



Universidad Nacional del Comahue

Centro Regional Universitario Bariloche

**Respuestas plásticas de *Daphnia commutata*
frente a cambios en la relación C:P como
consecuencia de la retracción glaciaria**

Trabajo Final para optar por el título de

Licenciada en Ciencias Biológicas



Tesista: Agustina Iglesias Louis

Director: Esteban Balseiro

Codirector: Beatriz Modenutti

**Laboratorio de Limnología. INBIOMA-Universidad Nacional, del Comahue,
Centro Regional, Universitario Bariloche, (CRUB), 8400 San Carlos de Bariloche,
Argentina.**

Índice:

Resumen:	iii
Abstract:	iv
Índice de abreviaturas:.....	v
Introducción:.....	1
Objetivos e hipótesis:	8
Material y métodos:	9
Área de estudio	9
Trabajo de campo:	13
Análisis de laboratorio:.....	14
Determinación de Sólidos totales en suspensión (STS):	14
Determinación de C:P sestónico:.....	14
Tratamiento de los organismos:.....	14
Análisis de isoenzimas:	15
Medición de actividad de fosfatasa alcalina (APA):	17
Experimento de laboratorio:	18
Análisis de datos	20
Perfiles lumínicos de los lagos:	20
Comparación de valores de Sólidos Totales en Suspensión y de C:P sestónico: ...	20
Análisis de isoformas de glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI):.....	21
Análisis de APA:	21
Resultados:	22
Perfiles lumínicos de los lagos:	22
Sólidos totales en suspensión y C:P sestónico:	23
Análisis de isoformas de glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI):.....	25
Daphnia commutata en el ambiente:	25



D. commutata criada en el laboratorio:	28
Análisis de APA:	28
APA en el ambiente:	28
Experimento de laboratorio:	29
Discusión:	31
Conclusiones:	37
Bibliografía:	38
Agradecimientos:	46



Resumen:

El derretimiento de glaciares afecta tanto a los ecosistemas linderos como a los ambientes acuáticos que reciben sus aguas de deshielo. Esto produce un cambio en la movilización y transporte de partículas orgánicas e inorgánicas, afectando las condiciones lumínicas y, por ende, a las relaciones elementales (de carbono y fósforo) de los ambientes acuáticos. En lagos transparentes, los herbívoros planctónicos, como *Daphnia commutata* están limitados por la calidad estequiométrica de su alimento (alta relación C:P). Esta condición cambia en lagos con influencia glaciaria, con transparencia disminuida. Estudios previos del género *Daphnia* demostraron que las enzimas del metabolismo del fósforo se relacionan con la calidad de alimento presente en el lago. Este trabajo evaluó la actividad de la fosfatasa alcalina (APA) y el potencial polimorfismo en GPI (glucosa 6-fosfato isomerasa) en individuos de *D. commutata* de lagos con diferente relación C:P. Se estudiaron individuos de los lagos Frías, Mascardi (en dos estaciones) y Guillermo, con diferente transparencia (dada por ingreso de arcillas glaciares) y relación C:P. El análisis de GPI se realizó mediante electroforesis en geles de acetato de celulosa y APA mediante espectrofluorometría. Los resultados obtenidos señalan que todos los individuos resultaron ser homocigotas para GPI, evidenciando que no se encontraron diferencias genéticas entre los individuos muestreados. Sin embargo, sí se observaron respuestas plásticas en APA tanto en individuos provenientes del campo como en un experimento de laboratorio con diferente condición C:P. Frente al incremento de la relación C:P los organismos mostraron una mayor APA. Las conclusiones de este trabajo señalan que si bien no se observaron cambios evolutivos (GPI), sí se evidenciaron respuestas plásticas (APA). Esto significa que frente a un cambio en la transparencia de los lagos producto de la retracción glaciaria, *D. commutata* responde a dichos cambios de forma rápida para mantener su homeostasis.

Palabras clave: Adaptación, Estequiometría ecológica, Evolución, Plasticidad fenotípica, Relación C:P



Abstract:

Glacier recession affects the nearby ecosystems and the aquatic environments that receive the melted water. This melting affects the patterns of mobilization and transport of organic and inorganic particles, modifying the underwater light conditions and elemental ratios, as C and P. In transparent lakes, planktonic herbivores like *Daphnia commutata* are limited by the stoichiometric quality of their food (high C:P ratio). This light condition changes in lakes with glacial influence, because the input of glacier clay decreases the transparency. Previous studies in the genus *Daphnia* have shown that enzymes of the phosphorous metabolism are related with the stoichiometric food quality. In this work, we studied the activity of alkaline phosphatase (APA) and the PGI (phosphate-6- glucose isomerase) potential polymorphism in *D. commutata* inhabiting lakes with different C:P ratios. The study was carried out in four environments (lakes Frias, Mascardi station 1 and 2 y Guillermo) with different transparency and C:P ratios (given by suspended glacial clay). The PGI analysis was carried out with cellulose acetate gel electrophoresis and the APA was determined by spectrofluorometry. The results showed that all the individuals were homozygous for PGI, indicating that we did not find any genetic difference among tested individuals. However, we found plastic responses, both in individuals coming from the lakes and those from the laboratory grown with different C:P ratio food. When exposed to higher C:P ratio, individuals of *D. commutata* showed a higher APA. The conclusions of this study point out that even though we could not observe evolutionary changes (PGI), we detected plastic responses (APA). This means that *D. commutata* will respond to changes in the transparency of the lakes due to glacier recession, in order to maintain their homeostasis.

Key words: adaptation, ecological stoichiometry, evolution, phenotypic plasticity, C:P ratio



Índice de abreviaturas:

Listado de las abreviaturas (acrónimos) empleadas en esta tesina

Abreviatura	Significado
A	ampere
APA	Actividad de fosfatasa alcalina
C	Carbono
cm	centímetro
G6PDH	Glucosa 6 deshidrogenasa
GPI	Glucosa-6-fosfato-isomerasa
HCl	Ácido clorhídrico
L	Litro
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
m	Metro
M	molar
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MTT	Bromuro de metiltiazolildifenil
MUF	4-metilumbeliferona
MUFP	4-metilumbeliferil fosfato
N	Nitrógeno
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
P	Fósforo
PDT	Fósforo total disuelto
PGM	Fosfoglucomutasa
PMS	Metosulfato de fenazina
PNNH	Parque Nacional Nahuel Huapi
STS	Sólidos Totales en Suspensión
TG	Tris glicina
V	voltios



Introducción:

El calentamiento global es actualmente incuestionable y está fundamentalmente relacionado con el incremento de los gases de efecto invernadero liberados a la atmósfera en concentraciones mucho mayores a las liberadas en la era preindustrial (IPCC, 2013). La atmósfera y el océano se han calentado, la cantidad de nieve y hielo ha disminuido y el nivel del mar se ha incrementado. A su vez, se pronostica un aumento en la temperatura media en la mayoría de las regiones del mundo para los años venideros (IPCC, 2013). Por efecto del cambio climático, los ecosistemas montañosos de regiones templadas y frías están cambiando de manera acelerada (Slemmons *et al.*, 2013). En tal sentido, la rápida retracción glaciaria es uno de los signos más importantes del cambio climático actual (IPCC, 2013). Por esta razón, se ha pronosticado que la mayoría de los glaciares desaparecerán en las próximas décadas sobre todo aquellos localizados a menor altitud y latitud (Zemp *et al.*, 2009). Debido a la retracción glaciaria, se produce un cambio en la movilización y transporte de partículas orgánicas e inorgánicas lo que afecta a las condiciones lumínicas de los ambientes acuáticos (Fountain *et al.*, 2012; Sommaruga, 2015). Además, muchos nutrientes como por ejemplo, nitrógeno (N) y fósforo (P), que estaban inaccesibles (retenidos en hielo complejizado con moléculas orgánicas o formando parte de la roca) son liberados y movilizados por el derretimiento del hielo (Saros *et al.*, 2010; Fountain *et al.*, 2012; Modenutti *et al.*, 2018).

Los Andes patagónicos constituyen la mayor región de glaciares de América del Sur. En particular, en el área hay muchos glaciares relativamente pequeños que han sido fuertemente afectados por el cambio climático, tanto presente como pasado (Leiva, 1999; Masiokas *et al.*, 2008; Rabassa, 2008; Ruiz *et al.*, 2017). Su rápida recesión afectará a la biodiversidad de estas áreas (Jacobsen *et al.*, 2012) con variaciones en la flora y fauna (Milner *et al.*, 2009; Milner *et al.*, 2011; Bastidas Navarro *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2019). Asimismo, el agua proveniente de estos glaciares en derretimiento influye en los ambientes aguas abajo en la turbiedad, disponibilidad lumínica y nutrientes que afecta a las comunidades bióticas (Laspoumaderes *et al.*, 2013; Modenutti *et al.*, 2013; Martyniuk *et al.*, 2014).

Los aportes de partículas de rocas finamente molidas en lagos influenciados por glaciares afectan la atenuación vertical de la luz, y, por lo tanto, pueden influir en el



desarrollo de las comunidades lacustres tanto de autótrofos como de heterótrofos (Modenutti *et al.*, 2000; Hylander *et al.*, 2011; Laspoumaderes *et al.*, 2013; Peter & Sommaruga, 2016). De hecho, los lagos superiores en las cuencas glaciares en general tienen una coloración gris o blanquecina, mientras que los que están más abajo en la cuenca son menos turbios porque las partículas han decantado (Sommaruga, 2015). Los mismos efectos generados por la arcilla de origen glaciar se pueden observar dentro de un solo lago, a medida que la arcilla en suspensión disminuye, al alejarse del afluyente que acarrea las partículas (Modenutti *et al.*, 2000; Hylander *et al.*, 2011). En cuanto a los cambios temporales, en los lagos andinos se ha observado, a lo largo de un estudio de 15 años, que cambios en la morenas frontales de los casquetes glaciares del Monte Tronador han inducido cambios en la transparencia del lago Mascardi (Bastidas Navarro *et al.*, 2018).

Los ecosistemas lacustres transparentes como los grandes lagos andino-patagónicos se caracterizan por poseer altas relaciones luz:nutrientes (Balseiro *et al.*, 2008). Esto significa que poseen una alta transparencia con una baja concentración de nutrientes, y quedan incluidos como ambientes de alta relación luz:fósforo en el concepto de Sterner y colaboradores (1997). Esta condición se traduce en relaciones estequiométricas sestónicas (se define seston como partículas vivas y no vivas que se encuentran en suspensión en el agua). La luz, en la zona eufótica, no es un factor ecológico limitante para los organismos fotosintéticos; pero las concentraciones de nutrientes son proporcionalmente muy bajas lo que resulta en limitación por nutrientes, en particular por fósforo (Sterner *et al.*, 1997). Como consecuencia de esto, el seston en los lagos andinos transparentes presenta altas relaciones C:P (carbono:fósforo) (Balseiro *et al.*, 2008). Sin embargo, los lagos influenciados por glaciares van a ser afectados en su transparencia y condiciones lumínicas por el ingreso de arcillas glaciares, y esta condición va a producir variaciones en la relación C:P sestónica (Laspoumaderes *et al.*, 2013). La estequiometría ecológica considera que las proporciones relativas de los elementos afectan los procesos biológicos a través de las interacciones ecológicas (Elser & Urabe, 1999; Elser *et al.*, 2000; Sterner & Elser, 2002). Varios estudios han enfatizado que ciertas diferencias entre productores y consumidores afectan los procesos del ecosistema acuático incluyendo los ciclos de los nutrientes, las interacciones tróficas, la dinámica poblacional y la estructura comunitaria (Frost & Elser, 2002; Sterner & Elser, 2002;



Laspoumaderes *et al.*, 2013). En las últimas décadas se ha probado que estas relaciones C:P pueden variar fuertemente dentro y entre las especies de diferentes ecosistemas (Elser *et al.*, 2000; Elser *et al.*, 2003; Hessen *et al.*, 2013). En este sentido, los herbívoros habitantes de lagos transparentes van a estar limitados en su crecimiento poblacional por la calidad estequiométrica (alto C:P) de su alimento (Balseiro *et al.*, 2007). Esta condición es bastante limitante para el caso del zooplancton ya que su alimento se presenta con relaciones C:P diferentes a la de sus requerimientos. Sin embargo, esta condición puede variar por el ingreso de arcillas que hacen disminuir la luz y, por consiguiente, disminuyen la relación C:P (Laspoumaderes *et al.*, 2013). Actualmente existe evidencia que en los ambientes glaciares (lagos y ríos) las relaciones luz:nutrientes fluctúan afectando a toda la matriz biológica regida, a su vez, por sus relaciones elementales (Laspoumaderes *et al.*, 2013; Martyniuk *et al.*, 2014; Laspoumaderes *et al.*, 2017; Martyniuk *et al.*, 2019a; Martyniuk *et al.*, 2019b; Ren *et al.*, 2019).

El cladóceros *Daphnia* ha sido estudiado de forma intensiva (Adamowicz *et al.*, 2004). Las especies de este género son miembros dominantes de las comunidades de microcrustáceos de los lagos y lagunas de todo el mundo, excepto en los trópicos (Hebert, 1978; Fernando *et al.*, 1987). Constituyen también un grupo de organismos modelos a nivel taxonómico, ecológico y evolutivo (Adamowicz *et al.*, 2004). Argentina alberga una gran diversidad de fauna de *Daphnia*, de hecho, los tres subgéneros de este género han sido descritos en el país (Paggi, 1998).

Las especies del género *Daphnia* poseen típicamente altos requerimientos de P (Andersen & Hessen, 1991; Hall *et al.*, 2004). Su crecimiento está limitado por el contenido de P, especialmente cuando las relaciones de C:P del seston son superiores a 300 expresadas en relación molar (Hessen *et al.*, 2002; Urabe *et al.*, 2002), tal como ocurre en la gran mayoría de los lagos del mundo (Elser & Hassett, 1994). En lagos andinos, estudios previos Balseiro *et al.* (2007) han demostrado que las relaciones sestónicas C:P resultaron ser un factor limitante en el crecimiento poblacional que influye en la distribución de *D. commutata*.

Experimentos realizados en microcosmos con tres diferentes especies del género *Daphnia* (Iwabuchi & Urabe, 2012) en condiciones de fósforo limitante, demostraron que aquellas especies con menor demanda de P (mayor C:P somático) excluyeron



competitivamente a las especies con altos requerimientos de fósforo (menor C:P somático). Esto indica un efecto directo de la estequiometría del alimento sobre el resultado de la competencia interespecífica entre poblaciones que varían en su demanda elemental. Asimismo, resultados similares se observaron entre clones de la misma especie, donde la calidad de la comida influyó en la habilidad competitiva de los distintos genotipos de la misma especie (Weider *et al.*, 2005; Seidendorf *et al.*, 2007; Jeyasingh *et al.*, 2009). La interacción competitiva entre organismos de la misma especie por la comida puede estar influenciada tanto por la cantidad como por la calidad de comida disponible (Tilman, 1982; Grover *et al.*, 1997). Trabajos experimentales con especies de *Daphnia* demostraron que la calidad de la comida influye tanto en la competencia interespecífica como en la intraespecífica entre diferentes especies de este cladócer o distintos genotipos dentro de la misma especie (clones) (Hessen, 1990; Hessen & Lyche, 1991; Urabe *et al.*, 2002; von Elert, 2004; Weider *et al.*, 2005; Brzeziński & Von Elert, 2007; Seidendorf *et al.*, 2007; Jeyasingh *et al.*, 2009).

En relación con la competencia entre especies de *Daphnia*, algunos autores han realizado trabajos experimentales donde demostraron que la habilidad competitiva podría relacionarse con las enzimas PGM y GPI (fosfoglicerato mutasa y glucosa-6-fosfato isomerasa, respectivamente) (Weider *et al.*, 2008; Jeyasingh *et al.*, 2009). En particular, se ha demostrado que los genes codificantes para la enzima GPI son muy importantes en el metabolismo de la glucosa y del fósforo, dado que intervienen en procesos relacionados con la glucólisis y la glucosa fosforilada (Nelson & Cox, 2000; Wheat *et al.*, 2006; Jeyasingh & Weider, 2007) (Figura 1).

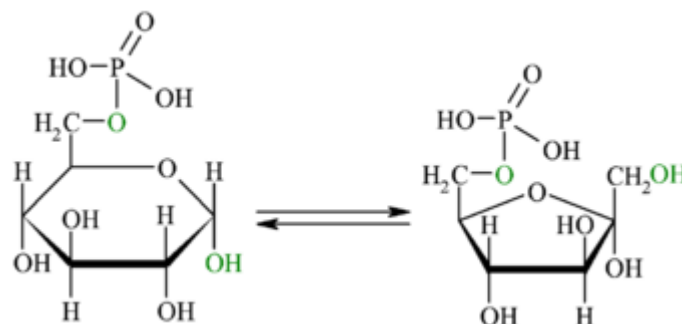


Figura 1. Reacción reversible catalizada por la glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI) de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato.



La condición de polimorfismo en GPI (Figura 2) tiene considerable valor ecológico (Weider *et al.*, 2008). Experimentos de competencia entre distintos genotipos de *Daphnia* sugieren la presencia de fuertes divergencias genéticas (gen-específicas) en respuesta a diferentes relaciones elementales del alimento (como por ejemplo, C:P), lo que demostró que diferentes genotipos tendrán una ventaja competitiva bajo las diferentes relaciones de calidad de alimento (Jeyasingh & Weider, 2007). Los autores mencionados pudieron observar que determinadas configuraciones alélicas de los genes PGM y GPI de *D. pulex* fueron competitivamente superiores dependiendo de la disponibilidad de P en la comida (relación C:P del alimento). En condiciones de bajo C:P (alta disponibilidad de P) los clones con heterocigosis en los loci de los genes de GPI fueron competitivamente superiores, mientras que en condiciones de limitación por P, los homocigotas desplazaron a los heterocigotas (Jeyasingh *et al.*, 2009).

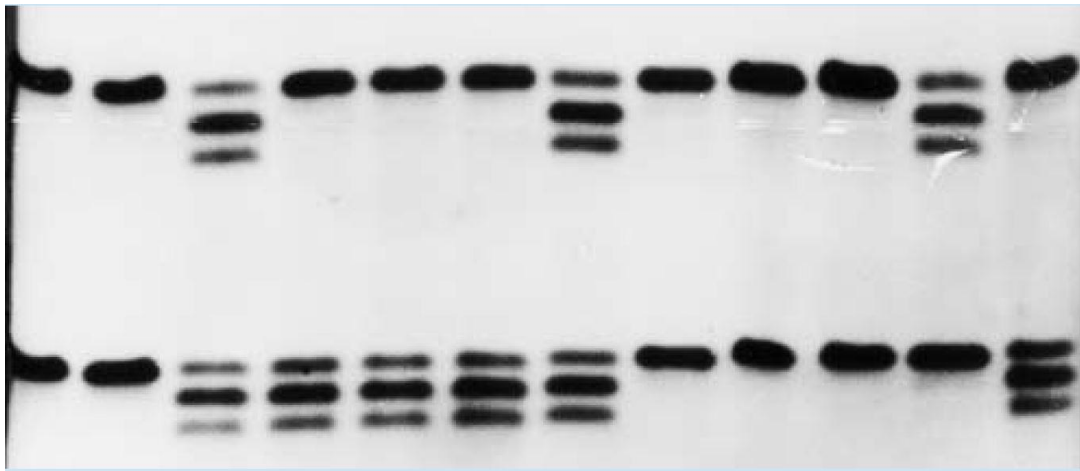


Figura 2. Polimorfismo en GPI en un ostrácodo. Se puede observar que los individuos heterocigotas presentan múltiples bandas, mientras que los homocigotas sola una.

Tomado de Hebert (1989).

Daphnia commutata es una especie sensible a la concentración de fósforo del ambiente (Balseiro *et al.*, 2007). Una respuesta interesante que se observó en esta especie y otras del género frente al incremento de la relación C:P (baja concentración de P) es el incremento de la actividad de fosfatasa alcalina (APA) (Wagner & Frost, 2012; Wolinski *et al.*, 2016). La fosfatasa alcalina es una enzima frecuente en los organismos y se encuentra comúnmente unida a la superficie celular o en la fracción disuelta (Tank *et al.*, 2005). Esta enzima libera fosfatos unidos a macromoléculas, permitiendo el transporte y la absorción celular de P proveniente de los alimentos (Elser *et al.*, 2010; Wojewodzic *et*



al., 2011). La APA está considerada como un indicador de la deficiencia de P en el zooplancton y la actividad aumenta cuando el alimento es pobre en P (Elser *et al.*, 2010; McCarthy *et al.*, 2010; Wagner & Frost, 2012). En particular, para *D. commutata*, Wolinski *et al.* (2016) observaron en experimentos de laboratorio, que la APA era dependiente tanto de la calidad del alimento como de la temperatura.

Esta especie habita, entre otros lagos, al lago Mascardi que posee un gradiente de transparencia a lo largo del brazo Tronador generado por el aporte de arcillas glaciarias desde los glaciares del Monte Tronador (Modenutti *et al.*, 2000; Hylander *et al.*, 2011; Laspoumaderes *et al.*, 2013; Modenutti *et al.*, 2013; Laspoumaderes *et al.*, 2017). Debido a esta variación en la luz, se establece un gradiente en la relación luz:nutrientes que se refleja en la calidad de alimento (C:P) lo que condiciona el éxito de una especie de alto requerimiento de P, como *Daphnia commutata* (Laspoumaderes *et al.*, 2013; Laspoumaderes *et al.*, 2017). Esta especie disminuye su abundancia absoluta y relativa a medida que el lago incrementa su transparencia y por ende se incrementa la relación C:P del alimento.

En base a estos antecedentes de estudio es que se propuso analizar a *D. commutata* en relación a los cambios en la transparencia y en la relación C:P observados en lagos andinos debido a la retracción glaciaria. Para ello, se propuso el estudio en tres lagos con diferentes aportes de arcillas glaciarias: un lago claro sin aporte, un lago oscuro con gran aporte y un lago con un gradiente longitudinal en la concentración de arcillas glaciarias. Basándose en la condición de transparencia que genera diferencias en el C:P sestónico (Sturner *et al.*, 1997; Laspoumaderes *et al.*, 2013) se podría postular la existencia, dentro de la misma especie de *Daphnia*, de clones en sectores de mayor o menor transparencia del ambiente. Sería esperable que clones de *D. commutata* expuestos a diferentes condiciones ambientales (por ejemplo, en lagos con concentraciones diferentes de arcillas glaciarias) presenten variaciones en la actividad o la estructura de algunas enzimas relacionadas con el metabolismo del P (por ejemplo, APA, GPI) relacionadas con el metabolismo del fósforo. Por esta razón, en este trabajo, se decidió muestrear tres lagos (Mascardi, Frías y Guillermo) donde habita el cladóceros *D. commutata*. Por un lado, el lago Frías brinda las condiciones de máxima turbiedad con arcillas provenientes del Glaciar Frías (Monte Tronador) mientras que el lago Guillermo es un lago claro sin aporte de arcillas. Por otro lado, se incluye al gradiente natural de luz que existe en el lago



Mascardi causado por las arcillas glaciarias provenientes del derretimiento de los glaciares del Monte Tronador (Hylander *et al.*, 2011; Laspoumaderes *et al.*, 2013).



Objetivos e hipótesis:

El objetivo general de esta tesina es determinar en *Daphnia commutata* de ambientes con diferentes niveles de transparencia dada por la retracción glaciaria, la existencia de una relación entre la calidad de alimento (relación sestónica C:P), la actividad de la fosfatasa alcalina (APA) y la presencia de isoformas de enzimas del metabolismo del fósforo.

Los objetivos específicos son:

- Determinar la actividad de fosfatasa alcalina (APA) de *Daphnia commutata* en sistemas con diferentes relaciones carbono:fósforo (C:P).
- Determinar la presencia de isoformas de la glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI) en *Daphnia commutata*.

Para estos objetivos se han propuesto las siguientes hipótesis con sus respectivas predicciones:

Hipótesis 1: La relación sestónica C:P del lago condicionará la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (APA) de los cladóceros filtradores (*Daphnia commutata*) que en el habitan.

Predicción 1: Los individuos de *Daphnia commutata* provenientes de ambientes con menor C:P (mayor calidad de alimento) tendrán menor actividad de APA. Sería esperable un incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina a lo largo de un gradiente de arcillas glaciares (donde la cantidad relativa de P disminuye a medida que aumenta la transparencia de la columna de agua).

Hipótesis 2: En lagos con diferente turbiedad y diferentes relaciones sestónicas C:P se observarán clones de *Daphnia commutata* identificables por diferentes isoformas de GPI.

Predicción 2: La mayor heterocigosis en los loci de GPI se esperará en los ambientes con menor relación C:P sestónica. Se espera entonces que los ejemplares de *D. commutata* colectados en lagos más turbios, donde hay mejores condiciones de calidad de alimento (menor C:P) presenten una mayor heterocigosis en los loci de GPI.



Material y métodos:

Área de estudio

Los lagos seleccionados para el análisis y comparación de poblaciones de *D. commutata* fueron los lagos Mascardi, Guillermo y Frías, todos ellos ubicados dentro del Parque Nacional, Nahuel Huapi, Río Negro, Argentina (Figuras 3 y 4).

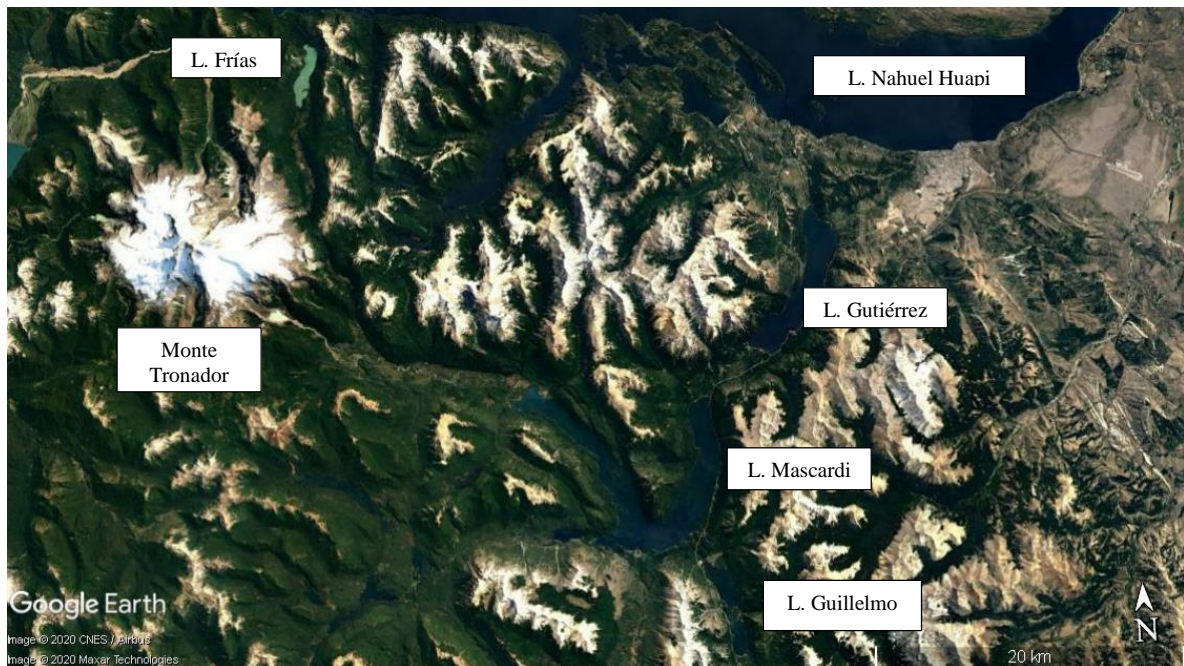


Figura 3. Lagos muestreados en el PNNH. Al noroeste del mapa puede visualizarse el lago Frías, con forma de herradura los dos brazos del lago Mascardi y al sur del mismo el lago Guillermo. Imagen extraída de Google Earth Pro.





Figura 4. Mapa topográfico de los lagos muestreados en el PNNH

El lago Mascardi ($41^{\circ}15'-41^{\circ}25'S$; $71^{\circ}28'-71^{\circ}39'W$) es un lago de origen glacial, con una cubeta profunda y márgenes bien definidos, con una superficie de 39.2 km². Es un lago en forma de V con dos grandes brazos: el brazo oeste (Brazo Tronador, $Z_{max}=118m$) y el brazo este (Brazo Catedral, $Z_{max}=218 m$). El extremo que se encuentra más al norte del brazo Tronador recibe las aguas del río Manso superior, que tiene sus nacientes en el glaciar más grande (glaciar Manso) del Monte Tronador (3.554 m.s.n.m) (Laspoumaderes *et al.*, 2013) (Figura 8). Se han registrado fluctuaciones en los glaciares del monte Tronador desde el año 1976 y se ha observado una continua y mantenida recesión de los mismos (Masiokas *et al.*, 2008). Durante los meses más cálidos del año, los glaciares descargan una gran cantidad de arcilla glaciaria (Iriondo, 1974), y las corrientes que drenan el glaciar se clasifican, por esta razón, como aguas blancas (Chillrud *et al.*, 1994). Las partículas que quedan en suspensión causan un gradiente de luz a lo largo del brazo Tronador del lago Mascardi (Modenutti *et al.*, 2000), dando lugar a diferencias entre ambos brazos del lago. El brazo Tronador presenta una gran carga de arcilla suspendida, mientras que el brazo Catedral, tiene aguas más transparentes y no posee arcillas glaciares. Como el emisario del lago (río Manso) se encuentra en la confluencia de ambos brazos, se mantienen las diferencias entre ambos (Laspoumaderes *et al.*, 2013). Se tomaron muestras de las poblaciones de *Daphnia commutata* de dos estaciones ubicadas en el brazo Tronador, una ubicada muy cerca de la desembocadura del río Manso superior y otra en el extremo sur-este del mismo. El muestreo en este lago fue realizado el martes 22 de enero del año 2020 (Figura 5: Fotos 1 y 2).



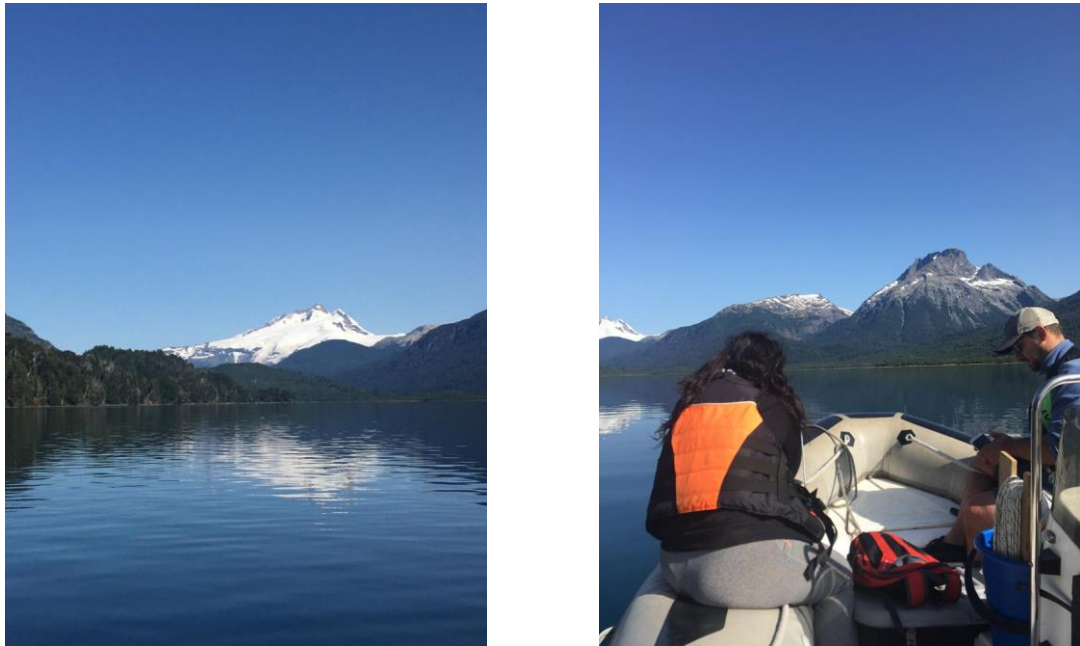


Figura 5. Fotos 1 y 2. Imágenes tomadas durante el muestreo en el lago Mascardi, el 22 de enero del año 2020

Otro lago que recibe los efluentes de los glaciares del monte Tronador es el lago Frías (40 1S, 71 1N, 790 m.s.n.m.). Es un lago proglacial de 4,1 km de longitud y aproximadamente 1.1 km de ancho, que comprende una superficie de 4 km² (Figura 8) con una profundidad máxima de 75 m. Sus aguas provienen principalmente del derretimiento del glaciar Frías, que se encuentra a aproximadamente a 7.5 km del lago homónimo y compone una de las siete lenguas glaciarias argentinas del monte Tronador (Ariztegui *et al.*, 2007). Se han registrado retracciones del mismo desde el año 1869, estimándose que ha retrocedido 800 m de frente desde entonces (Villalba, 1990). Al provenir directamente del deshielo de este glaciar, las aguas del lago Frías son turbias, mostrando un color verde aturquesado durante todo el año debido a las arcillas que permanecen en suspensión en el mismo. En este lago se realizó un muestreo el 5 de febrero del año 2020 (Figura 4: Fotos 3 y 4).





Figura 6. Fotos 3 y 4: Imágenes tomadas durante el muestreo en el lago Frías, el 5 de febrero del año 2020

El lago Guillermo ($41^{\circ}82'30''$ S $71^{\circ}82'70''$ W) es un lago ultraoligotrófico de 100 m de profundidad máxima y una superficie de 5 km^2 (Figura 8). Se trata también de un lago glaciar con muy baja concentración de nutrientes y de carbono orgánico disuelto (Morris *et al.*, 1995; Modenutti *et al.*, 2018). El lago Guillermo es el más transparente de los lagos estudiados, llegando el límite de la zona eufótica aproximadamente a los 32 m de profundidad (Modenutti *et al.*, 2018). El muestreo se realizó el 19 de febrero del año 2020 (Figura 7: Fotos 5 y 6).



Figura 7. Fotos 5 y 6: Imágenes tomadas durante el muestreo en el lago Guillermo, el 19 de febrero del año 2020



Trabajo de campo:

En cada lago se determinaron perfiles lumínicos desde la superficie hasta los 50 m con un radiómetro sumergible PUV 500B (Biospherical Instruments, San Diego, CA, USA). Para cada lago, se tomaron muestras de agua con una botella limnológica de 2 L a 5, 15, 30 y 40 m de profundidad las que fueron transportadas al laboratorio inmediatamente en oscuridad y en contenedores térmicos, para posteriormente realizar análisis del contenido sestónico de C y P. En todos los lagos muestreados, se colectó zooplancton con redes de plancton de 50 μm de apertura de malla en barridos verticales desde los 45 m de profundidad hasta la superficie. Las muestras fueron colectadas vivas y se colocaron en botellas de plástico, previamente lavadas con HCl 1N y enjuagadas con agua destilada. Las muestras fueron conservadas en un refrigerador durante su transporte hacia el laboratorio (1 h). En el caso del lago Frías el procesado del material se realizó en la Estación Biológica de Puerto Blest.

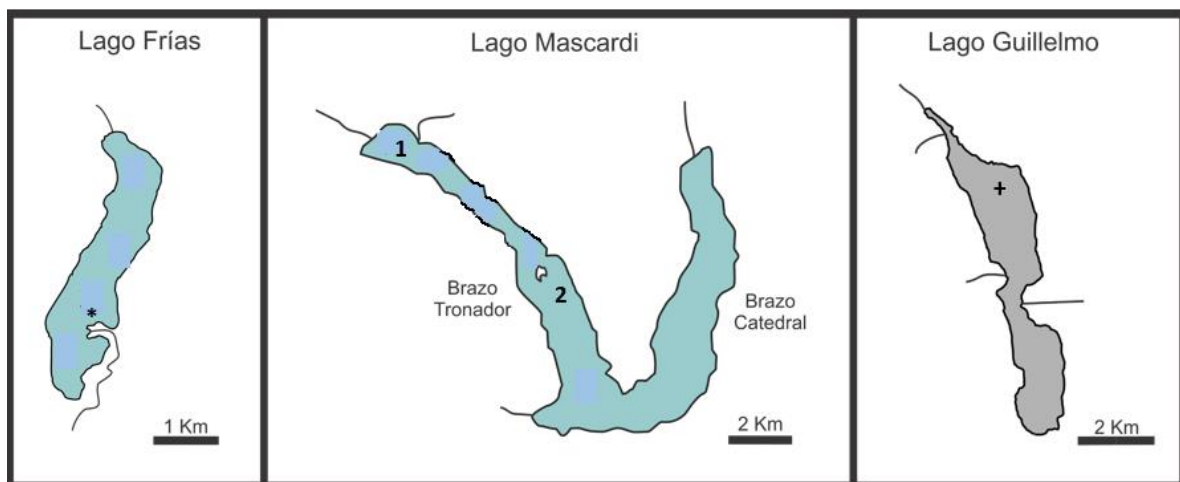


Figura 8. Sitios muestreados en los lagos del PNNH. En el lago Frías, se muestra la zona de muestreo con *. En el lago Mascardi, con el número 1 se señala el sitio de toma de datos de la estación 1 y con el número 2 la segunda estación de toma de datos. La zona de muestreo en el lago Guillermo se marca con un +.



Análisis de laboratorio:***Determinación de Sólidos totales en suspensión (STS):***

Se procedió a filtrar un volumen de 1L de agua de los ambientes sobre filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F (previamente pesados). Posteriormente, los filtros se secaron durante 48 h a 60°C y por diferencia de peso se obtuvieron los STS en mg L⁻¹.

Determinación de C:P sestónico:

En el laboratorio se procedió a determinar la concentración de C y P particulado sestónico de cada nivel muestreado. Para determinar la concentración de carbono particulado y la de fósforo particulado sestónico se siguió la metodología utilizada por Balseiro et al (2008) y Laspoumaderes et al (2013). Para la determinación del C sestónico en el laboratorio se filtró un volumen de 500 ml del agua colectada para cada profundidad por filtros de fibra de vidrio (filtros Whatman GF/F) combustionados previamente. Los filtros se secaron a 60°C durante 48 hs para determinar posteriormente el C. El carbono particulado sestónico fue determinado con un analizador elemental Thermo Finnigan EA1112 CHN.

El fósforo particulado sestónico se estimó a partir de la diferencia entre el fósforo total (PT) y el fósforo total disuelto (PTD). Para ello se utilizaron muestras de agua de lago sin filtrar (PT) y filtrada a través de filtro Whatman GF/F previamente lavados con ácido, enjuagados y secados (PTD). Las muestras fueron digeridas con persulfato a 125°C a 1.5 atm durante 1 h. Las concentraciones de fósforo se obtuvieron a través del método de reducción con ácido ascórbico (APHA, 2005).

Las relaciones C:P se calcularon en relación molar y promediando la totalidad de muestras (5, 15, 30 y 40 m de profundidad) que fueron utilizadas como réplicas de la columna de agua. Este procedimiento se aplicó porque el zooplancton realiza migraciones verticales diarias por lo cual está expuesto a las diferentes condiciones de la columna de agua (Balseiro *et al.*, 2007; Modenutti *et al.*, 2018).

Tratamiento de los organismos:

Al arribar al laboratorio luego de las respectivas salidas de campo, inmediatamente se separaron a los ejemplares de *D. commutata* bajo microscopio estereoscópico, y se los colocó en forma individual en tubos Eppendorf con buffer Tris



HCl (0,09 M, pH= 8). Se los congeló (utilizando la técnica conocida como flash freezing) en un termo con nitrógeno líquido y luego se los conservó en un ultrafreezer a -80°C. Se conservaron al menos 50 ejemplares de cada sitio para su futuro análisis.

Análisis de isoenzimas:

El análisis de las isoenzimas se hizo siguiendo la metodología de Hebert & Beaton (1989). En primer lugar, se prepararon las diferentes soluciones a utilizar, en las concentraciones requeridas. La solución del buffer de corrida, Tris Glicina (TG), se preparó utilizando 3 g de Trizma Base y 14.4 g de Glicina y llevando la solución a 100 mL utilizando agua Milli Q. Esta solución se guarda en heladera. Para su uso, se realizó una dilución 1:9 de este preparado de TG en agua Milli Q, esta solución se guardó en la heladera. Se preparó también la solución de Tris HCl 0.09 M pH=8, utilizando 1.11 g de Trizma Base y 6.20 ml de HCl 1 M, llevando a 100 ml con agua Milli Q.

Para revelar las isoenzimas de GPI, se utilizó:

- 1 ml de Tris HCl pH=8
- 1.5 ml de NAD (dinucleótido de nicotinamida y adenina), en una concentración de 2mg/ml
- 5 gotas de fructosa-6-fosfato, en una concentración de 20 mg/ml
- 5 gotas de MTT (bromuro de metiltiazolildifenil tetrazolio), en una concentración de 10 mg/ml
- 5 gotas de PMS (metosulfato de fenazina), en una concentración de 2 mg/ml
- 1.5 µl de G6PDH , en una concentración de 2000 unidades/ml
- 2 ml de agar en buffer TG

Para todos los casos, se tuvo en cuenta que 250 µL equivalen a 5 gotas. Se tuvo un especial, cuidado al manipular el PMS, al ser muy fotosensible, es por esta razón también que, al preparar el cóctel para revelado se lo hizo en un tubo Falcon envuelto en papel aluminio.

Para realizar las corridas de electroforesis se utilizaron geles de acetato de celulosa (Titan II). Se utilizaron los ejemplares de *D. commutata* colectados en los diferentes lagos que se encontraban congelados a -80°C en Tris HCl (0.09 M, pH=8) y ejemplares de un clon de laboratorio. Se descongelaron los Eppendorf con los ejemplares y, una vez



descongelados, se los homogeneizó con un sonicador de punto (Sartorius Labsonic M) ($\delta=0.6$, amplitud=8). Se colocaron 60 ml de buffer de corrida (TG) a cada lado de la cuba para electroforesis. Mientras se llevaba a cabo toda la preparación, se sumergió a la lámina de acetato de celulosa en un recipiente con TG agitando con un agitador durante 15 minutos. Se colocó una tira de papel Whatman (previamente recortada en las medidas adecuadas) en la cuba de electroforesis, permitiendo que la misma haga contacto con el buffer de corrida a ambos lados de la cuba (Figura 9). Una vez finalizados los 15 minutos, se retiró la lámina de acetato de celulosa del recipiente de remojo y se la colocó sobre un papel de filtro con el objetivo de retirar el exceso de solución de buffer de la misma. Se cargó a continuación el aplicador (Helena Laboratories) con 10 μ l de muestra (ejemplar de *Daphnia* sonicados en Tris HCl 0.09 M, pH=8) y se lo descargó en la cara porosa de la lámina de acetato de celulosa, a 1 cm del borde del gel. Por cada lámina, se corrieron 8 carriles, encontrándose en cada uno de ellos un ejemplar correspondiente a uno de los lagos muestreados. La disposición de los ejemplares en los carriles fue, por ejemplo, la siguiente: carriles 1 y 2 con muestras de la estación 2 del lago Mascardi, carriles 3 y 4 con muestras de la estación 6 del lago Mascardi, carriles 5 y 6 con muestras representantes del lago Frías y carriles 7 y 8 con muestras del lago Guillermo. Una vez cargadas las muestras, se colocó la lámina de acetato de celulosa en el puente de electroforesis de la cubeta (por sobre el papel Whatman previamente colocado), con la cara brillante hacia arriba y el borde cercano a la carga de las muestras hacia el cátodo. Una vez finalizado este procedimiento, se tapó la cubeta y se conectó a la fuente de alimentación. Se realizó la electroforesis a una intensidad de 8 mA y a 200 V, durante 15 minutos. Finalizado el tiempo de corrida, se desconectó a la cuba de la fuente de alimentación y se retiró la lámina de acetato de celulosa de la misma, colocándola sobre una placa acrílica con el lado brillante hacia abajo. A continuación, se colocó sobre la misma el cóctel de tinción correspondiente (preparado previamente) y se lo esparció por arriba del gel. Posteriormente, se dejó reposar la lámina de acetato de celulosa con el mismo en una estufa a 37°C, durante 20 minutos en oscuridad para permitir el revelado de las bandas. Finalizados los 20 minutos, se retiró la lámina de la estufa y, con un enjuague con agua destilada, se retiró el gel de tinción. El gel fue examinado bajo un transiluminador con luz blanca tomándose fotografía del mismo para el posterior análisis de las bandas. Los geles fueron conservados en la heladera en una bolsa plástica con cierre hermético con buffer de corrida.



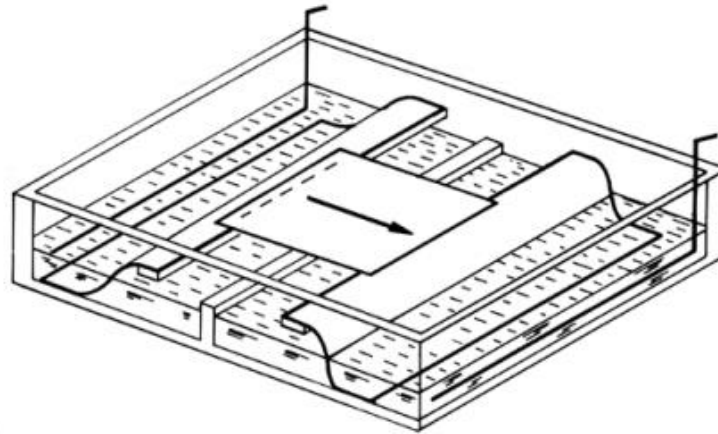


Figura 9. Tanque de electroforesis. Puede observarse como se colocó el papel Whatman haciendo que el mismo sea el conductor del buffer de corrida por la lámina de acetato de celulosa. Puede observarse también la zona de siembra de las muestras en el gel. Imagen extraída de Herbert & Beaton 1989.

Medición de actividad de fosfatasa alcalina (APA):

La estimación de APA se realizó en ejemplares provenientes de un experimento de laboratorio (ver más abajo) y del campo. En el caso del campo, se seleccionaron 10 ejemplares de cada estación del lago Mascardi. Para todos los casos (experimento de laboratorio y ejemplares del campo) antes de efectuar la determinación se tomó una imagen del ejemplar a utilizar bajo microscopio estereoscópico, utilizando el programa informático S-EYE, resolución 1600 x 1200, utilizando un aumento de 20 x. Las imágenes tomadas fueron posteriormente analizadas mediante el programa Image-J, con el objetivo de medir el área en vista lateral de cada ejemplar y posterior cálculo de su peso por regresiones longitud-peso (Balseiro *et al.*, 2008). Esto se realizó para poder referir la APA como unidad al peso seco del ejemplar.

Para medir la APA se siguió a Wolinski (Wolinski *et al.*, 2016) aplicándose el método de Wagner y Frost (Wagner & Frost, 2012) que consiste en determinar la producción de metilumberiferona (MU) a partir de metilumberiferilfosfato (MUP) por medio de la fosfatasa alcalina del organismo bajo estudio.

Luego de haber sido medido, se colocó a cada ejemplar de *Daphnia* en un tubo Eppendorff con 120 μ L de Buffer Tris pH=8. Se homogeneizó con sonicador de punto (Sartorius, Labsonic M, $\delta=0,6$, amplitud=8), con 3 pulsos de un segundo cada uno por cada individuo. Luego, los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 13000 x RPM a



4°C (microcentrífuga refrigerada Eppendorf). Una vez finalizado el centrifugado, se obtuvo el sobrenadante para estimar la APA en un espectrofluorómetro (Perkin Elmer LS45). El procedimiento consistió en la lectura de la línea de base sin agregado de sustrato (MUP), midiendo la fluorescencia (360 excitación y 420 emisión) en 120 µL de la solución centrifugada durante 2 minutos. Posteriormente, se agregaron 100 µL de sustrato (MUP) a la misma cubeta y se homogeneizó por inversión. Se volvió a medir la APA (producción de MU) durante dos minutos en las mismas condiciones que la línea de base. La estimación de la actividad se realizó en base a la pendiente obtenida a la cual se le sustrajo la pendiente de la línea de base (muestra sin sustrato). Finalmente, la APA se expresó como µmol MU/minuto/mg de peso seco.

Experimento de laboratorio:

El experimento se llevó a cabo con ejemplares de *D. commutata* clónico provenientes de un cultivo de laboratorio obtenido a partir de una única hembra aislada de una población del lago Mascardi (PNNH, Patagonia, Argentina). El clon fue mantenido bajo condiciones de laboratorio (15±1°C y 92 µmol de fotones m⁻² s⁻¹, con un fotoperiodo de 14:10 luz:oscuridad) en medio COMBO (Kilham *et al.*, 1998). La fuente de alimento fue suministrada por un cultivo de *Chamydomonas reinhardtii*.

Los cultivos de *C. reinhardtii* fueron mantenidos en el laboratorio a 15°C, en medio MBL (Tabla 1) (Guillard & Lorenzen, 1972) y en condiciones de luz PAR (400-700 nm de longitud de onda e intensidad de 92 µmol m⁻² s⁻¹) con un fotoperíodo 14:10 h (luz:oscuridad). Para preparar el medio de cultivo de las mismas (MBL) se colocó 1mL de cada componente (Tabla 1) y 1 mL de micronutrientes en 990 mL de agua destilada. Se agregó luego 0.1 mL de la mezcla de vitaminas. A continuación, se filtró la solución en un sistema estéril (utilizando embudo y quitasato) con un filtro estéril de 0.45µm de poro. Se guardó en la heladera hasta su posterior uso.

El experimento consistió en contrastar la actividad de fosfatasa alcalina (APA) de *D. commutata* en dos tratamientos con diferentes relaciones elementales C:P. En primer lugar, se separaron hembras de *D. commutata* bajo microscopio estereoscópico que fueron mantenidas en las mismas condiciones hasta que eclosionaran sus huevos. Los neonatos fueron separados en dos tratamientos con medio de cultivo COMBO-libre de P (Kilham *et al.*, 1998), disponiéndose 14 neonatos bajo la condición C:P 150 y 14 bajo la



condición C:P 450. La condición de C:P 150 corresponde al suministro de cultivo de *C. reinhardtii* en MBL con la concentración de P normal del medio (Tabla 1). La condición 450 corresponde al suministro de alimento con bajas concentraciones de P, que fue obtenido a partir del medio MBL con el agregado de sólo 120 µL de K₂HPO₄ en vez de 1 mL (1/8 de la concentración original) (Tabla 1). Los dos tratamientos fueron incubados por dos semanas en el laboratorio bajo las mismas condiciones de temperatura y luz (15°C y 92 µmol m⁻² s⁻¹) y cada dos días se agregó alimento siguiendo a Wolinski *et al.* (2013) (1 mg L⁻¹ de C, estimado por relaciones clorofila/C en el fluorómetro). Como puede notarse, en ambos cultivos se agregó la misma cantidad de C pero no de P, ya que el medio de cultivo había sido previamente preparado con concentraciones bajas o normales de P.

TABLA 1. Soluciones patrón utilizadas para preparar medio de cultivo MBL para *C. reinhardtii*.

Componentes	g por L de solución (en agua destilada)
1. CaCl ₂ .2H ₂ O	36.76 g
2. MgSO ₄ .7H ₂ O	36.97 g
3. NaHCO ₃	12.6 g
4. K ₂ HPO ₄	4.4 g
5. NaNO ₃	42.4 g
6. Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	28.42 g
7. NH ₄ Cl	5.4 g
8. Mezcla de micronutrientes	
Na ₂ EDTA	4.36 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	3.15 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.01 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.022 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.01 g
H ₃ BO ₃	0.13 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.18 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.006 g
11. Vitaminas	
Cyanocobalamin (Vitamin B12)	0.005 g / L dH ₂ O
Thiamine HCl (Vitamin B1)	0.10 g / L dH ₂ O
Biotin	0.005 g / L dH ₂ O

Una vez finalizado el experimento, cada individuo de *D. commutata* de cada tratamiento se individualizó, se fotografió bajo microscopio estereoscópico y se guardó



la imagen. Inmediatamente se lo colocó en un tubo Eppendorf y se lo mantuvo en ultrafreezer a -80°C hasta su análisis.

Análisis de datos

Perfiles lumínicos de los lagos:

Los perfiles lumínicos se analizaron a partir de los datos obtenidos con el radiómetro sumergible (aproximadamente 10 puntos por metro) para las longitudes de onda correspondientes a las bandas de luz visibles 400-700 nm (Radiación fotosintéticamente activa: RFA). El coeficiente de atenuación lumínica (K_d) se estimó a partir de la ecuación de extinción de la luz:

$$I_z = I_0 \times e^{-K_d z}$$

Donde z es la profundidad. A partir del coeficiente K_d , se estimó la profundidad de la zona eufótica ($z_{1\%}$)

$$z_{1\%} = \frac{\ln 100}{K_d}$$

Se realizó un gráfico de la atenuación de la luz (RFA) en función de la profundidad con el programa Sigmaplot (Versión 14.0).

Comparación de valores de Sólidos Totales en Suspensión y de C:P sestónico:

Para ambos conjuntos de datos se realizó un análisis de la varianza de una sola vía (one-way ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre los lagos y/o estaciones de muestreo. En caso de existir diferencias significativas se aplicó un test *a posteriori* de comparación de medias de Tukey. Previo a realizar estos análisis se verificó que los datos cumplieren los criterios de normalidad y homocedasticidad. En ambos casos, se consideró a los niveles de la columna de agua como réplicas del punto de muestreo. Esto se utilizó así ya que los cladóceros estudiados realizan amplias migraciones verticales diarias (Balseiro *et al.*, 2007) y se consideró más apropiado estimar a la columna de agua como un conjunto donde se desplazan estos organismos que a las profundidades por separado. Desde el punto de vista estadístico, esta consideración implica que si existiera una variación vertical en los diferentes niveles su utilización como réplicas del punto de muestreo podría incrementar la varianza, lo que podría disminuir las diferencias existentes entre estaciones de muestreo.



Análisis de isoformas de glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI):

Tanto los geles de acetato de celulosa realizados para organismos provenientes del campo como para aquellos cultivados en el laboratorio fueron revelados con el cóctel de enzimas correspondiente y fotografiados con un transiluminador de luz blanca. Se analizaron las imágenes obtenidas con el fin de observar si los individuos eran homocigotas o heterocigotas para las isoformas de GPI. Posteriormente se calcula el porcentaje de organismos homo y heterocigotas.

Análisis de APA:

Se aplicó un t-test para analizar si existía una diferencia significativa entre la actividad de APA, tanto entre los individuos colectados en las dos estaciones de muestreo del lago Mascaradi como para aquellos de los dos tratamientos del experimento de laboratorio. Los análisis se realizaron con el programa Sigmaplot (versión 14.0). Previo a realizar estos análisis se verificó que los datos cumplieren los criterios de normalidad y homocedasticidad. En el análisis de los individuos cultivados en el laboratorio se perdieron 5 datos de las mediciones de los individuos del tratamiento bajo C:P (C:P del alimento 150), y, al no poder repetir dicho experimento (condición sanitaria dada por la pandemia de COVID-19), se optó por incluirlo. Esta condición aislamiento dada por la pandemia también limitó la posibilidad de realizar mediciones en los otros lagos muestreados.



Resultados:

Perfiles lumínicos de los lagos:

Los perfiles lumínicos de los lagos muestreados pueden observarse en la Figura 10. Allí puede verse como la radiación fotosintéticamente activa (RFA: 400-700 nm) disminuye de manera diferente en función de la profundidad de los lagos.

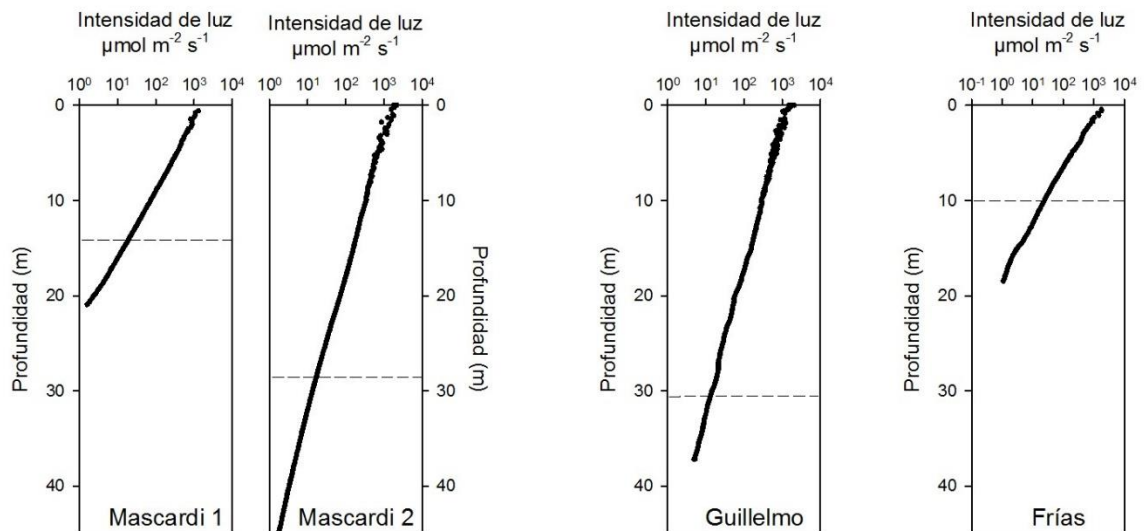


FIGURA 10. Intensidad de la radiación fotosintéticamente activa (RFA) en función de la profundidad en los lagos muestreados. La línea punteada indica el límite de la zona eufótica.

A partir de estos perfiles se calculó la zona eufótica (1% de la RAF en superficie), resultando el lago Guillermo el más transparente con una zona eufótica que sobrepasa los 30 m (Figura 10 ver línea punteada). El lago Frías, por el contrario, es el lago más turbio de los muestreados, con una zona eufótica que alcanza sólo los 10 m de profundidad. Seguido a este lago, se encuentra el lago Mascardi en la primera estación de muestreo, cuya zona eufótica alcanza los 14 m de profundidad. El límite de la zona eufótica del mismo lago en la estación 2 se incrementa hasta poco menos de los 30 m de profundidad. La Figura 10 permite observar un claro gradiente en la turbidez de los lagos muestreados: lago Frías, lago Mascardi en la estación 1, estación 2 de este mismo lago y lago Guillermo, siendo este último el más transparente.



Sólidos totales en suspensión y C:P sestónico:

Los datos obtenidos de sólidos totales en suspensión (STS) y el C:P sestónico de los ambientes muestreados pueden observarse en la Tabla 2.

TABLA 2. Sólidos totales en suspensión (STS) y relación elemental carbono:fósforo (C:P molar) en los ambientes muestreados. Los datos se consignan con promedio \pm Error estándar.

Ambiente muestreado	Lago Guillermo	Lago Mascardi Estación 1	Lago Mascardi Estación 2	Lago Frías
STS (mg L^{-1})	0.53 ± 0.03	2.40 ± 0.96	0.71 ± 0.19	4.75 ± 0.47
C:P (molar)	339 ± 14	163 ± 31	331 ± 70	146 ± 10

El lago Frías es el que posee una mayor cantidad de sólidos totales en suspensión en comparación a los restantes lagos muestreados, encontrándose $4.75 \pm 0.47 \text{ mg L}^{-1}$. Le sigue al mismo la estación 1 del lago Mascardi, con $2.40 \pm 0.96 \text{ mg L}^{-1}$ de sólidos totales en suspensión. En estos dos casos puede observarse como los dos lagos más turbios corresponden su menor transparencia con la presencia de una mayor cantidad de STS. Situación similar se observa para los dos lagos más transparentes: el lago Mascardi en la estación 2 mostró una mayor cantidad de STS ($0.71 \pm 0.19 \text{ mg L}^{-1}$) que el lago Guillermo (Tabla 2: $0.53 \pm 0.03 \text{ mg L}^{-1}$).

TABLA 3. Análisis de la varianza de una vía (one-way ANOVA) para los sólidos totales en suspensión de los lagos muestreados.

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos	3	46.038	15.346	13.011	<0.01
Residual	12	14.154	1.180		
Total	15	60.192			

El análisis de la varianza (Tabla 3) mostró que existen diferencias significativas en los sólidos totales en suspensión de los lagos muestreados ($p < 0.01$). El test de Tukey realizado *a posteriori* (Tabla 4) muestra que el lago Frías es el único estadísticamente diferente (en relación a los sólidos totales en suspensión) de los lagos muestreados



($p < 0.050$ en todas las comparaciones, Tabla 4). El resto de los lagos no difieren significativamente en los sólidos totales en suspensión que poseen.

Tabla 4. Test de Tukey *a posteriori* de la ANOVA realizada para los STS (Tabla 3). Se muestra la diferencia de medias y su significancia para cada uno de los pares comparados. Test realizado con Sigmaplot 14.0.

Comparación	Diferencia de medias	p	q	P	P<0,050
Frías vs Guillelmo	4.220	4	7.771	<0.001	Si
Frías vs M2	4.040	4	7.440	0.001	Si
Frías vs M1	2.350	4	4.328	0.043	Si
M1 vs Guillelmo	1.870	4	3.444	0.123	No
M1 vs M2	1.690	4	3.112	0.178	No prueba
M2 vs Guillelmo	0.180	4	0.331	0.995	No prueba

En cuanto a la relación C:P, tanto el lago Guillelmo (339 ± 14 molar) como el lago Mascardi en la estación más transparente (331 ± 70 molar) mostraron valores similares. En la estación 1 del lago Mascardi, la estación más turbia de dicho lago, la relación C:P sestónica disminuyó, mostrando una relación C:P 163 ± 31 . El lago muestreado con una menor relación C:P sestónica fue el lago Frías, con una relación C:P de 146 ± 10 molar (Tabla 2). El análisis estadístico (ANOVA de una sola vía, tabla 5) mostró que la relación de C:P sestónica es significativamente diferente en los lagos muestreados.

Tabla 5. Análisis de la varianza de una vía (one-way ANOVA) para la relación de C:P sestónico de los lagos muestreados.

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos	3	131027.000	43675.667	7.094	0.005
Residual	12	73884.000	6157.000		
Total	15	204911			



Tabla 6. Test de Tukey *a posteriori* de la ANOVA realizada para la relación C:P sestónica (Tabla 5). Se muestra la diferencia de medias y su significancia para cada uno de los pares comparados. Test realizado con Sigmaplot 14.0

Comparación	Diferencia de medias	p	q	P	P<0,050
Frías vs Guillermo	193.000	4	4.919	0.021	Si
Frías vs M2	176.000	4	4.486	0.035	Si
Frías vs M1	8.000	4	0.204	0.999	No
M1 vs Guillermo	185.000	4	4.715	0.027	Si
M1 vs M2	168.000	4	4.282	0.045	Si
M2 vs Guillermo	17.000	4	0.433	0.990	No

En la Tabla 6 puede observarse el test de Tukey realizado *a posteriori* del análisis de la varianza de la relación C:P de los lagos muestreados. Allí se evidencia claramente la existencia de dos grandes grupos en cuanto a la relación C:P de los lagos muestreados. Por un lado, al no observarse diferencias significativas entre la relación C:P del lago Frías y del lago Mascardi en la estación 1 ($p=0.999$) pero sí diferencias significativas en dicha relación al compararlos con los otros lagos, estos dos lagos conforman un grupo, que posee una relación C:P menor a los restantes. Por su parte, y al no diferir significativamente entre sí ($p=0.990$), el lago Guillermo y el lago Mascardi en la estación 2 forman otro grupo, con una relación C:P mayor con respecto al primer grupo.

Análisis de isoformas de glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI):

Daphnia commutata en el ambiente:

En la figura 11 (a, b, c y d) pueden observarse las imágenes obtenidas al revelar los geles de acetato de celulosa para la isoenzima GPI para los ejemplares extraídos de los diferentes lagos analizados. En la primera corrida (Figura 11 a), se utilizaron 4 ejemplares del lago Mascardi de la estación 1 y 4 ejemplares del mismo lago colectados en la estación 2. Se observó una sola banda al revelarse la tinción, por lo tanto, todos los individuos analizados resultaron ser homocigotas para GPI. En la segunda corrida (Figura 11 b) se analizaron 16 individuos simultáneamente. Los ejemplares del lago Guillermo (carriles 1 a 4 y 11 a 14) mostraron fuertes bandas, y todos demostraron ser homocigotas para la isoenzima analizada. Por su parte, los ejemplares del lago Frías analizados (carriles



5 a 8 y 15 a 18) mostraron solo una tenue banda en el carril número 18. En la tercera corrida se analizaron, al igual que la corrida anterior, 16 individuos al mismo tiempo. En los carriles 1 al 8 se corrieron ejemplares extraídos del lago Guillermo, mientras que en los restantes ejemplares del lago Frías. Los ejemplares de la primera fila (lago Guillermo) mostraron, al revelarse, bandas muy marcadas, todas homocigotas; los de la segunda fila (lago Frías) revelaron dos bandas muy tenues, ambas de organismos homocigotas. En la cuarta y última corrida (Figura 11 d) se analizaron únicamente ejemplares extraídos del lago Frías. Las bandas reveladas en todos los casos en que se las pudo visualizar fueron tenues y no mostraron rasgos de heterocigosis.



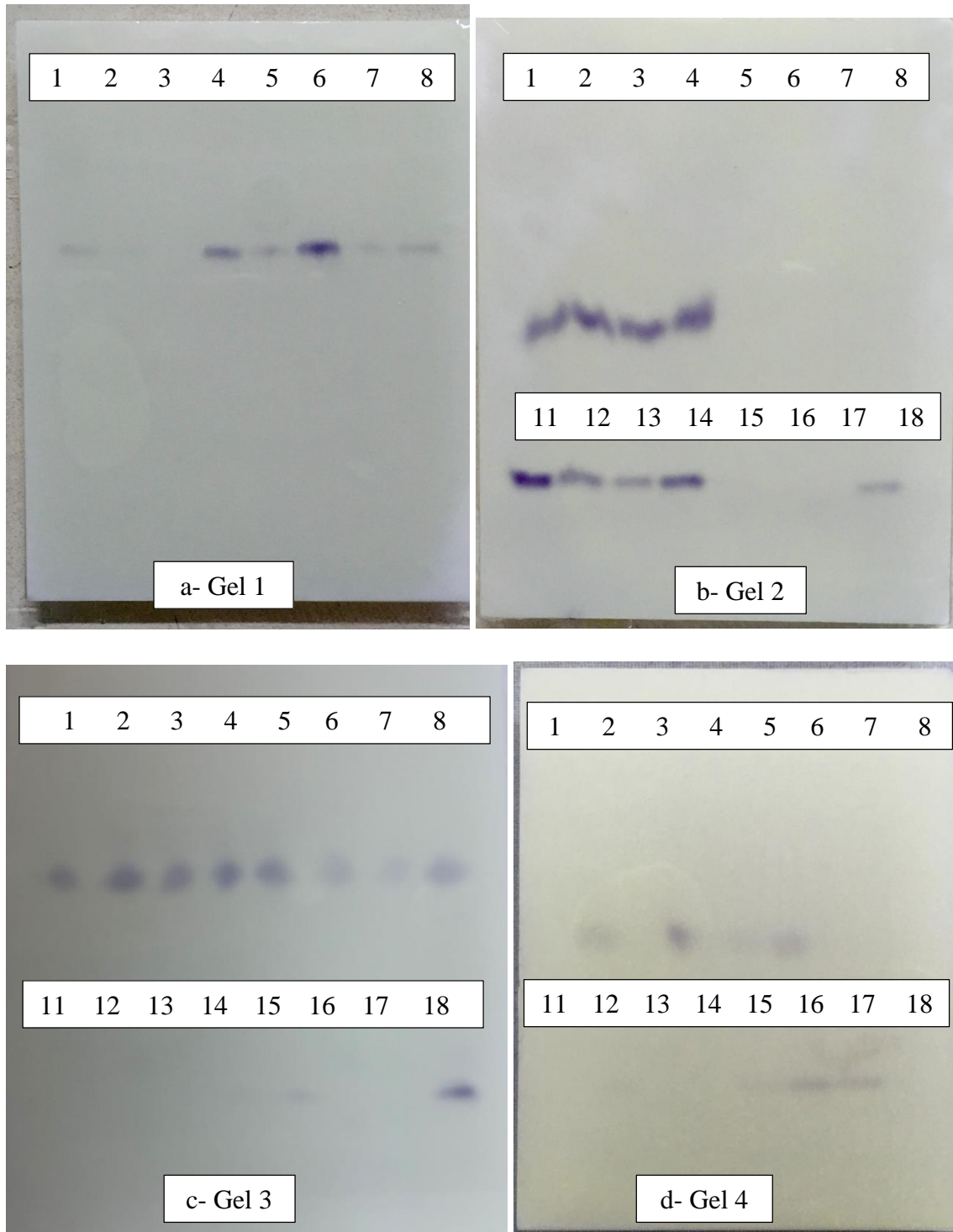


Figura 11. Imágenes de los geles de acetato de celulosa obtenidas luego de revelar con la tinción específica para GPI. a: posición 1 a 4 *Daphnias* de lago Mascardi estación 1, posición 5 a 8 lago Mascardi estación 2. B: posición 1 a 4 y 11 a 14 lago Guillermo, posición 5 a 8 y 15 a 18 lago Frías. c: posición 1 a 8 lago Guillermo, posición 11 a 18 lago Frías. d: corridas en su totalidad de ejemplares obtenidos del lago Frías.



D. commutata criada en el laboratorio:

En la figura 12 puede observarse la imagen del gel obtenido luego de haber sido revelado para la observación de las isoformas de GPI para los individuos cultivados en el laboratorio. Allí puede verse como todos los ejemplares mostraron ser homocigotas para la isoenzima analizada.

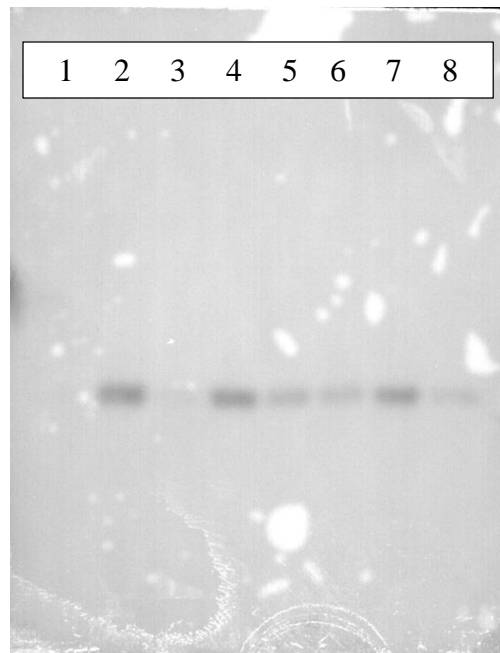


Figura 12. Imágen de los gels de acetato de celulosa obtenidas luego de revelar con la tinción específica para GPI a los individuos de *D. commutata* criados en el laboratorio.

Análisis de APA:***APA en el ambiente:***

La actividad de la fosfatasa alcalina (APA) fue medida en las dos estaciones del lago Mascardi (E1 y E2). La estación 1 (la más turbia de dicho lago) mostró una menor actividad de APA (Figura 13), teniendo los ejemplares de ese sitio una actividad media de $0.0548 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Los individuos muestreados en la estación 2 del mismo lago, que posee un mayor C:P sestónico (Tabla 2), mostraron una mayor actividad media de APA: $0.118 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Figura 13). La diferencia en dicha actividad fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$, $t = -4.390$, con 17 grados de libertad).



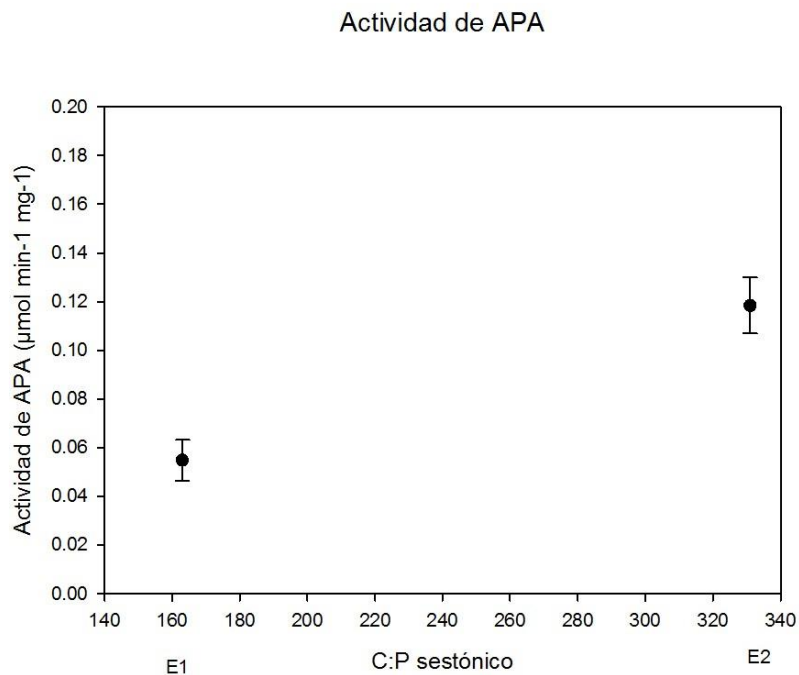


Figura 13. Actividad de APA ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) media \pm error estándar para los ejemplares colectados en la estación 1 (E1) y estación 2 (E2) del lago Mascardi. El círculo negro indica la actividad media de APA y la barra el Error Estándar.

Experimento de laboratorio:

En el experimento de laboratorio realizado con *D. commutata* bajo diferente calidad de alimento (C:P 450 vs. 150) se han encontrado diferencias significativas en la actividad de APA de ambos tratamientos (Figura 14). El tratamiento C:P 450 (baja disponibilidad de P) tuvo una actividad media de $0.163 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, mientras que el tratamiento C:P 150 (mayor disponibilidad de P) arrojó una actividad media de $0.0670 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Las diferencias resultaron estadísticamente significativas t-test: $p=0.0328$, $t=2.388$ con 13 grados de libertad.



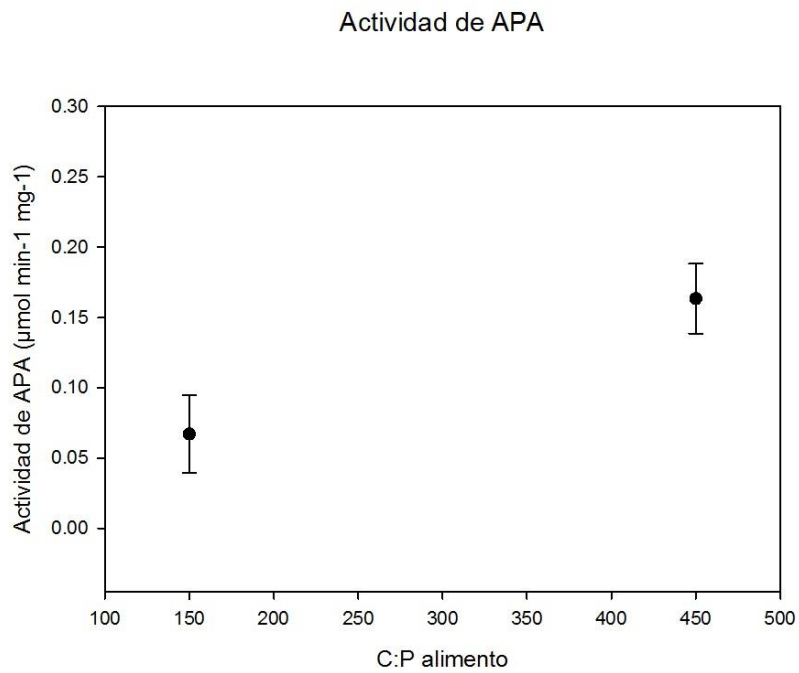


Figura 14. Actividad de APA ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) media \pm error estándar para los tratamientos C:P 150 y C:P 450 del experimento de laboratorio. El círculo negro indica la actividad media para ambos tratamientos y la barra el Error Estándar.

Discusión:

Los resultados obtenidos muestran que la relación C:P fue diferente en los lagos muestreados (Tabla 2). Estas relaciones coinciden con lo esperado, dado que los lagos con mayor penetración de luz poseen mayor relación C:P sestónica, tal como lo predice la hipótesis luz:nutrientes (Sterner *et al.*, 1997). En nuestro caso, los lagos con una menor relación C:P poseen ingresos de agua de deshielo del Monte Tronador (Frías y Mascardi Estación 1, Figuras 3 y 8), transportando en suspensión arcillas glaciares (“harina” glacial) (Ariztegui *et al.*, 2007; Laspoumaderes *et al.*, 2013). La harina glacial transportada aporta sólidos en suspensión que disminuyen la penetración de la radiación solar (como puede observarse en la figura 10), dejando una zona eufótica de menor tamaño. La zona eufótica finaliza cuando se alcanza el límite de compensación, donde llega sólo el 1% de la RFA de superficie y la tasa fotosintética se iguala con la tasa respiratoria, es decir la producción primaria neta es igual a 0. En la zona eufótica hay fijación de carbono por organismos fotosintéticos y se produce materia orgánica (Producción primaria neta >0). Por debajo de dicha zona se encuentra la zona afótica, donde la actividad fotosintética no alcanza para compensar la tasa respiratoria (Producción primaria neta <0). El lago Frías es el menos transparente de los lagos muestreados, tiene una menor zona eufótica y una menor relación C:P. Esto se debe a la concentración de sólidos totales en suspensión que posee el mismo, que es la mayor de todos los lagos muestreados ($4.75 \pm 0.47 \text{ mg L}^{-1}$ Tabla 2), a raíz de la gran cantidad de harina glacial que en él se encuentra, proveniente del deshielo de los glaciares. Por el contrario, en los lagos más transparentes (Guillermo y Mascardi en la estación 2) la disponibilidad de P mostró ser baja en relación a la disponibilidad de C (elevado C:P sestónico), dado que los mismos se encuentran alejados de la influencia glacial. Estos lagos mostraron tener una mayor zona eufótica bastante mayor a los anteriores, localizándose en ambos a profundidades cercanas a los 30 m. Al tener una zona eufótica de mayor tamaño, en dichos lagos la producción de C orgánico es mayor, lo que también explica por qué es mayor la relación C:P en ellos.

El análisis de isoformas de glucosa-6-fosfo isomerasa mostró resultados similares, tanto para los individuos colectados del campo en los diferentes lagos como para aquellos cultivados en el laboratorio. Todos los geles de acetato revelaron individuos homocigotas para las isoformas de GPI (Figuras 11 a, b, c y d y 12). Esto indicaría que



no se ha podido identificar una diferencia genética en los individuos muestreados para las isoformas de GPI. Jeyasingh *et al.* (2009) demostraron que en condiciones de bajo C:P (alta disponibilidad de P) los clones con heterocigosis en los loci de los genes de GPI fueron competitivamente superiores. Por el contrario, en condiciones de limitación por P, los homocigotas desplazaron competitivamente a los heterocigotas. En nuestro caso no se podría entonces presuponer diferencias competitivas entre organismos de diferentes ambientes.

Esta diferencia en la habilidad competitiva entre homocigotas y heterocigotas está relacionada con los mecanismos en los que interviene la GPI (Figura 1). Durante la glucólisis se produce la isomerización reversible de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato catalizada por GPI (Figura 1). La función de la GPI afecta a la eficiencia respiratoria ya que debe mantener niveles bajos de productos intermedios, que puede lograrse aumentando la actividad específica de la enzima (Watt, 1986). Boriss (2001) purificó y caracterizó alozimas de GPI de *Daphnia magna* y encontró que los heterocigotos tenían una actividad específica mucho mayor en comparación con los homocigotos. Esta mayor eficiencia implicaría que con una dieta alta en P (bajo C:P), los heterocigotas podrían tener una ventaja debido a una mayor eficiencia energética en este paso crítico de la glucólisis. Por el contrario, con una dieta baja en P (alto C:P, es decir, exceso de C tal como fue observado en los lagos andinos), la ineficiencia energética causada por la menor actividad específica de GPI de los homocigotas resultaría en una ventaja ya que se requeriría mayor consumo de C para obtener igual energía. Algunos estudios sugieren una estrecha correlación entre el C:P de la dieta y el rendimiento de genotipos de GPI en *Daphnia*, en estado salvaje (Weider & Hobæk, 1997), y en condiciones controladas de laboratorio (Jeyasingh & Weider, 2005; Weider *et al.*, 2005; Weider *et al.*, 2008). Podría ser posible que una menor eficiencia respiratoria en homocigotas de GPI en condiciones de alto C:P (es decir, el exceso de C) confiera una ventaja de aptitud, mientras que la mayor eficiencia de los heterocigotos se seleccionaría en condiciones de bajo C:P. Estos cambios en frecuencias alélicas en clones, implican un proceso evolutivo de selección natural en los cuales las condiciones ambientales de disponibilidad de P seleccionarían genotipos específicos mejor adaptados a las condiciones locales (Jeyasingh *et al.*, 2009). En nuestro estudio, con las limitaciones de número de casos estudiados, no se pudo observar diferencias en las frecuencias alélicas en GPI, ya que todos los ejemplares



analizados resultaron homocigotas. Esto podría interpretarse como una situación en la cual la variación en la disponibilidad de P (los sistemas locales tienen todos baja concentración de P) no presentaría situaciones en las cuales, la heterocigosis fuese una ventaja competitiva, suficiente como para que dicho genotipo aparezca con frecuencia en las poblaciones. Alternativamente, se podría pensar que independientemente de la disponibilidad de P, si el alelo no existe en las poblaciones locales, no podría ser seleccionado. Los estudios realizados en genética de *D. commutata*, específicamente en GPI, en la zona de estudio son inexistentes, por lo que estos son los primeros datos y no podemos asegurar que el locus tenga localmente ambos alelos, por lo que es prematuro sacar conclusiones en este sentido.

En condiciones de alto C:P, *Daphnia* no sólo requiere más P, pero también necesita eliminar el exceso de C. La diferencia de eficiencia mencionada en las diferentes configuraciones genéticas, no es la única forma de modificar la excreción de C. Por ejemplo, Darchambeau *et al.* (2003) y He & Wang (2008) mostraron que cuando *Daphnia* es alimentada con alimento de alta relación C:P (>300 molar), las tasas respiratorias se incrementan como una forma de aumentar la excreción de C para mantener las relaciones elementales internas (homeóstasis estequiométrica). Esta respuesta fisiológica permitiría respuestas rápidas sin necesidad de cambios genéticos que involucran procesos evolutivos. Similar a los cambios en la respiración, son los cambios que se observan en otras respuestas fisiológicas como son las actividades de enzimas específicas. Tal es el caso que se estudió de la APA.

Con respecto al análisis de la actividad de la fosfatasa alcalina (APA), sí pudieron observarse diferencias significativas entre los grupos contrastados. Los individuos colectados en la estación 2 del lago Mascardi (estación con mayor relación C:P) mostraron una actividad de APA mayor a la de aquellos muestreados en la estación número 1 del mismo lago (donde la disponibilidad de P es mayor, dado que la relación C:P es menor). Similares resultados se han encontrado en el experimento realizado con individuos de laboratorio, donde aquellos expuestos a condiciones con una alta relación C:P (450) mostraron tener una actividad de fosfatasa alcalina notablemente superior a la de los organismos con una relación C:P igual a 150. Los datos obtenidos coinciden con lo esperado, dado que es razonable que la actividad de la fosfatasa sea más alta en aquellos sistemas donde la disponibilidad de P es menor (mayor C:P), dado que dicha enzima



libera fosfatos unidos a macromoléculas, permitiendo el transporte y la absorción celular de P proveniente de los alimentos (Elser *et al.*, 2010; Wojewodzic *et al.*, 2011). Por esa razón entonces es esperable que los organismos que habiten en sitios con menor disponibilidad de P sestónico tengan una mayor actividad de dicha enzima.

Al medir la actividad de APA, se ha buscado medir la plasticidad fisiológica de *D. commutata*. Se ha podido observar claramente (Figuras 13 y 14) que los individuos analizados responden a una presión ambiental: al disminuir la disponibilidad de P (aumentar la relación C:P), la producción de APA ha aumentado. Dicha enzima es producida en el organismo para poder satisfacer las demandas de P necesarias para sus actividades metabólicas. Al haber observado que los individuos colectados en el campo responden de manera similar a los individuos criados en el laboratorio, se puede sugerir que existe una regulación fisiológica. Frente a un estímulo (en este caso, el aumento en la relación C:P), el individuo disminuye sus concentraciones fisiológicas de P, por lo que envía señales celulares que permitan regular positivamente la producción de APA. Esto parece ser una adaptación fisiológica frente a un cambio ambiental (Wolinski *et al.*, 2016). En los lagos donde habitan estos individuos, particularmente en el lago Frías y en la estación 1 del lago Mascardi, el nivel de turbidez del agua (por lo tanto también su relación C:P) varía con las estaciones del año. En los meses de invierno y primavera, estos lagos son más transparentes, dado que los glaciares que alimentan sus afluentes erosionan menos la roca madre. Como resultado de esta diferente condición de luz podría observarse una relación C:P sestónica mayor que la que se presenta en los meses de verano y otoño, donde la velocidad de los glaciares aumenta erosionando más la roca madre. Por lo tanto, en los meses estivales es probable que la relación C:P sestónica disminuya más que en otros períodos del año. La plasticidad fenotípica observada en los ejemplares de *D. commutata* analizados en relación a la APA puede entenderse como muy beneficiosa en las condiciones cambiantes de los lagos en los que habita (menor o mayor C:P sestónico). Dicha plasticidad podría resultar ser más beneficiosa que un cambio genético estable (homocigosis vs. heterocigosis en GPI), dado que estos últimos no permitirían adaptarse tan rápidamente a un ambiente cambiante como los lagos afectados por glaciares.

Cuando una población se enfrenta con nuevas presiones de selección, como pueden ser aquellas impuestas por el actual cambio climático (Houghton *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2001), puede responder básicamente de tres formas. La primera es evadir el



problema, dispersándose a otros hábitats más adecuados. Por ejemplo, los cambios que ocurren en el ensamble de nanoflagelados frente al mayor ingreso de arcillas glaciarias (Schenone *et al.*, 2020). La segunda es ajustarse a las condiciones cambiantes mediante mecanismos de plasticidad fenotípica, sin alterar su constitución genética. Esto ha sido observado en este trabajo en relación a la APA. La tercera es adaptarse a las condiciones cambiantes a través de cambios genéticos, siguiendo un proceso evolutivo. Esto último es observado por Jeyasingh *et al.* (2009) en *Daphnia* de Estados Unidos. Mientras que evadir el sitio cambiante lleva a la extinción local pero con persistencia en otro sitio, la plasticidad fenotípica y la adaptación pueden prevenir la extinción local (Gienapp *et al.*, 2008).

Es muy importante aclarar la diferencia entre las respuestas genéticas (evolutivas) y fenotípicas (componentes plásticos y no genéticos) para entender el papel que juegan la plasticidad fenotípica y la genética en la adaptación de las especies al cambio climático (Gienapp *et al.*, 2008). En este trabajo se buscó estudiar si existían respuestas genéticas (al estudiar las diferentes isoformas de GPI) y fenotípicas (al analizar la actividad de APA) de ejemplares de *D. commutata* colectados en diferentes ambientes, algunos de los cuales están sufriendo claramente los efectos del cambio climático. La retracción de glaciares, específicamente, es uno de los efectos esperados del cambio climático (IPCC, 2013). No se han encontrado diferencias a nivel genético (en las isoformas de GPI), pero sin embargo, sí se han encontrado diferencias fenotípicas. Esto coincide con lo encontrado en la revisión realizada por Gienapp *et al.* (2008), que demostraron con evidencias empíricas la existencia de respuestas microevolutivas recientes al cambio climático. Estos autores indicaron que diferentes rasgos del cambio climático son claramente visibles en procesos ecológicos, mientras que respuestas similares a nivel microevolutivo son más raras en la literatura. Esto podría deberse a que los cambios evolutivos operan a velocidades aún más lentas que los ritmos rápidamente cambiantes impuestos por el cambio climático. Existe muy poca evidencia de adaptación evolutiva al cambio climático, dado que, la mayoría de los casos revisados por Gienapp *et al.* (2008) muestran que la mayoría de las alteraciones que son percibidas como adaptaciones microevolutivas son en realidad respuestas plásticas inducidas por el ambiente cambiante. La plasticidad fenotípica provee un mecanismo importante para hacer frente a las condiciones ambientales cambiantes (Bradshaw, 1965; Przybylo *et al.*, 2000), pero existen límites a



las respuestas plásticas (Pigliucci, 1996; DeWitt, 1998; De Jong, 2005) ya que es muy poco probable que provean soluciones a largo plazo para los desafíos de un cambio ambiental continuo y direccionado.

Los ecosistemas alrededor del mundo se ven afectados por el cambio climático a nivel regional, en particular por el aumento de la temperatura. La disminución en la cobertura de nieve y la retracción de los glaciares de montaña y masas de hielo en los últimos 50 años es consistente con los efectos del cambio climático (IPCC, 2013). Se espera que la mayoría de los glaciares se derritan de manera significativa en las próximas décadas, y, eventualmente, muchos de ellos desaparecerán. Además de cambiar el ecosistema glaciar en sí, la retracción de estas masas de hielo también afecta a los ecosistemas linderos (Laspoumaderes *et al.*, 2017). Su derretimiento implica la erosión de la roca madre que se encuentra por debajo del glaciar, lo que produce que grandes cantidades de sedimentos ingresen a los lagos y ríos glaciares, originando ambientes turbios (Zemp *et al.*, 2009). La adaptación de las especies que allí habitan a estas condiciones, ya sea mediante mecanismos de plasticidad fenotípica o mecanismos genéticos será crucial para garantizar su supervivencia a nivel poblacional a largo plazo.

Es importante destacar, en este contexto, las limitaciones de este estudio: al carecer de tiempo en el laboratorio por las conocidas disposiciones establecidas por la condición sanitaria ASPO, se contó con un número muy bajo de repeticiones en los estudios realizados. En el caso de GPI se pudieron correr muy pocos geles y, en particular, para el caso de lago Frías no se pudieron realizar adecuaciones del método para una mejor visualización de las bandas. Por otra parte, el bajo número de ejemplares analizados, si bien permite sugerir homocigosis, no permitió detectar heterocigotas si estos existieran en baja frecuencia. Además, al estudiar la APA únicamente del lago Mascardi, no se pudo observar si la respuesta plástica observada en este lago frente al cambio de las relaciones C:P sestónicas se mantenía también en individuos colectados en otros lagos. Lamentablemente los organismos de los lagos Frías y Guillelmo no pudieron ser analizados en este trabajo. Sería interesante, en futuros estudios, profundizar los estudios de GPI y analizar si la respuesta plástica de APA también está presente en los individuos del lago Frías y el lago Guillelmo.



Conclusiones:

Las conclusiones de este trabajo se refieren a la respuesta de las poblaciones de *D. commutata* al cambio en la relación C:P de los lagos en los que habita y la respuesta de estos individuos del zooplancton a dichos cambios, para mantener sus relaciones elementales estables.

- Se ha podido observar que los lagos analizados en este trabajo mostraron una diferente concentración de Sólidos Totales en Suspensión, y se han distinguido dos grupos, entre lagos con alta relación C:P y lagos que poseen esta relación más baja.
- No se han encontrado diferencias genéticas, en lo que respecta a isoformas de glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI), entre los organismos analizados de los diferentes lagos. Por lo tanto, se puede sugerir que los cambios en las relaciones C:P no han influenciado cambios a nivel genético.
- Sí se han podido observar cambios de plasticidad fenotípica asociados a cambios en las relaciones C:P, en lo que respecta a la actividad de la fosfatasa alcalina. Esto indica que los cambios ambientales en esta relación son detectados por *D. commutata*, quién, en caso que la relación C:P aumente, envía señales a nivel celular para promover la producción de esta enzima, y así poder mantener sus relaciones elementales internas más estables.
- Si bien no se han podido observar cambios evolutivos en respuesta a las condiciones cambiantes impulsadas por el cambio climático global, cabe destacar que, sí se han podido detectar respuestas plásticas frente a dichos cambios, evidenciando que los organismos pueden responder a las condiciones cambiantes de su entorno para mantener su homeostasis.



Bibliografía:

- Adamowicz, S. J., Hebert, P. D. & Marinone, M. C. (2004) Species diversity and endemism in the *Daphnia* of Argentina: a genetic investigation. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **140**, 171-205.
- Andersen, T. & Hessen, D. O. (1991) Carbon, nitrogen, and phosphorus content of freshwater zooplankton. *Limnology and Oceanography*, **36**, 807-814.
- APHA (2005) *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, AWWA.
- Ariztegui, D., Bösch, P. & Davaud, E. (2007) Dominant ENSO frequencies during the Little Ice Age in Northern Patagonia: the varved record of proglacial Lago Frías, Argentina. *Quaternary International*, **161**, 46-55.
- Balseiro, E., Modenutti, B., Queimalinos, C. & Reissig, M. (2007) *Daphnia* distribution in Andean Patagonian lakes: effect of low food quality and fish predation. *Aquatic Ecology*, **41**, 599-609.
- Balseiro, E., Souza, M. S., Modenutti, B. & Reissig, M. (2008) Living in transparent lakes: Low food P: C ratio decreases antioxidant response to ultraviolet radiation in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, **53**, 2383-2390.
- Bastidas Navarro, M., Martyniuk, N., Balseiro, E. & Modenutti, B. (2018) Effect of glacial lake outburst floods on the light climate in an Andean Patagonian lake: implications for planktonic phototrophs. *Hydrobiologia*, **816**, 39-48.
- Boriss, H. (2001) Purification and characterization of phosphoglucose isomerase allozymes from *Daphnia magna*. *Biochimie*, **83**, 979-984.
- Bradshaw, A. D. (1965) Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants, p. 115-155. *Advances in Genetics*. Elsevier.
- Brzeziński, T. & Von Elert, E. (2007) Biochemical food quality effects on a *Daphnia* hybrid complex. *Limnology and Oceanography*, **52**, 2350-2357.
- Chillrud, S., Pedrozo, F., Temporetti, P., Planas, H. & Froelich, P. (1994) Chemical weathering of phosphate and germanium in glacial meltwater streams: effects of subglacial pyrite oxidation. *Limnology and Oceanography*, **39**, 1130-1140.
- Darchambeau, F., Faerøvig, P. J. & Hessen, D. O. (2003) How *Daphnia* copes with excess carbon in its food. *Oecologia*, **136**, 336-346.



- De Jong, G. (2005) Evolution of phenotypic plasticity: patterns of plasticity and the emergence of ecotypes. *New Phytologist*, **166**, 101-118.
- DeWitt, T. (1998) Costs and limits of phenotypic plasticity: Tests with predator-induced morphology and life history in a freshwater snail. *Journal of Evolutionary Biology*, **11**, 465-480.
- Elser, J., Acharya, K., Kyle, M., Cotner, J., Makino, W., Markow, T., Watts, T., Hobbie, S., Fagan, W. & Schade, J. (2003) Growth rate–stoichiometry couplings in diverse biota. *Ecology Letters*, **6**, 936-943.
- Elser, J., Sterner, R., Gorokhova, E. a., Fagan, W., Markow, T., Cotner, J., Harrison, J., Hobbie, S., Odell, G. & Weider, L. (2000) Biological stoichiometry from genes to ecosystems. *Ecology Letters*, **3**, 540-550.
- Elser, J. J. & Hassett, R. P. (1994) A stoichiometric analysis of the zooplankton–phytoplankton interaction in marine and freshwater ecosystems. *Nature*, **370**, 211-213.
- Elser, J. J., Peace, A. L., Kyle, M., Wojewodzic, M., McCrackin, M. L., Andersen, T. & Hessen, D. O. (2010) Atmospheric nitrogen deposition is associated with elevated phosphorus limitation of lake zooplankton. *Ecology Letters*, **13**, 1256-1261.
- Elser, J. J. & Urabe, J. (1999) The stoichiometry of consumer-driven nutrient recycling: theory, observations, and consequences. *Ecology*, **80**, 735-751.
- Fernando, C., Paggi, J. & Rajapaksa, R. (1987) Daphnia in tropical lowlands. *Daphnia Mememorie del Istituto Italiano di Idrobiologia*, **45**, 107-141.
- Fountain, A. G., Campbell, J. L., Schuur, E. A., Stammerjohn, S. E., Williams, M. W. & Ducklow, H. W. (2012) The disappearing cryosphere: impacts and ecosystem responses to rapid cryosphere loss. *BioScience*, **62**, 405-415.
- Frost, P. & Elser, J. (2002) Growth responses of littoral mayflies to the phosphorus content of their food. *Ecology Letters*, **5**, 232-240.
- Gienapp, P., Teplitsky, C., Alho, J., Mills, J. & Merilä, J. (2008) Climate change and evolution: disentangling environmental and genetic responses. *Molecular Ecology*, **17**, 167-178.
- Grover, J. P., Hudziak, J. & Grover, J. D. (1997) *Resource competition*. Springer Science & Business Media.



- Guillard, R. R. & Lorenzen, C. J. (1972) Yellow-green algae with chlorophyllide C 1, 2. *Journal of Phycology*, **8**, 10-14.
- Hall, S. R., Leibold, M. A., Lytle, D. A. & Smith, V. H. (2004) Stoichiometry and planktonic grazer composition over gradients of light, nutrients, and predation risk. *Ecology*, **85**, 2291-2301.
- He, X. & Wang, W. X. (2008) Stoichiometric regulation of carbon and phosphorus in P-deficient *Daphnia magna*. *Limnology and Oceanography*, **53**, 244-254.
- Hebert, P. D. (1978) The population biology of daphnia (crustacea, daphnidae). *Biological Reviews*, **53**, 387-426.
- Hebert, P. D. & Beaton, M. J. (1989) *Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis: a practical handbook*. Helena Laboratories.
- Hessen, D. & Lyche, A. (1991) Inter- and intraspecific variations in zooplankton element composition. *Archiv für Hydrobiologie*, **121**, 343-353.
- Hessen, D. O. (1990) Carbon, nitrogen and phosphorus status in *Daphnia* at varying food conditions. *Journal of Plankton Research*, **12**, 1239-1249.
- Hessen, D. O., Elser, J. J., Sterner, R. W. & Urabe, J. (2013) Ecological stoichiometry: an elementary approach using basic principles. *Limnology and Oceanography*, **58**, 2219-2236.
- Hessen, D. O., Færøvig, P. J. & Andersen, T. (2002) Light, nutrients, and P: C ratios in algae: grazer performance related to food quality and quantity. *Ecology*, **83**, 1886-1898.
- Houghton, J. T., Ding, Y., Griggs, D. J., Noguera, M., van der Linden, P. J., Dai, X., Maskell, K. & Johnson, C. (2001) *Climate change 2001: the scientific basis*. The Press Syndicate of the University of Cambridge.
- Hylander, S., Jephson, T., Lebret, K., Von Einem, J., Fagerberg, T., Balseiro, E., Modenutti, B., Souza, M. S., Laspoumaderes, C. & Jönsson, M. (2011) Climate-induced input of turbid glacial meltwater affects vertical distribution and community composition of phyto- and zooplankton. *Journal of Plankton Research*, **33**, 1239-1248.
- IPCC (2013) *Climate Change 2013*, Cambridge University Press.



- Iriondo, M. (1974) Modelo de sedimentación en el lago Mascarid, Provincia de Río Negro *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, **29**, 349-358.
- Iwabuchi, T. & Urabe, J. (2012) Competitive outcomes between herbivorous consumers can be predicted from their stoichiometric demands. *Ecosphere*, **3**, 1-16.
- Jacobsen, D., Milner, A. M., Brown, L. E. & Dangles, O. (2012) Biodiversity under threat in glacier-fed river systems. *Nature Climate Change*, **2**, 361-364.
- Jeyasingh, P. D. & Weider, L. J. (2005) Phosphorus availability mediates plasticity in life-history traits and predator-prey interactions in *Daphnia*. *Ecology Letters*, **8**, 1021-1028.
- Jeyasingh, P. D. & Weider, L. J. (2007) Fundamental links between genes and elements: evolutionary implications of ecological stoichiometry. *Molecular Ecology*, **16**, 4649-4661.
- Jeyasingh, P. D., Weider, L. J. & Sterner, R. W. (2009) Genetically-based trade-offs in response to stoichiometric food quality influence competition in a keystone aquatic herbivore. *Ecology Letters*, **12**, 1229-1237.
- Jones, P., Osborn, T. & Briffa, K. (2001) The evolution of climate over the last millennium. *Science*, **292**, 662-667.
- Kilham, S. S., Kreeger, D. A., Lynn, S. G., Goulden, C. E. & Herrera, L. (1998) COMBO: a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia*, **377**, 147-159.
- Laspoumaderes, C., Modenutti, B., Souza, M. S., Bastidas Navarro, M., Cuassolo, F. & Balseiro, E. (2013) Glacier melting and stoichiometric implications for lake community structure: zooplankton species distributions across a natural light gradient. *Global Change Biology*, **19**, 316-326.
- Laspoumaderes, C., Souza, M. S., Modenutti, B. & Balseiro, E. (2017) Glacier melting and response of *Daphnia* oxidative stress. *Journal of Plankton Research*, **39**, 675-686.
- Leiva, J. C. (1999) Recent fluctuations of the Argentinian glaciers. *Global and Planetary Change*, **22**, 169-177.
- Martyniuk, N., Modenutti, B. & Balseiro, E. G. (2014) Can increased glacial melting resulting from global change provide attached algae with transient protection against high irradiance? *Freshwater Biology*, **59**, 2290-2302.



- Martyniuk, N., Modenutti, B. & Balseiro, E. G. (2019a) Light intensity regulates stoichiometry of benthic grazers through changes in the quality of stream periphyton. *Freshwater Science*, **38**, 391-405.
- Martyniuk, N., Modenutti, B. & Balseiro, E. G. (2019b) Seasonal variability in glacial influence affects macroinvertebrate assemblages in North-Andean Patagonian glacier-fed streams. *Inland Waters*, 1-12.
- Masiokas, M. H., Villalba, R., Luckman, B. H., Lascano, M. E., Delgado, S. & Stepanek, P. (2008) 20th-century glacier recession and regional hydroclimatic changes in northwestern Patagonia. *Global and Planetary Change*, **60**, 85-100.
- McCarthy, S. D., Rafferty, S. P. & Frost, P. C. (2010) Responses of alkaline phosphatase activity to phosphorus stress in *Daphnia magna*. *Journal of Experimental Biology*, **213**, 256-261.
- Milner, A. M., Brown, L. E. & Hannah, D. M. (2009) Hydroecological response of river systems to shrinking glaciers. *Hydrological Processes*, **23**, 62-77.
- Milner, A. M., Robertson, A. L., Brown, L. E., Sønderland, S. H., McDermott, M. & Veal, A. J. (2011) Evolution of a stream ecosystem in recently deglaciated terrain. *Ecology*, **92**, 1924-1935.
- Modenutti, B., Balseiro, E., Navarro, M. B., Laspoumaderes, C., Souza, M. S. & Cuassolo, F. (2013) Environmental changes affecting light climate in oligotrophic mountain lakes: the deep chlorophyll maxima as a sensitive variable. *Aquatic Sciences*, **75**, 361-371.
- Modenutti, B., Balseiro, E. & Queimalinos, C. (2000) Ciliate community structure in two South Andean lakes: the effect of lake water on *Ophrydium naumanni* distribution. *Aquatic Microbial Ecology*, **21**, 299-307.
- Modenutti, B., Bastidas Navarro, M., Martyniuk, N. & Balseiro, E. (2018) Melting of clean and debris-rich ice differentially affect nutrients, dissolved organic matter and bacteria respiration in the early ontogeny of the newly formed proglacial Ventisquero Negro Lake (Patagonia Argentina). *Freshwater Biology*, **63**, 1341-1351.
- Morris, D. P., Zagarese, H., Williamson, C. E., Balseiro, E. G., Hargreaves, B. R., Modenutti, B., Moeller, R. & Queimalinos, C. (1995) The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnology and Oceanography*, **40**, 1381-1391.



- Nelson, L. & Cox, M. M. (2000) *Lehninger Principles of Biochemistry*. Third. *Worth Publishers*. N. Y.
- Paggi, J. (1998) Cladocera (Anomopoda y Ctenopoda). *Biodiversidad de Artrópodos Argentinos*. Ediciones Sur, La Plata.
- Peter, H. & Sommaruga, R. (2016) Shifts in diversity and function of lake bacterial communities upon glacier retreat. *The ISME Journal*, **10**, 1545-1554.
- Pigliucci, M. (1996) Modelling phenotypic plasticity. II. Do genetic correlations matter? *Heredity*, **77**, 453-460.
- Przybylo, R., Sheldon, B. C. & Merilä, J. (2000) Climatic effects on breeding and morphology: evidence for phenotypic plasticity. *Journal of Animal Ecology*, **69**, 395-403.
- Rabassa, J. (2008) Late cenozoic glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego. *Developments in Quaternary Sciences*, **11**, 151-204.
- Ren, Z., Martyniuk, N., Oleksy, I. A., Swain, A. & Hotaling, S. (2019) Ecological Stoichiometry of the Mountain Cryosphere. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **7**.
- Ruiz, L., Berthier, E., Viale, M., Pitte, P. & Masiokas, M. H. (2017) Recent geodetic mass balance of Monte Tronador glaciers, northern Patagonian Andes. *The Cryosphere*, **11**, 619-634.
- Saros, J. E., Rose, K. C., Clow, D. W., Stephens, V. C., Nurse, A. B., Arnett, H. A., Stone, J. R., Williamson, C. E. & Wolfe, A. P. (2010) Melting alpine glaciers enrich high-elevation lakes with reactive nitrogen. *Environmental Science & Technology*, **44**, 4891-4896.
- Schenone, L., Balseiro, E. G., Bastidas Navarro, M. & Modenutti, B. E. (2020) Modelling the consequence of glacier retreat on mixotrophic nanoflagellate bacterivory: a Bayesian approach. *Oikos*, **129**, 1216-1228.
- Seidendorf, B., Boersma, M. & Schwenk, K. (2007) Evolutionary stoichiometry: the role of food quality for clonal differentiation and hybrid maintenance in a *Daphnia* species complex. *Limnology and Oceanography*, **52**, 385-394.
- Slemmons, K. E., Saros, J. E. & Simon, K. (2013) The influence of glacial meltwater on alpine aquatic ecosystems: a review. *Environmental Science: Processes & Impacts*, **15**, 1794-1806.



- Sommaruga, R. (2015) When glaciers and ice sheets melt: consequences for planktonic organisms. *Journal of Plankton Research*, **37**, 509-518.
- Sterner, R. W. & Elser, J. J. (2002) *Ecological stoichiometry: the biology of elements from molecules to the biosphere*. Princeton university press.
- Sterner, R. W., Elser, J. J., Fee, E. J., Guildford, S. J. & Chrzanowski, T. H. (1997) The light: nutrient ratio in lakes: the balance of energy and materials affects ecosystem structure and process. *The American Naturalist*, **150**, 663-684.
- Tank, S. E., Xenopoulos, M. A. & Hendzel, L. L. (2005) Effect of ultraviolet radiation on alkaline phosphatase activity and planktonic phosphorus acquisition in Canadian boreal shield lakes. *Limnology and Oceanography*, **50**, 1345-1351.
- Tilman, D. (1982) *Resource competition and community structure*. Princeton university press.
- Urabe, J., Kyle, M., Makino, W., Yoshida, T., Andersen, T. & Elser, J. (2002) Reduced light increases herbivore production due to stoichiometric effects of light/nutrient balance. *Ecology*, **83**, 619-627.
- Villalba, R. (1990) Climatic fluctuations in northern Patagonia during the last 1000 years as inferred from tree-ring records. *Quaternary Research*, **34**, 346-360.
- von Elert, E. (2004) Food quality constraints in *Daphnia*: interspecific differences in the response to the absence of a long chain polyunsaturated fatty acid in the food source. *Hydrobiologia*, **526**, 187-196.
- Wagner, N. D. & Frost, P. C. (2012) Responses of alkaline phosphatase activity in *Daphnia* to poor nutrition. *Oecologia*, **170**, 1-10.
- Watt, W. B. (1986) Power and efficiency as indexes of fitness in metabolic organization. *The American Naturalist*, **127**, 629-653.
- Weider, L. J. & Hobæk, A. (1997) Postglacial dispersal, glacial refugia, and clonal structure in Russian/Siberian populations of the arctic *Daphnia pulex* complex. *Heredity*, **78**, 363-372.
- Weider, L. J., Jeyasingh, P. D. & Looper, K. G. (2008) Stoichiometric differences in food quality: Impacts on genetic diversity and the coexistence of aquatic herbivores in a *Daphnia* hybrid complex. *Oecologia*, **158**, 47-55.
- Weider, L. J., Makino, W., Acharya, K., Glenn, K. L., Kyle, M., Urabe, J. & Elser, J. J. (2005) Genotype× environment interactions, stoichiometric food quality effects, and clonal coexistence in *Daphnia pulex*. *Oecologia*, **143**, 537-547.



- Wheat, C. W., Watt, W. B., Pollock, D. D. & Schulte, P. M. (2006) From DNA to fitness differences: sequences and structures of adaptive variants of *Colias* phosphoglucose isomerase (PGI). *Molecular Biology and Evolution*, **23**, 499-512.
- Wojewodzic, M. W., Kyle, M., Elser, J. J., Hessen, D. O. & Andersen, T. (2011) Joint effect of phosphorus limitation and temperature on alkaline phosphatase activity and somatic growth in *Daphnia magna*. *Oecologia*, **165**, 837-846.
- Wolinski, L., Laspoumaderes, C., Bastidas Navarro, M., Modenutti, B. E. & Balseiro, E. G. (2013) The susceptibility of cladocerans in North Andean Patagonian lakes to volcanic ashes. *Freshwater Biology*, **58**, 1878-1888.
- Wolinski, L., Modenutti, B., Souza, M. S. & Balseiro, E. (2016) Interactive effects of temperature, ultraviolet radiation and food quality on zooplankton alkaline phosphatase activity. *Environmental Pollution*, **213**, 135-142.
- Zemp, M., Hoelzle, M. & Haeberli, W. (2009) Six decades of glacier mass-balance observations: a review of the worldwide monitoring network. *Annals of Glaciology*, **50**, 101-111.



Agradecimientos:

A mis directores, Esteban Balseiro y Beatriz Modenutti, por haberme guiado, ayudado y acompañado en este proceso. En particular agradecerles por su paciencia y compromiso a la hora de dirigirme, y por estar presentes en cada etapa del proceso. Gracias por acompañarme en estos primeros pasos en la ciencia y por compartir conmigo su experiencia y conocimiento.

A los integrantes del laboratorio de Limnología del Centro Regional Universitario Bariloche, por el apoyo, acompañamiento y ayuda recibida de su parte. Gracias en especial a Nicolas Martyniuk por compartir conmigo las imágenes esquemáticas de los lagos muestreados y a Luca Schenone por permitirme recuperar mi cuaderno de laboratorio durante el aislamiento dado por la pandemia de COVID-19.

A mi familia por el continuo acompañamiento, amor y cariño brindado durante la realización de la carrera y en particular por el aguante y tolerancia que me tuvieron durante el desarrollo de la tesina. Sin ellos nada de esto hubiera sucedido.

A Mica, Jose, Nati, Lihuen, Franco y Facu, los mejores compañeros de la facultad que alguien pudo haber pedido, eternos amantes de la biología y las risas en los laboratorios. Gracias por hacer de cada cursada más amena y cada recreo más divertido. Gracias por compartir la curiosidad por el mundo vivo y, sobre todo, gracias por su compañerismo y alegría. Sin ellos la carrera hubiera menos divertida.

A mis amigos de toda la vida: Vicky, Clari, ambas Flores, Juli, Jessi, Meri, Agus, Pedro, Franco y Juanma, por aguantarme cada dato biológico que comentaba en una juntada o en la montaña. Gracias por apoyarme siempre, por festejar conmigo mis alegrías y acompañarme en mis tristezas. Gracias por su inquebrantable apoyo.

Al Centro Regional Universitario Bariloche y a la Universidad Nacional del Comahue, por permitirme estudiar esta carrera tan hermosa e interesante de manera libre y gratuita. Gracias a cada uno de los profesores que me acompañaron en este proceso, gracias por la experiencia y sabiduría compartida. Gracias por inspirarme tanto.

Esta tesina fue realizada en el marco de un proyecto que contó con una beca CIN (Consejo Interuniversitario Nacional) de estímulo a la vocación científica y dentro de los proyectos FONCyT PICT 2017-1940 y FONCyT PICT 2018-1563.

