAPÍTULO VI

ACTIVIDAD Na^+ - K^+ -ATPasa EN EL “CAMARÓN DE AGUA DULCE” *Palaemonetes argentinus*:

VARIACIONES ONTOGENÉTICAS Y CAMBIOS INDUCIDOS POR LA SALINIDAD	140
INTRODUCCIÓN.....	141

	PÁGINA
MATERIALES Y MÉTODOS	145
RESULTADOS	149
DISCUSIÓN	152
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	157
 CAPÍTULO VII	
DISCUSIÓN GENERAL.....	158
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS GENERALES.....	164
LITERATURA CITADA.....	166

RESUMEN

EFFECTOS DE LA SALINIDAD SOBRE LA REPRODUCCIÓN Y EL DESARROLLO DEL “CAMARÓN DE AGUA DULCE” *Palaemonetes argentinus*.

ROMINA BELÉN ITUARTE

El camarón *Palaemonetes argentinus* (Decapoda: Caridea: Palaemonidae) se distribuye desde el centro este de Argentina hasta Uruguay y sur de Brasil. Habita lagos, ríos y arroyos, pero también lagunas costeras de salinidad variable. Fue sugerido que *P. argentinus*, como otras especies de la familia Palaemonidae, se encuentra en un estadio incipiente de radiación adaptativa hacia los ambientes de agua dulce. En esta tesis se compararon los efectos de la salinidad sobre la reproducción y el desarrollo embrionario entre poblaciones de *P. argentinus* geográficamente separadas y con distinto grado de aislamiento del mar. Además, los efectos de la salinidad a un nivel fisiológico-bioquímico fueron estudiados durante la ontogenia de la especie en una única población. Este estudio demostró que, aún cuando las poblaciones consideradas no estuvieron expuestas a salinidades concentradas en su ambiente natural, *P. argentinus* fue capaz de reproducirse y desarrollarse en un amplio rango de salinidades, desde el agua dulce hasta salinidades cercanas a la del agua de mar. Esos resultados apoyan la hipótesis que *P. argentinus* habría colonizado los ambientes de agua dulce en un tiempo evolutivo reciente. La mayoría de los rasgos comparados en el campo y experimentalmente difirieron notablemente entre y dentro de las poblaciones. Por ejemplo, las diferencias en el tiempo de incubación, en la tolerancia a la salinidad de los embriones y en la organogénesis embrionaria podría ser resultado de un desarrollo flexible asociado con las características ambientales locales o de una diferencia genética. Además, la variación intraespecífica en la respuesta de los embriones a las condiciones de cultivo *in vitro* sugiere que el control ejercido por las hembras durante la incubación difiere entre las poblaciones. Futuros experimentos deberán identificar si algunas de las diferencias fenotípicas entre las poblaciones estudiadas tienen un significado adaptativo en los distintos escenarios de las transiciones evolutivas entre los ambientes marino-salobre y de agua dulce.

ABSTRACT

SALINITY EFFECTS ON REPRODUCTION AND DEVELOPMENT OF THE “FRESHWATER SHRIMP”

Palaemonetes argentinus.

ROMINA BELÉN ITUARTE

The shrimp *Palaemonetes argentinus* (Decapoda: Caridea: Palaemonidae) occurs in limnic inland habitats such as lakes, rivers and streams, but also in brackish coastal lagoons, geographically ranging from central eastern Argentina to Uruguay and southern Brazil. It has been suggested that *P. argentinus*, such as several species of the family Palaemonidae, is in an early stage of evolutionary adaptation to life under freshwater conditions. In the present dissertation, salinity effects on reproduction and development of *P. argentinus* were compared in geographically separated populations with a different degree of isolation from the sea. In addition, the effects of salinity during the ontogeny were studied at a physiological-biochemical level in a freshwater population. Results showed that the studied populations were in its natural habitat not normally exposed to high salinities, even though *P. argentinus* was able to reproduce and develop in a wide range of salinities, from freshwater to brackish water conditions. These facts support the proposition that this species may have invaded freshwater environments in a recently evolutionary time. Striking differences in studied features occurred within and between populations, in both field and laboratory studies. For instance, the intraspecific differences between populations in incubation time, salinity tolerance during embryonic development, and embryonic organogenesis could result from a flexible development due to local environmental conditions or from genetic differentiation. Moreover, the variation in the embryonic response to *in vitro* culture conditions suggests that female control of the embryonic environment differs between populations. Future experiments should identify if some of the phenotypic variations in life-history traits between *P. argentinus* populations have an adaptive significance in different scenarios of an ongoing evolutionary transition between marine-brackish water and freshwater environments.

AGRADECIMIENTOS

A Eduardo Spivak por confiar en mí como estudiante y por la libertad que me dio de explorar mis propias preguntas. Al Dr. Anger por aceptar la dirección de esta tesis. A ambos por su infinita paciencia al responder cada uno de mis e-mails encabezados “otra consulta...” y por el conocimiento transmitido a lo largo de estos años. Ha sido una experiencia muy constructiva para mí, además de placentera, desarrollar este proyecto de tesis bajo sus direcciones. Muchas gracias.

A Damián por haber estado a lo largo este trayecto, acompañarme a buscar “bichitos” aún durante nuestras vacaciones, pero por sobre todo por su sincero interés y respeto por esta actividad que me resulta apasionante.... Gracias Pobi.

A Carla Derisio y a su familia, quienes me hospedaron incontables veces en Chascomús y me acompañaron otras tantas a muestrear allí. Sin su colaboración, el inicio de esta tesis hubiese sido mucho más difícil.

A todos mis compañeros del laboratorio, especialmente a Claudia y a María quienes me facilitaron muchísimo las cosas cuando al comienzo del estudio me llevaron en más de una ocasión al campo, y además porque gracias a su interés este trabajo pudo enriquecerse por incorporar distintos puntos de vista. A Martina, Alan, Mariano Albano y Mariano Diez por su desinteresada ayuda. A Juancito, Sandra, Tomás, Paola, Guada, Nahuel y a todos por la confianza y el entusiasmo transmitidos.

A Alejandra López Mañanes, por su interés, confianza y colaboración para realizar el último capítulo. A Silvina Pinoni y Cristina del Valle por su ayuda durante los experimentos.

A Fer, Mariela y Lía... ustedes saben. Gracias.

A Pablo Ribeiro que me ayudó desinteresadamente con el análisis de datos del segundo capítulo, y a Federico Isla que me prestó repetidas veces el Horiba.

Al CONICET, porque sin la beca no hubiese sido posible el desafío de formular e intentar resolver mis preguntas; y a The Crustacean Society porque los reconocimientos me permitieron recobrar confianza en mis planteos.

A los jurados: Dr. Horacio Heras, Dr. Pablo Collins y Dr. Oscar Iribarne por los valiosos comentarios que ayudaron a mejorar esta tesis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1.1 Hipotéticas vías de colonización de la fauna acuática de América del Sur.....	7
2.1 Ubicación geográfica de las poblaciones de <i>P. argentinus</i> estudiadas.....	27
2.2 Variaciones en la temperatura y salinidad del agua en los sitios de muestreo.....	33
2.3 Duración de la estación reproductiva de cuatro poblaciones de <i>P. argentinus</i>	35
2.4 Talla media de madurez sexual de las hembras de <i>P. argentinus</i>	45
2.5 Comparación entre poblaciones de la talla media de madurez sexual.....	46
3.1 Diseño experimental.....	61
3.2 Supervivencia de las hembras de LC y AV en tres tratamientos de salinidad.....	64
3.3 Éxito reproductivo de LC y AV en tres tratamientos de salinidad.....	65
3.4 Maduración ovárica en LC y AV en tres tratamientos de salinidad.....	67
3.5 Características del ciclo reproductivo de las hembras de LC y AV en tres salinidades	69
3.6 <i>P. argentinus</i> hembra originaria de AV infestada con un isópodo bopírido.....	75
4.1 Incubación <i>in vivo</i> en LC y AV en tres salinidades.....	84
4.2 Tamaño de huevos en LC y AV procedentes de ovarios madurados en condiciones de laboratorio.....	87
4.3 Volumen medio de la camada <i>vs.</i> el tamaño de las madres.....	91
4.4 Relación entre los pesos secos de la camada y de las hembras.....	95
4.5 Relación entre el peso seco de las hembras y el largo del caparazón.....	96
5.1 Diferenciación embrionaria de <i>P. argentinus</i>	113
5.2 Supervivencia de los embriones de LC cultivados <i>in vitro</i> en cuatro tratamientos de salinidad.....	114
5.3 Porcentaje de eclosión de esos cultivos.....	115
5.4 Tiempos para el desarrollo de embrionario <i>in vitro</i> en cuatro salinidades.....	117
5.5 Cambio porcentual en el volumen de los huevos en cuatro salinidades.....	124
5.6 Vitelo en larvas recién eclosionadas.....	126
5.7 Supervivencia de los embriones de AV cultivados <i>in vitro</i> en cuatro tratamientos de salinidad.....	135
5.8 Variaciones en el volumen de los huevos de AV durante el cultivo <i>in vitro</i> en cuatro tratamientos de salinidad.....	136
5.9 Eventos morfogénicos en los embriones de LC y AV.....	138
6.1 Variaciones ontogenéticas y efectos de la salinidad sobre la actividad Na ⁺ -K ⁺ -ATPasa.....	148
6.2 Efectos de la salinidad sobre la actividad Na ⁺ -K ⁺ -ATPasa en branquias.....	151

LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁGINA	
2.1	Parámetros físico-químicos de los cuatro sitios de muestreo.....	28
2.2	Ecuaciones de regresión y comparación de la fecundidad entre cuatro poblaciones de <i>Palaemonetes argentinus</i>	38
2.3	Análisis de la covarianza para la fecundidad realizada y real.....	39
2.4	Comparación del tamaño de las larvas recién eclosionadas.....	41
2.5	Rango de tallas de los camarones de las cuatro poblaciones.....	43
2.6	Madurez sexual de las hembras por intervalos de clase de tallas.....	44
2.7	Ecuaciones de regresión para el peso seco de las hembras vs el largo del caparazón....	48
3.1	Comparación de los efectos de la salinidad y las poblaciones sobre los eventos del ciclo reproductivo.....	70
4.1	Comparación del tiempo de incubación entre LC y AV en tres tratamientos de salinidad	85
4.2	Comparación del peso seco por huevo entre LC y AV en tres tratamientos de salinidad	88
4.3	Media, error estándar y rango para el tamaño de los huevos de LC y AV a partir de ovarios madurados en condiciones de laboratorio.....	89
4.4	Comparación del tamaño de los huevos entre LC y AV en tres tratamientos de salinidad	90
4.5	Comparación del volumen inicial de los huevos de LC y AV entre camadas.....	92
4.6	Ecuaciones de regresión para la biomasa de huevos vs el peso seco de las madres; y para el peso seco de las madres vs el largo del caparazón.....	94
5.1	Media, desvío y rango del tiempo hasta la eclosión para los embriones de LC cultivados <i>in vitro</i>	118
5.2	Efectos de la salinidad sobre los tiempos para el desarrollo embrionario de LC <i>in vitro</i>	119
5.3	Comparación del volumen de los huevos de LC cultivados <i>in vitro</i>	121
5.4	Media y desvío para el volumen de los huevos de LC en tres estadios del desarrollo.....	122
5.5	Supervivencia y tiempos a la eclosión de los embriones de LC y AV cultivados <i>in vitro</i>	134
6.1	Efectos de los estadios ontogenéticos y la salinidad sobre la actividad Na ⁺ -K ⁺ -ATPasa	149

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN

De los aproximadamente 30 phyla de animales originados en el océano, apenas la mitad (16 phyla) han colonizado los ambientes de agua dulce, y tan solo un 20% (7 phyla) han realizado la transición hacia los ambientes terrestres (Lee & Bell, 1999). Diversos grupos de animales con estilos de vida muy diferentes habrían ocupado rápidamente los ambientes marinos durante el Cámbrico, mientras que los hábitats de agua dulce habrían sido colonizados lentamente durante cientos de millones de años recién a partir del Paleozoico tardío (Miller & Labandeira, 2002). El desarrollo de sistemas osmorregulatorios más complejos, tanto como las modificaciones en los estilos de reproducción y dispersión pudieron retardar la conquista evolutiva de los hábitats de agua dulce (Miller & Labandeira, 2002). La colonización de los ambientes de agua dulce, y eventualmente los terrestres, por los organismos marinos representa una de las mayores transiciones evolutivas, por lo que actualmente constituye uno de los principales temas de interés para los biólogos evolutivos y los paleontólogos (Lee & Bell, 1999; Schubart *et al.*, 1998; Miller & Labandeira, 2002; Anger, 2005; 2006; Anger & Schubart, 2005; Anger *et al.*, 2007).

La conquista de los ambientes de agua dulce por los organismos de origen marino no solo ha ocurrido en una escala macroevolutiva sino que continúa en el presente. Algunos autores han documentado ejemplos en los que las invasiones se han incrementado en los pasados 150 años particularmente en los ambientes con un alto grado de impacto antrópico (veáse Lee & Bell, 1999; Lee, 2002; Miller & Labandeira, 2002; Havel *et al.*, 2005). Diversos aspectos evolutivos de los procesos de colonización, entendidos como la expansión del rango natural de una especie, han sido comprendidos a partir del intenso estudio de los eventos de invasión, esto es cuando una población expande su rango de distribución más allá de su zona potencial de dispersión, generalmente mediado por el transporte humano (Lee, 2002). Dichas investigaciones han puesto de manifiesto que entender los cambios

fisiológicos, genéticos y en los estilos de reproducción ocurridos durante las invasiones puede aportar información sobre los procesos que estuvieron y están involucrados en la colonización a gran escala de los ecosistemas de agua dulce.

Durante la última década un número creciente de estudios en especies modelo de origen marino-salobre que han invadido los ambientes de agua dulce (por ejemplo: el copépodo *Eurytemora affinis* y los mejillones *Dreissena polymorpha* “mejillón cebra” y *D. bugensis* “mejillón quagga”) han intentado responder los siguientes interrogantes: 1) por qué la tolerancia (por ejemplo a la salinidad) de una población particular es mayor y en consecuencia tiene éxito en el proceso de invasión; 2) por qué ciertos periodos y/o condiciones son más propicios en un evento de invasión; 3) qué mecanismos están involucrados en las transiciones entre los ambientes y 4) cuáles fueron las rutas más probables de las invasiones (revisión en Lee, 2002; Havel *et al.*, 2005). Esos estudios han demostrado que durante las transiciones entre los ambientes marino-salobre-dulceacuícola las presiones selectivas favorecen cambios en un tiempo evolutivamente corto; han detectado eventos repetidos e independientes de invasión- reinvasión a una escala global así como eventos de especiación; y también han presentado evidencias de que la arquitectura genética de los individuos de algunas poblaciones puede ser favorecida durante el/los proceso/s de invasión/es (Lee, 1999; 2000; Lee *et al.*, 2003; Lee & Frost, 2002; Lee & Petersen, 2002, 2003; Gelembiuk *et al.*, 2006; May *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007).

I.- LAS RUTAS HACIA EL AGUA DULCE

De acuerdo con los paleontólogos y biólogos evolutivos, los animales que actualmente se encuentran en ambientes de agua dulce derivan evolutivamente de:

a) grupos marinos que se han adaptado a salinidades reducidas, ya sea porque han quedado aislados debido a eventos vicariantes en ambientes que se desalinizaron paulatinamente; o porque se hubieran desplazado desde los estuarios hacia el agua dulce (véase Miller & Labandeira, 2002; Lovejoy *et al.*, 2006)

b) grupos terrestres como los insectos que invadieron secundariamente los ambientes acuáticos mediante el desarrollo de branquias o de varias adaptaciones de comportamiento y fisiológicas (Patrick *et al.*, 2001; Miller & Labandeira, 2002).

1.1.- HIPÓTESIS SOBRE EL ORIGEN DE LA FAUNA ACUÁTICA DE AMÉRICA DEL SUR...

En relación con la primera hipótesis indicada más arriba (a), uno de los ejemplos más notables lo constituye el origen de la fauna de agua dulce de América del Sur. Los ríos de la región del Amazonas presentan una fauna endémica derivada de taxa que generalmente se encuentran en el océano. El origen y evolución de diversos linajes de agua dulce derivados de ancestros marinos se vinculan con los profundos cambios paleogeográficos y paleoambientales ocurridos en América del Sur durante el Neógeno¹ (Lovejoy *et al.*, 2006).

¹ El Sistema Neógeno pertenece a la era Cenozoica y está constituido por las épocas: Mioceno, Plioceno, Pleistoceno, Holoceno y continuaría hasta el presente.

La ictiofauna Neotropical está dominada por especies que pudieron diversificarse en los habitats de agua dulce antes de la separación de Gondwana (como los Characiformes y Siluriformes), sin embargo la cuenca del Amazonas también alberga una diversa comunidad de peces de agua dulce cuyos ancestros marinos pudieron haber ingresado a América del Sur en un tiempo evolutivo más reciente (Lovejoy *et al.*, 2006). Los patrones biogeográficos de las especies y linajes derivados de ancestros marinos sugieren que su origen y evolución se vincularían con las siguientes hipótesis: las invasiones de especies oportunistas vía los estuarios; la vicarianza en relación con el levantamiento de los Andes y la vicarianza relacionada con las repetidas incursiones marinas y conexiones entre cursos de agua ocurridas durante el Mioceno (Lovejoy *et al.*, 2006).

Por un lado, la boca del Amazonas y sus vastos estuarios son relativamente más accesibles que otras cuencas por lo que las invasiones de especies oportunistas pudieron y podrían ocurrir por esa vía. Sin embargo, datos paleoecológicos y paleogeográficos demuestran que durante el Mioceno el cauce del Amazonas no fue una de las vías posibles para la entrada de las actuales especies de peces de agua dulce en la región (véase Lovejoy *et al.*, 2006). Por otro lado, la hipótesis de vicarianza debido a la emergencia de los Andes, que postula que grupos marinos pudieron quedar aislados en un mar interno derivado del Pacífico luego del levantamiento de la cordillera, ha sido criticada debido la falta de actualización de los datos paleogeográficos (véase Lovejoy *et al.*, 2006 y citas allí).

Evidencias provenientes de distintas disciplinas concuerdan en que la cabecera del Amazonas fue afectada al menos dos veces por las incursiones marinas del Neógeno, aunque el tiempo y extensión de dichas incursiones es controversial. Existe un consenso respecto de que esas incursiones conectaron el sistema del Amazonas con el océano vía el Caribe hacia el final del Mioceno medio (~ 12-11 Ma) y del Mioceno temprano (~ 22-16.5 Ma) (Lovejoy *et al.*, 2006, y citas allí). Resultados recientes apoyan la idea anterior, las incursiones marinas

ocurridas en el Mioceno temprano afectaron la cabecera del Amazonas conectando ese sistema con el Caribe a través de la cuenca de Los Llanos (Fig. 1.1). Los drenajes de los ríos principales debieron reorientarse, presuntamente durante las transgresiones y/o periodos regresivos, ofreciendo habitats interconectados con niveles de salinidad fluctuantes. Tales condiciones pudieron propiciar la evolución de la tolerancia al agua dulce y el aislamiento de linajes de agua dulce incipientes a partir de sus ancestros marinos (Lovejoy *et al.*, 2006). Los autores mencionan que durante las incursiones marinas del Mioceno temprano el sistema del Amazonas pudo funcionar como una “bomba” inyectando taxa marinos hacia los ambientes de agua dulce. Aunque los autores enfocaron sus estudios en la fauna íctica mencionan que debido a la historia paleogeográfica de la región sus resultados son congruentes con el origen de otros linajes, como por ejemplo el de los crustáceos decápodos (véase también Collins *et al.*, 2007).

De esta manera, una de la hipótesis sobre el origen de la fauna acuática de América del Sur sostiene que las incursiones marinas y la reorientación de los drenajes de los ríos principales ocurridos en el Mioceno temprano habrían promovido la transición evolutiva desde los ambientes marinos hacia los de agua dulce (Lovejoy *et al.*, 2006). Sin embargo, dicho escenario no explicaría el origen de todas las especies de linaje marino. Por ejemplo, el origen de algunas especies de pejerrey del género *Odontesthes* en el sureste de Brasil sería mucho más reciente aún. Los cambios en el nivel del mar ocurridos en el Pleistoceno y Holoceno, pudieron propiciar el origen de especies de agua dulce incipientes mediante el aislamiento de poblaciones de conespecíficos en ambientes marinos y estuariales (véase Beheregaray *et al.*, 2002).



Figura 1.1. Vías hipotéticas de colonización de la fauna íctica de América del Sur durante las incursiones marinas del Mioceno, siendo la del Caribe la más probable (extraído de Lovejoy *et al.*, 2006.). Las mismas vías explicarían también la colonización de los crustáceos decápodos de la región.

... Y DE LA FAUNA ACUÁTICA DE NUESTRA REGIÓN, INCLUYENDO LAS PRESUNTAS RUTAS DE COLONIZACIÓN DE *Palaemonetes argentinus*

Ringuelet (1961) menciona en su trabajo "*Rasgos fundamentales de la zoogeografía de la Argentina*" que la llanura chaco pampeana estuvo enteramente ocupada por fauna de tipo brasílico o "tropical". Sostiene que la colonización de especies tropicales es un fenómeno factible de producirse en la actualidad, y sugiere que la fauna "brasílica" pudo dispersarse hacia el sur en tiempos pre-cuaternarios. Algunas de las vías de colonización no permanecen como tales en la actualidad -la que permitió la entrada de los cangrejos Tricodactílicos (dulceacuícolas) hasta aquí-, mientras que otras como por ejemplo el cauce pluvial del Paraná ofreció y ofrece en la actualidad una ruta de dispersión hacia el sur para la fauna acuática de tipo tropical o subtropical. Morrone & Lopretto (1995) concuerdan con la idea de una dispersión hacia el sur de los crustáceos decápodos dulceacuícolas del sur de Sudamérica (< 30° lat) a partir de una biota ancestral tropical; y postulan que esa biota pudo fragmentarse debido a repetidos eventos vicariantes dando origen a las áreas de endemismo que hoy observamos. Las áreas endémicas delimitadas por Morrone & Lopretto (1995) vinculan la presencia de *P. argentinus* a los ríos Paraguay y Paraná. En este punto es interesante mencionar que la separación de las cuencas del Amazonas y del Paraná se produjo hace unos 30 Ma, aunque se ha sugerido algún tipo de conexión entre ellas durante el Mioceno tardío (Cione & Báez, 2007).

Sin embargo, Ringuelet (1956; 1961) considera que el estuario del Río de la Plata funcionaría como principal puerta de entrada para la fauna marina invasora. La entrada de especies invasoras pudo intensificarse durante las sucesivas ingresiones marinas ocurridas en el Mioceno temprano, Plioceno y Pleistoceno ("Mar Paranense", "Entrerriano, Puelchense", "Querandinense-Platense", respectivamente). El autor expone numerosos ejemplos zoogeográficos acerca de por qué el estuario del Río de la Plata, ha sido y continuaría siendo

una vía de penetración que permitiría a las especies marinas una invasión exitosa de las aguas continentales (Ringuelet, 1961). En uno de los muchos ejemplos menciona a varias especies cuyos géneros son marinos pero que han colonizado con éxito los ambientes continentales, como por ejemplo, el camarón *P. argentinus*. Las otras especies que junto con *P. argentinus* señalarían el papel jugado por la hoya del Plata en la colonización de los ambientes continentales son: *Clupea melanostoma melanostoma* (Pisces, Clupeiformes, Clupeidae); *Pseudodiaptomus richardi inaequalis* (Crustacea, Copepoda, Pseudodiaptoniidae); *Corophium rioplatense* (Crustacea, Amphipoda, Corophidae); *Tanais fluciatilis* y *T. herminiae* (Crustacea, Tanaidacea); *Exosphaeroma platensis* (Crustacea, Isopoda, Sphaeromidea); *Probopyrus spp* (Crustacea, Isopoda, Bopyridae); *Acetes paraguayensis* (Crustacea, Decapoda, Sergestidae).

En resumen, de acuerdo con las hipótesis existentes, la dispersión de *P. argentinus* podría haber ocurrido al menos a partir de dos fuentes, aunque no necesariamente excluyentes. Mientras que Ringuelet (1956; 1961) sugiere al Río de la Plata como principal puerta de entrada para la especie en la región, Morrone & Lopretto (1995) consideran más probable que se hubiera dispersado hacia el sur a partir de una biota tropical ancestral. Independientemente de la/s fuente/s de origen a partir de la cuál *P. argentinus* se hubiera dispersado, actualmente la especie es exitosa también en la invasión de distintos ambientes artificiales como por ejemplo los Lagos de Palermo, en Buenos Aires (Boschi, 1981), el Lago del parque Rodó, en Montevideo y varios diques ubicados en las provincias de Córdoba y San Luis (obs. personal).

Las disciplinas involucradas en dilucidar los orígenes de las faunas y vías de colonización en un contexto histórico son la paleontología y la sistemática filogenética. Sin embargo, también es posible aproximarse a esos interrogantes desde una perspectiva ecológica y experimental. Entender, por ejemplo, que factores ecológicos determinan la presencia de una especie en un hábitat particular, identificar mediante experimentos cuáles

son los límites de tolerancia de una especie (en esta tesis, al factor salinidad) e interpretar que mecanismos permiten su presencia en un ambiente determinado, también puede brindarnos información acerca de la historia evolutiva de una especie.

II.- LA CONQUISTA EVOLUTIVA DE LOS AMBIENTES DE AGUA DULCE

2.1.- MECANISMOS FISIOLÓGICOS:

El gradiente de presión osmótica y la concentración de iones son los principales factores abióticos que impiden la dispersión de los animales entre los ambientes marinos y de agua dulce. La composición iónica del agua salada es aproximadamente similar a la de los fluidos corporales, mientras que la composición iónica del agua dulce es comparativamente más baja (Willmer *et al.*, 2000). Por lo tanto, todos los organismos que se encuentran en ambientes de agua dulce deben enfrentarse a dos problemas que vienen de la mano: el agua tiende a fluir hacia el interior del cuerpo y los solutos a ser perdidos.

Básicamente existen dos caminos por los cuales los crustáceos pueden enfrentar los ambientes de salinidad variable: osmoconformación y osmorregulación. En los conformadores osmóticos la concentración osmótica interna se asemeja a la del medio externo. Así, en un medio externo más diluido, se reduce el gradiente osmótico disminuyendo la osmolalidad en la hemolinfa, y el volumen tisular es regulado por la disminución de la concentración intracelular de los solutos osmóticamente activos (aminoácidos libres) (Mantel & Farmer, 1983). Los completos osmoconformadores no toleran el agua dulce, su medio interno siempre será más concentrado que el externo (Mantel & Farmer, 1983). Por el contrario, los organismos que toleran un amplio rango de concentraciones externas son osmorreguladores. Ellos regulan la presión osmótica de su medio interno haciéndolo parcialmente independiente del medio externo mediante mecanismos fisiológicos de transporte activo, principalmente de iones (Mantel & Farmer, 1983; Péqueux, 1995).

El bombeo activo de iones en contra de un gradiente osmótico para contrarrestar la pérdida pasiva de los mismos, requiere indudablemente de un gasto energético. El costo energético de la regulación en agua dulce dependerá del gradiente osmótico entre los medios

internos y externos (Mantel & Farmer, 1983). Los taxa de invertebrados que han conquistado evolutivamente los ambientes dulceacuícolas desde el mar habrían adquirido la habilidad de reducir la concentración osmótica de su medio interno en el agua dulce, y por lo tanto, del gradiente osmótico entre las concentraciones externas e internas. Una reducida permeabilidad al agua e iones de las superficies corporales, en particular en las zonas de intercambio como las branquias, y el desarrollo de mecanismos osmorregulatorios altamente eficientes serían las principales adaptaciones a nivel fisiológico que permitirían a los crustáceos vivir en ambientes con una baja concentración iónica (ejemplos Cambell & Jones, 1990; Schubart & Diesel, 1999; Rainbow & Black, 2001).

2.2.- ESTRATEGIAS REPRODUCTIVAS:

Dentro de las estrategias de historia de vida observadas en los organismos residentes más antiguos de los ambientes de agua dulce se incluyen la abreviación o la pérdida completa de los estadios larvales, la inversión en unos pocos pero más costosos descendientes, larvas que no se alimentan y la producción de estadios de resistencia (Ruppert & Barnes, 1995; Lee & Bell, 1999).

Esas estrategias reproductivas han sido observadas en varios grupos de crustáceos decápodos. La abreviación de los estadios larvales y el concomitante incremento del tamaño de los huevos les habría permitido a los decápodos evadir el estrés osmótico, y también enfrentar la baja productividad de los ambientes de agua dulce (Anger, 1995; 2001). Esos ambientes en comparación con los estuariales o marinos, son más pequeños, fragmentados, efímeros y poseen un suministro consistentemente menor de alimento (Lee & Bell, 1999). En general, los ríos y los arroyos presentan una baja o poco predecible producción de plancton vs la alta productividad de los estuarios, restringiendo drásticamente el alimento disponible para que un desarrollo larval extendido pueda completarse con éxito (Anger, 2001).

III.- LOS CAMARONES CARIDEOS DE LA FAMILIA PALAEMONIDAE

Los camarones de la familia Palaemonidae (Crustacea: Decapoda: Caridea) se agrupan en 118 géneros y 887 especies (Bauer, 2004). Algunas de ellas, han invadido con éxito los ambientes estuariales y dulceacuícolas dentro de los cuáles han radiado rápidamente (Anger, 2001; Bauer, 2004). Dentro de los géneros con mayor número de especies, y más conocidos, se pueden mencionar: *Palaemon*, *Macrobrachium* y *Palaemonetes*.

Las especies del género *Palaemonetes* -“grass shrimp”- se encuentran ampliamente distribuidas en estuarios, marismas y bahías de la costa Atlántica, el Golfo de México, costas de los Estados Unidos y también a lo largo de la costa europea desde el Mar Báltico y el Mar del Norte hasta el Mediterráneo (Bauer, 2004). El género también tiene representantes en otras regiones como por ejemplo en Australia (Bray, 1976). Las especies de este género son ecológicamente importantes como detritívoros, depredadores de pequeños invertebrados y como presas de peces y aves (Bauer, 2004). La mayoría son muy abundantes en los sistemas estuariales y arroyos influenciados por las mareas, y debido a su modo de alimentación se consideran piezas claves en el ciclo de nutrientes, y consecuentemente en el balance energético de esos ambientes (Lowe & Provenzano, 1990; Reinsel *et al.*, 2001). Además, algunas especies del género se han propuesto recientemente como organismos relevantes para su uso como bioindicadores del impacto antropogénico (por ejemplo, Key *et al.*, 2006). El género cuenta con aproximadamente 30 *spp.*, de las cuáles un tercio habitan ambientes salobres y toleran desde el agua de mar hasta salinidades cercanas a la del agua dulce (por ejemplo *P. pugio* y *P. varians*) (Bauer, 2004). El resto de las especies son de agua dulce y se encuentran principalmente en las latitudes tropicales y subtropicales pero también se extienden hasta las latitudes templadas (Bauer, 2004), como es el caso de *P. argentinus*.

3.1.- HIPÓTESIS SOBRE EL ORIGEN DE LOS CAMARONES PALEMÓNIDOS

Existe un consenso general entre los investigadores sobre la hipótesis que postula que los palemónidos tendrían un origen marino, luego habrían colonizado los ambientes salobres y posteriormente los de agua dulce (McNamara 1987; Jalihal *et al.*, 1993; Odinetz Collart & Rabelo, 1996; Freire *et al.*, 2003; Ordiano *et al.*, 2005; Augusto *et al.*, 2007).

En biología evolutiva, los rasgos similares compartidos por especies estrechamente relacionadas ofrecen una evidencia de un ancestro en común, mientras que las diferencias podrían representar adaptaciones recientes a condiciones ambientales diferenciales (Anger *et al.*, 2007). Los camarones de los géneros *Macrobrachium* y *Palaemonetes* exhiben numerosas características biológicas que sugieren que los palemónidos se encuentran aún en un proceso activo de colonización (y/o invasión) de los ambientes de agua dulce. Por ejemplo, la mayoría de las especies de ambos géneros que habitan en ambientes de agua dulce presentan una notable tolerancia a las salinidades concentradas; altas concentraciones osmo-iónicas en su hemolinfa; una marcada dependencia del agua salobre para completar con éxito el desarrollo larval; un desarrollo larval extendido y comportamientos migratorios (McNamara 1987; Jalihal *et al.*, 1993; Anger, 2001; Bauer, 2004).

Uno de los rasgos mejor documentado para los palemónidos residentes en ambientes de agua dulce es la marcada tendencia hacia la reducción en el número de estadios larvales necesarios para alcanzar el estadio juvenil (Magalhães, 1986; 1986/87; 1988, 1989; Magalhães & Walker, 1988; Pereira & García, 1995; Magalhães & Medeiros, 1998). La abreviación del número de estadios larvales se ha correlacionado con un incremento del tamaño de los huevos (que deben proveer de alimento al embrión), con una disminución en la fecundidad, y con un incremento en el tiempo para que se complete el desarrollo embrionario (Anger, 2001). De la misma manera, el desarrollo larval extendido característico de los palemónidos que habitan ambientes marinos y salobres, se ha relacionado con la producción

de un mayor número de huevos más pequeños cuyo periodo de incubación suele ser más corto (Anger, 2001). Entonces, existe una estrecha asociación entre el tipo de ambiente (marino, salobre o de agua dulce) y las estrategias reproductivas en los camarones palemónidos.

Estudios recientes a nivel molecular en combinación con datos morfológicos apoyan la hipótesis de que las especies del género *Macrobrachium* habrían experimentado migraciones repetidas e independientes hacia los ambientes límnicos, y que al menos en el este de Asia la radiación adaptativa hacia los ambientes de agua dulce habría comenzado en un pasado reciente (Liu *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que algunas poblaciones del camarón japonés *M. nipponense* que habitan ambientes de agua dulce derivan efectivamente de poblaciones estuariales, y que pudieron separarse durante las transgresiones marinas del Holoceno (Mashiko & Numachi, 2000). En oposición a los diversos estudios considerando las relaciones filogenéticas, el origen y evolución de las especies del género *Macrobrachium* (ejemplos Murphy & Austin, 2003; 2004a; 2004b; 2005), esos aspectos han sido poco explorados en las especies del género *Palaemonetes*.

IV.- *Palaemonetes argentinus* NOBILI 1901

En Argentina se conocen al menos cinco especies de camarones palemónidos: *Pseudopalaemon bouvieri*; *Macrobrachium borellii*; *M. amazonicum*; *M. jelskii* y *P. argentinus* (Boschi, 1981; Petovello, 1996; Collins, 2000). Además, recientemente se ha citado la presencia de un invasor marino, *Palaemon macrodactylus*, en el puerto de Mar del Plata (Spivak *et al.*, 2006).

El sujeto de estudio de esta tesis, *P. argentinus*, se distribuye en el norte y centro de nuestro país, en Uruguay y sur de Brasil (Spivak, 1997; Collins *et al.*, 2004). Habita lagos, ríos y arroyos pero también lagunas costeras de salinidad variable como la laguna de Mar Chiquita (Argentina); Laguna Castillos (Uruguay) y Lagoa dos Patos (Brasil) (Spivak, 1997). En Brasil, se ha mencionado su presencia en los canales del Río Ratonés, Florianópolis, dónde la salinidad media es de 20 ‰ (Müller *et al.*, 2004).

Palaemonetes argentinus es comúnmente conocido como el “camarón de agua dulce” (Boschi, 1981). Sin embargo, no sólo se ha documentado su ocurrencia en ambientes salobres, sino que retiene en el presente una serie de rasgos que son característicos de los palemónidos habitantes de ambientes marinos-salobres. Por ejemplo, su desarrollo larval comprende 9 estadios de zoeas (Menú-Marque, 1973), mientras que generalmente los palemónidos restringidos a los ambientes de agua dulce tienen un desarrollo larval abreviado (desde < 5 estadios de zoeas hasta un desarrollo directo, Jalihal *et al.*, 1993). Por lo tanto, el desarrollo larval extendido de *P. argentinus* se asemeja al de los palemónidos de ambientes marino-salobres (Menú-Marque, 1973). Además, su desarrollo larval completo desde la eclosión hasta la metamorfosis, puede completarse en condiciones de salinidad altamente variables (Anger *et al.*, 1994; Spivak, 1997). Tanto las larvas como los adultos son capaces de enfrentar esas variaciones de salinidad debido a que tienen la habilidad de hiper-osmorregular en agua dulce y de hiper-osmoconformar en salinidades superiores a 20 ‰

(Charmantier & Anger, 1999). En general, la habilidad para hiper-osmorregular es característica de las especies estrictamente de agua dulce, y el patrón de hiper-osmoconformación suele ser típico de aquellas especies que se encuentran en ambientes salobres (Mantel & Farmer, 1983).

Por otro lado, *P. argentinus* presenta algunos rasgos compartidos con las especies de palemónidos restringidos al agua dulce. Por ejemplo, el primer estadio larval (la zoea I) puede mudar al siguiente estadio sin alimentarse (rasgo conocido como lecitotrofia primaria), hecho observado con mayor frecuencia en los palemónidos de agua dulce que en los marinos (Anger, 2001). Además, se ha demostrado que sus larvas son retenidas en el estuario de la Laguna de Mar Chiquita (Buenos Aires), a diferencia de lo que ocurre con las larvas de otros crustáceos decápodos que son exportadas hacia el océano (Anger *et al.*, 1994). Dicha estrategia de retención larval se ha interpretado como una de las adaptaciones desarrolladas durante la evolución de las especies de agua dulce (y terrestres; Anger, 2001).

Hasta aquí he resumido la información disponible sobre *P. argentinus* que habría llevado a sugerir que la especie se encuentra en un estadio muy temprano de radiación adaptativa hacia los ambientes de agua dulce (Menú Marque, 1973; Anger, 2001).

Como en la mayoría de los camarones de la familia Palaemonidae, en *P. argentinus* los sexos están separados y la reproducción es sexual. Diversos aspectos de la biología reproductiva y ecología de esta especie han sido descriptas para distintas poblaciones de Argentina y Brasil (Goldstein & Lauria de Cidre, 1974; Donatti, 1986; Gonçalves & Fontura, 1999; Félix & Petriella, 2003; Azevedo *et al.*, 2004). El inicio y duración de la estación reproductiva, definidas por la presencia de hembras con huevos, varían a lo largo de su rango geográfico y se correlacionan positivamente con el incremento de la temperatura del agua. La estación reproductiva de *P. argentinus* de las poblaciones del sureste de la provincia de Buenos Aires (como las utilizadas en este trabajo) se extiende desde mediados de septiembre hasta febrero (Rodríguez Capítulo & Freyre, 1989; Dávila, 1996; Spivak, 1997; Félix &

Petriella, 2003). Mientras que en las poblaciones de Brasil y del norte de Argentina la estación reproductiva comienza más temprano, en julio y agosto respectivamente (Donatti, 1986; Gonçalves & Fontura, 1999; Dumont & D’Incao, 2004). El desarrollo embrionario de *P. argentinus* de una población de Brasil donde la salinidad promedio del agua es 20 ‰ se completa en 12 días a 26 °C (Nazari *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2004). Hasta el momento no existían estudios que comparasen simultáneamente ni los rasgos de historia de vida, ni los aspectos reproductivos ni las características del desarrollo entre poblaciones de *P. argentinus* con distinto grado de aislamiento del mar.

Para finalizar, resulta interesante notar que *P. argentinus* es el único camarón palemónido presente en la mayoría de las lagunas del sureste de la provincia de Buenos de Aires. En estos sistemas, los adultos cumplen un rol muy importante como predadores del zooplancton (González Sagrario, 2004). Además, como muchos crustáceos, su calidad nutricional es muy alta (alrededor del 70% de peso seco es contenido proteico) representando uno de los items alimenticios más importantes para otros organismos como peces y aves (Collins *et al.*, 2006; Collins & Montagna, 2006). Presumiblemente, *P. argentinus* cumple un papel ecológico clave en las cadenas tróficas de estos ambientes; y como otras especies del género, también tenga una potencial influencia en el ciclo de nutrientes de las lagunas en nuestra región. Por lo tanto, comprender las estrategias reproductivas y los efectos de las variables ambientales sobre el ciclo de vida de esta especie no solo es importante conceptualmente, sino que también podría ofrecer información relevante para futuras evaluaciones de los efectos encadenados en las comunidades de las que es parte *P. argentinus*.

V.- ESTRUCTURA DE LA TESIS

Cada uno de los objetivos que se detallan a continuación se presenta como un capítulo separado con preguntas específicas a responder, metodología, análisis de datos específicos, una discusión de los resultados obtenidos y una sección con las principales conclusiones y perspectivas de estudio para el futuro. Por último, los resultados destacados de la tesis se unifican en una discusión general, considerando principalmente las hipótesis de trabajo y en la que se enfatiza sobre el grado de avance en la comprensión de las preguntas planteadas al inicio del trabajo y en cada capítulo en particular.

Sobre el análisis de los datos

Las comparaciones se hicieron de acuerdo al procedimiento estadístico sugerido por Underwood (1997). Luego de un control de calidad de los datos y previo a cada test utilizado, se chequeó la homocedasticidad de las varianzas mediante el test de Cochran y la normalidad de los datos mediante el de Kolmogorov-Smirnov. Si las varianzas fueron heterogéneas, se transformaron los datos y se chequeó nuevamente la normalidad y homocedasticidad. Los ANOVAs de dos factores (y también los ANCOVAs) fueron realizados únicamente cuando ambos supuestos del test fueron satisfechos; si luego de las transformaciones los supuestos de normalidad y homocedasticidad no se cumplieron entonces se realizaron ANOVAs de una vía. Este test se llevó a cabo aún cuando los datos no tuvieron una distribución normal puesto que es lo suficientemente robusto frente a las desviaciones de la normalidad (Norman & Streiner, 1996; Underwood, 1997). No fue así en el caso de que las varianzas no se pudieran homogeneizar por las transformaciones. En tal caso, se llevaron a cabo comparaciones de a pares con el test de Student que supone varianzas desiguales. Además, antes de realizar un ANCOVA se verificó primero la homogeneidad de las pendientes (Zar, 1996). Si las pendientes fueron paralelas se continuó con el ANCOVA para

evaluar las ordenadas al origen de las regresiones. Si las pendientes fueron heterogéneas, se detuvo el análisis en esa etapa y se interpretó el posible significado de dicha heterogeneidad. Finalmente, cuando los ANOVAs o ANCOVAs detectaron diferencias significativas las comparaciones *a posteriori* se realizaron con los tests de Student-Newman-Keuls, de Tuckey o mediante comparaciones planeadas de acuerdo con los objetivos de los diferentes capítulos. La elección de los distintos test paramétricos dependió del diseño experimental y la/s variable/s consideradas y se detallan en cada capítulo.

VI.- OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis es examinar los efectos de la salinidad sobre la reproducción y el desarrollo de *Palaemonetes argentinus*. Para cumplir con el objetivo general se compararon las siguientes características:

- 1) los rasgos de historia de vida entre poblaciones con distinto grado de aislamiento del mar
- 2) los efectos de la salinidad sobre el ciclo reproductivo de las hembras entre poblaciones con distinto grado de aislamiento del mar
- 3) los efectos de la salinidad sobre los rasgos de historia de vida entre poblaciones con distinto grado de aislamiento del mar
- 4) los efectos de la salinidad sobre el desarrollo embrionario *in vitro* entre poblaciones con distinto grado de aislamiento del mar
- 5) los efectos de la salinidad sobre la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ durante la ontogenia.

VII.- HIPÓTESIS GENERALES

i) Palaemonetes argentinus, al igual que los representantes de familia Palaemonidae tendría su origen en el ambiente marino, de modo que la colonización / invasión de los ambientes estuariales y de agua dulce es un evento evolutivamente posterior.

ii) Palaemonetes argentinus, puede reproducirse y desarrollarse en un amplio rango de salinidades puesto que habita tanto estuarios como cuerpos de agua dulce.

CAPÍTULO II

VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA EN LOS RASGOS DE HISTORIA DE VIDA DEL “CAMARÓN DE AGUA DULCE”, *Palaemonetes argentinus*

Los resultados de este capítulo fueron publicados en una revista internacional con referato:

ITUARTE, R.B., E.D. SPIVAK & K. ANGER. 2007. Intraspecific variability in life-history traits of a “freshwater shrimp”, *Palaemonetes argentinus*. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*, 43: 293-302.

INTRODUCCIÓN

Las variaciones en los rasgos de historia de vida a un nivel intraespecífico han sido bien documentadas, incluso en una pequeña escala geográfica, entre poblaciones de organismos conespecíficos que viven en habitats cuyas condiciones ambientales difieren (ejemplos Jonsson *et al.*, 2001; Dhuyvetter *et al.*, 2007). Dicha variabilidad puede ser el resultado de procesos evolutivos y / o de una respuesta plástica inmediata a las diferencias en los factores ambientales (Begon *et al.*, 2006: 124).

Los camarones carideos de la familia Palaemonidae representan un grupo particularmente diverso y ecológicamente importante y pueden encontrarse en los ambientes marinos, estuariales y de agua dulce (Bauer, 2004). Existe un consenso general entre los investigadores en cuanto a que el origen de este taxón es marino, luego habría colonizado los ambientes costeros estuariales, y posteriormente los ambientes de agua dulce (véase Jalihal *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2007). En los camarones palemónidos, la variabilidad en los rasgos de historia de vida asociada con las invasión evolutiva de los ambientes de agua dulce ha sido frecuentemente estudiada a un nivel inter-específico (ejemplos Jalihal *et al.*, 1993; Odinetz Collard & Magalhães, 1994). Por el contrario, unos pocos estudios de campo han evaluado el grado de variabilidad intra-específico entre o dentro poblaciones (Alon & Stancyk, 1982; Mashiko & Numachi, 2000; y los primeros estudios citados allí).

Diversos aspectos de la biología reproductiva y ecología de *Palaemonetes argentinus* han sido descriptas para distintas poblaciones de Argentina y Brasil (Donatti, 1986; Schuldt & Damborenea, 1987; Rodríguez Capítulo & Freyre, 1989; Dávila, 1996; Spivak, 1997; Gonçalves & Fontoura, 1999; Félix & Petriella, 2003; Dumont & D’Incao, 2004; Azevedo *et al.*, 2004). Sin embargo, los rasgos de historia de vida no habían sido comparados simultáneamente entre sus poblaciones. Esa clase de estudio permitiría cuantificar el grado de variabilidad intraespecífica entre y dentro de sus poblaciones, y además evaluar la posible

contribución de factores abióticos tales como la salinidad a dicha variabilidad. Por lo tanto en este capítulo se compararon los siguientes rasgos reproductivos entre cuatro poblaciones de *P. argentinus* separadas geográficamente y con distinto grado de aislamiento del mar: duración del periodo reproductivo, fecundidad realizada y real, pérdida de embriones durante el desarrollo, peso seco de embriones y larvas, tamaño de las larvas al nacer, y tamaño de primera madurez de las hembras. Las cuatro poblaciones consideradas se encuentran dentro de la misma región geográfica, la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Una de las poblaciones habita un arroyo que desemboca en la laguna costera Mar Chiquita, la que a su vez está conectada con el Océano Atlántico (para una descripción de las condiciones ecológicas véase Anger *et al.*, 1994; Spivak *et al.*, 1994). Las otras tres poblaciones viven en típicas lagunas someras de la región pampeana (Quirós, 2005). En éste estudio se intentó responder las siguientes preguntas:

a) ¿Difieren los rasgos de historia de vida de *P. argentinus* entre la población con influencia marina y el resto de las poblaciones?

b) ¿Qué tan similares son esos rasgos entre las poblaciones que no están expuestas a la influencia marina?.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de estudio

Los sitios de muestro fueron elegidos por el grado de aislamiento del mar, sus características físicas contrastantes, la proximidad entre ellos, la facilidad para acceder y por la información disponible sobre datos ambientales (Fig. 2.1; Tabla 2.1). Tres de los sitios son típicas lagunas pampeanas, de características eutróficas y baja concentración iónica (Quirós, 2005): Las Lagunas de Chascomús (LC); La Brava (LB) y Los Padres (LP). La cuarta población habita en el arroyo Vivoratá (AV) a pocos metros de su desembocadura en la Laguna Mar Chiquita, donde ocurren marcadas variaciones en la salinidad estacionales, diarias y locales dependiendo de las mareas, fuerza y dirección de los vientos y regímenes de precipitaciones (véase Anger *et al.*, 1994; Spivak *et al.*, 1994). En la Tabla 2.1 se resumen la localización de cada uno de los sitios de muestreo así como algunos de los parámetros físicos-químicos relevantes.

Muestreos y procesamiento de las muestras

Los muestreos se realizaron mensualmente entre septiembre 2003 y marzo 2004 (excepto en enero en LC debido al mal tiempo). Durante ese periodo, la diferencia entre la primera y última localidad muestreada en un mismo mes siempre fue menor o igual a 7 días. Los camarones fueron recolectados con una red de mano (tamaño de malla 1 mm) y transportados vivos al laboratorio donde se mantuvieron con el agua de los sitios de muestreo. Los muestreos se realizaron siempre en las mismas áreas de las lagunas y arroyo; la red fue pasada durante 45 minutos o bien hasta alcanzar unos 250 camarones aproximadamente. En AV los muestreos se realizaron durante el periodo de baja marea, para tener mejor acceso al cauce del arroyo. Durante cada muestreo se registraron las siguientes variables fisicoquímicas con un *water quality checker* Horiba U-10: salinidad; conductividad; pH; oxígeno disuelto y temperatura (5 réplicas por muestreo y lugar).

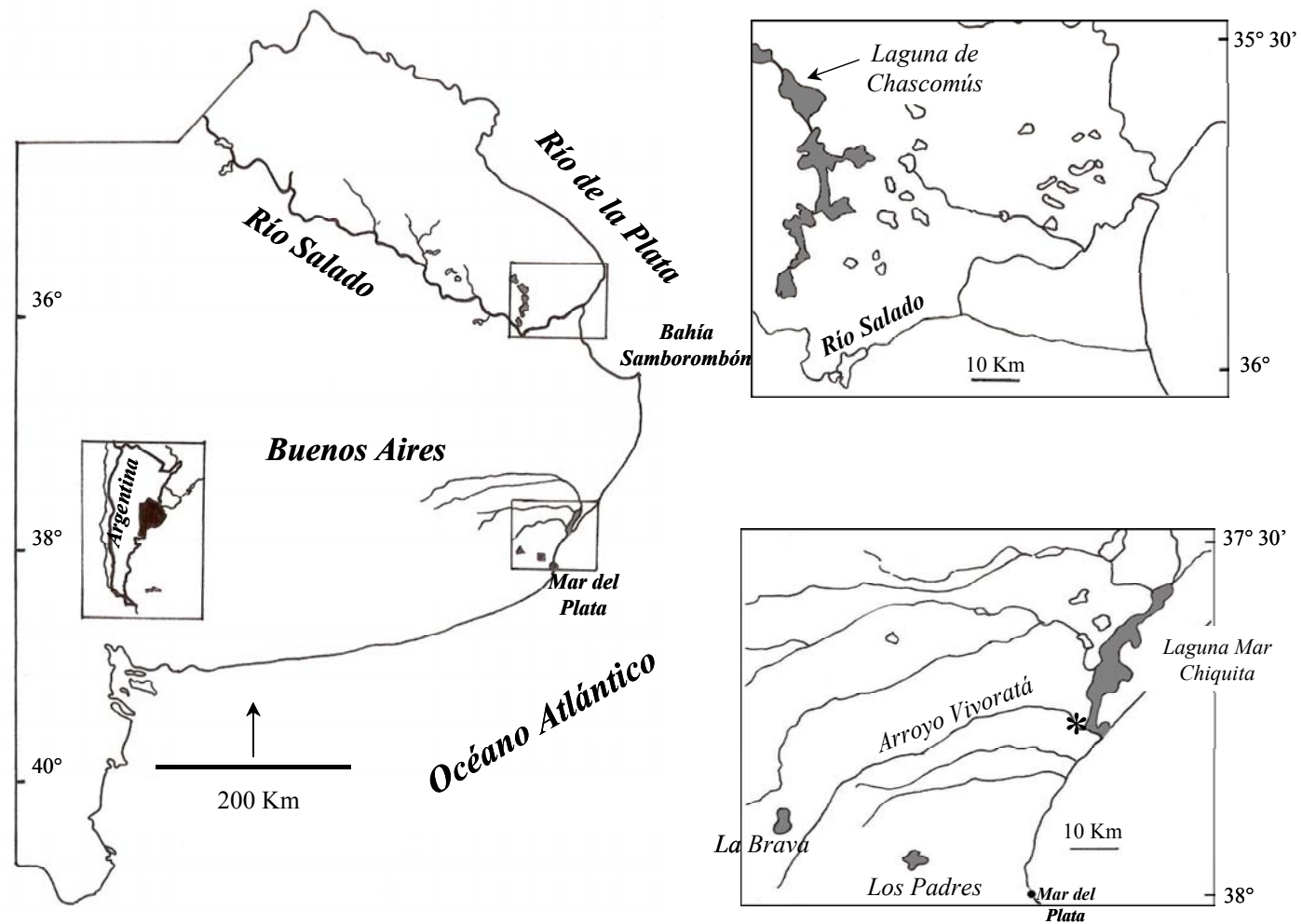


Figura 2.1. Sitios de muestreo en la provincia de Buenos Aires. En el recuadro superior se detalla la ubicación de las Encadenadas de Chascomús, la flecha señala la Laguna de Chascomús (LC). En el recuadro inferior se detalla la ubicación de los restantes sitios, Laguna La Brava (LB), Laguna de Los Padres (LP) y el asterisco indica el lugar de muestreo en el Arroyo Vivoratá (AV). Las tres lagunas son ambientes lénticos y de baja salinidad, mientras que el arroyo es un ambiente lóptico y de salinidad variable. Para un descripción detallada ver Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Parámetros físico-químicos para los cuatro sitios de muestreo de *Palaemonetes argentinus* en la provincia de Buenos Aires, Argentina. s/d: sin datos disponibles.

	Laguna Chascomús	Laguna La Brava	Laguna Los Padres	Arroyo Vivotatá
Tipo de ambiente	Léntico	Léntico	Léntico	Lótico
Localización	35°36'S / 58°O	37° 51'S / 57° 58'O	37° 55'S / 57° 43'O	37° 44'S / 57° 27'O
Área (km ²)	30,13 ^a	4,3 ⁱ	2,16 ^b	
Profundidad máxima (m)	1,9 ^a	4,8 ⁱ	2,4 ^b	Dependiente de las mareas (~2-3)
Profundidad media (m)	1,53 ^a	3,4 ⁱ	1,243 ^b	Dependiente de las mareas
Tipología	Casi permanente (se secó en 1910) ^c	Laguna permanente ^c	Laguna Semipermanente ^c	
Origen de las cubetas lagunares	Eólico-Fluvial ^c	Tectónico	Eólico (Paleozoico superior) ^b	
Salinidad	Varia entre hipohalino y oligohalino ^d	Oligohalino 0,64 g/L ^f	Varia entre hipohalino y oligohalino. ^{b,c}	Dependiente de las mareas
Fósforo total (µg l ⁻¹)	100-500; promedio: 294 ^d	s/d	100-400 ^g	0,35 – 2,24 ^h
Clorofila a (µg l ⁻¹)	92,9 – 219,9 ^d	s/d	20-90 ^g	1,15 – 60,4 ^h

a.- Dangavs, 1976.

b.- Cionchi *et al.*, 1982.

c.- Lenicov *et al.*, 2002.

d.- Maizels *et al.*, 2003.

e.- Dangavs, 2005.

f.- Lenicov *et al.*, 2001.

g.- González Sagrario & Balseiro, 2003.

h.- Marcovecchio *et al.*, 2005 (medido en la laguna Mar Chiquita)

i.- Quirós, 2004

En el laboratorio las hembras con huevos fueron clasificadas de acuerdo con el estadio de desarrollo de sus embriones. Los siguientes estadios fueron seleccionados: *Estadio I*: los huevos con hasta un 90 % de vitelo, no hay evidencias de segmentación ni de órganos; *Estadio II*: huevos con un 50-60 % de vitelo, ojos visibles como líneas rojas, latido cardíaco visible y a menudo irregular; *Estadio III*: vitelo mayoritariamente consumido, ojos completamente formados, latido regular, diferenciación de los apéndices embrionarios, listos para eclosionar. Para cada muestreo se registraron el porcentaje de hembras con embriones en cada uno de esos estadios y el porcentaje de ovígeras.

Posteriormente, los camarones se almacenaron a -20°C hasta su análisis (menos de un mes para obtener los datos de pesos secos), excepto un grupo de hembras de cada localidad con embriones en el *Estadio III*, para obtener las larvas zoeas I recién eclosionadas. Estas hembras se mantuvieron en recipientes de 1,3 L, al menos 3 días sin alimento, con agua de la canilla de clorada, fotoperíodo natural y temperatura ambiente. Las hembras fueron observadas entre 2 y 3 veces al día hasta las eclosiones. Inmediatamente después de la eclosión, las larvas se contaron, y tanto las larvas como las hembras fueron cuidadosamente secadas con papel tissue y almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

La fecundidad realizada (N_e) se definió como el número de embriones en el *Estadio I* llevados por una hembra, la fecundidad real (N_z) como el número de larvas recién eclosionadas por hembra (Anger & Moreira, 1998). La fecundidad, N_e y N_z , se estimó a partir de las hembras ovígeras recolectadas al inicio de la estación reproductiva, octubre y noviembre, respectivamente. El peso seco (PS) se determinó con una balanza Mettler H54 AR (0,01g). Los embriones, larvas y hembras fueron secados en estufa, en cápsulas de aluminio pre-pesadas, a 90°C hasta que el peso fue constante (24h para los embriones y larvas, 48h para las hembras).

El tamaño de hembras y larvas se estimó por el largo del caparazón (L_c), desde el margen orbital, próximo al pedúnculo ocular, hasta el borde dorso posterior, fue elegido

como una medida del tamaño individual. Las medidas se realizaron con una lupa SZ40 Olympus (magnificación 5,4 X). Las relaciones *Lc-PS* se calcularon para las ovígeras sin considerar el peso de sus huevos. Una sub muestra de 10 larvas por camada se seleccionó al azar y fueron medidas un total de 90 larvas ($n = 9$ hembras) de LC y 100 larvas para el resto de las poblaciones ($n = 10$ hembras por población). El sexo fue determinado bajo lupa por el tamaño y forma del endopodito del primer pleópodo y la presencia o ausencia del apéndice masculina (Donatti, 1986; Dávila, 1996). Cuando alguno de estos dos rasgos no pudieron ser claramente identificados los camarones fueron clasificados como juveniles indiferenciados.

Las hembras ovígeras y las hembras con ovarios desarrollados se consideraron sexualmente maduras. La talla media al inicio de la madurez sexual (SOM por sus siglas en inglés: *size at the onset of maturity*) se estimó con regresiones logísticas utilizando la ecuación 1 (modificada de Oh & Hartnoll, 2004):

$$\text{Ecuación 1: } P = 1/(1 + \exp [-(a + b Lc)])$$

Donde P es la proporción de hembras maduras, Lc es el largo del caparazón, a y b son los parámetros estimados a partir del método de máxima verosimilitud. La talla media de madurez sexual (Lc_{50}), correspondiente a la proporción de 0,5 hembras maduras, fue estimada como el valor negativo de la razón de los coeficientes a y b ($Lc_{50} = -a/b$) considerando $P = 0,5$ en la ecuación 1 para cada una de las poblaciones. Se calcularon los intervalos de confianza ($\alpha = 0,0125$), y la talla media a la madurez se comparó entre las poblaciones utilizando una estimación bootstrap (Roa *et al.*, 1999). En el caso de los machos, se reportaron únicamente las tallas mínimas para las cuales fue posible identificar el sexo y la máximas encontradas durante el periodo de muestreo en todas las poblaciones.

ANÁLISIS DE DATOS

Para cada población, las relaciones $Lc-N_e$, $Lc-N_z$ y $Lc-PS$ se describieron con regresiones lineales. Todas las variables se transformaron con el logaritmo natural para cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad de las varianzas. La fecundidad, N_e por un lado y N_z , por el otro se comparó entre las poblaciones por medio de análisis de la covarianza (ANCOVA), usando el Lc como covariable. El mismo test se utilizó para comparar el PS de las hembras maduras, con el Lc como la covariable. Para todos los ANCOVAs, la igualdad de las pendientes de las regresiones se evaluó con un test de Paralelismo (Zar, 1996). Si las pendientes fueron paralelas (homogéneas) entonces el análisis continuó para evaluar las diferencias en las ordenadas al origen para un valor medio de Lc . Si las pendientes no fueron paralelas, la/s línea/s de regresión con pendiente diferente fue excluida de la comparación. El test *a posteriori* de Student-Newman-Keuls (SNK) fue utilizado para determinar cuáles ordenadas al origen fueron diferentes.

Dentro de cada población, la diferencia entre N_e y N_z se consideró una medida de la pérdida de embriones en el transcurso del desarrollo embrionario. Ambas líneas de regresión se compararon con un ANCOVA, con el Lc como covariable en cada población. Debido a que en todos los casos las pendientes fueron paralelas se calculó una pendiente común (Zar, 1996) (en cada población) y las ordenadas al origen recalculadas con esa pendiente común fueron comparadas entre las poblaciones. La pérdida de embriones en cada población se estimó como la diferencia entre las nuevas ordenadas al origen (a) usando la Ecuación 2 (Oh & Hartnoll, 1999), donde a_z es la ordenada al origen para el número de zoeas y a_e la ordenada al origen para el número de embriones.

$$\text{Ecuación 2: } 100 [1 - \exp(a_z - a_e)]$$

El tamaño de las larvas se comparó dentro y entre las poblaciones, mediante ANOVAs de una vía, debido a que los datos no cumplieron los supuestos para realizar un ANOVA de

dos vías. Los pesos secos de embriones y larvas se compararon entre las poblaciones con ANOVAs de una vía. Cuando un ANOVA mostró diferencias significativas se aplicó el test *a posteriori* de Student-Newman-Keuls (SNK) para determinar las diferencias entre las poblaciones.

RESULTADOS

Variables ambientales

En octubre, la temperatura del agua fue menor de 18° C en LB, LP y AV pero superior a 21° C en LC (Fig. 2.2a). Luego, la misma se incrementó alcanzando un máximo en diciembre en LC o febrero en los otros sitios. En marzo, la temperatura del agua disminuyó en todos los sitios de muestreo.

La salinidad más baja se registró en LB y LP, valores intermedios en LC, y los más altos en VC (Fig. 2.2b). En LC y LP la salinidad varió débilmente entre meses, pero no espacialmente (entre de las réplicas). En LB no se detectaron variaciones temporales ni espaciales, mientras que ambas ocurrieron en AV (Fig. 2.2b). Considerando todo el periodo de estudio, la salinidad fue significativamente diferente entre los sitios de muestreo (ANOVA: *g.l.* = 3; *F* = 58,6; *P* < 0,0001). Los valores medios más altos ocurrieron en AV ($0,71 \pm 0,13$ ‰, media \pm ES), los más bajos en LB y LP ($0,2 \pm 0,0$ y $0,23 \pm 0,02$ ‰, respectivamente) y valores intermedios en LC ($0,44 \pm 0,02$ ‰) (SNK, *P* < 0,05). Al igual que la salinidad, los valores más bajos de conductividad (mS cm^{-1}) se registraron en LB y LP ($0,57 \pm 0,02$ y $0,65 \pm 0,09$, respectivamente), los más altos ocurrieron en AV ($1,46 \pm 0,5$) e intermedios en LC ($1,03 \pm 0,05$). Los valores medios de pH variaron entre 8,5 y 8,9, y los de oxígeno disuelto entre 1,33-2,74 (mg L^{-1}). No se detectaron diferencias en el pH ni el oxígeno disuelto entre sitios ni entre meses.

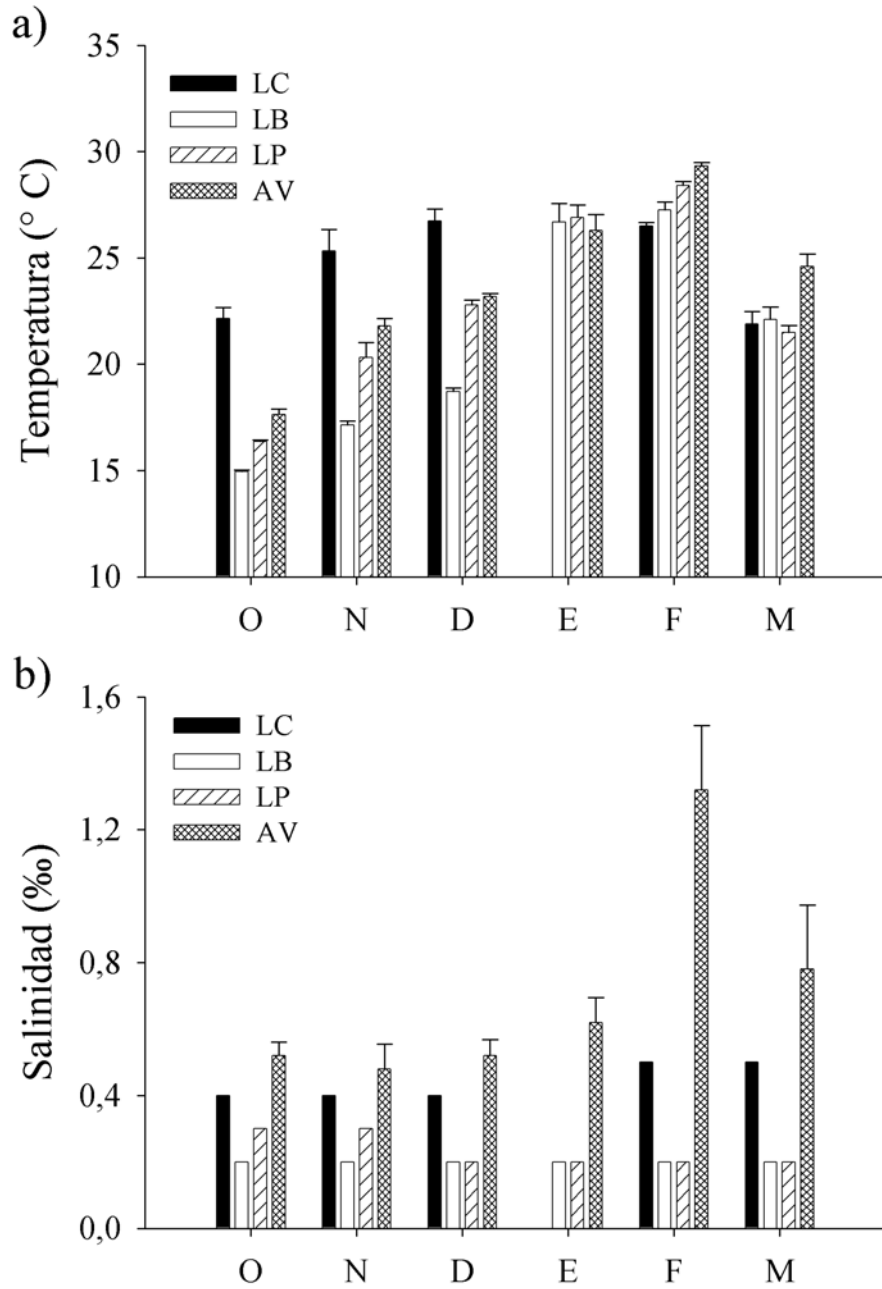


Figura 2.2. Valores mensuales promedio \pm 1 desvío estándar ($n = 5$ réplicas) para **a)** la temperatura del agua, **b)** la salinidad en los cuatro sitios de muestreo durante periodo de estudio. LC, LB, LP y AV: Laguna Chascomús, Laguna la Brava, Laguna Los Padres y Arroyo Vivoratá, respectivamente.

Estación reproductiva

La estación reproductiva fue diferente entre las poblaciones. Hacia fines de octubre, alrededor del 100% de las hembras de LB, LP y AV tuvieron sus embriones en el *Estadio I*, mientras que en LC más del 50% tuvieron sus embriones en los *Estadios II y III* (Fig. 2.3a) indicando que en la última población la producción de huevos comenzó antes de la fecha de muestreo. El periodo de puesta finalizó en febrero en LB y LP, pero en marzo en AV y LC (Fig. 2.3b). Por lo tanto, el periodo reproductivo fue de unos 5 meses en LB y LP, 6 meses en VC y 7 meses en LC. Los picos en la frecuencia de hembras con huevos también difirieron en el tiempo e intensidad entre las poblaciones (Fig. 2.3b), indicando que la estación reproductiva comenzó más temprano en LC, luego en AV, y finalmente en LB y LP. La máxima frecuencia de hembras ovígeras registrado fue más baja en LP (< 50%) que en las otras tres poblaciones (70-80%).

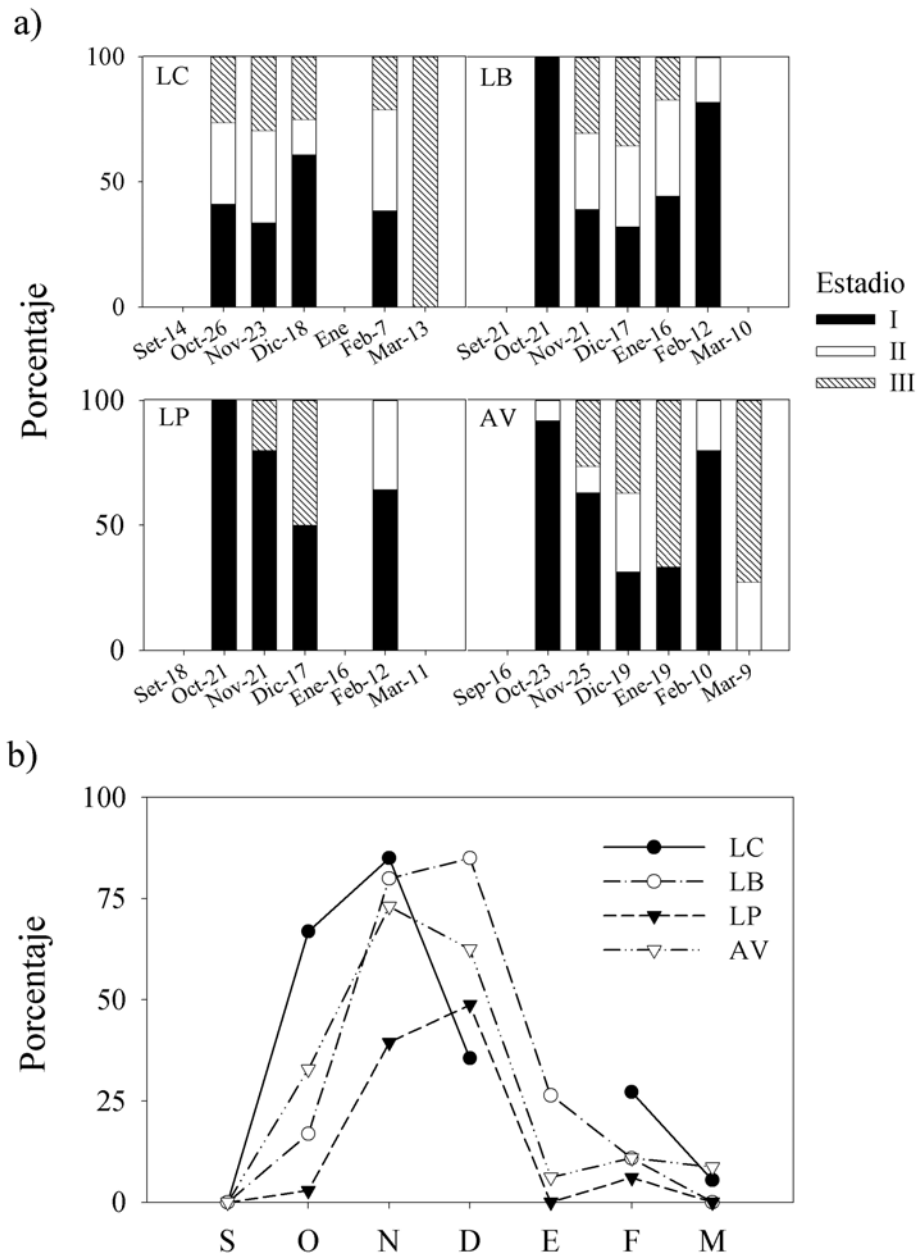


Figura 2.3. Duración de la estación reproductiva en las cuatro poblaciones estimada a partir de la presencia de hembras con huevos. **a)** Proporción de hembras con embriones en los estadios del desarrollo precoz (I), intermedio (II) y avanzado (III), **b)** Porcentaje de hembras ovígeras sobre el total de hembras para cada mes. LC, LB, LP y AV: Laguna Chascomús, Laguna la Brava, Laguna Los Padres y Arroyo Vivotatá, respectivamente.

Fecundidad y pérdida de embriones

El número de embriones (N_e , fecundidad realizada) y también el número de larvas (N_z , fecundidad real) se incrementaron lineal y positivamente con el L_c de las hembras en las cuatro poblaciones (Tabla 2.2). La N_e fue significativamente diferente entre las poblaciones. Las pendientes de las regresiones L_c-N_e difirieron significativamente entre LB y las otras dos poblaciones sin influencia marina (test de Paralelismo, $g.l. = 2$; $F = 4,35$; $P = 0,017$), pero no de AV. La línea de regresión correspondiente a LB cruzó las líneas de LC y LP. El punto donde las líneas de LB y LC se cruzaron fue para un largo del caparazón $L_c = 5,74$ mm, $N_e = 103$, esto indica que por encima de ese tamaño las hembras de LB llevaron más embriones que las de LC (por debajo, tuvieron menos huevos). Igualmente, las líneas de LB y LP se cruzaron en $L_c = 5,32$ mm, $N_e = 77$. Nuevamente, por encima de ese tamaño las hembras de LB llevaron más embriones que las de LP y por debajo de esa talla, tuvieron menos huevos que en LP. En resumen, en LB el N_e cambió de manera más pronunciada con el tamaño de las hembras que en las otras dos poblaciones mencionadas. Excluyendo LB, N_e difirió significativamente entre AV, LC y LP (ANCOVA: $g.l. = 2$; $F = 3,25$; $P = 0,04$). Para un mismo L_c de las hembras, los valores de N_e disminuyeron en el orden: $AV > LC > LP$. Además, para un mismo LC de las hembras, N_e fue significativamente más grande en AV que en LB (ANCOVA: $g.l. = 1$; $F = 5,12$; $P = 0,029$). De manera similar, N_z varió entre las poblaciones. En este caso, todas las pendientes fueron paralelas, pero las ordenadas al origen difirieron significativamente (ANCOVA: $g.l. = 3$; $F = 13,7$; $P < 0,0001$). Para un mismo L_c de las hembras, los valores de N_z disminuyeron en el orden $AV > LC = LB > LP$.

Con el objeto de estimar la pérdida de embriones durante el desarrollo, las líneas de regresión para N_e y N_z , con L_c como covariable fueron comparadas en cada población. Para cada una de las poblaciones las líneas de ambas rectas fueron paralelas, pero las ordenadas al origen difirieron significativamente, excepto en AV (Tabla 2.2), indicando una pérdida en el

número embriones durante el desarrollo. Después de calcular una pendiente común, la diferencia entre las ordenadas al origen en cada una de las cuatro poblaciones fue significativa (Tabla 2.3b). El porcentaje máximo de embriones perdidos ocurrió en LP (47%), valores intermedios se calcularon para LC y LB (33 y 16%, respectivamente) y el mínimo en AV (8%).

Tabla 2.2. Comparación de la fecundidad entre las poblaciones de *Palaemonetes argentinus*: ecuaciones de regresión describiendo (a) la fecundidad realizada (número de embriones en el estadio I, N_e), (b) fecundidad real (número de larvas recién eclosionadas, N_z) en función del tamaño corporal de las hembras (L_c , mm; datos transformados logarítmicamente). ANCOVA, con el L_c como covariable; letras minúsculas diferentes indican que las pendientes de las regresiones no fueron paralelas y no fue posible comparar los interceptos (--); letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los interceptos en el orden $A > B > C$ (SNK test, $P < 0,05$).

Población	Ecuación de regresión	P	r ²	n	ANCOVA			
					Pendiente	Intercepto		
(a)	LC	$\text{Ln } N_e = 2,05 \cdot \text{Ln } L_c + 1,05$	< 0,001	0,72	30	a	B	--
	LB	$\text{Ln } N_e = 3,84 \cdot \text{Ln } L_c - 2,07$	< 0,001	0,71	20	b	--	B
	LP	$\text{Ln } N_e = 2,34 \cdot \text{Ln } L_c + 0,43$	< 0,01	0,51	12	a	C	--
	AV	$\text{Ln } N_e = 2,88 \cdot \text{Ln } L_c - 0,55$	< 0,001	0,72	22	a-b	A	A
(b)	LC	$\text{Ln } N_z = 2,15 \cdot \text{Ln } L_c + 0,49$	< 0,01	0,40	17	a	B	
	LB	$\text{Ln } N_z = 3,38 \cdot \text{Ln } L_c - 1,49$	< 0,001	0,65	18	a	B	
	LP	$\text{Ln } N_z = 2,73 \cdot \text{Ln } L_c - 0,85$	< 0,05	0,56	9	a	C	
	AV	$\text{Ln } N_z = 3,34 \cdot \text{Ln } L_c - 1,48$	< 0,001	0,79	18	a	A	

Tabla 2.3. Análisis de la covarianza para la fecundidad realizada vs. la fecundidad real dentro de cada población, con el tamaño de las hembras como covariable. **(a)** Evaluación de las pendientes de las ecuaciones de regresión dentro de cada población (* indica diferencias significativas en las ordenadas al origen de N_e vs N_z dentro de cada población, test SNK, $P < 0,05$); **(b)** Evaluación de las ordenadas al origen de la fecundidad realizada y real recalculadas con la pendiente común; todas las comparaciones fueron significativas. SC: Suma de Cuadrados; *g.l.*: grados de libertad; CM: Cuadrados Medios; *F*: estadístico del test; *P*: probabilidad de error.

Población	Fuente de variación	Pendientes					Ordenadas					
		SC	<i>g.l.</i>	CM	<i>F</i>	<i>P</i>	SC	<i>g.l.</i>	CM	<i>F</i>	<i>P</i>	
(a) LC	Fecundidad	0,00	1	0,00	0,03	0,87*	(b)	1,57	1	1,57	0,00	< 0,0001
	Error	1,17	43	0,03				0,00	44	0,00		
LB	Fecundidad	0,00	1	0,00	0,29	0,59*	0,26	1	0,26	0,00	< 0,0001	
	Error	0,89	34	0,03			0,00	35	0,00			
LP	Fecundidad	0,00	1	0,00	0,11	0,74*	1,79	1	1,79	0,00	< 0,0001	
	Error	0,54	17	0,03			0,00	18	0,00			
AV	Fecundidad	0,02	1	0,02	0,63	0,43	0,07	1	0,07	0,00	< 0,0001	
	Error	1,12	36	0,03			0,00	37	0,00			

Peso seco (PS) de embriones y larvas

Los pesos secos de los embriones en el *Estadio I* y de las larvas recién eclosionadas difirieron significativamente entre las poblaciones (ANOVAs, factor *PS* embriones *g.l.* = 3; $F = 9,64$; $P < 0,0001$; factor *PS* larvas: *g.l.* = 3; $F = 4,88$, $P < 0,01$). Las hembras de AV produjeron embriones más pesados ($0,085 \pm 0,002$ mg *PS* por huevo, $n = 22$) que aquellas de las poblaciones sin influencia marina (media para los datos en conjunto: $0,074 \pm 0,001$ mg, $n = 61$). El *PS* promedio por larva recién eclosionada fue mínimo en LP ($0,048 \pm 0,002$ mg por zoea, $n = 11$), mientras que los valores en las otras tres poblaciones fueron consistentemente más altos (media para los datos en conjunto: $0,057 \pm 0,001$ mg, $n = 55$).

Tamaño al nacer

El tamaño de las larvas al momento de la eclosión (*Lc*) varió significativamente dentro de cada población (es decir entre camadas; Tabla 2.4a). A pesar de esa variabilidad intra-poblacional, también se detectaron diferencias significativas entre las poblaciones (Tabla 2.4b). Las tallas medias de las larvas de AV, LC, LB y LP fueron $0,913 \pm 0,005$ mm (media \pm SE; $n = 100$), $0,893 \pm 0,005$ mm ($n = 90$), $0,891 \pm 0,004$ ($n = 100$) y $0,856 \pm 0,004$ ($n = 100$), respectivamente. Las larvas de AV fueron significativamente más grandes, las de LP las más pequeñas y aquellas de LC y LB tuvieron tamaños intermedios y similares entre sí (SNK, $P < 0,05$).

Tabla 2.4. Comparación del tamaño larval dentro y entre las poblaciones de *Palaemonetes argentinus* **(a)** entre camadas en cada población, **(b)** entre poblaciones (datos transformados con $1/Lc$). SC: Suma de Cuadrados; *g.l.*: grados de libertad; CM: Cuadrados medios; *F*: estadístico del test; *P*: probabilidad.

	Población	Fuente de variación	SC	<i>g.l.</i>	CM	<i>F</i>	<i>P</i>
(a)	LC	Camada	0,059	8	0,005	2,74	< 0,05
		Error	0,175	81	0,002		
	LB	Camada	0,04	9	0,004	4,24	< 0,001
		Error	0,09	90	0,001		
	LP	Camada	0,05	9	0,005	4,99	< 0,0001
		Error	0,10	90	0,001		
	VC	Camada	0,057	9	0,006	3,61	< 0,001
		Error	0,157	90	0,002		
(b)		Población	0,274	3	0,091	30,44	< 0,0001
		Error	1,155	385	0,003		

Talla mínima para determinar el sexo y tallas máximas

La mínima talla (L_c) de *P. argentinus* a la cual fue posible determinar el sexo fue 2,4 mm en LB, pero solo 2,2 en los otros tres sitios. El máximo tamaño corporal de machos y hembras fue máximo en AV, mínimo en LP e intermedio en LC y LB (Tabla 2.5). La talla mínima a la que pudo determinarse el sexo no estuvo correlacionada con el tamaño máximo.

Talla de madurez sexual en las hembras

El rango de tallas (L_c) de las hembras consideradas para realizar esta estimación osciló entre 2,2 – 7,5 (LC); 2,2 – 8,6 (AV); 2,5 – 7,5 (LB); 2,4 – 6,7 (LP). La Tabla 2.6 muestra la proporción de hembras sexualmente maduras y el número total de hembras analizadas para cada intervalo de clase de talla de 0,3 mm de L_c en las cuatro poblaciones. La mínima talla de madurez sexual (>5 % maduras) estimada con este método estuvo entre las clases 3,2 – 3,5 mm para LC y LP; entre 4,1 – 4,4 en LB; 4,4 – 4,7 en AV (Tabla 2.6). Por otro lado, el tamaño de las hembras con huevos más pequeñas fue 4,6 (AV), 4,0 (LC), 4,4 (LB) y 3,7 mm (LP). En las cuatro poblaciones las hembras ovígeras más pequeñas fueron encontradas en febrero 2004, hacia el final de la estación reproductiva.

Tabla 2.5. Rango de tallas (largo del caparazón, mm) y número total (n) de camarones colectados en los cuatro sitios durante el periodo de estudio.

Población	Hembras (mm)	n	Machos (mm)	n	Indiferenciados (mm)	n
LC	2,2 – 8,1	1035	2,2 – 6,3	336	0,9 – 2,1	37
LB	2,4 – 7,5	845	2,4 – 5,3	479	-	-
LP	2,2 – 6,7	801	2,2 – 5,2	551	-	-
AV	2,2 – 8,6	767	2,2 – 6,5	510	1,6 – 2,2	73

Tabla 2.6. Talla de madurez sexual de las hembras de *Palaemonetes argentinus* en las cuatro poblaciones. *Lc*: largo del caparazón (valor medio para la clase de talla); T: número total de hembras; M: número de hembras maduras; PM: proporción de hembras maduras. En negrita se resalta la mínima clase de talla de madurez sexual (*SOM*) (> 5% maduras).

<i>Lc</i> (mm)	Chascomús			La Brava			Los Padres			Vivoratá		
	T	M	PM	T	M	PM	T	M	PM	T	M	PM
2,3	19	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2,6	53	0	0	5	0	0	22	0	0	24	0	0
2,9	62	0	0	31	0	0	59	0	0	33	0	0
3,2	41	2	0,049	73	0	0	66	2	0,030	27	0	0
3,5	47	3	0,064	75	0	0	53	4	0,075	22	0	0
3,8	44	3	0,068	79	1	0,013	66	9	0,136	17	0	0
4,1	39	4	0,103	79	2	0,025	20	8	0,4	16	0	0
4,4	49	7	0,143	40	2	0,05	27	23	0,852	44	2	0,045
4,7	65	23	0,354	46	23	0,5	40	39	0,975	54	5	0,093
5	60	25	0,417	49	39	0,796	54	53	0,981	67	8	0,119
5,3	93	54	0,581	57	56	0,982	47	43	0,915	83	12	0,145
5,6	91	73	0,802	87	84	0,966	25	25	1	78	30	0,385
5,9	122	108	0,885	79	76	0,962	11	10	0,909	79	38	0,481
6,2	107	97	0,907	53	52	0,981	3	3	1	66	47	0,712
6,5	63	61	0,968	31	31	1	1	1	1	65	59	0,908
6,8	43	40	0,930	9	8	0,889	2	2	1	54	53	0,981
7,1	15	15	1	5	4	0,8				15	14	0,933
7,4	13	12	0,923	0	0					7	7	1
7,7	5	5	1	1	1	1				8	8	1
8	2	2	1							6	6	1
8,3	2	2	1							1	1	1
8,6										1	1	1
total	1035	536		799	379		497	222		767	290	

La relaciones entre el L_c y la proporción de hembras maduras (P) por cada intervalo de clase de tallas se calculó mediante funciones logísticas (Fig. 2.4). El tamaño estimado en el que el 50% de las hembras eran maduras difirió significativamente entre las poblaciones ($P < 0,05$; Fig. 2.5): el máximo valor correspondió a AV, el mínimo a LP y valores intermedios se encontraron en LC y LB.

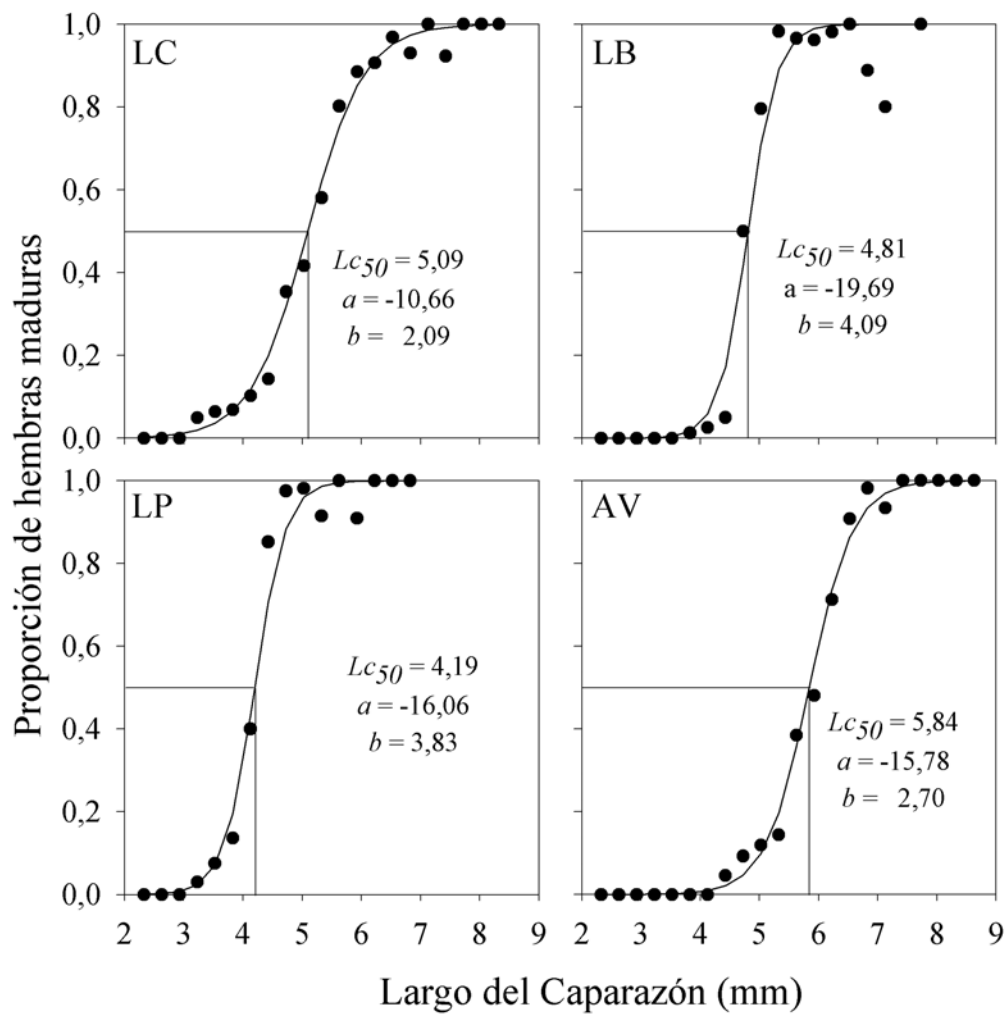


Figura 2.4. Talla media de madurez sexual de las hembras de *Palaemonetes argentinus*. En cada gráfico se indica la talla, como largo del caparazón (L_{c50}) en el que el 50% de las hembras eran maduras; a y b son los parámetros de las funciones logísticas. LC, LB, LP y AV: Laguna Chascomús, Laguna la Brava, Laguna Los Padres y Arroyo Vivoratá, respectivamente.

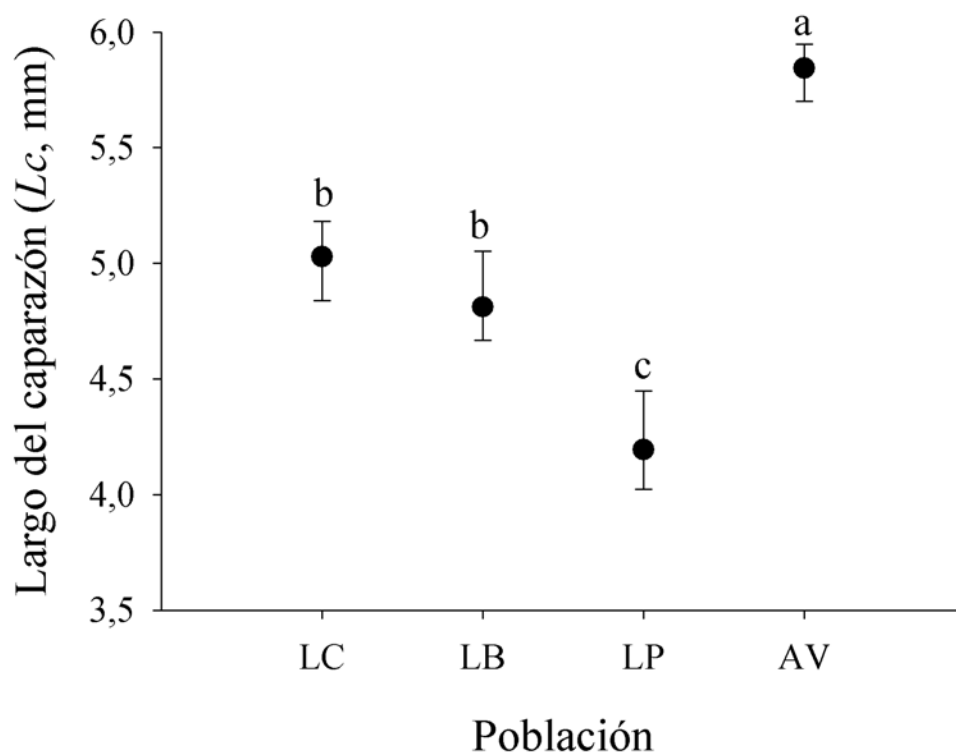


Figura 2.5. Tallas medias de madurez sexual de las hembras de *Palaemonetes argentinus* pertenecientes a las cuatro poblaciones. Valores medios \pm los intervalos de confianza ($\alpha = 0,025$) luego de aplicar la técnica de remuestreo con reposición (bootstrap).

Relación entre la talla y el peso seco de las hembras sexualmente maduras

Las ecuaciones de regresión entre los logaritmos de *Lc-PS* de las hembras sexualmente maduras fueron altamente significativas en las cuatro poblaciones (Tabla 2.7). Las pendientes de esas relaciones fueron similares entre las poblaciones; pero existieron diferencias significativas en las ordenadas al origen (ANCOVA: *g.l.* = 3; *F* = 5,68; *P* < 0,01). Para un mismo *Lc*, el *PS* de las hembras fue máximo en AV, mínimo en LP e intermedio y similar en LC y LB (SNK, *P* < 0,05).

Tabla 2.7. Ecuaciones de regresión que describen el peso seco (PS) de las hembras de *Palaemonetes argentinus* sexualmente maduras en relación con el largo del caparazón (Lc) en las cuatro poblaciones. Unidades antes de la transformación logarítmica (peso en mg; Lc en mm).

Población	Ecuación de regresión	<i>P</i>	r^2	<i>n</i>
LC	$\text{Ln } PS = 2,84 \cdot \text{Ln } Lc - 1,31$	$< 0,0001$	0,84	47
LB	$\text{Ln } PS = 2,64 \cdot \text{Ln } Lc - 0,89$	$< 0,0001$	0,80	36
LP	$\text{Ln } PS = 2,67 \cdot \text{Ln } Lc - 0,98$	$< 0,0001$	0,87	20
AV	$\text{Ln } PS = 3,07 \cdot \text{Ln } Lc - 1,64$	$< 0,0001$	0,89	40

DISCUSIÓN

Los rasgos de historia de vida investigados fueron notoriamente diferentes entre las cuatro poblaciones de *P. argentinus*. La estación reproductiva, por ejemplo, fue más larga en LC (7 meses), mientras que la misma se prolongó solo por 6 meses en AV, y 5 meses en LB y LP. La mayor temperatura del agua en Chascomús cuando comenzó este estudio podría explicar el inicio más temprano de las actividades reproductivas en esa población (Fig. 2.2a). La extensión de la estación reproductiva en las tres poblaciones ubicadas más al sur también se correlacionó con las temperaturas del agua, las cuales fueron en promedio más altas en el Arroyo Vivoratá que en las lagunas La Brava y en Los Padres.

La variabilidad en el número de huevos por hembra fue explicada principalmente por la variación en el tamaño corporal de las hembras (en las cuatro poblaciones dichos valores oscilaron entre el 51-72%; Tabla 2.2a). Sin embargo, para una misma talla corporal, la fecundidad más alta (ambas medidas: N_e y N_z) fue encontrada en la población de AV, mientras que las hembras de los ambientes sin influencia marina produjeron en promedio menor número de huevos y larvas. También en un camarón palemónido de Japón, *Macrobrachium nipponense* de Haan, 1849, se ha documentado una mayor fecundidad en poblaciones estuariales respecto de las de agua dulce (Mashiko, 1983a; Mashiko, 1990).

Entre las poblaciones sin influencia marina estudiadas aquí, la fecundidad realizada fue más alta en la laguna donde la salinidad fue débilmente más alta que el promedio (LC) y más baja en otra donde la concentración de iones fue significativamente menor (LP). La variabilidad en el número de embriones entre éstas poblaciones podría asociarse con un incremento en el tamaño de los huevos debido a las condiciones hipo-osmóticas, más que reflejar una mayor inversión energética de las hembras en la producción de huevos como fue sugerido para *M. nipponense* (Mashiko, 1990).

Las hembras de AV produjeron huevos más pesados, pero el peso seco de las larvas al momento de la eclosión fue similar al del resto de las poblaciones. Ese resultado sugiere un costo metabólico más alto para completar la embriogénesis en la población de AV, y/o diferencias en la composición bioquímica del vitelo de los huevos en AV y el resto de las poblaciones. Ambas posibilidades deberían explorarse en futuros experimentos.

Las hembras de *P. argentinus* de la población de AV presentaron la fecundidad más alta y el mayor tamaño de madurez sexual. El mismo patrón se ha observado también en las poblaciones estuariales de *M. nipponense* comparadas con aquellas de agua dulce (Mashiko 1983a; b; Mashiko, 1990). Por el contrario, en *P. pugio* Holthuis, 1949, una especie ecológicamente similar a *P. argentinus*, esos rasgos de historia de vida difirieron de manera opuesta: la fecundidad más alta y el mayor tamaño de madurez se observaron en una población que habita en el sitio de menor concentración salina (Alon & Stancyk, 1982).

El regimen de salinidad en AV es altamente impredecible, ya que está fuertemente afectado tanto por el balance entre precipitaciones y el caudal de los arroyos, como por las mareas y vientos que condicionan las intrusiones de agua salada desde la Laguna Mar Chiquita (Anger *et al.*, 1994, Spivak *et al.*, 1994). Durante este estudio, la salinidad del arroyo fue consistentemente baja. En promedio fue débil pero significativamente más alta que en el resto de las lagunas (Fig. 2.2b). Este hecho se explicaría en parte porque los muestreos y mediciones de salinidad fueron realizados durante el periodo de baja marea, cuando la descarga de agua dulce predomina sobre la salobre. La típica fauna estuarial del arroyo, como por ejemplo las agregaciones de tubos calcáreos construidas por el gusano poliqueto *Ficopomatus enigmaticus* Fauvel, 1923 y la presencia de cangrejos grapsoideos estuariales o marinos (Spivak *et al.*, 1994; obs. pers.), indican que a largo plazo en AV predominan concentraciones salinas más altas, y probablemente las fluctuaciones de salinidad sean mayores.

Además de la salinidad diferencial, las diferencias en fecundidad, tamaño de madurez y peso seco por huevo observadas entre las poblaciones de *P. argentinus* de AV y las otras tres lagunas pampeanas, podrían estar relacionadas con la naturaleza lótica del Arroyo Vivoratá; los otros tres sitios, por el contrario, son ambientes lénticos (Tabla 2.1).

Las características hidrológicas jugarían un rol importante en el modelado de la historia de vida en algunos carideos de la región del Amazonas (Odinetz Collart & Magalhães, 1994) y del sureste de Australia (Hancock & Bunn, 1997; Richardson *et al.*, 2004). Uno de los problemas primarios de la vida en aguas lóaticas es que los organismos pequeños podrían ser transportados aguas abajo hacia los estuarios o a la costa, donde las salinidades podrían tornarse desfavorablemente altas para la mayoría de los organismos de agua dulce. Esto podría aplicarse en particular a las larvas planctónicas de los crustáceos decápodos, las cuales son fisiológicamente sensibles a las variaciones de salinidad (Anger 2001; 2003). Las larvas de *P. argentinus* producidas en AV podrían ser removidas del ambiente parental, eventualmente se dirigirían hacia la laguna de Mar Chiquita, donde tienen lugar condiciones estuariales y algunas veces la salinidad es cercana a la del mar (Anger *et al.*, 1994). Además del estrés hiper-osmótico, en la laguna Mar Chiquita las larvas tendrían que enfrentarse a las fuertes presiones de depredación ejercidas por los peces como se ha documentado en la mayoría de esos ambientes (Morgan, 1995).

Lo descripto más arriba sugiere que la mortalidad de los primeros estadios del ciclo de vida de *P. argentinus* sería más alta en AV que en las poblaciones de las lagunas. Para tal situación, un modelo estocástico sobre los efectos de la mortalidad edad-específica predice un retraso de la madurez sexual (véase Alon & Stancyck, 1982: 274). Dicha predicción está de acuerdo con las observaciones de una mayor talla de madurez (la que a su vez explicaría la mayor fecundidad) y la mínima pérdida de embriones en la población de AV. Además, larvas más grandes (y presumiblemente más fuertes) producidas en AV podrían resistir mejor la advección hacia la adyacente Laguna Mar Chiquita. El mismo modelo predice una

reproducción más temprana (menor talla de madurez) cuando la mortalidad de los adultos es alta. Eso podría ocurrir en las lagunas someras pampeanas, donde los adultos de *P. argentinus* podrían ser más susceptibles a los depredadores orientados visualmente.

La variación intra-específica entre las poblaciones sin influencia marina podría relacionarse con la morfología de las lagunas pampeanas, la que a su vez afecta directamente su dinámica funcional y ecología (Quirós, 2004). La población de *P. argentinus* que habita la laguna más pequeña y de mínima profundidad (LP, Tabla 2.1) presentó el menor tamaño y peso de larvas, el menor tamaño de adultos, la mínima talla de madurez sexual, el mínimo porcentaje de ovígeras durante la estación reproductiva (siempre < 50 %), la mínima fecundidad; y por otra parte, la máxima pérdida de huevos. En su conjunto, los rasgos reproductivos observados en ésta población sugieren un nivel de adecuación particularmente bajo, que probablemente refleje condiciones poco favorables para la dinámica poblacional.

El tamaño y profundidad de un lago son parámetros claves en la estructuración de la dinámica trófica de sus comunidades, determinando por ejemplo el nivel de depredación, condiciones para el forrajeo, crecimiento, y en su conjunto, la adecuación de cada uno de sus habitantes (por ejemplo, Werner & Anholt, 1993). Las lagunas pampeanas presentan cambios estacionales en las comunidades de peces (Quirós *et al.*, 2002; Berasain *et al.*, 2005). Esa variación es particularmente marcada en las lagunas poco profundas y de superficie pequeña (Quirós *et al.*, 2002), afectando la intensidad de depredación, y mediante un efecto trófico en cascada, a la trama trófica en general (Quirós, 1998). Diferencias cualitativas en la composición y en las especies dominantes de peces han sido observadas en las tres lagunas pampeanas consideradas en este estudio (Lenicov & Berasain, 2001; 2002; Berasain *et al.*, 2005). Las variaciones en el tamaño corporal de *P. pugio* han sido relacionadas con la intensidad diferencial de depredación por peces (Alon & Stancyk, 1982; Bass *et al.*, 2001). En consecuencia, es posible que las poblaciones de *P. argentinus* que habitan en lagunas particularmente pequeñas como Los Padres estén sujetas a una intensa presión de

depredación. La hipótesis de una correlación entre la intensidad de depredación por peces, el tamaño de las lagunas y las variaciones en los rasgos de historia de vida en este camarón deberá ponerse a prueba en futuros estudios.

Los resultados de este capítulo mostraron la existencia de una notable variación intraespecífica en los rasgos reproductivos entre poblaciones de *P. argentinus* geográficamente separadas. La mortalidad edad-específica podría ser uno de los principales factores selectivos explicando la variación intraespecífica (véase Reznick *et al.*, 1996). Algunas de las variaciones observadas en los rasgos de historia de vida podrían tener una base genética (Reznick, 1982), mientras que otras podrían vincularse a una respuesta plástica frente a las variaciones bióticas o abióticas del ambiente. Las diferencias genéticas, incluidas aquellas que involucran a la plasticidad fenotípica, o a una respuesta a los factores ecológicos, pueden reflejar un estadio temprano de especiación (Mashiko, 1983c; Mashiko & Numachi, 2000; Dhuyvetter *et al.*, 2007). Futuros estudios considerando la variación intraespecífica comparativamente en condiciones controladas de laboratorio vs condiciones naturales (Reznick & Ghalambor, 2005), podrían demostrar si algunos rasgos particulares de historia de vida pueden considerarse adaptativos en los diferentes escenarios de una reciente radiación hacia los ambientes de agua dulce.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las sutiles (pero significativas) diferencias en la concentración iónica entre los ambientes estudiados afectarían el tamaño inicial de los huevos explicando, en parte, las diferencias en la fecundidad entre las poblaciones.

Los resultados mostraron una correlación entre las variaciones de los rasgos de historia de vida entre las poblaciones sin influencia marina con el tamaño de las lagunas: máximos valores de los rasgos ocurrieron en las lagunas de mayor tamaño y mínimos valores en la de menor tamaño.

Exceptuando la fecundidad, la variación en los rasgos de historia de vida entre las cuatro poblaciones no se relacionaría estrechamente con la concentración salina de los ambientes estudiados. Otras presiones selectivas locales podrían explicar la variabilidad intraespecífica observada. En relación con ello, se proponen las siguientes hipótesis que podrían evaluarse en el futuro:

- a) Uno de los procesos que contribuyen a la diferencia en los rasgos de historia de vida entre la población de AV (ambiente lótico) y el resto de las poblaciones (ambientes lénticos) es la mortalidad diferencial a una edad específica.
- b) Uno de los procesos que contribuyen a la diferencia en los rasgos de historia de vida entre las poblaciones sin influencia marina (ambientes lénticos) es la intensidad diferencial de depredación, la que se correlaciona estrechamente con el tamaño de los cuerpos de agua.

CAPÍTULO III

LA SALINIDAD Y EL CICLO REPRODUCTIVO DE LAS HEMBRAS DEL “CAMARÓN DE AGUA DULCE” *Palaemonetes argentinus*

INTRODUCCIÓN

El éxito reproductivo es uno de los eventos claves del ciclo de vida de los organismos ya que determinará la presencia de una población en un hábitat particular. En general, existe un rango esperado o más probable de condiciones ambientales bajo las cuales la reproducción será exitosa. En la mayoría de los organismos, pero particularmente en los crustáceos decápodos, la reproducción está fuertemente influenciada por los factores ambientales, y habitualmente ocurre en un rango más estrecho de condiciones que el necesario para la supervivencia y el crecimiento (Sastry, 1983). Por ejemplo, en algunas especies de camarones carideos los cambios en la salinidad pueden inhibir o alterar la maduración del ovario (por ejemplo, Gelin *et al.*, 2001). Por lo tanto, la frecuencia de producción de huevos puede ser modificada, y en consecuencia también la dinámica poblacional.

Los efectos de la salinidad sobre las fases del ciclo de vida y el éxito reproductivo han sido escasamente estudiados en los camarones del género *Palaemonetes* (Lowe & Provenzano, 1990). De hecho, para la mayoría de las especies de ese género aún es escasa la información existente sobre en qué rango de salinidad pueden completar con éxito los eventos del ciclo reproductivo como la maduración del ovario, fecundación, producción de huevos y desarrollo de los embriones hasta la eclosión de las larvas. Por un lado, esta información es relevante desde una perspectiva ecológica, ya que permitiría evaluar el grado de penetración de las especies de agua dulce en ambientes estuariales (o viceversa). Por el otro, desde un enfoque ecológico-evolutivo el rango de salinidades esperado dentro del cuál la reproducción será exitosa podría depender en parte de la historia evolutiva reciente de la especie.

Como se ha mencionado en el Capítulo I, algunas características biogeográficas y de historia de vida de *Palaemonetes argentinus*, como su distribución geográfica actual y su desarrollo larval extendido, han llevado a sugerir que este camarón habría colonizado en un

tiempo evolutivo reciente los ambientes de agua dulce (Menú-Marque, 1973; Anger, 2001). Hasta el momento no existían estudios experimentales que evalúen el desempeño reproductivo de *P. argentinus* en distintas condiciones de salinidad. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es explorar los efectos de la salinidad (tres tratamientos: 1, 15 y 25 ‰) sobre la capacidad de reproducción de *P. argentinus*. Adicionalmente, se presentan datos preliminares sobre la supervivencia de las hembras en dichos tratamientos de salinidad.

La hipótesis de éste estudio es que *P. argentinus* tiene la capacidad de sobrevivir y reproducirse en un amplio rango de salinidades, puesto que habita tanto en ambientes de salinidad variable como en cuerpos de agua dulce (véase Spivak, 1997; Müller *et al.*, 2004). Para poner a prueba esa hipótesis se seleccionaron dos poblaciones con distinto grado de aislamiento del mar: (1) la de la Laguna Chascomús (LC), que es una típica laguna pampeana ubicada a unos 70 km en línea recta desde la costa (Capítulo II) y (2) la del arroyo Vivoratá (AV) que desemboca en la Laguna Mar Chiquita, el sitio de muestreo se ubica aproximadamente a 3 km del mar y está expuesto a la influencia marina. En oposición al arroyo Vivoratá, la laguna de Chascomús no está expuesta a cambios diarios en la salinidad. Ambos sitios difieren además en sus características hidrológicas (Capítulo II). La predicción de la hipótesis postulada es que la capacidad de supervivencia y reproducción de *P. argentinus* frente a los tratamientos de salinidad será independiente de la procedencia de los camarones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Hembras con los ovarios completamente maduros y machos fueron recolectados en el inicio de la estación reproductiva, el 21/09/05 en LC y el 19/11/05 en AV. Los camarones fueron trasladados en agua de los sitios de origen al laboratorio. Durante los muestreos, la salinidad y la temperatura del agua fueron medidos con un refractómetro y un termómetro de alcohol, con los siguientes valores en LC: 1 ± 0 ‰, $16,9 \pm 0,37^{\circ}$ C, y en AV: $2,4 \pm 0,8$ ‰ y $23,5 \pm 0,44^{\circ}$ C (media \pm sd; $n = 5$ medidas).

En el laboratorio los camarones fueron separados en machos y hembras, conformando una pareja reproductiva. Las parejas se mantuvieron en recipientes plásticos de 500 ml perforados con circulación de agua común (Fig. 3.1a); aireación; temperatura y fotoperíodo constantes $21 \pm 2^{\circ}$ C y 14 h luz : 10 h oscuridad. Cada recipiente estuvo cubierto con pequeñas piedras hasta una profundidad de 1 cm aproximadamente, y una valva de bivalvo fue ofrecida como refugio (Fig. 3.1a). Un total de 90 parejas se mantuvieron en tres tratamientos de salinidad: 1, 15 y 25 ‰ (15 parejas por tratamiento, 45 por población). El agua para los cultivos se preparó diluyendo agua de mar filtrada (papel de filtro Schleicher and Schuell 0859, tamaño poro 7-12 μ m) con agua de canilla declorada. Los camarones fueron aclimatados por un período de 2 h en 1, 5 y 10 ‰ antes de ser transferidos a la condición final de 15 ‰, aquellos asignados al tratamiento de salinidad más alto fueron aclimatados por otras 2 h en 15 ‰ antes de ser transferidos a 25 ‰. Los camarones muertos hasta el día 6 (seis) del experimento fueron reemplazados para mantener el número inicial; se registró el número de muertes. Los camarones fueron alimentados diariamente con *Artemia* spp., alimento para peces TetraMin Pro[®], con alto contenido en lípidos y proteínas (12 y 46%, respectivamente), y cada 2 semanas se adicionó a la dieta tentáculos de calamar fresco.

El exceso de comida fue removido regularmente; el agua de los cultivos fue reemplazada cada 3-4 días. Las parejas fueron revisadas cada mañana registrándose muertes, mudas, hembras con huevos, eclosión de larvas y condición de los ovarios. Los camarones muertos fueron inmediatamente retirados de los recipientes.

El experimento se inició (tiempo cero) cuando las hembras provenientes del campo con los ovarios maduros desovaron en el laboratorio, hecho que ocurrió entre 1-3 días posteriores a la aclimatación. El experimento finalizó cuando las hembras que maduraron sus ovarios en las condiciones experimentales produjeron una segunda camada de huevos en el laboratorio, o a los 110 días en las que no maduraron los ovarios luego del primer desove.

Como en otros camarones carideos, en *P. argentinus* los ovarios son pares y están situados dorsalmente al estómago cardíaco y al hepatopáncreas (véase Bauer, 2004). Para cada ejemplar se realizó una descripción cualitativa del ovario considerando su forma y color, que dada la transparencia del exoesqueleto se realizó mediante observación directa. Se establecieron 4 estadios diferentes que en su conjunto conforman un ciclo ovárico y que se describe a continuación:

Todas las hembras experimentaron una muda previa a la extrusión e inmediatamente después de la puesta de los huevos (horas) fue posible distinguir bajo lupa en la zona del ovario, ubicada entre el estómago y el corazón, la presencia de ovocitos grisáceos translúcidos. A simple vista el ovario “descargado” (Estadio 0) y el oviducto pudieron distinguirse por puntos oscuros retraídos (presumiblemente cromatóforos ó cromatosomas, Fig. 3.1b) concentrados en la zona del ovario. En algunos casos se observaron los dos lóbulos del ovario, de apariencia delgada y translúcidos, extendiéndose desde la zona posterior del estómago hasta el corazón. El ovario permaneció en el Estadio 0 cuando las hembras incubaban una camada de embriones; excepto un caso en LC donde la maduración de las gónadas ocurrió en simultáneo con la incubación de los embriones. En una fase posterior, el tamaño fue incrementándose hasta que el ovario ocupó aproximadamente entre un 5-10 % del

caparazón, la coloración se tornó opaca y generalmente fue grisácea (Estadio I). A partir de este momento los lóbulos comenzaron a engrosarse gradualmente, desde la parte cercana al corazón hacia la zona anterior, el ovario ocupó entre un 20-50 % del caparazón, la tonalidad continuó siendo opaca y la coloración verdoso claro a marrón (Estadio II). Posteriormente, el tamaño se incrementó hasta cubrir por completo el estómago, ocupando casi totalmente el caparazón, y se extendió generalmente hasta el inicio del primer segmento abdominal; no hubo cambios de color (Estadio III). En este punto las hembras estuvieron listas para el desove.

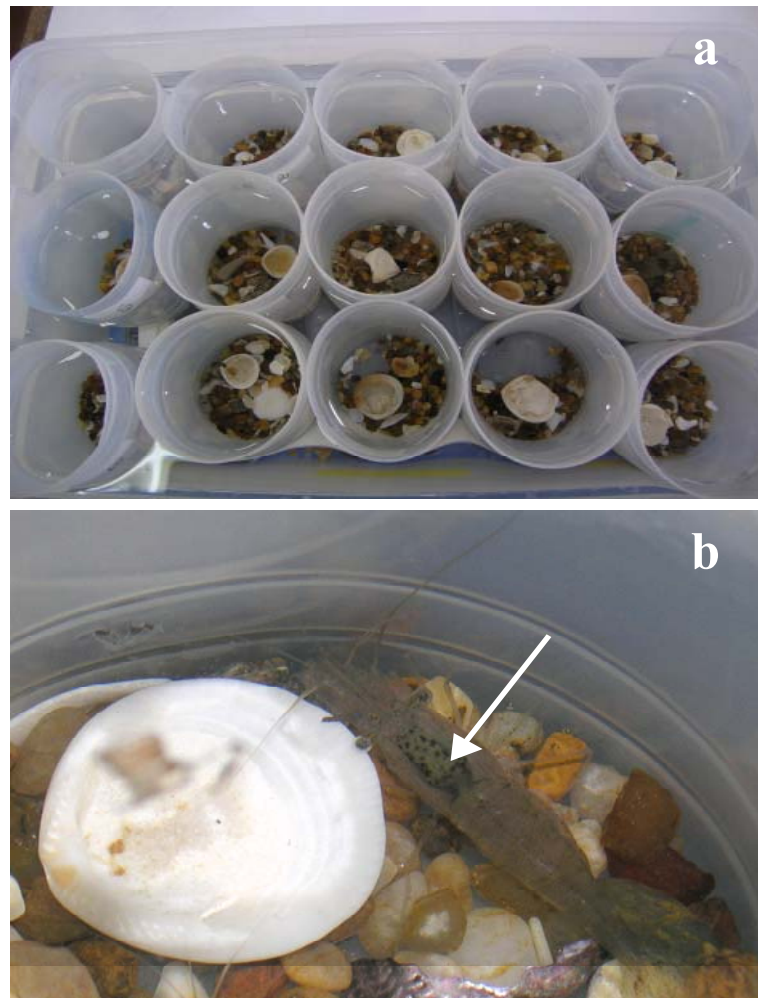


Figura 3.1. a) Recipientes individuales (500ml) donde se mantuvieron las parejas.
b) Hembra de *P. argentinus*, la flecha señala el ovario (Estadio II).

ANÁLISIS DE DATOS

La proporción de hembras que sobrevivieron al concluir el experimento fue comparada entre las salinidades más bajas (1 vs 15 ‰) dentro de cada población con el test de z. Como no se detectaron diferencias entre esas salinidades, se realizó un pool para cada población. El mismo test se utilizó para comparar la proporción de hembras sobrevivientes en el pool de salinidades más bajas (1 y 15 ‰) vs. el tratamiento de salinidad concentrada (25 ‰) en cada una de las poblaciones. Finalmente el porcentaje de supervivencia fue comparado entre las poblaciones con el mismo test.

El número de hembras que incubaron la primera camada de embriones hasta la eclosión de las larvas se consideró como una medida del éxito reproductivo. Para cada población se determinó si el éxito reproductivo fue independiente de los tratamientos de salinidad con el test de G (Sokal & Rohlf, 1981).

Los efectos de la salinidad (con tres niveles: 1, 15 y 25 ‰) y las poblaciones (dos niveles: LC y AV) sobre los tiempos entre puestas sucesivas, de descanso del ovario y para completar un ciclo ovárico se evaluaron con ANOVAs de dos vías utilizando una aproximación por regresión (Zar, 1996). Cuando un ANOVA detectó diferencias significativas en algunos de los factores, las medias fueron comparadas con el test de Tukey (o *honestly significant difference test*, HSD) para tamaños de muestras desiguales (Zar, 1996).

RESULTADOS

La salinidad y la mortalidad de las hembras

La supervivencia en ambas poblaciones fue alta en las salinidades más baja e intermedia (1, 15 ‰), al final del estudio los valores de supervivencia fueron superiores al 86% (Fig. 3.2a). Por el contrario, la tasa de mortalidad de las hembras (número de muertes / número inicial de hembras) fue alta en 25 ‰, particularmente durante la primera semana del experimento alcanzando valores de 0,19 en LC y 0,33 en AV. Posteriormente, no se registraron muertes en LC y la tasa de mortalidad se incrementó débilmente en AV (Fig. 3.2a). Durante los primeros 41 días del experimento, la tasa de mortalidad fue 0; 0,06 y 0,19 en LC y 0,13; 0,13 y 0,43 en AV en 1, 15 y 25 ‰, respectivamente. No se detectaron diferencias en la mortalidad entre 1 y 15 ‰ para ninguna de las poblaciones (LC: $z = 0,00$; $P = 1$; AV: $z = -0,54$; $P = 0,59$). La supervivencia final en 25 ‰ fue 81% en LC y 57% en AV (Fig. 3.2a, b). No se detectaron diferencias en la mortalidad entre 25 ‰ y el pool de las salinidades más bajas en LC ($z = 1,22$; $P = 0,22$). En cambio, la mortalidad fue significativamente mayor en 25 ‰ que en pool de las salinidades más bajas en AV ($z = 2,05$; $P = 0,04$).

Por otro lado, no se detectaron diferencias en la supervivencia entre LC y AV para el pool de salinidades bajas ($z = 0,93$; $P = 0,35$) ni para el tratamiento de salinidad concentrada ($z = 1,20$; $P = 0,23$).

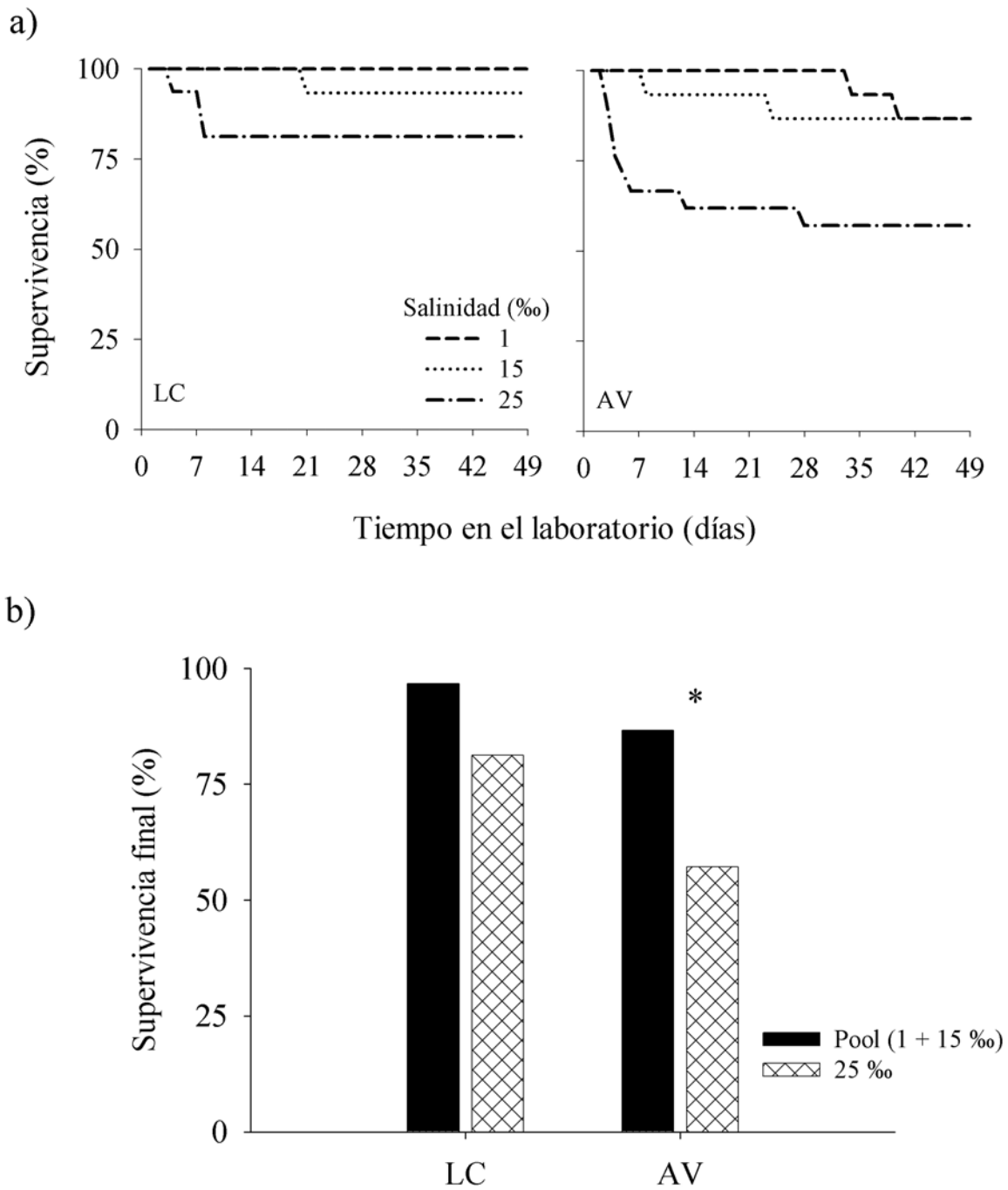


Figura 3.2. a) Supervivencia de las hembras de ambas poblaciones mantenidas en 1, 15 y 25 ‰. El experimento finalizó a los 110 días; a partir del día 42 no se registraron muertes. b) Supervivencia al concluir el experimento, el asterisco indica diferencias significativas entre salinidades. LC: Laguna Chascomús; AV: Arroyo Vivoratá

La salinidad y los eventos del ciclo reproductivo

Todas las hembras con sus ovarios maduros colectadas en el campo experimentaron una muda previa al desove, pero al cabo de una semana aproximadamente algunas perdieron sus huevos. El éxito en la incubación de esa primera camada de embriones presentó una tendencia hacia la disminución con el incremento en la salinidad (Fig. 3.3). En LC el 26, 42 y 61% de las hembras perdieron sus huevos en los tratamientos de 1, 15 y 25 ‰, respectivamente. En AV esos porcentajes fueron relativamente menores, 15, 38 y 42% en 1, 15 y 25 ‰, respectivamente. Sin embargo, el éxito reproductivo en ambas poblaciones fue independiente de los tratamientos de salinidad ($G = 0,27$, $g.l. = 2$; $P = 0,88$).

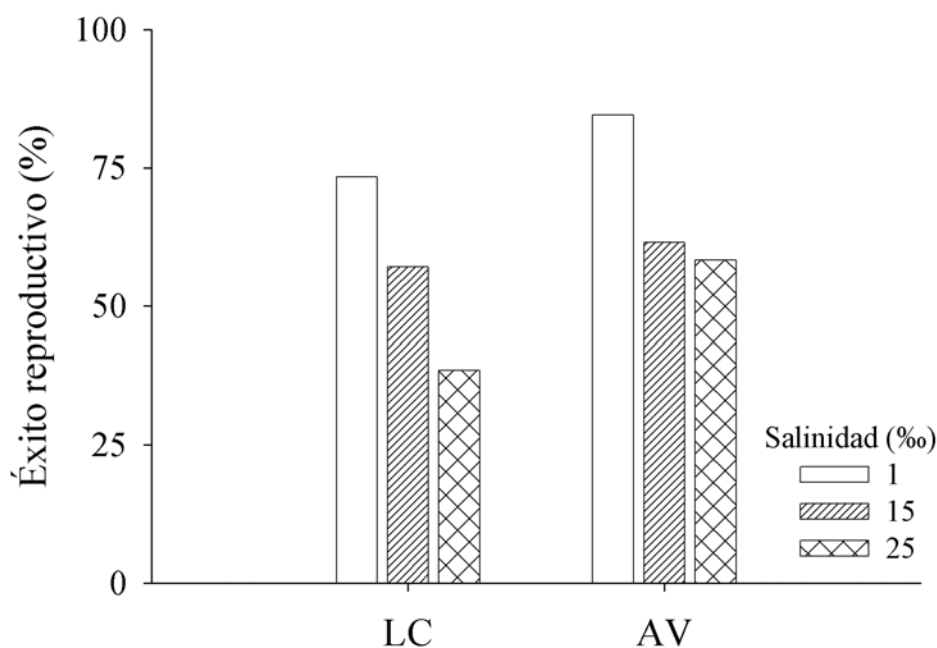


Figura 3.3. Porcentaje de las hembras (sobre el total de sobrevivientes) que desovaron e incubaron con éxito la primera camada de embriones hasta la eclosión de las larvas en los tres tratamientos de salinidad. LC: Chascomús; AV: Vivotatá.

La maduración ovárica ocurrió en todos los tratamientos de salinidad, excepto en AV en 15 ‰, donde se observó una regresión del ciclo cuando los ovarios habían alcanzado el Estadio II. Mientras que solamente 3 hembras de AV completaron el ciclo ovárico en 15 ‰, alrededor del 80 % lo hicieron en los tratamiento de 1 y 25 ‰ (Fig. 3.4a).

Un porcentaje superior al 50 % de las hembras de LC (en los tratamientos de 1 y 15 ‰) y de AV (en 25 ‰) maduraron las gónadas luego de haber incubado una camada de embriones (Fig. 3.4b). El tiempo en que se completó un ciclo ovárico en LC no fue afectado por la condición de las hembras (es decir, si ellas incubaron o perdieron sus embriones), en cambio existió un efecto de la salinidad (ANOVA dos factores: factor condición de las hembras: $F_{(1; 34)} = 0,37$, $P = 0,54$; Factor salinidad: $F_{(2; 34)} = 11,36$, $P < 0,001$; condición x salinidad: $F_{(2; 34)} = 2,53$; $P = 0,09$). Por lo tanto se realizó un pool con los datos correspondientes al tiempo de maduración ovárica para las hembras de LC que incubaron o perdieron sus embriones, respetando los tratamientos de salinidad. De manera similar, el tiempo de maduración ovárica de AV en 25 ‰ no se diferenció entre las hembras que incubaron o no una camada previa (Student test: $t = 0,0712$; $P = 0,94$), por lo que también se realizó un pool con los datos correspondientes al tiempo de maduración ovárica de las hembras de AV. Para las hembras de AV mantenidas en 1 y 15 ‰, la comparación entre la condición de las hembras no fue posible ya que el 100% de estas maduraron sus ovarios con embriones (Fig. 3.4b) o solo dos hembras completaron el ciclo ovárico sin embriones y una con embriones, respectivamente.

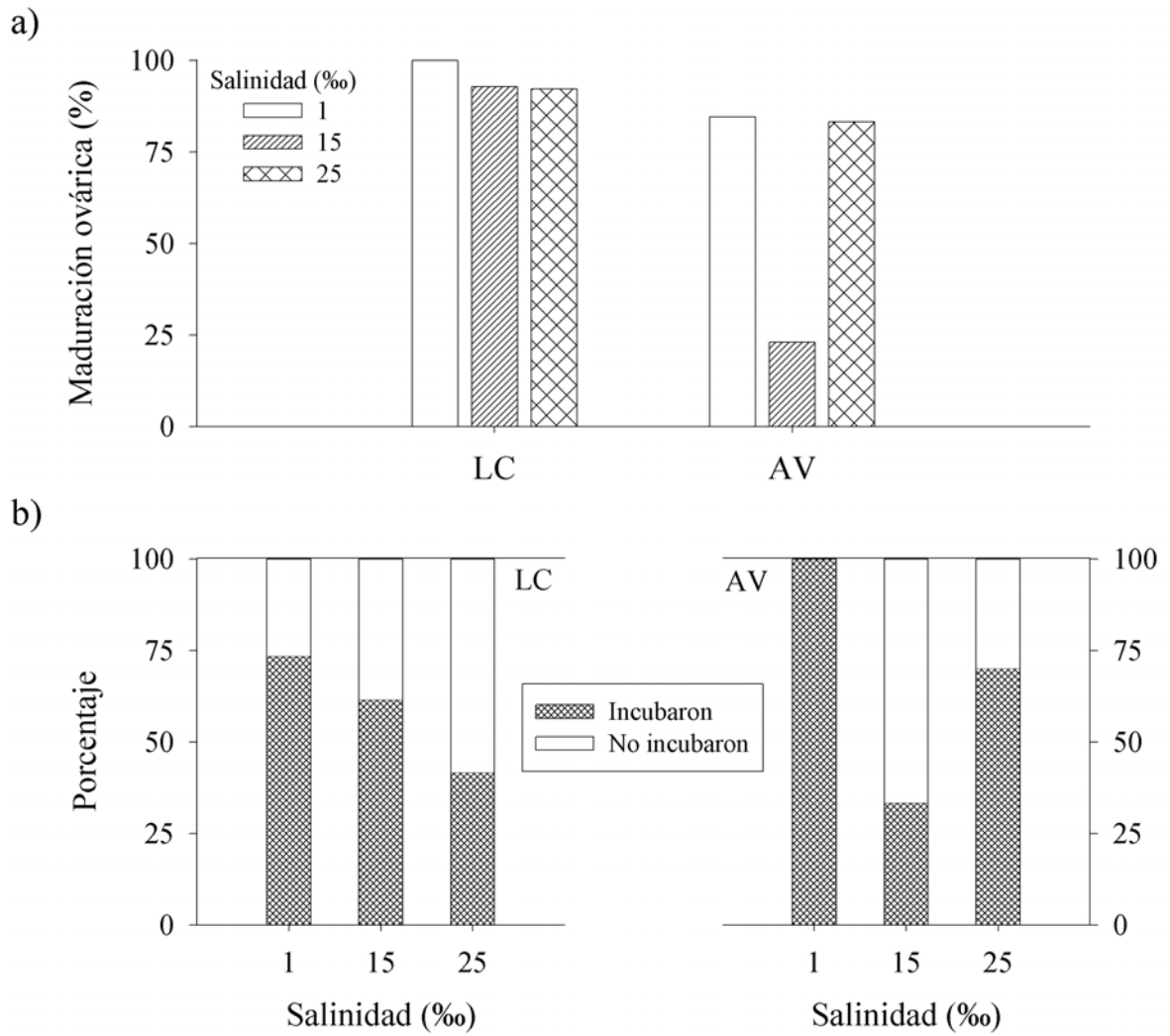


Figura 3.4. Hembras de *P. argentinus* que maduraron las gónadas en tres tratamientos de salinidad (1, 15 y 25 ‰). **a)** Porcentaje de las hembras que maduraron las gónadas y desovaron por segunda vez bajo las condiciones experimentales, **b)** Porcentaje de las hembras que maduraron las gónadas luego de haber incubado una camada previa de embriones (incubaron) y de aquellas que lo hicieron luego de haber perdido sus embriones (no incubaron).

Efectos de la salinidad sobre los periodos de descanso del ovario, para completar un ciclo ovárico y entre puestas sucesivas

El periodo entre la puesta de la primera camada de embriones y el inicio de la maduración ovárica, esto es entre los Estadios 0 y I del ciclo del ovario, fue significativamente afectado por los tratamientos de salinidad, y no se detectaron diferencias entre las poblaciones ni en la interacción de los factores (Tabla 3.1a; Fig. 3.5a). El tiempo de descanso del ovario fue significativamente más corto en 1 ‰ (días, media \pm ES: 26,44 \pm 0,67) que en las salinidades concentradas (33,79 \pm 1,41) (HSD, $P < 0,01$).

El periodo en que se completó un ciclo ovárico, considerado como el lapso transcurrido entre el Estadio I del ovario y la puesta de la segunda camada de huevos en el laboratorio, también fue significativamente afectado por los tratamientos de salinidad, en tanto que no se detectaron diferencias entre las poblaciones ni en la interacción de los factores (Tabla 3.1b; Fig. 3.5b). El tiempo medio en que se completó un ciclo ovárico fue significativamente más corto en 1‰ (días, media \pm ES: 16,33 \pm 0,76) que en las salinidades concentradas (19,35 \pm 0,66) (HSD, $P < 0,05$).

De la misma manera, el periodo entre puestas fue significativamente afectado por los tratamientos de salinidad, mientras que no se detectaron diferencias entre las poblaciones ni en la interacción de los factores (Tabla 3.1c; Fig. 3.5c). El tiempo entre puestas fue significativamente más corto en 1 ‰ (días, media \pm ES: 42,78 \pm 1,09) que en los tratamientos de salinidad concentrada (52,26 \pm 1,51) (HSD, $P < 0,05$).

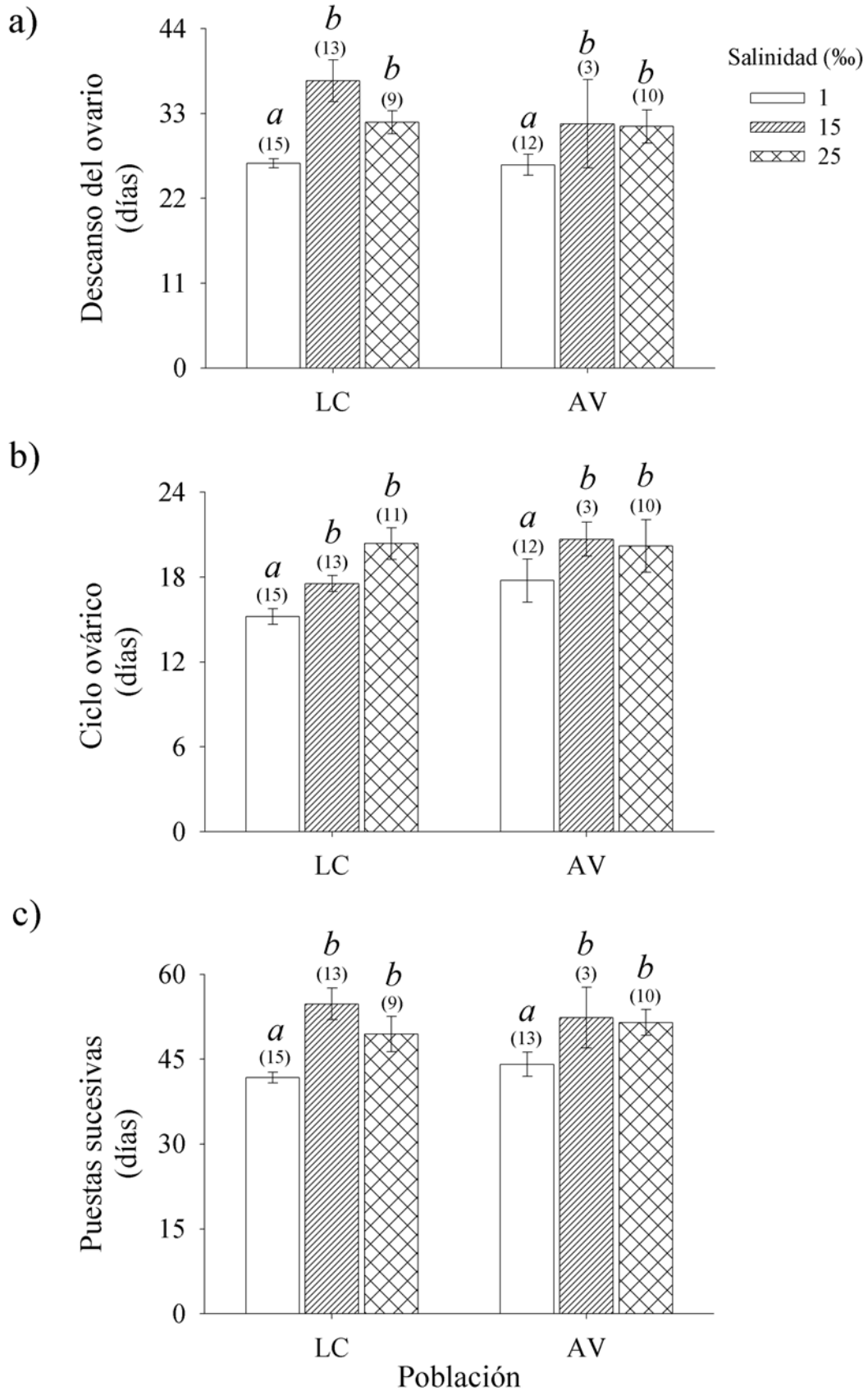


Figura 3.5. Características del ciclo reproductivo de *P. argentinus* de las poblaciones de Chascomús (LC) y Vivotatá (AV) en tres tratamientos de salinidad (1, 15 y 25 ‰). Tiempo (media \pm ES) **a)** entre los Estadios 0 y I del ciclo ovárico, **b)** en completar la maduración ovárica, **c)** entre puestas sucesivas. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos; los números entre paréntesis indican el número de hembras.

Tabla 3.1. ANOVA de dos factores con una aproximación por regresión para evaluar las diferencias en el tiempo a) de descanso del ovario, b) para completar un ciclo del ovario, c) entre puestas sucesivas entre los tratamientos de salinidad (tres niveles: 1, 15, y 25 ‰) y las poblaciones (dos niveles: LC y AV). En negrita se resalta el efecto significativo.

Fuente de Variación	SC	<i>g.l.</i>	CM	<i>F</i>	<i>P</i>
a) Salinidad	5,6 x 10 ⁻⁴	2	2,8 x 10 ⁻⁴	8,95	< 0,001
Población	6,3 x 10 ⁻⁵	1	6,3 x 10 ⁻⁵	2,01	0,16
Población x Salinidad	3,0 x 10 ⁻⁵	2	1,5 x 10 ⁻⁵	0,49	0,62
Error	1,7 x 10 ⁻³	54	3,1 x 10 ⁻⁵		
b) Salinidad	1,9 x 10 ⁻³	2	9,4 x 10 ⁻⁴	8,97	< 0,001
Población	2,9 x 10 ⁻⁴	1	2,9 x 10 ⁻⁴	2,74	0,10
Población x Salinidad	3,3 x 10 ⁻⁴	2	1,6 x 10 ⁻⁴	1,58	0,21
Error	6,1 x 10 ⁻³	58	1,0 x 10 ⁻⁴		
c) Salinidad	1,9 x 10 ⁻⁴	2	9,9 x 10 ⁻⁵	8,22	< 0,001
Población	3,5 x 10 ⁻⁶	1	3,5 x 10 ⁻⁶	0,29	0,59
Población x Salinidad	6,7 x 10 ⁻⁶	2	3,3 x 10 ⁻⁶	0,28	0,76
Error	6,7 x 10 ⁻⁴	56	1,2 x 10 ⁻⁵		

SC: suma de cuadrados; *g.l.*: grados de libertad; CM: cuadrado medio; *F*: CM factor / error; *P*: probabilidad. Datos transformados con 1/días.

DISCUSIÓN

Las hembras de los carideos experimentan una muda previa a la puesta de los huevos mediante la cuál las setas de los pleópodos que se han roto son reemplazadas, y en el caso de aquellas que hubieran tenido una camada previa las membranas de los huevos que eclosionaron son eliminadas (Bauer, 2004). Inmediatamente luego de la muda de pre-puesta (o parturial) las hembras están receptivas para el próximo apareamiento, puesta de huevos e incubación de una nueva camada de embriones (Bauer & Abdalla, 2000). En la mayoría de los carideos la fertilización no es necesaria para que los huevos se adhieran a los pleópodos, sin embargo los huevos no fertilizados serán removidos posteriormente (Bauer & Holt, 1998; Bauer, 2004). La pérdida de los huevos observada en *P. argentinus* al inicio del experimento podría relacionarse con una falla en la fertilización. Además, como se ha demostrado en una especie similar a la de este estudio, *P. pugio*, el estrés físico por manipular las hembras puede afectar la supervivencia embrionaria (Reinsel *et al.*, 2001). Por lo que también es posible que la manipulación de los camarones durante el cambio de agua, por ejemplo, haya provocado una situación estresante que afectara la supervivencia embrionaria. Ambos hechos explicarían que el éxito en la incubación de la primera camada en ambas poblaciones haya sido independiente de los tratamientos de salinidad.

La tasa de supervivencia de las hembras de ambas poblaciones fue similar en los tratamientos de 1 y 15 ‰, mientras que una disminución significativa fue detectada para AV en 25 ‰ respecto de las salinidades más bajas. Sin embargo, en AV la regresión de los ovarios ocurrió en la salinidad intermedia (15 ‰) pero un alto porcentaje de maduración de los ovarios ocurrió en la salinidad más concentrada (25 ‰), sugiriendo que las hembras de AV pudieron ser más sensibles a factores diferentes de la salinidad. En el campo se encontraron camarones de AV infestados con bopíridos adultos en el canal branquial (Fig. 3.6), esto nunca se observó en LC. El camarón *P. argentinus* es el hospedador definitivo de

dos especies de bopíridos: *Probopyrus cf. oviformis* y *P. ringueleti* n. sp. (Schuldt & Damborenea, 1988; Verdi & Schuldt, 1988). En particular *P. ringueleti* puede afectar la tasa de consumo de oxígeno y también el metabolismo de *P. argentinus* (Neves *et al.*, 2000; 2004). A pesar que en el experimento no se utilizaron camarones de AV infestados con isópodos adultos, las larvas de estos parásitos son intratisulares (Martorelli & Schuldt, 1990) por lo que pudieron no observarse a simple vista. Los isópodos bopíridos pueden inhibir la maduración de las gónadas en las hembras de los camarones carideos (Calado *et al.*, 2005), y se ha demostrado que pueden reducir la tolerancia de los camarones a la salinidad (Moles & Pella, 1984).

Además, *P. argentinus* es hospedador intermediario de las larvas metacercarias de distintas especies de digeneos, por ejemplo: *Microphallus szidati*; *Levinseniella cruzi* (Microphallidae) y *Phyllodistomum sp.* (Martorelli & Schuldt, 1990). En particular, las larvas de *L. cruzi* se alojan en los tejidos conectivos del cefalotórax y gonadal de *P. argentinus*, y una alta incidencia de larvas en el último tejido tendría consecuencias negativas sobre la fecundidad de este camarón (Martorelli & Schuldt, 1990). Actualmente, no existen estudios comparativos entre poblaciones de *P. argentinus* estuariales y de agua dulce que evalúen la incidencia y/o el grado de infestación con ninguno de los parásitos mencionados anteriormente. Futuros experimentos podrían investigar si la menor tolerancia a la salinidad concentrada en la población de *P. argentinus* que habita el arroyo Vivoratá se vincula con la infestación con las larvas de alguno de esos parásitos. Igualmente interesante sería determinar cuáles son las características ambientales de los sitios estudiados que podrían propiciar una exposición diferencial de las poblaciones de *P. argentinus* a la influencia de los parásitos (véase Pung *et al.*, 2002; 2006).

En general, la salinidad afectó de manera similar a las hembras de ambas poblaciones. La exposición prolongada en las salinidades concentradas (15, 25 ‰) no impusieron una severa restricción a la supervivencia ni a la reproducción del “camarón de agua dulce” *P.*

argentinus. En cambio, esas salinidades provocaron un retraso tanto en el inicio de un ciclo del ovario como en el tiempo en que se completó dicho ciclo; en consecuencia el tiempo entre puestas de huevos sucesivas fue más extenso. El menor tiempo entre puestas ocurrido en la salinidad más baja sugiere la producción de un número mayor de camadas por estación reproductiva, lo que incrementaría el *fitness* de las hembras. En ese sentido, los resultados indican que la salinidad más baja fue la condición óptima para la reproducción de los individuos de ambas poblaciones.

En los crustáceos decápodos, los efectos de factores tales como la temperatura y el fotoperíodo sobre el desarrollo de los ovarios han sido ampliamente investigados (ejemplos Wolcott, 1988; Bouchon 1991; Daniels *et al.*, 1994). Por el contrario, es escasa la información existente respecto de los efectos de la salinidad sobre el proceso de vitelogénesis. En tal sentido, *P. argentinus* podría ser un modelo conveniente para examinar los efectos de las altas concentraciones iónicas sobre el proceso de síntesis del vitelo. A un nivel bioquímico, otro aspecto interesante a estudiar es el/los rol/es de los iones (por ejemplo Ca^{+2} y Mg^{+2} ; véase Zalizniak *et al.*, 2006) en el anabolismo del vitelo.

Lowe & Provenzano (1990) realizaron uno de los pocos estudios donde se analizan en condiciones de laboratorio los efectos de la salinidad sobre la reproducción en un palemónido norteamericano de agua dulce: *Palaemonetes paludosus*. Los autores demostraron que la reproducción de *P. paludosus* tiene lugar en salinidades <20 ‰, aunque la puesta de los huevos no tiene lugar en 25 ‰ e incluso se reduce notablemente en 10 ‰. Es interesante notar que *P. paludosus* tiene un desarrollo larval abreviado, el cuál es característico de las especies de palemónidos dulceacuícolas, y comparativamente se reproduce en un rango más estrecho de salinidades que *P. argentinus* (el cuál tiene un desarrollo larval extendido, típico de las especies marino-salobres).

En la Laguna de Chascomús (LC) el valor promedio histórico de salinidad más alto documentado en la última década corresponde a uno de los periodos de sequía en la región

(en 1999), siendo ese valor de 1.474,6 mg/l (~ 1,5 ‰) (Maizels *et al.*, 2003 y citas allí). En el arroyo Vivoratá, la salinidad supera en ocasiones ese valor (ver materiales y métodos), y además es más variable temporal y espacialmente (Capítulo II). De cualquier modo, la salinidad promedio en ambos sitios no alcanza los valores más concentrados utilizados en este experimento (15 y 25 ‰) al menos por periodos prolongados, o en el caso de Chascomús, esas salinidades no ocurren frecuentemente. Por lo tanto, la elevada tasa de supervivencia y capacidad de reproducción de *P. argentinus* bajo las condiciones hiperosmóticas no tiene un correlato con las condiciones ecológicas de los sitios donde fue recolectado y en cambio podría vincularse con la historia evolutiva reciente de la especie. Hechos tales como que *P. argentinus* pueda reproducirse con éxito en un amplio rango de salinidades (este estudio), que el desarrollo larval sea extendido (Menú-Marque, 1973), y además que las larvas alcancen la metamorfosis en el mismo rango de salinidades que los ensayados en este experimento (Anger sin publicar) apoyan la hipótesis que la especie es un residente reciente de los ambientes de agua dulce.



Figura 3.6. Hembra de *P. argentinus* procedente del Arroyo Vivoratá (AV), la flecha señala un isópodo bopírido en el canal branquial.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La capacidad de *P. argentinus* para sobrevivir y reproducirse en salinidades concentradas podría vincularse con las condiciones a las que estuvo expuesto en su pasado reciente.

Las condiciones hiper-osmóticas provocaron un retraso tanto en el inicio como en el tiempo en que se completó un ciclo ovárico, y en consecuencia el tiempo entre puestas sucesivas fue más extenso. Sin embargo, esas condiciones no restringieron la reproducción. Los mecanismos fisiológicos - bioquímicos que le permiten a este camarón sobrevivir y reproducirse en salinidades concentradas podrían investigarse en el futuro.

La hipótesis que la infestación con parásitos (bopíridos y/o metacercarias de digeneos) afecta la tolerancia a la salinidad de *P. argentinus* podría evaluarse en el futuro.

Dados su fácil manejo y su plasticidad reproductiva, *P. argentinus* sería un modelo de estudio conveniente para examinar a un nivel bioquímico los efectos de las salinidades concentradas y el/los rol/es de los iones tales como el Ca^{+2} y el Mg^{+2} en el proceso de vitelogénesis.

CAPÍTULO IV

**TAMAÑO DE HUEVOS, INCUBACIÓN E INVERSIÓN REPRODUCTIVA
DEL “CAMARÓN DE AGUA DULCE” *Palaemonetes argentinus*:
DIFERENCIAS INTERPOBLACIONALES Y EFECTOS DE LA SALINIDAD**

INTRODUCCIÓN

Comprender la historia de vida de un organismo implica el estudio de los patrones de diferenciación, desarrollo, crecimiento, división de recursos y en particular de su modo de reproducción (Begon *et al.*, 2006). La aproximación típica para evaluar las variaciones en los rasgos de historia de vida es comparar dos ó más poblaciones de conespecíficos (o especies, o grupos de especies) y tratar de entender de qué manera las diferencias entre ellas se relacionan con su ambiente (Radder, 2006). Uno de los desafíos de ésta clase de estudios es identificar qué factores contribuyen potencialmente a la variabilidad interpoblacional e interindividual en los fenotipos de historia de vida. Otro, es determinar si esa variabilidad es el producto de una diferencia genética y/o de una respuesta plástica de los individuos a las condiciones ambientales (véase Reznick, 1982; Hancock *et al.*, 1998; Sears & Angilletta, 2003; Arendt & Reznick, 2005). Aunque la manera en que los fenotipos se vinculan con el ambiente se expresa de manera compleja (Sears & Angilletta, 2003), un número creciente de estudios utilizando técnicas experimentales de manipulación han intentado esclarecer la potencial contribución de la genética y/o de los cambios inducidos por las condiciones ambientales a la variabilidad interpoblacional en los rasgos de historia de vida (ejemplos, Qualls & Shine, 1998; Hancock *et al.*, 1998; Lardies & Bozinovic, 2006).

En la mayoría de los organismos, y particularmente en los crustáceos decápodos, el tamaño de los huevos (tanto en volumen como en peso) es uno de los rasgos mejor investigado puesto que puede correlacionarse con otros caracteres de historia vida como por ejemplo el número de huevos, el tiempo de incubación de los embriones, el número y tipo de estadios larvales y el tamaño del juvenil (ejemplos, Wear, 1974; Steele, 1977; Sastry, 1983; Bauer, 1991; Anger *et al.*, 2002; Anger, 2005). Variaciones en el tamaño de los huevos entre poblaciones de conespecíficos han sido ampliamente documentadas en decápodos, especialmente en los camarones carideos de la familia Palaemonidae (Mashiko, 1982; 1983a;

1987; 1990; Mashiko & Numachi, 1993; 2000; Odinetz Collard & Rabelo, 1996; Ituarte *et al.*, 2007). Los camarones palemónidos se encuentran ampliamente distribuidos y existen poblaciones de conoespecíficos que viven tanto en ambientes marinos y salobres como en los de agua dulce. En consecuencia, representan interesantes modelos para el estudio de los efectos de la salinidad sobre la variación interpoblacional en los rasgos de historia de vida, como por ejemplo sobre el tamaño de los huevos.

En el caso de *P. argentinus* se encontró que diversos rasgos de historia de vida varían marcadamente entre poblaciones con distinto grado de aislamiento del mar (Capítulo II). La fecundidad, estimada como el número de huevos recientemente desovados, es mayor en una población donde la concentración iónica y salina del agua es débil pero significativamente más alta (población del arroyo Vivoratá, AV), y menor en otros ambientes donde la concentración iónica es más baja (como por ejemplo en Chascomús, LC) (Capítulo II). La salinidad, entonces, podría ser uno de los factores que afectan el tamaño inicial de los huevos determinando la diferencia en el número de huevos recientemente desovados. Además, en la población de AV donde la fecundidad es mayor, la pérdida de embriones es mínima (y viceversa) (Capítulo II). El incremento del volumen de los huevos durante el desarrollo embrionario, así como una variación en el periodo de incubación pueden modificar el riesgo de mortalidad de los huevos en los decápodos (véase Oh & Hartnoll, 1999), y en consecuencia determinar el número de embriones que alcanzan con éxito la eclosión.

Aunque existen diversos factores bióticos y abióticos que posiblemente expliquen las diferencias mencionadas entre las poblaciones de *P. argentinus* de AV y de LC (Capítulos II y III), en este experimento se manipuló únicamente el factor salinidad. Las hipótesis de este estudio son *a)* el tamaño inicial de los huevos depende de las condiciones de salinidad bajo las que ocurre la maduración ovárica y *b)* la salinidad afecta el tiempo de incubación de los embriones. Para poner a prueba esas hipótesis, se estudiaron los efectos de la salinidad sobre el tamaño de los huevos en un estadio inicial del desarrollo y sobre el periodo de incubación

entre las poblaciones de *P. argentinus* de AV y de LC. Además, los efectos de la salinidad sobre el esfuerzo reproductivo también fueron comparados. La predicción de esas hipótesis es que bajo condiciones controladas de laboratorio los efectos de la salinidad sobre los rasgos estudiados serán similares en ambas poblaciones.

Las poblaciones de *P. argentinus* utilizadas para este estudio (AV y LC) están geográficamente separadas, presentan distinto grado de aislamiento del mar, y habitan en ambientes con características hidrológicas contrastantes (véase descripción detallada en Capítulo II). Sucintamente, el Arroyo Vivoratá (AV) desemboca en la laguna costera Mar Chiquita dónde las fluctuaciones de salinidad son altamente variables tanto temporal como espacialmente, el sitio de muestreo se ubica aproximadamente a 3 km de la costa, y es un ambiente lótico. Mientras que la Laguna de Chascomús (LC) es una típica laguna pampeana con salinidad relativamente baja y estable, ubicada a unos 70 km en línea recta del mar y por lo tanto no está expuesta a la influencia marina, y es un ambiente léntico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Hembras con los ovarios completamente maduros y machos fueron recolectados en el inicio de la estación reproductiva en ambos sitios (21/09/05 en LC; 19/11/05 en AV) y trasladados en agua de los sitios de origen al laboratorio. La salinidad y la temperatura del agua de los sitios de muestreo fueron medidos con un refractómetro y un termómetro de alcohol, con los siguientes valores en LC, 1 ± 0 ‰, $16,9 \pm 0,37^{\circ}$ C, y en AV, $2,4 \pm 0,8$ ‰ y $23,5 \pm 0,44^{\circ}$ C (media \pm sd; $n = 5$ medidas).

En el laboratorio los camarones fueron separados en machos y hembras, conformando una pareja reproductiva. Las parejas se mantuvieron en recipientes plásticos de 500 ml perforados con circulación de agua común (Fig. 3.1a); aireación; temperatura y fotoperíodo constantes $21 \pm 2^{\circ}$ C y 14 h luz : 10 h oscuridad. Cada recipiente estuvo cubierto con pequeñas piedras hasta una profundidad de 1 cm aproximadamente, y una valva de bivalvo fue ofrecida como refugio (Fig. 3.1a). Un total de 90 parejas se mantuvieron en tres tratamientos de salinidad: 1, 15 y 25 ‰ (15 parejas por tratamiento, 45 por población). El agua para los cultivos se preparó diluyendo agua de mar filtrada (papel de filtro Schleicher and Schuell 0859, tamaño poro 7-12 μ m) con agua de canilla previamente declorada. Los camarones fueron aclimatados por un período de 2 h en 1, 5 y 10 ‰ antes de ser transferidos a la condición final de 15 ‰, aquellos asignados al tratamiento de salinidad más alto fueron aclimatados por otras 2 h en 15 ‰ antes de ser transferidos a 25 ‰. Los camarones fueron alimentados diariamente con *Artemia* spp., alimento para peces TetraMin Pro[®], con alto contenido en lípidos y proteínas (12 y 46%, respectivamente), y cada 2 semanas se adicionó a la dieta tentáculos de calamar fresco. El exceso de comida fue removido regularmente y el agua de los cultivos fue reemplazada cada 3-4 días.

Cada día por la mañana cada pareja fue revisada y se registró la presencia de hembras con huevos, eclosiones larvales y maduración de las gónadas. El periodo de incubación (o duración del desarrollo embrionario *in vivo*) se estimó como el tiempo transcurrido entre la primera puesta de embriones hasta la eclosión de todas las larvas. Posteriormente, se obtuvieron el número, volumen y el peso seco de los huevos producidos bajo similares condiciones de maduración de los ovarios. El eje mayor (l) y menor (h) de un total de 10 huevos por hembra en el estadio inicial, tomados al azar, fueron medidos con lupa binocular Olympus SZ40 (aumento 4x). El volumen se calculó con la fórmula para un elipsoide $V = (\pi \cdot l \cdot h^2 / 6)$. El largo del caparazón (Lc) de las hembras también fue registrado. Los huevos y las hembras fueron cuidadosamente escurridos y secados en estufa durante 24 y 48 h, respectivamente y pesados en una balanza Mettler H54 AR. El peso seco por huevo se estimó como el peso seco de la biomasa de la camada / número de huevos. La inversión de las hembras en reproducción se estimó como la razón entre peso seco de la masa de huevos / peso seco de la hembra (Clarke *et al.*, 1991).

ANÁLISIS DE DATOS

Los efectos de la salinidad (con tres niveles: 1, 15 y 25 ‰) y de las poblaciones (dos niveles: LC y AV) sobre el tiempo de incubación, el peso seco por huevo, el volumen de los huevos por camada y el esfuerzo reproductivo se evaluaron con ANOVAs de dos vías utilizando una aproximación por regresión (Zar, 1996). Cuando un ANOVA detectó diferencias significativas en algunos de los factores, las medias fueron comparadas con el test de Tukey (o *honestly significant difference test*, HSD) para tamaños de muestras desiguales (Zar, 1996). Los datos correspondientes a la relación peso seco / volumen de huevos (PS / V) no cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad de las varianzas. Por eso, dicha relación fue comparada entre los tratamientos de salinidad con ANOVAs de un factor para cada población, y las diferencias entre las salinidades fueron comparadas con el

test *a posteriori* de Student-Newman-Keuls (SNK) (Underwood, 1997). Finalmente, la relación PS / V fue comparada entre las poblaciones, para un mismo nivel de salinidad, con el test de Student que supone varianzas desiguales.

Las variaciones de los volúmenes de los huevos recientemente extrudidos entre las camadas fueron evaluadas con ANOVAs de un factor para cada una de las salinidades experimentales. La relación entre el volumen promedio de los huevos de una camada y el largo del caparazón (*Lc*) de las hembras fue evaluada por medio de una regresión lineal.

Las relaciones entre el peso seco de la camada vs el peso seco de las hembras, y entre peso seco de las hembras vs el largo del caparazón se evaluaron con regresiones lineales. Las variaciones en el peso seco de las camadas fueron comparadas entre las poblaciones y las salinidades con ANCOVAs, utilizando el peso seco de las hembras como covariable. El mismo test se utilizó para comparar el peso seco de las hembras entre poblaciones y salinidades con el largo del caparazón como covariable.

RESULTADOS

Tiempo de incubación

Todas las hembras capturadas en el campo con sus ovarios maduros desovaron en el laboratorio, aunque no todas incubaron con éxito esa primera camada (Capítulo III). El tiempo de incubación de los embriones difirió significativamente entre las poblaciones, y no se detectó un efecto significativo de la salinidad sobre este rasgo (Tabla 4.1). Los embriones de LC eclosionaron en promedio 2,7 días después que los de AV (Fig. 4.1). El tiempo medio de incubación (días \pm ES) fue $26,6 \pm 0,19$ en LC y $23,8 \pm 0,3$ en AV. El rango para el periodo de incubación fue menor en LC (25-28 días) que en AV (21-27 días). En consecuencia, los coeficientes de variabilidad en AV fueron 4,87; 5,35 y 7,14 % en 1, 15 y 25 ‰, respectivamente, esos valores representan alrededor de una vez y media al doble de la

variabilidad observada en LC (3,66; 2,93 y 3,31 % en 1, 15 y 25 ‰, respectivamente). A pesar que no se detectó un efecto de los tratamientos, el tiempo de incubación tendió a incrementarse con la salinidad en ambas poblaciones (Fig 4.1). Particularmente en AV, el tiempo de incubación en 1 ‰ fue alrededor de un 1 día más corto que en las salinidades concentradas (Fig 4.1).

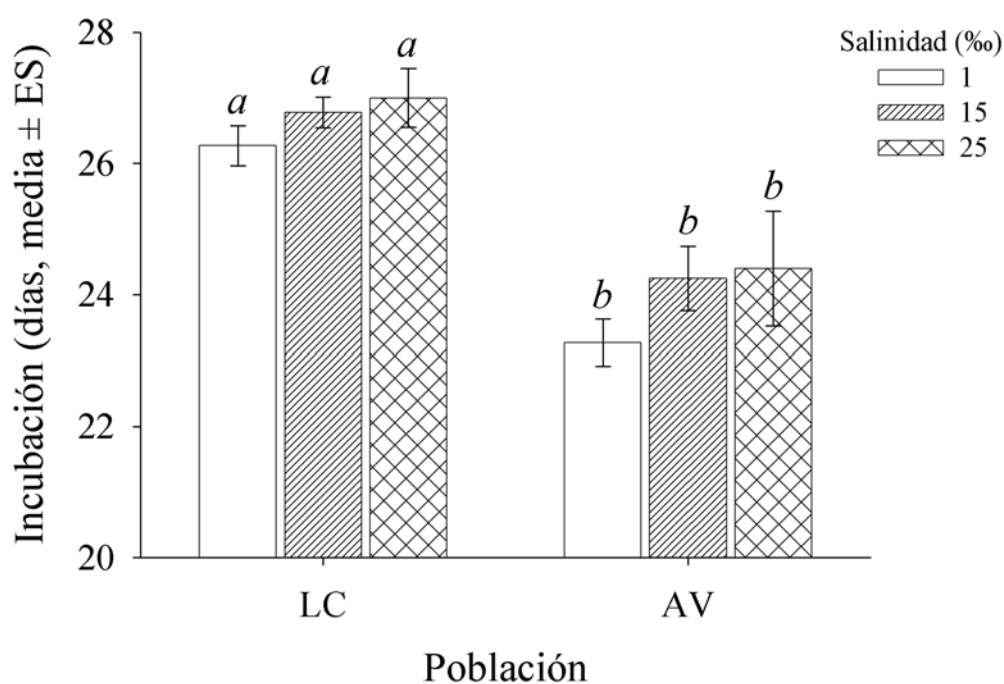


Figura 4.1.- Tiempo de incubación para los embriones de Chascomús (LC) y Vivotará (AV) en los tres tratamientos de salinidad. El tamaño de las muestras fue $n = 11, 9, 5$ camadas para LC y $n = 11, 8, 5$ para AV en 1, 15 y 25 ‰, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas (HDS $P < 0,05$).

Tabla 4.1. Estadísticos del ANOVA de dos factores con una aproximación por regresión para evaluar las diferencias en el tiempo de incubación entre las poblaciones (LC y AV) y las salinidades (1, 15 y 25 ‰). En negrita se resalta el efecto significativo.

Fuente de Variación	SC	g.l.	CM	F	P
Población	80,76	1	80,76	55,46	< 0,0001
Salinidad	8,17	2	4,08	2,80	= 0,07
Población x Salinidad	0,61	2	0,30	0,21	= 0,81
Error	62,62	43	1,46		

SC: Suma de Cuadrados; g.l.: grados de libertad; CM: Cuadrados Medios; F: estadístico del test; P: probabilidad de error.

Tamaño de los huevos

El tamaño de los huevos recientemente desovados y producidos bajo similares condiciones de maduración del ovario se estimó como el peso seco por huevo, el largo promedio de los ejes largo y corto, y el volumen calculado a partir de los datos anteriores.

El peso seco por huevo no fue afectado por los tratamientos de salinidad, sin embargo este rasgo fue débil pero significativamente diferente entre las poblaciones (Tabla 4.2). Los huevos de LC fueron en promedio significativamente más pesados que los de AV (HSD, $P = 0,03$) (Fig. 4.2a).

El largo promedio de los ejes largo y corto de los huevos producidos bajo similares condiciones de maduración del ovario se describe en la Tabla 4.3. Ambos parámetros fueron significativamente afectados por los tratamientos de salinidad, no se detectaron diferencias entre las poblaciones (Tabla 4.4a, b). Los ejes largo y corto de los huevos producidos en las salinidades concentradas (15 y 25 ‰) fueron significativamente más cortos que en 1 ‰ (Tabla 4.3). El volumen inicial de los huevos difirió significativamente entre las camadas dentro de cada población (Tabla 4.5), en ningún caso esa variación se correlacionó con el tamaño de las hembras (todas las regresiones $P > 0,05$) (Fig. 4.3). A pesar de la variabilidad entre las camadas, la salinidad afectó significativamente el volumen de los huevos, no se detectaron diferencias entre las poblaciones ni en la interacción de los factores (Tabla 4.4c). Las hembras mantenidas en los tratamientos de salinidad concentrada (15, 25 ‰) produjeron huevos de un volumen promedio significativamente más pequeño que aquellas mantenidas en el tratamiento de salinidad más baja (HDS, $P < 0,001$) (Fig. 4.2b).

La relación peso seco por huevo / volumen inicial (mg / mm^3) fue significativamente afectada por los tratamientos de salinidad (ANOVAs un factor, LC: $F_{(2; 29)} = 13,96$; $P < 0,0001$; AV: $F_{(2; 18)} = 35,19$; $P < 0,0001$). Dicha relación fue significativamente más alta en los tratamientos de salinidad concentrada respecto del de 1 ‰ (SNK, $P < 0,001$). Para

ninguno de los tratamientos se detectaron diferencias entre las poblaciones (Test de Student para 1 %: $t = 0,75$; $P = 0,46$; para 15 %: $t = 0,18$; $P = 0,86$; para 25 %: $t = -0,42$; $P = 0,68$) (Fig. 4.2c).

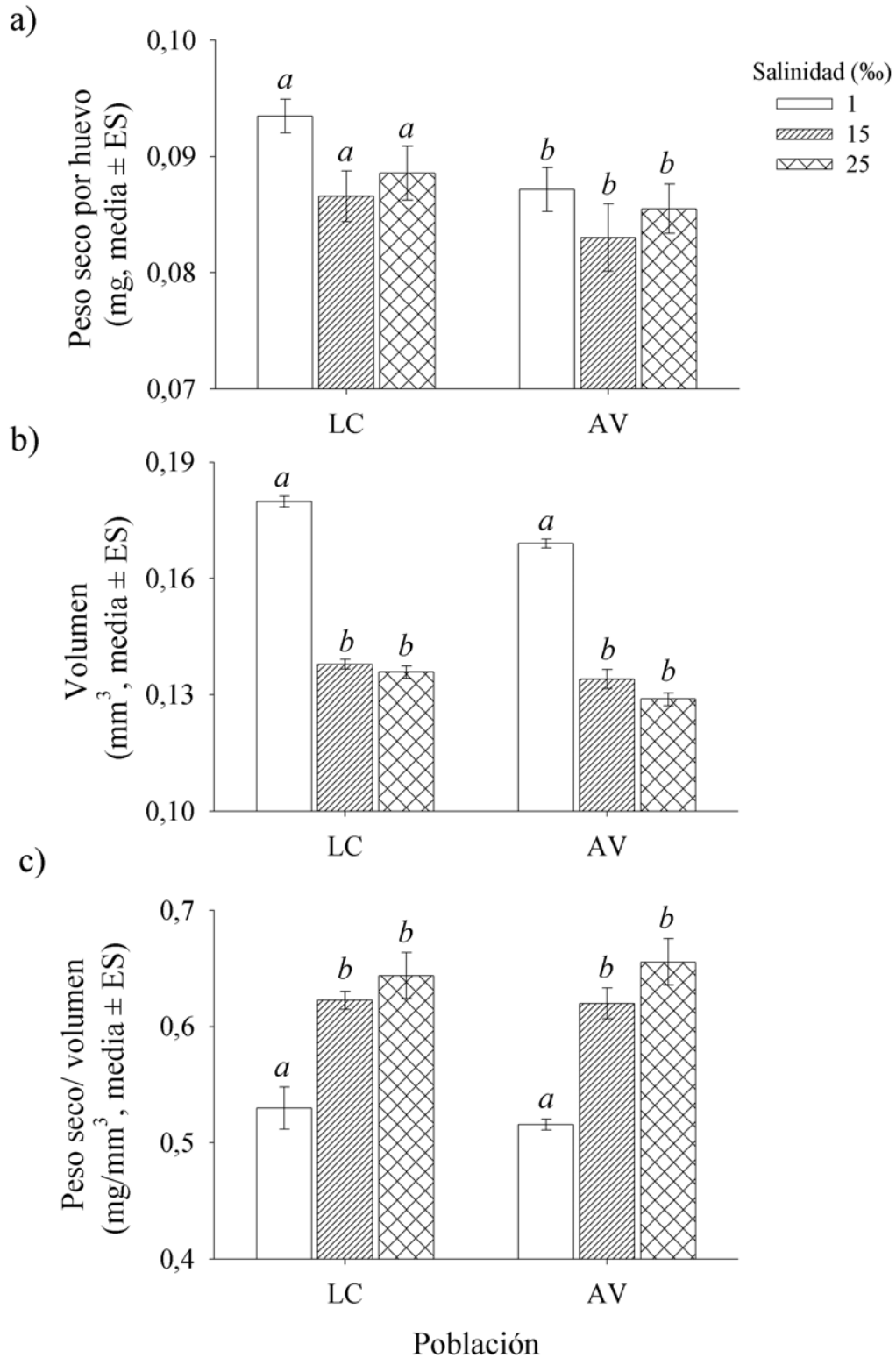


Figura 4.2.- Tamaño de los huevos producidos por *P. argentinus* provenientes de ovarios desarrollados en tres tratamientos de salinidad. a) peso seco por huevo b) volumen inicial de los huevos, c) relación peso seco / volumen. (LC) Chascomús y Vivotatá (AV). Letras distintas indican diferencias significativas.

Tabla 4.2. Estadísticos del ANOVA de dos factores (población: LC y AV; salinidades: 1, 15 y 25 ‰) con una aproximación por regresión para evaluar la diferencia en el peso seco por huevo (mg) provenientes de ovarios madurados en condiciones de laboratorio. En negrita se resalta el efecto significativo. LC: $n = 12$; 12; 8 y AV: $n = 10$; 3; 8, en 1, 15 y 25 ‰ respectivamente.

Fuente de Variación	SC	<i>g.l.</i>	CM	<i>F</i>	<i>P</i>
Población	0,0002	1	0,0002	5,07	= 0,029
Salinidad	0,0002	2	0,0001	2,95	= 0,062
Salinidad x Población	$2,8 \times 10^{-5}$	2	$1,4 \times 10^{-5}$	0,36	= 0,70
Error	0,002	47	$3,88 \times 10^{-5}$		

SC: Suma de Cuadrados; *g.l.*: grados de libertad; CM: Cuadrados Medios; *F*: estadístico del test; *P*: probabilidad de error.

Tabla 4.3. Tamaño de los huevos recientemente desovados de *P. argentinus* provenientes de ovarios madurados en condiciones de laboratorio. *n*: número de huevos medidos (10 huevos por camada). Letras distintas indican diferencias significativas entre salinidades (HDS $P < 0,01$ y $P < 0,001$ para los ejes largo y corto, respectivamente).

Tamaño de los huevos	Población	Salinidad (‰)		
		1	15	25
Eje largo (mm) media ± ES (rango) (n)	Chascomús (LC)	0,897 ± 0,0036 ^a (0,8 – 1,025) (150)	0,864 ± 0,0044 ^b (0,7 – 0,975) (110)	0,855 ± 0,0061 ^b (0,65 – 0,975) (100)
	Vivoratá (AV)	0,883 ± 0,0036 ^a (0,775 – 1) (130)	0,831 ± 0,0085 ^b (0,75 – 0,90) (30)	0,841 ± 0,0048 ^b (0,725 – 0,95) (100)
Eje corto (mm) media ± ES (rango) (n)	Chascomús (LC)	0,619 ± 0,0020 ^a (0,525 – 0,625) (150)	0,552 ± 0,0027 ^b (0,475 – 0,625) (110)	0,551 ± 0,0030 ^b (0,226 – 0,391) (100)
	Vivoratá (AV)	0,604 ± 0,0019 ^a (0,575 – 0,650) (130)	0,555 ± 0,0039 ^b (0,525 – 0,600) (30)	0,541 ± 0,0032 ^b (0,226 – 0,360) (100)

Tabla 4.4. Estadísticos de los ANOVAs de dos factores (población: LC y AV; salinidades: 1, 15 y 25 ‰) para la comparación del tamaño de los huevos de *P. argentinus* provenientes de ovarios madurados en condiciones de laboratorio. a) eje largo, b) el eje corto, c) volumen. En negrita se resalta el efecto significativo. Tamaño de las muestras ver Tabla 4.3.

Fuente de variación	SC	g.l.	CM	F	P
a) Población	0,005	1	0,005	3,57	= 0,064
Salinidad	0,024	2	0,012	8,81	< 0,0001
Población x salinidad	0,0008	2	0,0004	0,27	= 0,76
Error	0,077	56	0,0014		
b) Población	0,0006	1	0,0006	1,23	= 0,27
Salinidad	0,055	2	0,028	59,36	< 0,0001
Población x salinidad	0,0005	2	0,0003	0,57	= 0,57
Error	0,026	56	0,0005		
c) Población	0,022	1	0,0006	3,37	= 0,071
Salinidad	0,0006	2	0,011	64,99	< 0,0001
Población x salinidad	0,00009	2	4,94 x 10 ⁻⁵	0,28	= 0,75
Error	0,009	56	0,00017		

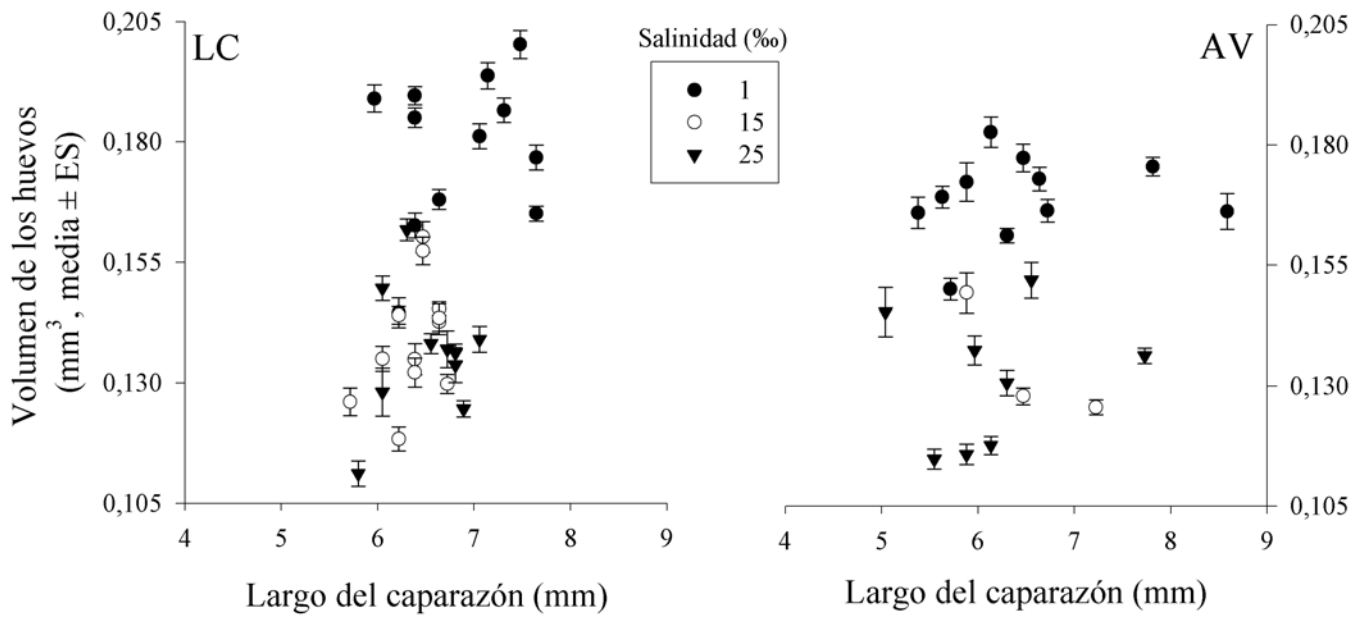


Figura 4.3. Tamaño de las madres y volumen de los huevos recientemente extrudidos provenientes de ovarios desarrollados en 1, 15 y 25 ‰. Chascomús (LC) y Vivotatá (AV). Los símbolos representan el volumen promedio de $n = 10$ huevos por camada \pm ES.

Tabla 4.5. ANOVAs de una vía para evaluar el volumen inicial de los huevos entre las camadas producidas por las hembras de las poblaciones de a) Laguna Chascomús (LC) y b) Arroyo Vivotatá (AV) en los tres tratamientos de salinidad (1, 15 y 25 ‰). En negrita se resaltan los efectos significativos. En b) los datos transformados con 1/volumen.

	Salinidad	Fuente de variación	SC	g.l.	CM	F	P
a)	1	Camada	0,035	14	0,0252	42,8	< 0,0001
		Error	0,008	135	5,9 x10 ⁻⁵		
	15	Camada	0,02	12	0,016	22,85	< 0,0001
		Error	0,008	117	6,9 x10 ⁻⁵		
	25	Camada	0,017	9	0,0018	20,73	< 0,0001
		Error	0,008	90	8,9 x10 ⁻⁵		
b)	1	Camada	0,008	10	0,0083	11,13	< 0,0001
		Error	0,007	99	7,43 x10 ⁻⁵		
	15	Camada	9,23	2	4,61	24,53	< 0,0001
		Error	5,08	27	0,188		
	25	Camada	56,5	9	6,28	21,07	< 0,0001
		Error	26,82	90	0,298		

Inversión reproductiva

1.- Esfuerzo reproductivo

La salinidad afectó significativamente el esfuerzo reproductivo (biomasa de huevos / biomasa hembra) y no se detectaron diferencias entre las poblaciones ni en la interacción de los factores (ANOVA factor salinidad: $F_{(2; 47)} = 3,63$; $P = 0,03$; factor población: $F_{(1; 47)} = 0,041$; $P = 0,84$; factor interacción: $F_{(2; 47)} = 0,4$; $P = 0,67$). La inversión en biomasa de huevos (como %; media \pm ES) fue $21,93 \pm 0,011$; $19,81 \pm 0,009$; $18,05 \pm 0,009$ en 1, 15 y 25 ‰, respectivamente. El esfuerzo reproductivo fue significativamente menor en 25 que 1 ‰ (HSD, $P = 0,04$), el valor intermedio encontrado en 15 ‰ no difirió de los otros tratamientos (HSD, $P > 0,05$).

2.- Biomasa de huevos

La inversión reproductiva en biomasa de huevos (peso seco de la camada) se correlacionó positivamente con el peso seco de las hembras (Tabla 4.6a). Para AV en 15 ‰ solo se obtuvieron resultados para tres camadas, siendo ese tamaño de muestra muy pequeño para establecer una regresión confiable. Además, como la diferencia en el esfuerzo reproductivo se detectó entre las salinidades extremas (1 vs 25 ‰ párrafo anterior), las regresiones entre el peso seco de la camada y el peso seco de las hembras fueron comparadas entre esas salinidades y las poblaciones. Las ordenadas de las regresiones difirieron significativamente entre las salinidades, pero no entre las poblaciones (ANCOVA con el peso seco de las hembras como covariable, factor salinidad: $F_{(1; 33)} = 4,86$; $P = 0,034$; factor población: $F_{(1; 33)} = 1,97$; $P = 0,09$; factor interacción: $F_{(1; 33)} = 0,00004$; $P = 0,9$). Para similar peso seco de las hembras, el peso seco de la camada de huevos fue significativamente menor en 25 que en 1 ‰ (HDS, $P = 0,003$) (Fig. 4.4).

Tabla 4.6. Ecuaciones de regresión para (a) la biomasa de la camada (*BC*) y el peso seco de las hembras (*PSH*); (b) el peso seco de las hembras (*PSH*) vs largo del caparazón (*Lc*) de Chascomús (LC) y Vivoratá (AV) al final del experimento en los tres tratamientos de salinidad
 * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$; n.t (no testeado).

		Población							
		Chascomús (LC)				Vivoratá (AV)			
Salinidad		Ecuación	<i>n</i>	r^2	<i>F</i>	Ecuación	<i>n</i>	r^2	<i>F</i>
a)	1	$BC = 0,180 \cdot PSH + 2,46$	12	0,40	6,63*	$BC = 0,135 \cdot PSH + 3,63$	11	0,63	15,2*
	15	$BC = 0,252 \cdot PSH - 2,58$	12	0,45	8,21*	$BC = 0,205 \cdot PSH + 0,390$	3	0,99	n.t.
	25	$BC = 0,280 \cdot PSH - 4,02$	7	0,70	11,2*	$BC = 0,167 \cdot PSH + 0,295$	8	0,88	44,7**
b)	1	$PSH = 21 \cdot Lc - 85,8$	12	0,90	90***	$PSH = 21 \cdot Lc - 83,4$	11	0,96	212,4***
	15	$PSH = 19,3 \cdot Lc - 75,5$	12	0,76	32,2**	$PSH = 17,5 \cdot Lc - 59,3$	3	0,99	n.t.
	25	$PSH = 14,8 \cdot Lc - 44,9$	7	0,60	7,61*	$PSH = 24,3 \cdot Lc - 101,7$	7	0,98	225***

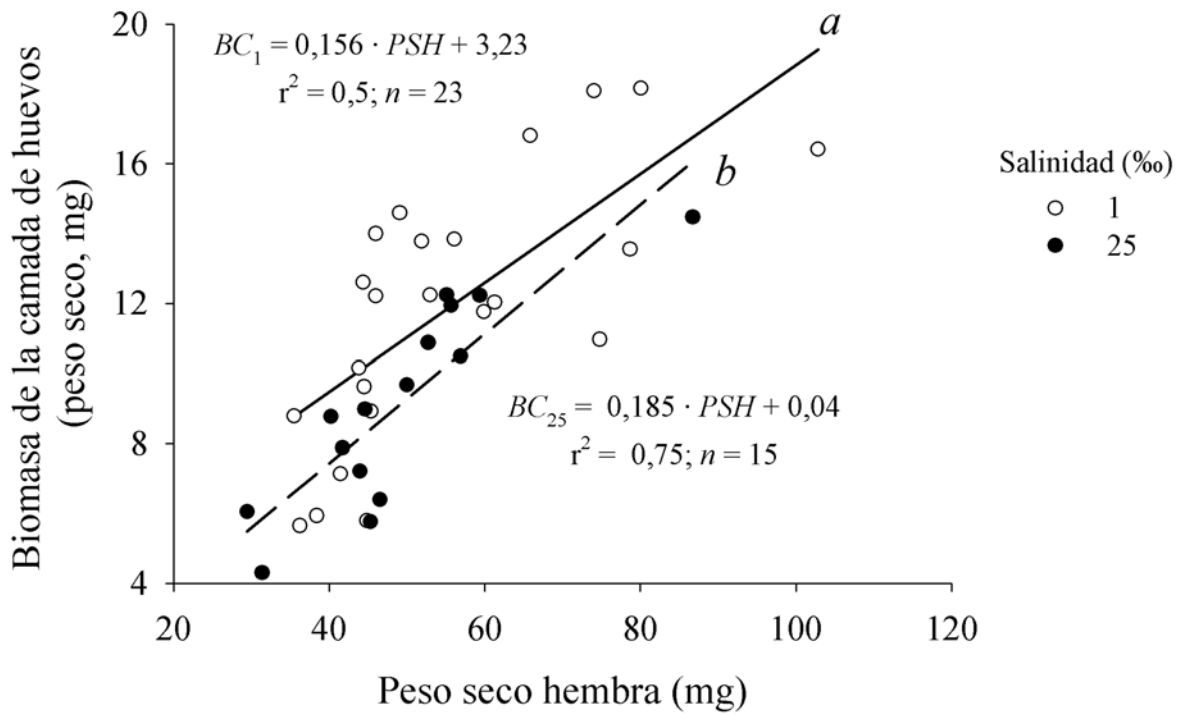


Figura 4.4. Relación entre la biomasa de la camada (*BC*) y la biomasa de las hembras (*PSH*) mantenidas en los tratamientos de 1 y 25 ‰. Datos agrupados por no existir diferencias significativas entre poblaciones (ver texto). Letras distintas indican diferencias significativas entre las salinidades.

Tamaño y peso seco de las hembras

El peso seco de las hembras que produjeron huevos durante el experimento se relacionó positivamente con el largo del caparazón (Tabla 4.6b). Por la misma razón señalada más arriba el peso seco de las hembras de LC y AV, con el largo del caparazón como covariable, fue comparado entre los tratamientos de salinidad de 1 y 25 ‰. Al final del experimento, el peso de las hembras difirió significativamente entre las poblaciones, pero no se detectaron diferencias entre las salinidades ni en la interacción de los factores (ANCOVA con el largo del caparazón como covariable, factor salinidad: $F_{(1; 32)} = 1,45$; $P = 0,24$; factor población: $F_{(1; 32)} = 4,80$; $P = 0,036$; factor interacción: $F_{(1; 32)} = 0,40$; $P = 0,53$). Para un mismo largo del caparazón, el peso seco de las hembras fue significativamente mayor en AV que en LC (Fig. 4.5).

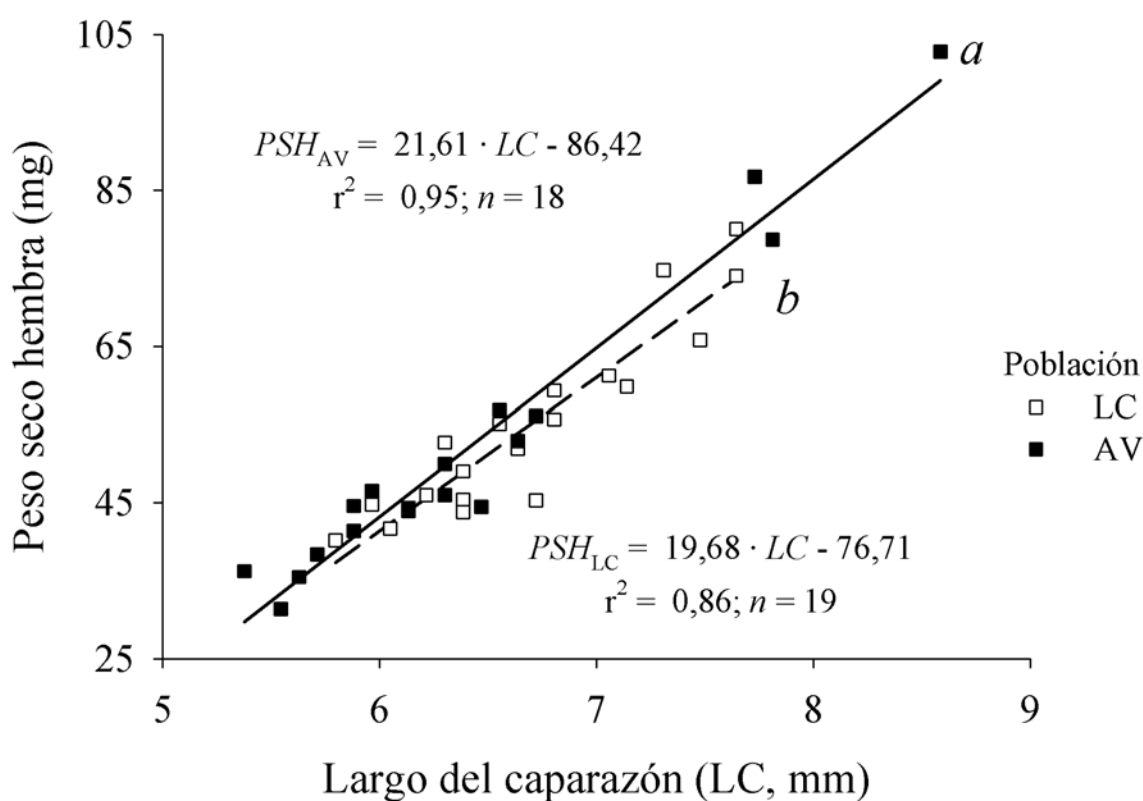


Figura 4.5. Relación entre peso seco (PSH) y el largo del caparazón (Lc) de las hembras al finalizar el experimento. Datos de los tratamientos de 1 y 25 ‰ agrupados por no existir diferencias significativas (ver texto). Letras distintas indican diferencias significativas entre las poblaciones. Chascomús (LC) y Vivoratá (AV).

DISCUSIÓN

Los resultados del estudio demostraron que bajo similares condiciones experimentales, existió una variación entre las poblaciones de *Palaemonetes argentinus* en el tiempo de incubación, el peso seco por huevo y el peso seco de las hembras que fue independiente de los tratamientos de salinidad, mientras que dicho factor afectó de manera similar el volumen de los huevos, el esfuerzo reproductivo y la producción de huevos medida como biomasa en ambas poblaciones.

Por un lado, un tiempo más largo para completar la embriogénesis incrementa considerablemente el riesgo de pérdida en número de embriones de la camada (Oh & Hartnoll, 1999). En *P. argentinus*, el mayor tiempo a la eclosión en LC que en AV podría relacionarse con la mayor pérdida de embriones encontrada en la población de LC en el campo (Capítulo II). Además, es interesante notar que un tiempo de incubación prolongado es característico de las poblaciones de palemónidos residentes en los ambientes de agua dulce, mientras que uno corto es típico de aquellas poblaciones que están expuestas a la influencia marina (Anger, 2001).

Por otro lado, en las especies de decápodos estrechamente relacionadas un tiempo de incubación prolongado se relaciona con la abreviación del número de estadios larvales y el incremento en el tamaño de los huevos, ya que parte del desarrollo larval transcurre en el interior de los mismos (véase Anger, 2001; 2005; Anger & Schubart, 2005). En los camarones palemónidos, en particular en las especies del género *Macrobrachium*, la relación entre la abreviación del número de estadios larvales y el incremento del tamaño de los huevos ha sido ampliamente documentada (ejemplos, Jalihal *et al.*, 1993; Alekhnovich & Kulesh, 2001). En cambio, el tiempo de incubación de los embriones y el tamaño de los huevos pueden variar independientemente en las especies de ese género (Alekhnovich & Kulesh,

2001). Además, dicha relación raramente ha sido investigada a nivel intraespecífico (ejemplos Mashiko, 1987; Alekhnovich & Kulesh, 2001). El tiempo de incubación más largo en la población de *P. argentinus* de LC sugiere una relación con el mayor peso seco por huevo. Sin embargo, los datos de campo muestran un resultado opuesto, el peso seco por huevo es mayor en la población de AV que en la de LC (Capítulo II). Entonces, una diferencia en la composición bioquímica del vitelo de los huevos entre dichas poblaciones (como fue sugerido en el Capítulo II) explicaría las variaciones en el peso seco por huevo y podría afectar el tiempo de metabolización de las reservas embrionarias determinando la diferencia interpoblacional en el periodo de incubación.

En la mayoría de los crustáceos decápodos, la calidad de los huevos se correlaciona con la disponibilidad de alimento bajo la que se produjo la maduración de los ovarios (Harrison, 1990). En este experimento se utilizaron raciones similares, y los camarones de ambas poblaciones completaron con éxito la vitelogénesis con la consecuente puesta de los huevos. Sin embargo, existió una diferencia en el peso seco por huevo entre las poblaciones, que además fue opuesta del patrón encontrado en el campo. En primer lugar, los resultados del experimento indican que la calidad de los huevos producidos en un momento determinado del periodo reproductivo no depende exclusivamente del alimento consumido por *P. argentinus* durante la maduración ovárica. Es decir, parte de los recursos utilizados por las hembras en el proceso de vitelogénesis podrían provenir de los nutrientes almacenados en otros órganos como ha sido sugerido para otros decápodos (ejemplos, Palacios *et al.*, 2000; Ituarte *et al.*, 2004; 2006). En segundo término, ambos resultados, los del experimento y los del campo, sugieren que el peso seco por huevo es un carácter fenotípico flexible. La contrastante hidrología de los sitios estudiados (AV: ambiente lótico, con salinidad y disponibilidad de alimento impredecibles; LC: ambiente léntico, salinidad estable y altamente eutrófico) podría determinar una diferencia en la condición fisiológica basal (nutricional y/o metabólica) entre los camarones de esas poblaciones. De modo que aunque la dieta

suministrada en el experimento fuera óptima para la maduración de los ovarios, las condiciones previas experimentadas por las hembras también contribuirían a la calidad de las reservas energéticas de los descendientes.

Considerando que las altas salinidades utilizadas en los experimentos no afectaron el peso seco por huevo ni tampoco el tiempo de incubación, es posible que una diferencia en la condición fisiológica de las hembras de *P. argentinus* contribuya a la diferencia interpoblacional en esos rasgos. La condición fisiológica de las hembras puede deteriorarse debido a la producción de múltiples y continuas camadas (ejemplo Palacios *et al.*, 1999). En consecuencia, la transferencia de diversos componentes bioquímicos desde las madres hacia sus embriones puede disminuir particularmente hacia el final del periodo de desove afectando no solo la calidad de los huevos sino también el desempeño de las larvas (Palacios *et al.*, 1999). Sin embargo, las hembras de *P. argentinus* utilizadas en este experimento fueron recolectadas al inicio de la estación reproductiva en ambas localidades y no hay evidencias de que las hembras de alguna de las dos poblaciones produzcan un mayor número de camadas en una estación reproductiva. A nivel poblacional, la mayor extensión de la estación reproductiva de *P. argentinus* en LC que en AV (Cap II) se explica por la incorporación de hembras primíparas al stock reproductivo. La alteración en la disponibilidad de nutrientes experimentada por las madres es otro de los factores claves que afectan el fenotipo y desempeño de la progenie (ejemplos, Carter *et al.*, 2004; Gagliano & McCormick, 2007 y citas allí). Futuros experimentos en el campo en los que se altere la dieta de *P. argentinus* de ambas poblaciones (véase por ejemplo Gagliano & McCormick, 2007) permitirían evaluar si ese factor en particular afecta el peso seco por huevo y el tiempo de desarrollo embrionario.

Dentro de la respuesta plástica, la variación geográfica en los rasgos de historia de vida puede estar determinada parcialmente por las diferencias en las condiciones bajo las cuáles tuvieron lugar, a lo largo de las generaciones, los eventos ontogénicos tempranos (por ejemplo, Qualls & Shine, 1998; Radder, 2006). Diversos estudios han sugerido que las

variaciones en los eventos durante la ontogenia temprana (particularmente durante la diferenciación) tienen un impacto potencialmente mayor sobre el fenotipo final (adulto) que si esos eventos actuaran en una etapa tardía de la ontogenia (Qualls & Shine, 1998; Radder, 2006 y citas allí). En los crustáceos ha sido demostrado que los factores externos actuando sobre los estadios larvales afectan a las fases ontogenéticas subsiguientes (Giménez & Torres 2002; Giménez & Anger, 2003).

En tal sentido, el peso seco de las hembras de *P. argentinus* de LC y AV difirió significativamente en este experimento (Fig. 4.5), y el mismo patrón ocurre en el campo donde las hembras de AV son más pesadas que las LC (Capítulo II). Esa diferencia es evidente al momento de la eclosión y podría ser más pronunciada durante la ontogenia. Por ejemplo, el tamaño promedio de los adultos (tanto en largo del caparazón como en peso seco) fue significativamente mayor en AV que en LC (Capítulo II; éste estudio). Esa misma diferencia está presente en las larvas recién eclosionadas (zoeas I), aunque solo para el tamaño del caparazón y no para el peso seco (Capítulo II). Nuevamente, en el campo dicha diferencia está presente en los embriones (los de AV son más pesados que los de LC, Capítulo II). El menor tiempo de incubación en AV indica que los individuos de esa población pasan menos tiempo como embriones, sugiriendo que el embrión podría no acabar con todas las reservas de vitelo y posiblemente eso determine un periodo larval más largo (ya sea en el número de estadios o en el tiempo entre estadios larvales). Un alargamiento del periodo larval determinaría que esa fase del ciclo pase un mayor tiempo como larva que se alimenta, con la posibilidad de alcanzar una mayor biomasa para un mismo estadio larval. En consecuencia los camarones de AV alcanzarían el estadio adulto o un determinado largo de caparazón con una mayor biomasa que aquellos de LC. Esta hipótesis es factible de ser evaluada en experimentos futuros.

El tiempo para que se complete el desarrollo embrionario es más variable entre poblaciones del camarón *M. nipponense* que a nivel intragenérico (Alekhovich & Kulesh,

2001). Los resultados de este estudio demostraron que en *P. argentinus* el periodo de incubación también es altamente variable, tanto entre como dentro de sus poblaciones. De la misma manera, existe una amplia variabilidad intraespecífica para el tamaño del primer estadio larval, la zoea I, de *P. argentinus* (Capítulo II). De acuerdo con Alekhovich & Kulesh (2001) el tamaño de las zoeas I es el rasgo más variable a nivel intragenérico e intraespecífico en *Macrobrachium* y sugieren que esa gran variabilidad sería consecuencia del origen y desarrollo de adaptaciones durante la etapa larval, lo que propiciaría la formación de nuevas especies. Por lo tanto, sería interesante estudiar si existe una relación entre la variación en el periodo de incubación, el tamaño al nacer y el patrón de desarrollo larval entre las poblaciones de *P. argentinus* consideradas en este estudio.

Independientemente de la procedencia de los camarones, el volumen inicial de los huevos dependió fuertemente de las condiciones de salinidad bajo las cuales se desarrollaron los ovarios. Es decir, las hembras de ambas poblaciones mantenidas en los tratamientos de salinidades más baja (1 ‰) y más altas (15 y 25 ‰) produjeron huevos con máximos y mínimos volúmenes, respectivamente (Fig. 4.2b). En ambas poblaciones la relación peso / volumen fue afectada de manera similar por la salinidad, indicando que el mayor volumen encontrado en 1‰ se debería a la incorporación osmótica de agua durante el proceso de maduración de los ovocitos. Se concluye que las condiciones de salinidad bajo las que se produjo la vitelogénesis afectaron el volumen inicial de los huevos, ello podría correlacionarse con las diferencias en la fecundidad en el campo entre estas poblaciones.

A pesar del efecto osmótico, en 1 ‰ existió una tendencia (aunque no significativa) hacia un mayor volumen en los huevos de *P. argentinus* procedentes del sitio más alejado del océano (LC) respecto de aquél con influencia marina (AV) (Fig. 4.2b). Dicha tendencia es similar pero notablemente más marcada en el camarón palémonido *Macrobrachium amazonicum*, en el que el volumen de los huevos se incrementa cuando el sitio de muestreo se aleja del océano (Odinetz Collard & Rabelo, 1996). Al menos en los camarones del género

Macrobrachium, dicho patrón ha sido asociado con un proceso activo de radiación adaptativa hacia los ambientes dulceacuícolas (Jalihal *et al.*, 1993; Odinetz Collard & Rabelo, 1996).

Al finalizar el ciclo ovárico, los huevos producidos en 15 y 25 ‰ tuvieron un volumen inicial similar (Fig. 4.2b). En cambio, al estudiarse el desarrollo embrionario de *P. argentinus in vitro* (= embriones aislados de un potencial efecto materno), el volumen de los huevos fue significativamente menor en 25 ‰ que en 15 ‰ (Capítulo V). Ambos resultados sugieren una diferencia en el ajuste fisiológico de los ovocitos y de los embriones. En algunos peces teleósteos, en los que el proceso de vitelogénesis sería similar al que ocurre en los de invertebrados, el ajuste fisiológico de los ovocitos frente a los cambios de salinidad es pasivo, es decir dependiente de los mecanismos de homeostasis y de la capacidad de regulación de las hembras (Alderdice, 1988). En *P. argentinus* la habilidad de osmorregular que está presente a partir del primer estadio larval (Charmantier & Anger, 1999) posiblemente se desarrolle durante la etapa embrionaria (Capítulo VI), pero la regulación osmótica durante la maduración de ovocitos podría depender exclusivamente de la habilidad de osmo-iono regular de las hembras.

La menor inversión en biomasa de huevos en la salinidad más alta (25 ‰) indica que dicho tratamiento pudo causar un estrés osmótico provocando que la energía disponible se destinará en parte para la reproducción y en parte para otro tipo de procesos de compensación fisiológica. En el capítulo VI se encontró que la actividad $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$, la cual implica un gasto energético, se incrementa significativamente luego de una breve exposición de los adultos de la población de LC a esas condiciones hiper-osmóticas. Es probable que ese gasto energético, ocurrido al menos en las primeras 48 hs de que los camarones se mantienen en 25 ‰, comprometiera la disponibilidad de recursos destinados a la producción de huevos.

En resumen, los resultados demostraron una diferencia interpoblacional en el tiempo de incubación y en el peso seco por huevo que fueron independientes de la salinidad. La diferencia en el tiempo de incubación podría ser resultado de una variación en el patrón de

desarrollo larval, ello tendría consecuencias sobre parte de la variabilidad intraespecífica en algunos de los rasgos historia de vida de *P. argentinus*, como por ejemplo la diferencia interpoblacional en el tamaño de los adultos (este estudio, Capítulo II). Además, un tiempo a la eclosión prolongado afectaría también el riesgo de perder embriones durante la incubación y en último término a la adecuación de los individuos. Por otro lado, la variación en el peso seco por huevo entre las poblaciones podría depender del estado fisiológico (nutricional y/o metabólico) de las hembras, el que a su vez respondería a las condiciones hidrológicas y ecológicas locales (véanse Capítulos II y III). Tanto el tiempo de incubación como la inversión por descendiente deberían compararse entre poblaciones que se encuentren en ambientes de similares características hidrológicas, es decir entre ambientes de características lénticas o lóxicas (por ejemplo lagunas o arroyos, respectivamente).

Futuros experimentos trasplantando los camarones de AV en la laguna de Chascomús (y viceversa) y/o experimentos de laboratorio en los cuales se entrecrucen los individuos de esas poblaciones deberán evaluar si la diferencia en el tiempo de incubación se relaciona con las condiciones ecológicas locales; y/o si ese carácter está bajo control genético. Además, experimentos en los que se manipule la dieta materna en el campo (ejemplo Gagliano & McCormick, 2007) permitirían entender la influencia de la disponibilidad del alimento sobre las variaciones fenotípicas entre las poblaciones de *P. argentinus* (por ejemplo en la inversión por descendiente). Finalmente mediante la combinación de experimentos en el laboratorio y en el campo se podría evaluar en qué medida las condiciones experimentadas durante las fases tempranas de la ontogenia, como por ejemplo variaciones en el periodo embrionario y/o en patrón de desarrollo larval, contribuyen a la variabilidad interpoblacional en rasgos tales como el tamaño de los adultos.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El volumen inicial de los huevos de ambas poblaciones fue afectado de manera similar por los tratamientos de salinidad: en las condiciones hiper-osmóticas el volumen inicial de los huevos fue más pequeño. Se concluye que el volumen inicial de los huevos depende de las condiciones de salinidad bajo las que maduraron los ovarios.

El tiempo de incubación de los embriones *in vivo* no fue afectado por la salinidad. La diferencia entre las poblaciones para ese rasgo podría ser consecuencia de una variación en el patrón de desarrollo larval, por ejemplo en el número de estadios larvales necesarios para alcanzar el juvenil o en el tiempo necesario para que cada estadio larval alcance la fase subsiguiente.

El peso seco por huevo no fue afectado por los tratamientos de salinidad. Sin embargo, bajo similares condiciones de maduración de los ovarios los huevos de LC fueron significativamente más pesados que los de AV. Éste patrón difirió del observado en el campo. En *P. argentinus* el peso seco por huevo y el tiempo de incubación podrían variar independientemente.

A partir de los resultados de este estudio, las siguientes hipótesis podrían evaluarse en el futuro:

- 1) La diferencia en el periodo de incubación entre las poblaciones se relaciona con:
 - a) una diferencia en la composición bioquímica de los huevos y/o en la tasa de metabolización del vitelo embrionario
 - b) una variación en el patrón del desarrollo larval

- 2) La condición fisiológica (nutricional o metabólica) de las hembras difiere entre las poblaciones estudiadas y afecta las reservas energéticas de los huevos
- 3) Los eventos ocurridos durante las fases tempranas de la ontogenia de *P. argentinus* contribuyen a la variabilidad interpoblacional en los rasgos de historia de vida. Por ejemplo, el tiempo de incubación de los embriones y el patrón de desarrollo larval determinan la diferencia en el peso seco de los adultos de LC y AV.

CAPÍTULO V

EFFECTOS DE LA SALINIDAD SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO* DEL “CAMARÓN DE AGUA DULCE” *Palaemonetes argentinus*

Los resultados de este capítulo fueron publicados parcialmente en una revista internacional con referato:

ITUARTE, R.B., E.D. SPIVAK & K. ANGER. 2005. Effects of salinity on embryonic development of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) cultured *in vitro*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 47: 213-223.

INTRODUCCIÓN

Las estrategias fisiológicas y de comportamiento que permiten a los crustáceos decápodos y a otros invertebrados acuáticos adaptarse a los cambios de salinidad pueden variar entre los estadios del ciclo de vida. La selección natural actúa diferencialmente sobre cada fase ontogenética y en consecuencia el establecimiento de una especie en un hábitat determinado dependerá de la habilidad de cada fase para adaptarse a ese ambiente (Charmantier, 1998; Willmer *et al.*, 2000; Charmantier & Wolcott, 2001). Como una estrategia alternativa, los estadios del ciclo de vida más sensibles (menos adaptados), por ejemplo, los estadios embrionarios o las fases larvales, pueden desarrollarse fuera del hábitat de los adultos (“estrategia de exportación”; Strathmann, 1982; Anger, 2001). Por lo tanto, entender las estrategias adaptativas de una especie implica entender la ecofisiología de todos los estadios de su ciclo de vida, desde el huevo hasta el adulto.

La mayoría de los crustáceos decápodos (alrededor de 9.000 especies) son animales marinos, tan solo 1.000 especies están adaptadas a los ambientes límnicos y pueden completar su ciclo de vida en agua dulce (Tudge, 2000). Dentro de estos últimos se encuentran las langostas de agua dulce o “*crayfishes*” (Holdich, 2001), los cangrejos potamoideos (véanse ejemplos en Tan & Ng, 1998) y algunas especies de sesármidos (Schubart & Koller, 2005), como también muchos camarones carideos (principalmente los de la familias Atydae y Palaemonidae; véase Bauer, 2004). Muchas de las especies marinas costeras muestran cierta capacidad para invadir los ambientes salobres o de agua dulce adyacentes, pero su reproducción y desarrollo inicial dependen del mar y a menudo implican migraciones ontogenéticas entre ambientes con diferentes salinidades.

Aunque los mecanismos fisiológicos que permiten a los decápodos tolerar amplias fluctuaciones de salinidad han sido estudiados en detalle en los adultos y en las larvas (revisión en Charmantier, 1998; Anger, 2001; 2003) mucho menos se conoce sobre tales

mecanismos en los estadios embrionarios (Charmantier & Charmantier-Daures, 2001; Susanto & Charmantier, 2001). En general, los adultos y juveniles de crustáceos son más tolerantes a los cambios de salinidad que las larvas y los embriones (ejemplos, Kinne, 1971; Greenwood *et al.*, 1989; Bas & Spivak, 2000).

Los camarones pertenecientes a la familia Palaemonidae se encuentran en ambientes marinos, salobres y de agua dulce (New & Valenty, 2000; Jayachandran, 2001; Bauer, 2004); sin embargo en la mayoría de las especies las larvas no son tan eurihalinas como los adultos (Moreira & McNamara, 1984; Antonopoulou & Emson, 1989; Lowe & Provenzano, 1990; Huong *et al.*, 2004). Sorprendentemente, muy poco se conoce en cuanto a los efectos de la salinidad sobre el desarrollo embrionario en esta familia.

Las larvas y los adultos de *Palaemonetes argentinus* han sido capturados en el cuerpo de la Laguna costera Mar Chiquita (provincia de Buenos Aires) donde la salinidad varía brusca y continuamente (Anger *et al.*, 1994). Por ello se ha propuesto que este camarón presenta una “estrategia de retención” (Anger *et al.*, 1994). Las larvas de *P. argentinus* tienen la habilidad de osmorregular en el momento de la eclosión y el mismo patrón de osmorregulación permanece sin cambios hasta el estadio adulto (Charmantier & Anger, 1999). Esta capacidad de hiper-osmorregular es característica de las especies de agua dulce y ha sido interpretada como una de las estrategias fisiológicas involucradas en la supervivencia de la especie en ambientes de salinidad variable como la laguna Mar Chiquita (Charmantier & Anger, 1999). Hasta el momento no existía información de los efectos de la salinidad sobre el desarrollo embrionario. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta de los embriones de *P. argentinus* frente a las variaciones de salinidad utilizando las tasas de mortalidad y desarrollo como criterios cuantitativos. En los experimentos se utilizó una técnica de cultivo *in vitro* que permitió comparar los efectos de la salinidad sobre los embriones de una misma camada, excluyendo el efecto materno como una fuente potencial de variación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Hembras con ovarios desarrollados y machos de *Palaemonetes argentinus* fueron colectados el 26/10/03 en la laguna de Chascomús (Fig. 2.1). Se mantuvieron en un acuario de 30 x 30 x 50 cm³ (50 lts) en agua de la canilla previamente declorada, aireación constante y temperatura ambiente durante un periodo máximo de una semana. Los camarones fueron alimentados diariamente con *Artemia* spp. Durante cada mañana (hasta las 13:00 hs máximo) el acuario fue revisado y las hembras con huevos fueron separadas. Un total de 10 hembras (camadas) fueron utilizadas para el cultivo de los embriones *in vitro*.

La masa de huevos se extrajo cuidadosamente con una pinza de puntas finas y se separaron 4 grupos de 20 huevos cada uno. El cultivo de los embriones *in vitro* se realizó en cápsulas de Petri de plástico de 3,2 cm de diámetro x 1 cm de alto. Así los huevos de una misma camada fueron incubados en 4 salinidades finales 1, 15, 25 y 32 ‰, con temperatura y fotoperiodo constantes (20 ± 2 °C y 10:14 h luz:oscuridad) hasta la eclosión de las larvas o muerte de los embriones. Los embriones fueron aclimatados paulatinamente durante un periodo de una hora y media en 1, 5, 10, 15, 25 y 32 ‰ hasta alcanzar las salinidades finales. El agua de cultivo fue preparada a partir de agua de mar diluida con agua destilada y esterilizada 30 minutos con luz ultravioleta. Se agregó azul de metileno (2 mg/ml) debido a la infestación de los huevos, principalmente con hongos, observada en pruebas piloto. Las cápsulas fueron desinfectadas a diario antes de su utilización con hipoclorito de sodio. El agua de los cultivos fue renovada diariamente y los embriones en mal estado fueron eliminados. El eje mayor (l) y menor (h) de los huevos fue medido con lupa binocular (4 x) y el volumen calculado a partir de la fórmula ($\Pi \cdot l \cdot h^2 / 6$). Los huevos fueron medidos solo en tres oportunidades durante todo el desarrollo embrionario: al finalizar la aclimatación (Estadio I); al aparecer el latido cardíaco (Estadio II) y un día antes de las primeras eclosiones (Estadio III). En este último caso, se tomaron las medidas durante varios días

seguidos y se tuvo en cuenta sólo la última antes que se produjeran las primeras eclosiones o la muerte de los embriones. Una vez eclosionadas, un grupo de larvas fue cultivado en las mismas condiciones de salinidad y temperatura que durante el desarrollo embrionario, sin alimentar, hasta la primera muda o la muerte de las mismas.

ANÁLISIS DE DATOS

La tasa de supervivencia de los embriones en las 4 salinidades de cultivo fue calculada como el número de embriones que alcanzaron exitosamente la eclosión / número de embriones al inicio del experimento * 100. El efecto de la salinidad sobre la tasa de supervivencia se evaluó con un ANOVA de una vía. El efecto de la salinidad sobre la duración de los estadios embrionarios T_1 , T_2 y T_3 fue comparado entre salinidades con un ANOVA de un factor por cada tiempo, donde T_1 corresponde al tiempo transcurrido entre los estadios I y II del desarrollo embrionario; T_2 al tiempo transcurrido desde el estadio II hasta las eclosiones y T_3 al tiempo transcurrido desde el estadio I hasta las eclosiones. Las variaciones en el tiempo hasta las eclosiones (T_3) entre las camadas fueron evaluadas con ANOVAs de un factor para cada una de las salinidades experimentales donde hubo eclosiones. Las variaciones de los volúmenes de los huevos en el estadio I fueron comparadas con un ANOVA de dos vías con salinidad y camadas como factores utilizando las medidas de 20 huevos por camada y condición de salinidad. Debido a que algunos embriones murieron en el transcurso del desarrollo, en los estadios II y III del desarrollo embrionario se compararon las medidas de entre 10 y 20 huevos por camada y condición de salinidad. En ambos casos se realizó un ANOVA de dos vías con réplicas desiguales con salinidad y camadas como factores (Zar, 1996). La relación entre el volumen de los huevos en el estadio inicial y la talla de las hembras fue evaluada por medio de una regresión lineal. Los cambios porcentuales del volumen de los huevos (ΔV) durante el desarrollo embrionario fueron calculados con la siguiente fórmula:

$$\Delta V = (V - VI) / VI * 100$$

donde V es volumen de los huevos en el estadio II o III del desarrollo, según corresponda y VI es el volumen en el estadio I. Las diferencias en la media ΔV fueron evaluados con un ANOVA de una vía entre salinidades.

RESULTADOS

Diferenciación embrionaria

Al inicio del desarrollo embrionario el 100% del volumen de los huevos estuvo ocupado por vitelo (Fig. 5.1). La segmentación pudo ser observada durante las primeras horas del cultivo (principalmente durante el periodo de aclimatación). Entre los días 2-4 de cultivo se hicieron visibles 2 hendiduras en el vitelo, generalmente sobre el eje mayor de los embriones. A partir del día 5 las hendiduras comenzaron a unirse formando una medialuna que se completó a la semana del desarrollo, cuando el vitelo ocupaba aproximadamente un 90% del volumen del huevo. Los primordios de apéndices comenzaron a ser visibles a partir del día 7 cuando el vitelo ocupaba aún alrededor de un 80% del huevo. Entre los días 8-10 el vitelo se redujo hasta un 60%. El latido cardíaco se hizo visible en 1 y 15 ‰ durante los días 11-12, pero débilmente antes (durante los días 10-11) en las salinidades más altas (25 y 32 ‰). Aproximadamente 1-2 días después se hicieron visibles los ojos como tenues líneas rojizas. Durante los días 21-22 comenzaron los movimientos embrionarios, en tanto que los ojos y cromatóforos estaban completamente formados, y el volumen ocupado por vitelo disminuyó hasta alrededor de un 10% (en 1 y 15 ‰) o 20-30% (en 25 y 32 ‰). Desde el día 23, los embriones estuvieron listos para eclosionar, y el vitelo fue drásticamente reducido en 1 y 15 ‰ (Fig. 5.1).

Durante el desarrollo en las salinidades más altas, especialmente en 32 ‰, se observaron algunos embriones con señales de estrés como, por ejemplo, deformaciones en los

ojos. En una gran parte de ellos un ojo, y en ocasiones los dos, no alcanzaron a redondearse y permanecieron como líneas gruesas. Además, en muchos de los embriones cultivados en 25 y particularmente en 32 ‰ el vitelo se oscureció y opacó hacia el final del desarrollo. Sin embargo, algunos de ellos eclosionaron exitosamente, sobre todo en 25 ‰. Ni la deformación de los ojos ni el oscurecimiento del vitelo fueron observados en embriones de la misma camada expuestos a las salinidades más bajas.

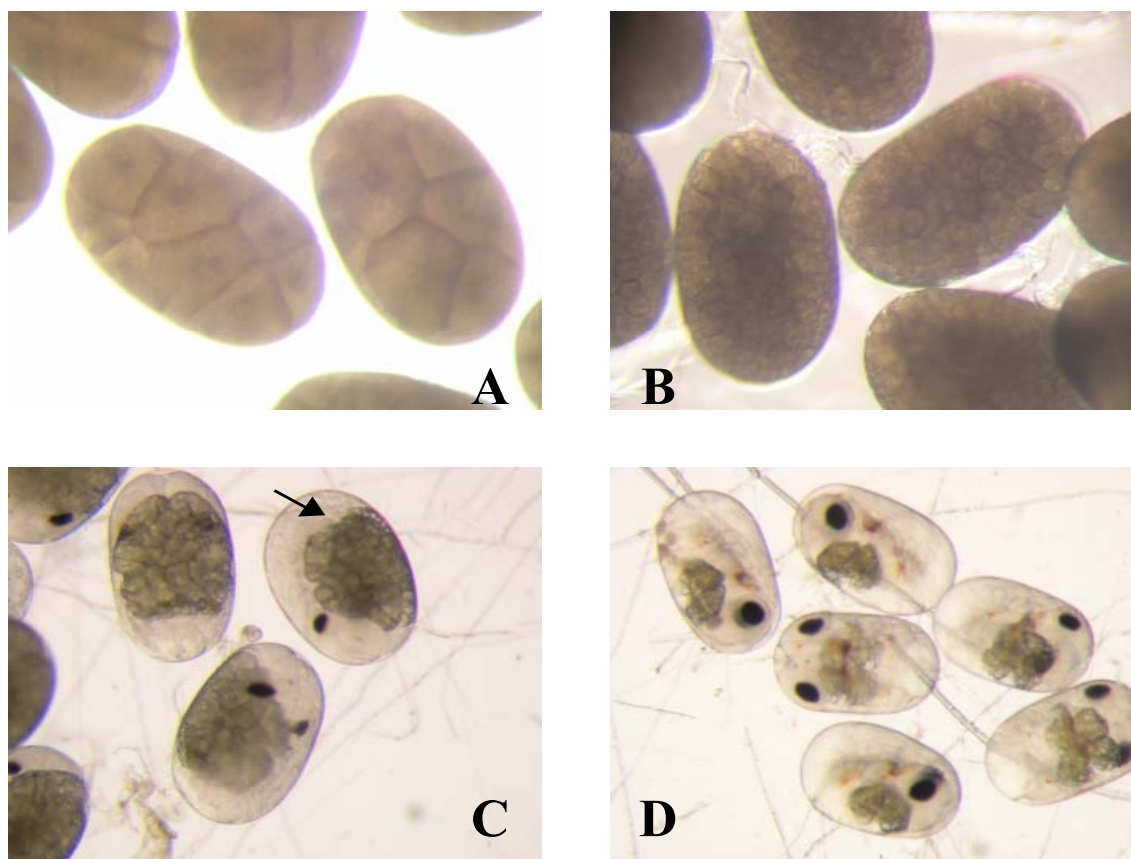


Figura 5.1. Diferenciación embrionaria en *P. argentinus*. (A) Estadio I, el embrión se encuentra en un estadio de 16 células o mórula donde el 100% del volumen del huevo está ocupado por vitelo de color marrón; (B) Estadio I avanzado, la división y el rearrreglo de las células embrionarias pudieron observarse durante el periodo de aclimatación; (C) Estadio II avanzado, ojos formados, el vitelo se reduce y el latido cardíaco es evidente (la flecha señala la zona del latido cardíaco); (D) Estadio III, embriones próximos a eclosionar.

Mortalidad de los huevos

En todos los tratamientos la supervivencia de los embriones fue alta hasta el día 20 del cultivo (alrededor de 90%; Fig. 5.2). Posteriormente, la mortalidad se incrementó marcadamente en los medios más concentrados, especialmente en 32 ‰, mientras que permaneció baja (< 30%) en 1 y 15 ‰. Las eclosiones larvales ocurrieron en todas las camadas incubadas en 1-25 ‰, pero excepcionalmente (en dos camadas) en 32 ‰ (Fig. 5.3a). Las tasas de eclosión difirieron significativamente entre las salinidades (factor salinidad: $g.l. = 3$; $F = 38,9$; $P < 0,0001$, Fig. 5.3b).

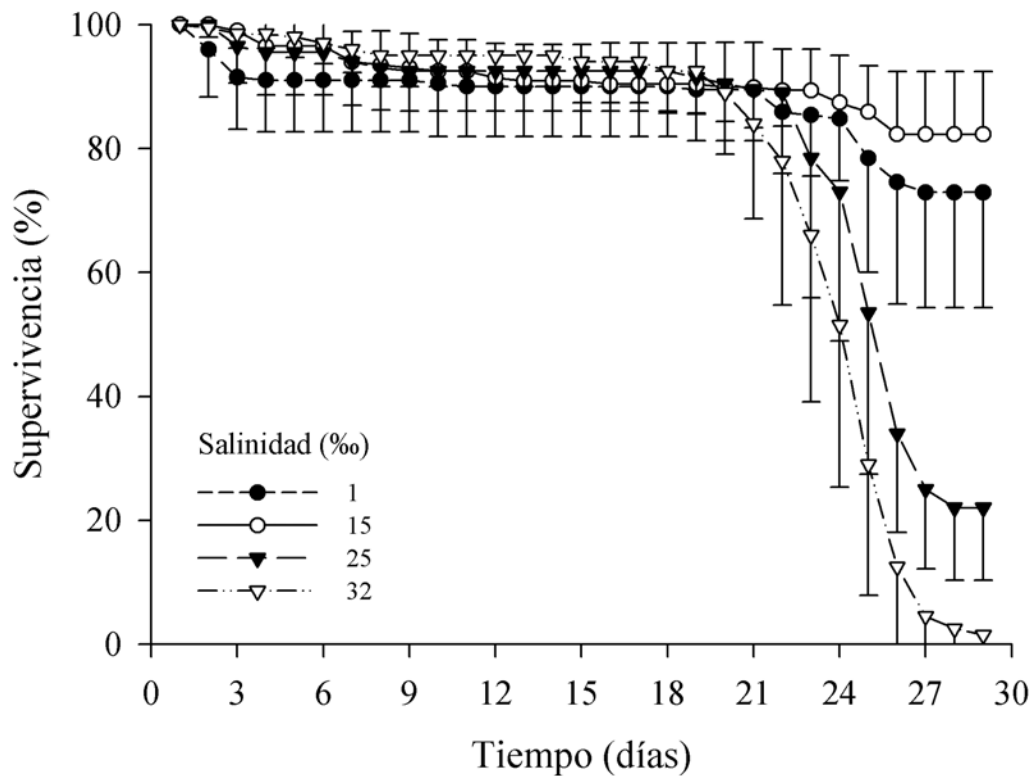


Figura 5.2. Supervivencia de los embriones de *P. argentinus* cultivados en 1, 15, 25 y 32 ‰. Los símbolos representan la media \pm 1 DE de las 10 camadas con 20 huevos por camada y condición de salinidad al inicio del experimento.

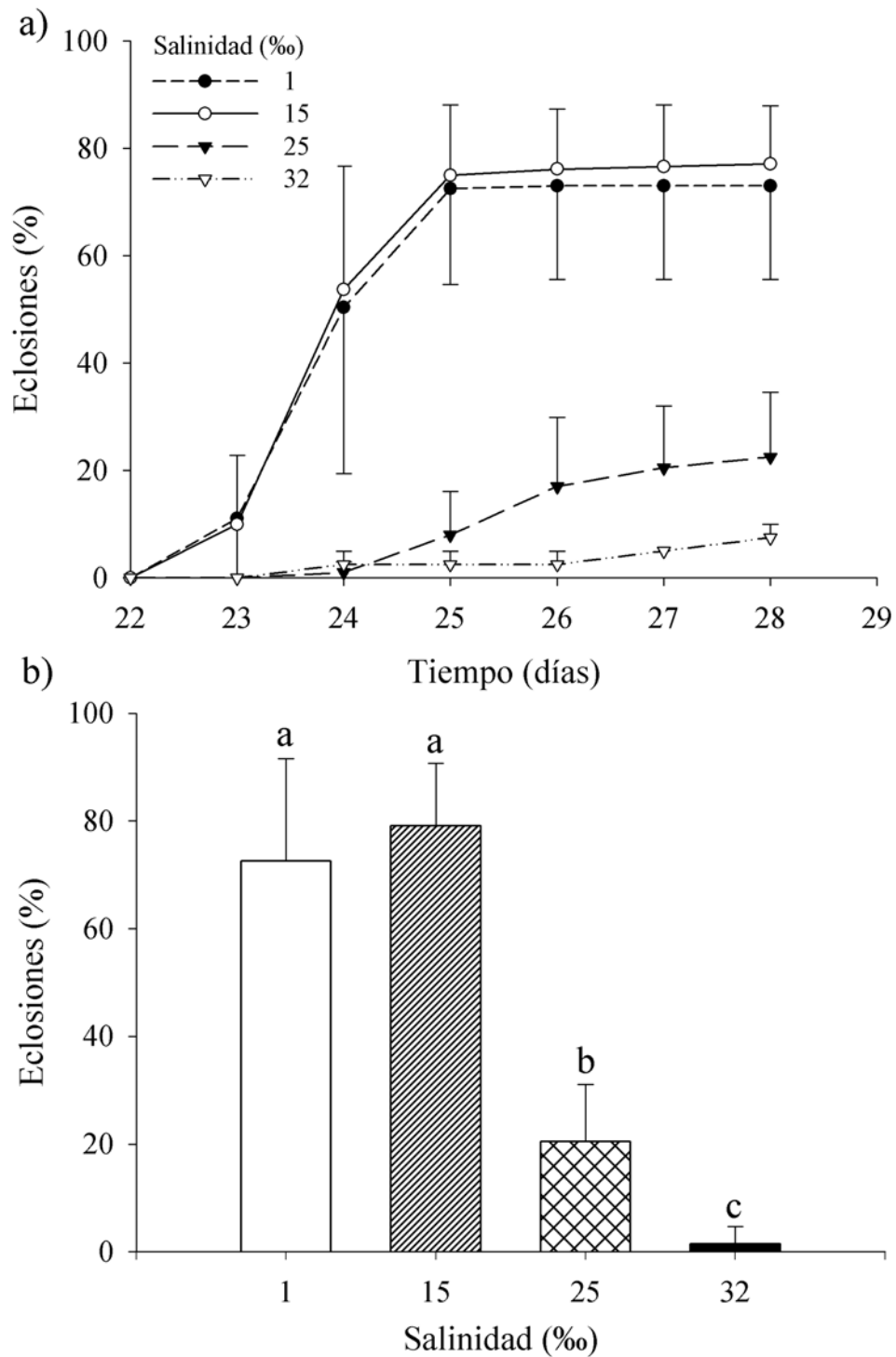


Figura 5.3. Eclusiones larvales a partir de los embriones de *P. argentinus* cultivados en 1, 15, 25 y 32 ‰. **a)** Los símbolos representan la media \pm 1 DE de las eclusiones acumuladas diariamente para las 10 camadas (excepto en 32 ‰ donde las eclusiones ocurrieron únicamente en 2 de las camadas); **b)** Las barras muestran la tasa media \pm 1 DE de eclusiones exitosas a partir de embriones incubados en las cuatro salinidades; inicial $n = 20$ huevos por camada y condición de salinidad, 10 camadas; letras distintas indican diferencias significativas entre salinidades ($P < 0,05$).

Tiempos para el desarrollo embrionario

El periodo de desarrollo embrionario desde la puesta de los huevos hasta el inicio del latido cardíaco (= tiempo T_1) se aceleró débil, pero significativamente, en 25 y 32 % comparado con las salinidades más bajas (Fig. 5.4). Sin embargo, la segunda parte del desarrollo (T_2) fue claramente más prolongada en los medios de cultivo con salinidades más concentradas (Fig. 5.4). Dado que el efecto final fue mucho más marcado, la duración completa del desarrollo desde la puesta hasta la eclosión (T_3) mostró una tendencia a incrementarse con el aumento de la salinidad (Tablas 5.1 y 5.2a; Figs. 5.3a y 5.4b). Sin embargo, existió también variabilidad individual dentro de las camadas, es decir, no todos los embriones eclosionaron simultáneamente (el mismo día), excepto en las camadas 4, 6 y 7 cultivadas en 1 ‰ (Tabla 5.1). Además, el tiempo de desarrollo varió significativamente entre camadas mantenidas en idénticas condiciones de salinidad (Tabla 5.2b), pero no hubo correlación con el tamaño corporal de las hembras ovígeras (rango: 5,4 a 7,2 mm de largo del caparazón; $r^2 = 0,11$; 0,36 y 0,009 en 1, 15 y 25 ‰, respectivamente; todas $P > 0,05$). A pesar de la variabilidad dentro y entre camadas, los efectos de la salinidad fueron siempre significativamente altos (ver T_3 , Tabla 5.2a, Fig. 5.4b).

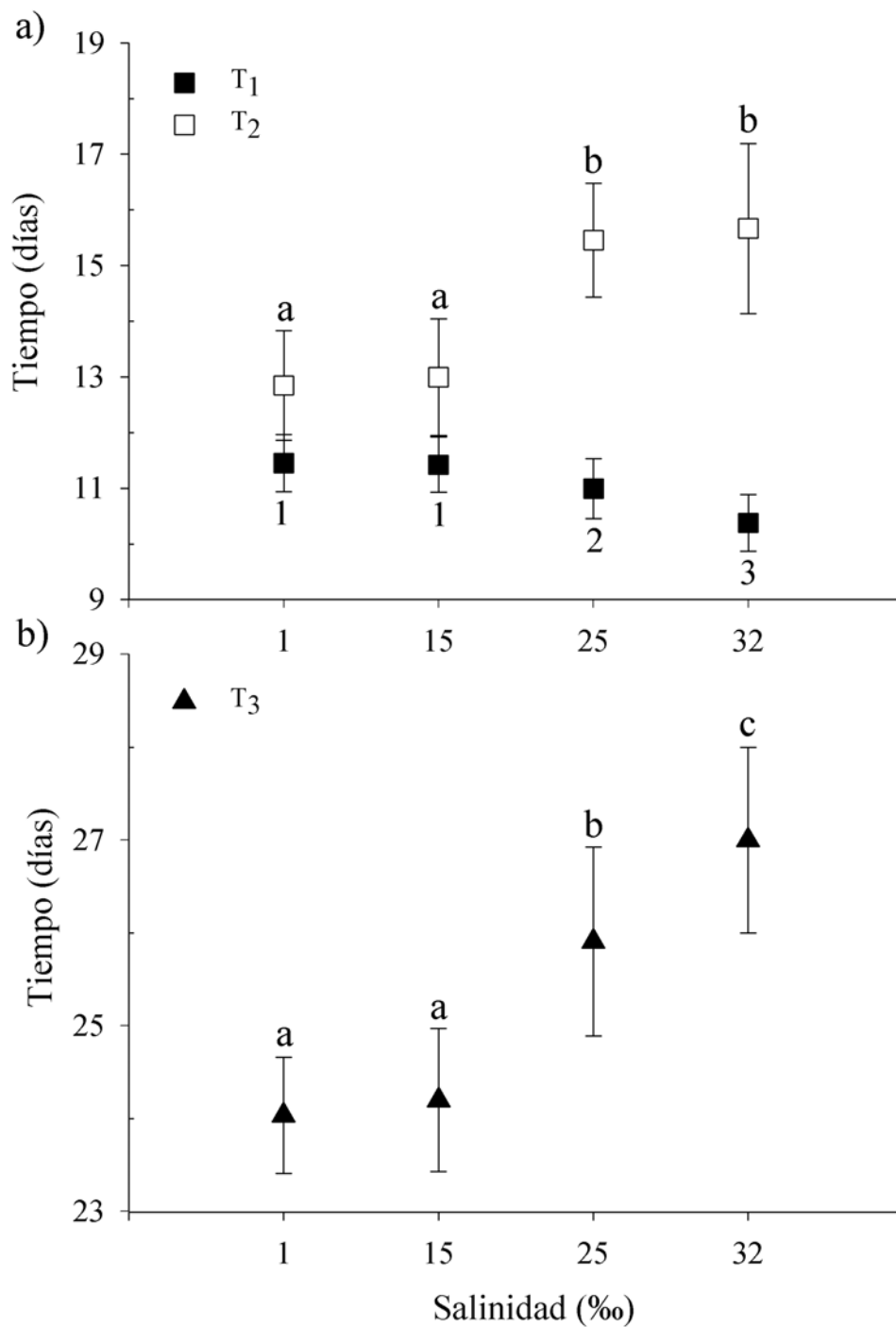


Figura 5.4. Tiempos para el desarrollo embrionario de *P. argentinus* en 1, 15, 25 y 32%. **a)** Días transcurridos entre los estadios I-II (T₁) y II-III (T₂); **b)** Tiempo total transcurrido entre los estadios I-III (T₃) en las mismas salinidades. Los símbolos muestran la media \pm 1 DE de los días; inicial n = 20 huevos por camada y condición de salinidad, 10 camadas; letras o números distintos indican diferencias significativas entre salinidades ($P < 0,05$).

Tabla 5.1. Tiempo transcurrido desde el inicio del desarrollo de los embriones cultivados *in vitro* en 1, 15, 25 y 32 ‰ hasta las eclosiones larvales de *P. argentinus*. Los valores muestran la media de días \pm 1 DE y el rango para cada una de las 10 camadas en las cuatro salinidades de cultivo; $n = 10-20$ larvas por camada, excepto en 32 ‰ donde solo eclosionaron 3 larvas.

Salinidad (‰)		Camadas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	media	24,9	24,5	23,2	25	23,8	24	24	24,1	24,2	24,1
	\pm DE	0,31	0,64	0,43	-	0,67	-	-	0,39	0,78	0,57
	rango	24 - 25	24 - 26	23 - 24	-	23 - 25	-	-	24 - 25	23 - 25	23 - 25
15	media	24,8	24,6	24,2	24,8	23,7	24,5	24,3	24,1	23,7	23,7
	\pm DE	0,71	1,07	0,92	0,33	0,56	0,4	0,76	0,26	0,46	0,42
	rango	24 - 26	24 - 28	23 - 25	24 - 25	23 - 25	24 - 25	24 - 27	24 - 25	23 - 24	23 - 24
25	media	25	25,3	25,4	27	27,5	26,6	26,1	25,7	26	26
	\pm DE	0,7	0,74	0,5	-	0,5	0,49	1,16	0,7		
	rango	24 - 26	24 - 26	25 - 26	-	27 - 28	26 - 27	25 - 28	25 - 27		
32	media	27							26		
	\pm DE	0,5							-		
	rango	27 - 28							-		

Tabla 5.2. ANOVAs de un factor para evaluar a) el efecto de la salinidad sobre el tiempo entre los estadios I y II del desarrollo embrionario (T1; ver definición en Materiales y Métodos), entre el estadio II y las eclosiones larvales (T2), y la duración total de la embriogénesis (T3), b) el efecto de las camadas sobre tiempo desde la puesta de los huevos hasta la eclosión de las larvas (T3).

Fuente de Variación	SC	<i>g.l.</i>	CM	<i>F</i>	<i>P</i>
Tiempo					
a) T ₁	138,9	3	46,3	175,2	< 0,0001
Error	187,9	723	0,26		
T ₂	263,1	3	87,7	83,4	< 0,0001
Error	354,9	338	1,05		
T ₃	138,3	3	46,1	79,4	< 0,0001
Error	162,4	280	0,58		
SALINIDAD					
b) 1	29,7	9	3,3	13,4	< 0,0001
Error	31,7	127	0,25		
15	274,7	9	2,7	6,02	< 0,0001
Error	339,1	143	0,45		
25	5,5 x 10 ⁻³	6	9,2 x 10 ⁻⁴	4,76	= 0,0013
Error	6,5 x 10 ⁻³	34	1,9 x 10 ⁻⁴		

SC: Suma de cuadrados; *g.l.*: grados de libertad; CM: cuadrados medios; *F*, CM factor/error; *P*: probabilidad de error.

Tamaño de los huevos

De la misma manera que la duración del desarrollo, el tamaño inicial de los huevos (estadio I) expresado como volumen varió significativamente entre las camadas (Tabla 5.3), pero nuevamente esa variación no estuvo correlacionada con el tamaño de las hembras ovígeras ($r^2 = 0,062$; $P > 0,05$). Las diferencias detectadas en el volumen inicial de los huevos entre salinidades indican que la salinidad afectó el volumen de los huevos de una misma camada en el transcurso de la aclimatación (alrededor de 10 hs). Sin embargo, este débil efecto no fue evidente en todas las camadas, lo que queda reflejado en la interacción significativa. Durante el transcurso del desarrollo, el patrón de variación del volumen de los huevos fue similar en diferentes camadas cultivadas en idénticas salinidades (Tabla 5.4). El volumen de los huevos alcanzado en los estadios II y III también difirió significativamente entre camadas, y entre salinidades y hubo interacción entre los factores (Tabla 5.3). Las camadas expuestas a los medios concentrados (25, 32 ‰) alcanzaron generalmente un menor volumen en los estadios intermedio (II) y final (III) del desarrollo que aquellos incubados en las salinidades más bajas (1, 15 ‰; Tabla 5.4; Fig. 5.5).

Tabla 5.3. Resumen de los ANOVAs de dos factores comparando el volumen de los huevos en un estadio inicial (I), intermedio (II) y final (III) del desarrollo, con salinidad y camadas como factores.

Estadio	Factor	SC	g.l.	CM	F	P
I	Salinidad	6,3 x 10 ⁻⁴	3	2,1 x 10 ⁻⁴	2,66	= 0,05
	Camada	9 x 10 ⁻³	9	1 x 10 ⁻³	124	< 0,0001
	Salinidad x camada	0,013	27	5 x 10 ⁻⁴	5,84	< 0,0001
	Error	0,061	757	8,05 x 10 ⁻⁵		
II	Salinidad	6	3	2	722,8	< 0,0001
	Camada	3,15	9	0,35	128,7	< 0,0001
	Salinidad x camada	0,154	27	5,7 x 10 ⁻³	2,04	< 0,0001
	Error	1,93	689	2,8 x 10 ⁻³		
III	Salinidad		3	4,67	1.505	< 0,0001
	Camada		9	2,9 x 10 ⁻¹	93,5	< 0,0001
	Salinidad x camada		27	3,4 x 10 ⁻²	10,9	< 0,0001
	Error		610	3,1 x 10 ⁻³		

SC: Suma de cuadrados; g.l.: grados de libertad; CM: cuadrados medios; F, CM factor/error; P: probabilidad de error.

Tabla 5.4. Volumen de los huevos (mm³) en los estadios inicial (I), intermedio(II) y final (III) del desarrollo embrionario (ver Materiales y Métodos) en las 10 camadas cultivadas *in vitro* en 1, 15, 25 y 32 ‰; n = 20 huevos por condición de salinidad en el estadio I, 10-20 huevos en los estadios II y III.

Camadas	Salinidad Estadios	1			15			25			32		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1	Media	0,182	0,227	0,289	0,165	0,197	0,250	0,175	0,182	0,209	0,182	0,171	0,196
	DE	0,010	0,020	0,020	0,007	0,01	0,02	0,007	0,007	0,01	0,01	0,007	0,013
2	Media	0,166	0,210	0,294	0,175	0,181	0,225	0,178	0,173	0,204	0,183	0,163	0,187
	DE	0,012	0,009	0,016	0,01	0,009	0,008	0,011	0,008	0,009	0,012	0,009	0,006
3	Media	0,151	0,188	0,258	0,159	0,166	0,218	0,154	0,154	0,184	0,158	0,147	0,170
	DE	0,009	0,009	0,014	0,008	0,008	0,014	0,009	0,006	0,007	0,006	0,008	0,007
4	Media	0,190	0,233	0,31	0,193	0,203	0,265	0,190	0,190	0,219	0,184	0,177	0,200
	DE	0,012	0,014	0,011	0,013	0,011	0,02	0,009	0,009	0,009	0,011	0,012	0,009
5	Media	0,157	0,187	0,255	0,165	0,169	0,213	0,153	0,157	0,184	0,160	0,146	0,166
	DE	0,010	0,010	0,012	0,007	0,01	0,01	0,008	0,008	0,011	0,007	0,009	0,01
6	Media	0,166	0,190	0,255	0,167	0,171	0,218	0,17	0,163	0,187	0,170	0,155	0,172
	DE	0,007	0,009	0,013	0,008	0,006	0,014	0,007	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
7	Media	0,176	0,203	0,272	0,179	0,189	0,239	0,177	0,173	0,206	0,177	0,165	0,183
	DE	0,009	0,015	0,017	0,006	0,008	0,013	0,007	0,008	0,01	0,007	0,009	0,012
8	Media	0,180	0,209	0,218	0,165	0,187	0,250	0,172	0,175	0,186	0,173	0,153	0,174
	DE	0,008	0,009	0,015	0,01	0,009	0,013	0,007	0,008	0,007	0,009	0,005	0,008
9	Media	0,170	0,206	0,282	0,172	0,185	0,243	0,176	0,176	0,209	0,174	0,163	0,186
	DE	0,007	0,012	0,017	0,007	0,006	0,007	0,009	0,005	0,009	0,007	0,006	0,008
10	Media	0,152	0,185	0,256	0,158	0,164	0,214	0,158	0,153	0,189	0,152	0,142	0,161
	DE	0,007	0,01	0,012	0,008	0,006	0,009	0,009	0,008	0,009	0,011	0,004	0,011

Los cambios en porcentaje en el volumen de los huevos entre los estadios I-II ($\Delta VI-II$) variaron entre salinidades (ANOVA: $F_{(3; 36)} = 114$; $P < 0,0001$). Durante la primera mitad del desarrollo embrionario (T_1), el volumen de los huevos se incrementó 20 y 6% en 1 y 15 ‰ respectivamente, mientras que se registró una tendencia a la disminución del volumen en las salinidades más altas (insignificante en 25 ‰; significativa en 32 ‰; ver Fig. 5.5, barras negras). Durante la segunda parte del desarrollo (T_2), en 1 y 15 ‰ se produjo un incremento cercano al 40 y 30%, respectivamente en relación al volumen inicial, mientras que en 25 y 32 ‰ ese incremento fue tan solo alrededor de 17 y 5%, respectivamente. Considerando el periodo de desarrollo completo, desde la puesta de los huevos hasta la eclosión larval (T_3), se produjo un incremento del volumen en todos los tratamientos, variando significativamente entre las salinidades de cultivo (ANOVA: $F_{(3; 36)} = 71.4$; $P < 0,0001$). Tal incremento fue generalmente más alto en las salinidades más bajas, con máximos y mínimos valores de $\Delta VI-III$ de 60% y 5% registrados en los huevos incubados en 1 y 32 ‰, respectivamente (Fig. 5.5, barras blancas).

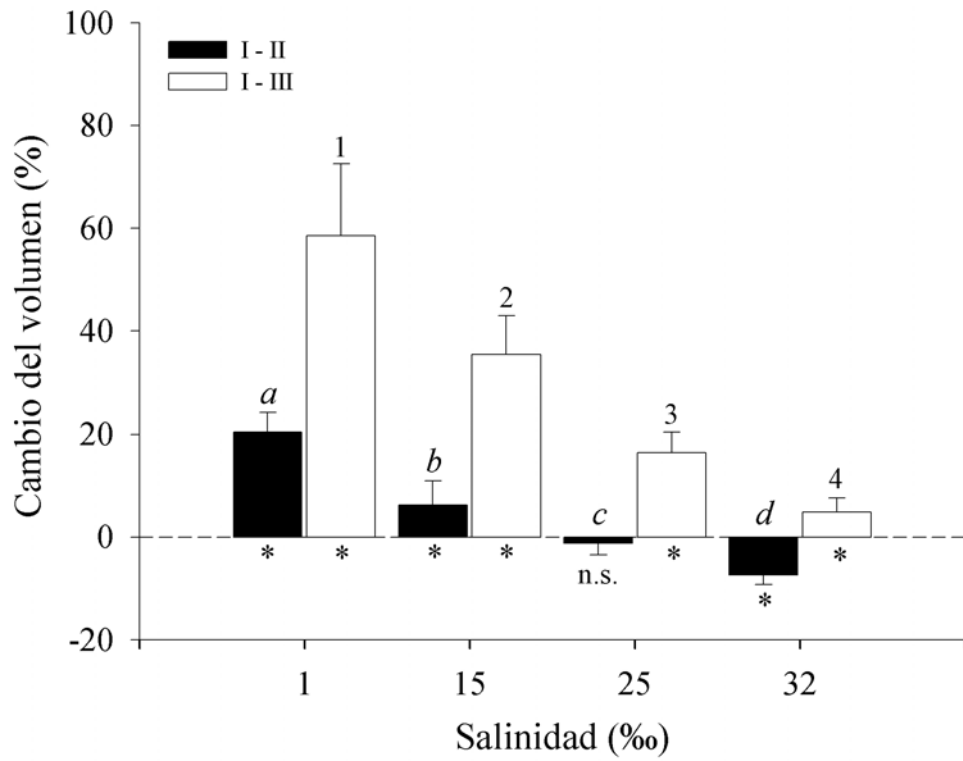


Figura 5.5. Cambio porcentual en el volumen de los huevos de *P. argentinus*. Las barras negras muestran el porcentaje de cambio entre los estadios I-II y las barras blancas entre los estadios I-III del desarrollo embrionario en 1, 15, 25 y 32 ‰. Media \pm 1 DE; inicial $n = 20$ huevos por camada y condición de salinidad, 10 camadas; letras y números distintos indican diferencias significativas entre salinidades (SNK, $P < 0,05$); los asteriscos debajo de las barras indican diferencias entre los volúmenes inicial (estadio I) y en el último estadio del desarrollo (test Student, $P < 0,05$, n.s. no significativo).

Larvas

Las larvas eclosionadas a partir de los embriones cultivados en 1 y 15 ‰ aún presentaban algunas gotas de vitelo aisladas, de amarillentas a transparentes (Fig. 5.6), tal como fue observado en larvas eclosionadas *in vivo* en agua de la canilla declorada. Por el contrario, todas las larvas eclosionadas de embriones cultivados en 25 y 32 ‰ presentaron una masa densa de vitelo de color marrón que ocupaba casi la totalidad del área bajo el caparazón. A pesar de las diferencias en la cantidad de vitelo remanente luego de la eclosión, las larvas eclosionadas de embriones cultivados en 1, 15 y 25 ‰ y mantenidas en las mismas condiciones de salinidad alcanzaron el segundo estadio de zoea (mudaron con éxito) sin alimentarse tras 4-5 días. Sin embargo, algunas de las larvas eclosionadas en 25‰ y los tres individuos que eclosionaron con éxito en 32 ‰ presentaron anomalías en el comportamiento (dificultades en la natación). Algunas presentaron también notorias deformaciones morfológicas como por ejemplo, el telson estaba curvado o ausente, dividido en dos, le faltaron setas o éstas estaban cortadas. Otras larvas eclosionadas en 25 ‰ no presentaron deformaciones y nadaban normalmente.

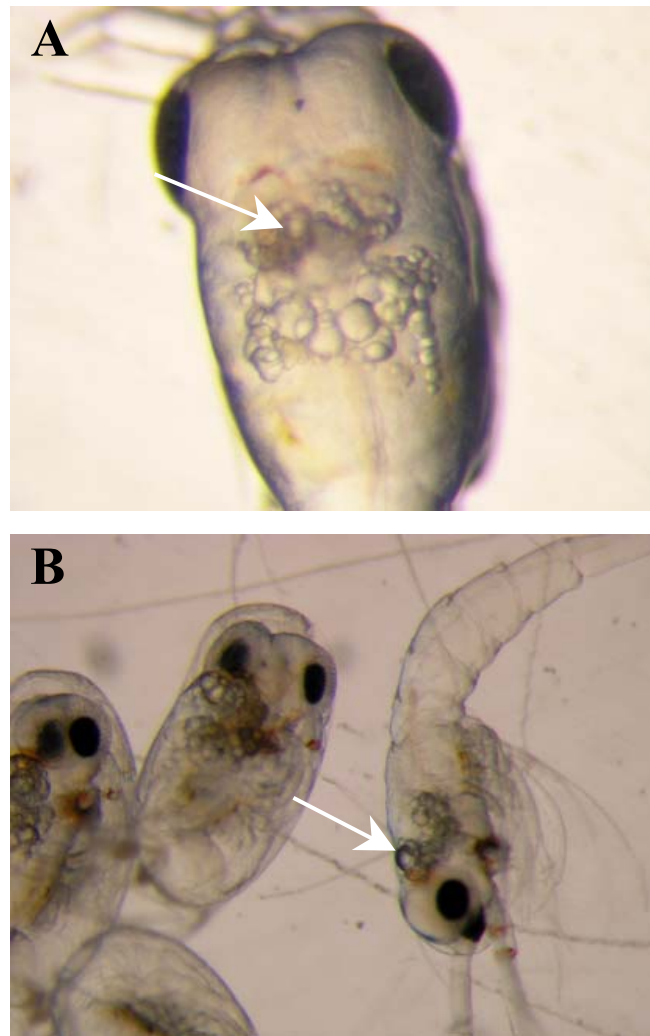


Figura 5.6. Larvas recién eclosionadas de *P. argentinus*. A) Vista dorsal de una larva proveniente de embriones cultivados en 1 ‰, la flecha indica las gotas de vitelo con aspecto oleoso. B) Larvas eclosionadas de embriones cultivados en 25 ‰, la flecha señala el vitelo de color marrón aún presente al eclosionar.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que los embriones de *Palaemonetes argentinus* fueron capaces de desarrollarse exitosamente desde la puesta hasta la eclosión en un amplio rango de salinidades, desde 1 a 25 ‰, excepcionalmente también en 32 ‰. Bajo las mismas condiciones, las larvas de esta especie pueden desarrollarse hasta la metamorfosis (Anger, com. pers.), los juveniles pueden crecer hasta alcanzar la madurez (Steinel, 2003), y la reproducción también es posible (Capítulo III). Por lo tanto, todos los estadios del ciclo de vida de este camarón pueden ser considerados extremadamente eurihalinos. Esto difiere no sólo de la mayoría de los decápodos marinos, sino también de las especies consideradas estrictamente de agua dulce como la langosta *Astacus leptodactylus*. En esa especie, el desarrollo embrionario y la eclosión son posibles únicamente en medios cuyas salinidades son <7 ‰, aunque los juveniles y adultos toleran concentraciones más altas (Susanto & Charmantier, 2001). Es sorprendente que los embriones del “camarón de agua dulce” *P. argentinus*, tanto como las larvas y juveniles, puedan desarrollarse con éxito en un rango tan amplio de salinidades. El rango de salinidades utilizado en el experimento es característico de ambientes estuariales costeros tales como la laguna Mar Chiquita (Anger *et al.*, 1994) pero no es habitual en las lagunas sin conexión con el mar como la Laguna de Chascomús (Quirós & Drago, 1999) de donde provenían los embriones del experimento. Considerando que los embriones son incapaces de explotar un medio ambiente más favorable para su desarrollo (a diferencia de larvas y juveniles) la elevada tolerancia a las altas salinidades reflejaría las condiciones experimentadas durante la evolución de la especie. Concretamente, los resultados sugieren que esta especie habría colonizado los ambientes de agua dulce en un tiempo evolutivamente reciente.

Los embriones de *P. argentinus* cultivados *in vitro* fueron aislados de cualquier potencial efecto materno. Por lo tanto, el exitoso desarrollo embrionario en el rango de

salinidades ensayados podría explicarse por alguno o una combinación de los siguientes mecanismos:

- 1) la protección pasiva de los embriones debido a una reducida permeabilidad a los iones de las membranas de los huevos y/o
- 2) la aparición de la habilidad de osmorregular durante la fase embrionaria.

Charmantier & Anger (1999) demostraron que el primer estadio larval de *P. argentinus* (zoea I) tiene la habilidad de hiper-osmorregular, y que dicha habilidad se incrementa gradualmente durante el desarrollo hasta el último estadio larval, en los juveniles y en los adultos. Es posible, entonces, que esa capacidad se origine en algún momento del desarrollo embrionario, más precisamente en los estadios avanzados del desarrollo cuando la mayoría de los órganos y tejidos presentes en la larva ya se han desarrollado en el embrión. Esto podría ser similar a lo que ocurre en *Astacus leptodactylus*, una especie estrictamente de agua dulce, donde se ha demostrado que la capacidad de hiper-osmorregulación se origina en los últimos estadios del desarrollo embrionario (Susanto & Charmantier, 2001). Asimismo, ambos mecanismos podrían estar ocurriendo de manera secuencial. Hacia el final del desarrollo embrionario de otros palemónidos, *Palaemonetes pugio* y *Macrobrachium borellii*, las membranas de los huevos se hacen más permeables a los iones y a moléculas hidrofóbicas (véase Glas *et al.*, 1997; Lavarías *et al.*, 2004). En *P. argentinus* también podría ocurrir algo similar y la capacidad para osmorregular sería efectiva cuando las membranas de los huevos ya no ofrecen una protección pasiva al embrión.

La duración del desarrollo embrionario de *P. argentinus* varió significativamente entre las camadas, producidas por diferentes hembras, incubadas en las mismas condiciones de salinidad. Dicha variación puede tener una base genética, como fue sugerido por Lee & Petersen (2002) para el copépodo invasor de los ambientes de agua dulce *Eurytemora affinis*. A pesar de la variabilidad interindividual, los efectos de la salinidad sobre el desarrollo embrionario fueron consistentes y significativos. Tanto la tasa de supervivencia como el

desarrollo de los embriones fueron similares en 1 y 15 ‰. Por el contrario, en las salinidades más altas la mortalidad mostró un claro incremento hacia el final del periodo de desarrollo embrionario, y las larvas tardaron más tiempo en alcanzar la eclosión. Además, las salinidades altas incrementaron la variabilidad en el tiempo de desarrollo dentro de una misma camada, por lo que las eclosiones fueron menos sincrónicas (Tabla 5.1).

En 25 y 32 ‰ se observó una aceleración de la morfogénesis durante la primera etapa del desarrollo embrionario, es decir el tiempo desde la puesta de los huevos hasta la aparición del latido cardíaco fue más corto bajo estas condiciones que en 1 y 15 ‰. Por otro lado, en las salinidades más altas el tiempo total del desarrollo embrionario (desde la puesta hasta las eclosiones larvales) se retrasó significativamente, y embriones y larvas presentaron deformaciones sugiriendo que la aceleración inicial en el desarrollo estuvo asociada con algún desorden patológico en la morfogénesis. Un retraso del desarrollo embrionario, deformaciones morfológicas o anormalidades en el comportamiento fueron observados en huevos y larvas de otros crustáceos cultivados bajo condiciones subóptimas de salinidad, por ejemplo en cirripedios (Crisp & Costlow, 1963; Barnes & Barnes, 1974), copépodos (Lee & Petersen, 2002), y cangrejos (Bas & Spivak, 2000; Bas, 2001).

El tamaño de los huevos en el estadio inicial del desarrollo embrionario varió significativamente entre camadas producidas por diferentes hembras, sin embargo, esa variación no estuvo correlacionada con el tamaño del cuerpo de las madres. Una variabilidad en el tamaño inicial de los huevos entre camadas ha sido también encontrada en otros invertebrados, como por ejemplo en el cangrejo estuarial *Neohelice granulata* (Bas & Spivak, 2000; Giménez & Anger, 2001; Giménez *et al.*, 2004). Esa variabilidad podría tener una base genética (Arthur, 2000), y/o estar ambientalmente controlada (Bayne & Honkoop, 2003; Piersma & Drent, 2003). Ambos fenómenos han sido observados en los camarones palemónidos (véase por ejemplo Wong & McAndrew, 1990; Mashiko & Numachi, 2000; Dimmock *et al.*, 2004).

A pesar de la variabilidad intraespecífica en el tamaño de los huevos, la respuesta a la salinidad fue similar en diferentes camadas. En las salinidades más altas (25 y 32 ‰) el volumen de los huevos en el estadio II no cambió o disminuyó respecto del volumen inicial (estadio I) (Tabla 5.4; Fig. 5.5). La disminución del tamaño de los huevos durante el desarrollo embrionario en esas salinidades se explica por una pérdida pasiva de agua a través de la membrana del huevo (el medio de cultivo tiene una mayor concentración de iones que el medio interno de los huevos, esa concentración desigual de iones crea el gradiente para que el agua se mueva desde el interior de los huevos hacia el medio de cultivo). Ese decremento inicial del volumen fue más pronunciado en los huevos incubados en 32 ‰ lo que pudo provocar daños fisiológicos irreversibles en el embrión en formación. En 25 ‰ ese efecto fue más débil, por lo que esos daños pudieron no ocurrir o ser mayormente reparados; de hecho, en esta salinidad eclosionaron larvas de todas las camadas (Tabla 5.1).

Al final del periodo del desarrollo embrionario el volumen de los huevos se incrementó en todos los tratamientos, especialmente en las salinidades más bajas. Esto puede explicarse porque las membranas de los huevos se hacen más permeables hacia el final del desarrollo embrionario permitiendo un incremento en la entrada de agua y el aumento de la presión hidrostática, los que facilitarían el proceso de eclosión larval (Charmantier & Aiken, 1987; Charmantier & Charmantier-Daures, 2001; Susanto & Charmantier, 2001). El incremento en el volumen de los huevos durante el transcurso del desarrollo embrionario también fue observado en otros camarones palemónidos (ejemplo Mashiko, 1982; 1983^a; Lavarías *et al.*, 2002) y en otros crustáceos decápodos (Wear, 1974), y probablemente se relacione no solo con la entrada de agua desde el medio externo sino también con la producción de agua metabólica (uno de los productos de la respiración) durante el transcurso del desarrollo (Anger *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2003).

En 25 y 32 ‰, los embriones próximos a eclosionar y las larvas recién eclosionadas de *P. argentinus* mantuvieron una mayor cantidad de vitelo que en las salinidades menores,

mientras que las deformaciones en embriones y larvas ocurrieron exclusivamente en esos cultivos. Esta observación es interesante porque muestra que las mayores reservas de vitelo mantenidas hacia el final de desarrollo embrionario no reflejan necesariamente una condición que incremente la supervivencia de una larva. Esto podría explicarse por una ineficiente movilización de energía del vitelo para la morfogénesis y los procesos vitales. Las lipo-proteínas son el principal componente del vitelo (Adiyodi, 1988; Sibert *et al.*, 2004), los lípidos son usados mayoritariamente como fuente de energía metabólica durante el desarrollo embrionario (Wehrtmann & Graeve, 1998; González-Baró *et al.*, 2000; Heras *et al.*, 2000; García-Guerrero *et al.*, 2003; Graeve & Wehrtmann, 2003; Rosa *et al.*, 2003), mientras que las proteínas constituyen el componente elemental para la construcción de los tejidos y órganos del embrión (Babu 1987; Subramoniam, 1991; García-Guerrero *et al.*, 2003). Es posible que el estrés osmótico afecte el catabolismo de las lipo-proteínas del vitelo de los embriones de *P. argentinus*, por lo que embriones y larvas retienen una mayor cantidad de vitelo, mientras que la organogénesis se retarda causando deformaciones morfológicas y del comportamiento en las larvas eclosionadas en agua de mar.

La primera zoea de *P. argentinus* es claramente un estadio larval que puede alimentarse, pero también es capaz de desarrollarse hasta el segundo estadio larval en ausencia absoluta de alimento. Esta alta, aunque temporalmente limitada, independencia de la comida (o lecitotrofia facultativa; para más ejemplos entre los Palaemonidae y otros crustáceos decápodos véase Anger, 2001) sería una adaptación a hábitats con una producción de plancton variable e impredecible. Un ejemplo sería el arroyo Sotelo, cuyas fuertes corrientes superficiales podrían transportar a las zoeas recién eclosionadas hasta la laguna costeras adyacentes de Mar Chiquita donde las condiciones nutricionales son más estables permitiendo el subsiguiente desarrollo larval planctotrófico (Anger *et al.*, 1994; Spivak 1997).

La habilidad para osmorregular, presumiblemente en combinación con una reducida permeabilidad a los iones de las membranas de los huevos habría permitido a los crustáceos decápodos como *P. argentinus* colonizar los ambientes estuariales y, posteriormente los cuerpos de agua dulce. Sin embargo, estos rasgos adaptativos podrían estar inicialmente ausentes y desarrollarse durante los últimos estadios del desarrollo embrionario. Futuras investigaciones podrían incluir estudios comparativos sobre los presumibles mecanismos pasivos de protección osmótica durante la ontogenia (reducción en permeabilidad; Rainbow & Black, 2005), el momento de la aparición de las estructuras osmorregulatorias durante el desarrollo, su función, incluida la actividad de la Na⁺-K⁺-ATPasa (véase Cieluch *et al.*, 2004; 2005) y la expresión de los genes que codifican para esa enzima clave (Scott *et al.*, 2004).

VARIABILIDAD INTERPOBLACIONAL EN LAS RESPUESTAS EMBRIONARIAS

El mismo experimento “*in vitro*” fue realizado en tres oportunidades diferentes (27/11/03, 17/01/03 y 3/01/04) con los embriones de *P. argentinus* procedentes de la población del Arroyo Vivoratá (AV). En total se cultivaron aproximadamente 2000 embriones, pero el éxito de esta técnica fue muy bajo en comparación con los resultados obtenidos para los embriones de Chascomús (Tabla 5.5). El hecho de haber probado el experimento en años diferentes y con embriones de distintos periodos reproductivos sugiere que el bajo éxito de la técnica no se relaciona con un inconveniente experimental, sino más bien con una característica inherente de la población de AV. Por esa razón y con el objeto de no entorpecer la comprensión de los resultados del trabajo, se discuten a continuación las diferencias más notables del cultivo embrionario “*in vitro*” entre las poblaciones de LC y AV.

Tabla 5.5. Supervivencia y tiempo hasta la eclosión para los embriones de Vivoratá (AV) cultivados *in vitro* en las mismas condiciones experimentales. La información para Chascomús (LC) se muestra con fines comparativos.

Salinidad	Nº camadas (nº huevos)	% de eclosión	Nº de camadas no viables	Tiempo para el desarrollo (días)
Arroyo Vivoratá				
1	24 (480)	1	23	23
15	24 (480)	43,7 ± 17,9 *	8	22,8 ± 1,5
25	24 (480)	2	22	23,5 ± 0,5
32	24 (480)	1	23	22
Laguna Chascomús				
1	10 (186)	72,61 ± 18,9	0	23,7 ± 0,6
15	10 (198)	79,1 ± 11,6	0	23,5 ± 0,5
25	10 (200)	20,5 ± 10,6	0	25,5 ± 1
32	10 (200)	1,5 ± 3,2	8	26 ± 2

*Calculado sobre el número de camadas viables; **1** y **2** solo uno y dos embriones alcanzaron la eclosión.

Los embriones de la población de AV fueron menos tolerantes a los tratamientos salinidad que aquellos procedentes de LC (Fig. 5.7). En particular, en la salinidad más baja (1 ‰) la mortalidad embrionaria ocurrió por un incremento desproporcionado del volumen de los huevos los que finalmente explotaron, especialmente luego de haber alcanzado el estadio II del desarrollo (Fig. 5.8). Sólo se registraron eclosiones exitosas en 15 ‰ (Tabla 5.5). En conclusión, los embriones provenientes de AV no se desarrollaron con éxito cuando fueron cultivados *in vitro* pero alcanzaron la eclosión cuando fueron incubados por sus madres (Capítulo IV). Los resultados del cultivo *in vitro* para los embriones de LC y de AV sugieren una diferencia entre las poblaciones en cuanto a la tolerancia a la salinidad en los primeros estadios de la ontogenia de la especie.

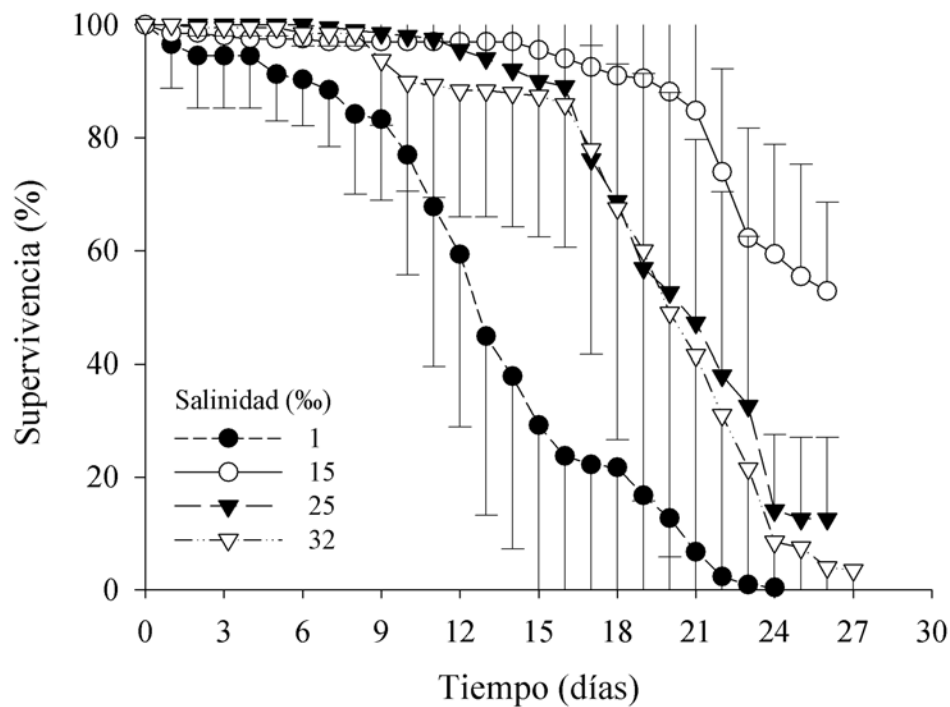


Figura 5.7. Supervivencia de los embriones de *P. argentinus* procedentes de Vivoratá cultivados en 1, 15, 25 y 32‰. Los símbolos representan la media \pm 1 DE de las 24 camadas con 20 huevos cada una al inicio del experimento.

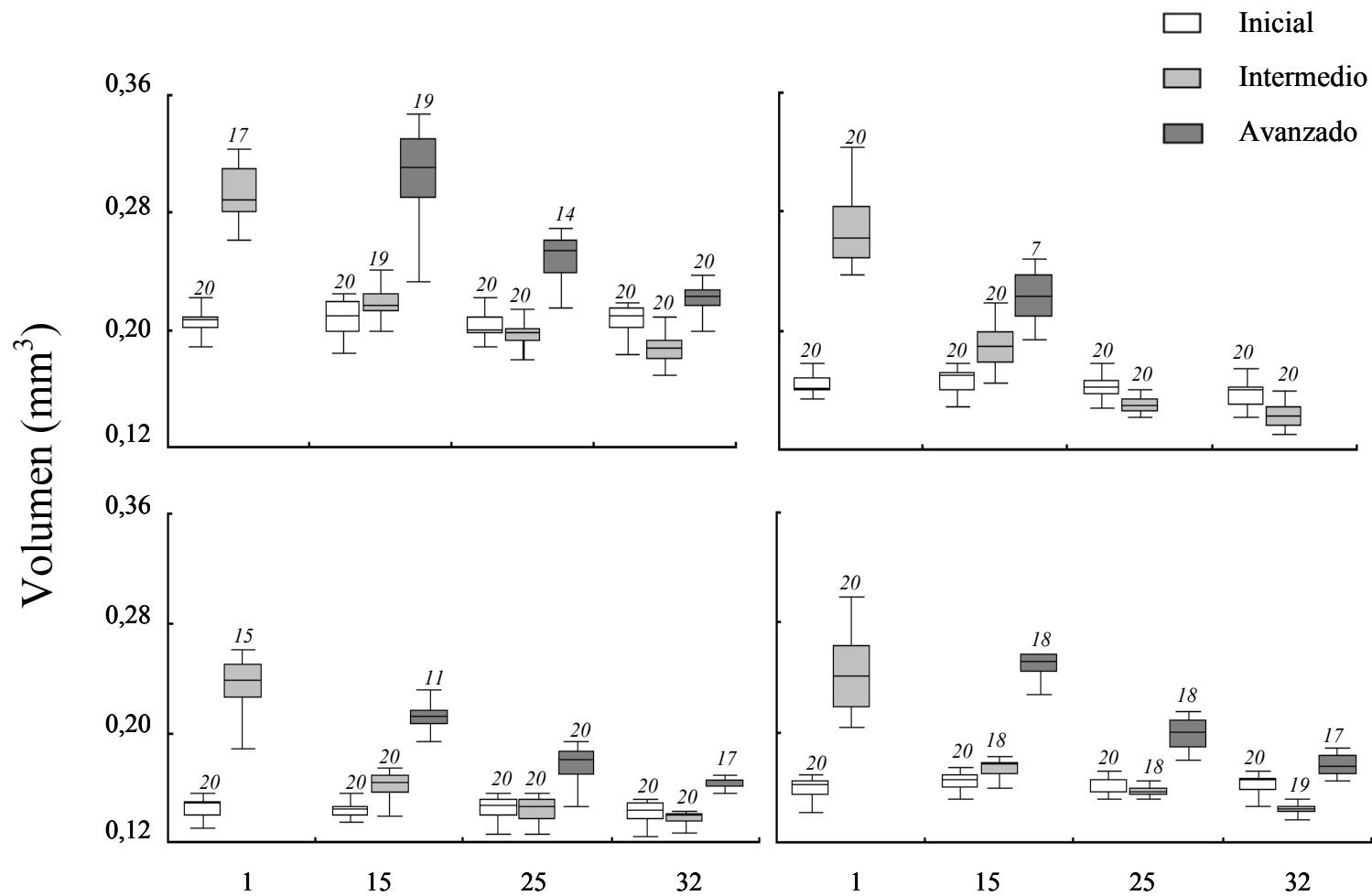


Figura 5.8. Variación del volumen (mm^3) de los huevos de *P. argentinus* durante el desarrollo embrionario en 1, 15, 25 y 32 % para la población de Vivotatá. Cuatro camadas como ejemplos. Las cajas muestran el 25th, 50th (mediana) y 75th percentiles. Las barras los volúmenes extremos más altos y más bajos. Cajas blancas, gris claro y oscuro representan los estadios inicial, intermedio y avanzado del desarrollo, respectivamente. Los números sobre las cajas indican el total de huevos medidos para cada estadio.

A diferencia de los embriones de AV, los de LC fueron capaces de desarrollarse aislados de la potencial influencia materna. Aparentemente los embriones de AV dependen de las condiciones de incubación generadas por sus madres para el exitoso desarrollo en condiciones de salinidad extremas. La importancia del ambiente generado por las hembras sobre el éxito para el desarrollo embrionario ha sido demostrada en algunas especies de anfípodos (Morrit & Spicer, 1996a; 1996b).

Otra de las diferencias notables entre las poblaciones ocurrió a nivel de los eventos morfogenéticos del embrión. En los embriones de ambas poblaciones, la formación de los ojos y del corazón ocurrió durante los días 10-12 del cultivo (mismo periodo de tiempo), pero el orden de formación de esos órganos fue diferente entre las poblaciones e independiente de la salinidad del cultivo. Por ejemplo, los lóbulos y manchas oculares se formaron en primer lugar y luego se observó el latido cardíaco en alrededor del 60% de los embriones de AV (Fig. 5.9). Esto jamás fue observado durante la diferenciación embrionaria en LC. En un 30 y un 80% de los embriones de AV y LC, respectivamente, la formación de los ojos y el latido cardíaco ocurrieron simultáneamente. Mientras que en un porcentaje menor, 5 y 18% para los embriones de AV y LC respectivamente, se observó el latido cardíaco y aproximadamente 1-2 días después la formación de los ojos.

La morfogénesis de los órganos mencionados se mantuvo entre estrechos límites de tiempo, sugiriendo que el periodo para la organogénesis puede ser un carácter canalizado. En cambio, existió plasticidad intra e interpoblacional en la secuencia o en el orden de la formación de dichos órganos. La pregunta que surge de estas observaciones es: cómo se refleja en el fenotipo adulto (morfológico y/o fisiológico) esa variación en los eventos morfogenéticos en una etapa presumiblemente tan sensible como la embrionaria. Las variaciones en la secuencia de los eventos del desarrollo podrían ser la base de un cambio evolutivo (véase Mabee *et al.*, 2000; Clark, 2005; Spicer & Rundle, 2006). En tal sentido, sería muy interesante cuantificar mediante un experimento debidamente planificado las

variaciones intraespecíficas en la secuencia de los eventos del desarrollo embrionario en *P. argentinus*.

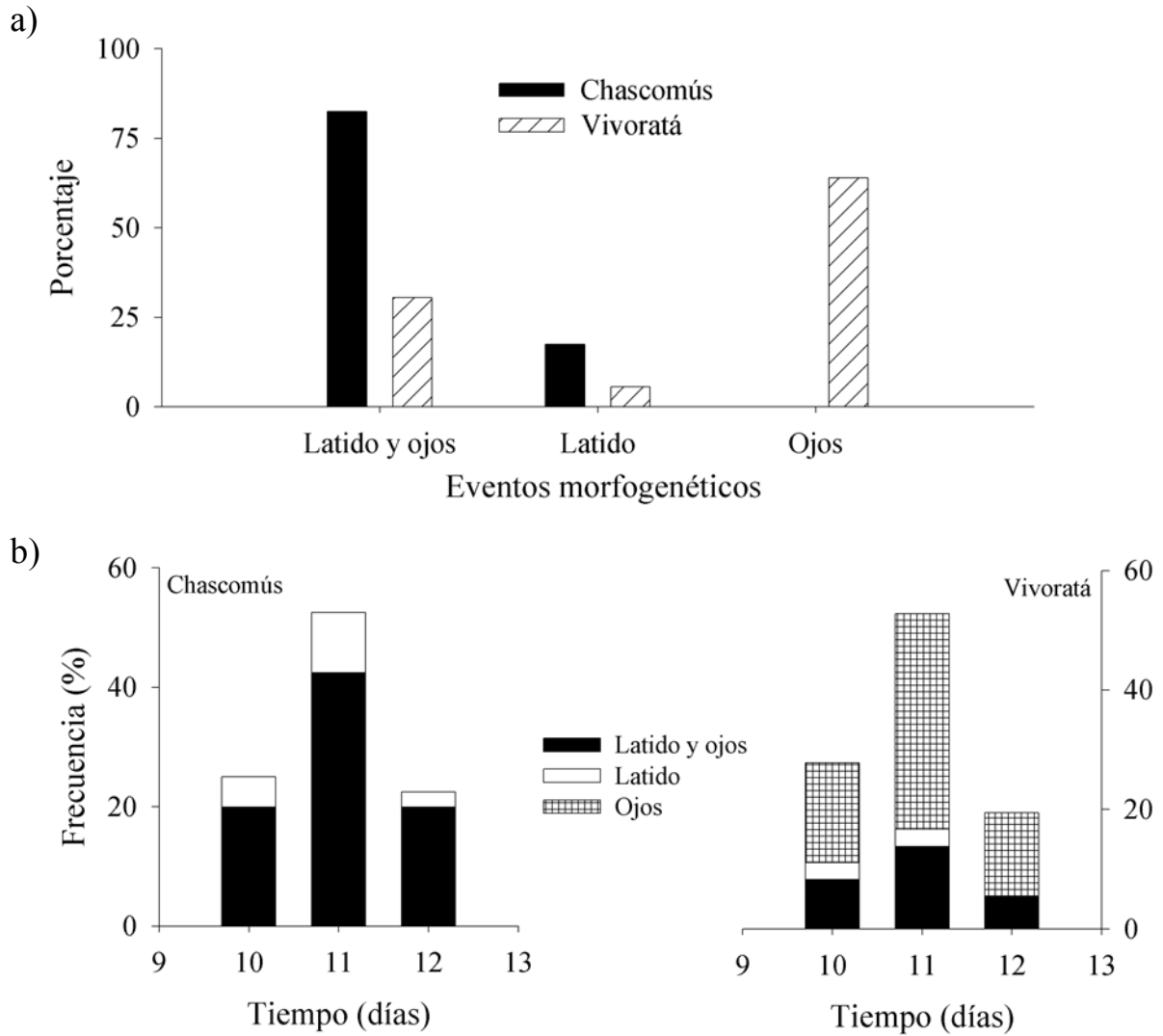


Figura 5.9. Eventos organogenéticos en los embriones de Chascomús y Vivoratá. **a)** Porcentaje de los eventos observados en los embriones de ambas poblaciones: latido y ojos simultáneamente, latido y ojos separados por 1-2 días en su aparición; **b)** Porcentaje de los mismos eventos discriminados en el tiempo (día de cultivo) que fueron observados. Porcentajes calculados sobre un total de 38 y 20 cultivos para LC y AV, respectivamente (un cultivo = 20 embriones al inicio del experimento). En el caso de AV se consideraron solo aquellos cultivos en los que los embriones alcanzaron la eclosión.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los embriones de *P. argentinus* provenientes de Chascomús (LC) completaron con éxito el desarrollo en un amplio rango de salinidades (1-25 ‰, excepcionalmente en 32 ‰). Debido a que en esa laguna las salinidades no superan 1 ‰, los resultados sugieren que *P. argentinus* habría colonizado dicho ambiente de agua dulce en un tiempo evolutivo reciente.

El exitoso desarrollo *in vitro* de los embriones provenientes de LC en las distintas salinidades podría explicarse por dos mecanismos que ocurrirían de manera secuencial: la protección pasiva de los embriones debido a una reducida permeabilidad de las membranas de los huevos a los iones en las etapas tempranas del desarrollo y la aparición de la habilidad de osmorregular durante una etapa avanzada del desarrollo embrionario.

La técnica de cultivo *in vitro* no funcionó con similar éxito en los embriones provenientes de la población de AV; pero éstos alcanzaron la eclosión en un amplio rango de salinidades cuando fueron incubados por sus madres (Capítulo IV). Los resultados indican que los embriones de AV dependen, en mayor grado que los de LC, del ambiente generado por las hembras para su exitoso desarrollo.

La variabilidad en la frecuencia del orden de los eventos morfogenéticos durante el desarrollo embrionario (dentro de cada población como entre las poblaciones) podría contribuir a la variación en los rasgos de historia de vida entre las poblaciones estudiadas.

CAPÍTULO VI

ACTIVIDAD Na^+ - K^+ -ATPASA EN EL “CAMARÓN DE AGUA DULCE”

Palaemonetes argentinus: VARIACIONES ONTOGENÉTICAS

Y CAMBIOS INDUCIDOS POR LA SALINIDAD

Los resultados de este capítulo fueron publicados en una revista internacional con referato:

ITUARTE, R.B., A.A. LÓPEZ MAÑANES, E.D. SPIVAK & K. ANGER. Activity of Na^+ - K^+ -ATPase in a “freshwater shrimp”, *Palaemonetes argentinus* (Caridea, Palaemonidae): ontogenetic and salinity-induced changes. *Aquatic Biology* (en prensa).

INTRODUCCIÓN

La eurihalinidad es la habilidad de un organismo acuático para tolerar amplias variaciones de salinidad sin comprometer sus procesos vitales. Esa habilidad requiere adaptaciones fisiológicas, bioquímicas, morfológicas y/o ecológicas que pueden variar durante la ontogenia. Dicha habilidad es característica de los organismos que viven en estuarios, lagunas costeras, manglares y pozas de mareas, donde las variaciones de salinidad ocurren tanto temporal como espacialmente en escalas locales pequeñas.

En las especies eurihalinas de crustáceos decápodos, las estrategias adaptativas así como los principales mecanismos fisiológicos y bioquímicos involucrados en la tolerancia a la salinidad han sido estudiadas casi exclusivamente en la fase adulta (revisiones en Péqueux, 1995; Lucu & Towle, 2003; Kirschner, 2004). En los estadios larvales, en cambio, las bases fisiológicas y las implicancias metabólicas de la tolerancia a la salinidad han recibido una atención creciente recién en los últimos años (Charmantier, 1998; Anger 2003), mientras que la fase embrionaria permanece al respecto menos investigada (Charmantier & Charmantier-Daures, 2001).

Al igual que en los adultos conoespecíficos, la eurihalinidad en la etapa larval se vincula frecuentemente a la capacidad para osmorregular (Read, 1984; Charmantier, 1998; Anger, 2001; Cieluch *et al.*, 2004; 2005; 2007). Aunque la evidencia experimental es escasa, principalmente por los problemas técnicos para muestrear y analizar hemolinfa a partir de los pequeños embriones de crustáceos, la información disponible sugiere que la capacidad osmorregulatoria podría desarrollarse durante esta etapa temprana de la ontogenia (ejemplos: Felder *et al.*, 1986; Susanto & Charmantier, 2001; Wilder *et al.*, 2001; Taylor & Seneviratna, 2005; Seneviratna & Taylor, 2006; Serrano *et al.*, 2007). Aún cuando similares mecanismos fisiológicos han sido encontrados en larvas y adultos de algunas especies (Read, 1984), en otras especies los cambios ontogenéticos en dichos mecanismos son drásticos y en general

están asociados a las migraciones de las distintas etapas del ciclo de vida entre habitats cuyas condiciones ambientales son diferentes (Charmantier, 1998; Anger 2001). En consecuencia, extrapolar los mecanismos bien conocidos en los adultos a las fases tempranas de la ontogenia podría generar conclusiones erróneas.

La regulación iónica y osmótica ocurre a través de dos mecanismos principales (Péqueux, 1995; Augusto *et al.*, 2007): (1) la regulación isosmótica intracelular, responsable del mantenimiento de los fluidos intracelulares y del volumen celular; (2) la regulación anisosmótica extracelular, que controla la osmolalidad en la hemolinfa, la composición iónica y el volumen del líquido extracelular. Además, los fluidos internos están protegidos de los cambios osmóticos desfavorables debido a la protección pasiva que ofrece la reducida permeabilidad del tegumento (Rainbow & Black, 2001).

La $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ (o “bomba de sodio”) es fundamental para la regulación osmótica en la mayoría de las células eucariotas (Balshaw *et al.*, 2001; Jorgensen *et al.*, 2003). Esta enzima tienen diversas funciones adicionales pero también cumple un rol clave en la osmorregulación extracelular. En los decápodos adultos expuestos a condiciones hipo-osmóticas la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ dirige la absorción activa de iones a través de los epitelios de transporte que están comúnmente localizados en las branquias y en la glándula antenal; en condiciones hiper-osmóticas actúa en la secreción de iones en la dirección opuesta (Augusto *et al.*, 2007 y citas allí). La capacidad de hiper-osmorregulación en medios diluidos se considera un prerrequisito clave para la intrusión en los ambientes continentales de agua dulce (véase Freire *et al.*, 2003). En ese escenario, el estrés hipo-osmótico pudo seleccionar el desarrollo temprano de las funciones osmorregulatorias durante la ontogenia incrementándose la tolerancia a las bajas salinidades en los primeros estadios del ciclo de vida. Sin embargo, los procesos homeostáticos de regulación iónica raramente han sido estudiados en los estadios larvales y embrionarios de los crustáceos decápodos (Charmantier, 1998; Charmantier & Charmantier-Daures, 2001).

Entre los decápodos, los camarones palemónidos pueden ser considerados modelos primarios para los estudios sobre adaptaciones fisiológicas asociadas con las intrusiones de los ambientes continentales por organismos marinos (Freire *et al.*, 2003). Esta familia de camarones carideos es un grupo particularmente importante y ecológicamente diverso, y pueden encontrarse en ambientes marinos, estuariales y también de agua dulce (Bauer, 2004). Existe un consenso general sobre el origen marino de este taxón, y la posterior colonización de los ambientes estuariales y de agua dulce (Freire *et al.*, 2003; Augusto *et al.*, 2007), y sobre que diversos géneros se encuentran aún en un procesos de radiación hacia los ambientes continentales presentando patrones adaptativos convergentes (ejemplo Murphy & Austin, 2005; Augusto *et al.*, 2007). Sin embargo, también en esta familia se conoce muy poco sobre la ontogenia de la osmorregulación, especialmente durante la fase embrionaria (Wilder *et al.*, 2001; Huong *et al.*, 2004; Augusto *et al.*, 2007).

Entre los Palaemonidae, el “camarón de agua dulce” *Palaemonetes argentinus* es un excelente modelo para estudiar las posibles adaptaciones fisiológicas a las condiciones salobres y de agua dulce. Su ciclo de vida puede completarse con similar éxito en agua dulce como en condiciones salobres (Capítulos III-V). Experimentos preliminares, sin embargo, han mostrado que las larvas se desarrollan preferentemente en condiciones salobres (5 – 15 ‰), independientemente de que provengan de poblaciones de agua dulce o de ambientes conectados con el mar (Cieluch, 2000; Anger com. pers.). Ello ha llevado a sugerir que *P. argentinus* no está aún completamente adaptado a las condiciones de agua dulce (Anger, 2001). Todos los estadios post-embrionarios de la especie hiper-osmorregulan en medios diluidos, pero osmoconforman en salinidades concentradas (Charmantier & Anger, 1999).

Cuando los embriones de esta especie se cultivaron *in vitro* (aislados de un potencial efecto materno) fueron capaces de sobrevivir y desarrollarse hasta la eclosión en un amplio rango de salinidades (1 - 25 ‰), a pesar del significativo incremento o disminución del volumen que ocurrió en agua dulce o en las condiciones salobres, respectivamente (Capítulo

V). Esos resultados sugirieron que al menos una limitada capacidad para osmorregular ocurriría por primera vez durante la ontogenia temprana de esta especie, aparentemente durante la fase embrionaria. Dicha función fisiológica está presente al momento de la eclosión y se incrementa gradualmente en los siguientes estadios post-embrionarios desde larvas hasta el juvenil (Charmantier & Anger, 1999). En los embriones, sin embargo, la eurihalinidad podría depender de una reducida permeabilidad de las membranas de los huevos (Rainbow & Black, 2001 op. cit.) y/o de que la habilidad para osmorregular se desarrolle en algún momento de la etapa embrionaria.

En este capítulo, se cuantificaron en *P. argentinus* las variaciones ontogénicas y los cambios inducidos por la salinidad en la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$. La repuesta de esta enzima frente a las variaciones de salinidad puede considerarse un indicio indirecto de la habilidad para osmorregular en los estadios tempranos de la ontogenia. La actividad enzimática se determinó en tres periodos diferentes del desarrollo embrionario, en el primer estadio larval y en los adultos luego de una breve exposición de todos esos estadios del ciclo de vida a tres tratamientos de salinidad (1, 15 y 25 ‰). Adicionalmente, los efectos de la salinidad sobre la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ fueron determinados en branquias de los camarones adultos, las cuales son consideradas el principal sitio de regulación iónica y osmótica (Péqueux, 1995).

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento experimental

Hembras con los ovarios desarrollados, hembras con huevos y machos de *P. argentinus* fueron recolectados en la Laguna de Chascomús (35° 36' S / 58° W), provincia de Buenos Aires, Argentina. La salinidad en esa laguna puede variar entre oligohalina (0,5 – 5 ‰) e hipohalina (< 0,5 ‰) dependiendo de las precipitaciones, la evaporación y los vientos (véase descripción detallada en Capítulo II). Al momento de los muestreos la salinidad de la laguna fue baja, osciló entre 0,4 - 0,5 ‰ y el rango de conductividad fue 0,97-1,13 mS cm⁻¹.

Los camarones fueron transportados al laboratorio en agua del sitio de muestreo. Antes del inicio de los experimentos, las hembras con huevos se mantuvieron al menos tres días en acuarios (30 x 30 x 50 cm) con agua de la canilla previamente declorada, con suministro de oxígeno constante, a una temperatura de 22 ± 2° C, fotoperíodo natural (ciclo 14 h luz: 10 h oscuridad) y en todos los casos los camarones fueron alimentados con alimento para peces TetraMin[®] Pro Tropical Crisps. Las hembras sin huevos y con los ovarios maduros se mantuvieron en un acuario diferente junto con los machos para obtener embriones en un estadio inicial del desarrollo (huevos recién fertilizados). Los acuarios fueron revisados dos veces por día.

Luego de inspeccionar cuidadosamente bajo lupa las hembras con huevos, tres estadios embrionarios fueron seleccionados para los experimentos: (1) embriones recientemente desovados sin diferenciación, 100% del volumen de los huevos ocupado por vitelo (embriones en un estadio inicial del desarrollo, SI); (2) embriones con ojos visibles como tenues líneas rojizas latido cardíaco presente aunque a menudo irregular, huevos con un 50-60% de vitelo (embriones intermedios, SII); (3) embriones con ojos completamente desarrollados, latido cardíaco regular, vitelo mayoritariamente consumido (embriones

próximos a eclosionar, SIII). Además, larvas y adultos completos (ambos machos y hembras sin huevos o sin ovarios desarrollados), y tejido branquial aislado de los adultos fueron utilizados en los experimentos.

Todos los estadios fueron abruptamente transferidos a 1, 15 y 25 ‰ (soluciones preparadas diluyendo agua de mar filtrada con agua de la canilla previamente declorada; papel de filtro Schleicher and Schuell 0859, tamaño de poro alrededor de 7-12 μm). Las ovígeras se mantuvieron 24 hs en cada tratamiento y posteriormente los embriones fueron cuidadosamente removidos del canal de incubación. Las larvas recientemente eclosionadas (zoea I, ZI) se obtuvieron a partir de hembras que llevaban embriones en SIII. Esas hembras se mantuvieron al menos dos días en recipientes individuales de 1,3 L, no fueron alimentadas y se observaron entre 2-3 veces al día, hasta que las larvas eclosionaron. Inmediatamente después de la eclosión, las larvas fueron expuestas a cada tratamiento por 24 hs y los adultos por 48h (véase Charmantier & Anger, 1999). Las branquias fueron extraídas de ambos lados, izquierdo y derecho, del canal branquial de los adultos con una pinza de puntas finas luego de anestesiar los camarones en hielo durante al menos 5 min. Durante el periodo de aclimatación a los tratamientos de salinidad los animales no fueron alimentados.

Determinación de la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$

La actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ fue medida en cinco réplicas (únicamente tres para el tejido branquial), utilizando 40-50 mg de peso húmedo de tejido por determinación. Una réplica estuvo compuesta por tres camadas de embriones o larvas, mientras que una réplica del estadio adulto (A) estuvo representada por un único camarón. Un pool de 10-12 adultos (= 1 réplica) fue necesario para alcanzar el mínimo peso húmedo necesario para determinar la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ en branquias aisladas. La preparación de los tejidos para la determinación enzimática siempre se realizó a 0° C. Todas las muestras fueron rápidamente procesadas en un medio que contiene 0,25 M sacarosa / 0,25 mM EGTA-Tris, pH 7,4; y

homogenizadas a 0° C con un homogeneizador manual a motor. Luego se les adicionó glicerol (1/3% v/v). Las muestras se mantuvieron siempre a 0° C, y la actividad Na⁺-K⁺-ATPasa fue determinada a la mayor brevedad posible.

La actividad Na⁺-K⁺-ATPasa fue determinada de acuerdo con el protocolo descrito por López Mañanes *et al.* (2002). La actividad total Mg⁺²-Na⁺-K⁺-ATPasa se determinó midiendo la hidrólisis de ATP en un medio de reacción que contiene 100 mM NaCl; 30 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 0,5 mM EGTA en 20 mM buffer Imidazol (pH 7,4). La actividad basal Mg⁺²-ATPasa se determinó en el mismo medio de reacción, pero sin KCl y en presencia de 1mM de ouabaína (inhibidor específico de la Na⁺-K⁺-ATPasa). La actividad Na⁺-K⁺-ATPasa se determinó como la diferencia entre ambos ensayos. Una alícuota de la muestra correspondiente (5µg de proteínas) se adicionó a la mezcla de reacción y se pre-incubó a 30° C por 5 min. La reacción comenzó con la adición de ATP (concentración final 5mM). La incubación se llevó a cabo a 30° C por 20 min; y fue detenida adicionando 2 ml del reactivo de Bonting frío (560mM ácido sulfúrico, 8,1 mM molibdato de amonio y 176mM sulfato ferroso). Luego de 20 min a temperatura ambiente la cantidad de fosfato liberado (Pi) se determinó leyendo la absorbancia a 700 nm del complejo fosfomolibdato reducido. Además, las proteínas fueron determinadas con el método de Bradford (1976) utilizando seroalbúmina bovina como estándar (0,96 mg ml⁻¹).

ANÁLISIS DE DATOS

Todos los valores fueron expresados como la media \pm error estándar (ES). Las diferencias en la actividad $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$ fueron comparadas entre los estadios del ciclo de vida y los tratamientos de salinidad con un ANOVA de dos factores. El mismo test se utilizó para determinar las diferencias en la actividad ($\text{Mg}^{+2} - \text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$) basal entre estadios y tratamientos de salinidad. Los efectos de los tratamientos de salinidad sobre la actividad $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$ en tejido branquial y, sobre la actividad basal fueron comparados con ANOVAs de un factor. Las comparaciones fueron realizadas luego de chequear que la distribución de los datos cumpliera con los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante los test de Kolmogorov-Smirnov y Cochran, respectivamente (Underwood, 1997). Cuando fue necesario, los datos fueron transformados. Cuando un ANOVA detectó un resultado significativo, las diferencias entre los tratamientos fueron determinadas *a posteriori* utilizando comparaciones planeadas (si hubo una interacción significativa) o el test de Student-Newman-Keuls (SNK) (Underwood, 1997).

RESULTADOS

La actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ fue detectada en los tres tratamientos de salinidad y en los cinco estadios ontogenéticos. En cada salinidad, la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ cambió significativamente entre los estadios del ciclo de vida de *P. argentinus* (Fig. 6.1; Tabla 6.1). En el tratamiento de salinidad más baja (1 ‰), la actividad fue detectada en los embriones recientemente desovados (SI). La actividad fue alrededor de 2 veces más alta en los embriones en SII respecto de SI ($17,7 \pm 4,3$ vs $6,9 \pm 1,4$ nmol $\text{Pi} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, respectivamente); sin embargo, esa diferencia no fue estadísticamente significativa. Un fuerte y significativo incremento en la actividad ocurrió en los embriones cercanos a eclosionar (SIII), alcanzando un valor máximo de $142,1 \pm 9,5$ nmol $\text{Pi} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. En los estadios post-embrionarios (ZI larvas y adultos), la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ fue significativamente más baja que en los embriones en SIII ($53,3 \pm 4,9$ y $43,4 \pm 6,1$ nmol $\text{Pi} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, respectivamente). En 15 y 25 ‰, los cambios ontogenéticos en la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ fueron similares a aquellos observados en 1 ‰ (Fig. 6.1).

Los tratamientos de salinidad concentrada (15 y 25 ‰) indujeron un incremento significativo en la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, sin embargo, también existió una interacción significativa entre los factores salinidad y estadios del ciclo de vida (Tabla 6.1). Esa interacción se debió a que la salinidad influenció la actividad enzimática en SIII y en los estadios post-embrionarios, pero no en los estadios embrionarios tempranos (SI, SII; Fig. 6.1).

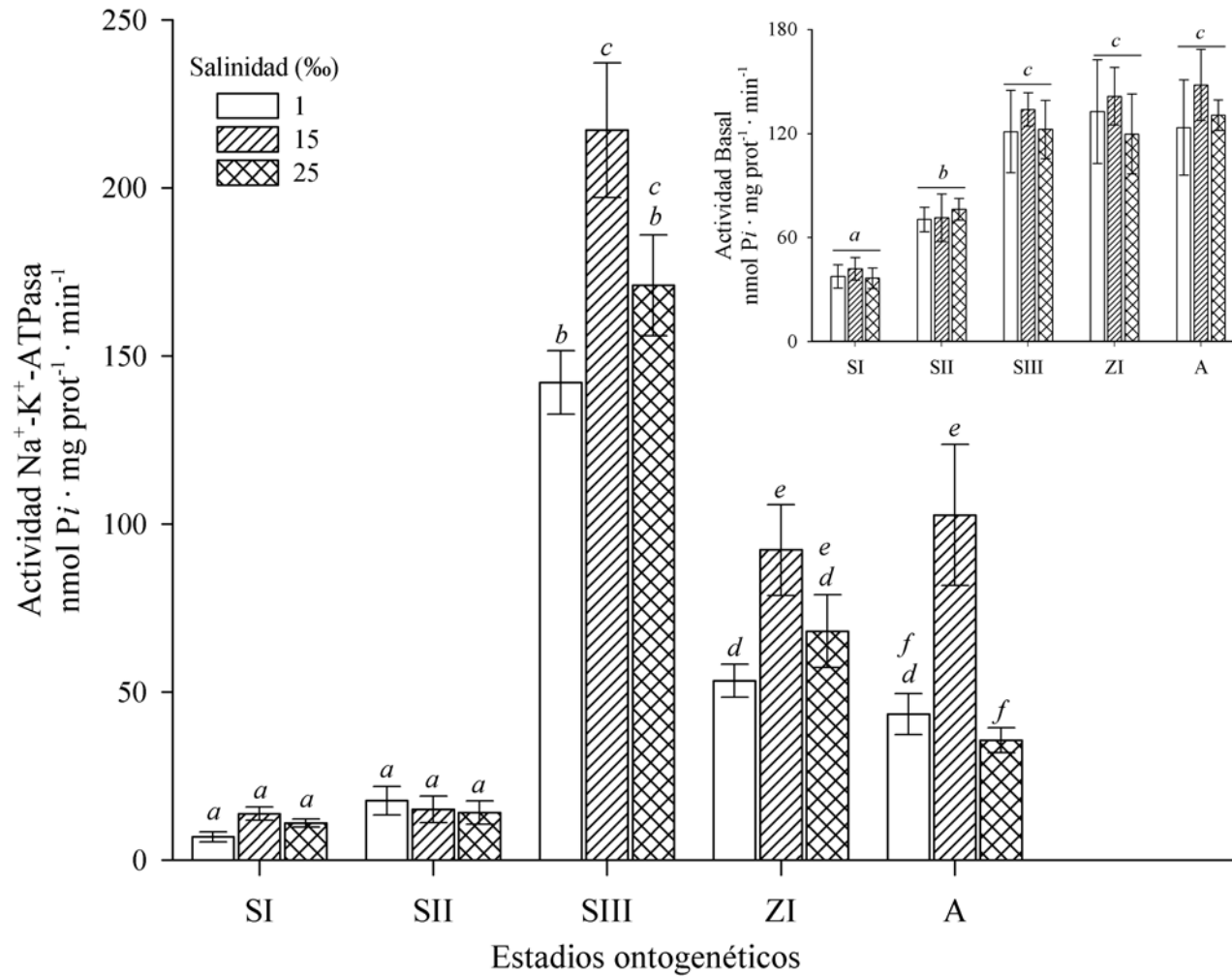


Figura 6.1. Variaciones ontogenéticas y cambios inducidos por la salinidad en la actividad Na⁺-K⁺-ATPasa en *P. argentinus*. Estadios embrionarios (SI, SII y SIII), primer estadio larval (ZI) y adulto completo (A). Letras distintas indican diferencias significativas entre los estadios ontogenéticos para un mismo tratamiento de salinidad o entre salinidades para el mismo estadio del ciclo (comparaciones planeadas, $P < 0,05$). Figura pequeña: actividad correspondiente a “otras” ATPasas, letras distintas indican diferencias significativas entre los estadios ontogenéticos (SNK, $P < 0,05$); las líneas indican no diferencias entre los tratamientos de salinidad.

Tabla 6.1. Estadísticos del ANOVA de dos factores para evaluar la actividad Na⁺-K⁺-ATPasa durante la ontogenia de *P. argentinus* (estadios: SI, SII, SIII, ZI y A) y los efectos de los tratamientos de salinidad (1, 15 y 25 ‰). En negrita los efectos significativos.

Fuente de variación	SC	g.l.	CM	F-ratio	P
Estadio	114,75	4	28,69	158,68	< 0,0001
Salinidad	4,92	2	2,46	13,62	< 0,0001
Estadio x Salinidad	3,60	8	0,45	2,49	= 0,02
Error	10,84	60	0,18		

SC: Suma de Cuadrados; *g.l.*: grados de libertad; CM: Cuadrados Medios; *F*: estadístico del test; *P*: probabilidad de error.

La actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ en branquias fue significativamente afectada por los tratamientos de salinidad ($F_{(2; 6)} = 25,86; P < 0,01$). La actividad fue más alta en 15 y 25 que en 1 ‰ (Fig. 6.2). Además, los niveles de actividad en este tejido fueron más altos que los observados en los camarones completos (Figs. 6.1 y 6.2).

La actividad basal ($\text{Mg}^{2+}\text{-Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$) varió significativamente entre los estadios del ciclo de vida ($F_{(4; 60)} = 33,77; P < 0,0001$), pero que no fue afectada por los tratamientos de salinidad ($F_{(2; 60)} = 0,79; P = 0,45$), y no hubo interacción entre los factores ($F_{(8; 60)} = 0,21; P = 0,99$). La actividad basal se incrementó significativamente desde el estadio SI hasta el SIII, y luego permaneció en un nivel similar (no hubo diferencias significativas entre SIII, ZI, A; véase figura pequeña en Fig. 6.1). De manera similar, la actividad basal no fue afectada por la salinidad en el tejido branquial ($F_{(2; 6)} = 0,39; P = 0,69$; véase figura pequeña en Fig. 6.2).

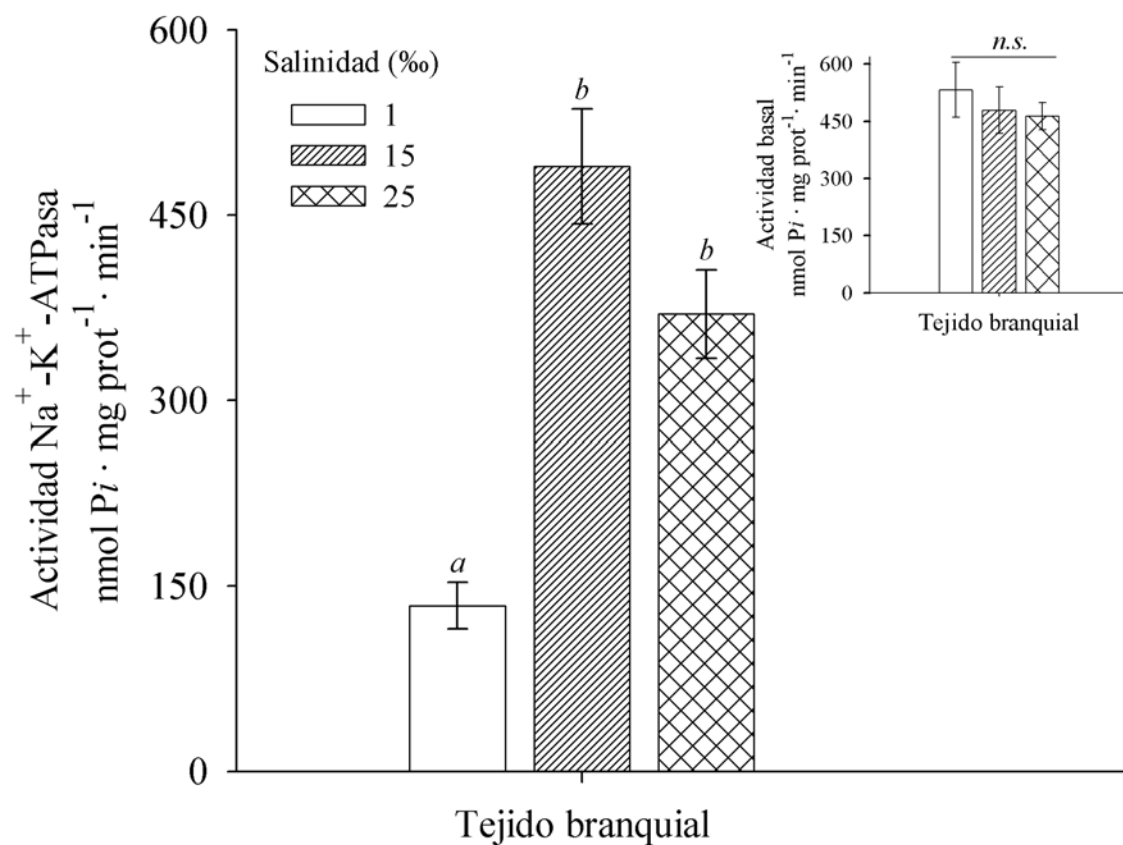


Figura 6.2. Cambios inducidos por la salinidad en la actividad Na⁺-K⁺-ATPasa en branquias aisladas de *P. argentinus*. Figura pequeña: actividad correspondiente a “otras” ATPasas. Letras distintas indican diferencias significativas; *n.s.* diferencias no significativas (SNK, $P < 0,05$).

DISCUSIÓN

Los resultados del estudio con *P. argentinus*, un camarón que vive en ambientes salobres y agua dulce, demostraron que la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, una enzima clave en la regulación iónica, varía durante la ontogenia y luego de los cambios de salinidad. La última respuesta fue similar en los embriones en SIII y en branquias aisladas de adultos, indicando que los mecanismos que son típicos de los adultos eurihalinos (un transporte activo de iones basado en la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$) comenzarían a ser funcionales en los estadios tempranos de la ontogenia, probablemente durante la fase final de la embriogénesis. Además, una reducida permeabilidad de las membranas de los huevos podría ser otro mecanismo adicional que ofrecería una protección pasiva a los embriones durante las primeras etapas del desarrollo, es decir antes del inicio de la habilidad para osmorregular.

Un incremento en la actividad de esta enzima clave durante el transcurso del desarrollo embrionario ha sido observada en varias especies de crustáceos decápodos. En los embriones de *P. argentinus*, la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ se incrementó hasta alrededor de 18 veces, dependiendo de las condiciones de salinidad (Fig. 6.1), de manera similar en una especie de camarón de agua dulce estrechamente relacionada, *Macrobrachium rosenbergii* de Man, 1879, la actividad fue alrededor de 15 veces más alta en los embriones cercanos a la eclosión respecto de aquellos recientemente desovados (Wilder *et al.*, 2001). En el camarón estuarino, *Callinassa jamaicense* var. *louisianensis* Schmitt 1935, la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ se incrementó alrededor de 12 veces durante el desarrollo embrionario (Felder *et al.*, 1986), y Taylor & Seneviratna (2005) documentaron un incremento de aproximadamente 50 veces en los embriones avanzados del cangrejo intermareal *Hemigrapsus crenulatus* Milne Edwards, 1837 respecto de aquellos en un estadio temprano del desarrollo.

Independientemente del hábitat (agua dulce, salobre o intermareal), los embriones de todas las especies mencionadas presentan una alta actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ cuando están

próximos a la eclosión. Mientras que este patrón sugiere que las estructuras osmorregulatorias serían funcionales durante la última etapa de la embriogénesis, la disminución posterior de la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ en las larvas y en los adultos (un resultado similar fue encontrado en *C. jamaicense*, Felder *et al.*, 1986) podría asociarse con otras funciones de ésta enzima clave (véase Balshaw *et al.*, 2001; Jorgensen *et al.*, 2003). El mayor nivel de actividad en los embriones avanzados (SIII) podría también estar relacionado con el mecanismo de eclosión, que involucra numerosos procesos bioquímicos y de reconstrucción ultraestructural (Saigusa, 1996). La mayor actividad de esta enzima causaría una rápida entrada de Na^+ , y en consecuencia, aumentaría la presión osmótica, seguida de una entrada pasiva de agua lo que llevaría a la ruptura de las membranas de los huevos y a la eclosión.

La actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ se expresa en células y tejidos especializados en la regulación iónica, los cuales se encuentran mayoritariamente en las branquias (ejemplos Péqueux, 1995; Charmantier, 1998; Torres *et al.*, 2007). Sin embargo, en *P. argentinus*, como en diversas especies de decápodos, la capacidad de hiper osmorregular está presente al momento de la eclosión, aunque las branquias funcionales generalmente están ausentes en los primeros estadios larvales (Felder *et al.*, 1986; Charmantier, 1998; Anger, 2001). En consecuencia, las células encargadas del transporte de iones deberían ubicarse en algún otro sitio diferente de las branquias durante las fases tempranas de la ontogenia. Algunos estudios histológicos y de microscopía electrónica han detectado tejidos involucradas en el transporte de iones en el órgano dorsal de embriones en cangrejos (véase Seneviratna & Taylor, 2006), en los branquiostegitos larvales y en las estructuras adyacentes asociadas al canal branquial (Felder *et al.*, 1986; Bouaricha *et al.*, 1994; Cieluch *et al.*, 2007). En larvas de *P. argentinus* Cieluch (2000) encontró evidencia ultraestructural de la presencia de células involucradas en el transporte de iones en los branquiostegitos. La localización de las células especializadas en el transporte de iones en los embriones, en cambio, deberá evaluarse en futuros estudios.

Las condiciones hiper osmóticas indujeron un incremento significativo en la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ en branquias de *P. argentinus*, mientras que esas condiciones no afectaron la actividad basal (Fig. 6.2). Además, los niveles de actividad fueron cualitativamente más altos en las branquias que en los camarones adultos completos, lo que sugiere que la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ es más abundante en esos órganos de transporte que en otras regiones del cuerpo. Esas observaciones corroboran el vínculo entre la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, el tejido branquial y el transporte de iones. Sin embargo, la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ ha sido localizada también en otros dos epitelios en la cámara branquial en adultos de camarones carideos, en los branquiostegitos y en epipoditos (Martinez *et al.*, 2005). Por lo tanto, la presente evidencia bioquímica de que en *P. argentinus* las branquias cumplen un rol en el transporte de iones podría ser confirmada mediante estudios de inmunolocalización en conjunto con la determinación de la expresión del ARN mensajero que codifica para esa enzima en ese tejido.

Mientras que los resultados de este capítulo reflejarían una consistente relación ecofisiológica entre la ontogenia, la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, la hiper osmorregulación en medios diluidos y la vida en condiciones salobres y de agua dulce, la respuesta a la salinidad más concentrada no es tan clara. *Palaemonetes argentinus* hiper osmorregula en salinidades desde 1 a 17 ‰, pero osmoconforma en salinidades > 20 ‰ (Charmantier & Anger, 1999). Entonces, el incremento de la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ en 15 ‰ es consistente con la habilidad para hiper osmorregular en condiciones de salinidad de moderada a baja. En cambio, el mayor nivel de actividad determinado en 25 ‰, condición donde la especie osmoconforma, podría asociarse con otras funciones de esta enzima, como por ejemplo en la regulación del volumen intracelular. El incremento de la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ en branquias de *P. argentinus* expuesto a salinidad concentrada (Fig. 6.2), es contrario al patrón observado en los cangrejos eurihalinos (ejemplos en Péqueux, 1995; Lucu & Towle, 2003; Kirschner, 2004), pero consistente con el incremento en los niveles de actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ en branquias de peces anádromos cuando son transferidos desde una condición

de salinidad reducida hacia el agua de mar (ejemplos Deane & Woo, 2004; Laiz-Carrión *et al.*, 2005 y citas allí; Bystriansky *et al.*, 2006). Las condiciones hiper osmóticas no afectaron la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ en las branquias del camarón dulceacuícola *Macrobrachium rosenbergii* (Wilder *et al.*, 2000). En otra especie de camarón de agua dulce, *M. olfersii* Wiegmann, 1836, por el contrario, la salinidad concentrada indujo una reducción en la superficie apical de las células especializadas en la regulación iónica del tejido branquial, eso pudo provocar una disminución en la permeabilidad a los iones y en la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ (Lima *et al.*, 1997; McNamara & Lima, 1997). Esos inconsistentes patrones de respuesta sugieren que la tolerancia a altas presiones osmóticas y los mecanismos de hipo osmorregulación relacionados no han sido completamente entendidos y necesitan ser evaluados con más detalle.

Valores bajos de los puntos isosmóticos reflejarían una buena adaptación a las condiciones de agua dulce (Augusto *et al.*, 2007). En los adultos de *P. argentinus* el punto isosmótico (500 mOsm kg^{-1} o 17 ‰; Charmantier & Anger, 1999) se asemeja al de otros palemónidos completamente adaptados a la vida en agua dulce, como por ejemplo *Macrobrachium brasiliense*, *M. equidens* y *M. potiuna* (521 , 529 , y 552 mOsm kg^{-1} , respectivamente; Augusto *et al.*, 2007). Sin embargo, *P. argentinus* de la población de Chascomús tiene también la capacidad para enfrentarse con un repentino incremento en la salinidad, aparentemente basado en un incremento de la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$. La regulación eficiente de esta enzima clave permitiría entonces a este “camarón de agua dulce” sobrevivir y reproducirse en un amplio rango de salinidades. Esta especie extremadamente eurihalina podría ser un modelo invertebrado conveniente para estudiar la modulación de los procesos fisiológicos involucrados en la tolerancia a la salinidad (véase por ejemplo, Deane & Woo, 2004). Por ejemplo, futuros estudios podrían revelar si el incremento en la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ está modulado por la activación de proteína existente y/o por una síntesis de

novo, y además cómo están regulados otros procesos claves, bioquímicos y moleculares, durante la ontogenia.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ varió significativamente durante la ontogenia de *P. argentinus* y fue afectada por los tratamientos de salinidad. La salinidad en cambio, no afectó la actividad de “otras” ATPasas (o actividad basal). En consecuencia, la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ podría estar involucrada en los mecanismos bioquímicos que permiten a *P. argentinus* tolerar cambios abruptos en la salinidad.

Los mayores niveles de actividad justo antes de la eclosión sugieren que la maquinaria bioquímica involucrada en las funciones osmorregulatorias de *P. argentinus* se expresa hacia el final de la etapa embrionaria; pero además, que la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ podría estar involucrada en otros mecanismos bioquímicos-moleculares como en el proceso de eclosión.

Los niveles de actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ fueron más altos en branquias aisladas que en los camarones enteros y fueron significativamente afectados por la salinidad, sugiriendo que esa enzima localizada en las branquias cumple un rol en las funciones osmorregulatorias en los adultos.

Las branquias funcionales están ausentes en los embriones y en los primeros estadios larvales. Por lo tanto, las células especializadas en el transporte de iones deben estar localizadas en otro/s sitio/s en los estadios ontogenéticos tempranos de *P. argentinus*.

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN GENERAL

Las respuestas de *Palaemonetes argentinus* en los experimentos de laboratorio, en los que solamente la variable salinidad fue manipulada, ofrecen evidencias a favor de la primera hipótesis postulada en esta tesis: **“*P. argentinus*, al igual que los representantes de familia Palaemonidae tendría su origen en el ambiente marino, de modo que la colonización / invasión de los ambientes estuariales y de agua dulce es un evento evolutivamente posterior”**. El factor salinidad varió sutilmente entre los ambientes de estudio seleccionados, e incluso en el periodo de 4 años en los que se realizaron los distintos muestreos nunca se registraron valores superiores a 3 ‰. A pesar de ello, todos los estadios ontogenéticos utilizados en esta tesis (embriones, zoeas I y adultos) fueron altamente tolerantes a los tratamientos de salinidades concentradas (15 y 25 ‰). Considerando que el ciclo de vida de este camarón se completa en aproximadamente 15 meses (Spivak, 1997) la mayoría de los individuos utilizados para los experimentos pertenecieron a generaciones (o cohortes) que estuvieron expuestos, la mayor parte del tiempo, a condiciones de salinidad inferiores a 3 ‰. Entonces, si *P. argentinus* no estuvo o no está expuesto regularmente, ya sea diaria o estacionalmente, a salinidades concentradas en los ambientes estudiados: ¿cómo se explica su alta tolerancia a esas salinidades?. Una posibilidad podría vincularse con su reciente historia evolutiva en los ambientes de agua dulce.

Un caso posiblemente análogo e interesante lo constituye el gasterópodo *Heleobia parchappii* d'Orbigny, 1835, el cuál ha sido utilizado en la reconstrucción paleoecológica de la evolución ambiental de los estuarios del sudeste de la provincia de Buenos Aires durante el último ciclo transgresivo-regresivo (De Francesco, 2002). El caracol *H. parchappii* se encuentra en la actualidad ampliamente distribuido en los ambientes de agua dulce tales como ríos, arroyos y lagunas someras, y recientemente se ha encontrado una población estable en un arroyo artificial cuya concentración salina varía entre 17 y 24 ‰ (De Francesco & Isla, 2004). Distintas investigaciones han llevado a concluir que *H. parchappii* habitó en

un pasado reciente ambientes de salinidad altamente fluctuante (De Francesco, 2002 y citas allí). De Francesco (2002) menciona en su tesis que la curva del nivel del mar propuesta para la provincia de Buenos Aires indica un máximo de 2,5m por encima del nivel actual a los 6.500-6.000 años antes del presente (dataciones hechas con el isótopo ^{14}C). Desde ese periodo hasta alrededor de los 5.000 años ^{14}C AP existen evidencias de numerosos eventos de aislamiento del mar probablemente como consecuencia de la formación de barreras medanosas. Esas barreras pudieron impedir el ingreso directo del agua de mar dando lugar a pequeñas lagunas salobres, y éstos pequeños cuerpos de agua salobre pudieron experimentar amplias fluctuaciones de salinidad ocasionadas por repetidos periodos de sequía e inundación ocurridos en la región pampeana durante el Holoceno (véase De Francesco, 2002 y citas allí). Considerando la reconstrucción paleoecológica de la región de estudio, y los resultados experimentales de este trabajo es posible que al igual que *H. parchappii*, *P. argentinus* haya estado expuesto a éstos ambientes de salinidad fluctuante en su pasado reciente.

El hecho que el “camarón de agua dulce” *P. argentinus* tenga la habilidad para reproducirse y desarrollarse con similar éxito en agua dulce como en salinidades de hasta 15 ‰ (Capítulos III - V), apoya la presunción del párrafo anterior. Aunque el éxito se redujo débilmente en la salinidad más concentrada (25 ‰) esa condición no restringió severamente la reproducción ni el desarrollo embrionario. De modo que la segunda hipótesis de este estudio que postulaba que “***P. argentinus*, puede reproducirse y desarrollarse en un amplio rango de salinidades puesto que habita tanto estuarios como cuerpos de agua dulce**” también fue corroborada. Aunque en este punto es importante recalcar que las poblaciones utilizadas en esta tesis, incluso la del Arroyo Vivoratá, se encontraron (al menos durante el periodo de estudio) sujetas a condiciones de salinidad cercanas al agua dulce.

La variabilidad en la mayoría de los rasgos de historia de vida entre las poblaciones consideradas en esta tesis no se correlacionó estrechamente con la salinidad. Así por ejemplo, los resultados obtenidos en los Capítulos II y IV sugieren que otras presiones selectivas

jugarían un papel importante en diferenciación fenotípica entre esas poblaciones. La diferencia intraespecífica en el tiempo de incubación, en la tolerancia a la salinidad de los embriones y en la organogénesis embrionaria entre las poblaciones podría ser el resultado de un desarrollo flexible asociado a las características hidrológicas-ecológicas locales, pero también el producto de una incipiente diferenciación genética.

En el escenario de las transiciones evolutivas, por ejemplo hacia los ambientes de agua dulce, el estudio comparativo entre poblaciones de conoespecíficos sujetas a condiciones diferenciales permitiría entender las causas de la divergencia fenotípica, y en último término de los eventos de especiación ecológica (Schluter, 2000). Numerosos estudios han reportado una rápida diferenciación fenotípica a nivel morfológico (Kristjánsson *et al.*, 2004; Kristjánsson, 2005), de comportamiento (Schaarschmidt & Jürss, 2003) y fisiológico (Lee *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2004) entre individuos de poblaciones marino-salobre y su contraparte dulceacuícola. En algunos casos se ha demostrado que luego del aislamiento de poblaciones marinas en ambientes estuariales y de agua dulce, la diferenciación fenotípica tiene un componente genético, demostrándose el origen de especies incipientes de agua dulce derivadas de ancestros marinos (Beheregaray & Sunnucks, 2001; Beheregaray *et al.*, 2002). Incluso en presencia de flujo génico, fuertes presiones selectivas diferenciales entre nichos o ambientes son suficientes para la evolución de poblaciones con distintas propiedades ecológicas, lo que en último término puede conducir a un evento de especiación (Dhuyvetter *et al.*, 2007 y citas allí).

Actualmente, en las lagunas de la limítrofe provincia de La Pampa tiene lugar un patrón de variación estacional en la salinidad debido a los periodos de sequías e inundaciones. Durante los periodos extremos de sequía en esa provincia, como por ejemplo el del verano de 2007, algunas lagunas alcanzaron concentraciones salinas de hasta 46mg/ml y otras tantas se secaron (Omar Del Ponti, comentario personal). La salinidad promedio en varias de las lagunas de esa provincia oscila entre 8 y 11 ‰, encontrándose en esos cuerpos

de agua poblaciones de *P. argentinus* y *H. parchappii* (De Francesco y Del Ponti, comentario personal). Presuntamente durante los periodos de extrema sequía la distribución de *P. argentinus* debe restringirse drásticamente y quizá no sobreviva en aquellos cuerpos donde la salinidad alcanza valores superiores a los del agua de mar. Sin embargo, en los periodos de inundación los individuos que sobrevivieron a las condiciones hiper salinas podrían volver a colonizar los cuerpos de agua disponibles (o esa colonización se realiza con individuos de poblaciones de agua dulce de otros sitios, o ambas posibilidades). Las preguntas que surgen de estas especulaciones son: ¿existirá un intercambio genético significativo entre las poblaciones de la Pampa y las de este estudio?, ¿subsidiarán las poblaciones de la Pampa a las de este estudio o viceversa?. Sería interesante determinar el grado de intercambio entre las poblaciones mencionadas, así como también intentar establecer la relación entre poblaciones ancestrales y derivadas mediante un estudio filogeográfico (véase Avise, 2000).

En el último capítulo se identificó uno de los componentes que a nivel bioquímico permitiría a los camarones procedentes de la Laguna de Chascomús tolerar una exposición abrupta a las altas concentraciones de salinidad. A diferencia de los crustáceos decápodos con una larga historia evolutiva en el agua dulce, todos los estadios ontogénicos de *P. argentinus* de esa localidad mostraron un alto grado de eurihalinidad, y toleraron tanto un cambio abrupto como uno gradual en la salinidad. De acuerdo con los resultados del Capítulo VI, los mecanismos fisiológicos-bioquímicos que permitirían a los adultos y larvas de *P. argentinus* hacer frente a las variaciones de salinidad, se expresarían durante la etapa embrionaria. El trabajo ofrece un punto de partida para futuras comparaciones en las que la respuesta a la salinidad durante la ontogenia pueda ser evaluada a un nivel fisiológico-bioquímico e incluso morfológico entre poblaciones de *P. argentinus*.

Finalmente, este estudio ha ofrecido información básica sobre la reproducción y desarrollo de *P. argentinus*. Aunque los resultados y la información teórica han sido enmarcados en un contexto ecológico-evolutivo, es necesario enfatizar que dicha información

puede ser utilizada como punto de partida para varios estudios aplicados. Considerando que *P. argentinus* es el único camarón palemónido presente en las lagunas del sureste de la provincia de Buenos Aires, su papel ecológico en estos ambientes no ha sido profundamente explorado. Solo para ejemplificar ese punto, las especies del género *Palaemonetes* tienen un rol clave en el ciclo de nutrientes en estuarios y lagunas costeras norteamericanos, tanto por su alta abundancia como por su modo trófico (ejemplos: Bell & Coull, 1978; Reinsel *et al.*, 2001 y citas allí; Haertel-Borera *et al.*, 2004). Éstas especies funcionan como intermediarios claves en las cadenas tróficas en esos ambientes (Bauer, 2004), y un rol similar fue sugerido para *P. argentinus* en los ambientes pampeanos (González Sagrario, 2004). Además, las especies del género *Palaemonetes* han sido ampliamente utilizadas durante muchos años como organismos bioindicadores de contaminación y en investigaciones toxicológicas (ejemplos: American Public Health Association (APHA). 1975; Cochran & Burnett, 1996; Key *et al.*, 1998; Lund *et al.*, 2000). De hecho, Reinsel *et al.* (2001: 231) afirman que “debido al significado ecológico de las especies de éste género, ellas pueden utilizarse como potenciales centinelas de la integridad de los ecosistemas.” En consecuencia, la información sobre el ciclo de vida de una especie que potencialmente tiene un rol clave en los ambientes acuáticos de nuestra región resulta fundamental para el desarrollo de futuros proyectos aplicados, incluidos aquellos que involucren la evaluación del estado y conservación de éstos ambientes.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS GENERALES

El “camarón de agua dulce” *Palaemonetes argentinus* tiene la capacidad para reproducirse y desarrollarse en salinidades concentradas.

La extrema eurihalinidad de todos sus estadios ontogenéticos no se vincula con la baja concentración iónica y salina de los ambientes estudiados, lo que sugiere que *P. argentinus* estuvo expuesto en su pasado reciente a condiciones de salinidad diferentes de las actuales.

Considerando la historia paleogeográfica de la región de estudio, *P. argentinus* pudo habitar cuerpos de agua salobre que experimentaron fluctuaciones de salinidad en el último ciclo transgresivo-regresivo.

Las diferencias intraespecíficas observadas entre las poblaciones estudiadas serían el resultado de una flexibilidad en los eventos ontogenéticos tempranos (por ejemplo en el patrón de desarrollo larval) ó de una diferenciación genética incipiente.

Un estudio filogeográfico permitiría determinar el grado de similitud-diferencia entre las poblaciones que actualmente habitan en las lagunas costeras del Atlántico (las que potencialmente podrían considerarse ancestrales) y aquellas localizadas en los ambientes de agua dulce.

Las contrastantes características hidrológicas locales de los ambientes estudiados contribuiría a la variabilidad en los rasgos de historia de vida entre las poblaciones de *P. argentinus*. Identificar el conjunto de factores bióticos (depredación, mortalidad edad-específica, competencia, parasitismo) y abióticos locales (velocidad de corrientes, disponibilidad de

alimento, e incluso los efectos de contaminantes) que potencialmente determinan dicha variación requiere de estudios comparativos entre el campo y el laboratorio. Además, la utilización de diferentes técnicas (moleculares, fisiológicas, morfológicas, etc.) permitiría un abordaje integral del por qué de dicha variación, pero también la formulación de preguntas específicas asociadas con las herramientas utilizadas.

LITERATURA CITADA

- ADIYODI, R.T. 1988. Reproduction and Development. Pp. 139-185. En: W.W. Burggren & B.R. McMahon (eds.). *Biology of Land Crabs*. Cambridge University Press, New York.
- ALDERICE, D.F. 1988. Osmotic and ionic regulation in teleost eggs and larvae. Pp. 253-346. En: W.S. Hoar & D. J. Randall (eds.). *Fish Physiology*. Vol XI, The physiology of Developing Fish. Part A, Eggs and Larvae. Academic Press, New York.
- ALEKHNovich, A.V. & V.F. KULESH. 2001. Variation in the parameters of the life cycle in prawns of the genus *Macrobrachium* Bate (Crustacea, Palaemonidae). *Russian Journal of Ecology*, 32: 420-424.
- ALON, N.C. & S.E. STANCYK. 1982. Variation in life-history patterns of the grass shrimp *Palaemonetes pugio* in two south Carolina estuarine systems. *Marine Biology*, 68: 265-276.
- American Public Health Association (APHA). 1975. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington D.C. 1193 pp.
- ANGER, K. 1995. The conquest of freshwater and land by marine crabs: adaptations in life-history patterns and larval bioenergetics. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 193: 119-145.
- ANGER, K. 2001. *The Biology of Decapod Crustacean Larvae*. Crustacean Issues, Vol. 14., A.A. Balkema, Lisse, The Netherlands. 419 pp.
- ANGER, K. 2003. Salinity as a key parameter in the larval biology of decapod crustaceans. *Invertebrate Reproduction and Development*, 43: 29-45.
- ANGER, K. 2005. The early life history of *Sesarma fossarum*, an endemic freshwater crab from Jamaica. *Invertebrate Reproduction and Development*, 47: 63-72.
- ANGER, K. 2006. Contributions of larval biology to crustacean research: a review. *Invertebrate Reproduction and Development*, 49: 175-205.
- ANGER, K. & G.S. MOREIRA. 1998. Morphometric and reproductive traits of tropical caridean shrimps. *Journal of Crustacean Biology*, 18: 823-838.
- ANGER, K., G. MOREIRA & D. ISMAEL. 2002. Comparative size, biomass, elemental composition (C, N, H), and energy concentration of caridean shrimp eggs. *Invertebrate Reproduction & Development*, 42: 83-93.
- ANGER, K. & C.D. SCHUBART. 2005. Experimental evidence of food-independent larval development in endemic Jamaican freshwater-breeding crabs. *Physiological and Biochemical Zoology*, 78: 246-258.

- ANGER, K., E. SPIVAK, C. BAS, D. ISMAEL & T. LUPPI. 1994. Hatching rhythms and dispersion of decapod crustacean larvae in a brackish coastal lagoon in Argentina. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 48: 445-466.
- ANGER, K., G. TORRES & U. NETTELMANN. 2007. Adaptive traits in ecology, reproduction and early life history of *Sesarma meridies*, an endemic stream crab from Jamaica. *Marine and Freshwater Research*, 58: 743-755.
- ANTONOPOULOU, E. & R. EMSON. 1989. The combined effects of temperature and salinity on survival, moulting and metamorphosis of the larval stages of three species of palaemonid prawns. Pp. 339-347. En: Ryland, J.S. & P.A. Tyler (eds.). *Reproduction, Genetics and Distributions of Marine Organisms*. European Marine Biology Symposia, 23. Olsen and Olsen Publishers, Fredensborg, Denmark.
- ARENDR, J.F & D.N. REZNICK. 2005. Evolution of juvenile growth rates in females guppies (*Poecilia reticulata*): predator regime or resource level?. *Proceedings of the Royal Society B*, 272: 333-337.
- AUGUSTO, A., L.J. GREENE, H.J. LAURE & J.C. MCNAMARA. 2007. The ontogeny of isosmotic intracellular regulation in the diadromus, freshwater palaemonid shrimps *Macrobrachium amazonicum* and *M. olfersi* (Decapoda). *Journal of Crustacean Biology*, 27: 626-634.
- AVISE, J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press. 447 pp.
- AZEVEDO, O.C.L., E.F.C. PESSANO, D.S. TOMASSONI, M.V.M. QUEROL & E. QUEROL 2004. Aspectos da biologia e ecologia de *Palaemonetes argentinus* (Nobili, 1901) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae), no arroio Felizardo, bacia do médio Rio Uruguay, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brasil. *Biotemas*, 17: 91-106.
- BABU, D.E. 1987. Observations on the embryonic development and energy source in the crab *Xantho bidentatus*. *Marine Biology*, 95: 123-127.
- BALSHAW, D.M., L.A. MILLETTE & E.T. WALLICK. 2001. Sodium pump function. Pp. 261-268. En: N. Sperelakis (ed.). *Cell Physiology Source Book: a molecular approach*. Academic Press, San Diego.
- BARNES, H. & M. BARNES. 1974. The responses during development of the embryos of some common cirripedes to wide changes in salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 15: 197-202.
- BAS, C.C. 2001. Efecto de la salinidad y la temperatura sobre el ciclo de vida de cangrejos estuariales (Decapoda, Grapsidae). Tesis Docoral. Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina.

- BAS, C.C. & E.D. SPIVAK. 2000. Effect of salinity on embryos of two southwestern Atlantic estuarine crab species cultured *in vitro*. *Journal of Crustacean Biology*, 20: 647-656.
- BASS, C.S., S. BHAN, G.M. SMITH & J.S. WEIS. 2001. Some factors affecting size distribution and density of grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) populations in two New Jersey estuaries. *Hydrobiologia*, 450: 231-241.
- BAUER, R. 1991. Analysis of embryo production in a caridean shrimp guild from a tropical seagrass meadow. Pp 181-191. En: E. Wenner & A. Kuris (eds.). Crustacean egg Production. A.A. Balkema, Brookfield.
- BAUER, R.T. 2004. *Remarkable Shrimps: Adaptations and Natural History of the Carideans*. University of Oklahoma Press, Norman. 282 pp.
- BAUER, R.T. & J.H. ABDALLA. 2000. Patterns of brood production in the grass shrimp *Palaemonetes pugio* (Decapoda: Caridea). *Invertebrate Reproduction and Development*, 38: 107-113.
- BAUER, R.T. & G.J. HOLT. 1998. Simultaneous hermaphroditism in the marine shrimp *Lysmata wurdemanni* (Caridea: Hippolytidae): An undescribed sexual system in decapod Crustacea. *Marine Biology*, 132: 223-225.
- BAYNE, B.L. & P.J.C. HONKOOP. 2003. Phenotypic flexibility. *Trends in Ecology & Evolution*, 18: 554-555.
- BEGON, M., C.R. TOWNSEND & J.L. HARPER. 2006. *Ecology: from individual to ecosystems*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford. 759 pp.
- BEHEREGARAY, L.B. & P. SUNNUCKS. 2001. Fine-scale genetic structure, estuarine colonization and incipient speciation in the marine silverside fish *Odontesthes argentinensis*. *Molecular Ecology*, 10: 2849-2866
- BEHEREGARAY, L.B., P. SUNNUCKS & D.A. BRISCOE. 2002. A rapid fish radiation associated with the last sea-level changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 269: 65-73.
- BELL, S.S. & B.C. COULL. 1978. Field evidence that shrimp predation regulates meiofauna. *Oecologia* (Berlin), 35: 141-148.
- BERASAIN, G.E., D.C. COLAUTTI, M.R. LENICOV & C.A. VELASCO. 2005. Variaciones estacionales e históricas de las especies ícticas de la Laguna Chascomús. *Biología Acuática*, 22: 47-58.
- BOSCHI, E.E. 1981. Decapoda Natantia. En: Fauna de agua dulce de la República Argentina. Vol. 26, FECIC, Buenos Aires, 61 pp.

- BOUARICHA, N., M. CHARMANTIER-DAURES, P. THUET, J.P. TRILLES & G. CHARMANTIER. 1994. Ontogeny of osmoregulatory structures in the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Biological Bulletin*, 186: 29-40.
- BOUCHON, D. 1991. Biological clock in seasonal reproductive cycle in the ditch shrimp *Palaemonetes varians* Leach. II. Ovarian state-dependent response to non-diel light-dark cycles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 146: 13-26.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding. *Annals of Biochemical*, 72: 248-254.
- BRAY, D.M. 1976. A review of two Western Australian shrimps of the genus *Palaemonetes*, *P. australis* Dakin 1915 and *P. atrinubes* Sp. Nov. (Decapoda, Palaemonidae). *Records of the Western Australian Museum*, 4: 65-84.
- BYSTRIANSKY, J.S., J.G. RICHARDS, P.M. SCHULTE & J.S. BALLANTYNE. 2006. Reciprocal expression of gill Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit isoforms α 1a and α 1b during seawater acclimation of three salmonid fishes that vary in their salinity tolerance. *Journal of Experimental Biology*, 209: 1848-1858.
- CALADO, R., C.B. BARTILOTTI & L. NARCISO. 2005. Short report on the effect of a parasitic isopod on reproductive performance of a shrimp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 321: 13-18.
- CAMPBELL, P.J. & M.B. JONES. 1990. Water permeability of *Palaemon longirostris* and other euryhaline caridean prawns. *Journal of Experimental Biology*, 150: 145-158.
- CARTER, M.J., M.A. LARDIES, R.F. NESPOLO & F. BOZINOVIC. 2004. Heritability of progeny size in a terrestrial isopod: transgenerational environmental effects on a life history trait. *Heredity*, 93: 455-459.
- CHARMANTIER, G. 1998. Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: a review. *Invertebrate Reproduction & Development*, 33: 177-190.
- CHARMANTIER, G. & D.E. AIKEN. 1987. Osmotic regulation in late embryos and prelarvae of the American lobster *Homarus americanus* H. Milne Edwards, 1837 (Crustacea, Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 109: 101-108.
- CHARMANTIER, G. & K. ANGER. 1999. Ontogeny of osmoregulation in the palaemonid shrimp *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Decapoda). *Marine Ecology Progress Series*, 181: 125-129.
- CHARMANTIER, G. & M. CHARMANTIER-DAURES. 2001. Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: the embryonic phase. *American Zoologist*, 41: 1078-1089.
- CHARMANTIER, G. & D.L. WOLCOTT. 2001. Introduction to the Symposium: Ontogenetic strategies of invertebrates in aquatic environments. *American Zoologist*, 41: 1053-1056.

- CIELUCH, U. 2000. Ultrastrukturelle Untersuchungen zum Einfluß von Salinität auf die Entwicklung von Transportepithelien bei *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Decapoda). MS dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Alemania.
- CIELUCH, U., K. ANGER, F. AUJOULAT, F. BUCHHOLZ, M. CHARMANTIER-DAURES & G. CHARMANTIER. 2004. Ontogeny of osmoregulatory structures and functions in the green crab, *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Experimental Biology*, 207: 325-336.
- CIELUCH, U., K. ANGER, M. CHARMANTIER-DAURES & G. CHARMANTIER. 2007. Osmoregulation and immunolocalization of Na⁺/K⁺-ATPase during the ontogeny of the mitten crab *Eriocheir sinensis* (Decapoda, Grapsoidea). *Marine Ecology Progress Series*, 329: 169-178.
- CIELUCH, U., G. CHARMANTIER, E. GROUSSET, M. CHARMANTIER-DAURES & K. ANGER. 2005. Osmoregulation, immunolocalization of Na⁺/K⁺-ATPase, and ultrastructure of branchial epithelia in the developing brown shrimp, *Crangon crangon* (Decapoda, Caridea). *Physiological and Biochemical Zoology*, 78: 1017-1025.
- CIONE, A.L. & A.M. BÁEZ. 2007. Peces continentales y anfibios cenozoicos de Argentina: los últimos cincuenta años. *Ameghiniana* 50° aniversario, 11: 195-220.
- CIONCHI, J.L., E.J. SCHNACK, J.R. ÁLVAREZ, E.M. BOCANEGA, J.E. BAGLIANO & J.J. DEL RÍO. 1982. Caracterización hidrogeológica y fisco-ambiental preliminar de la Laguna de Los Padres. Partido General Pueyrredón, Provincia de Buenos Aires. Centro de Geología de Costas del Cuaternario, Universidad Nacional de Mar del Plata. 72 pp.
- CLARK, P.F. 2005. The evolutionary significance of heterochrony in the abbreviated zoal development of pilumnine crabs (Crustacea: Brachyura: Xanthoidea). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 143: 417-446.
- CLARKE, A., C.C.E. HOPKINS & E.M. NILSEN. 1991. Egg size and reproductive output in the deep-water prawn *Pandalus borealis* Krøyer, 1838. *Functional Ecology*, 5: 724-730.
- COCHRAN, R.E. & L.E. BURNETT. 1996. Respiratory responses of the salt marsh animals, *Fundulus heteroclitus*, *Leiostomes xanthurus*, and *Palaemonetes pugio* to environmental hypoxia and hypercapnia and to the organophosphate pesticide, azinphosmethyl. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 195: 125-144.
- COLLINS, P. 2000. A new distribution record for *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) in Argentina (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, 73: 1167-1169.
- COLLINS, P. & S. CAPPELLO. 2006. Cypermethrin toxicity to aquatic life: bioassays for the freshwater prawn *Palaemonetes argentinus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51:79-85.

- COLLINS, P. & M. MONTAGNA. 2006. Riesgos y áreas potenciales para la acuicultura de crustáceos en Entre Ríos (Argentina). IV Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA2006. Pp. 1-7.
- COLLINS, P., V. WILLINER & F. GIRI. 2004. Crustáceos decápodos del litoral fluvial argentino. *Miscelánea*, 12: 253-264.
- COLLINS, P., V. WILLINER & F. GIRI. 2006. Trophic relationships in Crustacea Decapoda of a river with floodplain. Pp:59-86. En: Ashraf M.T. (ed). *Predation in Organisms: A Distinct phenomenon*. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- COLLINS, P., V. WILLINER & F. GIRI. 2007. Littoral Communities. Macrocrustaceans. Pp: 277-301. En: Iriondo M.H., J.C. Paggi y M.J. Parma (Eds.). *The Middle Paraná River: Limnology of a subtropical wetland*. Springer Verlag.
- CRISP, D.J. & J.D. COSTLOW JR. 1963. The tolerance of developing cirripede embryos to salinity and temperature. *Oikos*, 14: 22-34.
- DANGVAS, N.V. 1976. Descripción sistemática de los parámetros morfométricos considerados en las lagunas pampásicas. *Limnobiós*, 1: 35-59.
- DANGVAS, N.V. 2005. Los ambientes acuáticos de la provincia de Buenos Aires. Pp. 219-236. En: R.E. de Barrio, R.O. Etcheverry, M.F. Caballé & E. Llambías (eds). *Geología y Recursos Minerales de la Provincia de Buenos Aires*. Relatorio del XVI Congreso Geológico Argentino. La Plata, 2005.
- DANIELS, W.H., L.R. D'ABRAMO & K.F. GRAVES. 1994. Ovarian development of females of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) as influenced by temperature and photoperiod. *Journal of Crustacean Biology*, 14: 530-537.
- DÁVILA, C. 1996. Alometría y madurez sexual en *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Decapoda: Caridea). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de Mar del Plata. 34 pp.
- DEANE, E.E. & N.Y.S. WOO. 2004. Differential gene expression associated with euryhalinity in sea bream (*Sparus sarba*). *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287: R1054-R1063.
- DE FRANCESCO, C.G. 2002. Significado paleobiológico y paleoambiental de las concentraciones holocenas de *Heleobia* (Gastropoda) presentes en el sudeste de la provincia de Buenos Aires. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina. 109 pp.
- DE FRANCESCO, C.G. & F.I. ISLA. 2004. Reproductive period and growth rate of the freshwater snail *Heleobia parchappii* (d'Orbigny, 1835) (Gastropoda: Risssooidea) in a shallow brackish habitat (Buenos Aires province, Argentina). *Malacologia*, 45: 443-450.
- DONATTI, O.S. 1986. Algunos aspectos bioecológicos del camarón *Palaemonetes argentinus* (Nobili, 1901) en el embalse San Roque, Córdoba (Argentina). *Hidrobiologica tropical*. 19: 45-60.

- DHUYVETTER, H., F. HENDRICKX, E. GAUBLOMME & K. DESENDER. 2007. Differentiation between two salt marsh beetle ecotypes: evidence for ongoing speciation. *Evolution*, 61: 184-193.
- DIMMOCK, A., I. WILLIAMSON & P.B. MATHER. 2004. The influence of environment on the morphology of *Macrobrachium australiense* (Decapoda, Palaemonidae). *Aquaculture International*, 12: 435-456.
- DUMONT, L.F.C. & F. D'INCAO. 2004. Growth and reproductive pattern of the caridean shrimp *Palaemonetes argentinus*, Nobili, 1901 (Decapoda: Palaemonidae) in the South of Rio Grande do Sul, Brazil. *Nauplius*, 12: 151-163.
- FELDER, J.M., D.L. FELDER & S.C. HAND. 1986. Ontogeny of osmoregulation in the estuarine ghost shrimp *Callinassa jamaicensis* var. *louisianensis* Schmitt (Decapoda, Thalassinidea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 99: 91-105.
- FÉLIX, M.M. & A.M. PETRIELLA. 2003. Molt cycle of the natural population of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Palaemonidae) from Los Padres Lagoon (Buenos Aires, Argentina). *Iheringia Série Zoologia*, 93: 399-411.
- FREIRE, C.A., F. CAVASSIN, E.N. RODRIGUES, A.H. TORRES & J.C. MCNAMARA. 2003. Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 136: 771-778.
- GAGLIANO, M. & M.I. MCCORMICK. 2007. Maternal condition influences phenotypic selection on offspring. *Journal of Animal Ecology*, 76: 174-182.
- GARCÍA-GUERRERO, M., I.S. RACOTTA & H. VILLAREAL. 2003. Variation in lipid, protein, and carbohydrate content during the embryonic development of the crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology*, 23: 1-6.
- GELEMBIUK, G.W., MAY G.E. & C.E. LEE. 2006. Phylogeography and systematics of zebra mussels and related species. *Molecular Ecology*, 15: 1033-1050.
- GELIN, A., A.J. CRIVELLI, E. ROSECCHI & P. KERAMBRUN. 2001. Can salinity changes affect reproductive success in the brown shrimp *Crangon crangon*?. *Journal of Crustacean Biology*, 21: 905-911.
- GIMÉNEZ, L. & K. ANGER. 2001. Relationship among salinity, egg size, embryonic development, and larval biomass in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 260: 241-527.
- GIMÉNEZ L. & K. ANGER. 2003. Larval performance in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata*, is a consequence of both larval and embryonic experience. *Marine Ecology Progress Series*, 249: 251-264.

- GIMÉNEZ, L., K. ANGER & G. TORRES. 2004. Linking life history traits in successive phases of a complex life cycle: effects of larval biomass on early juvenile development in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata*. *Oikos*, 104: 570-580.
- GIMÉNEZ, L., & G. TORRES. 2002. Larval growth in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*: the importance of salinity experienced during embryonic development, and the initial larval biomass. *Marine Biology*, 141: 877-885.
- GOLDSTEIN, B. & L. LAURIA DE CIDRE. 1974. Ciclo de maduración sexual y observaciones preliminares sobre el desove del camarón dulceacuícola *Palaemonetes argentinus* (Nobili, 1901) (Crustacea, Caridea, Palaemonidae). I. Hembra. *Physis*, 33: 165-176.
- GONÇALVES, P.L. & N.F. FONTOURA. 1999. Dinâmica populacional de *Palaemonetes argentinus* na Lagoa Fortaleza, Rio Grande do Sul, Brasil (Decapoda, Palaemonidae). *Iheringia Série Zoologia*, 86: 171-182.
- GONZÁLEZ-BARÓ, M.R., H. HERAS & R.J. POLLERO. 2000. Enzyme activities involved in lipid metabolism during embryonic development of *Macrobrachium borelli*. *Journal of Experimental Zoology*, 286: 231-237.
- GONZÁLEZ- SAGRARIO, M.A. 2004. *Rol de las macrófitas sumergidas en las interacciones tróficas de lagos someros*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Comahue. Centro Regional Universitario Bariloche. 145 pp.
- GONZÁLEZ SAGRARIO, M.A. & E. BALSEIRO. 2003. Indirect enhancement of large zooplankton by consumption of predacious macroinvertebrates by littoral fish. *Archiv für Hydrobiologie*, 158: 551-574.
- GLAS, P.S., L.A. COURTNEY , J.R. RAYBURN & W.S. FISHER. 1997. Embryonic coat of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*. *Biological Bulletin*, 192: 231-242.
- GRAEVE, M. & I.S. WEHRTMANN. 2003. Lipid and fatty acid composition of Antarctic shrimp eggs (Decapoda: Caridea). *Polar Biology*, 26: 55-61.
- GREENWOOD, J.G., M.B. JONES & J. GREENWOOD. 1989. Salinity effects on brood maturation of the mysid crustacean *Mesopodopsis slabberi*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 69: 683-694.
- HAERTEL-BORERA, S.S., D.M. ALLEN & R.F. DAME. 2004. Fishes and shrimps are significant sources of dissolved inorganic nutrients in intertidal salt marsh creeks. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 311:79– 99.
- HANCOCK, M.A. & S.E. BUNN. 1997. Population dynamics and life history of *Paratya australiensis* Kemp, 1917 (Decapoda: Atyidae) in upland rainforest streams, south-eastern Queensland, Australia. *Marine and Freshwater Research*, 48: 361-369.

- HANCOCK, M.A., J.M. HUGHES & S.E. 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. *Oecologia*, 115: 483-491.
- HARRISON, K. 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. *Journal of Shelf Research*, 9: 1-28.
- HAVEL, J.E., C.E. LEE & M.J. VANDER ZANDEN. 2005. Do reservoirs facilitate invasions into landscapes? *BioScience*, 55: 518-525.
- HERAS, H., M.R. GONZALEZ-BARÓ & R.J. POLLERO. 2000. Lipid and fatty acid composition and energy partitioning during embryo development in the shrimp *Macrobrachium borellii*. *Lipids*, 35: 645-651.
- HOLDICH, D.M. 2001. *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science, Oxford. 720 pp.
- HUONG, D.T.T, V. JAYASANKAR, S. JASMANI, H. SAIDO-SAKANAKA, A.J. WIGGINTON & M.N. WILDER. 2004. Na/K-ATPase activity during larval development in the giant freshwater prawn *Macrobrachium resenbergi* and the effects of salinity on survival rates. *Fisheries Science*, 70: 518-520.
- ITUARTE, R.B., C. BAS, T.A LUPPI & E.D. SPIVAK. 2006. Interpopulational differences in the female reproductive cycle of the southwestern Atlantic estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura: Grapsoidea: Varunidae). *Scientia Marina*, 70: 709-718.
- ITUARTE, R.B., E.D. SPIVAK & K. ANGER. 2005. Effects of salinity on embryonic development of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) cultured *in vitro*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 47: 213-223.
- ITUARTE, R.B., E.D. SPIVAK & K. ANGER. 2007. Intraspecific variability in life-history traits of a "freshwater shrimp", *Palaemonetes argentinus*. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*, 43: 293-302.
- ITUARTE, R.B., E.D. SPIVAK & T.A LUPPI. 2004. Female reproductive cycle of the southwestern Atlantic estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura: Grapsoidea: Varunidae). *Scientia Marina*, 68: 127-137.
- JALIHAL, D.R., SANKOLLI K.N. & SHENOY S. 1993. Evolution of larval developmental patterns and the process of freshwaterization in the prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, 65: 365-376.
- JAYACHANDRAN, K.V. 2004. *Palaemonid prawns: biodiversity, taxonomy, biology and management*. Science Publishers, Enfield, N.H. 624 pp.
- JONSSON, B., N. JONSSON, E. BRODTKORB & P.-J. INGEBRIGTSEN. 2001. Life-history traits of brown trout vary with the size of small streams. *Functional Ecology*, 15:310-317.

- JORGENSEN, P.L., K.O. HÅKANSSON & S.J.D. KARLISH. 2003. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annual Review of Physiology*, 65: 817-849.
- KEY, P.B., M.H. FULTON, G.I. SCOTT, S.L. LAYMAN & E.F. WIRTH. 1998. Lethal and sublethal effects of malathion on three life stage of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Aquatic Toxicology*, 40:311-322.
- KEY, P.B., E.F. WIRTH & M.H. FULTON. 2006. A review of grass shrimps as, *Palaemonetes* spp., as a bioindicator of anthropogenic impacts. *Environmental Bioindicators*, 1: 115-128.
- KINNE, O. 1971. Salinity. Pp. 821-995. En: Kinne O. (ed.). *Marine Ecology. A Comprehensive, Integrated Treatise on Life in Oceans and Coastal Waters*. Vol. 1. Wiley, London.
- KIRSCHNER, L.B. 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *The Journal of Experimental Biology*, 207: 1439-1452.
- KRISTJÁNSSON, B.K. 2005. Rapid morphological changes in threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, in freshwater. *Environmental Biology of Fishes*, 74: 357-363.
- KRISTJÁNSSON, B.K., S. SKÚLASON & D.L.G. NOAKES. 2004. Unusual number of pectoral fin rays in an Icelandic population of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) recently isolated in freshwater. *Evolutionary Ecology*, 18: 379-384.
- LAIZ-CARRIÓN, L., P.M. GUERRERO, J. FUENTES, A.V.M. CANARIO, M.P. MARTÍN DEL RÍO & J. M. MANCERA. 2005. Branchial osmoregulatory response to salinity in the gilthead sea bream, *Sparus auratus*. *Journal of Experimental Zoology*, 303A: 563-576.
- LARDIES, M.A. & F. BOZINOVIC. 2006. Geographic covariation between metabolic rate and life-history traits. *Evolutionary Ecology Research*, 8: 1-16.
- LAVARÍAS, S., H. HERAS, S. DEMICHELIS, E. PORTIANSKY & R.J. POLLERO. 2002. Morphometric study of embryonic development of *Macrobrachium borellii* (Arthropoda: Crustacea). *Invertebrate Reproduction and Development*, 41: 157-163.
- LAVARÍAS, S., H. HERAS & R.J. POLLERO. 2004. Toxicity, uptake, and release of the water-soluble fraction of crude oil in different developing stages of the prawn *Macrobrachium borellii*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47: 215-222.
- LEE, C.E. 1999. Rapid and repeated invasions of fresh water by the copepod *Eurytemora affinis*. *Evolution*, 53: 1423-1434.
- LEE, C.E. 2000. Global phylogeography of a cryptic copepod species complex and reproductive isolation between genetically proximate "populations". *Evolution*, 54: 2014-2027.
- LEE, C.E. 2002. Evolutionary genetics of invasive species. A review. *Trends in Ecology & Evolution*, 17: 386-391.

- LEE, C.E. & M.A. BELL. 1999. Causes and consequences of recent freshwater invasions by saltwater animal. *Trends in Ecology & Evolution*, 14: 284-288.
- LEE, C.E. & B.W. FROST. 2002. Morphological stasis in the *Eurytemora affinis* species complex (Copepoda: Temoridae). *Hydrobiologia*, 480: 111-128.
- LEE, C.E. & C.H. PETERSEN. 2002. Genotype-by-environment interaction for salinity tolerance in the freshwater invading copepod *Eurytemora affinis*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 75: 335-344.
- LEE, C.E. & C.H. PETERSEN. 2003. Effects of developmental acclimation on adult salinity tolerance in the freshwater-invading copepod *Eurytemora affinis*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 76: 296-301.
- LEE, C.E., J.L. REMFERT & G.W. GELEMBIUK. 2003. Evolution of physiological tolerance and performance during freshwater invasions. *Integrative and Comparative Biology*, 43: 439-449.
- LEE, C.E., J.L. REMFERT & YU-MEI CHANG. 2007. Response to selection and evolvability of invasive populations. *Genetica*, 129: 179-192.
- LENICOV, R.M. & G.E. BERASAIN. 2001. Estudio de la Laguna La Brava (Pdo. Balcarce, Bs. As.). Campaña de relevamientos limnológicos e ictiológicos. Informe Técnico N° 30. Disponible en: <http://www.maa.gba.gov.ar/pesca/relevamientos.php>
- LENICOV, R.M. & G.E. BERASAIN. 2002. Estudio de la Laguna Los Padres (Pdo. de Gral. Pueyrredón). Campaña de relevamientos limnológicos e ictiológicos. Informe Técnico N° 39. Disponible en: <http://www.maa.gba.gov.ar/pesca/relevamientos.php>
- LIMA, A.G., J.C. MCNAMARA & W.T. RIBEIRO. 1997. Regulation of hemolymph osmolytes and gill Na⁺ /K⁺ - ATPase activities during acclimation to saline media in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 215: 81-91.
- LIU, M-Y., Y-X. CAI & C-S. TZENG. 2007. Molecular systematics of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) inferred from mtDNA sequences, with emphasis on East Asian species. *Zoological Studies*, 46: 272-289.
- LÓPEZ MAÑANES, A.A., C.D. MELIGENI & A.L. GOLDEMBERG. 2002. Response to environmental salinity of Na⁺- K⁺ ATPase activity in individual gills of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 274: 75-85.
- LOVEJOY, N.R., J.S. ALBERT & W.G.R. CRAMPTON. 2006. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical fishes. *Journal of South American Earth Sciences*, 21: 5-13.

- LOWE, B.T. & A.J. PROVENZANO JR. 1990. Survival and reproduction of *Palaemonetes paludosus* (Gibbes, 1850) (Decapoda: Palaemonidae) in saline water. *Journal of Crustacean Biology*, 10: 639-647.
- LUCU, C.D. & W. TOWLE. 2003. Na⁺ /K⁺-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 135: 195-214.
- LUND, S.A., M.H. FULTON & P.B. KEY. 2000. The sensitivity of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, embryos to organophosphate pesticide-induced acetylcholinesterase inhibition. *Aquatic Toxicology*, 48:127-134.
- MABEE, P.M., K.L. OLMSTEAD & C.C. CUBBAGE. 2000. An experimental study of intraspecific variation, developmental timing, and heterochrony in fishes. *Evolution, International Journal of Organic Evolution*, 54(6): 2091-2106.
- MAGALHÃES, C. 1986. The larval development of palaemonid shrimps from the Amazon Region reared in the laboratory. IV. The abbreviated development of *Palaemonetes ivonicus* Holthuis, 1950 (Crustacea: Decapoda). *Amazoniana*. 10: 67-78.
- MAGALHÃES, C. 1986/87. The larval development of palaemonid shrimps from the Amazon Region reared in the laboratory. V. The abbreviated development of *Pseudopalaemon chryseus* Kensley & Walker, 1982 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Acta Amazonica*, 16/17: 95-108.
- MAGALHÃES, C. 1988. The larval development of palaemonid shrimps from the Amazon Region reared in the laboratory. II. Extremely abbreviated larval development in *Euryrhynchus miers*, 1877 (Decapoda, Euryrhynchinae). *Crustaceana*, 55: 39-52.
- MAGALHÃES, C. 1989. The larval development of palaemonid shrimps from the Amazon Region reared in the laboratory. VI. Abbreviated development of *Macrobrachium nattereri* (Heller, 1862) (Crustacea: Decapoda). *Amazoniana*, 10: 379-392.
- MAGALHÃES, C. & N. MEDEIROS. 1998. The larval development of palaemonid shrimps from the amazon region reared in the laboratory. VII. Abbreviated development of *Pseudopalaemon amazonensis* Ramos-Porto, 1979 (Crustacea: Decapoda: Caridea). *Acta Amazonica*, 28: 433-448.
- MAGALHÃES, C. & I. WALKER. 1988. Larval development and ecological distribution of central Amazonian palaemonid shrimps (Decapoda, Caridea). *Crustaceana*, 55: 279-292.
- MAIZELS, P., E. ETCHEPARE, E. CHORNOMAZ, J. BUSTINGORRY, R. ESCARAY & V. CONZONNO. 2003. Parámetros abióticos y biomasa planctónica en la Laguna Chascomús (Provincia de Buenos Aires). Periodo de inundación 2002. *Biología Acuática*, 20: 6-11.
- MANTEL, L.H. & L.L. FARMER. 1983. Osmotic and Ionic Regulation. Pp. 53-161. En: L. Mantel (ed.). *The Biology of Crustacea*. Vol 5. Internal anatomy and physiological regulation. Academic Press, New York.

- MARCOVECCHIO, J., H. FREIJE, S. DE MARCO, A. GAVIO, L. FERRERO, S. ANDRADE, O. BELTRAME & R. ASTEASUAIN. 2005. Seasonality of hydrographic variables in a coastal lagoon: Mar Chiquita, Argentina. *Aquatic Conservation- Marine and Freshwater Ecosystems*, 15: 180-191.
- MARTINEZ, A.S., G. CHARMANTIER, P. COMPÈRE & M. CHARMANTIER-DAURES. 2005. Branchial chamber tissues in two caridean shrimps: the epibenthic *Palaemon adspersus* and the deep-sea hydrothermal *Rimicaris exoculata*. *Tissue and Cell*, 37: 153-165.
- MARTORELLI, S.R. & M. SCHULDT. 1990. Encapsulación de dos metacercarias (Digenea: Microphallidae) en *Cyrtograpsus angulatus* y *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Decapoda). *Revista de Biología Tropical*, 38: 295-304.
- 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. *Japanese Journal of Ecology*, 32: 445-451.
- MASHIKO, K. 1983a. Differences in the egg and clutch sizes of the prawn *Macrobrachium nipponense* (de Haan) between brackish and fresh waters of a river. *Zoological Magazine*, 92: 1-9.
- MASHIKO, K. 1983b. Comparison of growth pattern until sexual maturity between the estuarine and upper freshwater populations of the prawn *Macrobrachium nipponense* (de Haan) within a river. *Japanese Journal of Ecology*, 33: 207-212.
- MASHIKO, K. 1983c. Evidence of differentiation between the estuarine and upper freshwater population inhabiting the same water system in the long-armed prawn *Macrobrachium nipponense* (de Haan). *Zoological Magazine*, 92: 180-185.
- MASHIKO, K. 1987. Relationship between egg size and incubation time among the populations of two freshwater prawns. *Ecological Research*, 2: 97-99.
- MASHIKO, K. 1990. Diversified egg and clutch sizes among local populations of the fresh-water prawn *Macrobrachium nipponense* (de Haan). *Journal of Crustacean Biology*, 10: 306-314.
- MASHIKO, K. & K.I. NUMACHI. 1993. Genetic evidence for the presence of distinct fresh-water prawn (*Macrobrachium nipponense*) populations in a single river system. *Zoological Magazine*, 10: 161-167.
- MASHIKO, K. & K.I. NUMACHI. 2000. Derivation of populations with different-size eggs in the palaemonid prawn *Macrobrachium nipponense*. *Journal of Crustacean Biology*, 20: 118-127.
- MAY, G.E., G.W. GELEMBIUK, V.E. PANOV, M.I. ORLOVA & C.E. LEE. 2006. Molecular ecology of zebra mussel invasions. *Molecular Ecology*, 15: 1024-1031.
- MCNAMARA, J.C. 1987. The time of osmotic regulation in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Experimental Biology and Ecology*, 107: 245-451.

- MCNAMARA, J.C. & A.G. LIMA. 1997. The route of ion and water movements across the gill epithelium of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae): evidence from ultrastructural changes induced by acclimation to saline media. *Biological Bulletin*, 192: 321-331.
- MENÚ-MARQUE, S.A. 1973. Desarrollo larval de *Palaemonetes argentinus* (Nobili, 1901) en el laboratorio (Crustacea, Caridea, Palaemonidae). *Physis*, 32: 149-169.
- MILLER, M.F. & C.C. LABANDEIRA. 2002. Slow crawl across the salinity divide: delayed colonization of freshwater ecosystems by invertebrates. *Geological Society of America TODAY*, 12: 1-10.
- MOLES A. & J.J. PELLA. 1984. Effects of parasitism and temperature on salinity tolerance of the kelp shrimp *Eualus suckleyi*. *Transactions of the American Fisheries Society*, 113: 354-359.
- MONTAGNA, M. & P. COLLINS. 2005. Toxicity of glyphosate herbicide formulation upon the freshwater prawn *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *Nauplius*, 13: 149-157.
- MONTAGNA, M. & P. COLLINS. 2007. Survival and growth of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda; Caridea) exposed to insecticides with chlorpyrifos and endosulfan as active element. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53: 371-378.
- MOREIRA, G.S. & J.C. MCNAMARA. 1984. Physiological responses of the early zoeal stages of *Palaemon pandaliformis* Stimpson and *Palaemon northropi* (Rankin) to salinity variation. *Hydrobiologia*, 113: 165-169.
- MORGAN, S.G. 1995. Life and death in the plankton: larval mortality and adaptation. Pp 279-321. En: L.R. McEdward (ed). *Ecology of Marine Invertebrate Larvae*. CRC Press, Florida.
- MORRIT, D. & J.I. SPICER. 1996a. Developmental ecophysiology of the beachflea *Orchestia gammarellus* (Pallas) (Crustacea: Amphipoda). I. Female control of the embryonic environment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 207: 191-203.
- MORRIT, D. & J.I. SPICER. 1996b. The culture of eggs and embryos of amphipod crustaceans: implications for brood pouch physiology. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 76: 361-376.
- MORRONE, J.J. & E.C. LOPRETTO. 1995. Parsimony analysis of endemism of freshwater Decapoda (Crustacea: Malacostraca) from southern South America. *Neotrópica*, 41: 3-8.
- MÜLLER, Y., D. AMMAR & E. NAZARI. 2004. Embryonic development of four species of palaemonid prawns (Crustacea, Decapoda): pre-naupliar, naupliar and post-naupliar periods. *Revista Brasileira de Zoologia*, 21: 27-32.

- MURPHY, N.P. & C.M. AUSTIN. 2003. Molecular taxonomy and phylogenetics of some species of Australian palaemonid shrimps. *Journal of Crustacean Biology*, 23: 169-177.
- MURPHY, N.P. & C.M. AUSTIN. 2004a. Multiple origins of the endemic Australian *Macrobrachium* (Decapoda : Palaemonidae) based on 16S rRNA mitochondrial sequences. *Australian Journal of Zoology*, 52: 549-559.
- MURPHY, N.P. & C.M. AUSTIN. 2004b. Phylogeography of the widespread Australian freshwater prawn, *Macrobrachium australiense* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Biogeography*, 31: 1065-1072.
- MURPHY, N.P. & C.M. AUSTIN. 2005. Phylogenetic relationships of the globally distributed freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae): biogeography, taxonomy and the convergent evolution of abbreviated larval development. *Zoologica Scripta*, 34: 187-197.
- NAZARI, E.M., Y.M.R. MÜLLER & D. AMMAR. 2000. Embryonic development of *Palaemonetes argentinus* Nobili, 1901 (Decapoda, Palaemonidae), reared in the laboratory. *Crustaceana*, 73: 143-152.
- NEVES, C.A., E.A. SANTOS & A.C.D. BAINY. 2000. Reduced superoxide dismutase activity in *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Palaemonidae) infected by *Probopyrus ringueleti* (Isopoda, Bopyridae). *Diseases of Aquatic Organisms*, 39: 155-158.
- NEVES, C.A., M.P. SAMPEDRO PASTOR, L.E.M NERY & E.A.SANTOS. 2004. Effects of the parasite *Probopyrus ringueleti* (Isopoda) on glucose, glycogen and lipid concentration in starved *Palaemonetes argentinus* (Decapoda). *Diseases of Aquatic Organisms*, 58: 209-213.
- NEW, M.B. & W.C. VALENTI. 2000. *Freshwater Prawn Culture*. Blackwell Science, Oxford, U.K. 443 pp.
- NORMAN, G.R. & D.L. STREINER. 1996. *Bioestadística*. Ediciones Harcourt, Madrid, España. 260 pp.
- ODINETZ COLLARD, O. & C. MAGALHÃES. 1994. Ecological constraints and life history strategies of palaemonid prawns in Amazonia. *Verhandlungen der Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 25: 2460-2467.
- ODINETZ COLLART, O. & H. RABELO. 1996. Variation in egg size of the fresh-water prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology*, 16: 684-688.
- OH, C.W. & R.G. HARTNOLL. 1999. Brood loss during incubation in *Philocheras trispinosus* (Decapoda) in port Erin Bay, Isle of Man. *Journal of Crustacean Biology*, 19: 467-476.
- OH, C.W. & R.G. HARTNOLL. 2004. Reproductive biology of the common shrimp *Crangon crangon* (Decapoda: Crangonidae) in the central Irish Sea. *Marine Biology*, 144: 303-316.

- ORDIANO, A., F. ALVAREZ & G. ALCARAZ. 2005. Osmoregulation and oxygen consumption of the hololimnetic prawn, *Macrobrachium tuxtlaense* at varying salinities (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, 78: 1013-1022.
- PALACIOS, E., A.M. IBARRA & I.S. RACOTTA. 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*, 185: 353-371.
- PALACIOS, E., C.I. PÉREZ-ROSTRO, J.L. RAMÍREZ, A.M. IBARRA & I.S. RACOTTA. 1999. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival and growth. *Aquaculture*, 171: 309-321.
- PATRICK, M.L., R.J. GONZALEZ & T.J. BRADLEY. 2001. Sodium and chloride regulation in freshwater and osmoconforming larvae of *Culex* mosquitoes. *The Journal of Experimental Biology*, 204: 3345-3354.
- PEREIRA, G.A. & J.V. GARCÍA. 1995. Larval development of *Macrobrachium reyesi* Periera (Decapoda: Palaemonidae), with a discussion of the origin of the abbreviated development in Palaemonids. *Journal of Crustacean Biology*, 15: 117-133.
- PÉQUEUX, A. 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 15: 1-60.
- PETOVELLO, A.D. 1996. First record of *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae) in Argentina. *Crustaceana*, 69: 113-114.
- PIERSMA, T. & J. DRENT. 2003. Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 228-233.
- PUNG, O.J., C.B. GRINSTEAD & S.P. VIVES. 2006. Variation in the geographic and temporal distribution of *Microphallus turgidus* (Trematoda: Microphallidae) in grass shrimp (*Palaemonetes* spp.) on Tidal Rivers in Southeast Georgia, U.S.A. *Comparative Parasitology*, 73: 171-178.
- PUNG, O.J., R.N. KHAN, S.P. VIVES & C.B. WALKER. 2002. Prevalence, geographic distribution, and fitness effects of *Microphallus turgidus* (Trematoda: Microphallidae) in grass shrimp (*Palaemonetes* spp.) from coastal Georgia. *The Journal of Parasitology*, 88: 89-92.
- QUALLS, F.J. & R. SHINE. 1998. Geographic variation in lizard phenotypes: importance of incubation environment. *Biological Journal of the Linnean Society*, 64: 477-491.
- QUIRÓS, R. 1998. Fish effects on trophic relationships in the pelagic zone of lakes. *Hydrobiologia*, 361: 101-111.
- QUIRÓS, R. 2004. Sobre la morfología de las lagunas pampeanas. Serie de documentos de Trabajo del Área de Sistemas de Producción Acuática N° 3. Universidad de Buenos Aires, Argentina. 16 pp. Disponible en: <http://www.agro.uba.ar/users/quiros/>

- QUIRÓS, R. 2005. La ecología de las lagunas de las Pampas. Investigación y Ciencia. Madrid, Spain. (En prensa). Disponible en: <http://www.agro.uba.ar/users/quiros/>
- QUIRÓS, R. & E. DRAGO. 1999. The environmental state of Argentinean lakes: an overview. *Lakes and Reservoirs: Research and Management*, 4: 55-64.
- QUIRÓS, R., A.M. RENELLA, M. BOVERI, J.J. ROSSO & A. SOSNOVSKY. 2002. Factores que afectan la estructura y el funcionamiento de las lagunas pampeanas. *Ecología Austral*, 12: 175-185.
- RADDER, R.S. 2006. An overview of geographic variation in the life history traits of the tropical agamid lizard, *Calotes versicolor*. *Current Science*, 91: 1354-1363.
- RAINBOW, P.S. & W.H. BLACK. 2001. Effects of changes in salinity on the apparent water permeability of three crab species: *Carcinus maenas*, *Eriocheir sinensis* and *Necora puber*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 264: 1-13.
- RAINBOW, P.S. & W.H. BLACK. 2005. Physicochemistry or physiology: Cadmium uptake and effects of salinity and osmolality in three crabs of different ecologies. *Marine Ecology Progress Series*, 286: 217-229.
- READ, G.H.L. 1984. Intraspecific variation in the osmoregulatory capacity of larval, post-larval, juvenile and adult *Macrobrachium petersi* (Hilgendorf). *Comparative Biochemical and Physiology*, A 78: 501-506.
- REINSEL, K.A., P.S. GLAS, J.R. RAYBURN, M.K. PRITCHARD & W.S. FISHER. 2001. Effects of food availability on survival, growth, and reproduction of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*: a laboratory study. *Marine Ecology Progress Series*, 220: 231-239.
- REZNICK, D.N. 1982. The impact of predation on life history evolution in Trinidadian guppies: The genetic components of observed life history differences. *Evolution*, 36: 1236-1250.
- REZNICK, D.N., IV M.J., BUTLER, F.H. RODD & P. ROSS. 1996. Life history evolution in guppies (*Poecilia reticulata*). 6. Differential mortality as a mechanism for natural selection. *Evolution*, 50: 1651-1660.
- REZNICK, D.N. & C.K. GHALAMBOR. 2005. Selection in nature: experimental manipulations of natural populations. *Integrative and Comparative Biology*, 45: 456-462.
- RICHARDSON, A.J., J.E. GROWNS & R.A. COOK 2004. Distribution and life history of caridean shrimps in regulated lowland rivers in southern Australia. *Marine and Freshwater Research*, 55: 295-308.
- RINGUELET, R.A. 1956. Los factores históricos o geológicos en la zoogeografía de la Argentina. *Holmbergia*, 5: 1-18.

- RINGUELET, R.A. 1961. Rasgos fundamentales de la zoogeografía de la Argentina. *Physis*, 22: 151-170.
- ROA, R., B. ERNST & F. TAPIA. 1999. Estimation of size at sexual maturity: an evaluation of analytical and resampling procedures. *Fisheries Bulletin*, 97: 570-580.
- RODRIGUES CAPÍTULO, A. & L. R. FREYRE. 1989. Tablas de vida ecológicas de supervivencia y fecundidad de *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Palaemonidae). Contribución Científica N° 339 del Instituto de Limnología de La Plata "Dr. Raúl Ringuelet".
- ROSA, R., S. MORAIS, R. CALADO, L. NARCISO & M.L. NUNES. 2003. Biochemical changes during the embryonic development of Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. *Aquaculture*, 221: 507-522.
- RUPPERT, E.E & R.D. BARNES. *Zoología de los Invertebrados*. Sexta Edición. McGraw-Hill Interamericana, México D.F., México. 1114 pp.
- SAIGUSA, M. 1996. Two kinds of active factor in crab hatch water: ovigerous-hair stripping substance (OHSS) and a proteinase. *Biological Bulletin*, 191:234-240.
- SASTRY, A.N. 1983. Ecological aspects of reproduction. Pp. 179-270. En: F.J. Vernberg & V.B. Vernberg (eds.), *Environmental adaptations*, Vol. 8, D. E. Bliss (gen. ed.). *The Biology of Crustacea*, Academic Press, New York.
- SCHAARSCHMIDT, TH. & K. JÜRSS. 2003. Locomotory capacity of Baltic Sea and freshwater populations of the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A, 135: 411-424.
- SCHLUTER, D. 2000. *The Ecology of Adaptive Radiation*. Oxford University Press, Inc., New York. 288 pp.
- SCHUBART, C.D., R. DIESEL & S.B. HEDGES. 1998. Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs. *Nature*, 393: 363-365.
- SCHUBART, C.D. & R. DIESEL. 1999. Osmoregulation and the transition from marine to freshwater and terrestrial life: a comparative study of Jamaican crabs of the genus *Sesarma*. *Archiv für Hydrobiologie*, 145: 331-347.
- SCHUBART, C.D. & P. KOLLER. 2005. Genetic diversity of freshwater crabs (Brachyura: Sesarmidae) from central Jamaica with description of a new species. *Journal of Natural History*, 39: 469-481.
- SCHULDT, M. & M. C. DAMBORENEA. 1987. La fecundidad de *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Palaemonidae) en el canal Villa Elisa (Punta Lara, Provincia de Buenos Aires, Argentina). *Anales Museo de Historia Natural Valparaíso*, 18: 33-39.

- SCHULDT, M. & M. C. DAMBORENEA. 1988. Infestation of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Palaemonidae) with *Probopyrus cf. oviformis* (Crustacea: Bopyridae): observations on the habitat of *Cryptoniscus* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 52: 365-372.
- SCOTT, G.R., J.G. RICHARDS, B. FORBUSH, P. ISENRING & P.M. SCHULTE. 2004. Changes in gene expression in gills of the euryhaline killifish *Fundulus heteroclitus* after abrupt salinity transfer. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 287: C300-C309.
- SCOTT, G.R., J.T. ROGERS, J.G. RICHARDS, C.M. WOOD & P.M. SCHULTE. 2004. Intraspecific divergence of ionoregulatory physiology in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*: possible mechanisms of freshwater adaptation. *The Journal of Experimental Biology*, 207: 3399-3410.
- SEARS, M.W. & M.J. ANGILLETA JR. 2003. Life-history variation in the sagebrush lizard: phenotypic plasticity or local adaptation?. *Ecology*, 86: 1624-1634.
- SENEVIRATNA, D. & H.H. TAYLOR. 2006. Ontogeny of osmoregulation in embryos of intertidal crabs (*Hemigrapsus sexdentatus* and *H. crenulatus*, Grapsidae, Brachyura): putative involvement of the embryonic dorsal organ. *Journal of Experimental Biology*, 209: 1487-1501.
- SERRANO, L., D.W. TOWLE, G. CHARMANTIER & C. SPANINGS-PIERROT. 2007. Expression of Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit mRNA during embryonic development of the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Comparative Biochemical and Physiology*, 2: 126-134.
- SIBERT, V., P. OUELLET & J-C. BRÊTHES. 2004. Changes in yolk total proteins and lipids components and embryonic growth rates during lobster (*Homarus americanus*) egg development under a simulated seasonal temperature cycle. *Marine Biology*, 144: 1075-1086.
- SOKAL, R.R. & F.J. ROHLF. 1981. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. Freeman, San Francisco. 859 pp.
- SPICER, J.I. & S.D. RUNDLE. 2006. Out of place and out of time-towards a more integrated approach to heterochrony. *Animal Biology*, 56: 487-502.
- SPIVAK, E.D. 1997. Life history of a brackish-water population of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda: Caridea) in Argentina. *Annales de Limnologie*, 33: 179-190.
- SPIVAK, E.D., K. ANGER, T.A. LUPPI, C.C. BAS & D. ISMAEL. 1994. Distribution and habitat preferences of two grapsid crab species in Mar Chiquita Lagoon (Province of Buenos Aires, Argentina). *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 48: 59-78.
- SPIVAK, E.D., E.E. BOSCHI & S.R. MARTORELLI. 2006. Presence of *Palaemon macrodactylus* Rathbun 1902 (Crustacea: Decapoda: Caridea: Palaemonidae) in Mar del Plata harbor, Argentina: first record from southwestern Atlantic waters. *Biological Invasions*, 8: 673-676.
- STEELE, D.H. 1977. Correlation between egg size and developmental period. Letters to the editors. *The American Naturalist*, 111: 371-372.

- STEINEL, N. 2003. Einfluss der Salinität auf Wachstum und Reproduktion von *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Dekapoda). Masters Thesis, University Hamburg, Alemania.
- STRATHMANN, R.R. 1982. Selection for retention or export of larvae in estuaries. Pp. 521-535. En: Kennedy, V.S. (ed). *Estuarine Comparisons*. Academic Press, San Diego.
- SUBRAMONIAN, T. 1991. Yolk utilization and esterase activity in the mole crab *Emerita asiática* (Milne Edwards). Pp. 19-30. En: A. Wenner & A.A. Kuris (eds.). *Crustacean Egg Production*, Crustacean Issues. Balkema, Rotterdam.
- SUSANTO, G.N. & G. CHARMANTIER. 2001. Crayfish freshwater adaptation starts in eggs: Ontogeny of osmoregulation in embryos of *Astacus leptodactylus*. *Journal of Experimental Zoology*, 289: 433-440.
- TAN, S.H. & P.K.L. NG. 1998. The freshwater crab fauna (Crustacea: Brachyura) of the Philippines. V. On a new genus and species of potamid from Palawan Island, Philippines. *Hydrobiologia*, 379: 93-96.
- TAYLOR, H.H. & D. SENEVIRATNA. 2005. Ontogeny of salinity tolerance and hyper-osmoregulation by embryos of the intertidal crabs *Hemigrapsus edwardsii* and *Hemigrapsus crenulatus* (Decapoda, Grapsidae): Survival of acute hyposaline exposure. *Comparative Biochemical and Physiology*, 140: 495-505.
- TORRES, G., M. CHARMANTIER-DAURES, S. CHIFFLET & K. ANGER. 2007. Effects of long-term exposure to different salinities on the location and activity of Na⁺-K⁺-ATPase in the gills of juvenile mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Comparative Biochemical and Physiology*, A 147: 460-465.
- TUDGE, C. 2000. *The Variety of Life*. Oxford University Press, Oxford. 684 pp.
- UNDERWOOD, A. 1997. *Experiments in Ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance*. Cambridge University Press. 504 pp.
- VERDI, A.C. & M. SCHULDT. 1988. Descripción y biología de *Probopyrus ringueleti* n. sp. (Crustacea, Epicaridea, Bopyridae). Efectos sobre el hospedador *Palaemonetes argentinus* Nobili (Crustacea, Caridea, Palaemonidae). *Anales de la Sociedad Científica Argentina*, 118: 15-26.
- WEAR, R. 1974. Incubation in British decapod crustacea, and the effects of temperature on the rate and success of embryonic development. *Journal of Marine Biology Association United Kingdom*, 54: 745-762.
- WEHRTMANN, I.S & M. GRAEVE. 1998. Lipid composition and utilization in developing eggs of two tropical marine caridean shrimps (Decapoda: Caridea: Alpheidae, Palaemonidae). *Comparative Biochemistry and Physiology B- Biochemistry & Molecular Biology*, 121: 457-463.

- WERNER, E.E. & B.R. ANHOLT. 1993. Ecological consequences of the trade-off between growth and mortality rates mediated by foraging activity. *American Naturalist*, 142: 242-272.
- WILDER, M.N., D.T.T. HUONG, M. ATMOMARSONO, T.T.T. HIEN, T.Q. PHU & W.J. YANG. 2000. Characterization of Na/K-ATPase in *Macrobrachium rosenbergii* and the effects of changing salinity on enzymatic activity. *Comparative Biochemical and Physiology*, 125: 377-388.
- WILDER, M.N., D.T.T. HUONG, A. OKUNO, M. ATMOMARSONO & W.J. YANG. 2001. Oubain-sensitive Na/K-ATPase activity increases during embryogenesis in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fisheries Science*, 67: 182-184.
- WILLMER, P., G. STONE & I. JOHNSTON. 2000. *Environmental Physiology of Animals*, Blackwell Science, Oxford, U.K. 644 pp.
- WOLCOTT, T.G. 1988. Ecology. Pp. 55- 96. En: W.W. Burggren & B.R. McMahon (eds.). *Biology of the land crabs*. Cambridge University Press. Cambridge.
- WONG, J.T.Y. & B.J. MCANDREW. 1990. Selection for larval freshwater tolerance in *Macrobrachium nipponense* (de Haan). *Aquaculture*, 15: 151-156
- ZALIZNIAK, L., B.J. KEFFORD & D. NUGEGODA. 2006. Is all salinity the same? I. The effect of ionic compositions on the salinity tolerance of five species of freshwater invertebrates. *Marine and Freshwater Research*, 57: 75-82.
- ZAR, J.H. 1996. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey. 718 pp.