



Universidad Nacional del Comahue  
Centro Regional Universitario Bariloche

**Impacto de la radiación ultravioleta (RUV) en estadios larvales de  
distintas especies de cangrejos**

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en Biología

Lic. Rodrigo D. Hernández Moresino

Director: Dr. E. Walter Helbling

Co-director: Dr. Pedro J. Barón

2012

## *Agradecimientos*

Quiero agradecer especialmente a mi director Walter Helbling con quien pasé por muchos estados de ánimo y de relación de trabajo, pero con quien siempre guarde un inmenso respeto. Su guía constante en este largo proceso hizo que sea en mi opinión un inmejorable director. Espero haber aprendido lo suficiente de Walter para llegar a ser un buen investigador en el futuro. Cito dos frases célebres que me quedarán de por vida:

*“Preferible ser cabeza de ratón y no cola de león”*

*“El sentido común es el menos común de los sentidos”*

Agradecer a todo el grupo de trabajo de la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU). Especialmente a Rodrigo Gonçalves por saciar casi todas mis dudas en fotobiología, informática, y muchas más. A Klaudia Hernández Rondón quien fue en muchos casos un diván para los inicios de este plan donde me encontré algo perdido y confundido. A Valeria Fiorda Giordanino una excelente persona y compañera en la que siempre pude contar. A Virginia Villafañe por sus comentarios y correcciones en los trabajos publicados. A Emilia, Roberto y Niní por tener siempre a tiro los pedidos que les hacía. Al resto del equipo con los que no llegué a tener una relación personal ni de trabajo, también les agradezco el tiempo compartido.

Agradecer también a mi co-director Pedro Barón quien ayudó principalmente facilitando la obtención de muestras, equipamientos y el nexa con otros becarios de su grupo LAPEMAR que fueron de ayuda durante el desarrollo de la tesis. Ente ellos, quiero agradecer especialmente a Fernando Dellatorre quien me guió muchas veces con sus conocimientos en temas relacionados a la distribución y tipo de especies de cangrejos que se encuentran en la zona. A Jimena Dima y Ximena Gonzales Pisani por compartir esfuerzos para las campañas y obtención de ejemplares.

Agradezco la calidez y predisposición de Tomás Luppi quien me guió en los inicios de esta tesis en temas relacionados con el cultivo y mantenimientos de larvas de cangrejos.

Este doctorado fue financiado por completo con una Beca Interna de Posgrado del CONICET. La Fundación Playa Unión subsidió parte de los gastos de investigación. El equipamiento e instrumental de trabajo fueron financiados por tres proyectos otorgados a investigadores de la Estación de Fotobiología Playa Unión y financiados por la ANPCyT: PICT 2003-13388, PICT 2005-32034 y PICT 2007-01651. Para la obtención y mantenimiento en acuario de cangrejos se contó con fondos de los proyectos financiados por ANPCyT (PICT 14700), por CONICET (PIP 5835) y por PNUD-ARG 02/018 (GEF) cuyo beneficiario fue Pedro J. Barón.

No sería nada sin la contención y la ayuda de mi mujer en los momentos de debilidad, a Vane dedico especialmente esta tesis, mi compañera de vida. A mis hijos Ema y Tomás, gracias por elegirnos!!! A mis queridos viejitos, cimientos de mi crecimiento. A mi hermanita que junto a Seba me hicieron padrino de un sol, Isabella. A la familia de Vane, mi familia, quienes me brindaron un lugar de hijo y hermano. Abuelita, me hubiese gustado que estés en este momento. Los amo a todos....

## ***Contenidos***

<b>Lista de figuras y tablas.....</b>	<b>iv</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>vi</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>viii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xi</b>
 <b><i>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</i></b>	 <b><i>1</i></b>
<b>CONCEPTOS GENERALES.....</b>	<b>1</b>
<i>i) Radiación solar.....</i>	<i>1</i>
<i>ii) Capa de ozono y radiación ultravioleta.....</i>	<i>2</i>
<i>iii) Atenuación de la radiación solar.....</i>	<i>4</i>
<i>iv) Efectos de la RUV sobre los organismos vivos.....</i>	<i>5</i>
<i>v) Efectos combinados de la RUV y la temperatura.....</i>	<i>7</i>
<i>vi) Adaptaciones a la RUV.....</i>	<i>8</i>
<i>vii) Los cangrejos como organismos modelo de estudio de los efectos de la RUV.....</i>	<i>10</i>
<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</b>	<b>11</b>
<b>ESTRUCTURA DE LA TESIS.....</b>	<b>13</b>
 <b><i>MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES: OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE CANGREJOS.....</i></b>	 <b><i>14</i></b>
<i>i) Especies estudiadas y características del área de muestreo.....</i>	<i>14</i>
<i>ii) Mantenimiento de ejemplares adultos y obtención de larvas.....</i>	<i>19</i>
 <b><i>CAPÍTULO 1.....</i></b>	 <b><i>22</i></b>
<b>Efectos combinados de la RUV y temperatura en la supervivencia de larvas de cangrejos (Zoea I) de Patagonia: Rol de los compuestos que absorben RUV.....</b>	<b>22</b>

INTRODUCCIÓN.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
<i>Muestreo/mantenimiento de especies.....</i>	25
<i>Experimentación.....</i>	26
<i>Determinación de la mortalidad.....</i>	27
<i>Ajuste sigmoideo de los datos de mortalidad.....</i>	28
<i>Análisis de compuestos que absorben RUV (CARUV).....</i>	29
<i>Análisis de carotenoides.....</i>	30
<i>Datos de radiación/temperatura de la zona.....</i>	31
<i>Análisis estadístico.....</i>	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
<i>Mortalidad de las cinco especies de cangrejos al ser expuestas a la RUV.....</i>	32
<i>Exposición letal al 50%.....</i>	33
<i>Respuestas generales de las larvas de cangrejos a la radiación y a la temperatura.....</i>	35
<i>Umbrales de tiempo de exposición y de dosis.....</i>	36
<i>Tasa de mortalidad (p) y dosis letal 50% (DL<sub>50</sub>).....</i>	41
<i>Compuestos que absorben la RUV (CARUV) y anti-oxicantes (carotenoides).....</i>	44
IMPLICANCIAS ECOLÓGICAS.....	48
CONCLUSIONES.....	53
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>55</b>
<b>Sensibilidad de larvas de <i>Cyrtograpsus altimanus</i> a la RUV-B en función de la bioacumulación compuestos que absorben la RUV.....</b>	<b>55</b>
INTRODUCCIÓN.....	56
MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
<i>Ensayos de bioacumulación.....</i>	58
<i>Experimentos para determinar la mortalidad larvaria.....</i>	63
<i>Sensibilidad al RUV-B en distintos estadios larvarios.....</i>	64
<i>Análisis estadístico.....</i>	65

RESULTADOS.....	66
<i>Identificación de compuestos que absorben RUV (CARUV).....</i>	66
<i>Ensayos de bioacumulación de compuestos que absorben RUV (CARUV).....</i>	67
<i>Experimentos de exposición a la radiación.....</i>	70
<i>Sensibilidad al RUV-B en distintos estadios larvarios.....</i>	71
DISCUSIÓN.....	72
<b><i>CAPÍTULO 3.....</i></b>	<b>76</b>
<b>Efectos sub-letales de la RUV en larvas del cangrejo <i>Cyrtograpsus altimanus</i>.....</b>	<b>76</b>
INTRODUCCIÓN.....	77
MATERIALES Y MÉTODOS.....	78
<i>Exposición sub-letal a la RUV-B y mantenimiento posterior de las larvas.....</i>	79
<i>Mediciones de talla.....</i>	80
<i>Determinación de estadios larvales.....</i>	81
<i>Medidas de movilidad.....</i>	81
<i>Análisis estadístico.....</i>	84
RESULTADOS.....	85
<i>Muda y crecimiento.....</i>	85
<i>Movilidad.....</i>	87
DISCUSIÓN.....	93
<b><i>CONCLUSIONES GENERALES.....</i></b>	<b>97</b>
<b><i>BIBLIOGRAFÍA.....</i></b>	<b>101</b>
<b><i>Anexo 1.....</i></b>	<b>114</b>
<b><i>Anexo 2.....</i></b>	<b>141</b>

## *Lista de figuras y tablas*

<b>Figura I.1:</b> Espectro de radiación solar.....	1
<b>Figura. I.2:</b> Distribución de energía solar terrestre.....	2
<b>Figura I.3:</b> Distribución de la radiación en la atmósfera.....	3
<b>Figura M.1:</b> Zonas de muestreo de adultos.....	15
<b>Figura M.2:</b> Área de estudio.....	15
<b>Figura M.3:</b> Adultos de cangrejos de las cinco especies bajo estudio.....	17
<b>Figura M.4:</b> Dosis diarias promedio en la zona de estudio.....	19
<b>Figura M.5:</b> Esquema de obtención de larvas.....	21
<b>Figura 1.1:</b> Esquema del dispositivo de experimentación.....	27
<b>Tabla 1.1:</b> Niveles de irradiancia usados en los experimentos.....	27
<b>Figura 1.2:</b> Representación de una distribución sigmoidea.....	29
<b>Figura 1.3:</b> Mortalidad en función del tiempo de exposición.....	32
<b>Figura 1.4:</b> Comparación de los parámetros Tiempo letal 50% (TL <sub>50</sub> ) y Dosis letal 50% (DL <sub>50</sub> ) a partir de las curvas de mortalidad.....	34
<b>Figura 1.5:</b> Mortalidad larvaria en función del tiempo de exposición a la radiación ultravioleta.....	36
<b>Figura 1.6:</b> Valores umbrales de tiempo (U <sub>t</sub> ) y dosis (U <sub>d</sub> ) de las larvas de las tres especies de cangrejos.....	38
<b>Tabla 1.2:</b> Tablas de resultados de ANOVA de 2 factores del umbral de tiempo ( U <sub>t</sub> ).....	39
<b>Tabla 1.3:</b> Tablas de resultados de ANOVA de 2 factores del umbral de dosis (U <sub>d</sub> ).....	40
<b>Tabla 1.4:</b> Tablas de resultados de RLS del ubbral de tiempo (U <sub>t</sub> ).....	40
<b>Figura 1.7.</b> Tasa de mortalidad (p) y Dosis letal 50% (DL <sub>50</sub> ) de larvas de las tres especies de cangrejos.....	42
<b>Tabla 1.5:</b> Tablas de resultados de ANOVA de 2 factores de la pendiente máxima (p).....	43
<b>Tabla 1.6:</b> Tablas de resultados de ANOVA de 2 factores para dosis letal 50% (LD <sub>50</sub> ).....	44

<b>Figura 1.8:</b> Compuestos que absorben radiación ultravioleta (CARUV) y carotenoides totales.....	46
<b>Figura 1.9:</b> Dosis diaria de RUV-B y temperatura superficial del agua a lo largo del año.....	49
<b>Figura 2.1:</b> Espectros de absorción de macroalgas.....	60
<b>Figura 2.2:</b> Espectros de absorción de <i>P. micans</i> .....	62
<b>Figura 2.3:</b> Cromatogramas de estándares utilizados para la identificación de compuestos que absorben radiación ultravioleta (CARUV).....	66
<b>Figura 2.4:</b> Cromatogramas para identificar compuestos que absorben radiación ultravioleta (CARUV) en gónadas de <i>Cyrtograpsus altimanus</i> .....	67
<b>Figura 2.5:</b> Análisis de picos de absorción en extractos de tejidos de hembras adultas de <i>Cyrtograpsus altimanus</i> .....	68
<b>Figura 2.6:</b> Análisis de picos de absorción de extractos de tejidos de larvas de <i>Cyrtograpsus altimanus</i> .....	69
<b>Figura 2.7:</b> Efecto de la RUV-B sobre la mortalidad de larvas con concentraciones altas y bajas de compuestos que absorben la RUV (CARUV).....	71
<b>Figura 2.8:</b> Efecto de la RUV-B sobre la mortalidad de larvas de distintos estadios de <i>Cyrtograpsus spp</i> .....	72
<b>Figura 3.1:</b> Parámetros morfométricos de las larvas de cangrejos obtenidos a partir de imágenes.....	81
<b>Figura 3.2:</b> Ejemplos de trayectorias de natación ascendentes de las larvas.....	83
<b>Figura 3.3:</b> Muda y crecimiento de las larvas después de la exposición a la RUV.....	86
<b>Figura 3.4:</b> Velocidad de natación durante los experimentos.....	88
<b>Figura 3.5:</b> Movilidad en función del tiempo, determinado como número y linealidad de las trayectorias.....	90
<b>Figura 3.6:</b> Posición de las larvas en la columna de agua en función del tiempo.....	92
<b>Figura 3.7:</b> Desplazamiento promedio real de las larvas del tratamiento con RUV.....	93

## *Lista de abreviaturas*

RUV: Radiación ultravioleta

RUV-A: Radiación ultravioleta A

RUV-B: Radiación ultravioleta B

RUV-C: Radiación ultravioleta C

RI: Radiación infrarroja

PAR: *Photosynthetic Active Radiation*, radiación visible o fotosintéticamente activa

Tratamiento P: Tratamiento de radiación PAR

Tratamiento PA: Tratamiento de radiación PAR + RUV-A

Tratamiento PAB: Tratamiento de radiación PAR + RUV-A + RUV-B

MAAs: *Mycosporine-like amino acids* o aminoácidos tipo micosporinas

CARUV: Compuestos que absorben radiación ultravioleta

ROS: Reactive oxygen species o especies oxidadas reactivas

$K_d$ : Coeficiente de atenuación de la radiación

$K_{RUV-B}$ : Coeficiente de atenuación de la RUV-B

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

CFCs: Gases clorofluorcarbonados

$NO_x$ : Gases nitrosos

$CO_2$ : Dióxido de carbono

ATP: Adenosín trifosfato

NER: *Nucleotide excision repair*, reparación por escisión de nucleótidos

PER: *Photoenzymatic repair*, reparación fotoenzimática

CSM: Capa superficial de mezcla

ELDONET: European Light Dosimeter Network, Red Europea de Medición de Radiación.

$TL_{50}$ : Tiempo letal 50 %

$DL_{50}$ : Dosis letal 50 %

U: Umbral

$U_t$ : Tiempo umbral

U<sub>d</sub>: Dosis umbral

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*, Cromatografía líquida de alto rendimiento

P<sub>334</sub>: Porphyra-334

SHI: Shinorine

MycGly: Mycosporine-Glycine

MAA-332: Mycosporine-332

## ***Resumen***

Impacto de la radiación ultravioleta (RUV) en estadios larvales de distintas especies de cangrejos.

Rodrigo D. Hernández Moresino

Doctorado en Biología

Universidad Nacional del Comahue, 2011

La mayoría de los crustáceos decápodos atraviesan una fase larvaria planctónica en las etapas tempranas de su ciclo de vida. Esta fase es crítica para la dinámica de las poblaciones debido a que en ella se observan las mayores tasas de mortalidad de todo el ciclo de vida y ocurren procesos de transporte y dispersión que desacoplan la distribución espacial de los parentales y la progenie, particularmente en especies con larvas meroplanctónicas. En esta etapa, las larvas pueden estar sometidas a marcadas fluctuaciones de variables ambientales (i.e., volumen y calidad del alimento, predación, turbulencia, temperatura, salinidad, luz, etc.). La interacción entre el comportamiento de las larvas y las presiones ambientales incidentes determinará en gran parte el éxito de la incorporación de reclutas a las poblaciones.

Entre los factores ambientales que afectan la etapa de vida planctónica, la radiación ultravioleta solar (RUV, 280-400 nm) conlleva un riesgo para los individuos debido a que puede alterar la locomoción, la alimentación, el apareamiento, y la supervivencia en general. Para contrarrestar estos efectos perjudiciales, los organismos que se encuentran en ambientes expuestos a la RUV han desarrollado distintos mecanismos que podrían explicar la historia lumínica de cada especie. Teniendo en cuenta estas consideraciones, el objetivo general de esta tesis es estudiar los efectos letales y sub-letales de la RUV sobre las larvas de distintas especies de cangrejos braquiuros de aguas costeras del norte de Patagonia, como así también identificar algunos mecanismos que emplean estos organismos para disminuir o eliminar sus efectos negativos.

En experimentos preliminares se determinaron importantes efectos de la radiación ultravioleta de longitudes de onda más cortas (RUV-B, 280-315 nm) sobre la supervivencia de larvas tempranas (Zoea I) de cinco especies de cangrejos: *Cyrtograpsus altimanus*, *C. angulatus*, *Leucippa pentagona*, *Libinia spinosa* y *Pachycheles chubutensis*. Luego se seleccionaron las tres primeras especies, mencionadas anteriormente, con distinto rango de supervivencia frente a la RUV-B y se determinó su supervivencia y potencial aclimatación a distintas temperaturas. También se realizaron análisis de distintos tejidos de adultos y de larvas para determinar la presencia de compuestos potencialmente fotoprotectores (i.e., compuestos que absorben RUV y carotenoides). Finalmente, se determinaron los efectos de la exposición a valores sub-letales de RUV-B sobre el desarrollo y la movilidad de larvas de *C. altimanus*.

Los resultados obtenidos sugieren que los niveles de RUV-B incidente en la zona Patagónica podrían afectar la estructura de las comunidades de cangrejos, generando un predominio de las especies mejor adaptadas a estas condiciones. De hecho, en las larvas de tres de las especies estudiadas se observaron potenciales mecanismos de adaptación a la RUV: 1) Incorporación y “direccionamiento” de compuestos fotoprotectores desde las gónadas de las hembras adultas hacia los embriones, y posteriormente a las larvas recién liberadas, y 2) Posible actividad enzimática de reparación de daños, reflejada en un aumento de la resistencia a la RUV-B bajo condiciones de mayor temperatura (esto sólo en las dos especies más resistentes - *Cyrtograpsus altimanus* y *C. angulatus*). Más aún, en experimentos complementarios se corroboraron las ventajas que ofrece la acumulación de gran cantidad de compuestos que absorben RUV en las larvas de *C. altimanus* (que resultó ser la especie más resistente a la RUV-B). Además, se realizó un experimento con distintos estadios larvarios de la misma especie obtenidos del ambiente y se determinó que en estadios larvarios más avanzados, la tolerancia a la RUV-B es mayor.

Se observó un retardo / anulación de la muda, y por lo tanto del crecimiento, y un aumento en la actividad natatoria y de la capacidad de desplazamiento vertical en larvas de *C. altimanus* al ser expuestas a dosis sub-letales de RUV-B. Las consecuencias de estos efectos son variadas: Por un lado, los individuos que permanecen más tiempo con un tamaño pequeño (i.e., crecen más lentamente o no crecen) estarán sujetos a mayores riesgos, tales como a una

menor oferta trófica, mayor vulnerabilidad a la predación y exposición más prolongada a eventuales condiciones adversas durante la fase planctónica. Por otro lado, el cambio en el comportamiento natatorio y en la tasa de migración vertical generará un cambio en los patrones de transporte y dispersión larvaria.

Los efectos letales y sub-letales de la RUV observados indican que este factor ambiental puede afectar el desarrollo de las poblaciones de cangrejos que habitan las costas patagónicas. Sumado a ello, la sensibilidad a la RUV-B fue muy influenciada por la temperatura en las especies del género *Cyrtograpsus*, por lo que la interacción entre estos dos factores ambientales debe ser tomada en cuenta en futuras líneas de estudio sobre estos y otros organismos, en un contexto del cambio global.

En síntesis, en esta Tesis se pusieron a prueba hipótesis referidas a los efectos letales y sub-letales de la RUV-B sobre larvas de distintas especies de cangrejos, sus efectos combinados con la temperatura, y los posibles mecanismos de adaptación que han desarrollado. Este trabajo permitió ampliar los conocimientos acerca de los efectos de la RUV solar en organismos del plancton tales como las larvas de cangrejos que pueden quedar expuestos a dicho factor ambiental, lo cual puede servir como referencia en futuras investigaciones del tema.

Palabras claves: *bioacumulación, cangrejos, compuestos que absorben RUV, desarrollo larvario, larvas, RUV, temperatura.*

## ***Abstract***

Impact of ultraviolet radiation (UVR) on larval stages of different crab species

Rodrigo D. Hernández Moresino  
Doctorado en Biología  
Universidad Nacional del Comahue, 2011

Most decapod crustaceans have a planktonic larval stage in the early stages of their life cycle. This phase is critical for the population dynamics because it has the highest mortality rates of the entire life cycle and because of the transport and dispersion processes that decouple the spatial distribution between parents and progeny, particularly in species with meroplanktonic larvae. At this stage, larvae may be influenced by marked changes in environmental variables (i.e., volume and quality of food, predation, turbulence, temperature, salinity, light, etc.). The interaction between the larvae behavior and the prevailing environmental pressures will largely determine the success of recruit incorporation into populations.

Among all the environmental factors affecting the planktonic-life stage, solar ultraviolet radiation (UVR, 280-400 nm) implies a risk for individuals because it may alter their movement, feeding, mating, and survival in general. Organisms from UVR-exposed environments have developed several mechanisms to cope with increased levels of radiation. Taking into account these considerations, the general objective of this thesis is to study lethal and sub-lethal UVR effects on the larvae of various species of Brachyuran crabs of coastal waters of Northern Patagonia, as well as also to identify some of the mechanisms used by these organisms to reduce or eliminate their adverse effects.

In preliminary experiments, the effects of shorter wavelengths of ultraviolet radiation (RUV-B, 280-315 nm) were determined on the survival of early larvae stages (Zoea I) of five crab species: *Cyrtograpsus altimanus*, *C. angulatus*, *Leucippa pentagona*, *Libinia spinosa* and *Pachycheles chubutensis*). Then, the first three species (cited previously) with different tolerance to UV-B were selected and their survival and potential acclimatization at different

temperatures were determined. Also, analyses in different adult tissues and in larvae were performed, searching for potentially photoprotective compounds (i.e., UVR-absorbing compounds and carotenoids). Finally, the effects of UV-B sub-lethal exposures on development and motility of *C. altimanus* larvae were tested.

The obtained results suggest that incident UVR levels in the Patagonian area could affect the structure of the crab communities, towards species that were best adapted to these conditions. In fact, potentially UVR adaptive mechanisms in larvae from three of the species under study were found: 1) Incorporation and "redirection" of photoprotective compounds from the gonads of adult females to embryos, and later to newly released larvae, and 2) Possible enzymatic repair activity of damage, reflected in an increase in resistance to UV-B under higher temperature conditions (this occurred only in the two more resistant species - *Cyrtograpsus altimanus* and *C. angulatus*). Moreover, complementary experiments corroborated the advantages offered by the accumulation of large amounts of UV-absorbing compounds on larvae of *C. altimanus* (which turned out to be the most UV-B-resistant species). In addition, an experiment with different larval stages of the same species obtained from the environment was carried out, showing up that later larval stages had higher UV-B tolerance than earlier ones.

It was observed a delay / absence in the development and growth, and an increase in swimming activity and in vertical displacement ability in larvae of *C. altimanus* when they were exposed to sub-lethal doses of UV-B. There are a number of consequences that these effects may cause: On the one hand, individuals who stay longer in a small size (i.e., they grow more slowly or do not grow at all) could be exposed to disadvantageous conditions such as a food scarcity, predation and more prolonged exposure to any other adverse conditions during the planktonic phase. On the other hand, changes in the swimming behavior and vertical migration rates could lead to changes in larval transport and dispersal patterns.

The observed lethal and sub-lethal effects of UV-B indicate that this environmental factor has the potential to affect the development of crab populations inhabiting the Patagonian coast. Additionally, the sensitivity to UV-B was strongly influenced by temperature in species of the genus *Cyrtograpsus*, thus the interaction between these two

environmental factors must be taken into account in future studies in the context of global climate change.

Summing up, in this Thesis were tested hypotheses about the lethal and sub-lethal UV-B effects on larvae of several crab species, as well as its combined effects with temperature, and possible adaptive mechanisms that they have been developed. This work increased the knowledge about the effects of the solar UVR on plankton organisms such as crab larvae that can be exposed to such environmental factor, which can be a useful reference in future related investigations.

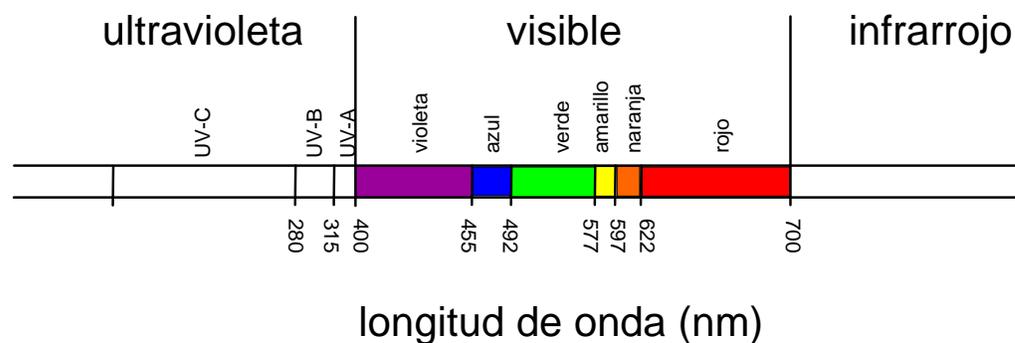
Key words: *bioaccumulation, crab, larvae, larval development, UVR, UV-absorbing compounds, temperature.*

## ***INTRODUCCIÓN GENERAL***

### CONCEPTOS GENERALES

#### *i) Radiación solar:*

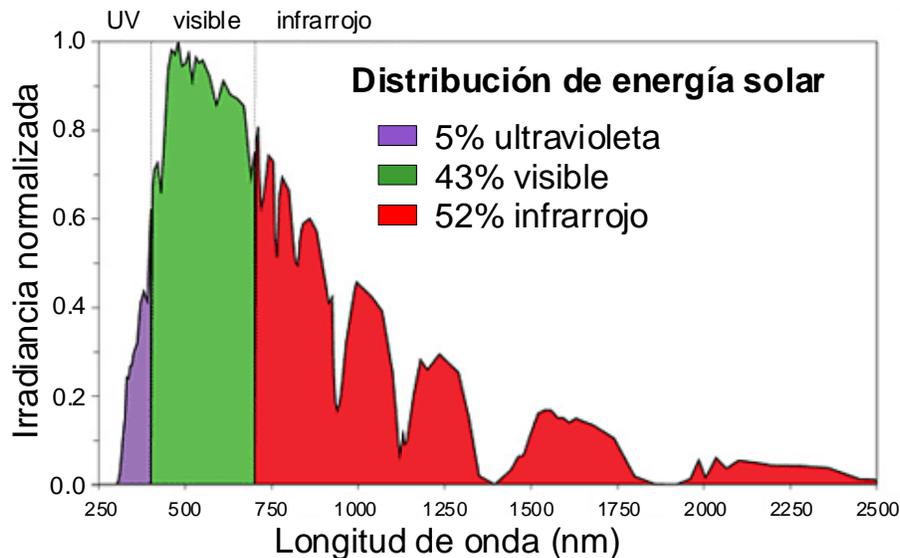
La fuente de energía necesaria que permite la vida en nuestro planeta es obtenida a partir del Sol, en forma de radiación electromagnética. Esta radiación se filtra por diversos componentes atmosféricos, de manera tal que sólo una fracción de lo que llega a las capas superiores de la atmósfera alcanza finalmente la superficie terrestre (Madronich 1993). La radiación solar que llega a la superficie terrestre comprende un amplio rango del espectro electromagnético que se clasifica según su longitud de onda ( $\lambda$ ) en: Radiación ultravioleta (RUV, 280 a 400 nm), radiación visible o fotosintéticamente activa (PAR o *Photosynthetic Active Radiation*, de 400 a 700 nm) y radiación infrarroja (RI, de 700 a 2500 nm). A su vez, la RUV se clasifica en RUV-A (315-400 nm), RUV-B (280-315 nm), y RUV-C (100-280 nm) (Fig. I.1).



**Figura I.1:** Espectro de radiación solar, indicando las longitudes de onda que separan las distintas bandas.

La cantidad de radiación solar que llega a la superficie de la tierra se denomina irradiancia, y corresponde a la energía recibida por unidad de tiempo y unidad de área. Su unidad es  $W\ m^{-2}$  (Watts por metro cuadrado). La mayor parte de la energía que llega a la superficie terrestre

corresponde a la radiación infrarroja y visible, mientras que sólo un 5% del total corresponde a la RUV (Fig. I.2). Si se integra la irradiancia recibida en el tiempo, se obtiene la dosis de radiación, con unidades de  $J m^{-2}$  (Joules por metro cuadrado).



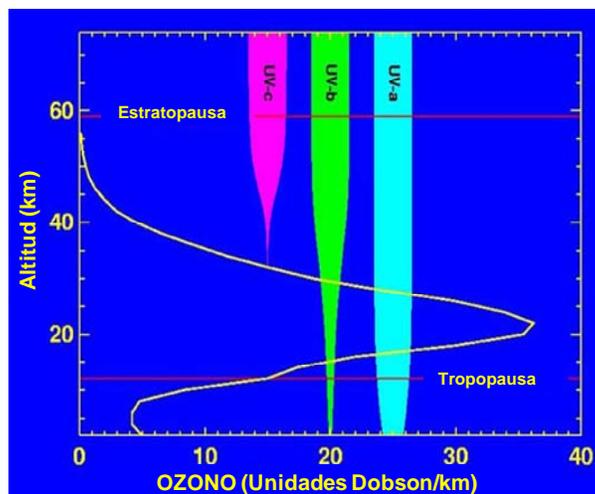
**Figura. I.2:** Distribución de energía solar que llega a la superficie terrestre.

Existen dos factores geofísicos que condicionan fuertemente la cantidad de radiación solar incidente en cada región del planeta: La latitud y la altitud. La latitud determina el grado de inclinación con la que la radiación solar alcanza la superficie terrestre. Una mayor inclinación de la superficie terrestre hace que una misma cantidad de radiación solar se distribuya en una superficie mayor, por lo tanto la irradiancia disminuye proporcionalmente a medida que nos alejamos del Ecuador. Por otro lado, a mayor altitud la cantidad de energía solar aumenta debido a que la capa atmosférica que atraviesa para alcanzar la superficie terrestre disminuye, junto con los procesos de absorción y dispersión atmosféricos (Blumthaler y Webb 2003; Madronich 2007).

### *ii) Capa de ozono y radiación ultravioleta:*

Además de los factores geofísicos, la irradiancia y la calidad (es decir, la composición espectral) de la radiación que alcanza la superficie de la Tierra dependen en parte de la absorción de los gases que se encuentran en la atmósfera, entre ellos el ozono estratosférico que constituye la barrera más importante para la penetración de la RUV-B (Environmental

Effects Assessment Panel 2010). El ozono es un gas que forma una capa situada entre los 15 y 35 km de altura sobre la superficie terrestre y su característica principal es la de filtrar entre el 95.5 y el 99% de la RUV de las longitudes de onda más cortas - desde los 150 a los 300 nm (RUV-C y parte de RUV-B) (Rowland 2006) (Fig. I.3).



**Figura I.3:** Distribución de la radiación en la atmósfera. Las barras verticales representan las proporciones de RUV-A, RUV-B y RUV-C que penetran a través de las distintas capas de la atmósfera. Datos obtenidos de: <http://www.gsfc.nasa.gov>.

En las últimas décadas se ha detectado un aumento significativo de la RUV-B que llega a la superficie de la Tierra debido a la disminución del ozono estratosférico (Hough y Derwent 1990; Herman et al. 1996; Rozema et al. 2002). Esta disminución ha sido atribuida a causas antrópicas, tales como el incremento en las concentraciones de gases clorofluorcarbonados (CFCs), halógenos y nitrosos ( $\text{NO}_x$ ) (Rozema et al. 2002; Rowland 2006). El progresivo deterioro de la capa de ozono es un problema ambiental muy importante, estimándose en latitudes templadas un 7% de reducción por década (Madronich 1993). El primer y mejor ejemplo conocido del debilitamiento de la capa de ozono es el llamado “agujero de ozono” que se genera cada año sobre la Antártida durante la primavera austral (Farman et al. 1985). Desde su descubrimiento, se ha observado un aumento tanto en la duración como en su superficie, llegando a alcanzar áreas de América del Sur, Australia y Nueva Zelandia (Jones y Shanklin 1995). En el caso de Sudamérica, esta disminución en los niveles de ozono, evidenciados a partir del aumento relativo de RUV-B, han sido documentadas durante cortos períodos de tiempo (días) en la Patagonia (Orce y Helbling 1997; Helbling et al. 2005) e incluso hasta los 30°S en Brasil (Kirchhoff et al. 1996). Es de destacar, sin embargo, que si bien en los últimos años se ha observado una leve recuperación de la capa de ozono, se estima

que los altos niveles de RUV-B continuarán todavía por varias décadas (McKenzie et al. 2011).

### *iii) Atenuación de la radiación solar:*

Además del ozono estratosférico, existen otros factores tales como la nubosidad y la contaminación en zonas urbanas que condicionan la cantidad de radiación que llega a la superficie terrestre. Por ejemplo, en las regiones montañosas de los Andes y en áreas sub-antárticas, la cobertura nubosa es muy importante, mientras que en las zonas costeras predominan los cielos despejados (Lubin y Jensen 1995) siendo, por lo tanto, la RUV incidente comparativamente mayor.

En los ecosistemas acuáticos la columna de agua es una barrera natural que debe atravesar la radiación antes de alcanzar a los organismos. La transparencia del agua depende de la cantidad de sustancias particuladas, de las sustancias orgánicas disueltas de color o sustancias amarillas y de la concentración de fitoplancton que se encuentran en la columna de agua (Häder 1997; Siegel et al. 2002). Estos compuestos, por su parte, condicionan la cantidad de radiación que se recibe a una determinada profundidad. La atenuación de la radiación solar es proporcional a la profundidad, por lo cual al representar la radiación *versus* la profundidad en una escala semi-logarítmica, se obtiene una línea recta cuya pendiente representa el “coeficiente de atenuación” para la radiación considerada ( $K_d$ ).

En general, en estanques y lagos eutroficados, así como en aguas costeras turbias, sólo el 1% de la energía de la RUV-B incidente en la superficie del agua puede penetrar a más de 1 m de profundidad. Para sistemas marinos de la costa Patagónica, tales como la Bahía Camarones (Chubut) Helbling et al. (2005) determinaron que el 1% de la RUV-B que alcanza la superficie penetra hasta 3.5 m de profundidad (i.e.,  $K_{RUV-B} = 1.27 \text{ m}^{-1}$ ); por su parte, el 1% de la RUV-A y PAR alcanzan profundidades mayores i.e., 7 y 15 m, respectivamente, siendo éstos valores representativos de la mayoría de las zonas costeras patagónicas durante el verano. En contraste, en aguas oceánicas claras la penetración del 1% de la RUV-B ha sido medida hasta varias decenas de metros (Smith y Baker 1979; Aas y Hokedal 1996; Hargreaves 2003). Es de destacar que se han realizado grandes esfuerzos para evaluar la penetración y el impacto de la RUV asociado al adelgazamiento de la capa de ozono sobre distintos ecosistemas. En particular, y para los ecosistemas acuáticos, se ha encontrado que

los efectos de la RUV sobre organismos pueden ser detectados a profundidades de hasta 16 m en aguas costeras claras (Tedetti y Sempéré 2006) y hasta 30 m en aguas oceánicas (Karentz y Lutze 1990).

*iv) Efectos de la RUV sobre los organismos vivos:*

Aunque la radiación solar proporciona la energía que hace posible la vida terrestre, también puede ser perjudicial en ciertas circunstancias, especialmente las longitudes de onda más cortas tales como la RUV. La radiación solar llega a la Tierra en forma de “paquetes” llamados quanta. La energía de cada uno de estos quantum depende de la frecuencia de la radiación electromagnética: A mayor frecuencia, mayor es la energía por quantum. Cuando un átomo absorbe un quantum, uno de sus electrones cambia de órbita (i.e., se excita). Los quanta de RUV tienen suficiente energía como para excitar a la mayoría de los átomos, incluso en ciertos casos pueden quitarle electrones o “ionizarlos”. Esto es lo que hace a la RUV potencialmente peligrosa para los seres vivos (Zagarese et al. 1998b). Los efectos / daños producidos por la RUV son muy variados y dependen de la intensidad de la radiación recibida (o irradiancia), del tiempo que estuvieron expuestos a dicha radiación (o dosis) y de la sensibilidad de cada especie.

Estos daños pueden producirse en forma directa sobre moléculas fotosensibles (e.g., ADN, ARN, proteínas y lípidos) o, indirectamente, a partir de la formación de especies oxidadas reactivas intracelulares (ROS, reactive oxygen species) (Buma et al. 2003; Monaghan et al. 2009). A pesar de que los organismos terrestres pueden parecer los más afectados por la RUV por tener sólo la barrera atmosférica como atenuadora de la radiación, también se han determinado importantes efectos en los organismos acuáticos (ver revisiones de De Mora et al. 2000; Sinha et al. 2002; Helbling y Zagarese 2003; Häder et al. 2007 y sus correspondientes citas). Numerosos trabajos relacionados a los efectos de la RUV en organismos acuáticos están enfocados sobre el fitoplancton, debido al papel que juega como pilar de la cadena trófica, y a que son los productores de aproximadamente la mitad de la biomasa de nuestro planeta (Longhurst et al. 1995).

Entre los muchos efectos que puede producir la RUV sobre el fitoplancton, se encuentran la inhibición de la fotosíntesis, la modificación en la morfología celular y las alteraciones en la

composición bioquímica. La exposición a la RUV genera anomalías en el aparato fotosintético causando reducción de la tasa fotosintética, fotodecoloración de los pigmentos, reducción de proteínas en el fotosistema II; disminución de la actividad enzimática en el ciclo de Calvin-Benson e inhibición de la anhidrasa carbónica (Villafañe et al. 2003). La RUV puede causar cambios en la morfología celular, la movilidad y la composición química de las células que van desde un incremento en el volumen celular (Van Donk y Hessen 1995; Buma et al. 1996) hasta la pérdida o inactivación de los flagelos (Hessen et al. 1997). Además, en diferentes especies fitoplanctónicas se han reportado cambios bioquímicos debido a la RUV a nivel de los lípidos, polisacáridos, proteínas y ácidos grasos (Goes et al 1994; Arts y Rai 1997; Villafañe et al. 2003). Todo esto generará, en última instancia, una disminución de la productividad primaria (Neale et al. 1998; Sobrino y Neale 2007; Fritz et al. 2008) y posiblemente, cambios en la estructura de las comunidades fitoplanctónicas (Hessen et al. 2008; Ogbebo y Ochs 2008)

En cuanto a los efectos que la RUV produce sobre organismos heterótrofos acuáticos, la mayoría de los trabajos están referidos al aumento de la tasa de mortalidad. Los efectos letales de la RUV han sido descritos en una amplia variedad de de estos organismos: el isópodo *Idothea baltica* (Helbling et al. 2002a), un gran número de copépodos como *Acartia clausii* (Karanas et al. 1979), *Boeckella gracilipes* (Zagarese et al. 1998a), *Calanus finmarchicus* (Alonso Rodriguez et al. 2000a), *Metacyclops mendocinus* (Gonçalves et al. 2002), y *Boeckella titicacae* (Helbling et al. 2002b), en cladóceros como *Daphnia menucoensis* (Gonçalves et al. 2002), *D. dadayana* (De los Ríos y Soto 2005), *D. carinata*, *Ceriodaphnia dubia*, *Bosmina meridionalis* (Wübben y Vareschi 2001), en larvas de decápodos como los camarones *Pandalus danae*, *P. hypsinotus* y *P. platyceros* (Damkaer et al. 1980; Damkaer et al. 1981), o los cangrejos *Eurypanopeus planus*, *Uca beebei*, *Pachygrapsus transversus*, *Cataleptodius taboganus* (Morgan y Christy 1996), *Uca pugnax*, *Sesarma reticulatum*, *Dyspanopeus sayi* (Hovel y Morgan 1999), *Libinia dubia*, *Menippe adina*, *Panopeus herbstii* (Peachey 2005), en larvas y huevos de peces como *Gadus morhua* (Kouwenberg et al. 1999; Browman et al. 2000), etc. También existen efectos comúnmente llamados “sub-letales” debido a exposiciones a la RUV, pudiéndose mencionar, por ejemplo, anormalidades durante las distintas etapas del desarrollo de erizos tales como *Strongylocentrotus droebachiensis* (Adams y Shick 2001) o *Sterechinus neumayeri* (Karentz et al. 2004), disminución de la tasa de fecundidad del copépodo *Acartia clausii* (Karanas et al.

1981), aumento de la tasa de respiración y comportamiento natatorio en juveniles de trucha *Oncorhynchus mykiss* (Alemanni et al. 2003), entre otros.

Asimismo, la radiación solar puede afectar indirectamente a los consumidores por una disminución en la cantidad o calidad de su alimento debido a la exposición a la radiación solar. En este sentido, se ha demostrado en experimentos de tipo mesocosmos que, aunque el impacto de la RUV puede ser relativamente pequeño sobre la biomasa total, esto puede resultar en cambios significativos en la estructura de la cadena trófica debido a la sensibilidad diferencial a la RUV de cada uno de los organismos que la componen (Tank et al. 2003; Belzile et al. 2006). También se han observado diferencias de la estructura de las comunidades en un estudio que incluyó un gradiente amplio de sistemas acuáticos patagónicos con distintas incidencias de la RUV (Marinone et al. 2006). Por lo tanto, también puede considerarse que la RUV es un factor modulador de la composición específica de las comunidades naturales, en todos los niveles tróficos.

Aunque en general se ha encontrado que la RUV es un factor de estrés para los organismos, debe destacarse que en muchos casos las longitudes de onda más largas (RUV-A) pueden producir efectos benéficos al participar en procesos de reparación de daños generados por la exposición a la RUV-B. Esto se ha observado en organismos tan distintos como la cianobacteria *Anabaena sp.* (Han et al. 2001), el cladóceros *Daphnia pulicaria* (Williamson et al. 2001a), o el pez cebra *Danio rerio* (Dong et al. 2007).

#### v) *Efectos combinados de la RUV y la temperatura:*

El cambio global involucra un conjunto de cambios ambientales que se derivan de las actividades humanas sobre el planeta, principalmente aquellos en los procesos que determinan el funcionamiento de la Tierra. Entre estos cambios de origen antrópico, los más reconocidos son el adelgazamiento de la capa de ozono con el consiguiente aumento de la RUV-B incidente, y el calentamiento global. La emisión antrópica de gases que se acumulan en la atmósfera, tales como el dióxido de carbono, retienen la radiación infrarroja que devuelve la Tierra luego de ser calentada por el Sol. Esta radiación es reflejada por dichos gases y retorna a la superficie de la Tierra generando un aumento en la temperatura atmosférica, proceso conocido con el nombre de “efecto invernadero”. Este fenómeno induce cambios tanto en los procesos químicos como físicos en los ambientes. En particular, el proceso químico más

importante en los ambientes acuáticos es una acidificación del agua ya que la misma absorbe la mayor parte del CO<sub>2</sub> de origen antrópico. Por su lado, la temperatura afecta la mezcla y estratificación de las aguas, reguladoras de la cantidad y calidad de luz que penetra en la columna de agua, la temperatura superficial, y la magnitud de nutrientes recirculando desde las capas más profundas. Finalmente, las condiciones de la capa superficial determinarán el desarrollo del fitoplancton y de los organismos pertenecientes a niveles tróficos más altos (heterótrofos) (Hays et al. 2005).

Los efectos combinados de la RUV y a temperatura pueden tener distintas respuestas de acuerdo a las características adaptativas de cada especie, es decir, pueden actuar sinérgicamente, antagónicamente, o simplemente no tener interacción alguna entre ellos (Hoffman et al. 2003). Algunos ejemplos que se pueden mencionar son el sinergismo que se produce aumentando la supervivencia en los estadios tempranos de dos especies de corales *Heteroxenia fuscescens* y *Rhytisma fulvum* (Zeevi-Ben-Yosef y Benayahu 2008), o en el cladóceros *Daphnia catawba* y el copépodo *Leptodiptomus minutus*, mientras que el efecto es contrario en la supervivencia del rotífero *Asplanchna girodi* (Williamson et al. 2002). Según estos autores la dependencia de la supervivencia de los organismos expuestos a la RUV con la temperatura estaría estrechamente ligada a la presencia de actividad de fotoreparación. Otro caso antagónico de la interacción RUV-temperatura se observó en cuatro especies de *Daphnia*, donde las mayores supervivencias ocurrieron al nivel de temperatura menor (Connelly et al. 2009). Por ello, y en un contexto de cambio climático global es que resulta fundamental determinar los efectos combinados de la RUV y la temperatura para tener un panorama más realista de sus efectos en los organismos.

#### vi) Adaptaciones a la RUV:

El desarrollo de la vida en la Tierra tiene sus comienzos en una atmósfera completamente distinta a la conocida en la actualidad, sin ozono y niveles de RUV mucho más altos (Rothschild 1999; Cockell y Knowland 1999). Los organismos que vivieron en ese período debieron tener una presión de selección muy fuerte que les permitió seguramente desarrollar mecanismos de adaptación a estas altas radiaciones. Algunos de estos mecanismos o estrategias adaptativas han sido observados en organismos actuales. Estos mecanismos permiten disminuir o anular completamente los efectos perjudiciales de la RUV y son

utilizados tanto por los organismos actuales, tanto autótrofos como heterótrofos (Banaszak 2003). Entre las estrategias adaptativas de los organismos a elevados niveles de RUV se han mencionado las siguientes:

a) *Estrategias evasivas*, tales como la migración vertical en la columna de agua observada en copépodos (Aarseth y Schram 1999; Wold y Norrbin 2004), los cambios en el patrón batimétrico de erizos de mar (Adams 2001) o de corales (Dunlap et al. 1986), la protección bajo piedras o coberturas de algas en erizos marinos (Adams 2001) y la liberación de larvas de cangrejos en períodos con baja radiación (Queiroga et al. 1994; Forward 2009).

b) *Estrategias de protección*, tales como la acumulación de compuestos protectores como los aminoácidos tipo micosporinas (mycosporine like amino acids, MAAs) producidos por el fitoplancton (Banaszak, 2003) y posteriormente bioacumulados en erizos de mar (Adams y Shick 2001), en anfípodos (Helbling et al. 2002a) y en copépodos (Helbling et al. 2002b); la acumulación de pigmentos como los carotenoides en copépodos (Moeller et al. 2005; Sommaruga 2010); o la protecciones externas por una cobertura calcárea o de celulosa, que absorben RUV evitando el daño a las moléculas vitales en cocolitofótidos (Gao et al 2009). La función fotoprotectora de los MAAs ha sido inferida a partir de sus propiedades de absorción en el rango de la RUV, con máximos entre 310 y 360 nm (Dunlap y Shick, 1998; Shick y Dunlap, 2002). Cuando se aplican técnicas espectrofotométricas para el análisis de tejidos, los compuestos que absorben en el rango de la RUV pueden ser llamados genéricamente como Compuestos que Absorben RUV (o CARUV). Por su lado, los carotenoides son conocidos como pigmentos naranjas (absorbiendo la luz azul) y su función fotoprotectora está asociada a la neutralización de especies oxidadas reactivas (ROS, por sus siglas en inglés) (Roy 2000; Banaszak 2003).

c) *Estrategias de prevención de daños*, a partir de la activación de enzimas antioxidantes que se combinan con ROS que se generaron por exposición a la RUV neutralizándolos, tal como se ha observado en el fitoplancton (Janknegt et al. 2009), en algunos cladóceros (Vega y Pizarro 2000) y en larvas de peces (Lesser et al. 2001).

d) *Estrategias de reparación de daños*, que se produce sobre moléculas fotosensibles, y entre las cuales se pueden mencionar : (1) La fotoreparación de daños producidos en el ADN (e.g., dímeros de timina) en presencia de la RUV-A y PAR como fuente de energía (PER,

photoenzymatic repair), como ha sido observado en peces y krill (Malloy et al. 1997), así como en copépodos (Zagarese et al. 1997) y en algunos cladóceros (Gonçalves et al. 2002; MacFadyen et al. 2004) y, (2) La reparación de daños en el ADN por escisión de nucleótidos, utilizando el ATP como fuente de energía (NER, nucleotide excision repair) tal como ha sido observada en cladóceros (MacFadyen et al. 2004).

### *vii) Los cangrejos como organismos modelo de estudio de los efectos de la RUV*

El subphylum Crustacea, con alrededor de 50.000 especies conocidas, constituye el grupo más abundante de artrópodos acuáticos. Con aproximadamente el 66% de las especies existentes, la Clase Malacostraca es el grupo dominante y con más éxito adaptativo entre los crustáceos y, dentro de ésta, el Orden Decapoda es el más numeroso y diverso (Bowman y Abele, 1982). Estos últimos están caracterizados por poseer cinco pares de apéndices torácicos en una estructura de pereiópodos o patas. Gran parte de los decápodos son de vida adulta bentónica (suborden Pleocyemata) y morfológicamente se caracterizan por tener un caparazón cefalotorácico comprimido dorsoventralmente de donde se desprenden los 5 pares de patas y un abdomen que se encuentra plegado debajo del cefalotórax con apéndices reducidos (pleópodos) que no cumplen función locomotora pero que sirven de órganos copulatorios y ovígeros.

Los integrantes del suborden Pleocyemata presentan típicamente cuidado parental, incubando los embriones (o huevos) adheridos a los pleópodos hasta la eclosión. Este último evento da lugar generalmente a la liberación de larvas planctónicas de vida libre, reconocida como Zoeas, en su mayoría planctotróficas y más raramente lecitotrófica (Anger 2001). Las larvas recién liberadas se encuentran en un estadio de desarrollo Zoea I, el cual les permite moverse libremente nadando con sus apéndices natatorios; además poseen un sistema digestivo, visión y apéndices maxilares que les permiten ser predadores activos desde que salen del huevo. La fase larvaria de los cangrejos puede durar desde unos pocos días hasta más de dos meses de acuerdo a la especie y a factores ambientales (*e.g.*, temperatura, disponibilidad de alimento, salinidad, etc.), pudiendo pasar por hasta 8 etapas de Zoeas planctónicas antes de metamorfosear en una Megalopa y posteriormente en el primer juvenil que tiene la forma del cangrejo adulto. En algunos casos particulares, donde no hay fase larvaria, los huevos eclosionan dando lugar a individuos juveniles directamente (Anger 2001)..

En la región templado-fría del Atlántico Sudoccidental comprendida entre los 42°-47°S, se han descrito 39 especies de crustáceos decápodos (Spivak 1997; Arntz et al. 1999). Algunas de estas especies son organismos clave en la cadena trófica, ya que constituyen gran parte de la dieta de predadores tales como peces (Moreno y Jara 1984) y aves (Delhey et al. 2001). Además, los crustáceos han sido reconocidos como un importante recurso pesquero, con un elevado valor comercial tanto en la Argentina como en otras regiones del mundo (Boschi 1997; Caddy 1989) con capturas anuales que superan los seis millones de toneladas (FAO 2008). Por lo tanto, resulta de un obvio interés la evaluación de los factores de estrés que puedan afectar el desarrollo y supervivencia de estos organismos.

En esta Tesis se trabajó con especies de crustáceos decápodos del suborden Pleocyemata, comúnmente llamados cangrejos, que son de hábitos costeros en todo su ciclo de vida (aunque algunos son encontrados también a grandes profundidades dentro de la plataforma) (Spivak 1997). A diferencia de la etapa bentónica que mantienen los cangrejos en su vida adulta, la larvaria es completamente planctónica. Durante la etapa larvaria es donde se produce la mayor mortalidad en invertebrados marinos, estimada en más del 90 %, debida tanto a factores ambientales adversos y cambiantes tales como la escasez de alimento y la presión de predación (Morgan 1995). Dentro de los factores ambientales se encuentra la RUV, cuyos efectos perjudiciales han sido poco descritos hasta el momento (Damkaer et al. 1980; Morgan y Christy 1996; Hovel y Morgan 1999). En estos estudios (Damkaer et al. 1980; Morgan y Christy 1996; Hovel y Morgan 1999) se ha determinado incluso que los efectos letales de la RUV pueden ser observados a niveles por debajo de los encontrados en el ambiente. Los efectos perjudiciales de la RUV sobre larvas de cangrejos pueden ser significativos si se considera que generalmente son organismos cuasi transparentes (Damkaer et al. 1980). Además los cangrejos realizan migraciones verticales que están relacionadas con sus patrones de dispersión / retención de los hábitats de adultos (Queiroga y Blanton 2005) pudiendo quedar expuestos a la RUV si se encuentran cerca de la superficie en horas del día. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se plantean los siguientes objetivos e hipótesis:

## OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### **Objetivo general:**

El objetivo general de este trabajo de Tesis es determinar el impacto de la RUV sobre larvas de cangrejos característicos de aguas costeras de la Patagonia (Chubut) como así también detectar mecanismos que emplean éstas para evitar o contrarrestar sus efectos perjudiciales.

Objetivos específicos e hipótesis:

1. Determinar las tasas de mortalidad larval en distintos estadios y especies de cangrejo al ser expuestas a distintas condiciones de radiación.
2. Determinar los efectos combinados de la RUV y la temperatura sobre la supervivencia de las larvas.
3. Determinar la bioacumulación de compuestos que absorben RUV (CARUV) en larvas y adultos de cangrejos en función de la dieta, como así también su rol para contrarrestar los efectos negativos de estas longitudes de onda.
4. Determinar el impacto de exposiciones a niveles sub-letales de RUV en el desarrollo y en la actividad larval.

Hipótesis N° 1: La exposición a la RUV produce mortalidad larvaria y ésta aumenta con el incremento de la radiación.

Hipótesis N° 2: La exposición a la RUV produce mayor mortalidad larval en los estadios más tempranos (e.g., Zoea I) que en los más desarrollados (e.g., Zoea II y III).

Hipótesis N° 3: Un incremento de la temperatura disminuirá la mortalidad larval causada por la RUV.

Hipótesis N° 4: La bioacumulación de compuestos que absorben RUV depende de la dieta y su acumulación en larvas resultará en una menor mortalidad al ser expuestas a la RUV.

Hipótesis N° 5: La exposición de las larvas a dosis sub-letales de RUV inducirá malformaciones, disminución en la tasa de crecimiento y retardo en el desarrollo. También alterará el “patrón” de comportamiento y distribución en la columna de agua.

## ESTRUCTURA DE LA TESIS

Para lograr el objetivo y probar las hipótesis propuestas, esta Tesis ha sido estructurada de la siguiente manera: La primera sección es una **Introducción General** a la Fotobiología, con especial énfasis en los efectos de la RUV en organismos acuáticos y mecanismos de protección y aclimatación. Se resalta también la importancia del estudio de los efectos de la RUV en cangrejos, los cuales constituyen un importante recurso en la zona Patagónica. En la segunda sección de **Materiales y métodos generales: obtención y mantenimiento de cangrejos**, se describen los sitios de muestreo y las especies bajo estudio, así como el mantenimiento de los adultos y la obtención de sus larvas. En el **Capítulo 1** se presentan los resultados de estudios destinados a evaluar la sensibilidad de larvas recién liberadas a exposiciones realizadas con distintas condiciones (calidad y cantidad) de radiación (Hipótesis 1), a diferentes temperaturas (Hipótesis 3) y considerando también algunos posibles mecanismos para mitigar los efectos producidos por la RUV (Hipótesis 4) (trabajo publicado en la revista *Marine Drugs* – Anexo 1). En el **Capítulo 2** se estudia la capacidad de bioacumulación de compuestos que absorben RUV en larvas y adultos de la especie *Cyrtograpsus altimanus*. Además, se presentan datos de experimentos destinados a evaluar el rol de los compuestos que absorben RUV (Hipótesis 4) y el efecto de la RUV sobre distintos estadios larvarios de esta especie (Hipótesis 2). En el **Capítulo 3** se describen los efectos producidos por una exposición a niveles sub-letales de RUV en el desarrollo, comportamiento y distribución de larvas de *C. altimanus* (Hipótesis 5) (trabajo publicado en la revista *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* – Anexo 2). Finalmente, se presentan las **Conclusiones Generales** obtenidas en esta Tesis.

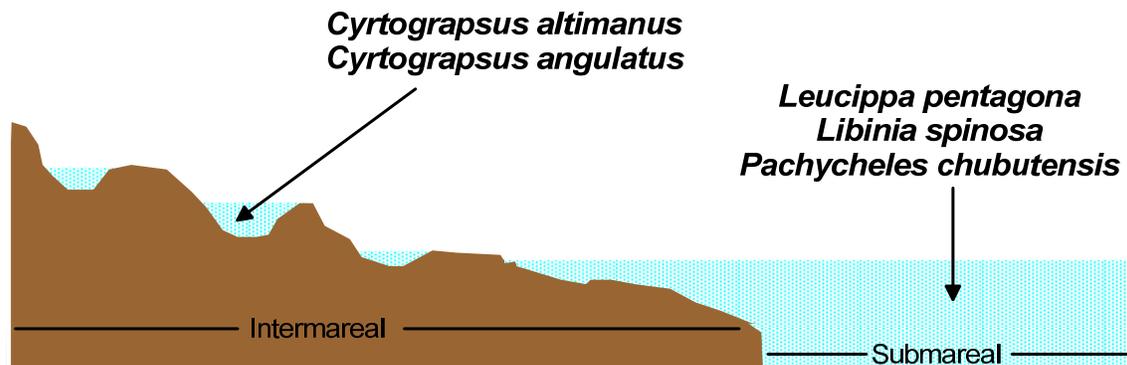
## ***MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES: OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE CANGREJOS***

### *i) Especies estudiadas y características del área de muestreo*

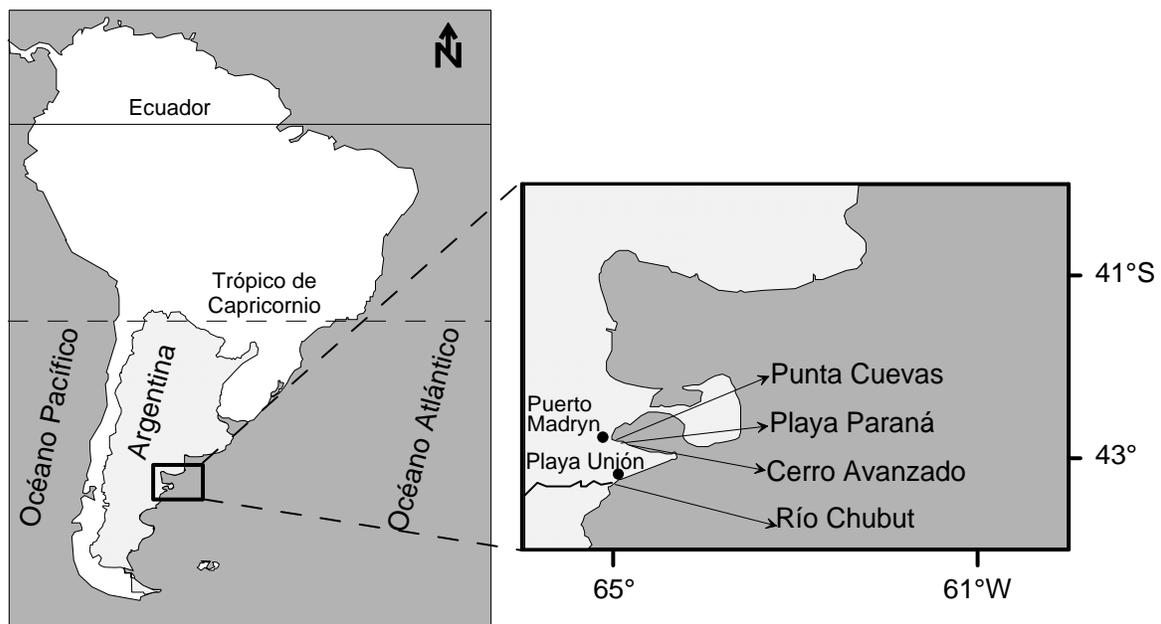
Para el desarrollo de esta Tesis se seleccionaron especies de cangrejos presentes en aguas costeras de la provincia del Chubut (Patagonia, Argentina). Inicialmente, las hembras adultas de nueve especies preseleccionadas, incluyendo a los Brachyura *Ovalipes trimaculatus* (Portunidae), *Platyxanthus patagonicus* (Platyxanthidae), *Leurocyclus tuberculatus*, *Leucipa pentagona* y *Libinia spinosa* (Majidae), *Cyrtograpsus angulatus* y *C. altimanus* (Varunidae), y los Anomura *Munida subrugosa* (Galatheidae) y *Pachycheles chubutensis* (Porcellanidae), se mantuvieron en acuarios en condiciones controladas. Teniendo en cuenta la facilidad de acceso a muestras de individuos adultos, su manipulación, y/o transporte y mantenimiento (tanto de los adultos como de sus larvas), se determinaron las tasas de mortalidad debidas a la exposición a RUV (Hipótesis 1) en larvas de *L. pentagona* (Milne Edwards, 1833), *L. spinosa* (Milne Edwards, 1834), *C. altimanus* (Rathbun, 1914), *C. angulatus* (Dana, 1851) y *P. chubutensis* (Boschi, 1963). A fin de responder las demás hipótesis planteadas, se realizaron experimentos exclusivamente con *C. altimanus*, *C. angulatus* y *L. pentagona*.

En cada muestreo se colectaron ejemplares adultos de las especies de interés, incluyendo hembras ovígeras (i.e., con embriones en desarrollo en sus abdómenes) o preovígeras (sin embriones en sus abdómenes pero prontas al desove), dependiendo del experimento a realizar. Se denominan hembras preovígeras aquellas que están prontas al desove, ya que se conoce cuando es la aparición de los embriones en las especies bajo estudio (i.e., observaciones personales), y la colecta se realizó poco tiempo antes de que esto ocurra (i.e., para mayor detalle ver Capítulo 2 donde se trabajó con las mismas). En el caso de las hembras ovígeras, sólo se colectaron aquellas que portaban embriones en desarrollo avanzado (próximos a la eclosión) para la posterior utilización de sus larvas. Los adultos se obtuvieron en muestreos realizados en la zona submareal mediante colección manual con equipo de buceo autónomo (*L. pentagona*, *L. spinosa* y *P. chubutensis*) y/o con trampas cebadas (*L. spinosa*), o en la zona intermareal por colección manual (*C. altimanus*) o con trampas cebadas (*C. angulatus*) (Fig. M.1). Los adultos de *C. angulatus* se obtuvieron en el puerto de Rawson, sobre la

desembocadura del río Chubut ( $43^{\circ}19' S - 65^{\circ}02' O$ ), y los de las demás especies fueron capturados en el golfo Nuevo ( $42^{\circ}45' S - 65^{\circ}03' O$ ) (Fig. M.2).



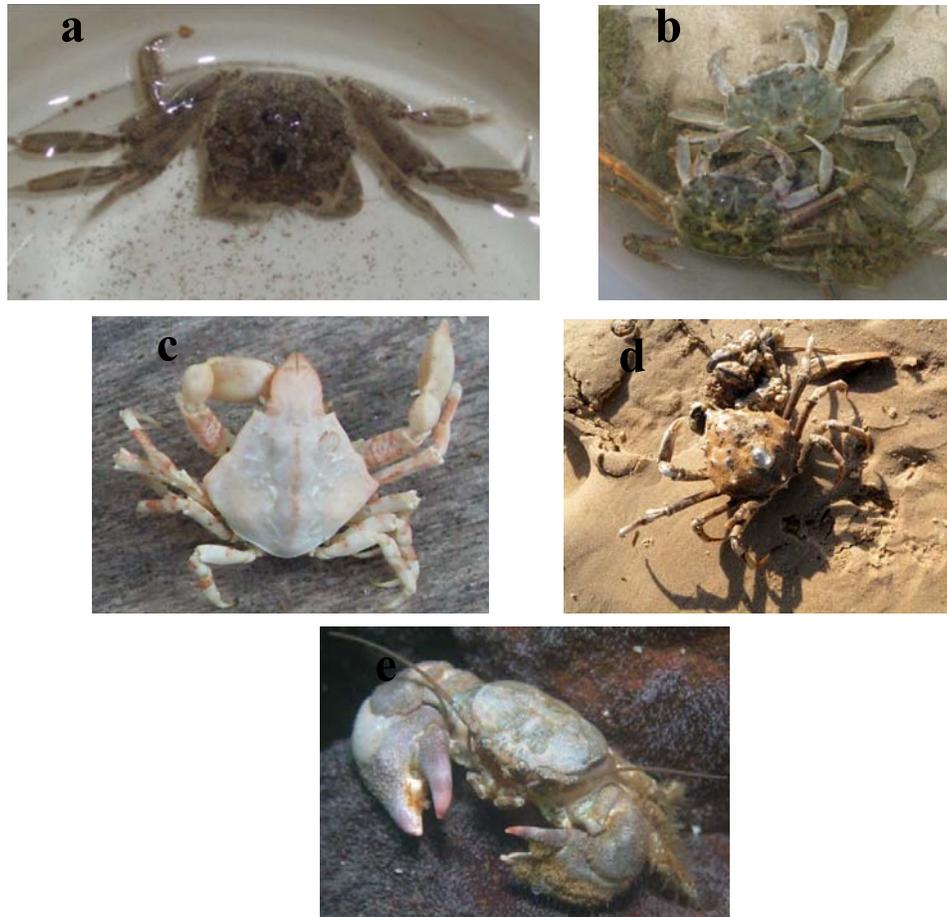
**Figura M.1:** Zonas de muestreo de adultos de las especies de cangrejo bajo estudio.



**Figura M.2:** Área de estudio. El recuadro de la derecha muestra los puntos de donde se extrajeron los cangrejos utilizados en la experimentación.

A partir de observaciones personales y tomando como referencia los estudios de Boschi et al (1992), en la Figura M.1 se representan las zonas donde se colectaron los adultos de las cinco especies estudiadas. Los adultos de las dos especies del género *Cyrtograpsus* son comunes

tanto en el intermareal como el submareal somero (mediolitoral). Sin embargo, los adultos de estas dos especies solo fueron colectados de zonas intermareales, por dos razones; (1) por practicidad, y (2) para disminuir cualquier variabilidad intraespecífica en las respuestas de las larvas, diferencias que se podrían atribuir a distintas condiciones de desarrollo de los embriones de hembras del intermareal o del submareal, ya sea por distintas condiciones de alimentación, como por distinta incidencia de la radiación. Estas dos especies tienen además distintas distribuciones geográficas; mientras que *C. altimanus* está restringida a las costas del Atlántico desde el sur de Brasil hasta el Golfo Nuevo (Chubut-Argentina), *C. angulatus* tiene una distribución más amplia, encontrándose además en costas del Pacífico entre Perú y Chile. Por su parte, las restantes tres especies suelen encontrarse también en zonas costeras pero restringidas al submareal, hasta profundidades de 30 m, siendo los adultos de cada una de estas especies colectados a profundidades similares para eliminar cualquier variabilidad intraespecífica debido a la profundidad. *L. pentagona* es la especie de más amplia distribución, habitando las costas del Pacífico desde Baja California (México) hasta el sur de Chile, y las costas del Atlántico desde el sur de Brasil hasta Rawson (Chubut). La especie *L. spinosa* abarca las costas desde el sur de Brasil hasta Tierra del Fuego. Finalmente, *P. chubutensis* es la de menor distribución de las cinco especies estudiadas, hallándose desde los 39° 00' S (sur de la provincia de Buenos Aires) hasta Rawson (Chubut). En cuanto a la talla (i.e., largo del caparazón), los adultos de mayor tamaño son los de *L. spinosa* (30-80 mm), y le siguen los adultos de *C. angulatus* (15-40 mm), *L. pentagona* (9-30 mm), *C. altimanus* (12-25 mm) y por último *P. chubutensis* (5-14 mm). Por lo tanto, en esta Tesis se trabaja con especies de distintas características, ya sea por su distribución geográfica como batimétrica, y abarcando no solo distintos grupos de Decápodos (braquiuros y anomuros) con distintas tallas, sino también con distintos hábitats de los adultos que podrían determinar su dieta, así como su historia lumínica y la de su descendencia (larvas).



**Figura M.3:** Adultos de cangrejos de las cinco especies bajo estudio: **a)** *Cyrtograpsus altimanus*; **b)** *C. angulatus*; **c)** *Leucipa pentagona*; **d)** *Libinia spinosa*; y **e)** *Pachycheles chubutensis*.

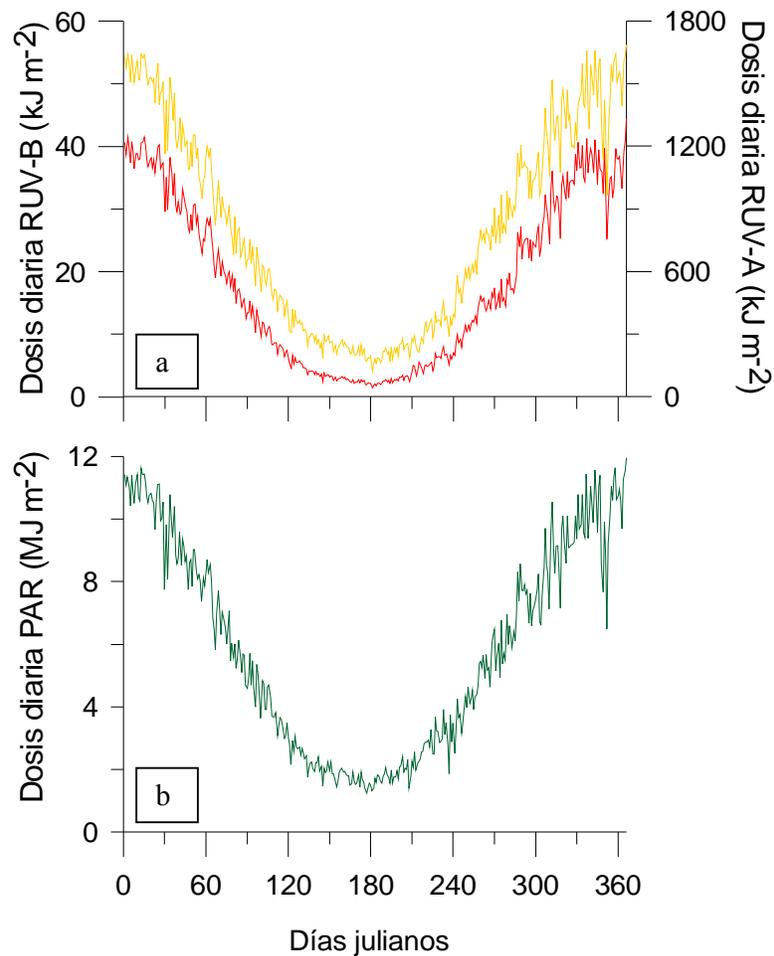
Las especies estudiadas representan la mayor parte de la comunidad de cangrejos de la zona (observaciones personales). Aún cuando estas especies en particular no tienen un interés económico actualmente, podrían ser recursos pesqueros en el futuro. Por otro lado, es importante señalar que desempeñan un rol bioenergético en las comunidades marinas, tanto en la columna de aguas (larvas) como en el bentos (juveniles y adultos). En este sentido, se ha registrado que los cangrejos de la zona son parte de la dieta de gran variedad de organismos de niveles tróficos superiores como peces (Moreno y Jara 1984), aves (Delhey et al 2001) y pulpos (Bremec y Cazzaniga, 1984).

El Golfo Nuevo es un sistema semi-cerrado, con poco recambio de aguas del Océano Atlántico (Rivas y Beier 1990). La temperatura superficial del agua oscila entre los 7,5° y 18 °C, con mínimos entre Junio y Agosto, y máximos entre Enero y Abril, y salinidades de casi

34, la cual se mantiene estable durante todo el año (Gayoso y Fulco 2006). En contraste, la desembocadura del río Chubut representa una zona estuarial con amplios gradientes físico-químicos, con una salinidad baja durante las bajamares y alta durante las pleamares (e.g., casi 0 y  $> 32$ , respectivamente). En cuanto a la temperatura, las aguas del estuario y del mar presentan valores promedios que oscilan en los  $7\text{ }^{\circ}\text{C}$  a finales del invierno hasta los  $18\text{ }^{\circ}\text{C}$  a mediados del verano (Helbling et al. 2010).

Aproximadamente sobre la isobata de 30 m, las aguas costeras del norte de Patagonia se encuentran casi constantemente mezcladas verticalmente debido a la acción del viento y las mareas, mientras que a mayores profundidades puede observarse una estratificación estacional, con una capa superficial de mezcla (CSM) definida (Acha et al. 2004). Durante la primavera y verano (i.e., la temporada de eclosión de la mayoría de las larvas de las especies de cangrejo estudiadas; Dellatorre, 2009) los vientos presentan las velocidades medias diarias más altas del año, que alcanzan los  $25\text{ m s}^{-1}$  (Villafañe et al. 2004a).

En cuanto a la radiación, los registros continuos obtenidos a partir de 1998 en la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU) con un radiómetro de banda ancha ELDONET (Real Time Computer, Möhrendorf, Germany) muestran que en el norte de Patagonia las dosis diarias de RUV-A (315-400 nm) varían entre  $200\text{ kJ m}^{-2}$  y  $1600\text{ kJ m}^{-2}$ , las de RUV-B (280-315 nm) fluctúan entre  $2.2$  a  $40\text{ kJ m}^{-2}$  (Fig. M.4a) y las de PAR (400-700 nm) oscilan entre  $1.4\text{ MJ m}^{-2}$  en invierno y  $12\text{ MJ m}^{-2}$  en verano, respectivamente (Fig. M.4b).



**Figura M.4:** Dosis diarias promedio (desde 1998 a 2011) en la zona de estudio de: a) RUV-A (línea amarilla) y RUV-B (línea roja) (en  $\text{kJ m}^{-2}$ ) y, b) PAR (en  $\text{MJ m}^{-2}$ ).

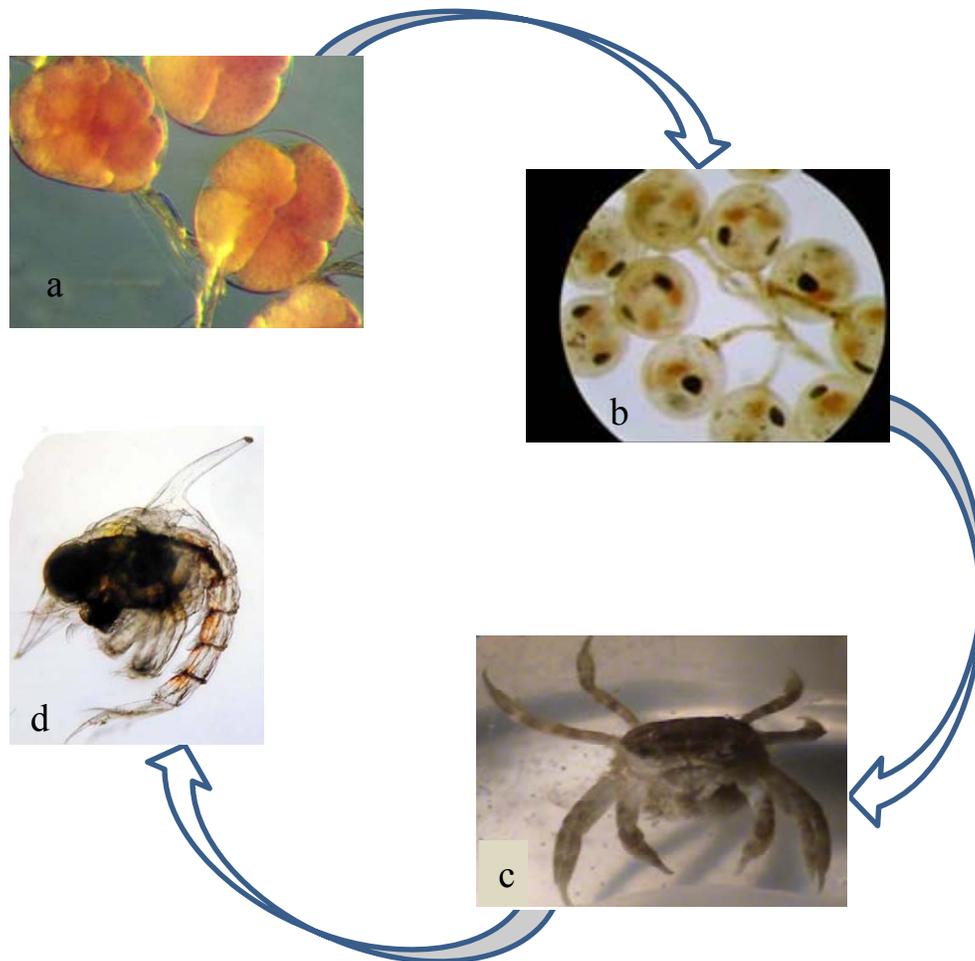
### ii) Mantenimiento de ejemplares adultos y obtención de larvas

Los adultos de las cinco especies se mantuvieron agrupados en acuarios con agua de mar (5-10 l de capacidad) en condiciones controladas de temperatura y con un fotoperíodo 12h : 12h luz : oscuridad. El agua de mar utilizada para los experimentos con larvas fue esterilizada en autoclave. En el caso particular de los adultos de *C. angulatus*, fueron colectados del ambiente estuarial debido a las grandes concentraciones halladas en la zona. Es sabido que las condiciones ambientales de un estuario pueden no ser similares a las marinas, lo cual podría condicionar las respuestas de estas larvas con respecto a las larvas de adultos obtenidos en ambientes netamente marinos. Pero este no sería el caso, por dos motivos: (1) las larvas de esta especie no soportan salinidades bajas y sólo sobreviven en un ambiente marino luego de

la eclosión (Bas y Spivak, 2000), y (2) la zona donde fueron obtenidos estos adultos tiene características de agua marina la mayor parte del día, sumado a ello, los adultos fueron obtenidos durante pleamar que es cuando las trampas quedan sumergidas y es cuando las características de las aguas en el lugar son netamente marinas (Helbling et al. 2010). Por tal motivo, puede asumirse que las larvas deben necesariamente desarrollarse fuera del estuario y es por ello que también se utilizó agua de mar para el mantenimiento de los adultos.. Los adultos se alimentaron dos veces por semana con carne de merluza, tras lo cual se renovó el agua para impedir la proliferación de bacterias. Luego, las hembras con embriones en la etapa final de maduración (i.e., menos de una semana para la eclosión) se separaron del grupo y se mantuvieron en condiciones similares, pero en acuarios individuales. Esto permitió realizar experimentos con larvas provenientes de una sola progenitora, evitando así la variabilidad intraespecífica.

Los tanques con hembras reproductoras en la fase final de desarrollo embrionario fueron controlados dos veces al día para comprobar la presencia de larvas, utilizándose en los experimentos sólo aquellas con menos de 16 horas de vida libre. Considerando que todas las especies bajo estudio tienen larvas planctotróficas (i.e., comienzan a alimentarse después de ser liberadas) se estableció que un período de 16 horas era el tiempo que las larvas podían soportar antes de sufrir un debilitamiento por la falta de alimento, lo cual podría sesgar los resultados de los experimentos. Por otro lado, este tiempo desde la eclosión es similar a los utilizados en otros trabajos de exposición a la RUV en larvas recién liberadas de decápodos (Hovel y Morgan 1999; Alonso Rodriguez et al 2000b; Wübben y Vareschi 2001).

Las larvas se recolectaron de los tanques con las hembras previamente aisladas. Se colocó una lámpara con luz fría en un lado de cada acuario para permitir que las larvas naden hacia el lado iluminado, donde fueron colectadas mediante una pipeta. De esta forma, se seleccionaron las larvas saludables y fototácticas para luego ser utilizadas en los experimentos. Los distintos estadios observados desde la captura de adultos hasta la eclosión del huevo y la liberación de una larva planctónica de forma libre se muestran en la Fig. M.5.



**Figura M.5:** Esquema de las etapas de desarrollo hasta la obtención de larvas: a) Embriones en la fase inicial de desarrollo (i.e., inmaduros); b) Embriones en fase final de desarrollo; c) Hembra ovígera de *Cyrtograpsus altimanus* en proceso de eclosión; d) Larva Zoea I.

## ***CAPÍTULO 1***

### ***Efectos combinados de la RUV y temperatura en la supervivencia de larvas de cangrejos (Zoea I) de Patagonia: Rol de los compuestos que absorben RUV<sup>1</sup>***

- 1- Parte de este capítulo fue publicado como trabajo de respaldo de la presente tesis: Hernández Moresino RD, Helbling EW (2010) *Combined Effects of UVR and Temperature on the Survival of Crab Larvae (Zoea I) from Patagonia: The Role of UV-Absorbing Compounds*. *Marine Drugs* 8: 1681-1698. Anexo 1

## INTRODUCCIÓN

El cambio climático, debido a las actividades antrópicas, tiene dos resultantes principales i.e., el incremento de la radiación ultravioleta (RUV, 280-400 nm), especialmente de RUV-B (280-315 nm), debido a la reducción del ozono, y el incremento de la temperatura debido a la liberación de gases de efecto invernadero. Ambos tienen consecuencias para los organismos y los ecosistemas (Harley et al. 2006; Nelson et al. 2006). Por un lado, la radiación solar es la energía que hace posible la producción de materia orgánica vía fotosíntesis por parte de los organismos autótrofos. La mayoría de los procesos fotosintéticos usan la Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR, 400-700 nm). Por otro lado, se ha encontrado que la RUV solar, tanto a niveles normales como incrementados, causa daños biológicos. El impacto negativo de la RUV-B sobre varios blancos o “targets” de los organismos acuáticos (e.g., ADN, fotosíntesis, proteínas, etc) se ha documentado exhaustivamente (De Mora et al. 2000; Helbling y Zagarese 2003; Häder et al. 2007). En contraste, se ha observado que la radiación ultravioleta A (RUV-A, 315-400 nm) es al mismo tiempo benéfica por participar en procesos de fotosíntesis y de reparación, como perjudicial por inducir la formación de especies oxidadas reactivas (Setlow et al. 1993; Vega y Pizarro 2000; Lesser et al. 2001) y por afectar negativamente el rendimiento del fotosistema II (Buma et al. 2003; Villafañe et al. 2003).

También la temperatura puede generar efectos benéficos como nocivos sobre los organismos vivos. Estudios previos han destacado la importancia de un incremento en la temperatura, asociada al aumento de la tasa de crecimiento (casi quintuplicada) en las larvas del cangrejo *Paralomis granulosa*, cuando se comparan las tasas a 15 °C y a 3 °C (Anger et al. 2003). Sumado a ello, un incremento térmico ha resultado en una menor mortalidad del zooplancton expuesto a la RUV, debida a una mayor efectividad de la actividad enzimática, incluyendo la de proteínas involucradas en mecanismos de fotoreparación (Williamson et al. 2002; MacFadyen et al. 2004; Lamare et al. 2006). Sin embargo, algunas especies estenotérmicas podrían ser vulnerables al aumento de la temperatura. Por ejemplo, en estudios realizados con *Asplanchna girodi* se ha demostrado que la tolerancia a la RUV se reduce significativamente al aumentar los niveles de temperatura (Williamson et al. 2002).

Aunque existe mucha literatura referida a los efectos sobre los organismos acuáticos de estos dos factores de estrés por separado (i.e., temperatura y RUV), a la fecha se sabe poco respecto a los efectos combinados de ambos. Esto es importante debido a que los mismos pueden

actuar sinérgica o antagónicamente (Hoffman et al. 2003). Un estudio anterior realizado con algas simbióticas reportó concentraciones significativamente más altas de radicales superóxido y de peróxido de hidrógeno cuando los cultivos fueron expuestos a elevadas temperaturas, con y sin exposición a la RUV (Lesser 1996). La respuesta general parece tener un alto grado de especificidad (Persaud y Williamson 2005). La aclimatación y la capacidad de reparación de cada organismo influyen en el nivel del impacto (Lamare et al. 2006). Cabe mencionar también el rol complementario de los compuestos que absorben RUV (CARUV) en la protección de un gran número de organismos contra el estrés que produce la RUV, abarcando desde el fitoplancton a las macroalgas, el zooplancton y los invertebrados (Dunlap y Shick 1998; Banaszak 2003). Sumado a ello, los organismos pueden presentar uno a más mecanismos para reparar el daño causado por la RUV (Buma et al. 2003) algunos modulados por la temperatura. Generalizando, las respuestas a diferentes variables abióticas son el resultado de interacciones altamente complejas dentro del organismo, que pueden también estar moduladas por las interacciones ecológicas (Hansson et al. 2004).

Con la idea de determinar respuestas de larvas de varias especies de cangrejos de la zona a distintas condiciones de exposición a la RUV (i.e., tanto calidad como cantidad de radiación) es que se realizaron experimentos de exposición sobre cinco especies características del Mar Argentino: *Cyrtograpsus altimanus*, *C. angulatus*, *Leucippa pantagona*, *Libinia spinosa* y *Pachycheles chubutensis* (Decapoda, Crustacea). Luego, y para estudiar el efecto combinado de esta variable con la temperatura, el trabajo se centró en las tres primeras especies (*C. altimanus*, *C. angulatus* y *L. pantagona*).

En las aguas templado-frías del Océano Atlántico Sudoccidental se han descripto 39 especies de crustáceos decápodos (Spivak 1997; Arntz et al. 1999). Algunas de ellas son eslabones importantes en la red trófica y constituyen una gran parte de la dieta de predadores tales como peces (Moreno y Jara 1984) y aves marinas (Delhey et al. 2001). Más aún, algunas de estas especies de crustáceos decápodos son de importancia comercial alcanzando elevados precios en el mercado (Boschi 1997; Wyngaard et al. 2001).

Las larvas de crustáceos resultan ser un sistema de estudio interesante, desde el punto de vista fotobiológico, ya que tienen una fase planctónica (expuesta a la radiación solar) la cual es una de las más abundantes en el zooplancton (Boltovskoy 1981). Además, durante esta fase larvaria, y especialmente durante la de Zoea, se han reportado altas mortalidades (>80%)

(Morgan 1995), debidas principalmente a la acción de diversos factores bióticos, tales como la depredación y la falta de alimento, así como también a factores abióticos, tales como la radiación solar y la temperatura (Pechenik 2006). Finalmente, las especies utilizadas en nuestra experimentación representan una alta proporción del total de las larvas presentes en la columna de agua en la región de estudio: 35% en el caso de *Cyrtograpsus spp.* y 11% en el caso de *L. pentagona* (Dellatorre 2009).

Para lograr los objetivos de este Capítulo, se expusieron larvas recientemente liberadas de cangrejos a tres niveles de RUV (i.e., usando un simulador solar) (Hipótesis 1) mientras eran incubadas a dos temperaturas: 15 °C y 20 °C (Hipótesis 3). Ambos conjuntos de condiciones son relevantes desde el punto de vista ecológico por simular niveles ambientales similares e incluso aumentados (en el caso de los niveles de irradiancia) a los encontrados en la superficie del mar durante el período de estudio. Asimismo, un incremento de la temperatura durante los inicios de la temporada de eclosión se asemeja a una condición de cambio extremo para futuros escenarios de cambio climático (IPCC 2007). Después del período de incubación, se evaluó la mortalidad y se correlacionaron los resultados con la presencia de compuestos que absorben RUV (CARUV) y carotenoides (Hipótesis 4). En este Capítulo se adquirió conocimientos sobre el efecto combinado de la RUV y la temperatura en estos organismos (los cuales han sido poco estudiados dentro del contexto del cambio global y también de los ecosistemas patagónicos), y se evalúan las potenciales implicancias de estos factores de estrés sobre los ecosistemas locales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Muestreo / mantenimiento de especies*

Las condiciones de muestreo y mantenimiento se han descripto en la segunda sección de esta Tesis. Brevemente, las hembras ovígeras (i.e., con huevos prontos a la eclosión) de los cangrejos *Cyrtograpsus altimanus*, *Cyrtograpsus angulatus*, *Leucippa pentagona*, *Libinia spinosa*, y *Pachycheles chubutensis*, fueron colectadas durante la primavera, verano y otoño de los años 2007 y 2008 para obtener larvas recién liberadas. Los especímenes fueron llevados inmediatamente al laboratorio de la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU, 15-60 min de los sitios de muestro) donde fueron mantenidos en acuarios bajo un fotoperíodo

12h: 12h luz: oscuridad en una cámara a temperatura controlada (a 15 o 20 °C, dependiendo de los experimentos, ver más adelante) hasta la eclosión de los huevos. A fin de aclimatar las hembras ovígeras a las nuevas condiciones de laboratorio, estas permanecieron por al menos dos días y sólo se utilizaron larvas liberadas después de ese período en los experimentos, para determinar los efectos combinados de la RUV y la temperatura en la supervivencia (ver más adelante).

### *Experimentación*

En cada experimento de supervivencia, se colocaron 20 larvas (Zoea I de una misma hembra colectadas poco después de la eclosión) por cada recipiente de vidrio de 180 ml (10 cm de diámetro) con 100 ml de agua de mar esterilizada (i.e., unidad experimental) y se las expuso por hasta 12 horas a radiación artificial RUV-PAR usando un simulador solar (Hönle system, Sol 1200, Alemania Fig. 1.1). Se implementaron tres tratamientos de calidad de radiación (cada uno con tres réplicas): (1) Tratamiento PAB (larvas expuestas a toda la radiación - PAR + RUV-A + RUV-B, 290-700 nm), donde los recipientes de vidrio se cubrieron con Ultraphan 290 ó láminas de acetato para eliminar la RUV-C emitida por el simulador solar; (2) Tratamiento PA (larvas expuestas a la radiación en el rango 320-700 nm - PAR + RUV-A), donde los recipientes de vidrio se cubrieron con filtros Folex (Montagefolie, No. 10155099); (3) Tratamiento P o control (larvas expuestas a la radiación en el rango de 400-700 nm - sólo PAR), donde los recipientes de vidrio se cubrieron con filtros Ultraphan UV Opak Digefra. Las características de transmisión fueron publicadas anteriormente (Villafañe et al. 2003). Las nueve unidades experimentales utilizadas en cada experimento (i.e., los tres tratamientos de radiación y sus réplicas) fueron distribuidas al azar en un contenedor negro con baño de agua manteniendo la temperatura a 15 o a 20 °C bajo el simulador solar. Para cada experimento se fijó un nivel de irradiancia colocando todos los recipientes (n = 9) a la misma distancia del simulador solar. Para representar distintos niveles de irradiancia los experimentos fueron repetidos a tres distancias del simulador (Tabla 1.1), con un grupo nuevo de larvas para cada experimento. Se realizó como mínimo un experimento con larvas de cada una de las cinco especies bajo los tres niveles de radiación, para la temperatura de 15°C. Luego, para evaluar los efectos combinados de la radiación con la temperatura, se repitieron los mismos experimentos de exposición a 20°C, pero sólo con larvas de las especies del género *Cyrtograpsus* y *L. pentagona* (ver más adelante).



**Figura 1.1:** Esquema del dispositivo utilizado para los experimentos de exposición a la radiación bajo el simulador solar en condiciones controladas de temperatura.

Distancia al simulador solar (m)	PAR ( $\text{W m}^{-2}$ )	UV-A ( $\text{W m}^{-2}$ )	UV-B ( $\text{W m}^{-2}$ )
0.56	223.5	89.4	2.19
0.85	125.8	49.1	1.22
1.09	84.5	30	0.76

**Tabla 1.1:** Niveles de irradiancia (en  $\text{W m}^{-2}$ ) usados en los experimentos

### *Determinación de la mortalidad*

Durante el período de exposición a la radiación, los recipientes con las larvas fueron extraídos de la fuente de radiación (tres a la vez) cada 1-2 horas, y se contaron las larvas vivas y muertas. Debido a que las larvas de las 5 especies usadas en todos los experimentos presentan orientación fototáctica positiva, se consideraron muertos aquellos individuos que no reaccionaron hacia una fuente de luz tenue posicionada en un lado del recipiente. Este

procedimiento de conteo lleva no más de 2 minutos, por lo que el tiempo fuera de la fuente de radiación fue considerado ínfimo. La mortalidad fue definida como el porcentaje de larvas muertas respecto al número total de larvas en el recipiente ( $n = 20$ ).

### *Ajuste sigmoideo de los datos de mortalidad*

La función que mejor ajusta a los datos de mortalidad larval por efectos de una exposición a la radiación, y que es normalmente utilizada en este tipo de trabajos, es una curva sigmoidea (McNamara y Hill 1999; Wübben y Vareschi 2001; Aarseth y Schram 2002). Inicialmente los individuos permanecen sin mostrar los efectos del tratamiento (mortalidad = 0) durante un cierto lapso de tiempo, luego comienzan a morir por un efecto acumulativo del mismo, primero a velocidades en incremento y luego en decremento al superar el punto de inflexión, alcanzando finalmente la mortalidad máxima (100 %). A partir de un ajuste sigmoideo se pueden calcular varios parámetros que resultan relevantes al momento de realizar interpretaciones biológicas:

*Tiempo o dosis de exposición umbral o Threshold ( $U_t$  o  $U_d$ ):* Tiempo o dosis de exposición a partir del cual se empiezan a observar efectos del tratamiento.

*Tiempo o dosis letal al 50 % ( $TL_{50}$  o  $DL_{50}$ ):* Tiempo o dosis necesaria para alcanzar el 50% de mortalidad.

*Pendiente o tasa de mortalidad ( $p$ ):* Velocidad máxima a la cual los individuos mueren luego de superado el umbral.

Para ajustar las curvas sigmoideas a los conjuntos de datos de mortalidad sobre tiempo de exposición, el modelo elegido que mejor representa los datos es la función sigmoidea de Boltzmann, cuya ecuación es:

$$Y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2$$

Donde:

$A_1$  es el valor inicial (i.e., siempre 0 % a tiempo 0 o inicio de cada experimento)

$A_2$  es el valor final (i.e., siempre 100 % que es el total de mortalidad)

$x_0$  es el  $L_{50}$

$dx$  es la diferencial del tiempo.

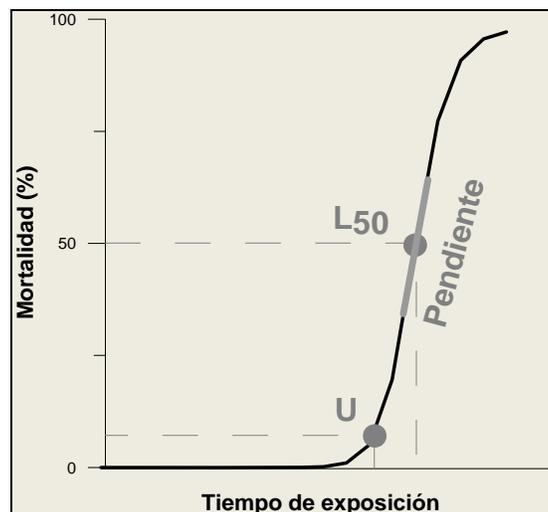
Cada valor tiene asignado un error estándar (EE) del cual se calcula el desvío estándar (DE) como valor de dispersión que será utilizado luego para el análisis de la varianza (ANOVA).

$DE = EE * \sqrt{n}$  , donde  $n$  es el tamaño de la muestra.

Para el cálculo de la pendiente máxima se emplea la fórmula:

$$p = \frac{A_1 - A_2}{4dx}$$

Por último, para determinar el umbral (U) se calcula el gradiente máximo de cambio de la curva de mortalidad sobre tiempo de exposición (derivada primera).



**Figura 1.2:** Representación de una distribución sigmoidea como ajuste de los datos de mortalidad larvaria en función del tiempo de exposición a la radiación. En gris se muestran los parámetros de interés que se pueden calcular a partir del ajuste.

### *Análisis de compuestos que absorben RUV (CARUV)*

Los CARUV fueron medidos en las larvas enteras, así como en hepatopáncreas (glándulas digestivas), músculos, gónadas, embriones y caparazón de hembras adultas, y en hepatopáncreas, músculos y caparazón de machos adultos, de las tres especies utilizadas en los experimentos de exposición larvaria en el simulador solar bajo las dos condiciones de

temperatura. Las muestras (por duplicado o triplicado) fueron obtenidas al principio, mediados y finales de la temporada de desove para evaluar diferencias entre estaciones. Las muestras frescas fueron colocadas en tubos de centrifuga de 15 ml con 5 ml de metanol absoluto, sonicadas por 20 minutos a 25 °C, y extraídas por al menos una hora. Dado que fue demostrado que el metanol al 20% es el mejor solvente para la extracción para este tipo de compuestos en análisis de HPLC (Tartarotti y Sommaruga 2002) se puede pensar que los compuestos que absorben RUV son ligeramente subestimados por nuestro procedimiento. Sin embargo, considerando que previamente no se observaron diferencias significativas entre las dos metodologías de extracción en nuestro laboratorio, y que con éste procedimiento utilizado se podían determinar las concentraciones de carotenoides totales (ver más detalles en próximo párrafo), se decidió la utilización del metanol absoluto como solvente para el análisis de los espectros de absorción. Después del período de extracción, las muestras fueron centrifugadas por 15 minutos a 1500 rpm y las características espectrales del sobrenadante fueron medidas desde los 280 a los 750 nm con un espectrofotómetro de barrido (Hewlett Packard modelo 8453E). La estimación de la cantidad de CARUV fue obtenida por análisis de picos entre 310-360 nm (Helbling et al. 1996). La cantidad de CARUV fue normalizada por gramo de peso seco, que fue determinado por el secado de submuestras en una estufa a 35 °C por 24 horas. Para fijar el tiempo de secado (i.e., 24h) se realizó previamente una prueba pesando las muestras cada 12h, y se determinó que luego de las 24 h las muestras se mantenían en un peso constante.

### *Análisis de carotenoides*

Los mismos espectros obtenidos para determinar las concentraciones de CARUV fueron utilizados para estimar la concentración total de carotenoides. Esta se calculó a partir de los espectros de absorción, usando la formula de Hairston (1979):  $C = (D \times V \times 10^4) / (E \times W)$ , donde C es la concentración de carotenoides en la muestra (en  $\mu\text{g mg}^{-1}$  de peso seco); D, la absorción a 472 nm; V, el volumen de la extracción (en ml); E, el coeficiente de extinción (2500); y W, el peso seco (en mg) de la muestra.

### *Datos de radiación / temperatura de la zona*

Los niveles de irradiancia bajo el simulador solar fueron medidos usando un radiómetro de banda ancha ELDONET (Real Time Computers, Inc.) que tiene canales para medir RUV-B (280-315 nm), RUV-A (315-400 nm), y Radiación Fotosintéticamente Activa o PAR (400-700 nm). La información de radiación en el campo también fue obtenida con un radiómetro ELDONET (Real Time Computers, Inc.) que está instalado permanentemente en el techo de la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU). Los datos de temperatura superficial del mar fueron obtenidos con un termómetro digital a 50 cm de profundidad, montado en una boya situada próxima a Punta Cuevas y Playa Paraná (datos provistos por F. Dellatorre). El termómetro registró datos cada 5 minutos y la información fue almacenada en un datalogger. Los datos de temperatura fueron similares a los medidos en el estuario del Río Chubut (Helbling et al. 2010).

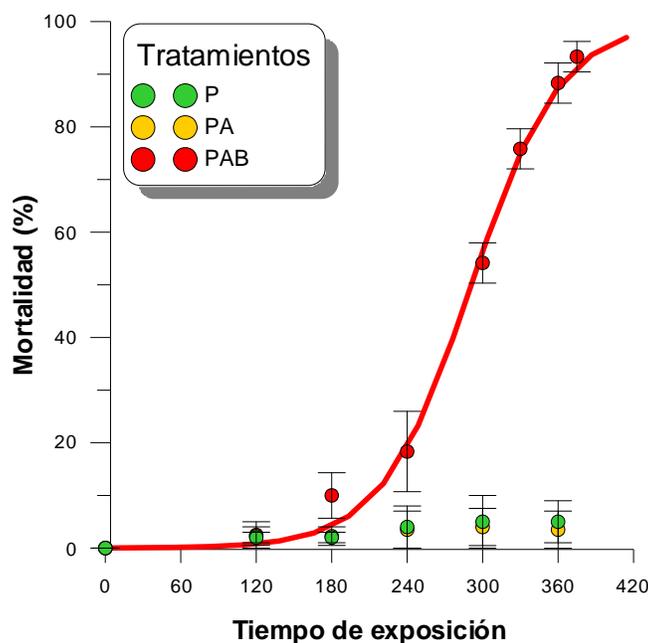
### *Análisis estadístico*

Los datos de mortalidad *versus* tiempo de exposición fueron graficados para cada condición de irradiancia-temperatura y para cada especie seleccionada. La mortalidad en función del tiempo de exposición fue ajustada mediante un modelo sigmoideo (Zagarese et al. 1997). A partir de los ajustes sigmoideos se determinaron los parámetros de interés que son el umbral (U) y la letalidad al 50% (L<sub>50</sub>). Se utilizó análisis de la varianza (ANOVA) de una vía para determinar diferencias significativas en la resistencia de las larvas de las 5 especies, bajo las tres irradiancias, a 15 °C. También se utilizó un ANOVA de dos vías para determinar las interacciones entre factores (i.e., irradiancia y temperatura) en larvas de las especies *C. altimanus*, *C. angulatus* y *L. pentagona* (Zar 1999). Se realizaron comparaciones de pares *a posteriori* (Prueba LSD) en los parámetros U<sub>t</sub>, p y TL<sub>50</sub> obtenidos de los ajustes de las curvas de mortalidad de distintas especies a las que se aplicó un mismo nivel de irradiancia y con los parámetros U<sub>d</sub> y DL<sub>50</sub> de las curvas de mortalidad ajustadas para distintos niveles de irradiancia a los que fueron expuestas las larvas de cada especie en particular. También se aplicó Análisis de Regresión Simple (RLS) para analizar relaciones en las diferencias de los parámetros de mortalidad con respecto a los niveles de irradiancia. Para testear las diferencias entre estacionales y entre tejidos de la cantidad de CARUV y carotenoides totales, fue utilizando el estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis. El nivel de significancia estadística con el que se trabajó fue del 5% en todos los análisis.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Mortalidad de cangrejos al ser expuestas a la RUV:*

No se detectó mortalidad significativa en las larvas de todas las especies consideradas cuando fueron expuestas a PAR + RUV-A (tratamiento PA) o a PAR solamente (tratamiento P). Para ello se realizaron análisis de regresión lineal de los datos de mortalidad larvaria *versus* el tiempo de exposición en los tratamientos P y PA, resultando que ninguna de las pendientes de las regresiones fue significativamente distintas de cero (mortalidad larvaria <7%,  $H^0: \beta = 0$ ,  $P > 0.11$ ). En cambio, se observó mortalidad significativa de larvas en todos los experimentos cuando se expusieron las muestras a la radiación total bajo el simulador solar (i.e., PAR + RUV-A + RUV-B, tratamiento PAB), ajustando curvas sigmoidales a estos datos. El hecho de que la mortalidad larvaria sea sólo debida a la RUV-B es consistente con trabajos anteriores realizados con larvas de camarón (Damkaer et al. 1981; Damkaer y Dey 1983) y con larvas de otras especies de cangrejos (Morgan y Christy 1996; Hovel y Morgan 1999; Peachey 2005). A modo de ejemplo se muestran en la Figura 1.3. los datos de una exposición a la RUV de *C. angulatus*.

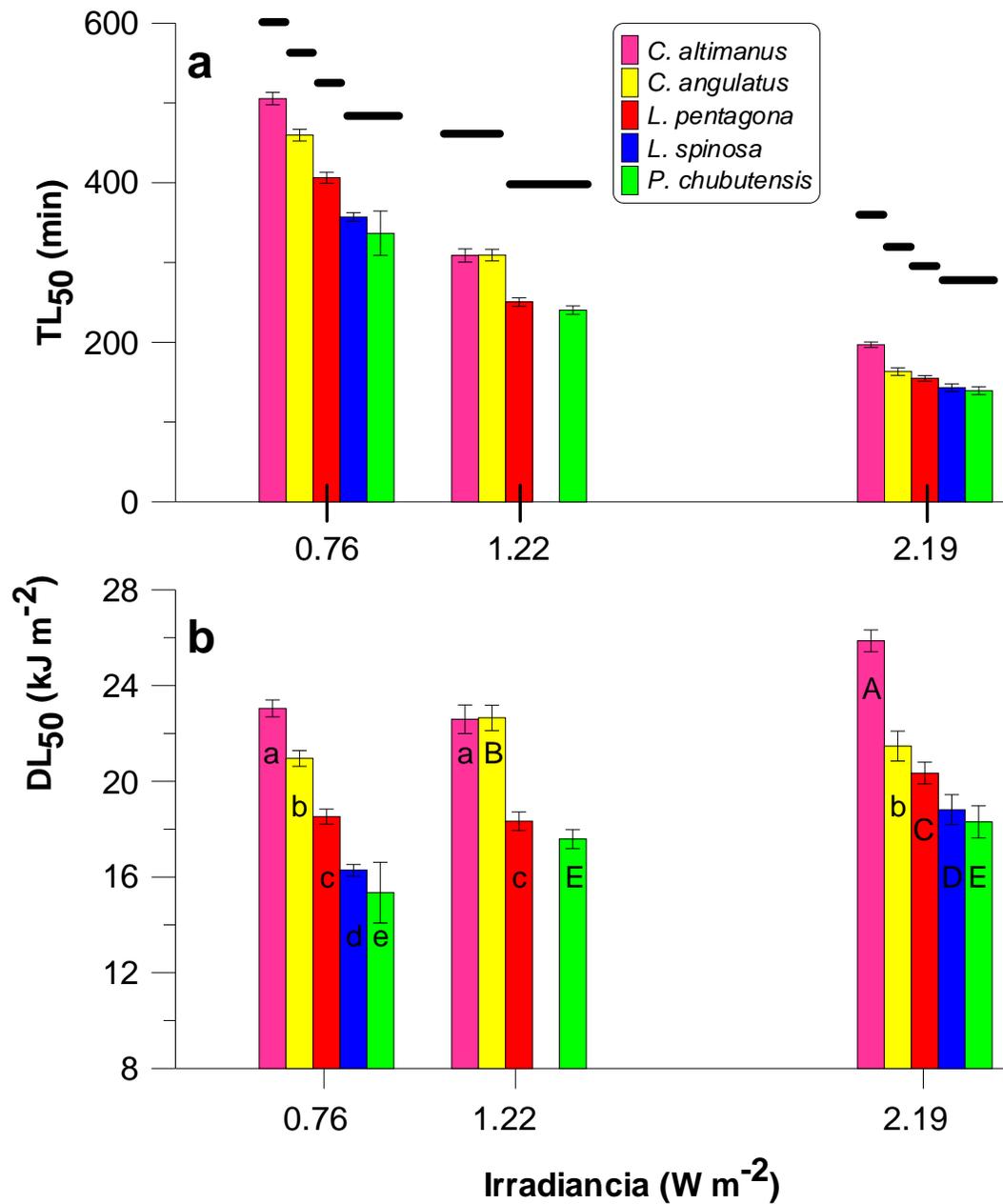


**Figura 1.3:** Mortalidad en función del tiempo de exposición (minutos). Los círculos representan la mortalidad en los distintos tratamientos mientras que las barras verticales

muestran los desvíos estándar ( $n = 3$ ) en un experimento representativo (i.e., larvas de *C. angulatus* expuestas a una irradiancia de  $1.22 \text{ Wm}^{-2}$  y  $15^\circ\text{C}$ ).

### *Exposición letal al 50%*

El tiempo o la dosis de exposición al alcanzar el 50% de mortalidad larvaria (i.e.,  $TL_{50}$  o  $DL_{50}$ ) pueden ser utilizados como indicadores de resistencia a la exposición a RUV-B. Se observaron diferencias significativas (ANOVA,  $P < 0.05$ ) en estos parámetros entre especies sometidas a igual tratamiento (Fig. 1.4a), así como entre tratamientos a distintos niveles de irradiancia aplicados a una misma especie (Fig. 1.4b).



**Figura 1.4:** Comparación de los parámetros Tempo letal 50% (TL<sub>50</sub>) y Dosis letal 50% (DL<sub>50</sub>) calculados a partir de las curvas de mortalidad ajustadas a larvas de cinco especies de cangrejo expuestas a tres niveles de irradiancia de RUV-B. Las columnas representan valores medios del parámetro y las barras verticales muestran el desvío estándar. Las líneas horizontales conectan especies que no muestran diferencias significativas (Pruebas LSD, P < 0,05). Las letras dentro de las columnas indican las diferencias significativas entre irradiancias dentro de cada especie estudiada (Pruebas LSD, P < 0,05). Las diferencias entre irradiancias son representadas por letras minúscula y mayúscula, mientras que cada especie

está representada por una letra particular. Para una mejor visualización, las líneas horizontales y las letras se encuentran en gráficos distintos, pero son aplicables a ambos.

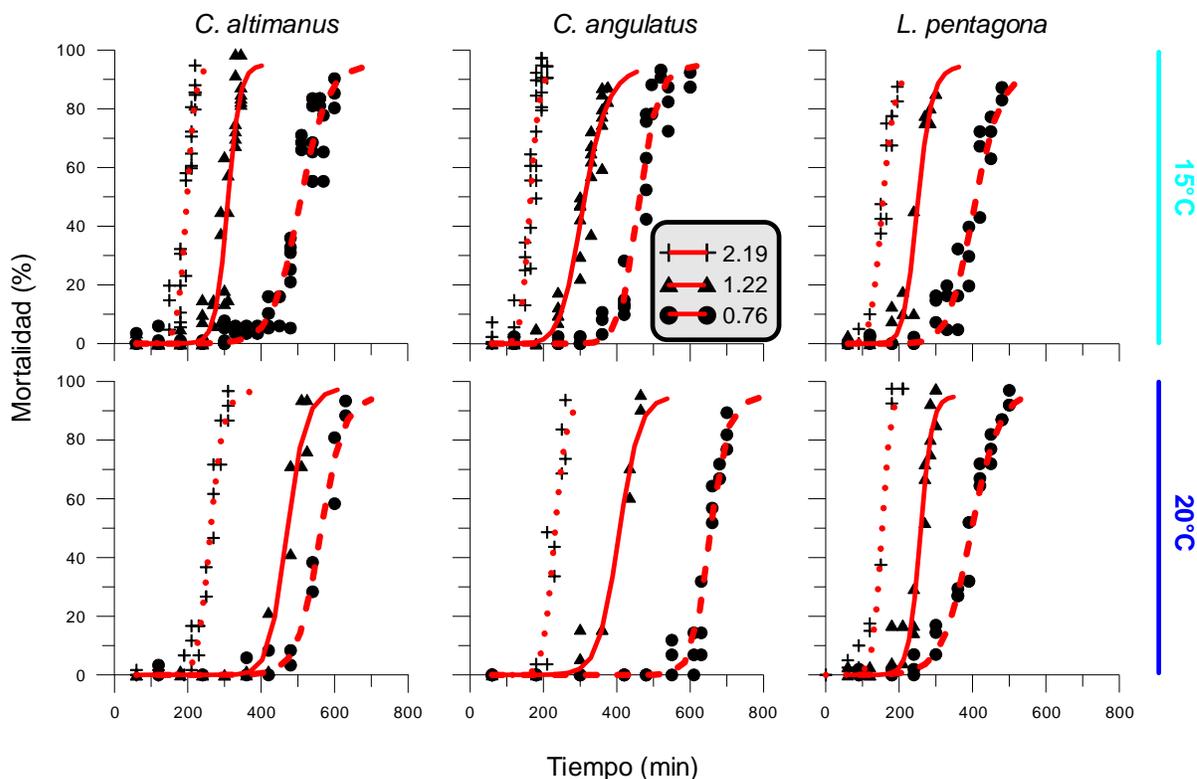
Comparaciones múltiples a posteriori del tiempo letal 50% (TL<sub>50</sub>) entre larvas de distintas especies expuestas al mismo nivel de irradiancia, permitieron ordenar las mismas según su resistencia a la RUV-B. Los símbolo  $\geq$  se utilizan para indicar que la resistencia de las larvas de una especie es mayor a las de otra especie en al menos un nivel de irradiancia aplicado. Cuando el símbolo es  $>$  o es  $=$ , las diferencias entre las dos especies son significativas o no significativas respectivamente, para todas las irradiancias aplicadas. Entonces:

***C. altimanus*  $\geq$  *C. angulatus*  $>$  *L. pentagona*  $\geq$  *L. spinosa* = *P. chubutensis***

Como se mencionó anteriormente, de estas cinco especies usadas inicialmente en los experimentos, se seleccionaron tres, *C.altimanus*, *C. angulatus*, y *L. pentagona*, para analizar el efecto de la radiación y la temperatura. La selección se basó en sus respuestas diferenciales a la RUV-B y en la facilidad de su obtención en el campo.

### *Respuestas generales de las larvas de cangrejos a la radiación y a la temperatura*

La mortalidad, en función del tiempo de exposición, varió de acuerdo con las condiciones de irradiancia y temperatura a la cual las larvas fueron expuestas e incubadas (Fig. 1.5). Sin embargo, la respuesta general fue de una mortalidad más bien constante hasta que alcanzar el valor umbral. Después del mismo, la mortalidad fue aumentando significativamente con el tiempo, alcanzando el 100% hacia el final de los experimentos. Se determinaron tres parámetros que fueron usados para comparar las respuestas y la sensibilidad de las especies bajo las diferentes condiciones experimentales: (a) Un valor umbral (U) debajo del cual no se detectó mortalidad; este umbral fue fijado como el primer máximo gradiente de cambio en la curva de mortalidad *versus* tiempo / dosis; (b) La dosis letal al 50% de muerte larvaria (DL<sub>50</sub>); y (c) La tasa de mortalidad, como la máxima pendiente de la curva de mortalidad *versus* tiempo.

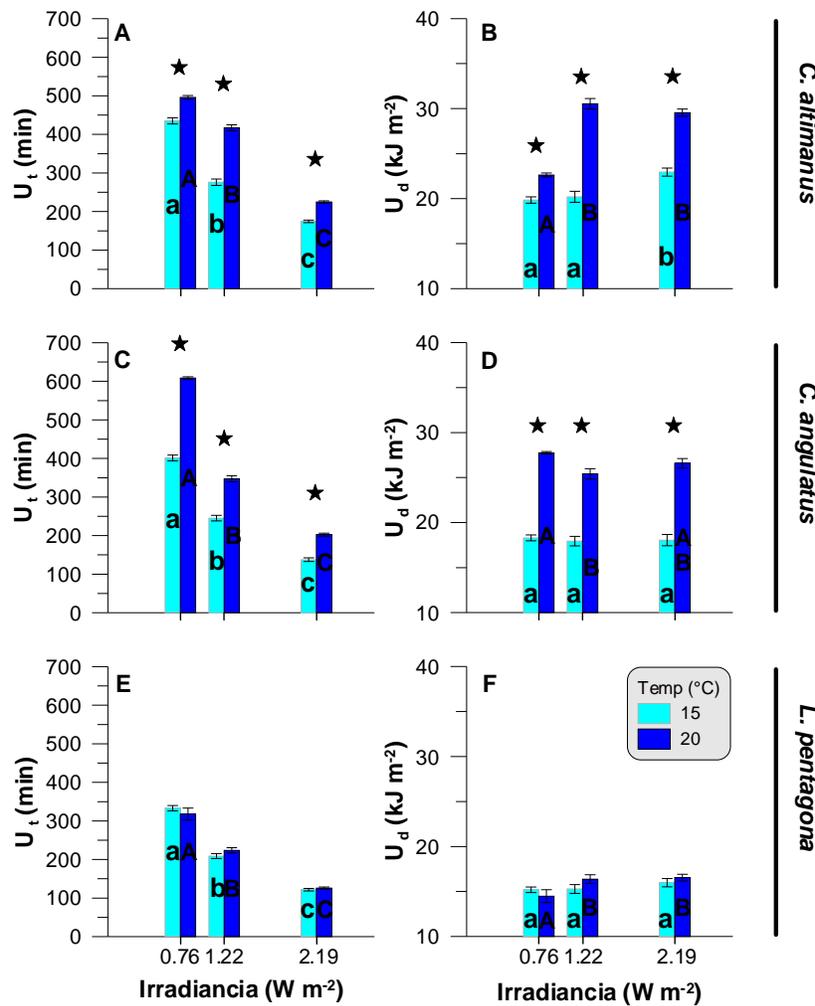


**Figura 1.5:** Mortalidad larvaria (%), en función del tiempo de exposición, para muestras bajo el tratamiento PAB expuestas a irradiancias de RUV-B de 2.19, 1.22 y 0.76 W m<sup>-2</sup>, y bajo temperaturas de 15 y 20 °C. A, B y C son los experimentos realizados con larvas expuestas a 15 °C; D, E y F son los experimentos realizados con larvas expuestas a 20 °C. Se realizaron un total de 28 experimentos, con al menos tres réplicas por cada condición de irradiancia-temperatura. Cada símbolo representa una réplica; las curvas rojas son las líneas de mejor ajuste para cada condición de irradiancia.

### *Umbrales de tiempo de exposición y de dosis*

Para comparar los datos obtenidos entre tratamientos de irradiancia y temperatura, se calcularon los valores umbral (U) basados tanto en el tiempo ( $U_t$ ) como en la dosis ( $U_d$ ) asociados a cada nivel de irradiancia (Fig. 1.2), aplicando ANOVA de 2 factores (Tablas 1.2 y 1.3). Para todas las especies y a ambas temperaturas, los valores de  $U_t$  estuvieron negativamente relacionados, disminuyendo a medida que los niveles de irradiancia aumentaron (Fig. 1.6A, C y E) (ver tabla 1.4 de Regresión Lineal Simple). Los valores de  $U_t$  fueron significativamente menores (LSD,  $P < 0.01$ ) cuando las larvas fueron expuestas a mayores irradiancias de RUV-B (i.e.,  $U_t$  a 2,19 W m<sup>-2</sup> <  $U_t$  a 1,22 W m<sup>-2</sup> <  $U_t$  a 0,76 W m<sup>-2</sup>). En ambas especies de *Cyrtograpsus*,  $U_t$  fue significativamente mayor a 20 °C que a 15 °C

dentro de cada nivel de irradiancia (Fig. 1.6A y C), sugiriendo una mayor resistencia a 20 °C. Sin embargo en el caso de *L. pentagona* los valores umbrales fueron semejantes dentro de cada nivel de irradiancia a las dos temperaturas aplicadas (Fig. 1.6E). Los valores de  $U_d$  (Fig. 1.6B, D y F) fueron significativamente diferentes entre temperaturas para *C. altimanus* (Fig. 1.6B) y para *C. angulatus* (Fig. 1.6D), pero no en el caso de *L. pentagona* (Fig. 1.6F). En cambio, no hubo diferencias en  $U_d$  entre más de dos niveles de irradiancia dentro de cada especie, lo cual sugiere que las larvas empiezan a morir, en general, al recibir aproximadamente la misma dosis. Sin embargo, para *C. altimanus* (Fig.1.6B), el  $U_d$  a 15 y a 20 °C fue significativamente menor a bajos niveles de irradiancia. Esto indica que las larvas de *C. altimanus* empezaron a morir a una dosis más baja comparada con niveles más altos de irradiancia. Esto mismo fue observado en un estudio previo realizado con el rotífero *Asplanchna girodi* y con el cladóceros *Daphnia pulicaria*, donde incubaciones cortas a altos niveles de irradiancia de RUV resultaron menos letales que las exposiciones prolongadas a bajos niveles de irradiancia de RUV (Grad et al. 2001). Estos autores especularon que la tasa teórica de reparación fotoenzimática (PER) no sería constante en animales, los cuales no requieren luz para realizar la fotosíntesis como las plantas, y que pueden utilizar esta energía extra para reparar los daños ocasionados por la exposición a la RUV.



**Figura 1.6:** Valores umbrales de las larvas de las tres especies de cangrejos en función de la irradiancia de RUV-B. Los paneles A, C y E son los valores umbrales expresados en minutos de exposición ( $U_t$ ), mientras los paneles B, D y F son los umbrales ( $U_d$ ) expresados en  $\text{kJ m}^{-2}$ . Los valores son las medias y desvíos estándar ( $n \geq 3$ ). Los asteriscos (\*) sobre las barras indican diferencias significativas en la respuesta entre temperaturas para cada nivel de irradiancia. Las letras en minúscula y mayúscula indican diferencias significativas en la respuesta entre niveles de irradiancia a 15°C y a 20°C respectivamente.

En la mayoría de los experimentos los valores de  $U_d$  fueron similares dentro de una misma temperatura, para cada especie estudiada. Por el contrario, cuando comparamos entre temperaturas en el caso de las dos especies de *Cyrtograpsus*, los valores de  $U_d$  fueron más altos a la temperatura más elevada. Este comportamiento sugiere que actuaron mecanismos de reparación que contrarrestaron el impacto de la RUV-B hasta alcanzar el  $U_d$ , y que el incremento en la temperatura resultó en una reparación más efectiva, lo cual incrementó la

tolerancia de las larvas a longitudes de onda cortas. Este aumento en la supervivencia, hasta un 50% mayor a 20 °C que a 15 °C, es consistente con los resultados encontrados en otros estudios realizados con *Daphnia catawba* y *Leptodiptomus minutus* (Williamson et al. 2002), *Daphnia pulicaria* (MacFadyen et al. 2004), y *Evechinus chloroticus* y *Diadema setosum* (Lamare et al. 2006). Los estudios sugieren un sinergismo entre la temperatura y la tolerancia a la RUV-B que depende de la reparación enzimática. Se sugiere que este mecanismo es principalmente utilizado por organismos que habitan en aguas templadas y tropicales, mientras que la fotoprotección podría ser más efectiva en aguas frías (MacFadyen, 2004).

<i>C. altimanus</i>					
<b>ANOVA 2 factores</b>	SC	g.l.	CM	F	P
intercepto	2003301	1	2003301	51477	0.00
irradiancia	211597	2	105799	2719	0.00
temperatura	37843	1	37843	972	0.00
irradiancia*temperatura	7326	2	3663	94	0.00
error	467	12	39		

<i>C. angulatus</i>					
<b>ANOVA 2 factores</b>	SC	g.l.	CM	F	P
intercepto	1885061	1	1885061	52122	0.00
irradiancia	343661	2	171831	4751	0.00
temperatura	69945	1	69945	1934	0.00
irradiancia*temperatura	16289	2	8145	225	0.00
error	434	12	36		

<i>L. pentagona</i>					
<b>ANOVA 2 factores</b>	SC	g.l.	CM	F	P
intercepto	885834	1	885834	33491	0.00
irradiancia	122359	2	61179	2313	0.00
temperatura	7	1	7	0	0.63
irradiancia*temperatura	188	2	94	4	0.08
error	317	12	26		

**Tabla 1.2:** Tablas de resultados de ANOVA de dos factores para comparar  $U_t$  dentro de cada especie, combinando los factores ambientales irradiancia y temperatura.

<i>C. altimanus</i>					
<b>ANOVA 2 factores</b>	SC	g.l.	CM	F	P
intercepto	10354	1	10354	50509.07	0.00
irradiancia	79	2	40	193.63	0.00
temperatura	232	1	232	1131.37	0.00
irradiancia*temperatura	44	2	22	108.39	0.00
error	2	12	0		

<i>C. angulatus</i>					
<b>ANOVA 2 factores</b>	SC	g.l.	CM	F	P
intercepto	8982	1	8982	38059	0.00
irradiancia	6	2	3	12	0.00
temperatura	324	1	324	1372	0.00
irradiancia*temperatura	3	2	1	6	0.01
error	3	12	0		

<i>L. pentagona</i>					
<b>ANOVA 2 factores</b>	SC	g.l.	CM	F	P
intercepto	4406	1	4406	31285	0.00
irradiancia	6	2	3	23	0.00
temperatura	0	1	0	3	0.10
irradiancia*temperatura	1	2	1	4	0.06
error	2	12	0		

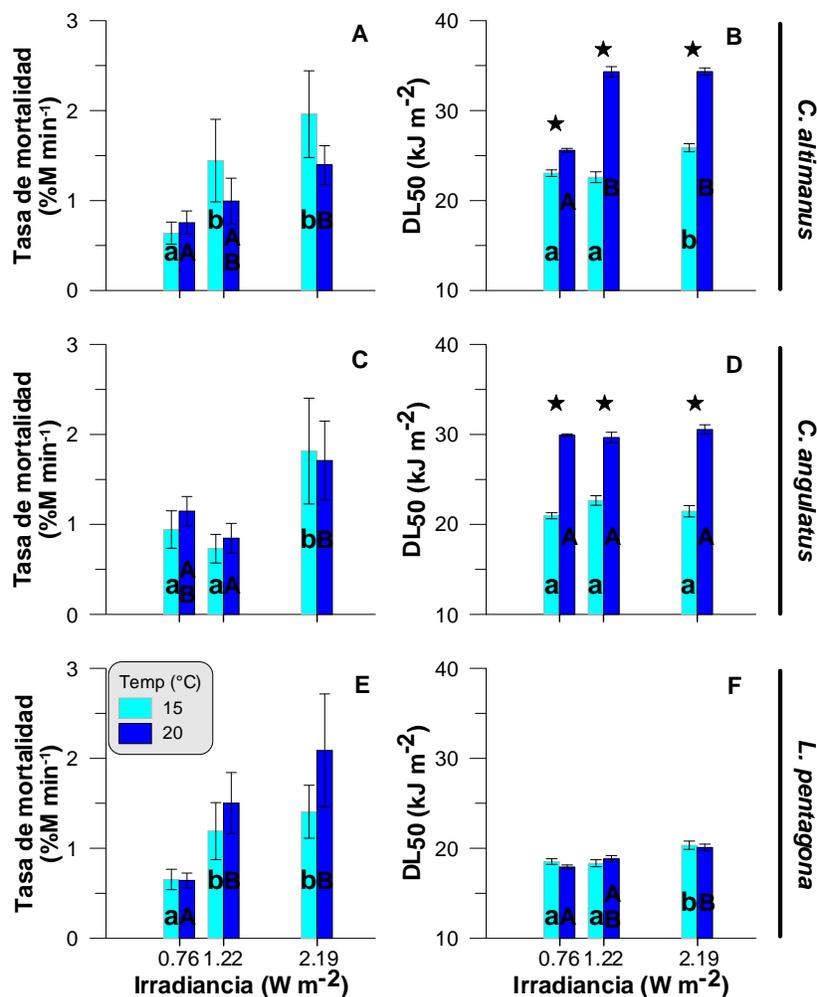
**Tabla 1.3:** Tablas de resultados de ANOVA de dos factores para comparar  $U_d$  dentro de cada especie, combinando los factores ambientales irradiancia y temperatura.

<b>Regresión lineal (<math>H^0: \beta = 0</math>)</b>	$R^2$	g.l.	F	P
<i>C. altimanus</i> 15°C	0.87	1, 7	58.66	0.00
<i>C. altimanus</i> 20°C	0.99	1, 7	2584.34	0.00
<i>C. angulatus</i> 15°C	0.90	1, 7	66.83	0.00
<i>C. angulatus</i> 20°C	0.87	1, 7	47.01	0.00
<i>L. pentagona</i> 15°C	0.91	1, 7	68.60	0.00
<i>L. pentagona</i> 20°C	0.96	1, 7	176.34	0.00

**Tabla 1.4:** Tabla de resultados de Análisis de Regresión Lineal Simple (RLS), para estudiar la relación entre  $U_t$  y la irradiancia de RUV-B aplicada en cada experimento.

### *Tasa de mortalidad (p) y Dosis letal 50% (DL<sub>50</sub>)*

La tasa de mortalidad (i.e., máxima pendiente) aumentó significativamente con la irradiancia en *C. altimanus* (Fig. 1.7A, análisis de RLS,  $R^2 = 0,95$ ,  $F_{(2, 15)} = 11,01$  y  $P < 0,01$ ) y *L. pentagona* (Fig. 1.7E, análisis de RLS,  $R^2 = 0,96$ ,  $F_{(2, 15)} = 12,26$  y  $P < 0,01$ ). No se observaron diferencias significativas en las tasas de mortalidad en *C. angulatus* a 0,76 y a 1,22 W m<sup>-2</sup> (Fig. 1.7C). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre las tasas de mortalidad a estos dos niveles de irradiancia y aquella al nivel de irradiancia más elevado (i.e., 2,19 W m<sup>-2</sup>). En el caso de *C. altimanus* (Fig. 1.7A) y *L. pentagona* (Fig. 1.7E) no se detectaron diferencias significativas entre los niveles de irradiancia de 1,22 Wm<sup>-2</sup> y 2,19 W m<sup>-2</sup>. En las tres especies, no se encontraron diferencias significativas en las tasas de mortalidad entre temperaturas dentro de cada nivel de irradiancia (Tabla 1.5). La DL<sub>50</sub> aumentó significativamente en ambas especies de *Cyrtograpsus* a 20 °C comparado con los valores a 15 °C, para todos los niveles de irradiancia (Fig. 1.7B y 1.7D) (Tabla 1.6). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el DL<sub>50</sub> entre temperaturas en *L. pentagona* (Fig. 1.7F), en ninguno de los niveles de irradiancia. En las tres especies la DL<sub>50</sub> fue similar al U<sub>d</sub> en términos de sus respuestas a la irradiancia y a la temperatura.



**Figura 1.7.** Tasa de mortalidad (% mortalidad min<sup>-1</sup>) y Dosis letal 50% (DL<sub>50</sub>) (en kJ m<sup>-2</sup>) en función de los niveles de irradiancia de RUV-B para *C. altimanus* (A, B), *C. angulatus* (C, D), *L. pentagona* (E, F). Los valores son las medias y desvíos estándar (n ≥ 3). Los asteriscos (\*) sobre las barras indican diferencias significativas en la respuesta entre temperaturas para cada nivel de irradiancia. Las letras en minúscula y mayúscula indican diferencias significativas en la respuesta entre niveles de irradiancia a 15°C y a 20°C, respectivamente.

<i>C. altimanus</i>					
<b>ANOVA 2 factores</b>	SC	g.l.	CM	F	P
intercepto	26	1	26	265	0.00
irradiancia	3	2	1	15	0.00
temperatura	0	1	0	4	0.06
irradiancia*temperatura	0	2	0	2	0.17
error	1	12	0		

<i>C. angulatus</i>					
<b>ANOVA 2 factores</b>	SC	g.l.	CM	F	P
intercepto	26	1	26	235	0.00
irradiancia	3	2	2	14	0.00
temperatura	0	1	0	0	0.66
irradiancia*temperatura	0	2	0	0	0.71
error	1	12	0		

<i>L. pentagona</i>					
<b>ANOVA 2 factores</b>	SC	g.l.	CM	F	P
intercepto	28	1	28	235	0.00
irradiancia	4	2	2	16	0.00
temperatura	0	1	0	4	0.07
irradiancia*temperatura	0	2	0	2	0.26
error	1	12	0		

**Tabla 1.5:** Tabla de resultados de ANOVA de dos factores para comparar la pendiente dentro de cada especie, combinando los factores ambientales irradiancia y temperatura.

<i>C. altimanus</i>					
<b>ANOVA 2 factores</b>	SC	g.l.	CM	F	P
intercepto	13736	1	13736	67006	0.00
irradiancia	107	2	53	261	0.00
temperatura	258	1	258	1260	0.00
irradiancia*temperatura	65	2	33	159	0.00
error	2	12	0		

<i>C. angulatus</i>					
<b>ANOVA 2 factores</b>	SC	g.l.	CM	F	P
intercepto	12044	1	12044	51072	0.00
irradiancia	2	2	1	4	0.06
temperatura	314	1	314	1331	0.00
irradiancia*temperatura	4	2	2	8	0.00
error	3	12	0		

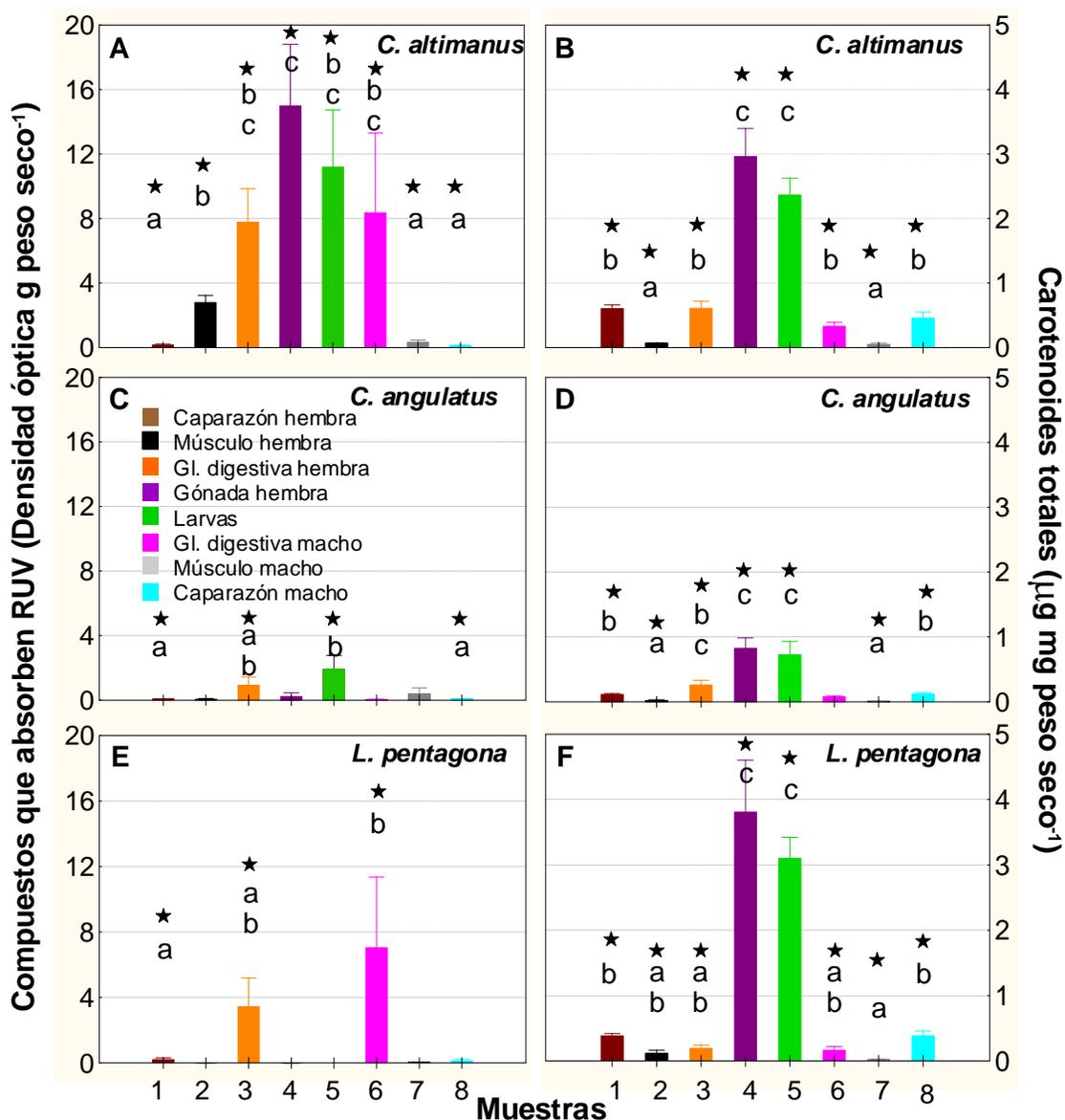
<i>L. pentagona</i>					
<b>ANOVA 2 factores</b>	SC	g.l.	CM	F	P
intercepto	6503	1	6503	50675	0.00
irradiancia	14	2	7	53	0.00
temperatura	0	1	0	0	0.50
irradiancia*temperatura	1	2	0	4	0.05
error	2	12	0		

**Tabla 1.6:** Tabla de resultados de ANOVA de dos factores para comparar DL<sub>50</sub> dentro de cada especie, combinando los factores ambientales irradiancia y temperatura.

### *Compuestos que absorben la RUV (CARUV) y anti-oxidantes (carotenoides)*

Se encuentra ampliamente documentado en la literatura que los compuestos que absorben en RUV, como así también los carotenoides, ayudan a los organismos a enfrentar el estrés producido por el exceso de radiación (Banaszak 2003). Mientras que los CARUV (donde se incluyen los MAAs) protegen directamente a los organismos mediante la absorción y la dispersión de la energía de la RUV, los carotenoides desempeñan una función antioxidante. Estos últimos contrarrestan los efectos de los productos de radicales libres que se generan por exposición a la RUV (Roy 2000; Banaszak 2003). En este estudio, se evaluaron las

concentraciones tanto de los CARUV como de los carotenoides en distintos tejidos de cangrejos adultos y en las larvas. La temporada de eclosión abarca la primavera-verano y el otoño temprano austral. Por este motivo, se contrastaron las diferencias en las concentraciones de los CARUV y carotenoides durante estos períodos mediante la recolección y análisis de compuestos de muestras (i.e., duplicados o triplicados) obtenidas en las tres estaciones. Debido a que no se observaron diferencias significativas entre estaciones en las concentraciones de los CARUV y/o los carotenoides (datos no mostrados), los datos tomados en las distintas estaciones fueron agrupados, para cada tejido / larva /especie. Entonces, las concentraciones de estos compuestos, promediando los datos de las tres estaciones de muestreo, se observan en la Figura 1.8.



**Figura 1.8:** Compuestos que absorben radiación ultravioleta (CARUV) (A, C y E) y carotenoides totales (B, D y F) encontrados en las tres especies usadas en los experimentos. Los valores son las medias y errores estándar (EE) de las muestras (n = 7-9) colectadas de tres periodos diferentes durante la temporada de eclosión y agrupados juntos (explicación en el texto). Los números 1 al 4 sobre el eje X indican tejidos en hembras: el número 5 corresponde a la larva entera, y los números 6 al 8 son tejidos en machos. Los astriscos (\*) sobre las barras indican que la concentración es significativamente distinta de cero. Las letras en minúscula indican diferencias significativas entre tejidos.

Hubo una gran variabilidad en las concentraciones de estos compuestos entre los diferentes tejidos y especies, siendo los carotenoides detectados en todos los tejidos analizados, mientras

que los CARUV se observaron en la mayoría de ellos. Aunque se registraron cantidades significativas de CARUV en algunos tejidos de las tres especies ( $P < 0.05$ ,  $n = 7-9$ ), sólo *C. altimanus* presentó las concentraciones más altas en las gónadas y en las larvas ( $P < 0,05$ , KW-H (1, 57) = 15,56, Fig. 1.8A). Asimismo, las larvas de las dos especies de *Cyrtograpsus* tuvieron concentraciones significativas de CARUV (Fig. 1.8A y C). Sin embargo, en *C. altimanus* la concentración fue significativamente mayor que en *C. angulatus* ( $P < 0.05$ , KW-H (1, 14) = 10.67). No se encontraron diferencias significativas en los CARUV en las larvas obtenidas de adultos que fueron mantenidos a las dos temperaturas experimentales. Similar a lo mencionado anteriormente, no se encontraron diferencias significativas en los CARUV en larvas / adultos obtenidos en los diferentes momentos de la temporada de eclosión, y en consecuencia, a diferentes temperaturas del agua. Esto podría sugerir que la concentración de CARUV en estas tres especies no depende de la temperatura, sino más bien de la dieta de los adultos. De hecho, la relación entre la acumulación de los CARUV respecto de la dieta ha sido determinada en varias especies (Carroll y Shick 1996; Newman et al. 2000; Gonçalves et al. 2002; Helbling et al. 2002a; Moeller et al. 2005). En cambio, los estudios *in situ* realizados con fitoplancton y krill (Riemer et al. 2007) no revelaron una relación temporal de las concentraciones de MAAs entre los organismos: Las concentraciones de MAAs en el fitoplancton fueron generalmente bajas en invierno y altas en verano; sin embargo, su concentración en el krill permaneció relativamente constante durante todo el año. Los resultados de estos autores sugieren que la acumulación de CARUV a través de la dieta puede ser el resultado de una suma de factores tales como la disponibilidad de alimentos ricos en estos compuestos, la selectividad, la bioacumulación, entre otros.

Cuando se observa tanto el  $U_d$  (Fig. 1.6) como la  $DL_{50}$  (Fig. 1.7) de las tres especies estudiadas, los resultados sugieren que las larvas de *C. altimanus* son las más resistentes a la RUV-B. Las concentraciones relativamente más altas de CARUV en las larvas de *C. altimanus* (Fig. 1.8), podría contribuir parcialmente a su relativamente alta resistencia a la RUV-B. Sin embargo, como se mencionó antes, las concentraciones de CARUV no variaron entre las tres estaciones que abarcan el período de eclosión, y por ende, no variaron entre las distintas temperaturas a las que fueron encontrados los cangrejos al momento de ser colectados del ambiente (para más información ver Fig. 1.9). Por lo tanto, las mayores tolerancias a la RUV-B de *C. altimanus* y *C. angulatus* a 20°C se relacionarían con una mayor eficiencia del mecanismo de reparación enzimática

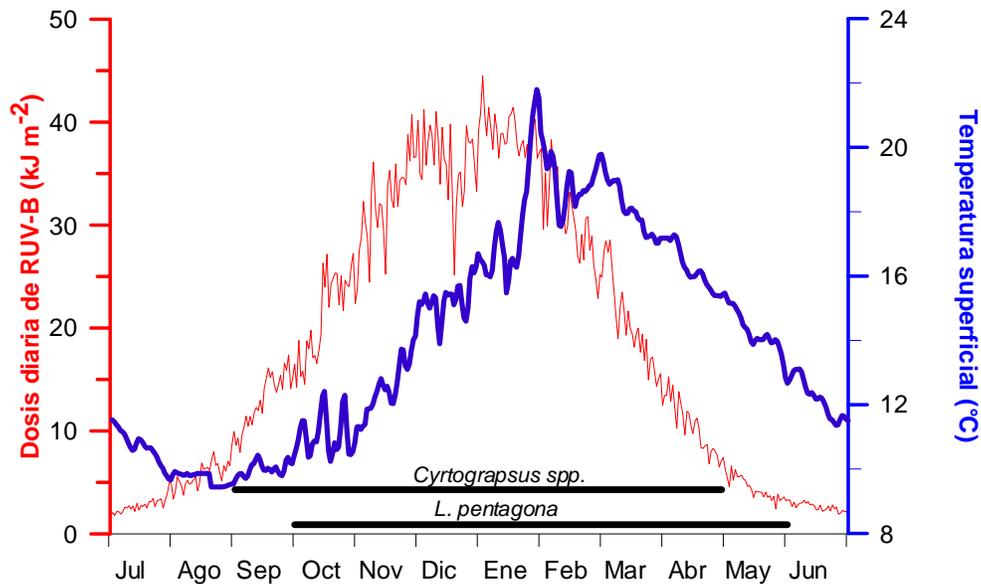
Los carotenoides estuvieron presentes en cantidades significativas dentro de todos los tejidos y larvas en las tres especies. Estos aparecieron en concentraciones significativamente más altas ( $P < 0.05$ ) en las gónadas y en las larvas que en el resto de los tejidos (Figure 1.8B, D y F). La mayor cantidad de carotenoides fue encontrada en *L. pentagona* y la menor en *C. angulatus*. Los carotenoides podrían proveer alguna protección a las larvas; sin embargo, no fue observada una relación clara entre los carotenoides y su resistencia / mortalidad. Estudios previos han determinado que en el copépodo calanoideo *Leptodiptomus minutus* la resistencia a la RUV aumentó 2,5 veces en animales aclimatados a la RUV y ricos en MAA, pero sólo 1,5 veces en aquellos animales aclimatados a la RUV y ricos en compuestos carotenoides (Moeller et al. 2005). Los autores siguieron que los animales bajo estrés por la RUV cambiaron de una acumulación de carotenoides hacia una de MAAs cuando estos últimos estaban disponibles a través de la dieta. Más aún Persaud et al. (2007) compararon la acumulación de MAAs y carotenoides en poblaciones de copépodos calanoideos de varios lagos con diferentes transparencias de RUV. Los autores observaron un cambio desde un contenido alto de carotenoides / bajo en MAAs en primavera, hacia uno bajos en carotenoides / altos en MAAs en verano en calanoideos de lagos transparentes a la RUV. Esto sugiere que un contenido relativamente alto de MAAs brindaría una mayor fotoprotección, cuando los organismos se encuentran en lagos con alta transparencia a la RUV.

Las mayores concentraciones de CARUV y / o carotenoides en gónadas y larvas en las distintas especies, respecto del resto de los tejidos, sugieren un comportamiento de incorporación y transferencia desde los adulto hacia su descendencia. Si es así, estos compuestos son fundamentales para el éxito de las larvas al menos en la primera etapa de vida, relacionado probablemente a los efectos nocivos de la RUV-B. Para corroborar esto, hace falta realizar experimentos de exposición de larvas a la RUV-B, contrastando la resistencia de larvas con altas y con bajas concentraciones en dichos compuestos. Larvas con distintas concentraciones de compuestos fotoprotectores se logran a través de ensayos con dietas ricas y pobres en dichos compuestos. Estos experimentos están desarrollados en el Capítulo 2.

## IMPLICANCIAS ECOLÓGICAS

La temporada de eclosión para las tres especies estudiadas comprende la primavera-verano y principios del otoño. Por eso los adultos y las larvas se encuentran expuestos a condiciones

de temperatura y radiación solar relativamente altas respecto al resto del año (Fig. 1.9). Las dosis diarias de RUV-B solar que alcanzan la superficie del mar varían desde aproximadamente los 2 a 45  $\text{kJ m}^{-2}$ , mientras que la temperatura superficial del agua varía desde aproximadamente 10 a 22  $^{\circ}\text{C}$  en el área de estudio. La irradiancia máxima de RUV-B en superficie en el área puede alcanzar hasta 1,8  $\text{W m}^{-2}$  al mediodía (Villafañe et al. 2004b) la cual es mucho menor a la recibida en áreas tropicales (Gao et al. 2007).



**Figura 1.9:** Dosis diaria de RUV-B (línea roja) y temperatura superficial del agua (línea azul) a lo largo del año en el área de estudio. Las líneas horizontales indican la temporada de eclosión para *Cyrtograpsus spp.* y *L. pentagona*.

La temperatura superficial del mar varía significativamente durante el año, siendo más fría en Agosto y más caliente en Febrero (rango de 10 a 22  $^{\circ}\text{C}$ ). Las condiciones de temperatura de experimentación utilizadas en este trabajo se encuentran dentro de la variabilidad normal en Patagonia, mientras que las condiciones de irradiancia fueron más amplias. De hecho, dos de las condiciones de irradiancia utilizadas en estos experimentos fueron menores y una fue mayor que la mayor irradiancia que se alcanza en superficie en un día estival durante horas del mediodía en la zona. Además, las temperaturas utilizadas representan los dos extremos en los cuales estas larvas se desarrollan *in situ*. En este estudio, se alcanzó el 100% de mortalidad de las larvas en todos los experimentos, combinando niveles de irradiancia y de temperatura, a dosis que fueron menores que las encontradas en el área en superficie.

En la región de la Patagonia, la intensidad de los vientos condiciona fuertemente la profundidad de la capa superficial de mezcla (CSM), que a su vez modula la irradiancia media que reciben los organismos planctónicos (Helbling et al. 1994). Además, la Patagonia se caracteriza por la presencia de fuertes vientos, predominantes del oeste durante la primavera y el verano (Villafañe et al. 2004a). El viento es también importante en la resuspensión de materia particulada (principalmente en áreas costeras) que incrementa la atenuación de la radiación solar en la columna de agua. Como ha sido demostrado en un estudio previo (Helbling et al. 2005) realizado en Bahía Camarones (distante a 250 km del área de estudio), la penetración de la RUV-B al 1 % de la irradiancia que llega a la superficie fue de 3,5 m de profundidad (i.e.,  $K_{UV-B} = 1.27 \text{ m}^{-1}$ ) mientras que la RUV-A y PAR a 7 y 15 m, respectivamente.

Basados en los valores de penetración de la radiación solar en Bahía Camarones, los cuales son representativos del área de estudio, se calcularon la irradiancia / dosis de RUV-B en la columna de agua y se compararon con los parámetros obtenidos de los ajustes sigmoideos (Fig.1.5). Por ejemplo, la irradiancia intermedia de  $1,22 \text{ W m}^{-2}$  se encontraría a  $< 32 \text{ cm}$  de profundidad durante el mediodía, cuando la irradiancia medida en la superficie es de  $1,8 \text{ W m}^{-2}$ ; en el caso de la irradiancia de  $0,76 \text{ W m}^{-2}$ , podría encontrarse a una profundidad  $< 68 \text{ cm}$ . Basados en estos valores, el  $U_d$  podría ser alcanzado después de 5 horas en el caso de *L. pentagona*, y después de las 6,5-10 horas para *Cyrtograpsus* spp., dependiendo de la temperatura del agua. Sin embargo, tanto las larvas como el resto del plancton se encuentran en movimiento en la columna de agua, y no estáticas a una profundidad fija (Alonso et al. 2004; Queiroga y Blanton 2005). Además, las intensidades de radiación no son fijas en el ambiente natural ya que alcanzan un máximo cuando el sol está en su zenit (mediodía) y luego disminuye paulatinamente hasta el ocaso. Es por todo ello que se necesita también tener en cuenta la profundidad de distribución de las especies y la intensidad de luz a lo largo del día, para poder inferir el grado de estrés causado por la radiación solar.

En un estudio realizado en aguas del Golfo Nuevo sobre la distribución espacial de las larvas de varias especies de cangrejos (Dellatorre 2009), las larvas de *L. pentagona* fueron encontradas en zonas costeras durante todo el ciclo anual, principalmente en aguas superficiales durante la noche y en estratos más profundos durante el día. En forma similar a lo que sucede con *L. pentagona*, las larvas de las especies del género *Cyrtograpsus* se hallaron concentradas durante el día principalmente alrededor de los 30 m de profundidad

(aproximadamente coincidiendo con la termoclina), aunque una pequeña proporción fue también observada en estratos superficiales. Durante la noche, en sitios someros (profundidad del fondo no mayor a 35 m) éstas estuvieron distribuidas homogéneamente en toda la columna y en sitios más profundos (80 m de profundidad del fondo) sólo se concentraron cerca de la superficie (Dellatorre, 2009). Asimismo, las mayores densidades de Zoea de *P. chubutensis* se encontraron principalmente en estratos intermedios (10 y 30 m) durante el día y, en contraste con las otras especies, a mayores profundidades ( $\geq 30$  m) durante la noche (Dellatorre, 2009). La alternancia entre estratos superficiales durante la noche y estratos medios o profundos durante el día, podría permitir a las larvas de algunas de estas especies evitar el encuentro con los predadores visuales cerca de la superficie durante el día (Forward, 2009) y / o evitar la exposición a la RUV. Respecto a las larvas de *L. spinosa* no se tienen datos respecto a su presencia en los distintos estratos de la columna de agua. Por su alta sensibilidad a la RUV-B, se puede suponer que las mismas se comportan en forma similar a *L. pentagona* o *P. chubutensis* en cuanto a que se hallan virtualmente ausentes de los estratos superficiales durante el día, sea por adaptación antipredatoria (predadores visuales), por evasión a radiaciones perjudiciales, o una combinación de ambos factores. Vale destacar que las Zoea I de las larvas de las dos especies del género *Cyrtograpsus*, las que presentan mayor resistencia al efecto de la exposición a RUV-B, fueron las únicas halladas en estratos superficiales durante el día, aunque en pequeña proporción (Dellatorre, 2009).

Cuando existen condiciones de flujo estratificado (i.e., la dirección y velocidad de los estratos de la columna de agua difieren entre sí) las larvas pueden realizar navegaciones parciales (Kingsford et al. 2002) ajustando su posición vertical y concentrándose en estratos específicos mediante natación activa (Young 1995). Dependiendo de las condiciones ambientales (dirección del viento y de las corrientes) y del patrón de distribución espacial que maximice su supervivencia, las larvas deberán eventualmente permanecer cerca de la superficie para ser retenidas / advectadas desde/hacia la costa, resultando expuestas a las componentes espectrales de la radiación solar (Damkaer et al., 1980; Epifanio, 1988; MartaAlmeida et al., 2006).

En el caso de las larvas de *Cyrtograpsus spp.*, parece que un proceso de deriva larvaria explicaría la ausencia de los estadios intermedios en zonas costeras. Los adultos de estas especies se encuentran normalmente en lugares donde reciben altos niveles de radiación solar, tales como las zonas poco profundas de los submareales y los intermareales (Spivak 1997).

Las larvas de *Cyrtograpsus* spp., parecen ser transportadas por advección lejos de la zona costera donde la presión de predación es alta, y retornan a sitios costeros cuando se encuentran en la fase de Megalopa, dado que los primeros dos estadios de Zoea y la Megalopa sólo fueron encontradas en la zona costera, mientras los restantes tres estadios larvales ZIII, ZIV y ZV se encontraron lejos de la misma (Dellatorre 2009). Si las larvas de *Cyrtograpsus* spp son transportadas hacia aguas alejadas de la costa, esto debe realizarse seguramente en aguas bien superficiales, donde las corrientes forzadas por los vientos predominantes del cuadrante SO, tienen una dirección predominante hacia el NE (Palma 2008), y donde la influencia de la radiación solar sería considerable ya que se encontrarían en la llamada “zona fotoactiva”. Se entiende por definición (Neale et al. 2003) que la zona fotoactiva es la porción de la columna de agua hasta donde llega el 10% de la RUV-B incidente en la superficie. Por otro lado, y ya que no se tienen datos de penetración de la radiación en el área de estudio, se tomó como referencia al trabajo de Smith et al. (1979), donde la RUV-B puede ser detectable hasta 40 m de profundidad en las aguas más claras estudiadas. Teniendo en cuenta estos dos trabajos, se puede decir que el 10% de RUV-B que llega a la superficie en nuestras aguas puede alcanzar no más de 4 m de profundidad, y ésta sería nuestra zona fotoactiva a la que consideramos como aguas superficiales.

No se sabe, sin embargo, si hay algún cambio en la sensibilidad de las larvas a lo largo de su desarrollo en los distintos estadios. Considerando que las larvas cambian su comportamiento durante el desarrollo respecto a la alimentación, distribución en la columna, y / o hábitat (somero o alejado de la costa), también podríamos esperar que las larvas tengan distintas sensibilidades a la RUV-B a lo largo de su desarrollo. Este tema está contemplado en el próximo capítulo, trabajando con larvas de *Cyrtograpsus* spp. obtenidas del ambiente.

Las larvas que permanecen en aguas costeras podrían estar expuestas a menor radiación que en aguas de mar abierto como resultado de la turbiedad diferencial (i.e., la turbidez es mayor en áreas costeras). A pesar del hecho que las larvas *in situ* parecen recibir una dosis que es menor al  $U_d$  de RUV-B calculado (y que por eso sólo podría esperarse una mortalidad pequeña) hay que tener en cuenta que los niveles ambientales de RUV-B pueden incrementarse como resultado del cambio climático (Häder et al. 2007). Más aún, también deben considerarse otros efectos indirectos de la RUV, tales como los cambios en las interacciones de las cadenas tróficas, que pueden ejercer un efecto mayor que los efectos directos en organismos individuales en cualquiera de los niveles tróficos. Además, han sido

descriptos efectos subletales de la RUV tales como la disminución de la tasa de crecimiento en larvas de bacalao (Lesser et al. 2001), el aumento de la tasa respiratoria en *Daphnia catawba* (Fischer et al. 2006), o el alto consumo de oxígeno y de la actividad de natación que ocurre en juveniles de truchas arco iris (Alemanni et al., 2003). Los efectos subletales podrían ocurrir a dosis bajas y por eso no se consideraron en estos experimentos de supervivencia, pero son estudiados en detalle en el Capítulo 3.

## CONCLUSIONES

Por un lado, se adquirió conocimiento acerca del efecto combinado de la RUV y la temperatura en tres especies de cangrejos de aguas Patagónicas, los cuales han sido poco estudiados en un contexto de cambio global. Por otro lado, se ha podido especular acerca de las potenciales implicancias de estos factores de estrés en larvas de diferentes especies de cangrejo características del área. Los datos también sugieren una gran variabilidad entre especies, no sólo en relación a su capacidad de aclimatación (i.e., cantidad y distribución dentro del cuerpo de compuestos protectores) sino también en cuanto a su respuesta a los efectos combinados de la RUV y la temperatura. Algunas de estas respuestas podrían estar parcialmente relacionadas con su hábitat y con la cantidad de radiación recibida. Las larvas de *Cyrtograpsus spp.* son las más resistentes a la RUV-B, debido seguramente a que se encuentran tanto ellas como los adultos más expuestos a dicha variable, por lo que han desarrollado mecanismos efectivos para soportar las condiciones ambientales fluctuantes de aguas próximas a la superficie. Por el contrario, las larvas y adultos de *L. pentagona* se mantienen poco expuestas a la radiación durante el día, por lo que sus larvas son menos resistentes debido seguramente a que tendrían mecanismos menos desarrollados para contrarrestar los efectos de la RUV-B, o incluso nulos.

La ausencia de diferencias interestacionales sugiere que otros mecanismos, más que la simple aclimatación a bajas y altas irradiancias, podría estar concomitantemente. Uno de estos mecanismos parece ser la presencia de CARUV y carotenoides, cuyas concentraciones dentro de los tejidos parecen estar más relacionadas a la dieta que a las condiciones de irradiancia. Otro mecanismo, como sugiere la mayor tolerancia a la RUV-B a mayores temperaturas en algunas de las especies, es la actividad de enzimas de reparación que parecen aumentar su actividad cuando hay un aumento de la temperatura. Sin embargo, mientras que este último mecanismo parece ser importante en larvas de *Cyrtograpsus*, parecería ser muy débil e

independiente de la temperatura en las larvas de *L. pentagona*. En general, estos resultados sugieren que *C. altimanus* es la especie más resistente a la RUV-B como resultado de mecanismos de reparación bien desarrollados como así también de la presencia de compuestos protectores. La RUV-B no sólo afectaría la supervivencia de estas especies sino también que condicionaría su distribución en la columna del agua. De las tres especies, sólo las larvas de *Cyrtograpsus* tuvieron un incremento significativo en la  $DL_{50}$  con un incremento en la temperatura, sugiriendo que estas especies podrían estar mejor adaptadas para tener éxito bajo un eventual aumento de la temperatura debido al cambio climático. El futuro de otras especies zooplanctónicas en el caso de un incremento en la temperatura, o con respecto a potenciales cambios en el comportamiento de todas las especies (i.e., natación hacia zonas más profundas, distribución hacia aguas más turbias, etc.) así como de cualquier potencial efecto subletal, continúan siendo desconocidos.

## ***CAPÍTULO 2***

***Sensibilidad de larvas de *Cyrtograpsus altimanus* a la RUV-B en función de la bioacumulación compuestos que absorben la RUV***

## INTRODUCCIÓN

Los organismos acuáticos poseen mecanismos para disminuir o evitar los efectos negativos que puede ocasionar la RUV. Mientras que la forma más sencilla es la evasión mediante migraciones verticales hacia aguas más profundas o la protección debajo de mantos de algas o piedras en horas de altas irradiancias (Roy 2000) hay muchos organismos que permanecen regularmente expuestos por diferentes motivos adaptativos. Para estos, una de las formas más eficaces para protegerse de la RUV es la adquisición de compuestos fotoprotectores. Los compuestos fotoprotectores más comúnmente hallados son los carotenoides, que actúan como antioxidantes, y los aminoácidos tipo micosporinas (MAAs, *mycosporine like aminoacids*) que tienen su máximo de absorción entre los 310 y 360 nm cumpliendo la función de “escudos” solares (Banaszak 2003).

Los MAAs son producidos a través de la ruta metabólica del ácido shikímico (Shick y Dunlap, 2002). Esta ruta metabólica se encuentra en bacterias, hongos y algas (Sommaruga y García-Pichel, 1999; Shick y Dunlap, 2002; Libkind et al. 2004), mientras que el resto de los organismos pueden adquirirlo solamente por medio de su dieta (Carroll y Shick, 1996; Newman et al, 2000; Moeller et al, 2005), o también por la presencia de organismos endosimbiontes unicelulares autótrofos (Banaszak et al. 2000; Shick y Dunlap 2002). Para que estos compuestos cumplan su función fotoprotectora, deberían estar distribuido en tejidos específicos como se ha demostrado comparando juveniles y adultos de varias especies del género *Daphnia*, donde las especies más resistentes a la RUV y las de distribución más cercana a la superficie durante el día en su ambiente natural, eran las que contenían mayores concentraciones de carotenoides en sus exuvias (Rhode et al, 2001).

En el Capítulo 1 de esta Tesis se demostró, por análisis espectrofotométricos, que existen compuestos potencialmente fotoprotectores en concentraciones diferenciales en tejidos de adultos y en larvas de tres especies de cangrejos. Mientras que las mayores concentraciones de carotenoides fueron encontrados en las gónadas de adultos y en las larvas de las tres especies, los CARUV sólo se encontraron en concentraciones elevadas en gónadas y en larvas de *C. altimanus*. De hecho, las larvas de *C. altimanus* resultaron ser las más resistentes a los efectos letales (al menos en términos de mortalidad) de la RUV-B, lo cual podría responder a los elevados contenidos de CARUV presentes en sus tejidos (Capítulo 1). En este sentido, se

ha demostrado en un copépodo calanoideo de agua dulce que los MAAs son más importantes como protectores que los carotenoides (Moeller et al. 2005). En contraste, en lagos de altura del Himalaya se ha encontrado que los carotenoides son los predominantes en todos los organismos planctónicos estudiados, y se ha propuesto que esto es debido a que las bajas concentraciones de nitrógeno que se encuentran en estos lagos de altura no permiten que los organismos fotosintetizadores puedan producir MAAs. Entonces, los organismos adaptados a estos ambientes de altura dependerían mayormente de los compuestos carotenoideos para mitigar los efectos de la radiación (Sommaruga 2010). También hay estudios en la costa de Irlanda del efecto protector de la pigmentación en el copépodo *Tigriopus brevicornis* (Davenport et al. 2004), en el cual la astaxantina (pigmento correspondiente al grupo de los carotenos que les confiere el color anaranjado) actuaría como protección no sólo en verano sino durante todo el año. Dicho pigmento es adquirido a través de la dieta (en este caso, *Enteromorpha sp.*, fitoplancton y diatomeas bentónicas) y les confiere mayor supervivencia al ser expuestos a RUV. Por otro lado, que los organismos zooplanctónicos tengan pigmentos como los carotenoides, puede ser también perjudicial ya que aumenta el riesgo de ser vistos principalmente por peces planctívoros. En este sentido, el trabajo de Morgan y Christy (1996) sobre la supervivencia de larvas de 4 especies de cangrejos bajo los efectos combinados de la radiación con predadores, sugiere que las larvas con mayor pigmentación tendrían una mayor supervivencia a la RUV sin un incremento significativo de su visibilidad para los peces.

En nuestro caso, las mayores concentraciones de CARUV en gónadas y larvas, respecto del resto de los tejidos de *C. altimanus*, sugieren un “direccionamiento” de dichos compuestos hacia los tejidos gonadales y su posterior transferencia a los embriones y las larvas. Esto podría ser un comportamiento adaptativo de la especie para que tanto los embriones como las larvas puedan soportar niveles elevados de RUV. Por un lado, los embriones de estos cangrejos que habitan los intermareales pueden estar en contacto con elevados niveles de radiación, especialmente en la etapa final de desarrollo cuando las hembras realizan una ventilación frecuente del pleon, abriendo y cerrando el mismo, para llevar oxígeno a los embriones. Por otro lado, estas larvas también quedarían expuestas a radiaciones nocivas durante el período de dispersión hacia sitios más propicios para su desarrollo, ayudadas por las corrientes superficiales, como ha sido sugerido por Dellatorre (2009). Este tipo de comportamiento de direccionamiento ha sido observado previamente en un erizo (Adams et al. 1994) y en un isópodo marino (Helbling et al. 2002a). En ambos casos, se alimentaron previamente los organismos con dietas ricas y pobres en CARUV. El primer objetivo de este

Capítulo es entonces determinar si la bioacumulación de CARUV depende de la dieta y si su acumulación en larvas resulta en una disminución de la mortalidad al ser expuestas a la RUV-B (Hipótesis 4).

En el Capítulo 1 se trabajó con larvas en el primer estadio de crecimiento (Zoea I) que son naturalmente las más abundantes y que representan la base de la pirámide de la población larvaria, superando en órdenes de magnitud la abundancia de estadios más avanzados en la zona de estudio (Dellatorre, 2009). Las Zoea I son de fácil obtención a partir de hembras ovígeras y en general los estadios más tempranos (i.e., más pequeños) suelen ser más susceptibles a la RUV que los estadios más tardíos de desarrollo. Esto sugiere que la talla / estadio podrían explicar en gran medida la supervivencia y el crecimiento de las larvas en esta etapa crítica. También se han demostrado diferencias en la supervivencia de caracoles pulmonados *Physella* según su tamaño, donde los de pequeño tamaño se ven significativamente perjudicados por una dosis de RUV-B a la cual los individuos de tamaño mediano y grande no resultan afectados (McNamara y Hill 1999). Asimismo, se ha observado mayor supervivencia a mayor tamaño en algunas especies de copépodos calanoideos y ciclopoideos y en insectos (Leech y Williamson 2000). Cabe aclarar que la relación talla / resistencia a la RUV parece ser directamente proporcional sólo dentro de cada especie en particular, mientras que esta relación no se mantiene cuando se comparan distintas especies, ya que en este caso actuarían los mecanismos de adaptación particulares de cada especie (Olson y Mitchell 2006). Por lo tanto, el segundo objetivo de este Capítulo es determinar si las larvas de estadios más tempranos de *C. altimanus* son más susceptibles a la RUV-B que las de estadios más desarrollados (Hipótesis 2).

## MATERIALES Y MÉTODOS

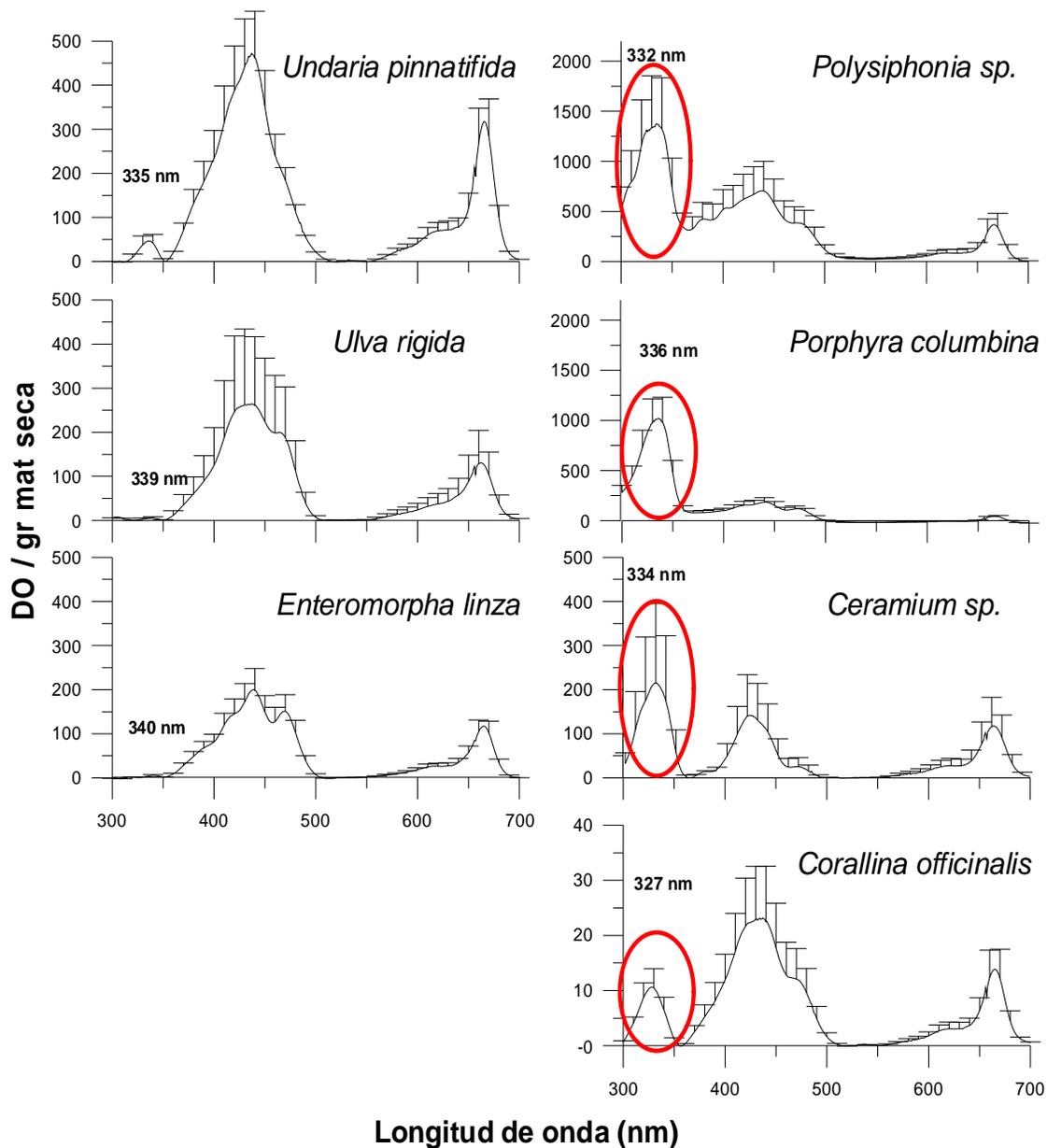
### *Ensayos de bioacumulación*

Los ensayos de bioacumulación de compuestos fotoprotectores en las larvas se realizaron de dos formas: 1) Indirectamente, alimentando las hembras adultas de *Cyrtograpsus altimanus* para que sean bioacumulados posteriormente en sus gónadas, embriones y finalmente larvas, y 2) Directamente, sobre las larvas recientemente liberadas para que sean bioacumuladas a través de la dieta.

### 1) Alimentación en adultos:

Se alimentó a hembras adultas con dietas conteniendo diferentes concentraciones de CARUV con el fin de que estos fueran transferidos como sustancias de reserva a las larvas. Para tal fin, se colocaron especímenes en acuarios de experimentación en donde recibieron las diferentes dietas. Luego se tomaron especímenes de cada acuario (muestreo por triplicado) para analizar el contenido y concentración de CARUV (por técnicas espectrofotométricas) en diferentes partes del cuerpo (principalmente glándulas digestivas, gónadas, músculo y embriones en hembras ovígeras). También se analizaron las concentraciones de los CARUV en larvas provenientes de hembras alimentadas con las distintas dietas. Cabe aclarar que, para realizar los análisis espectrofotométricos de tejidos, fueron seleccionadas hembras que se encontraban en la fase final de desarrollo embrionario. Esto es porque los embriones en la fase final de su desarrollo tendrían concentraciones comparables de CARUV a las encontradas en las larvas liberadas posteriormente.

Se utilizó como alimento base de las condiciones de alimentación de adultos el músculo de merluza (*Merluccius hubbsi*). El músculo de merluza fue analizado por espectrofotometría previamente y se comprobó que no tiene absorción en la porción del espectro correspondiente al RUV ni en la porción visible (PAR). Por otro lado, se colectaron distintas especies de macroalgas que habitan en la zona intermareal en la zona de estudio para verificar los contenidos de CARUV y definir cuál de ellas sería suministrada a los adultos como condiciones de alimentación (Fig. 2.1).



**Figura 2.1:** Espectros de absorción de los extractos de macroalgas encontradas en el intermareal rocoso de Punta Cuevas, de donde fueron obtenidos los ejemplares adultos de *C. altimanus*. Con elipses rojas se señalan los elevados picos de absorción de las macroalgas rojas en la porción de longitud de onda del RUV.

Como fue documentado previamente por otros autores (Hoyer et al. 2002; Misonou et al. 2003) y como se observa en los espectros de algas del intermareal, las algas rojas (Rhodophytas) son las que sintetizan y concentran mayores cantidades de MAAs en sus tejidos (principalmente *Porphyra columbina* y *Polysiphonia sp.*).

Los dos tipos de alimentación suministrados a los adultos de *C. altimanus* fueron:

- a. Músculo de merluza sólo (i.e., condición sin algas).
- b. Músculo de merluza + alga roja (*Porphyra columbina*).

Se colocaron 15 machos y 30 hembras adultas preovígeras (inicio del experimento a mediados de Julio de 2009) en dos acuarios. Los machos fueron agregados para permitir la copula de las hembras entre desoves. Las hembras son preovígeras (o prontas al desove) ya que en esta especie la aparición de los embriones es durante el mes de agosto (observaciones personales). Para asegurar que los compuestos presentes en los alimentos suministrados sean acumulados y transferidos desde las gónadas a los embriones durante la vitelogénesis, las larvas correspondientes al primer desove no fueron utilizadas y se mantuvieron los adultos hasta alcanzar el segundo desove. Con las larvas correspondientes al segundo desove se realizaron los experimentos posteriores de exposición y análisis de compuestos. Los acuarios de alimentación consistieron en contenedores de plástico de 40 x 60 x 20 cm (ancho x largo x profundidad) que se llenaron a la mitad de agua de mar (aprox. 24 l) y se mantuvieron con aireación y fotoperíodo de 12h: 12h luz: oscuridad (i.e., dos lámparas incandescentes luz día de 40 W de potencia cada una) en una cámara de cultivo Minicella (marca Friolatina) a 15 °C.

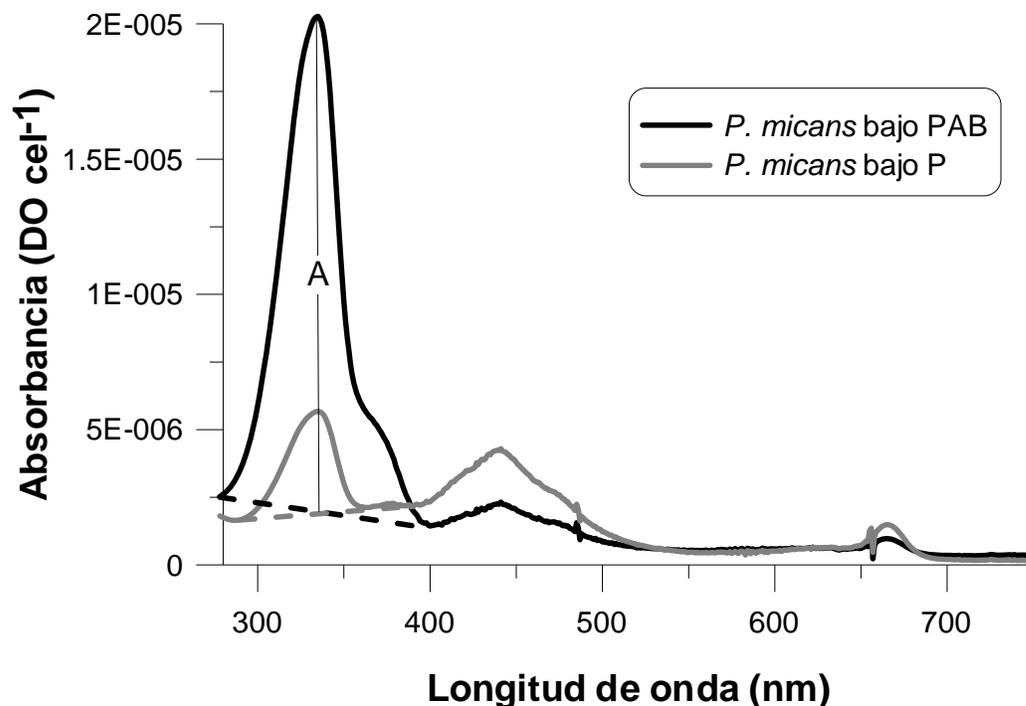
El alimento común para ambos tratamientos fue la carne de pescado. Con el objetivo de que ingieran también *P. columbina* en uno de los tratamientos, sólo se les suministró pescado *ad libitum* una vez por semana en ambos acuarios, mientras que las macroalgas permanecieron dentro de uno de los acuarios durante todo el período de alimentación. Las macroalgas fueron renovadas cada dos semanas con la finalidad de contar siempre con algas en concentraciones naturales de MAAs (i.e., concentraciones elevadas). Luego de 24 horas de suministrado el pescado, fue extraído de los dos contenedores y el agua fue renovada parcialmente sifoneando el fondo de los acuarios con el fin de extraer todos los desechos posibles producidos por los cangrejos y evitar la proliferación de agentes patógenos.

## 2) Alimentación en larvas:

Las larvas de *C. altimanus* utilizadas en esta sección provinieron de hembras recientemente extraídas del ambiente, sin un tratamiento previo de alimentación en el acuario. Se eligió como alimento para las larvas aisladas tras la eclosión al dinoflagelado *Prorocentrum micans*,

debido a sus contenidos elevados de MAAs y a que es una especie que aumenta la síntesis de dichos compuestos por exposición a la RUV (Marcoval et al. 2007). Entonces, el cultivo inicial de *P. micans* fue dividido en dos subcultivos de concentraciones iguales (i.e., cantidad de células) y mantenidos por 6 días bajo dos tratamientos de radiación (i.e., PAB y P) en una cámara iluminada Sanyo a 15 °C y fotoperíodo 12h: 12h luz: oscuridad, con una irradiancia de RUV-B de 0,15 W m<sup>-2</sup> y PAR de 11.8 W m<sup>-2</sup>. De esta forma se obtuvieron dos cultivos de la misma especie con distintas concentraciones de CARUV, que fueron utilizados para alimentar las larvas.

En la Figura 2.2 se presentan las características espectrales de los cultivos de *P. micans* sometidos a los dos tratamientos de radiación. Como resultado de los tratamientos, se produjo un aumento en la síntesis de CARUV en el cultivo sometido al tratamiento PAB comparado con el que sólo estaba bajo el tratamiento P (~ 5 veces mayor). Estos dos cultivos con concentraciones muy distintas de los compuestos de interés fueron los utilizados para alimentar las larvas recién liberadas, colectadas de hembras sin tratamiento previo de alimentación.



**Figura 2.2:** Espectros de absorción de extractos de dos cultivos de *P. micans*, mantenidos por 6 días bajo dos condiciones de radiación artificial (espectro color negro: tratamiento PAB;

espectro color gris: tratamiento P. Las líneas punteadas indican las líneas de base a partir de las cuales se calcularon las alturas (A) de los picos.

Para corroborar que el alimento ofrecido fue ingerido por las larvas, se realizaron pruebas de alimentación larvaria y se observaron tasas de ingestión de  $\sim 400-700$  células  $\text{día}^{-1}$  larva $^{-1}$ . Entonces las larvas (300 individuos) fueron colocadas en dos recipientes de Plexiglas de 1 l de capacidad con 500 ml de agua de mar autoclavada con los dos tipos de alimentos:

- a. *P. micans* con concentraciones bajas de CARUV
- b. *P. micans* con concentraciones altas (i.e., enriquecido) de CARUV

Los recipientes contenían concentraciones iguales de alimento ( $5000 \text{ cel ml}^{-1}$ ), renovándose con cada recambio de agua cada dos días. Con cada recambio también fueron extraídas 20 larvas para determinar sus concentraciones de CARUV por espectrofotometría.

### 3) Cromatografía líquida de alta precisión

Adicionalmente, se analizaron tejidos y larvas selectas de *C. altimanus* mediante HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) para determinar los contenidos de CARUV.

Básicamente, las muestras liofilizadas fueron extraídas en metanol acuoso al 25%, sonicadas y luego clarificadas por filtración (GF/F). Luego, alícuotas de 300  $\mu\text{l}$  fueron inyectadas en un cromatógrafo (Äktabasic; Amersham<sup>®</sup>, para mayor información ver García et al. 2010). Las muestras fueron corridas con una fase móvil de ácido acético al 1% en MeOH al 25 % (vol:vol) y una tasa de flujo de  $0.79 \text{ ml min}^{-1}$ . Los picos de absorción fueron determinados por su tiempo de retención y su longitud de onda de máxima absorción (i.e. 310, 332, 334 nm) y comparados con estándares disponibles en el Instituto de Investigaciones Biotecnológicas - Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH-UNSAM-CONICET).

### *Experimentos para determinar la mortalidad larvaria*

Las larvas obtenidas bajo condiciones diferenciales de dieta (i.e., larvas de adultos pretratados o larvas pretratadas con distintas dietas), fueron utilizadas en dos experimentos de exposición a la RUV en el simulador solar Hönle mediante la metodología descripta previamente

(Capítulo 1). Se realizaron dos tratamientos de radiación: PAB (PAR+RUV) y P (PAR, control). Finalmente se calcularon las dosis umbrales ( $U_d$ ) y letales al 50% ( $DL_{50}$ ) en larvas con altos y bajos contenidos en CARUV.

### *Sensibilidad a la RUV-B en distintos estadios larvarios*

A fin de determinar la sensibilidad a la RUV-B de distintos estadios larvarios (Hipótesis 2), se obtuvieron larvas directamente del ambiente por medio de una red de plancton de 200  $\mu\text{m}$  y diámetro de boca de 40 cm. Se realizaron arrastres de 10 minutos a velocidades de 2 nudos aproximadamente en aguas costeras de la playa Cerro Avanzado (ver Fig. 2.2) de manera de obtener cantidades suficientes de larvas de *Cyrtograpsus* para realizar los experimentos de exposición a la radiación. Cabe aclarar que la identificación y diferenciación entre larvas de *C. altimanus* y *C. angulatus* se debe realizar diseccionando los individuos, y esto no fue realizado en este trabajo; es por ello que los resultados se mencionan como efectos de la RUV-B sobre larvas de distintos estadios de *Cyrtograpsus spp.*, sin diferenciación en especie. La temperatura del agua durante este muestreo fue de 18 °C, por lo que el experimento de exposición se realizó a esta temperatura ( $\pm 1$  °C) y a una irradiancia de 1,22  $\text{W m}^{-2}$  de RUV-B. Los tratamientos de radiación fueron PAB y P (i.e., utilizando filtros para generar las condiciones de irradiancia, ver Capítulo 1), por triplicado, bajo el simulador solar Hönle. Para ello, se colocaron al azar  $\sim 20$  larvas de distintos estadios en cada uno de los recipientes de exposición (i.e., 6 recipientes, 3 por tratamiento). Los 6 recipientes fueron dispuestos bajo el simulador al mismo tiempo, dentro de un contenedor con agua a 18 °C para mantener estable la temperatura de los recipientes. Los mismos fueron colocados al azar dentro del contenedor. El procedimiento fue extraer de a tres los recipientes del simulador solar cada 1 hora, contar y extraer los individuos muertos, y devolver los recipientes bajo el simulador para continuar el experimento de exposición. Los individuos muertos en cada etapa de muestreo fueron fijados con formol al 5% para la posterior inspección de los estadios larvarios bajo lupa. Los estadios larvales se determinaron contando el número de sedas plumosas presentes en el exopodito del segundo par de maxilipedios; por ejemplo, los primeros tres estadios larvales (Zoea I, II y III) tienen 4, 6 y 8 sedas, respectivamente (Scelzo y Lichtschein de Bastida 1979; Rieger y Ramos Vieira 1997). Debido al bajo número de individuos encontrado en los estadios avanzados (i.e., ZIV y ZV), no se realizó una discriminación de los mismos, agrupándolos simplemente como “estadios avanzados”.

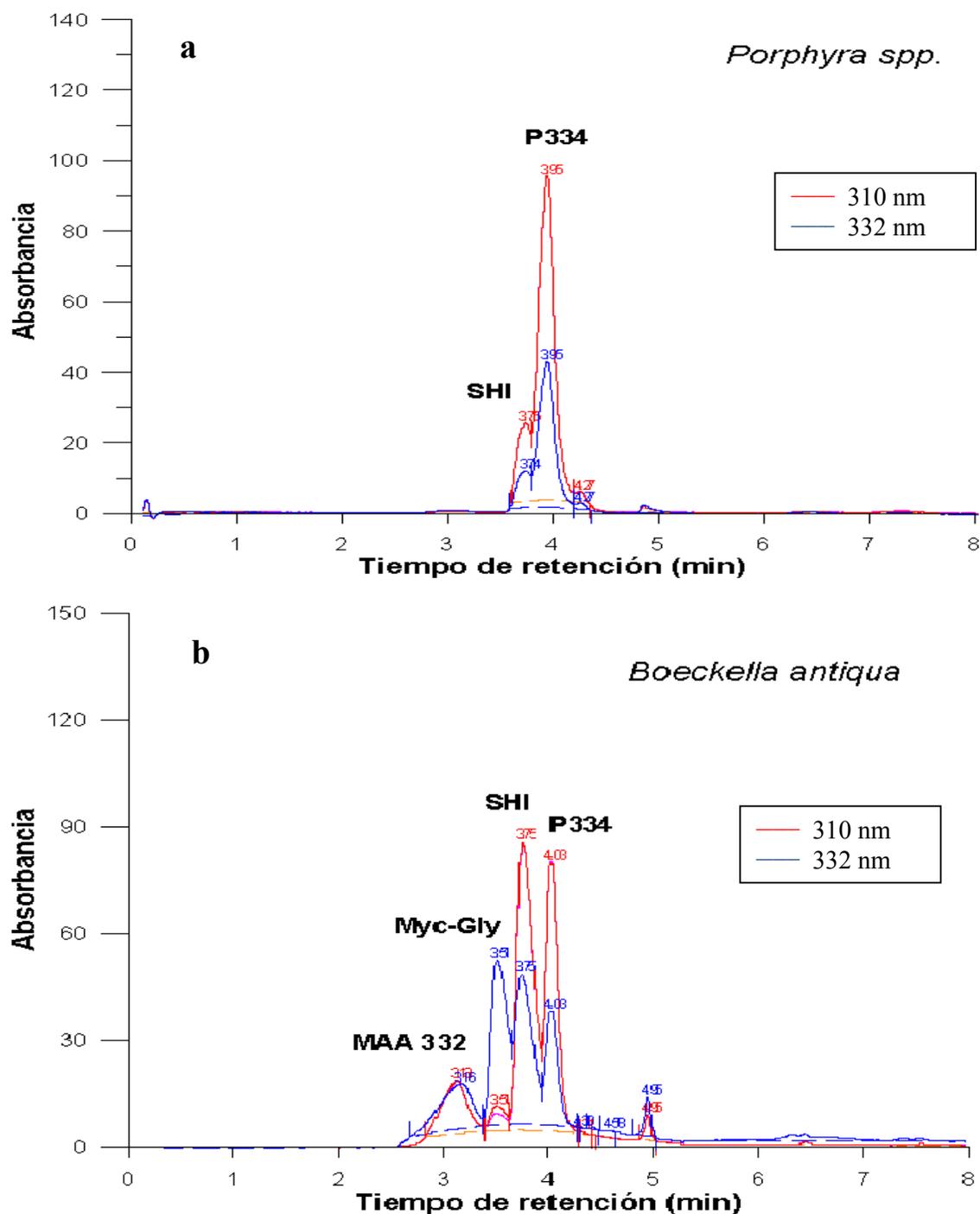
### *Análisis estadístico*

Se utilizó ANOVA de un factor para estudiar el efecto de la dieta con distintas concentraciones de CARUV sobre las concentraciones de CARUV en los tejidos y en las larvas por separado, así como entre los valores umbral de exposición (U) y letalidad al 50% (L<sub>50</sub>) de larvas con concentraciones contrastantes de dichos compuestos. También se usó esta prueba para contrastar diferencias de mortalidad entre distintos estadios larvales (Zar 1999). La significancia estadística fue fijada al 5%.

## RESULTADOS

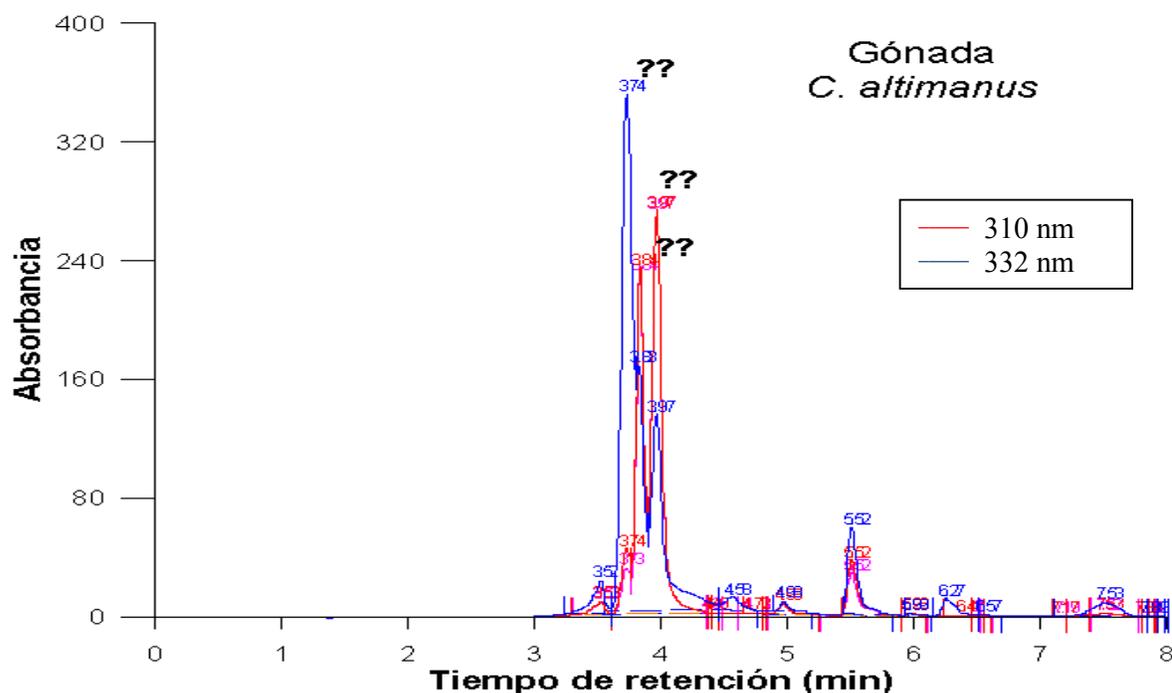
### *Identificación de compuestos que absorben RUV (CARUV)*

Con la finalidad de identificar los CARUV que presenta *C. altimanus* colectados del ambiente (i.e., principalmente dilucidar si pertenecen al grupo de los MAAs) se analizaron algunos tejidos y larvas con contenidos de CARUV. De acuerdo a lo observado en el Capítulo 1 (ver Fig. 1.8), los tejidos con mayores concentraciones de CARUV, y que fueron analizados en esta sección, fueron la glándula digestiva y la gónada, además de las larvas recientemente liberadas. Se aplicaron técnicas de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), utilizando como estándares de comparación a tejidos de *Porphyra sp.* (Rodophyta) y de *Boeckella antiqua* (copépodo calanoideo) (Fig. 2.3).



**Figura 2.3:** Cromatogramas de estándares utilizados para la identificación de compuestos que absorben radiación ultravioleta (CARUV). a) *Porphyrin spp.* donde se identifican dos tipos de MAAs: **P334** - Porphyrin-334, y **SHI** - Shinorine, y b) *Boeckella antiqua* donde se identifican además de las anteriores, otros dos MAAs: **MycGly** - Mycosporine-Glycine y **MAA-332** - Mycosporine-332.

Los compuestos encontrados en los extractos de los tejidos de los cangrejos analizados por HPLC (Fig. 4.4) no pudieron ser identificados como ninguno de los MAAs encontrados en los estándares de comparación (i.e., *Porphyra spp.* y *Boeckella antiqua*). Esto indica que los CARUV hallados en los cangrejos, y que podrían actuar como compuestos fotoprotectores, corresponden a otros MAAs o incluso podrían ser compuestos de otra estructura molecular. Para su identificación se requiere efectuar análisis moleculares que se encuentran fuera de los alcances de esta tesis y que podrían ser realizados en el futuro.

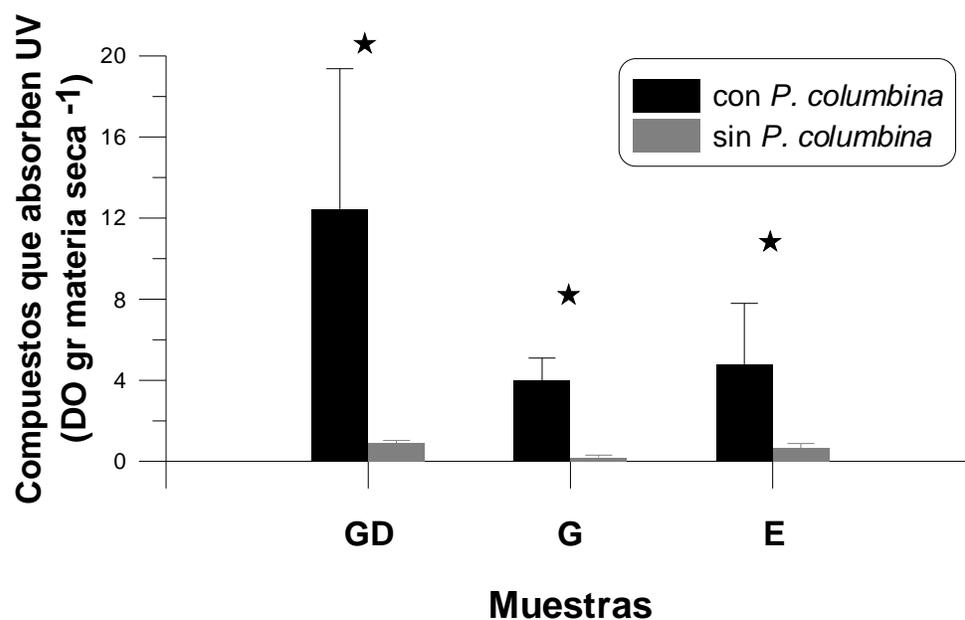


**Figura 2.4:** Cromatogramas realizados para identificar los compuestos que absorben radiación ultravioleta (CARUV) en tejidos de adultos y en larvas de *Cyrtograpsus altimanus*. A modo de ejemplo sólo se muestra uno de los tejidos de cangrejos (i.e., gónadas). Los signos de interrogación simbolizan los compuestos hallados y que no pudieron ser identificados por medio de los estándares de comparación utilizados.

### *Ensayos de bioacumulación de compuestos que absorben RUV (CARUV)*

#### 1° Alimentación en adultos

Luego de tres meses de alimentación de los adultos, se obtuvo la segunda camada de embriones en su estadio final de desarrollo, donde las concentraciones de CARUV fueron significativamente distintas entre los dos tipos de alimentación (Fig. 2.5). Se observó que tanto las glándulas digestivas (GD), como las gónadas (G) y los embriones en la fase final de su desarrollo (E) tenían cantidades significativamente mayores de CARUV en los cangrejos alimentados con *P. columbina*, comparado con los que habían sido alimentados sólo con pescado. Resultados de ANOVA ( $F_{(1,4)} = 8,36$  y  $P = 0,04$ ;  $F_{(1,4)} = 32,20$  y  $P < 0,01$ ;  $F_{(1,4)} = 8,92$  y  $P = 0,04$ , para GD, G y E respectivamente).

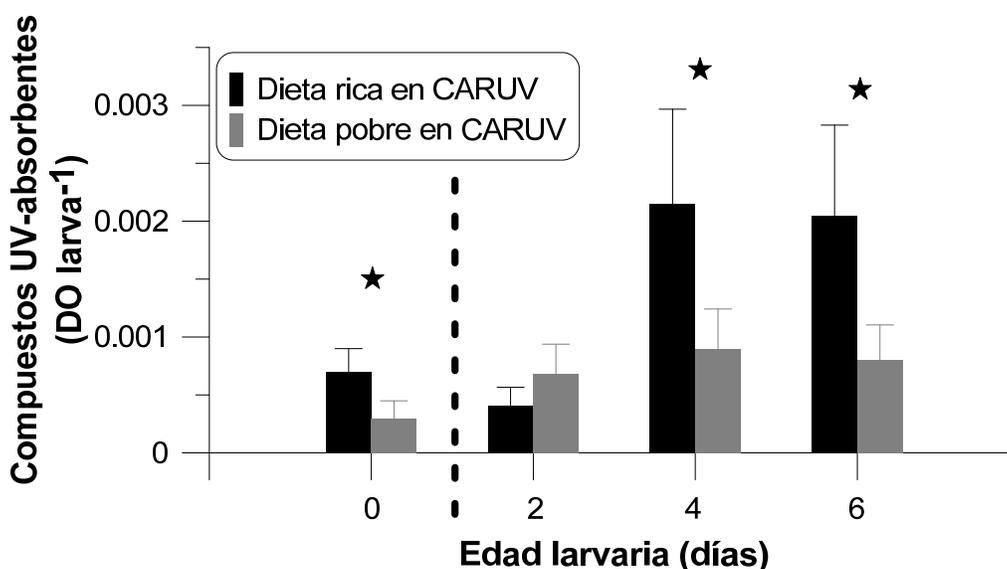


**Figura 2.5:** Análisis de picos de absorción en extractos de tejidos de hembras adultas de *Cyrtograpsus altimanus* alimentadas con dietas ricas y pobres en CARUV (GD: glándulas digestivas; G: gónadas; E: embriones) durante aproximadamente 3 meses. Las líneas verticales indican desvío estándar ( $n=3$ ), mientras que los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticas entre tratamientos de alimentación.

## 2°) Alimentación en larvas

La Figura 2.6 muestra los picos de absorción de CARUV en larvas provenientes de los dos tipos de alimentación (i.e., directa sobre las larvas e indirecta por alimentación de los adultos), bajo dos tratamientos de alimentación (i.e., rico y pobre en CARUV). Las larvas muestreadas tras la eclosión (i.e., día 0) provienen de masas ovígeras de hembras adultas previamente

alimentadas por aproximadamente tres meses con pescado y macroalgas (alimentación indirecta), mientras que las larvas muestreadas los días posteriores (i.e., días 2, 4 y 6) son las larvas alimentadas con fitoplancton (alimentación directa). En términos generales, las larvas provenientes de dietas ricas en CARUV, tuvieron picos de absorción en la región de la RUV mayores que las larvas provenientes de una dieta pobre, a excepción del día 2 donde no se encontraron diferencias significativas. Se observó también que con una alimentación directa sobre las larvas, se obtuvieron diferencias más claras que cuando el ensayo se hizo indirectamente alimentando a los cangrejos adultos. Es decir que, se observó una leve diferencia de concentraciones de compuestos en larvas provenientes de cangrejos previamente alimentados por aproximadamente 3 meses ( $F_{(1,4)} = 8,27$  y  $P = 0,04$ ), mientras que se observaron diferencias similares pero a concentraciones mayores en las larvas alimentadas directamente con fitoplancton durante 4 días ( $F_{(1,2)} = 20,73$  y  $P = 0,04$ ) y 6 días ( $F_{(1,2)} = 19,05$  y  $P = 0,04$ ).

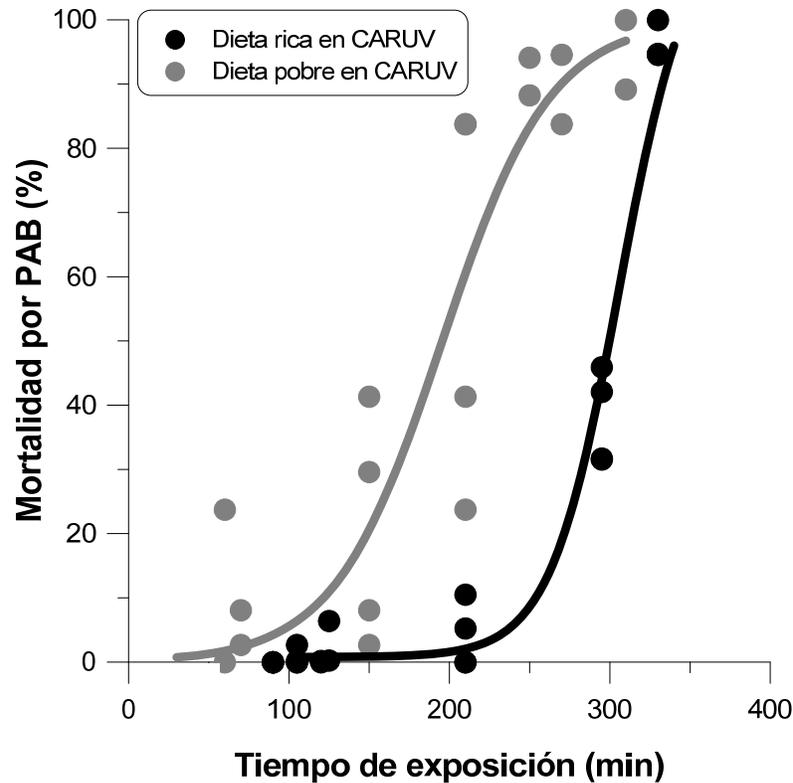


**Figura 2.6:** Análisis de picos de absorción de extractos de tejidos de larvas de *Cyrtograpsus altimanus*. El día 0 corresponde a las larvas colectadas tras la eclosión, provenientes de cangrejos alimentados durante aproximadamente 3 meses. El resto de los días (i.e., 2-6) corresponde a las larvas alimentadas directamente con fitoplancton. Los colores de las columnas corresponden a los dos tipos de alimentación suministrados: Negro y gris: alimento rico y pobre en CARUV, respectivamente. La línea vertical punteada separa los dos procesos de acumulación de los CARUV (i.e., por transferencia materna a la izquierda y por adquisición directa a la derecha). Las líneas verticales continuas sobre las columnas indican

DE en el caso del día 0 ( $n = 3$ ) y el rango promedio medio ( $n = 2$ ) en el resto de los días. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre tratamientos de alimentación.

### *Experimentos de exposición a la radiación*

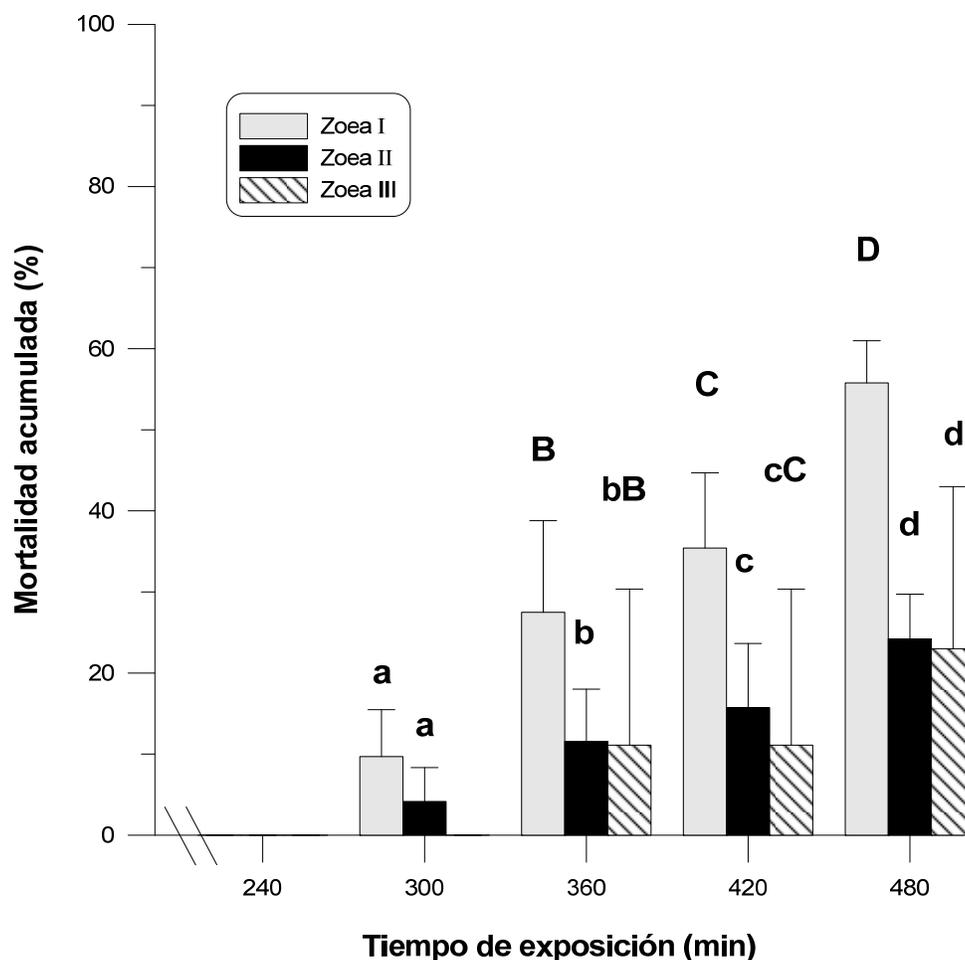
Luego de obtener diferencias significativas de CARUV entre larvas de los dos tratamientos de alimentación, se realizaron dos experimentos de mortalidad por RUV-B, sobre larvas de cangrejos alimentados con dietas ricas y pobres en CARUV. La Figura 2.7 muestra la mortalidad diferencial frente a exposiciones a la RUV-B (tratamiento PAB) que presentaron las larvas con distintas concentraciones de CARUV. Las larvas con altos contenidos en CARUV resultaron ser más resistentes que las que tuvieron bajos contenidos. El tiempo de exposición umbral (U) de las larvas con altos contenidos de CARUV resultó ser significativamente ( $F_{(1,4)} = 59.53$ ,  $P < 0.01$ ) más alto (254 min) que el correspondiente a las larvas pobres en dichos compuestos (139 min). Lo mismo ocurrió con el tiempo de exposición letal al 50 % ( $TL_{50}$ ), y por ende la dosis letal, donde los valores fueron de 304 contra 196 min ( $F_{(1,4)} = 31.33$ ,  $P < 0.01$ ) en larvas con contenidos alto y bajos de CARUV, respectivamente.



**Figura 2.7:** Efecto de la RUV-B sobre la mortalidad de larvas (%) con concentraciones de CARUV altas (círculos negros) y bajas (círculos grises). Las curvas indican los ajustes sigmoideos correspondientes a la mortalidad de los dos tipos de larvas.

### *Sensibilidad a la RUV-B en distintos estadios larvarios*

La Figura 2.8 muestra la sensibilidad a la RUV-B (i.e., evaluada en términos de mortalidad) de los distintos estadios larvales de *Cyrtograpsus spp.*, obtenidos a partir de una muestra de plancton. Los resultados indican que las larvas del primer estadio (Zoea I) fueron las más sensibles a la RUV-B ( $n = 81$ ), seguidas por las larvas de los siguientes dos estadios (Zoea II,  $n = 40$  y Zoea III,  $n = 11$ ), mientras que de las larvas que se expusieron al tratamiento PAB de los últimos dos estadios larvales (Zoea IV y V,  $n = 6$ ) no presentaron mortalidad durante el tiempo de exposición (no se muestran en la figura).



**Figura 2.8:** Efectos de la RUV-B sobre la mortalidad de larvas (%) de distintos estadios de *Cyrtograpsus spp.*. Las columnas y barras verticales representan la mortalidad promedio de los distintos estadios larvarios (i.e., ZI, ZII y ZIII) con sus desvíos estándar (n=3). En el gráfico no se muestran las mortalidades de los estadios avanzados (i.e., ZIV y ZV) debido a que resultaron nulas con este tiempo de exposición. Las letras en minúscula y mayúscula representan las diferencias significativas entre estadios para cada tiempo de exposición, siendo cada letra un tiempo de exposición determinado.

## DISCUSIÓN

Existen muchos estudios referidos a la importancia de los CARUV, específicamente de los MAAs, en diferentes organismos acuáticos, demostrando su función protectora contra los niveles de RUV perjudiciales (Roy 2000; Banaszak 2003). En especies de invertebrados

marinos se pueden mencionar al erizo marino verde donde los MAAs proporcionan una protección en los huevos evitando la aparición de anomalías inducidas por la RUV durante su desarrollo (Adams y Shick 2001). También se demostró que la presencia de MAAs disminuye significativamente la mortalidad debida a la RUV en otros invertebrados como los anfípodos (Helbling et al. 2002a) y los copépodos (Helbling et al. 2002b).

Teniendo en cuenta la función protectora ya demostrada de estos compuestos, también resulta de interés conocer el proceso de transferencia desde los productores primarios hacia los niveles tróficos superiores (i.e., bioacumulación). En la naturaleza se observó que los compuestos MAAs encontrados en distintos invertebrados de la Antártida y el Ártico tenían su origen en los organismos autótrofos del lugar (i.e., macroalgas y fitoplancton) sugiriendo una transferencia de dichos compuestos a través de la dieta (Karentz et al. 1991; McClintock y Karentz 1997; Newman et al. 2000; Rautio et al. 2009). De hecho, en este estudio se comprobó la bioacumulación de CARUV, tanto en los adultos como en las larvas de *C. altimanus*, a través de la dieta basada en distintos alimentos. Si bien hay una transferencia de dichos compuestos desde los adultos hacia su descendencia, parece ser que el proceso de alimentación directa sobre las larvas tiene una mayor bioacumulación de dichos compuestos, que la transferencia de los compuestos vía materna. Es más, la transferencia vía materna parece ser poco eficiente en nuestro experimento de alimentación, ya que la concentración de estos compuestos en gónadas de hembras de campo era mucho mayor (i.e., tres veces, ver Fig. 1.8A), y quizá en esos casos la transferencia podría ser más eficiente y proteger mejor a las larvas recién liberadas. Como consideraciones para el futuro, se podrían plantear otros experimentos de alimentación, teniendo en cuenta distintos alimentos o la presencia de la RUV. Respecto al alimento suministrado a los adultos, se puede suponer que otros alimentos con menores concentraciones en CARUV puedan tener incluso mejores tasas de transferencia de dichos compuestos. Por otro lado, la presencia de RUV podría estimular la transferencia de estos compuestos hacia las gónadas, como una medida adaptativa de la especie a elevados valores de radiación que resultaría nociva para las larvas recién liberadas.

Aunque en este estudio se ha demostrado la presencia de CARUV en los cangrejos adultos y en las larvas, así como la relación con su dieta, estos hechos únicos no garantizan su función protectora. Es por ello que se realizaron experimentos de supervivencia de larvas expuestas a la RUV, alimentadas con dietas ricas y pobres en dichos compuestos. De hecho, las larvas con altos contenidos de CARUV tuvieron una tolerancia mayor a la RUV-B de ~50,

comparado con las larvas con bajas concentraciones (i.e., el  $TL_{50}$  resultó de 196 y 304 min respectivamente para las larvas de bajos y altos contenidos de CARUV) (Hipótesis 4).

Por otro lado, ha sido demostrado que la tolerancia a la RUV depende no sólo de la especie (tolerancia especie-específica) (Williamson et al. 2001b; Leech et al. 2005; Kessler et al. 2008), sino también del estadio de desarrollo o la talla (Leech y Williamson 2000). En este Capítulo se ha observado que las larvas de los estadios tempranos de *Cyrtograpsus spp.* son menos tolerantes a la RUV-B que las larvas de estadios tardíos (Hipótesis N°2). Esto mismo se observó en diferentes taxa de zooplancton de varios lagos del norte de Pensylvania (USA) donde los tamaños más chicos (dentro de una misma especie) resultaban ser los más sensibles a la radiación (Leech y Williamson 2000). Sin embargo, los tamaños más chicos parecen ser los que tienen mayores concentraciones de compuestos MAAs, como se observó en nauplios y copepoditos de *Cyclops abyssorum* comparado con sus copépodos adultos (Tartarotti y Sommaruga 2006). Todo esto hace pensar que las larvas de los primeros estadios de *Cyrtograpsus spp.* son más sensibles a la RUV-B en los primeros estadios del desarrollo debido a su pequeño tamaño y a su mayor relación superficie/volumen, comparado con los estadios avanzados. Probablemente, para poder contrarrestar los efectos adversos de la RUV-B, las larvas ZI recién liberadas tienen CARUV en sus tejidos proveniente de la gametogénesis, que se encuentran seguramente en concentraciones mayores que en estadios más avanzados. Para corroborar lo dicho, habría que tomar muestras de los distintos estadios larvarios de *Cyrtograpsus spp.* y analizar los contenidos de CARUV. Este análisis no fue posible, debido al bajo número de larvas en estadios avanzados que se encontraron en el ambiente durante los arrastres con la red de plancton.

Si bien este trabajo no apunta a dilucidar la distribución de las larvas en la vertical, es común que las larvas de los primeros estadios de decápodos tengan una distribución más superficial en la columna de agua que las de estadios avanzados, hasta llegar al estadio Megalopa que se asientan en el fondo (Queiroga y Blanton 2005). Las larvas de estadios avanzados de *Cyrtograpsus spp.* no fueron encontradas en zonas costeras (Dellatorre, 2009) por lo que se infiere que se estarían desarrollando en aguas alejadas de la costa. Entonces, los primeros estadios larvarios (i.e., ZI y ZII) serían los encargados de alejarse de las aguas costeras (dispersión) donde ocurre la eclosión. Si consideramos que la predominancia de los vientos del sector costero en la Patagonia hace que las corrientes superficiales predominantes sean en dirección hacia aguas más profundas (Palma et al., 2008) se podría sugerir que la deriva

larvaria de los primeros estadios debe efectuarse en aguas superficiales, con gran incidencia de la RUV. Si este fuera el caso de las larvas de *Cyrtograpsus spp.* (y probablemente de otras especies de cangrejos) entonces el éxito de las poblaciones se vería afectado por la incidencia de la RUV-B, debido a que justamente los estadios más sensibles estarían más expuestos a este factor ambiental.

### CAPÍTULO 3

## **Efectos sub-letales de la RUV en larvas del cangrejo *Cyrtograpsus altimanus*<sup>2</sup>**

2 Este capítulo fue publicado como segundo trabajo de respaldo de esta tesis:  
Hernández Moresino RD, Gonçalves RJ & Helbling EW (2011). Sublethal effects of ultraviolet radiation on crab larvae of *Cyrtograpsus altimanus*. JEMBE 407: 363-369 – Anexo 2.

## INTRODUCCIÓN

Los efectos de la radiación solar ultravioleta (RUV 280-320 nm) en organismos y ecosistemas acuáticos han sido ampliamente estudiados, principalmente en relación con las consecuencias negativas que generan o podrían generar los aumentos en la radiación ultravioleta de menor longitud de onda que llegan a la superficie terrestre (RUV-B, 280-315 nm) (De Mora et al. 2000; Helbling y Zagarese 2003). La RUV puede dañar directamente componentes celulares tales como el ADN, proteínas y/o membranas (Sinha y Häder 2002). La radiación ultravioleta A (RUV-A, 315-400 nm) también puede producir especies reactivas de oxígeno (ROS) con sus consecuentes efectos negativos (Vega y Pizarro 2000; Lesser et al. 2001). En términos generales, la RUV puede tener efectos directos e inmediatos sobre la supervivencia (i.e., “exposición letal”) o indirectos y sutiles que afectan la aptitud o fitness (i.e., “exposición sub-letal”).

Los estadios tempranos de los organismos marinos, particularmente huevos y larvas, son usualmente considerados los más vulnerables a la RUV (Häder et al. 2011). Muchos organismos planctónicos tienen algunos mecanismos para evitar o minimizar los daños causados por la RUV (e.g., comportamiento de evasión, bioacumulación de CARUV, sistemas eficientes de reparación del ADN, etc.), pero aún así pueden ser afectados por la radiación solar incluso cuando esto no se manifiesta inmediatamente ni tiene efectos evidentes en su supervivencia. Las consecuencias ecológicas de estas “exposiciones sub-letales” en poblaciones naturales no han sido extensamente estudiadas hasta la fecha, aunque han recibido mayor atención en los últimos años. Por ejemplo, la RUV puede afectar estadios tempranos (i.e., huevos y larvas) pero sus efectos podrían ser observados en los estadios posteriores (i.e., juveniles, adultos) e incluso cuando la RUV ya dejó de ser un factor de estrés. De hecho, se han observado efectos indirectos de la RUV sobre renacuajos de *Rana temporaria* varias semanas después de la metamorfosis. En este caso se observó un aumento en la duración de la etapa larvaria, al igual que de las malformaciones en el desarrollo, y una reducción en el peso corporal (Pahkala et al. 2001). Las exposiciones sub-letales generan “efectos latentes” sobre los organismos, llamados así porque el daño puede ser observado tiempo después de que se produzca la exposición. Estos efectos latentes han sido documentados en gasterópodos, bivalvos, equinodermos, poliquetos, crustáceos, briozoos, urocordados y vertebrados (Pechenik 2006). Otros efectos sub-letales por exposición a la

RUV sobre zooplancton incluyen la tasa de alimentación y de respiración (Freitag et al. 1998; Ylönen et al. 2004; Fischer et al. 2006), retraso en el desarrollo o en el asentamiento (Kuffner 2001; Pahkala et al. 2001), los que inducen malformaciones (Adams y Shick 2001; Lermanda et al. 2009), lesiones corporales y reducción de la tasa de crecimiento (Browman et al. 2000), distribución vertical (Shick et al. 1996), cambios en la movilidad (Alemanni et al. 2003; Gonçalves et al. 2007), anomalías en la síntesis de proteínas (Tartarotti y Torres 2009), entre otros.

En zonas costeras de la Patagonia Atlántica, el cangrejo varunido *Cyrtograpsus altimanus* (Brachyura: Grapsoidea; Rathbun, 1914) es una especie típica y muy abundante de las fosas que se forman en los intermareales rocosos y de los fondos arenosos someros (Scelzo y Lichtschein de Bastida 1979). Sus larvas, junto con las de *Cyrtograpsus angulatus*, constituyen el 35% del total de las larvas en aguas costeras locales (Dellatorre 2009). El asentamiento de las megalopas ocurre después de la metamorfosis de las larvas planctónicas, las cuales pueden estar expuestas a la RUV solar en su ambiente natural. Sin embargo, en el Capítulo 1 se determinó que el primer estadio larval (Zoea I) de esta especie es muy tolerante (en términos de supervivencia) a exposiciones cortas de RUV-B artificial, comparada con otras especies de cangrejos. Sin embargo, hasta donde se sabe no hay información referida a los efectos sub-letales de la exposición a la RUV en *C. altimanus*. Por lo tanto, el objetivo de este Capítulo fue evaluar cambios en la morfología, desarrollo y comportamiento natatorio de las larvas de *C. altimanus* después de una exposición inicial a niveles sub-letales de RUV (Hipótesis 5). Para cumplir con el objetivo, se expusieron larvas Zoea I a dosis sub-letales de RUV artificial y durante ~2 semanas después de la exposición se registraron los cambios en el desarrollo y en la natación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio fue llevado a cabo durante el verano austral (Marzo) de 2010 y 2011 con larvas Zoea de *C. altimanus*. La fuente de estos especímenes fueron hembras ovígeras colectadas durante bajamar de las fosas de marea rocosas en Puerto Madryn (42°46'S, 65°02'O), Chubut, Argentina.

### *Exposición sub-letal a la RUV-B y mantenimiento posterior de las larvas*

Las hembras colectadas se mantuvieron por aproximadamente 48 h en acuarios colocados en una cámara de incubación (MiniCella) a 19-20 °C con burbujeo y un fotoperíodo 12h: 12h luz: oscuridad; al final de dicho período los huevos empezaron a eclosionar. Se realizaron tres experimentos de exposición sub-letal a la RUV-B y mantenimiento posterior a la exposición de los huevos, con larvas recién liberadas que fueron expuestas bajo un simulador solar (Hönle, Sol 1200) a una distancia de 109 cm de la lámpara. Las irradiancias de la lámpara fueron de 84.5, 30 y 0.76 W m<sup>-2</sup> para PAR, RUV-A y RUV-B, respectivamente. Estas condiciones de irradiancia, junto con el tiempo de exposición de 120 min (que resultaron en una dosis de RUV-B de 5.5 kJ m<sup>-2</sup>) fueron elegidos basados en ensayos previos y en los estudios realizados con esta especie en el Capítulo 1. Allí se determinó que ni el PAR, ni la RUV-A produjeron efectos significativos en la mortalidad larvaria, mientras que un período de incubación con dosis de RUV-B > 22.5 kJ m<sup>-2</sup> (i.e., después de 495 min bajo una irradiancia de RUV-B de 0.76 W m<sup>-2</sup>) resultó letal. Considerando esto, para los experimentos de exposición del presente Capítulo se eligió el mismo nivel de irradiancia (i.e., 0.76 W m<sup>-2</sup>) pero con un tiempo de exposición mucho más corto de ~ 25 % (i.e., 120 min), alcanzando una dosis de RUV-B de 5.5 kJ m<sup>-2</sup>; esta es una dosis sub-letal para las larvas de *C. altimanus*. Cabe aclarar que en verano la dosis diaria de RUV-B que alcanza la superficie del mar en esta región Patagónica normalmente excede los 30 kJ m<sup>-2</sup> (hasta 45 kJ m<sup>-2</sup>) mientras que en horas del mediodía la irradiancia de RUV-B puede llegar a 1.8 W m<sup>-2</sup> (Villafañe et al. 2004b).

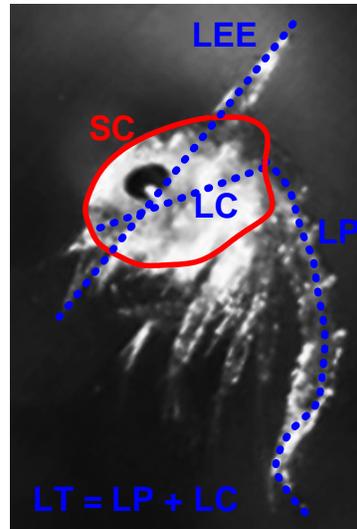
Se utilizaron grupos de 300 larvas por acuario, con larvas de menos de 16 h de liberadas. Las mismas fueron separadas usando una pipeta plástica de boca ancha, y colocadas en dos acuarios cúbicos iguales (17 x 17 x 4 cm, largo x ancho x profundidad) conteniendo 300 ml de agua de mar esterilizada y expuestas a dos tratamientos de radiación: 1) Tratamiento PAB, acuario cubierto con filtro (Ultraplan 290) para eliminar la RUV-C que pudiera generar la lámpara, por lo que el grupo de larvas recibió la radiación total (PAR + RUV-A + RUV-B); 2) Tratamiento P o control, acuario cubierto con filtro (Ultraplan RUV Opak Digefra) por lo que las larvas recibieron sólo PAR. Las características de transmisión de los filtros fueron publicadas anteriormente (Villafañe et al. 2003).

Después del período de exposición, ambos acuarios fueron retirados del simulador solar y se mantuvieron en la misma cámara de cultivo a 19-20 °C. Los acuarios fueron mantenidos con burbujeo suave y las larvas se alimentaron con una mezcla de diatomeas - *Thalassiosira weissflogii* y *Phaeodactylum tricornutum* a una concentración final de aproximadamente  $6-8 \times 10^4$  cel  $\text{ml}^{-1}$ . La cámara de cultivo tenía un fotoperíodo de 12h: 12h luz: oscuridad con un nivel de irradiancia PAR de  $250 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . El agua y el alimento de los acuarios fueron renovados completamente cada 2 días (excepto entre los días 6 a 9). Las larvas muertas fueron contadas, retiradas de los acuarios y fijadas con formaldehído al 4% para la posterior medición de tallas. La baja proporción de individuos muertos que se observó en ambos tratamientos durante los tres experimentos (< 5%) se debió probablemente al resultado de una combinación de factores tales como las condiciones de cultivos, efectos de los acuarios, manipulación, etc., más que a la exposición. Asimismo, cada dos días y previo a cada recambio de agua y alimento, se colectaron 20 larvas por cada tratamiento, las cuales fueron filmadas para medir parámetros de movilidad como se explica más adelante. Los datos obtenidos de los tres experimentos se utilizaron para determinar los cambios de talla y de estadio larval, mientras que los datos obtenidos de dos de ellos se utilizaron para las mediciones de movilidad. Se decidió dejar un experimento sin manipulación (hecho común que ocurre durante las grabaciones de los videos y las medidas de movilidad) como experimento control para establecer si el manipuleo podría haber causado algún estrés que pudiese haber afectado el desarrollo de las larvas. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre el experimento control y los otros dos, por lo tanto los datos de los tres fueron utilizados para determinar cambios en el tamaño corporal y el desarrollo.

### *Mediciones de talla*

Las larvas fijadas fueron examinadas con una lupa para determinar tanto el crecimiento corporal como la aparición de posibles malformaciones usando el programa Micro Image Analysis (MIAS 2003, ver 1.3B). Entre 5 y 10 individuos por tratamiento de radiación fueron analizados cada dos días en cada experimento. Se midieron el largo total (LT), el largo desde la punta de la espina rostral hasta la punta de la espina dorsal (LEE), el largo del caparazón (LC), el largo del pleón (LP) y la superficie del caparazón (SC) (ver Figura 3.1). El largo del caparazón se calcula siempre a partir de una recta trazada entre la base de la espina rostral y la

base del pleón. De todas estas variables, se eligió el largo del caparazón como estimador de la talla corporal larvaria, ya que fue la variable morfométrica con la menor variabilidad.



**Figura 3.1:** Parámetros morfométricos de las larvas de cangrejos obtenidos a partir de imágenes.

### *Determinación de estadios larvales*

Los estadios larvales se determinaron a partir de las muestras fijadas contando el número de setas plumosas presentes en el exopodito del segundo par de maxilipedios; por ejemplo, los primeros dos estadios larvales (Zoea I y II) tienen 4 y 6 setas, respectivamente. Otras características distintivas fueron el largo de la espina rostral o el tamaño del caparazón, que eran más corta y más pequeña respectivamente en la Zoea I comparadas con la Zoea II (Scelzo y Lichtschein de Bastida 1979).

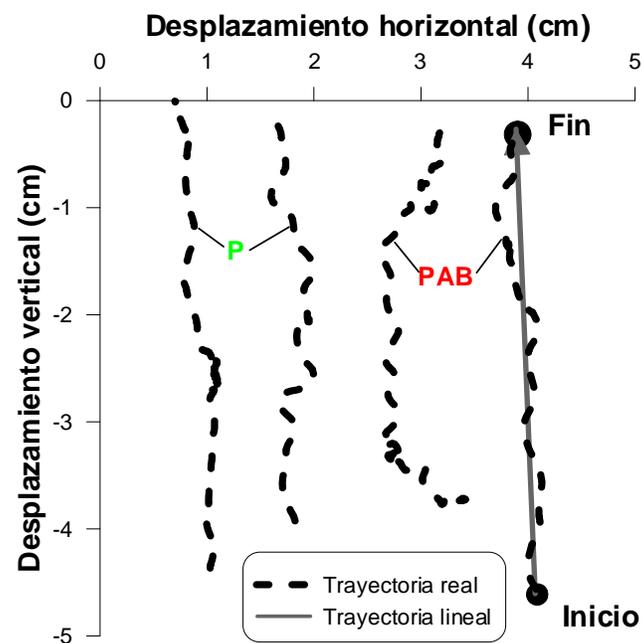
### *Medidas de movilidad*

Cada dos días, se colectaron al azar 20 larvas de cada recipiente expuesto a uno de los dos tratamientos de radiación, y se colocaron en un acuario de vidrio rectangular (6 x 5 x 1 cm, alto x ancho x espesor) con 25 ml de agua de mar esterilizada, de manera tal que la superficie filmada tenía 25 cm<sup>2</sup> (recipiente con una columna de agua de 5 cm de altura). Antes de

comenzar la filmación, las larvas en el recipiente fueron aclimatadas durante aproximadamente 1 min en oscuridad, tiempo suficiente para disipar la débil turbulencia generada al introducir los individuos dentro del acuario de filmación. Transcurrido ese tiempo, se pudo observar el comportamiento natatorio normal de las larvas. Luego se realizaron filmaciones durante 1 min en oscuridad, usando una fuente de luz infrarroja (IR) y una cámara de video sensible al IR (Sony DCR SR85) con una velocidad de 30 fps (*frames per second* o cuadros por segundo). De esta forma (i.e., filmaciones en oscuridad) el comportamiento natatorio normal de las larvas no se vio alterado (e.g., debido al comportamiento fototáctico diferencial producido por la distribución angular irregular de la luz dentro del recipiente de filmación, etc.). Se debe tener en cuenta que cuando los individuos se mueven cerca de la superficie del agua (i.e., a menos de 0.5 cm de profundidad) se producen perturbaciones ópticas que generan errores en la detección de larvas y mediciones de velocidades de natación. Es por ello, que sólo fueron analizadas las trayectorias bien definidas y claramente visibles. También cabe aclarar que para un mismo individuo, pueden ser detectadas más de una trayectoria, por lo que para los datos de movilidad media de cada video fueron considerados los 20 individuos como representativos de su tratamiento (PAB o P) a ese estadio de desarrollo. Después de finalizada la filmación, las larvas fueron devueltas a sus respectivos acuarios hasta la próxima medición: Todo este procedimiento fue realizado en menos de 5 minutos. La Figura 3.2 muestra algunos ejemplos de natación hacia arriba (movimiento de ascenso) de dos larvas expuestas a los distintos tratamientos de radiación. Las larvas del día 0 sin exposición previa a un tratamiento de radiación, permanecieron cerca de la superficie del agua todo el tiempo de filmación (i.e., en los primeros 0.5 cm de la columna de agua) por lo que sus movimientos no fueron analizados; la movilidad larval en los días 2, 4, 6, 9 y 11 después de la exposición fue medida para ambos tratamientos de radiación.

Los archivos de video fueron convertidos a imágenes individuales (i.e., una imagen por cuadro) que fueron preprocesadas y llevadas a archivos binarios (i.e., dejando sólo las larvas en movimiento como objetos blancos sobre un fondo oscuro) usando el paquete informático ImageJ (Abramoff et al. 2004). Estas imágenes binarias fueron entonces analizadas para obtener la posición X-Y de cada larva detectada en cada cuadro, usando el paquete informático CellProfiler (Lamprecht et al. 2007).

En general, las larvas realizaron dos tipos de movimientos: (1) Un hundimiento vertical pasivo o descenso y (2) Un movimiento de natación ascendente activo casi vertical. En este estudio se enfocó en los movimientos ascendentes (i.e., trayectorias) ya que son ellos los que implican un costo energético. Del análisis de estas trayectorias, se obtuvieron la velocidad de natación, el ángulo de desplazamiento con respecto a la vertical, la linealidad, posición X-Y distancia recorrida por cada larva. La linealidad de la trayectoria entre un punto A y un punto B se calculó como la razón de la distancia lineal entre estos puntos y la distancia real recorrida por la larva (i.e., una trayectoria directa tiene una linealidad igual a 1).



**Figura 3.2:** Ejemplos de trayectorias de natación ascendentes de las larvas, indicando las trayectorias reales (líneas discontinuas) y las lineales (líneas continuas). El valor -5 del eje Y indica el fondo del recipiente de filmación, mientras que el 0 indica la superficie de la columna de agua del mismo.

Para comparar la velocidad de natación de los individuos de diferentes tallas debido al crecimiento durante el desarrollo larval, la velocidad fue “normalizada” con la talla corporal, por lo que se expresa como *talla corporal s<sup>-1</sup>* (i.e., número de veces que entra la talla corporal de la larva en la distancia recorrida por unidad de tiempo). Como no se encontraron diferencias significativas entre las tallas corporales de las larvas preservadas (fijadas) versus

las larvas vivas (ANOVA de una vía,  $F_{(1,18)} = 0.45$ ,  $P = 0.51$ ), es que se eligió utilizar la talla de las larvas fijadas como medida de normalización de la velocidad.

### *Análisis estadístico*

Debido al espacio efectivo bajo el simulador solar, no se pudieron colocar réplicas para cada experimento de exposición sub-letal, que consistió de dos acuarios, uno por cada tratamiento de radiación (P y PAB). Sin embargo, se asume que las réplicas fueron obtenidas llevando a cabo el experimento tres veces bajo condiciones idénticas, cada una con un nuevo grupo de larvas recientemente liberadas.

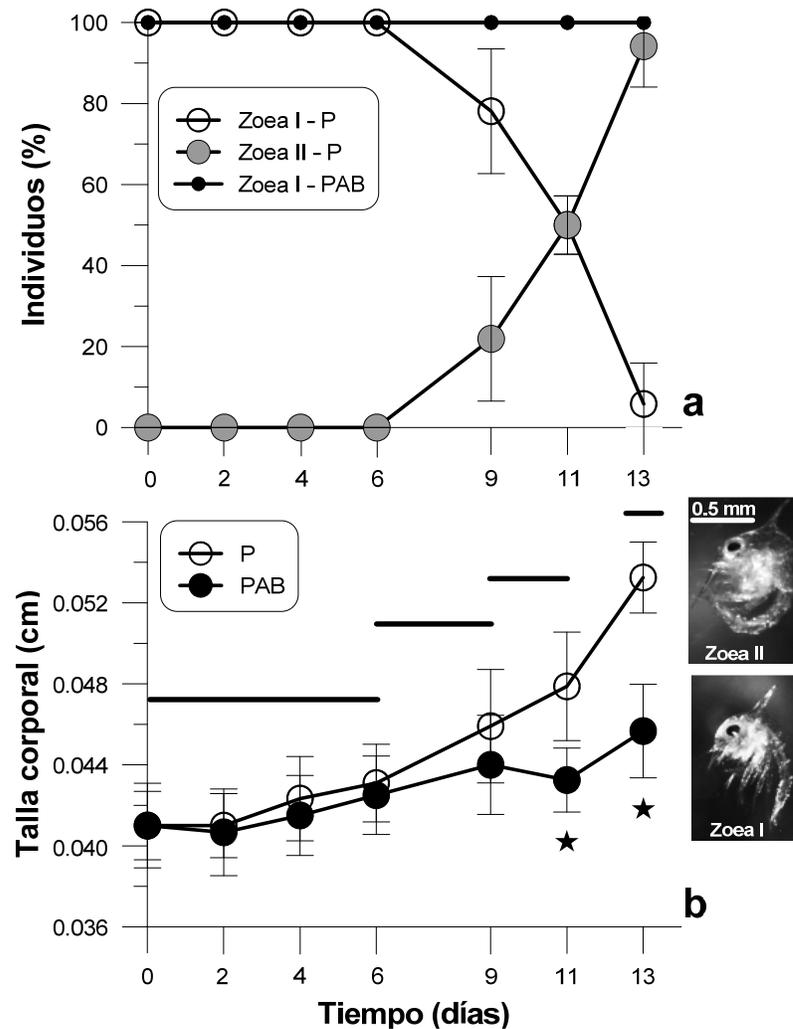
Debido a que existe una baja pero no despreciable probabilidad de que una misma larva haya sido seleccionada más de una vez para las mediciones de movilidad, es que el supuesto de independencia de muestras no se cumple. Lo mismo sucede con todas las variables (i.e., talla corporal, moda de la velocidad, posición vertical, desplazamiento real y linealidad) que fueron medidas repetidas a lo largo del tiempo transcurrido. Es por todo ello, que se utilizó la prueba no paramétrica de Friedman para hacer comparaciones múltiples para muestras dependientes (Zar 1999). Cuando los resultados de la prueba de Friedman dieron significativos, se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para comparaciones de pares de muestras dependientes.

Los datos de la moda de velocidad, número de trayectorias, desplazamiento real y linealidad fueron ajustados en función del tiempo a modelos lineales mediante regresión lineal. La validez de los modelos ajustados fue determinada mediante ANOVA. También se usó ANOVA de una vía para determinar diferencias significativas entre tratamientos de radiación en días específicos (Zar, 1999). Se usó el paquete informático R versión 2.11 para las pruebas estadísticas (con significancia estadística fijada al 5%).

## RESULTADOS

### *Muda y crecimiento*

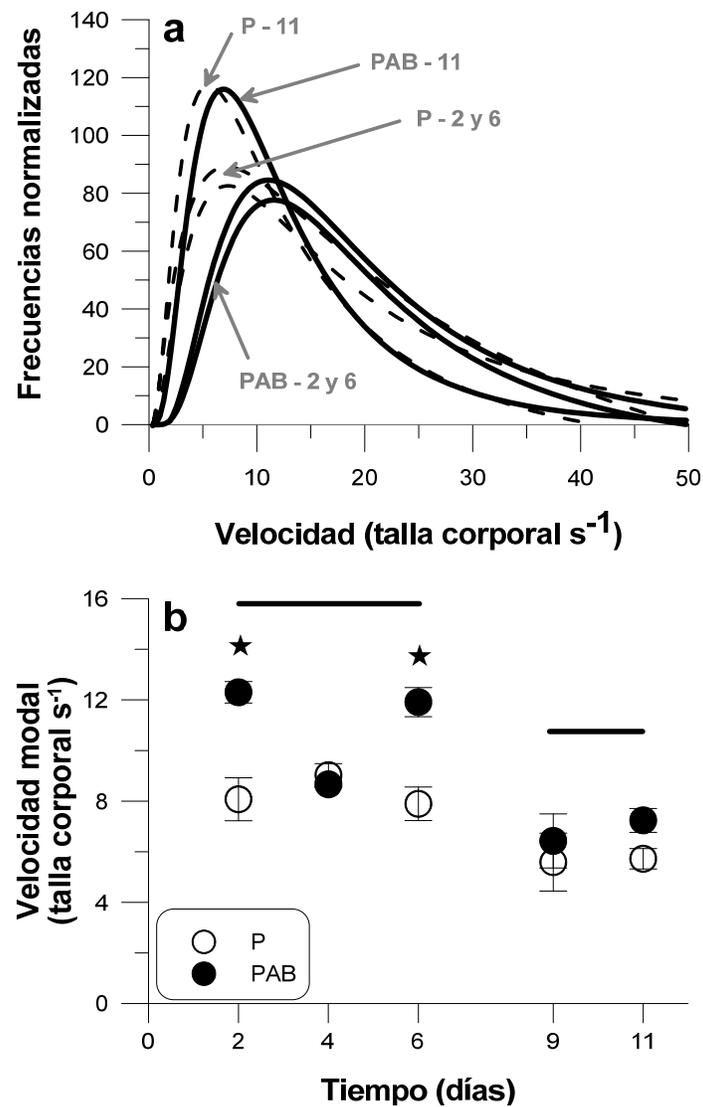
La Figura 3.3 muestra el desarrollo y la talla corporal diferenciales en larvas preexpuestas al tratamiento P y al tratamiento PAB. Se observaron cambios significativos en los estadios de desarrollo (Fig. 3.3a) y en la talla corporal (Fig. 3.3b) entre los dos tratamientos de radiación. Las larvas que recibieron RUV (tratamiento PAB) permanecieron como Zoea I durante todo el período experimental, sin alcanzar el estadio Zoea II (Fig. 3.3a). Por el contrario, las larvas que recibieron solo PAR (tratamiento P) empezaron a mudar de Zoea I a Zoea II entre los días 6 y 9, alcanzando aproximadamente el 50% del segundo estadio larval a los 11 días, y el 100 % al final del experimento (Fig 3.3.a). No se observaron malformaciones en larvas expuestas a los dos tratamientos de radiación, por el simple hecho de que las larvas del tratamiento PAB no mudaron a Z II. La talla corporal de las larvas (Fig. 3.3b) en el tratamiento PAB varió entre 0,041 y 0,045 cm sin mostrar un incremento significativo durante el experimento (Prueba de Friedman,  $X^2_{(n=2, df=6)} = 11.58, P = 0.07$ ). En cambio, la talla corporal de las larvas en el tratamiento P tuvo un incremento significativo después de los 13 días (Prueba de Friedman,  $X^2_{(n=2, df=6)} = 20,15, P < 0,01$ ) desde 0,041 (DE = 0,004) a 0,054 (DE = 0,003) cm. El crecimiento en la talla corporal en los dos tratamientos de radiación resultó en larvas significativamente más grandes en el tratamiento P que en el tratamiento PAB, tanto en el día 11 (ANOVA,  $F_{(1,4)} = 8,49, P < 0,01$ ) como en el día 13 (ANOVA,  $F_{(1,4)} = 14,82, P < 0,01$ ).



**Figura 3.3:** Muda y crecimiento de las larvas después de la exposición al tratamiento PAB (círculos negros) y al tratamiento P (círculos blancos y grises). **a)** Proporción (%) de Zoea I y Zoea II. **b)** Talla corporal de las larvas (en cm) a lo largo del período de experimentación (13 días). Los símbolos representan la media de tres experimentos excepto para el día 6 en el cual una de las muestras se perdió ( $n = 2$ ). Las líneas verticales indican los desvíos estándar, mientras que los asteriscos indican diferencias entre los tratamientos de radiación ( $P < 0,005$ ). Las líneas horizontales en el panel **b** conectan las muestras que en el tratamiento P no resultaron diferentes significativamente (Prueba de Wilcoxon).

### *Movilidad*

Se observó un patrón general de movilidad en cada uno de los videos registrados: Una cantidad variable de larvas se mantenían muy cerca de la superficie del agua, mientras que el resto describía el movimiento de descenso y ascenso descrito anteriormente. Ninguno de los individuos en los videos permaneció quieto en el fondo o a una profundidad determinada (i.e., todo individuo que no estaba en la superficie describió el patrón de “descenso y ascenso”). Por lo tanto, para cada trayectoria registrada, siempre fue observado un descenso previo. Se determinó que una función LogNormal representaba el mejor ajuste para la distribución de frecuencias de la velocidad de natación (Fig. 3.4). Las distribuciones de frecuencia fueron cambiando hacia velocidades menores en ambos tratamientos a medida que progresaba el experimento (Fig. 3.4a). Se observaron diferencias entre tratamientos de radiación sólo en los días 2 y 6 al comparar las velocidades modales (i.e., el valor más frecuente) (Fig. 3.4b) (ANOVA,  $F_{(1,2)} = 39.49$ ,  $P = 0.02$  y  $F_{(1,2)} = 29.41.97$ ,  $P = 0.02$ , respectivamente) con larvas preexpuestas a la RUV teniendo velocidades modales más altas que aquellas que recibieron sólo PAR. A lo largo de los experimentos, hubo una disminución significativa en la moda de la velocidad de natación en los días 9 y 11, comparado con los días 2, 4 y 6 (prueba de Friedman,  $X^2_{(n=4, df=4)} = 12.00$ ,  $P = 0.02$ ; prueba de Wilcoxon,  $T = 2.52$ ,  $n = 8$ ,  $P = 0.01$ ).

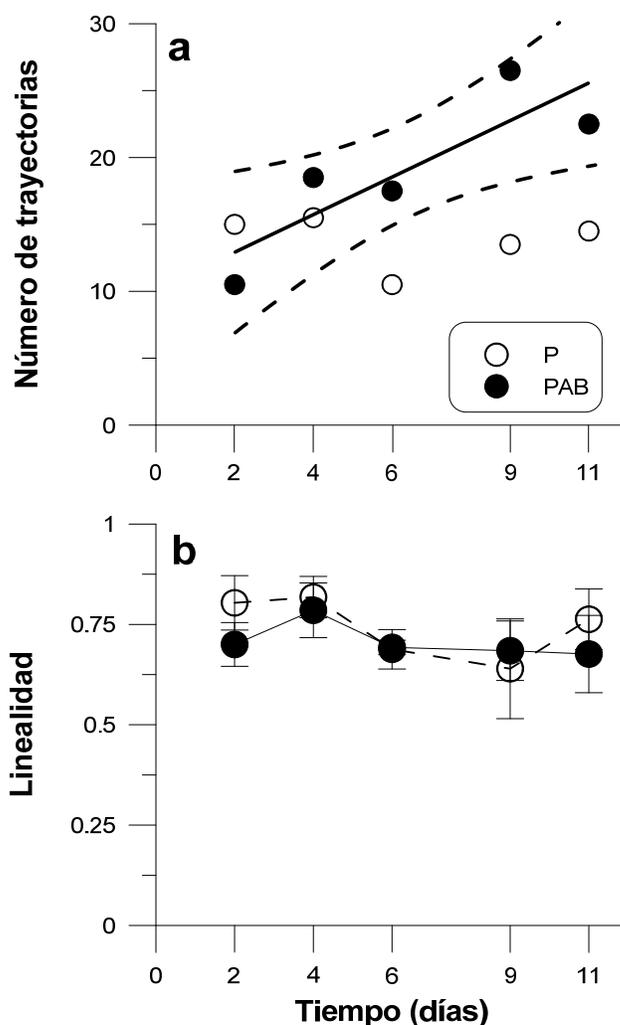


**Figura 3.4:** Velocidad de natación durante los experimentos. **a)** Distribución de frecuencias medias de dos experimentos para ambos tratamientos de radiación, ajustadas por curvas de distribución LogNormal. **b)** Velocidad modal (en *talla corporal*  $s^{-1}$ ) calculada a partir de las curvas de distribución de frecuencias. Las líneas verticales indican el rango promedio medio, mientras que los asteriscos representan las diferencias significativas entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ). Las líneas horizontales indican muestras que no resultaron diferentes significativamente agrupando los dos tratamientos de radiación (Prueba de Wilcoxon).

Como en cada video fueron filmadas 20 larvas, el hecho de observar menos de 20 trayectorias indica que algunas larvas migraron al fondo mientras que otras permanecieron en la superficie y por lo tanto estas últimas no fueron tomadas en cuenta para las mediciones de movilidad.

Por el contrario, cuando más de 20 trayectorias fueron registradas esto podría reflejar que a) Al menos un individuo había realizado más de un movimiento de descenso-ascenso y b) Hubo mayor movilidad promedio en ese tratamiento.

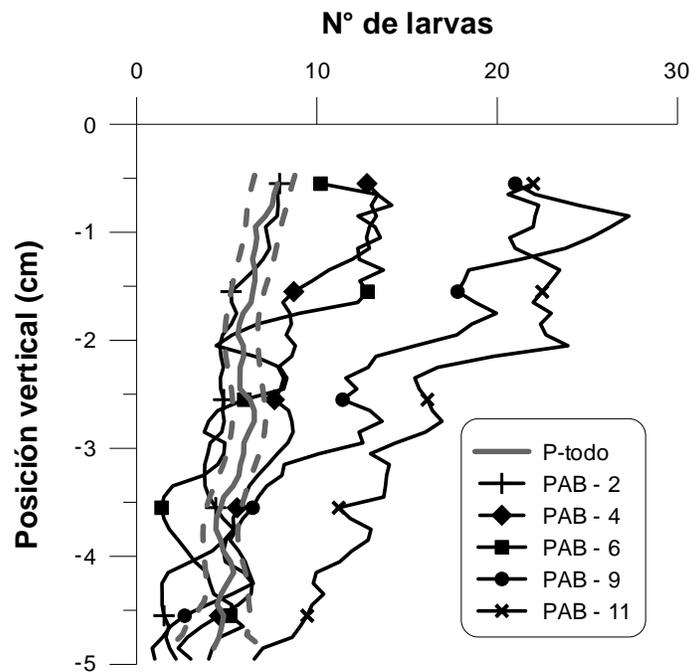
El número de trayectorias observado en el tratamiento P no registró cambios significativos y se mantuvo entre 10-15 (Fig. 3.5a), indicando que ese fue el número máximo de larvas moviéndose hacia abajo (y luego hacia arriba) mientras el resto de ellas permanecieron en la superficie. En el tratamiento PAB, sin embargo, el número de trayectorias aumentó significativamente a medida que el experimento progresaba (i.e., 10 trayectorias en el día 2 hasta 26 trayectorias en el día 9), con un incremento lineal significativo de 1.41 por día ( $r^2 = 0.64$ ,  $F_{(1,8)} = 8.65$ ,  $P = 0.02$ ). El patrón de la trayectoria fue en general altamente lineal (Fig. 3.5b), y no se observaron diferencias entre tratamientos de radiación o entre días de muestreo (media general de 0.71, DE = 0.09, n = 20).



**Figura 3.5:** Movilidad en función del tiempo, determinado como número y linealidad de las trayectorias. **a)** Número promedio de trayectorias. Las líneas discontinuas indican los límites de confianza al 95 % del ajuste lineal (línea continua); **b)** Linealidad de las trayectorias. Las barras de error verticales muestran el rango medio entre muestras.

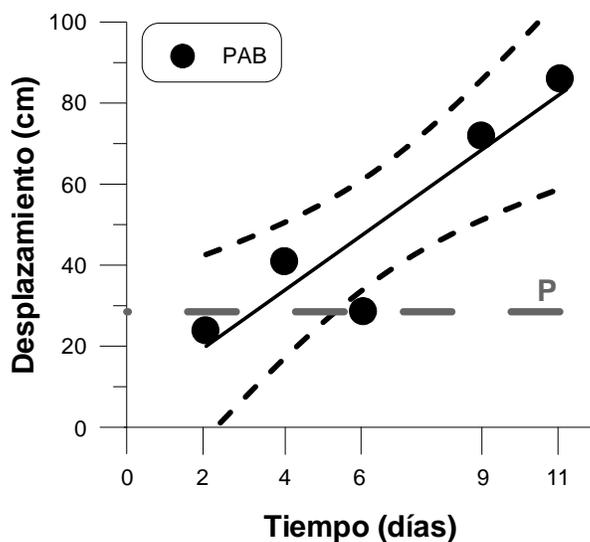
Para poder relacionar los cambios en el número de trayectorias registradas (Fig. 3.5a) con la posición real de las larvas en la vertical, se calculó la integral en el tiempo de la distribución vertical de las larvas durante el movimiento de natación ascendente, considerando el número total de ocurrencias de las larvas a las distintas profundidades (i.e., nadando hacia arriba) durante un minuto de filmación, usando intervalos de profundidad de 0.1 cm (Fig. 3.6). La ocurrencia larval promedio a cada profundidad se graficó con respecto a su posición vertical (i.e., profundidad) para cada día de muestreo. No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de larvas en función de su posición vertical en el tratamiento P, indicando que no

sólo el número de trayectorias no cambió (Fig. 3.5a), sino que tampoco sufrió cambios el número de “descensos” en el transcurso del experimento. Sin embargo, las larvas que recibieron RUV tuvieron un mayor número de ocurrencias a todas las profundidades en la columna de agua (por debajo de los 0.5 cm de profundidad), mostrando un incremento en la actividad promedio. Como la cantidad total de individuos fue la misma en cada video (i.e., 20 larvas), también se puede inferir a partir de la Fig.3.6 que el número de individuos en la superficie (i.e., excluidos de los análisis – ver más arriba) se redujo en el tratamiento PAB durante el experimento: Inicialmente (días 2-6) hubo entre 5 y 10 ocurrencias en todas las profundidades, lo cual significa que hay una mayor cantidad de larvas que permanecen en la superficie comparado con la última parte del experimento (días 9 y 11) cuando hubo mayor cantidad de ocurrencias por debajo de los 0.5 cm (i.e., menos cantidad de larvas permanecieron en la superficie).



**Figura 3.6:** Posición de las larvas en la columna de agua en función del tiempo para los dos experimentos. Para el tratamiento PAB, cada línea continua negra indica el número de larvas encontradas a la profundidad correspondiente para ese día. La línea continua gris y las líneas discontinuas indican la distribución media y los límites de confianza al 95 %, respectivamente, para las larvas del tratamiento P en todos los días de muestreo. Por simplicidad, los símbolos se muestran cada 1 cm.

El aumento general de la actividad que se observó en las larvas expuestas a la RUV, también pudo ser confirmado calculando el desplazamiento vertical integrado que realizan las mismas, lo cual resultó en un incremento lineal a medida que el experimento progresaba (Fig. 3.7). De esta manera se pudo cuantificar la mayor profundidad en la distribución de las larvas que recibieron RUV con un incremento lineal de 6.92 cm por día para todo el grupo de larvas que se movieron por debajo de los 0.5 cm ( $r^2 = 0.65$ ,  $F_{(1,8)}$ ,  $P < 0.01$ ).



**Figura 3.7:** Desplazamiento promedio real de las larvas del tratamiento PAB, calculado a partir de la ocurrencia versus la posición vertical, en función del tiempo. La línea continua y las discontinuas representan el ajuste lineal con sus bandas de confianza al 95 % para el tratamiento PAB. La línea gruesa discontinua indica el desplazamiento promedio que tienen las larvas todos los días bajo el tratamiento P, a modo de referencia.

## DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios que tratan sobre los efectos de la RUV en larvas de invertebrados están orientados a exposiciones letales (Browman et al. 2000; Wübben y Vareschi 2001; Hernández Moresino y Helbling, 2010). Sin embargo los efectos sub-letales pueden ser muy importantes, especialmente cuando los estadios tempranos son vulnerables a la RUV. En este trabajo se observó que la muda, el crecimiento y la movilidad de las larvas del cangrejo *C. altimanus* son afectadas por una exposiciones previas a la RUV sub-letal (tratamiento PAB). En los párrafos siguientes se discutirá cómo estos efectos de la RUV podrían afectar el comportamiento y el éxito reproductivo de *C. altimanus* de aguas Patagónicas.

Se ha observado que las larvas de crustáceos decápodos pueden sufrir un retardo en el proceso de muda en condiciones desfavorables tales como cambios en la temperatura, salinidad, nutrición o química del agua (Anger 2003 y las referencias citadas en el mismo). En el presente estudio se ha determinado además que una dosis sub-letal de RUV puede actuar como un factor de estrés adicional, causando una demora / ausencia de la muda, extendiendo

la duración de un estadio larval particular. Debido a que *C. altimanus* se asienta en el fondo cuando alcanza el estadio megalopa, esta extensión del período larval resultaría en un mayor período planctónico. Esto a su vez, podría causar una reducción de su supervivencia debido a inanición, estrés por exposición a otros factores físicos, predación, entre otros) (Morgan 1995). Además, un período planctónico extendido puede exponer a las larvas a mayores niveles de RUV, con el potencial aumento de la mortalidad como fue observado previamente en esta especie de cangrejos (Hernández Moresino y Helbling, 2010). Más allá de eso, una demora en la metamorfosis hacia un estadio juvenil de vida bentónica puede también afectar la performance post-metamórfica (e.g., reducción en las tasas de crecimiento, supervivencia y desarrollo) como ya fue observado en juveniles de decápodos que presentaron un período larval más prolongado (Gebauer et al. 2003), siendo esto más bien un patrón general para muchos organismos. Por ejemplo, se ha comprobado que las reservas de energía, metamorfosis y tasas de crecimiento podrían verse afectadas en larvas de peces del Lago Pyhäselkä (Ylönen et al. 2004; Pechenik, 2006), en el cirripedio *Balanus amphitrite* (Thiyagarajan et al. 2007) y en una gran variedad de invertebrados marinos – ver revisión de Pechenik (2006). Bajo este escenario, las oportunidades de una larva de convertirse en miembro reproductivo de la población disminuyen, con el consiguiente costo para la población.

La muda es también muy importante porque la talla corporal depende de ella. Por ejemplo, el tamaño de una larva de cangrejo braquiuro aumenta linealmente con los estadios larvales consecutivos (Anger 2001). En muchos organismos zooplanctónicos, el tamaño corporal tiene una importancia fundamental para la alimentación, las habilidades de búsqueda y de reducción de riesgos de predación, como fuera observado en larvas de peces (Miller et al. 1988). En este trabajo, la ausencia de la muda en larvas previamente expuestas al RUV tuvo un impacto directo en su tamaño corporal ya que no pudieron crecer durante el transcurso del experimento. Por el contrario, las larvas previamente expuestas sólo a radiación PAR alcanzaron un tamaño que está dentro de los rangos “normales” de crecimiento (Scelzo y Lichtschein de Bastida 1979).

Se podría pensar que cualquier impacto que genere una exposición sub-lethal a la RUV debería reflejarse en una disminución en la actividad de natación, como fue observado en una especie de renacuajos (Hatch y Blaustein 2000) aunque esto no es una regla general. El caso contrario

se observa en el comportamiento de natación de juveniles de trucha cuya velocidad de natación puede verse incluso aumentada bajo exposición a la RUV (Alemanni et al. 2003). En términos de la velocidad de natación, los resultados del presente trabajo apoyan la hipótesis de una reducción de la velocidad debida a la RUV (Fig. 3.4a y 3.4b). Sin embargo, en términos de la actividad promedio, las larvas preexpuestas a la RUV tuvieron una actividad que fue incrementándose durante su desarrollo comparada con las larvas expuestas sólo a radiación PAR (Fig. 3.5–3.7). Esto fue observado como una mayor cantidad de trayectorias (Fig. 3.5a). Como la linearidad permaneció constante (Fig. 3.5b), esto se traduce finalmente en un desplazamiento acumulativo más efectivo (Fig. 3.7). Esto es especialmente importante en relación a las reservas de energía ya que el desplazamiento fue obtenido midiendo los movimientos verticales activos durante la natación ascendente de los individuos. Por lo tanto las larvas realizaron un esfuerzo durante estos desplazamientos ascendentes (Fig. 3.7) que involucró un costo metabólico, a diferencia del modo pasivo de “descenso”. Dado que al nadar la larva tiene que contrarrestar la fuerza de gravedad más la fuerza de rozamiento del agua aplicando un momento ascendente, la Fig. 3.7 también sugiere que fue necesaria más energía a medida que el desplazamiento aumentaba en el tiempo en el tratamiento con RUV. Respecto a la distribución vertical de estos desplazamientos, resultaron en un mayor número de ocurrencias a cualquier profundidad comparado con el tratamiento P (Fig. 3.6). Este aumento en la actividad y su concomitante costo energético podrían disminuir la cantidad de energía requerida para la muda / crecimiento, lo cual resultaría finalmente en un retardo / ausencia de la muda. El aumento en la actividad de las larvas para moverse hacia abajo en la columna de agua podría deberse a (1) Un mecanismo natural de la larva para “escapar” de las aguas superficiales donde la RUV es alta, y/o (2) Una tendencia a permanecer más tiempo “cayendo” para incrementar las posibilidades de encontrar partículas de alimento, ya que este tipo de larvas buscan alimento mientras descienden pasivamente en la columna de agua (Anger 2001). Este patrón no fue observado en larvas preexpuestas sólo a la radiación PAR, las cuales tenían la misma distribución en la columna de agua en todo momento pero, más importante aún, más del 50% de las larvas de este tratamiento permanecieron siempre cerca de la superficie. Esto indicaría que el alimento no sería el limitante, sino más bien que las excursiones descendentes estarían más relacionadas a la necesidad de cambiar su posición en la columna de agua para evitar la RUV. Alternativamente esto podría ser interpretado como un comportamiento particular relacionado con la ausencia de la muda.

Los resultados de laboratorio sugieren que las larvas de *C. altimanus* evitarían las capas superficiales cuando han sido previamente expuestas a la RUV (Fig. 3.6). En un contexto ecológico, los cambios en la posición vertical de las larvas (i.e., alejándose de una potencial preexposición a la RUV en superficie) afectarían fuertemente su mecanismo de dispersión. Ha sido observado previamente que las larvas de *C. altimanus* se dispersan cerca de la superficie del agua luego de la eclosión desde zonas costeras someras hacia áreas pelágicas (Dellatorre 2009). Por eso, las larvas que permanecen menos tiempo cerca de la superficie tendrían menores posibilidades de ser dispersadas, y no serían capaces de alcanzar áreas favorables para sus próximos estadios de desarrollo.

En su ambiente natural, se espera que las larvas tengan uno o varios de los mecanismos para anular o disminuir los daños causados por la RUV. Algunos de ellos son la migración vertical (Alonso et al. 2004; Queiroga y Blanton 2005), reparación del ADN (Gonçalves et al. 2002; Mitchell et al. 2009), y la obtención de compuestos protectores a través de su dieta (e.g., carotenoides, aminoácidos tipo micosporinas) (Newman et al. 2000; Helbling et al. 2002a; Banaszak 2003). Ya se ha demostrado que las larvas de *C. altimanus* tienen CARUV y carotenoides (Capítulo 1). Sin embargo, en el diseño de los experimentos no se realizó la inducción de estos compuestos a través de la alimentación de adultos o larvas con alimentos ricos en CARUV. Por lo tanto, los resultados fueron obtenidos a concentraciones “normales” de estos compuestos que poseen las larvas en la naturaleza, y que podrían variar desde un sitio a otro y dependiendo del alimento disponible.

Se debe tener en cuenta sin embargo, que el éxito promedio de las larvas de *C. altimanus* será el resultado de la interacción de muchos factores que pueden actuar sinérgica o antagónicamente (Dunne 2010). En el caso particular de este experimento, se analizó el efecto de uno de los factores potenciales de estrés (i.e., RUV) y los resultados indican que las dosis sub-letales de RUV podrían tener consecuencias para la población y el ecosistema más significativas que lo anticipado en el Capítulo 1. Queda por explorar si estos efectos negativos de la RUV - observados sobre el desarrollo, el crecimiento y la movilidad- pueden ser contrarrestados por cambios en otras variables como fue observado en el Capítulo 1 y en otros trabajos en los cuales una mayor temperatura puede reducir los daños producidos por la RUV en especies zooplanctónicas (MacFadyen et al. 2004; Sanders et al. 2005; Cooke et al. 2006).

## ***CONCLUSIONES GENERALES***

A continuación, se presentan las conclusiones basadas en los resultados obtenidos al probar las hipótesis propuestas:

Hipótesis N° 1: “*La mortalidad larval se debe a la exposición a la RUV y aumenta con el incremento de la radiación.*” Esta hipótesis **no se rechaza**.

- La mortalidad debida a exposiciones a la RUV-B resultó significativa en larvas Zoea I de las 5 especies de cangrejos estudiadas y presentes en aguas costeras de Patagonia, mientras aquella debida a la RUV-A y PAR resultó insignificante.
- En todos los casos, a mayor nivel de irradiancia de RUV-B se observó una mayor mortalidad larvaria. Por lo tanto, un potencial aumento en la exposición a la RUV-B de estas larvas, en relación con el cambio global, podría generar un incremento de los efectos nocivos sobre estos organismos planctónicos.
- Las larvas de estas especies presentaron dosis letales al 50% (DL<sub>50</sub>) por RUV-B que varió entre dosis de ~15 kJ m<sup>-2</sup> en larvas de *Pachycheles chubutensis* (i.e., la especie más sensible) hasta ~32 kJ m<sup>-2</sup> en larvas de *C. altimanus* (i.e., la especie más resistente). Estos valores son menores a las dosis diarias que pueden ser halladas en superficie en la zona de estudio durante la temporada de eclosión (i.e., hasta 45 kJ m<sup>-2</sup>) por lo cual se podrían esperar efectos nocivos sobre larvas de estas especies cerca de la superficie en horas del día.

Hipótesis N° 2: “*Un aumento de temperatura resultará en una menor mortalidad larval al ser expuestas a RUV.*” Esta hipótesis **no se rechaza**.

- Un aumento de la temperatura genera un aumento en la resistencia a la RUV-B en las dos especies de *Cyrtograpsus*, lo cual sugiere que son especies más adaptadas a condiciones cambiantes de RUV-temperatura, como las que se producen en la superficie marina durante la temporada de eclosión. Esto sugiere que las larvas de estas especies se verían menos afectadas por períodos de exposición a la RUV en condiciones de temperatura incrementada, en un escenario de calentamiento global.

*Hipótesis N° 3: “La bioacumulación de compuestos que absorben RUV depende de la dieta y su acumulación en larvas resultará en una menor mortalidad al ser expuestas a la RUV.”* Esta hipótesis **no se rechaza**.

- Los compuestos fotoprotectores (i.e., CARUV y carotenoides) también parecen cumplir una función determinante en la resistencia de las larvas a la RUV-B, ya que se ha encontrado un “direccionamiento” de dichos compuestos en los tejidos de adultos, siendo mayores las concentraciones encontradas en las gónadas que en los tejidos somáticos (i.e., músculo y caparazón).
- El beneficio en la incorporación de compuestos fotoprotectores, específicamente de CARUV, pudo ser corroborado en larvas de *C. altimanus*. Además, la bioacumulación de compuestos fotoprotectores en las larvas es más eficiente a través de su alimentación que por la transferencia vía materna.

*Hipótesis N° 4: “La mortalidad larval es mayor en los estadios más tempranos (e.g., Zoea I) que en los más desarrollados (e.g., Zoea II y III).”* Esta hipótesis **no se rechaza**.

- Las larvas de *Cyrtograpsus spp.* de los primeros estadios resultaron ser más sensibles a la RUV-B que las larvas de estadios más desarrollados. Esto, sumado a que las larvas de cangrejos tienden a ocupar estratos cada vez más profundos a medida que avanzan en su desarrollo, sugeriría que la influencia de la RUV en los ambientes naturales se produciría principalmente en los estadios más tempranos.

Hipótesis N° 5: “*Las exposiciones a dosis sub-letales de RUV en las larvas resultará en malformaciones, disminución en la tasa de crecimiento y retardo en el desarrollo. Esto resultará en cambios en el “patrón” de comportamiento y distribución en la columna de agua.*” Esta hipótesis **no se rechaza**.

- Se observaron efectos sub-letales de la RUV-B, tanto en el desarrollo como en la movilidad de larvas de *C. altimanus*. Estas larvas presentaron un retardo / ausencia de muda durante el desarrollo, con su consiguiente menor tamaño respecto a las larvas que no fueron expuestas a la RUV-B. Además, las larvas expuestas a la RUV-B mostraron mayor movilidad y menor permanencia cerca de la superficie, lo cual podría implicar un cambio en su comportamiento de dispersión / retención de las áreas costeras donde son liberadas.

A modo de cierre, se plantean algunas interrogantes o líneas futuras de investigación que se desprenden de los resultados obtenidos en esta Tesis:

- Las distintas sensibilidades a la RUV-B que caracterizan a las distintas especies seleccionadas sugiere diferentes grados de desarrollo de los mecanismos adaptativos frente a la radiación. Estas diferencias interespecíficas en la sensibilidad podrían determinar un cambio en la estructura de las comunidades de cangrejos, tal como podría ocurrir si los niveles de RUV-B se mantienen o incrementan en el futuro.
- Queda por dilucidar si el alimento enriquecido con CARUV es igualmente nutritivo al alimento que no fue previamente tratado con RUV, ya que la RUV podría generar cambios en su composición bioquímica o en su estructura celular como fue observado en otros trabajos. Otro aspecto interesante sería poder identificar los CARUV detectados en los cangrejos ya que no pertenecen a ninguno de los MAAs conocidos (según análisis de HPLC realizados), pudiéndose tratar de compuestos aún no descubiertos.

- En el futuro, el estudio de los efectos negativos que puede producir la RUV sobre los organismos debe ser considerado como parte de un “todo”. Su interacción con otros factores del ambiente es fundamental para entender el impacto real sobre los organismos. Dentro de estos factores se encuentra la temperatura, importante en un contexto de calentamiento global, pero también pueden incorporarse otros como la contaminación, la acidificación del agua, etc.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Aarseth KA, Schram TA (1999) Wavelength-specific behaviour in *Lepeophtheirus salmonis* and *Calanus finmarchicus* to ultraviolet and visible light in laboratory experiments (Crustacea: Copepoda). *Marine Ecology Progress Series* 186: 211-217
- Aarseth KA, Schram TA (2002) Susceptibility to ultraviolet radiation in *Calanus finmarchicus* and *Lepeophtheirus salmonis* and the adaptive value of external filtering (Crustacea: Copepoda). *Journal of Plankton Research* 24: 661-679
- Aas E, Hokedal J (1996) Penetration of ultraviolet B, blue and quanta irradiance into Svalbard waters. *Polar Research* 15: 127-138
- Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11: 36-42
- Acha EM, Mianzan H, Guerrero RA, Favero M, Bava J (2004) Marine fronts at the continental shelves of austral South America: Physical and ecological processes. *Journal of Marine Systems* 44: 83-105
- Adams NL (2001) UV radiation evokes negative phototaxis and covering behavior in the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Marine Ecology Progress Series* 213: 87-95
- Adams NL, Carroll AK, Shick JM (1994) Mycosporine-like amino acid (MAA) enriched embryos of the green sea urchin show reduced UV-induced cytokinetic delay: evidence for MAAs as photoprotectants. *American Zoologist* 34: 123A
- Adams NL, Shick JM (2001) Mycosporine-like amino acids prevent UVB-induced abnormalities during early development of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Marine Biology* 138: 267-280
- Alemanni ME, Lozada M, Zagarese HE (2003) Assessing sublethal effects of ultraviolet radiation in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Photochemical and Photobiological Sciences* 2: 867-870
- Alonso C, Zagarese HE, Rocco V, Barriga JP, Battini MA (2004) Surface avoidance by freshwater zooplankton: Field evidence on the role of ultraviolet radiation. *Limnology and Oceanography* 49: 225-232
- Alonso Rodriguez C, Browman HI, Runge JA, St-Pierre JF (2000a) Impact of solar ultraviolet radiation on hatching of a marine copepod, *Calanus finmarchicus*. *Marine Ecology Progress Series* 193: 85-93
- Alonso Rodriguez C, Browman HI, St-Pierre JF (2000b) High survival of neustonic zoea I larvae of American lobster *Homarus americanus* following short-term exposure to ultraviolet radiation (280-400 nm). *Marine Ecology Progress Series* 193: 305-309
- Anger K (2001) The biology of decapod crustacean larvae. A. A. Balkema, Lisse - The Netherlands
- Anger K (2003) Salinity as a key parameter in the larval biology of decapod crustaceans. *Invertebrate Reproduction and Development* 43: 29-45
- Anger K, Thatje S, Lovrich G, Calcagno J (2003) Larval and early juvenile development of *Paralomis granulosa* reared at different temperatures: tolerance of cold and food

- limitation in a lithodid crab from high latitudes. *Marine Ecology Progress Series* 253: 243-251
- Arntz WE, Gorny M, Soto R, Lardies M, Retamal M, Wehrtmann IS (1999) Species composition and distribution of decapod crustaceans in the waters off Patagonia and Tierra del Fuego, South America. *Scientia Marina* 63: 303-314
- Arts MT, Rai H (1997) Effects of enhanced ultraviolet-B radiation on the production of lipid, polysaccharide and protein in three freshwater algal species. *Freshwater Biology* 38: 597-610
- Banaszak AT (2003) Photoprotective physiological and biochemical responses of aquatic organisms. In: Helbling EW, Zagarese HE (eds) *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 329-356
- Banaszak AT, LaJeunesse TC, Trench RK (2000) The synthesis of mycosporine-like amino acids (MAAs) by cultured, symbiotic dinoflagellates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 249: 219-233
- Bancroft BA, Baker NJ, Blaustein AR (2007) Effects of UVB radiation on marine and freshwater organisms: A synthesis through meta-analysis. *Ecology Letters* 10: 332-345
- Bas CC, Spivak ED (2000) Effect of salinity on embryos of two Southwestern Atlantic estuarine grapsid crab species cultures in vitro. *Journal of Crustacean Biology*. 20: 647-656
- Belzile C, Demers S, Ferreyra GA, Schloss I, Nozais C, Lacoste K, Mostajir B, Roy S, Gosselin M, Pelletier E, Giancesella SMF, Vernet M (2006) UV Effects on marine planktonic food webs: A synthesis of results from mesocosm studies. *Photochemistry and Photobiology* 82: 850-856
- Blumthaler M, Webb AR (2003) UVR climatology. In: Helbling EW, Zagarese HE (eds) *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 21-58
- Boltovskoy, D. (1981) *Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental*. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. pp. 936
- Boschi EE (1997) Las pesquerías de crustáceos decápodos en el litoral de la República Argentina. *Investigaciones Marinas* 25: 19-40
- Boschi EE, Fischbach CE, Iorio MI (1992) Catálogo ilustrado de los Crustáceos Estomatópodos y Decápodos marinos de Argentina. *Frente Marítimo* 10: 7-94
- Bowman TE y Abele LG (1982) Classification of the Recent Crustacea. In: *The Biology of Crustacea 1* (Bliss, D. E. ed). Academic Press, New York, pp 1-27
- Bremec C, Cazzaniga N (1984) Consideraciones sobre *Pachycheles haigae* Rodrigues da Costa, 1960 y *P. chubutensis* Boschi, 1963 en Monte Hermoso (República Argentina) (Crustacea, Anomura, Porcellanidae). *Iheringia* 64: 149-162
- Browman HI, Alonso Rodríguez C, Béland F, Cullen JJ, Davis RF, Kouwenberg JHM, Kuhn PS, McArthur BL, Runge JA, St-Pierre JF, Vetter RD (2000) Impact of ultraviolet radiation on marine crustacean zooplankton and ichthyoplankton: a synthesis of results from the estuary and Gulf of St. Lawrence, Canada. *Marine Ecology Progress Series* 199: 293-311

- Buma AGJ, Boelen P, Jeffrey WH (2003) UVR-induced DNA damage in aquatic organisms. In: Helbling EW, Zagarese HE (eds) UV effects in aquatic organisms and ecosystems. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 291-327
- Buma AGJ, Zemmeling HJ, Sjollem K, Gieskes WWC (1996) UVB radiation modifies protein and photosynthetic pigment content, volume and ultrastructure of marine diatoms. *Marine Ecology Progress Series* 142: 47-54
- Cabrera S, Bozzo S, Fuenzalida H (1995) Variations in UV radiation in Chile. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 28: 137-142
- Caddy JF (1989) *Marine Invertebrate Fisheries. Their Assessment and Management*. Wiley and Sons Inc., New York. pp 752
- Carroll AK, Shick JM (1996) Dietary accumulation of UV-absorbing mycosporine-like aminoacids (MAAs) by the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Marine Biology* 124: 561-569
- Cockell CS, Knowland J (1999) Ultraviolet radiation screening compounds. *Biological Reviews* 74: 311-345
- Connelly SJ, Moeller RE, Sanchez G, Mitchell DL (2009) Temperature effects on survival and DNA repair in four freshwater cladoceran *Daphnia* species exposed to UV radiation. *Photochemistry and Photobiology* 85: 144-152
- Cooke SL, Williamson CE, Saros JE (2006) How do temperature, dissolved organic matter and nutrients influence the response of *Leptodiatomus ashlandi* to UV radiation in a subalpine lake? *Freshwater Biology* 51: 1827-1837
- Cullen JJ, Neale PJ (1994) Ultraviolet radiation, ozone depletion, and marine photosynthesis. *Photosynthesis Research* 39: 303-320
- Cummins CP, Greenslade PD, McLeod AR (1999) A test of the effect of supplemental UV-B radiation on the common frog, *Rana temporaria* L., during embryonic development. *Global Change Biology* 5: 471-479
- Damkaer DM, Dey DB (1983) UV damage and photoreactivation potentials of larval shrimp, *Pandalus platyceros*, and adult euphausiids, *Thysanoessa raschii*. *Oecologia* 60: 169-175
- Damkaer DM, Dey DB, Heron GA (1981) Dose / dose rate responses of shrimp larvae to UV-B radiation. *Oecologia* 48: 178-182
- Damkaer DM, Dey DB, Heron GA, Prentice EF (1980) Effects of UV-B radiation on near-surface zooplankton of Puget Sound. *Oecologia* 44: 149-158
- Davenport J, Healy A, Casey N, Heffron JJA (2004) Diet-dependent UVAR and UVBR resistance in the high shore harpacticoid copepod *Tigriopus brevicornis*. *Marine Ecology Progress Series* 276: 299-303
- De los Ríos P, Soto D (2005) Survival of two species of crustacean zooplankton under two chlorophyll concentrations and protection from or exposure to natural ultraviolet radiation. *Crustaceana: International Journal of Crustacean Research* 78: 163-169
- De Mora S, Demers S, Vernet M (2000) *The effect of UV radiation in the marine environment*. Cambridge University Press, Cambridge

- Delhey JKV, Carrete M, Martínez MM (2001) Diet and feeding behaviour of Olrog's Gull *Larus atlanticus* in Bahía Blanca, Argentina. *Ardea* 89: 319-329
- Dellatorre FG (2009) Influencia de factores ambientales sobre la distribución y el asentamiento de larvas de cangrejos braquiuros y anomuros con potencial pesquero en Golfo Nuevo. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Argentina
- Döhler G (1992) Impact of UV-B radiation on uptake of <sup>15</sup>N-ammonia and <sup>15</sup>N-nitrate by phytoplankton of the Wadden Sea. *Marine Biology* 112: 485-489
- Dong Q, Svoboda K, Tiersch TR, Monroe WT (2007) Photobiological effects of UVA and UVB light in zebrafish embryos: Evidence for a competent photorepair system. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 88: 137-146
- Dunlap WC, Chalker BE, Oliver JK (1986) Bathymetric adaptations of reef-building corals at Davies Reef, Great Barrier Reef, Australia. III. UV-B absorbing compounds. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 104: 239-248
- Dunlap WC, Shick JM (1998) Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in coral reef organisms: A biochemical and environmental perspective. *Journal of Phycology* 34: 418-430
- Dunne RP (2010) Synergy or antagonism—interactions between stressors on coral reefs. *Coral Reefs* 29: 145-152
- Environmental Effects Assessment Panel UNEP (2010) Environmental effects of ozone depletion and its interactions with climate change: progress report, 2009. *Photochemical and Photobiological Sciences* 9: 275-294
- Epifanio CE (1988) Dispersal strategies of two species of swimming crab on the continental shelf adjacent to Delaware Bay. *Marine Ecology Progress Series* 49: 243-248
- FAO (2008) Fishstat Plus, V 2.30 Universal software for fisheries statistical time series. <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat>
- Farman JC, Gardiner BG, Shanklin JD (1985) Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO<sub>x</sub>/NO<sub>x</sub> interaction. *Nature* 315: 207-210
- Fischer JM, Fields PA, Pryzbylkowski PG, Nicolai JL, Neale PJ (2006) Sublethal exposure to UV radiation affects respiration rates of the freshwater cladoceran *Daphnia catawba*. *Photochemistry and Photobiology* 82: 547-550
- Forward RB Jr. (2009). Larval Biology of the Crab *Rhithropanopeus harrisi* (Gould): A Synthesis. *Biological Bulletin* 216: 243–256.
- Freitag JF, Steeger HU, Storz UC, Paul RJ (1998) Sublethal impairment of respiratory control in plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae induced by UV-B radiation, determined using a novel biocybernetical approach. *Marine Biology* 132: 1-8
- Fritz JJ, Neale PJ, Davis RF, Peloquin JA (2008) Response of Antarctic phytoplankton to solar UVR exposure: Inhibition and recovery of photosynthesis in coastal and pelagic assemblages. *Marine Ecology Progress Series* 365: 1-16
- Gao K, Li G, Helbling EW, Villafañe VE (2007) Variability of UVR effects on photosynthesis of summer phytoplankton assemblages from a tropical coastal area of the South China Sea. *Photochemistry and Photobiology* 83: 802-809

- Gao KS, Ruan Z, Villafañe VE, Gattuso JP, Helbling EW (2009) Ocean acidification exacerbates the effect of UV radiation on the calcifying phytoplankter *Emiliana huxleyi*. *Limnology and Oceanography* 54: 1855-1862
- García PE, Diéguez MC, Ferraro MA, Zagarese HE, Pérez AP (2010) Mycosporine-like amino acids in freshwater copepods: Potential sources and some factors that affect their bioaccumulation. *Photochemistry and Photobiology* 86: 353-359
- Gayoso AM, Fulco VK (2006) Occurrence patterns of *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech populations in the Golfo Nuevo (Patagonia, Argentina), with observations on ventral porre occurrence in natural and cultured cells. *Harmful Algae* 5: 233-241
- Gebauer P, Paschke K, Anger K (2003) Delayed metamorphosis in decapod crustaceans: evidence and consequences. *Revista Chilena de Historia Natural* 76: 169-175
- Goes JI, Handa N, Taguchi S, Hama T (1994) Effect of UV-B radiation on the fatty acid composition of the marine phytoplankter *Tetraselmis sp.*: relationship to cellular pigments. *Marine Ecology Progress Series* 114: 259-274
- Gonçalves RJ, Barbieri ES, Villafañe VE, Helbling EW (2007) Motility of *Daphnia spinulata* as affected by solar radiation throughout an annual cycle in mid-latitudes of Patagonia. *Photochemistry and Photobiology* 83: 824-832
- Gonçalves RJ, Villafañe VE, Helbling EW (2002) Photorepair activity and protective compounds in two freshwater zooplankton species (*Daphnia menucoensis* and *Metacyclops mendocinus*) from Patagonia, Argentina. *Photochemical and Photobiological Sciences* 1: 996-1000
- Grad G, Williamson CE, Karapelou DM (2001) Zooplankton survival and reproduction responses to damaging UV radiation: A test of reciprocity and photoenzymatic repair. *Limnology and Oceanography* 46: 584-591
- Guerrero RA, Piola AR (1997) Masas de agua en la plataforma continental. En: Boschi EE (ed) *Antecedentes históricos de las exploraciones en el mar y las características ambientales*. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Mar del Plata, pp 107-118
- Häder DP (1997) Penetration and effects of solar UV-B on phytoplankton and macroalgae. *Plant Ecology* 128: 4-13
- Häder DP, Helbling EW, et al. (2011). Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical and Photobiological Sciences* 10: 242-260
- Häder DP, Kumar HD, Smith RC, Worrest RC (2007) Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical and Photobiological Sciences* 6: 267-285
- Hairston NG, Jr (1979) The adaptive significance of color polymorphism in two species of *Diaptomus* (Copepoda). *Limnology and Oceanography* 24: 15-37
- Han T, Sinha RP, Häder DP (2001) UV-A/blue light-induced reactivation of photosynthesis in UV-B irradiated cyanobacterium, *Anabaena sp.* *Journal of Plant Physiology* 158: 1403-1413
- Hansson L-A (2004) Plasticity in pigmentation induced by conflicting threats from predation and UV radiation. *Ecology* 85: 1005-1016

- Hargreaves BR (2003) Water column optics and penetration of UVR. In: Helbling EW, Zagarese HE (eds) UV effects in aquatic organisms and ecosystems. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 59-105
- Harley CDG, Hughes AR, Hultgre KM, Miner BG, Sorte CJB, Thornber CS, Rodriguez LF, Tomanek L, Williams SL (2006) The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters* 9: 228-241
- Hatch AC, Blaustein AR (2000) Combined effects of UV-B, nitrate, and low pH reduce the survival and activity level of larval cascades frogs (*Rana cascadae*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39: 494-499
- Hays GC, Richardson AJ, Robinson C (2005) Climate change and marine plankton. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 337-344
- Helbling EW, Barbieri ES, Marcoval MA, Gonçalves RJ, Villafañe VE (2005) Impact of solar ultraviolet radiation on marine phytoplankton of Patagonia, Argentina. *Photochemistry and Photobiology* 81: 807-818
- Helbling EW, Chalker BE, Dunlap WC, Holm-Hansen O, Villafañe VE (1996) Photoacclimation of antarctic marine diatoms to solar ultraviolet radiation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 204: 85-101
- Helbling EW, Menchi CF, Villafañe VE (2002a) Bioaccumulation and role of UV-absorbing compounds in two marine crustacean species from Patagonia, Argentina. *Photochemical and Photobiological Sciences* 1: 820-825
- Helbling EW, Pérez DE, Medina CD, Lagunas MG, Villafañe VE (2010) Phytoplankton distribution and photosynthesis dynamics in the Chubut River estuary (Patagonia, Argentina) throughout tidal cycles *Limnology and Oceanography* 55: 55-65
- Helbling EW, Villafañe VE, Holm-Hansen O (1994) Effects of ultraviolet radiation on Antarctic marine phytoplankton photosynthesis with particular attention to the influence of mixing. In: Weiler CS, Penhale PA (eds) *Ultraviolet Radiation in Antarctica: Measurements and Biological Effects*. American Geophysical Union, Washington, D.C., pp 207-227
- Helbling EW, Zagarese HE (2003) UV effects in aquatic organisms and ecosystems. The Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Helbling EW, Zaratti F, Sala LO, Palenque ER, Menchi CF, Villafañe VE (2002b) Mycosporine like aminoacids protect the copepod *Boeckella titicacae* (Harding) against high levels of solar UVR. *Journal of Plankton Research* 24: 225-234
- Herman JR, Bhartia PK, Ziemke J, Ahmad Z, Larko D (1996) UV-B increases (1979-1992) from decreases in total ozone. *Geophysical Research Letters* 23: 2117-2120
- Hernando MP, Ferreyra GA (2005) The effects of UV radiation on photosynthesis in an Antarctic diatom (*Thalassiosira sp.*): Does vertical mixing matter? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 325: 35-45
- Hessen D, De Lange H, Van Donk E (1997) UV-induced changes in phytoplankton cells and its effects on grazers. *Freshwater Biology* 38: 513-524
- Hessen DO (2003) UVR and pelagic metazoans. In: Helbling EW, Zagarese HE (eds) *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 1-575

- Hessen DO, Leu E, Færøvig PJ, Petersen SF (2008) Light and spectral properties as determinants of C:N:P-ratios in phytoplankton. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 55
- Hoffman JR, Hansen LJ, Klinger T (2003) Interactions between UV radiation and temperature limit inferences from single-factor experiments. *Journal of Phycology* 39: 268-272
- Holm-Hansen O, Helbling EW, Lubin D (1993) Ultraviolet radiation in Antarctica: inhibition of primary production. *Photochemistry and Photobiology* 58: 567-570
- Hough AM, Derwent RG (1990) Changes in the global concentration of tropospheric ozone due to human activities. *Nature* 344: 645-648
- Hovel KA, Morgan SG (1999) Susceptibility of estuarine crab larvae to ultraviolet radiation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 237: 107-125
- Hoyer K, Karsten U, Wiencke C (2002) Induction of sunscreen compounds in Antarctic macroalgae by different radiation conditions. *Marine Biology* 141: 619-627
- IPCC (2007) *Climate Change 2007: The physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, New York (USA)
- Janknegt PJ, De Graaff M, Van de Poll W, Visser RJ, Helbling EW, Buma AGJ (2009) Antioxidative responses of two marine microalgae during acclimation to static and fluctuating natural UV radiation. *Photochemistry and Photobiology* 85: 1336-1345
- Jones AE, Shanklin JD (1995) Continued decline of total ozone over Halley, Antarctica, since 1985. *Nature* 376: 409-411
- Karanas JJ, Van Dyke H, Worrest RC (1979) Midultraviolet (UV-B) sensitivity of *Acartia clausii* Giesbrecht (Copepoda). *Limnology and Oceanography* 24: 1104-1116
- Karanas JJ, Worrest RC, Van Dyke H (1981) Impact of UV-B radiation on the fecundity of the copepod *Acartia clausii*. *Marine Biology* 65: 125-133
- Karentz D, Bosch I, Mitchell DM (2004) Limited effects of Antarctic ozone depletion on sea urchin development. *Marine Biology* 145: 277-292
- Karentz D, Lutze LH (1990) Evaluation of biologically harmful ultraviolet radiation in Antarctica with a biological dosimeter designed for aquatic environments. *Limnology and Oceanography* 35 (3): 549-561
- Karentz D, McEuen FS, Land MC, Dunlap WC (1991) Survey of mycosporine-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. *Marine Biology* 108: 157-166
- Kessler K, Lockwood RS, Williamson CE, Saros JE (2008) Vertical distribution of zooplankton in subalpine and alpine lakes: Ultraviolet radiation, fish predation, and the transparency-gradient hypothesis. *Limnology and Oceanography* 53: 2374-2382
- Kingsford MJ, Leis JM, Shanks AL, Lindeman KC, Morgan SG, Pineda J (2002) Sensory environments, larval abilities and local self-recruitment. *Bulletin of Marine Science* 70: 309-340
- Kirchhoff VWJH, Schuch NJ, Pinheiro DK, Harris JM (1996) Evidence for an ozone hole perturbation at 30° south. *Atmospheric Environment* 30: 1481-1488

- Kouwenberg JHM, Browman HI, Runge HA, Cullen JJ, Davis RF, St-Pierre JF (1999) Biological weighting of ultraviolet (280-400 nm) induced mortality in marine zooplankton and fish. II. *Calanus finmarchicus* (Copepoda) eggs. *Marine Biology* 134: 285-293
- Kuffner IB (2001) Effects of ultraviolet (UV) radiation on larval settlement of the reef coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Ecology Progress Series* 217: 251-261
- Lamare MD, Barker MF, Lesser MP, Marshall C (2006) DNA photorepair in echinoid embryos: Effects of temperature on repair rate in Antarctic and non-Antarctic species. *The Journal of Experimental Biology* 209: 5017-5028
- Lamprecht MR, Sabatini DM, Carpenter AE (2007) CellProfiler™: free, versatile software for automated biological image analysis. *BioTechniques* 42: 71-75
- Leech DM, Williamson CE (2000) Is tolerance to UV radiation in zooplankton related to body size, taxon, or lake transparency? *Ecological Applications* 10: 1530-1540
- Leech DM, Williamson CE, Moeller RE, Hargreaves BR (2005) Effects of ultraviolet radiation on the seasonal vertical distribution of zooplankton: a database analysis. *Archiv für Hydrobiologie* 162: 445-464
- Lermanda MP, Urrutia C, Novoa V, Rudolph A (2009) Efecto del EDTA sobre la toxicidad del cromo (VI) en el desarrollo larval de *Petrolisthes laevigatus* (Guérin, 1835). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 44: 137-143
- Lesser MP (1996) Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnology and Oceanography* 41: 271-283
- Lesser MP, Farrell JH, Walker CW (2001) Oxidative stress, DNA damage and p53 expression in the larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to ultraviolet (290-400 nm) radiation. *The Journal of Experimental Biology* 204: 157-164
- Longhurst A, Sathyendranath S, Platt T, Caverhill C (1995) An estimate of global primary production in the ocean from satellite radiometer data. *Journal of Plankton Research* 17: 1245-1271
- Lubin D, Jensen EH (1995) Effects of clouds and stratospheric ozone depletion on ultraviolet radiation trends. *Nature* 377: 710-713
- MacFadyen EJ, Williamson CE, Grad G, Lowery M, Wade JH, Mitchell DL (2004) Molecular response to climate change: temperature dependence of UV-induced DNA damage and repair in the freshwater crustacean *Daphnia pulicaria*. *Global Change Biology* 10: 408-416
- Madronich S (1993) The atmosphere and UV-B radiation at ground level. In: Young AR, Björn LO, Moan J, Nultsch W (eds) *Environmental UV photobiology*. Plenum Press, New York, pp 1-39
- Madronich S (2007) Analytic formula for the Clear-sky UV Index. *Photochemistry and Photobiology* 83: 1537-1538
- Malloy KD, Holman MA, Mitchell DL, Dietrich III HW (1997) Solar UVB-induced DNA damage and photoenzymatic DNA repair in antarctic zooplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 1258-1263

- Marcovall MA, Villafañe VE, Helbling EW (2007) Interactive effects of ultraviolet radiation and nutrient addition on growth and photosynthesis performance of four species of marine phytoplankton. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 89: 78-87
- Marinone MC, Marque SM, Suarez DA, Dieguez MDC, Perez P, Rios PDL, Soto D, Zagarese HE (2006) UV radiation as a potential driving force for zooplankton community structure in Patagonian lakes. *Photochemistry and Photobiology* 82: 962-971
- Marta-Almeida M, Dubert J, Peliz Á, Queiroga H (2006). Influence of vertical migration pattern on retention of crab larvae in a seasonal upwelling system. *Marine Ecology Progress Series* 307: 1-19
- McClintock JB, Karentz D (1997) Mycosporine-like amino acids in 38 species of subtidal marine organisms from McMurdo Sound, Antarctica. *Antarctic Science* 9: 392-398
- McKenzie R, Aucamp PJ, Bais A, Björn LO, Ilyas M, Madronich S (2011) Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochemical and Photobiological Sciences* 10
- McNamara AE, Hill WR (1999) Effects of UV-B dose and irradiance: Comparison among grazers. *Journal of North American Benthological Society* 18: 370-380
- Miller TJ, Crowder LB, Rice JA, A. ME (1988) Larval size and recruitment mechanisms in fishes: Toward a conceptual framework *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45: 1657-1670
- Misonou T, Saitoh J, Oshiba S, Tokitomo Y, Maegawa M, Inoue Y, Hori H, Sakurai T (2003) UV-absorbing substance in the red alga *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) block thymine photodimer production. *Marine Biotechnology* 5: 194-200
- Mitchell DL, Adams-Deutsch T, Olson MH (2009) Dose dependence of DNA repair in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae exposed to UV-B radiation. *Photochemical and Photobiological Sciences* 8: 75-81
- Mitchell DL, Karentz D (1993) The induction and repair of DNA photodamage in the environment. In: Young AR, Björn LO, Moan J, Nultsch W (eds) *Environmental UV Photobiology*. Plenum Press, New York, pp 345-377
- Moeller RE, Gilroy S, Williamson CE, Grad G, Sommaruga R (2005) Dietary acquisition of photoprotective compounds (mycosporine-like amino acids, carotenoids) and acclimation to ultraviolet radiation in a freshwater copepod. *Limnology and Oceanography* 50: 427-439
- Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R (2009) Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters* 12: 75-92
- Moreno CA, Jara HF (1984) Ecological studies on fish fauna associated with *Macrocystis pyrifera* belts in the south of Fuegian Islands, Chile. *Marine Ecology Progress Series* 15: 99-107
- Morgan SG (1995) Life and death in the plankton: Larval mortality and adaptation. In: L. M (ed) *Ecology of Marine Invertebrate Larvae* CSC Press, Boca Raton, pp 279-321
- Morgan SG (1995) Life and death in the plankton: Larval mortality and adaptation. In: L. M (ed) *Ecology of Marine Invertebrate Larvae* CSC Press, Boca Raton, pp 279-321

- Morgan SG (1995) Life and death in the plankton: Larval mortality and adaptation. In: L. M (ed) Ecology of marine invertebrate larvae. CSC Press, Boca Raton, pp 279-321
- Morgan SG, Christy JH (1996) Survival of marine larvae under the countervailing selective pressures of photodamage and predation. *Limnology and Oceanography* 41: 498-504
- Neale PJ, Banaszak AT, Jarriel CR (1998) Ultraviolet sunscreens in *Gymnodinium sanguineum* (Dinophyceae); Mycosporine-like amino acids protect against inhibition of photosynthesis. *Journal of Phycology* 34: 928-938
- Nelson GC, Bennet E, Berhe AA, Cassman K, DeFries R, Dietz T, Dobermann A, Dobson A, Janetos A, Levy M, Marco D, Nakicenovic N, O'Neill B, Norgaard R, Petschel-Held G, Ojima D, Pingali P, Watson R, Zurek M (2006) Anthropogenic drivers of ecosystem change: An overview. *Ecology and Society* 11: 29 [online]
- Newman SJ, Dunlap WC, Nicol S, Ritz D (2000) Antarctic krill (*Euphausia superba*) acquire a UV-absorbing mycosporine-like amino acid from dietary algae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 255: 93-110
- Ogbebo FE, Ochs C (2008) Bacterioplankton and phytoplankton production rates compared at different levels of solar ultraviolet radiation and limiting nutrient ratios. *Journal of Plankton Research* 30: 1271-1284
- Olson MH, Mitchell DL (2006) Interspecific variation in UV defense mechanisms among temperate freshwater fishes. *Photochemistry and Photobiology* 82: 606-610
- Orce VL, Helbling EW (1997) Latitudinal UVR-PAR measurements in Argentina: Extent of the "ozone hole". *Global and Planetary Change* 15: 113-121
- Pahkala M, Laurila A, Merilä J (2001) Carry-over effects of ultraviolet-B radiation on larval fitness in *Rana temporaria*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 268: 1699-1706
- Palma ED, Matano RP y Piola AR (2008) A numerical study of the Southwestern Atlantic Shelf circulation: Barotropic response to tidal and wind forcing. *Journal of Geophysical Research* 109
- Peachey RBJ (2005) The synergism between hydrocarbon pollutants and UV radiation: A potential link between coastal pollution and larval mortality. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 315: 103-114
- Pechenik JA (2006) Larval experience and latent effects—metamorphosis is not a new beginning. *Integrative and Comparative Biology* 46: 323-333
- Persaud AD, Moeller RE, Williamson CE, Burns CW (2007) Photoprotective compounds in weakly and strongly pigmented copepods and co-occurring cladocerans. *Freshwater Biology* 52: 2121-2133
- Persaud AD, Williamson CE (2005) Ultraviolet and temperature effects on planktonic rotifers and crustaceans in northern temperate lakes. *Freshwater Biology* 50: 467-476
- Queiroga H, Blanton J (2005) Interactions between behaviour and physical forcing in the control of horizontal transport of Decapod crustacean larvae. *Advances in Marine Biology* 47: 107-214

- Queiroga H, Costlow J D Jr. and Moreira MH (1994). Larval abundance patterns of *Carcinus maenas* (Decapoda, Brachyura) in Canal de Mira (Ria de Aveiro, Portugal). *Marine Ecology Progress Series* 111: 63–72
- Rautio M, Bonilla S, Vincent WF (2009) UV photoprotectants in arctic zooplankton. *Aquatic Biology* 7: 93-105
- Rhode SC, Pawlowski M, Tollrian R (2001) The impact of ultraviolet radiation on the vertical distribution of zooplankton of the genus *Daphnia*. *Nature* 412: 69-72
- Rieger PJ, Ramos Vieira RR (1997) Desenvolvimento larval de *Cyrtograpsus angulatus* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) em laboratório. *Revista Brasileira de Zoologia* 14: 601-623
- Riemer U, Lamare MD, Peake BM (2007) Temporal concentrations of sunscreen compounds (Mycosporine-like Amino Acids) in phytoplankton and in the New Zealand krill, *Nyctiphanes australis* G.O. Sars. *Journal of Plankton Research* 29: 1077-1086
- Rivas AL, Beier EJ (1990) Temperature and salinity fields in the north Patagonic gulfs. *Oceanologica Acta* 13: 15-20
- Rothschild LJ (1999) The influence of UV radiation on protistan evolution. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46: 548-555
- Rowland FS (2006) Stratospheric ozone depletion. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361: 769-790
- Roy S (2000) Strategies for the minimization of UV-induced damage. In: De Mora SJ, Demers S, Vernet M (eds) *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 177-205
- Rozema J, van Geel B, Björn L-O, Lean J, Madronich S (2002) Toward solving the UV puzzle. *Science* 296: 1621-1622
- Sanders RW, Macaluso AL, Sardina TJ, Mitchell DL (2005) Photoreactivation in two freshwater ciliates: Differential responses to variations in UV-B flux and temperature. *Aquatic Microbial Ecology* 40: 283-292
- Scelzo MA, Lichtschein de Bastida V (1979) The larval development and metamorphosis of the crab *Cyrtograpsus altimanus* Rathbun, 1914 (Brachyura, Grapsidae) in the laboratory, with observations on the ecology of the specie. *Physis Sección A* 38: 103-126
- Setlow RB, Grist E, Thompson K, Woodhead AD (1993) Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 6666-6670
- Shick JM, Dunlap WC (2002) Mycosporine-like amino acids and related gadusols: Biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annual Review of Physiology* 64: 223-262
- Shick JM, Lesser MP, Jokiel PL (1996) Effects of ultraviolet radiation on corals and other coral reef organisms. *Global Change Biology* 2: 527-545
- Siegel DA, Maritorena S, Nelson NB, Hansell DA, Lorenzi-Kayser M (2002) Global distribution and dynamics of colored dissolved and detrital organic materials. *Journal of Geophysical Research* 107: 3228, doi:10.1029/2001JC000965

- Sinha RP, Gröniger A, Klisch M, Häder DP (2002) Ozone depletion and ultraviolet-B radiation: Impacts on aquatic organisms. *Recent Research Developments in Photochemistry and Photobiology* 6: 95-106
- Sinha RP, Häder D-P (2002) UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical and Photobiological Sciences* 1 225 -236
- Smith RC, Baker KS (1979) Penetration of UV-B and biologically effective dose-rates in natural waters. *Photochemistry and Photobiology* 29: 311-323
- Sobrino C, Neale PJ (2007) Short-term and long-term effects of temperature on photosynthesis in the diatom *Thalassiosira pseudonana* under UVR exposures. *Journal of Phycology* 43: 426-436
- Sommaruga R (2010) Preferential accumulation of carotenoids rather than of mycosporine-like amino acids in copepods from high altitude Himalayan lakes. *Hydrobiologia* 648: 143-146
- Sommaruga R, Garcia-Pichel F (1999) UV-absorbing mycosporine-like compounds in planktonic and benthic organisms from a high-mountain lake. *Archiv für Hydrobiologie* 144: 255-269
- Spivak ED (1997) Los crustáceos decápodos del Atlántico sudoccidental (25°-55°S): distribución y ciclos de vida. *Investigaciones Marinas* 25: 69-91
- Tank SE, Schindler DW, Arts MT (2003) Direct and indirect effects of UV radiation on benthic communities: epilithic food quality and invertebrate growth in four montane lakes. *Oikos* 103: 651-667
- Tartarotti B, Sommaruga R (2002) The effect of different methanol concentrations and temperatures on the extraction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in algae and zooplankton. *Archiv für Hydrobiologie* 154: 691-703
- Tartarotti B, Sommaruga R (2006) Seasonal and ontogenetic changes of mycosporine-like amino acids in planktonic organisms from an alpine lake. *Limnology and Oceanography* 51: 1530-1541
- Tartarotti B, Torres JJ (2009) Sublethal stress: Impact of solar UV radiation on protein synthesis in the copepod *Acartia tonsa*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 375: 106-113
- Tedetti M, Sempéré R (2006) Penetration of ultraviolet radiation in the marine environment. A review. *Photochemistry and Photobiology* 82: 389-397
- Thiyagarajan V, Pechenik JA, Gosselin LA, Qian PY (2007) Juvenile growth in barnacles: combined effect of delayed metamorphosis and sub-lethal exposure of cyprids to low-salinity stress. *Marine Ecology Progress Series* 344: 173-184
- Van Donk E, Hessen DO (1995) Reduced digestibility of UV-B stressed and nutrient-limited algae by *Daphnia magna*. *Hydrobiologia* 307: 147-151
- Vega MP, Pizarro RA (2000) Oxidative stress and defence mechanisms of the freshwater cladoceran *Daphnia longispina* exposed to UV radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 54: 121-125

- Villafañe VE, Barbieri ES, Helbling EW (2004b) Annual patterns of ultraviolet radiation effects on temperate marine phytoplankton off Patagonia, Argentina. *Journal of Plankton Research* 26: 167-174
- Villafañe VE, Marcoval MA, Helbling EW (2004a) Photosynthesis versus irradiance characteristics in phytoplankton assemblages off Patagonia (Argentina): Temporal variability and solar UVR effects. *Marine Ecology Progress Series* 284: 23-34
- Villafañe VE, Sundbäck K, Figueroa FL, Helbling EW (2003) Photosynthesis in the aquatic environment as affected by UVR. In: Helbling EW, Zagarese HE (eds) *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. Royal Society of Chemistry, pp 357-397
- Williamson CE, Grad G, De Lange HJ, Gilroy S (2002) Temperature-dependent ultraviolet responses in zooplankton: Implications of climate change. *Limnology and Oceanography* 47: 1844-1848
- Williamson CE, Neale PJ, Grad G, De Lange HJ, Hargreaves BR (2001a) Beneficial and detrimental effects of UV on aquatic organisms: Implications of spectral variation. *Ecological Applications* 11: 1843-1857
- Williamson CE, Olson OG, Lott SE, Walker ND, Engstrom DR, Hargreaves BR (2001b) Ultraviolet radiation and zooplankton community structure following deglaciation in Glacier Bay, Alaska. *Ecology* 82: 1748-1760
- Wold A, Norrbin F (2004) Vertical migration as a response to UVR stress in *Calanus finmarchicus* females and nauplii. *Polar Research* 23: 27-34
- Wübben DL (2000) UV-induced mortality of zoea I larvae of brown shrimp *Crangon crangon* (Linnaeus, 1758). *Journal of Plankton Research* 22: 2095-2104
- Wübben DL, Vareschi E (2001) Differential UVB-sensitivities of five New Zealand freshwater zooplankton species. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 35: 635-645
- Wyngaard JG, Iorio MI, Boschi EE (2001) ¿Es viable el desarrollo de pesquerías de cangrejos en la Argentina? Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero - INIDEP: 9
- Ylönen O, Heikkilä J, Karjalainen J (2004) Metabolic depression in UV-B exposed larval coregonids. *Annual Zoology Fennici* 41: 577-585
- Young CM (1995) Behaviour and locomotion during the dispersal phase of larval life. In: McEdward L (ed) *Ecology of Marine Invertebrate Larvae*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 249-277
- Zagarese HE, Cravero W, González P, Pedrozo F (1998a) Copepod mortality induced by fluctuating levels of natural ultraviolet radiation simulating vertical water mixing. *Limnology and Oceanography* 43: 169-174
- Zagarese HE, Cravero WR, Villafañe VE, Helbling EW (1998b) Efecto de la radiación ultravioleta sobre los ecosistemas acuáticos. *Ciencia Hoy* 8: 22-29
- Zagarese HE, Feldman M, Williamson CE (1997) UV-B induced damage and photoreactivation in three species of *Boeckella* (Copepoda, Calanoida). *Journal of Plankton Research* 19: 357-367
- Zar JH (1999) *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ

***Anexo 1:***

Article

## Combined Effects of UVR and Temperature on the Survival of Crab Larvae (Zoea I) from Patagonia: The Role of UV-Absorbing Compounds

Rodrigo D. Hernández Moresino and E. Walter Helbling \*

Estación de Fotobiología Playa Unión and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Casilla de Correos N° 15 (9103) Rawson, Chubut, Argentina; E-Mail: [efpu@efpu.org.ar](mailto:efpu@efpu.org.ar)

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: [whelbling@efpu.org.ar](mailto:whelbling@efpu.org.ar); Tel.: +54-2965-498-019.

Received: 22 April 2010; in revised form: 12 May 2010 / Accepted: 21 May 2010 /

Published: 25 May 2010

---

**Abstract:** The aim of our study was to assess the combined impact of UVR (280–400 nm) and temperature on the first larval stage (Zoea I) of three crab species from the Patagonian coast: *Cyrtograpsus altimanus*, *C. angulatus*, and *Leucippa pentagona*. We determined the survival response of newly hatched Zoea I after being exposed for 8–10 h under a solar simulator (Hönle SOL 1200) at 15 and 20 °C. There was no mortality due to Photosynthetic Active Radiation (PAR, 400–700 nm) or ultraviolet-A radiation (UV-A, 315–400 nm), and all the observed mortality was due to ultraviolet-B radiation (UV-B, 280–315 nm). The data of larval mortality relative to exposure time was best fit using a sigmoid curve. Based on this curve, a threshold (Th) and the lethal dose for 50% mortality (LD<sub>50</sub>) were determined for each species. Based on the Th and LD<sub>50</sub>, *C. altimanus* was found to be the most resistant species, while *L. pentagona* was found to be the most sensitive to UV-B. For both species of *Cyrtograpsus*, mortality was significantly lower at 20 °C than at 15 °C; however, no significant differences between the two temperature treatments were found in *L. pentagona*. Bioaccumulation of UV-absorbing compounds in the gonads and larvae of *C. altimanus*, and to a lesser extent in *C. angulatus*, might have contributed for counteracting the impact of UV-B. However, most of the resilience to UV-B observed with the increase in temperature might be due to an increase in metabolic activity caused by a repair mechanism mediated by enzymes.

**Keywords:** crab; larvae; mortality; Patagonia; temperature; ultraviolet; UV-absorbing compounds

---

## 1. Introduction

Climate change, due to anthropogenic activities, has two main outcomes *i.e.*, the increase of ultraviolet radiation (UVR, 280–400 nm), especially of UV-B (280–315 nm), due to ozone depletion, and the increase in temperature due to the release of greenhouse gases. Both have important consequences for organisms and ecosystems [1,2]. On the one hand, solar radiation is the driving energy that makes possible the production of organic matter *via* photosynthesis by autotrophic organisms. Most photosynthetic processes use Photosynthetic Active Radiation (PAR, 400–700 nm). On the other hand, solar UVR, both at normal and enhanced levels, has been found to cause biological damage. The negative impact of UV-B radiation on various targets of aquatic organisms (e.g., DNA, photosystems, proteins, *etc.*) has been particularly well documented in the literature [3–5]. However, UV-A radiation (315–400 nm) has been found to be both beneficial by participating in photosynthesis and repair processes, as well as detrimental, by inducing reactive oxygen species [6–8] and also by adversely affecting the performance of photosystem II [9,10]. Previous studies have highlighted the importance of an increase in temperature, at least as seen in a higher growth rate—of almost five-fold—in the larvae of the crab *Paralomis granulosa*, when comparing the rates at 15 °C and at 3 °C [11]. Additionally, a temperature increase resulted in lower mortality of zooplankton due to the higher effectiveness of enzymatic activity, including the activities of those proteins involved in the photorepair mechanism [12–14]. However, some stenotherm species may not be able to cope with a potential increase in temperature. For example, studies carried out with *Asplanchna girodi* [12] demonstrated that the UVR tolerance was significantly reduced with elevated temperatures.

While extensive literature on the separate effects of these two stressors (*i.e.*, temperature and UVR) upon diverse aspects of performance within aquatic organisms is currently available, as of today, little is known about the combined effects of them. This is important as they can act synergistically or antagonistically [15]. An early study carried out with symbiotic algae reported significantly higher cellular concentrations of superoxide radicals and hydrogen peroxide when the cultures were exposed to elevated temperatures, both with and without exposure to UVR [16]. The overall responses seem to have a high degree of species-specificity [17]. The acclimation or repair capacities, of the organisms influences the observed impacts [14]. It is noteworthy to mention the role of UV-absorbing compounds (*i.e.*, mycosporine like amino acids, MAAs) in protecting an important number of organisms against UVR stress (at least partially), ranging from phytoplankton, to macroalgae, zooplankton and invertebrates [18,19]. Besides, organisms may display one or more mechanisms to repair the damage caused by UVR [9], as some of them are temperature-dependent. Overall, responses to different abiotic variables are the result of highly complex interactions within the organism.

In an attempt to assess such responses to abiotic variables, the aim of this study was to evaluate the combined effects of both UVR and temperature on three crab larvae species that are characteristic of the Argentinean Sea: *Cyrtograpsus altimanus*, *Cyrtograpsus angulatus* and *Leucippa pentagona* (Crustacea, Decapoda). A number of reasons guarantee the importance of working with these species of Decapoda: Firstly, in the temperate—cold waters of the SW Atlantic Ocean, 39 species of decapod crustaceans were described [20,21]. Some of these species are important links in the food web, and constitute a large part of the diet for predators such as fish [22] and seabirds [23]. Furthermore, some decapod crustaceans are of commercial importance. They command high market prices [24,25].

Additionally, the life cycle of crabs, as well as that of many other marine invertebrates, has a planktonic larval phase, after which metamorphosis and settlement occur. During this larval phase, and especially during the Zoea, high mortality (>80%) has been reported [26]. This is mainly due to biotic factors, such as predation and lack of food and also because of abiotic factors, such as solar radiation and temperature [27]. Finally, particular species used in our experimentation account for a high proportion of the total larvae present in the water column: 35% of *Cyrtograpsus spp.* and 11% in *L. pentagona* [28].

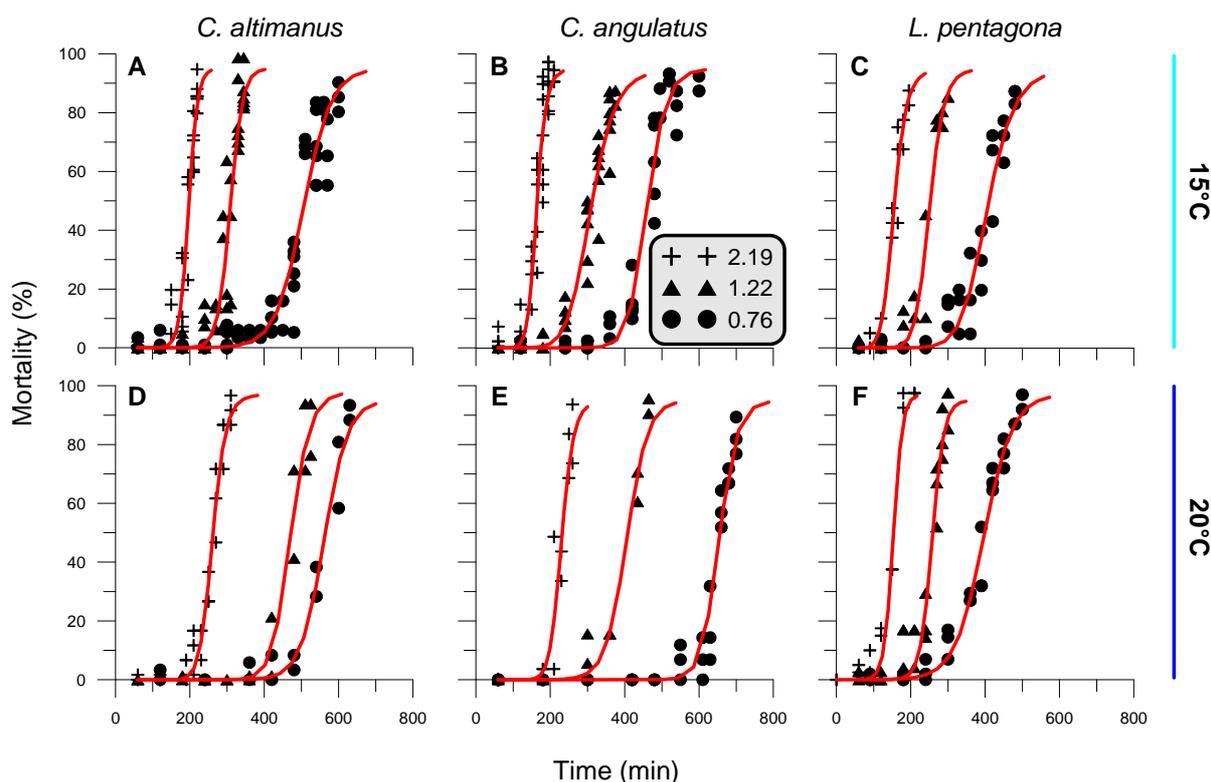
To achieve our objective, we exposed newly hatched crab larvae to three ultraviolet radiation levels (*i.e.*, using a solar simulator) while incubating them to two temperatures of 15 °C and 20 °C. Both sets of conditions are ecologically relevant as they are similar to the observed conditions on the sea surface during the study period. In addition, an increase in temperature during the early spawning season simulated an extreme change condition for future climate change scenarios [29]. After the incubation period, we evaluated the mortality and correlated our results with the presence of UV-absorbing compounds and carotenoids. The results of this work seem straightforward. On the one hand, we have gained knowledge on the effects of both UVR and temperature on these organisms (which have been poorly sampled within the context of both global change and Patagonian ecosystems). On the other hand, we can speculate on the potential implications of these stressors to local ecosystems.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. General responses of crab larvae to radiation and temperature

No significant larval mortality was determined in samples exposed to Photosynthetic Active Radiation (PAR) + ultraviolet-A (UV-A) radiation (PA treatment) or to PAR alone—P treatment (<7%,  $P > 0.11$ ). On the other hand, significant mortality was observed in all experiments in samples exposed to full simulated solar radiation (*i.e.*, PAR + UV-A + UV-B, PAB treatment). Therefore, we will only present the results for all crab larvae that received full radiation under the different irradiance/temperature conditions (Figure 1). The fact that larval mortality was only due to UV-B radiation is consistent with previous findings obtained with shrimp larvae [30,31] and with other crab larvae species [32]. The mortality, as a function of the exposure time, varied according to the irradiance and temperature conditions at which the larvae were exposed and incubated. However, the general response was of a rather constant mortality prior to that of threshold value. After that, mortality increased significantly as time progressed, reaching 100% towards the end of the experiments. Sigmoid curves were the best fit to describe mortality as a function of exposure time. Three parameters were determined and used to compare the responses and sensitivity of species under the different experimental conditions: (a) A threshold value ( $T_h$ ) below which no mortality was detected. This threshold was set at the first maximum gradient of change in the curve, mortality *vs.* time/dose; (b) The lethal dose at which 50% of the larvae died ( $LD_{50}$ ); and (c) The mortality rate, as the slope of mortality *vs.* time.

**Figure 1.** Larvae mortality (%), as a function of exposure time, for samples under the PAB treatment exposed to UV-B irradiances of 2.19, 1.22 and 0.76 W m<sup>-2</sup>, and temperatures of 15 and 20 °C. **A**, **B**, and **C** are experiments carried out with larvae exposed at 15 °C; **D**, **E**, and **F** are experiments carried out with larvae exposed at 20 °C. A total of 28 experiments were done, with at least one experiment (with triplicates) for each irradiance-temperature condition. Each symbol in the Figure represents the mean of the triplicates and the red curves are the best fit lines for each irradiance condition.

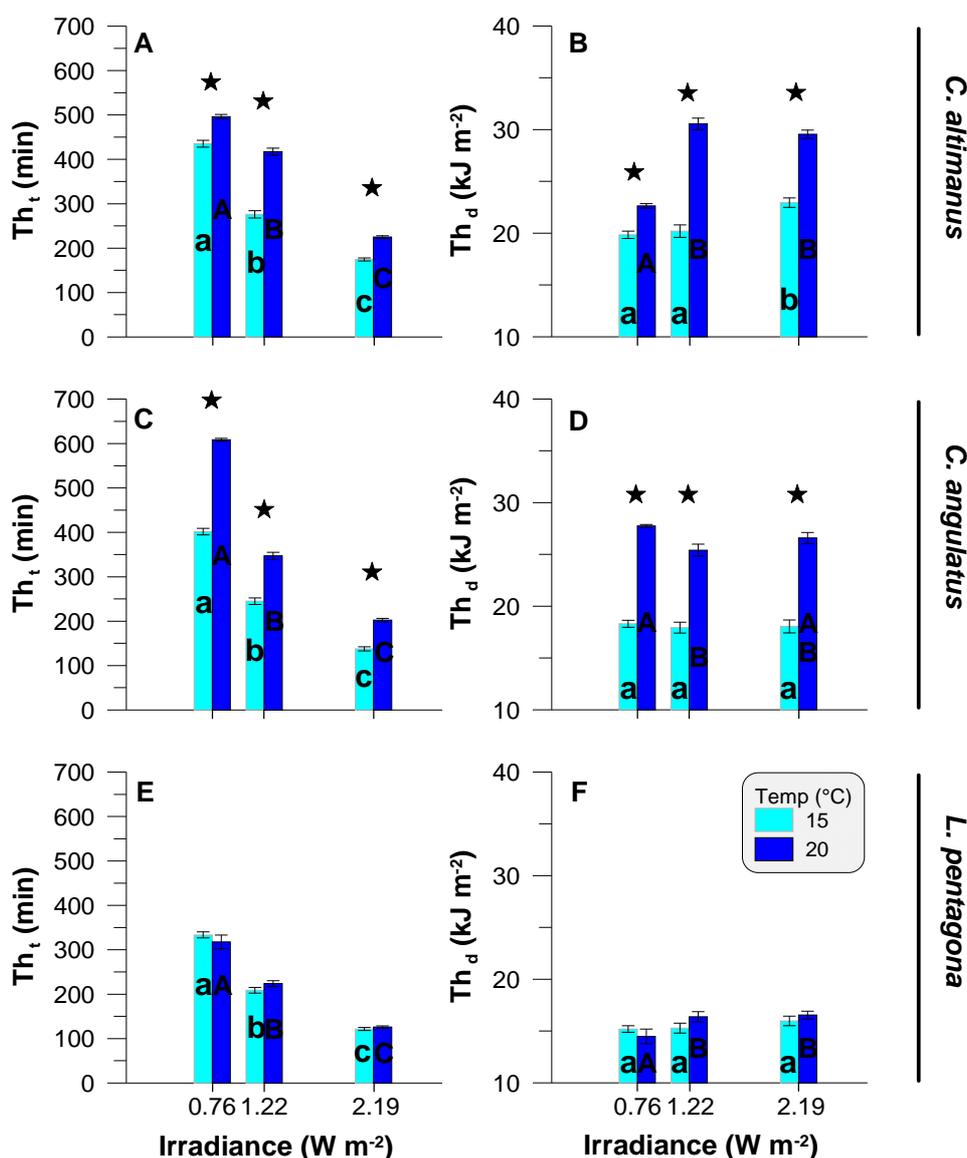


## 2.2. Threshold

In order to compare data obtained between the irradiance and temperature treatments, we calculated the threshold ( $Th$ ) values based both on time ( $Th_t$ ) and on the dose ( $Th_d$ ) associated with each irradiance level (Figure 2). For all species,  $Th_t$  values were negatively correlated with the irradiance level at both temperatures (Figures 2A, 2C and 2E).  $Th_t$  values were significantly lower ( $P < 0.01$ ,  $F(2, 6) > 990$ ) when the larvae were exposed to higher UV-B irradiances (*i.e.*,  $Th_t$  at 2.19 W m<sup>-2</sup> <  $Th_t$  at 1.22 W m<sup>-2</sup> <  $Th_t$  at 0.76 W m<sup>-2</sup>). In both species of *Cyrtograpsus*,  $Th_t$  was significantly higher at 20 °C than at 15 °C ( $P < 0.01$ ,  $F(1, 4) > 175$ ), within each irradiance level (Figures 2A and 2C), suggesting a higher resistance at 20 °C. For *L. pentagona*, however, there were no significant differences in threshold values between temperatures within each irradiance level (Figure 2E). The  $Th_d$  values (Figures 2B, 2D and 2F) were significantly different between temperatures for *C. altimanus* ( $P < 0.01$ ,  $F(1, 16) = 29.39$ , Figure 2B) and for *C. angulatus* ( $P < 0.01$ ,  $F(1, 16) = 460.42$ , Figure 2D), but not for *L. pentagona* ( $P = 0.42$ ,  $F(1, 16) = 0.68$ , Figure 2F). On the other hand, there were no differences in  $Th_d$  among two or more irradiance levels within each species, thus suggesting that the larvae started to die, in general, at approximately the same

dose. However, for *C. altimanus* (Figure 2B), the  $Th_d$  at 20 °C was significantly lower ( $P < 0.01$ ,  $F(1, 7) = 303.51$ ) at  $0.76 \text{ W m}^{-2}$  than at the other two irradiance levels. This indicates that the *C. altimanus* larvae started to die at a lower dose as compared to the other two irradiance levels, similarly to found in previous studies [33] carried out with the rotifer *Asplanchna girodi* and in the cladocera *Daphnia pulex*, where short incubations at high UVR irradiances were less lethal than long-term exposure to low UVR irradiances. These authors [33] speculated that photoenzymatic repair (PER) was not linear in animals, and that there was a clear link between PER and reciprocity (*i.e.*, the effect of dosage is independent of the effects of irradiance or dose rate).

**Figure 2.** Threshold values for the three larvae species as a function of the UV-B irradiance level. Panels A, C, and E are the thresholds expressed in minutes of exposure ( $Th_t$ ), while panels B, D, and F are the thresholds ( $Th_d$ ) expressed in  $\text{kJ m}^{-2}$ . The values are the mean and standard deviation ( $n \geq 3$ ). The \* on top of the bars indicates differences between temperatures for each irradiance level. Lower case and capital letters indicate differences among irradiances at 15 °C and 20 °C, respectively.



In most of our experiments,  $Th_d$  values were similar within the same temperature. However, in the case of both *Cyrtograpsus* species,  $Th_d$  values increased at high temperature. This behavior suggests that repair mechanisms counteracted the UV-B impact until attainment of  $Th_d$ , and the increase of temperature resulted in a more effective repair, thus increasing the tolerance of the larvae towards short wavelengths. This increased survival of up to 50% at 20 °C, as compared to that at 15 °C, is consistent with results found within other studies. These experiments were carried out with *Daphnia catawba* and *Leptodiaptomus minutus* [12], *Daphnia pulicaria* [13], and *Evechinus chloroticus* and *Diadema setosum* [14]. The studies suggested a synergism between temperature and UV-B tolerance that is dependent on enzymatic repair to cope with UV-B's harmful effects. It is suggested that this mechanism is mostly used in organisms that inhabit temperate and tropical waters, while photoprotection might be more effective in cold waters [13].

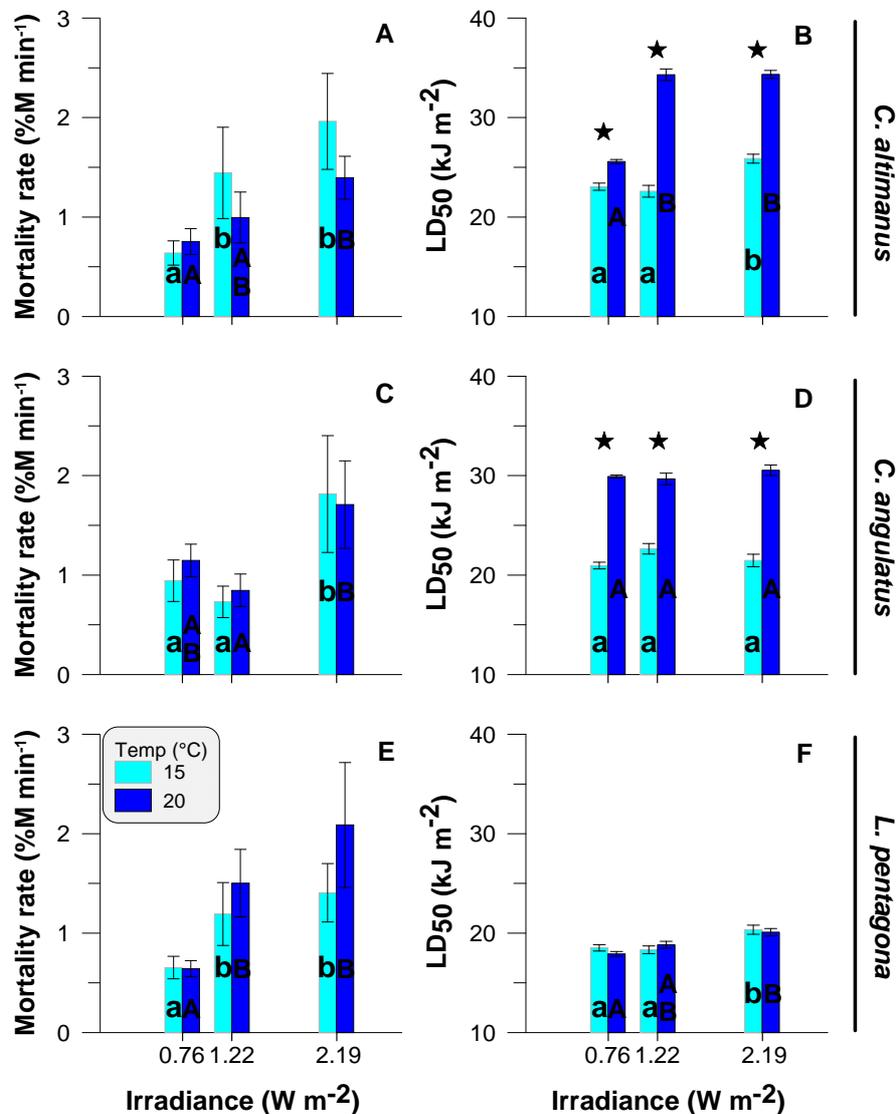
### 2.3. Rate of mortality and $LD_{50}$

The rate of mortality (*i.e.*, slope) increased significantly with increasing irradiance in *C. altimanus* (Figure 3A,  $R^2 = 0.95$  and  $P < 0.01$ ,  $F(2, 15) = 11.01$ ) and *L. pentagona* (Figure 3E,  $R^2 = 0.96$  and  $P < 0.01$ ,  $F(2, 15) = 12.26$ ). There were no significant differences in mortality ( $P = 0.056$ ,  $F(1, 10) = 4.69$ ) in *C. angulatus* at 0.76 and 1.22  $W m^{-2}$  (Figure 3C). However, there was a significant difference between mortality at these two irradiances and mortality at the highest level of irradiance (*i.e.*, 2.19  $W m^{-2}$ ;  $P < 0.01$ ,  $F(1, 16) = 28.27$ ). In the case of *C. altimanus* (Figure 3A) and *L. pentagona* (Figure 3E), there were no significant differences between the 1.22  $W m^{-2}$  and 2.19  $W m^{-2}$  irradiance levels. In the three species, there were no significant differences in the mortality rates between temperatures within each irradiance level. The  $LD_{50}$  also increased significantly in both species of *Cyrtograpsus* at 20 °C as compared to the values at 15 °C, for all irradiance levels (Figure 3B and 3D). However, no significant differences were observed between temperatures in the  $LD_{50}$  for *L. pentagona* (Figure 3F). In general, and for the three species, the  $LD_{50}$  was similar to  $Th_d$  in terms of its response to irradiance and temperature.

### 2.4. UV-absorbing compounds and carotenoids

It has been widely documented in the literature that UV-absorbing compounds, as well as carotenoids, help organisms cope with excess radiation [19]. While UV-absorbing compounds (mainly mycosporine-like amino acids, MAAs) absorb in the UVR region and directly protect the organisms by absorbing and dissipating UVR energy, carotenoids are involved in antioxidant activities. They counteract the effects of free radical products generated by UV-B exposure [19,34]. In our study, we evaluated the concentrations of both UV-absorbing compounds and carotenoids within different tissues of both adults and larvae. The spawning season encompasses the austral spring-summer and early autumn. Thus, we tested for differences in the concentration of UV-absorbing compounds and carotenoids during these periods by taking samples (*i.e.*, duplicate or triplicates) during the three seasons. No intra-seasonal differences in UV-absorbing compounds and/or carotenoids were found (data not shown). Therefore, we pooled all the data per tissue/larvae/species; the concentrations of UV-absorbing compounds and carotenoids are shown in Figure 4.

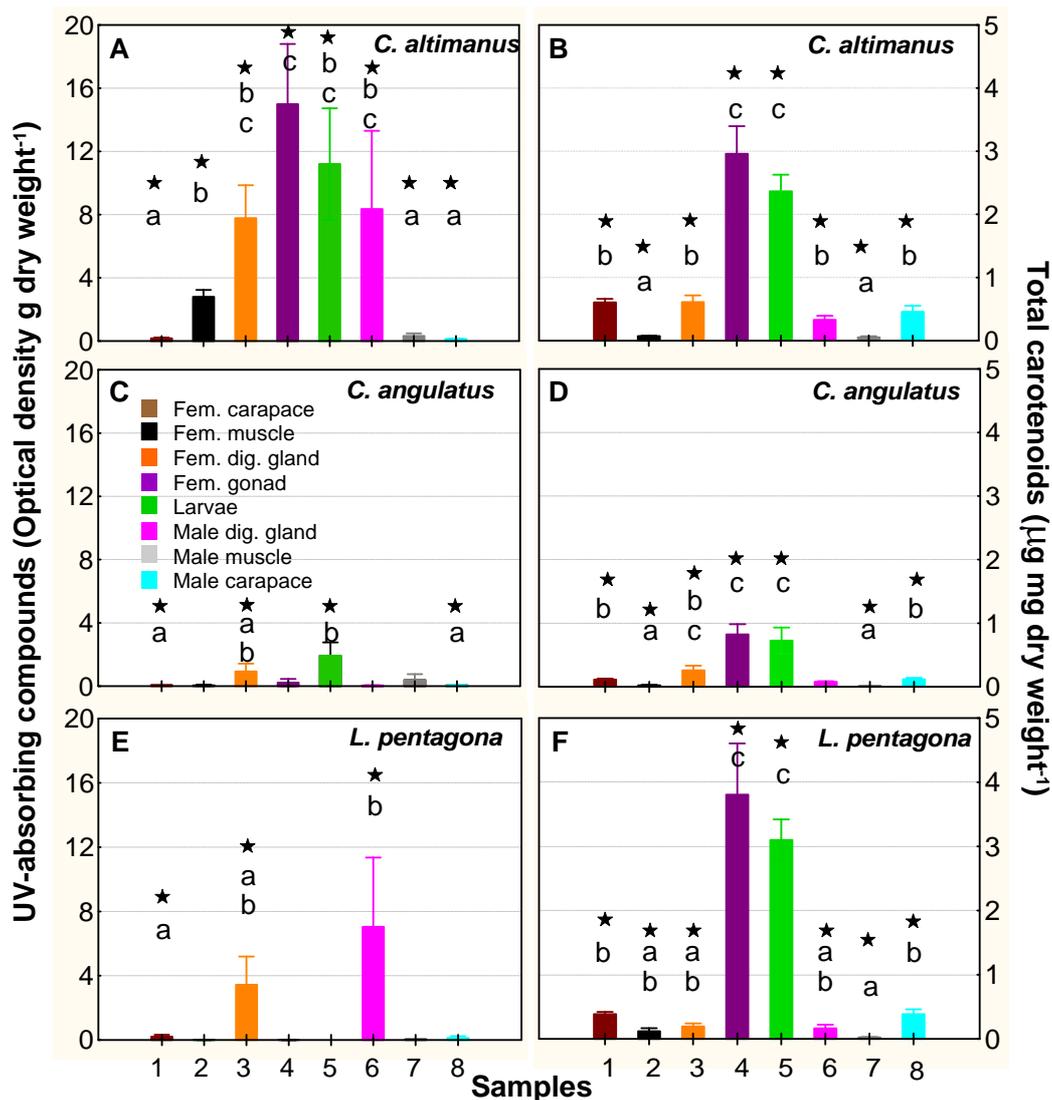
**Figure 3.** Rate of mortality (% mortality min<sup>-1</sup>) and LD<sub>50</sub> (in kJ m<sup>-2</sup>) as a function of the UV-B irradiance levels for *C. altimanus* (A, B), *C. angulatus* (C, D), and *L. pentagona* (E, F). The values are the mean and standard deviation (SD) (n ≥ 3). \* indicates significant differences between temperatures for each irradiance level. Lower case letters and capital letters indicate differences among irradiances at 15 °C and 20 °C, respectively.



There was high variability in the concentration of these compounds among different tissues and species, but carotenoids were, in general, in significantly higher concentrations than the UV-absorbing compounds (Figure 4). Although there were significant amounts of UV-absorbing compounds in some tissues of the three species ( $P < 0.05$ ,  $n = 7-9$ ), only *C. altimanus* had them in significantly higher concentration in the gonads and larvae than in the rest of the tissues ( $P < 0.05$ , KW-H (1, 57) = 15.56, Figure 4A). In addition, both species of *Cyrtograpsus* had significant concentrations of UV-absorbing compounds in the larvae (Figures 4A and 4C). However, in *C. altimanus*, the concentration was significantly higher than the concentration in *C. angulatus* ( $P < 0.05$ , KW-H (1, 14) = 10.67). We did not find any significant differences in the UV-absorbing compounds found in the larvae obtained from adults that were kept at the two experimental temperatures. Similarly as mentioned above, we did not find significant differences in the UV-absorbing compounds found in the larvae/adults obtained at

different moments during the spawning season, and consequently at different water temperatures. This would suggest that the concentration of UV-absorbing compounds in these three species was not dependent upon temperature, but rather upon the diet of the adults. Indeed, the dependence of UV-absorbing compound accumulation on diet has been determined in several species [35–39]. On the other hand, *in situ* studies carried out with phytoplankton and krill [40] did not find a temporal relationship of MAA concentrations between these organisms: MAA concentrations in phytoplankton were generally low in the winter and high in the summer; however, their concentration in krill remained relatively constant during the year.

**Figure 4.** UV-absorbing compounds (A, C, and E) and total carotenoids (B, D, and F) found in the three species used in the experiments. The values are the mean and standard error (SE) of samples (n = 7–9) collected at three different periods during the spawning season and pooled together (explanation in the text). The numbers in the x-axis 1 to 4 indicate female tissues; number 5 corresponds to the whole larvae, and numbers 6 to 8 are male tissues. The \* on top of the bars indicates that the concentration is significantly different from zero. Lower case letters indicate significant differences among tissues.



When looking at either the  $Th_d$  (Figure 2) or at the  $LD_{50}$  (Figure 3) of the three studied species, our results suggest that *C. altimanus* larvae were the most resistant to UV-B radiation. The relatively high concentrations of UV-absorbing compounds present in the *C. altimanus* larvae (Figure 4), when compared to the other species, may partially contribute to the relatively higher resistance to UV-B. However, as mentioned above, the concentration of UV-absorbing compounds did not vary between the two temperatures tested. Therefore, the increased tolerance at 20 °C in this species, as well as that of *C. angulatus*, might be more related to efficient enzymatic repair.

Carotenoids were present in significant amounts within the gonads and larvae of the three species. They appeared in significantly higher concentrations ( $P < 0.05$ ) than that of the other tissues (Figure 4B, 4D and 4F). The highest amount of carotenoids was found in *L. pentagona* and the lowest in *C. angulatus*. Carotenoids could have provided some protection to the larvae; however, no clear relationship between carotenoids and resistance/mortality was observed. Previous studies [39] determined that in *Leptodiaptomus minutus* (a calanoid copepod), the resistance to UVR increased 2.5-fold for UVR-acclimated, MAA-rich animals (*i.e.*, with UV-absorbing compounds), but only 1.5-fold for UVR-acclimated, carotenoid-rich animals. The authors suggested that UVR-stressed animals switched from carotenoid to MAA accumulation when MAA was available through the diet. Furthermore, Persau *et al.* [41] compared the MAA and carotenoid accumulation on calanoid copepod populations from various lakes with different UVR transparencies. They observed a shift from high carotenoid/low MAA content in spring, to low carotenoid/high MAA content in summer in calanoids from the UVR-transparent lakes. This suggests a relatively higher MAA content and therefore, a more effective photoprotection, when organisms were present in high UVR-transparent lakes

### 2.5. Ecological implications

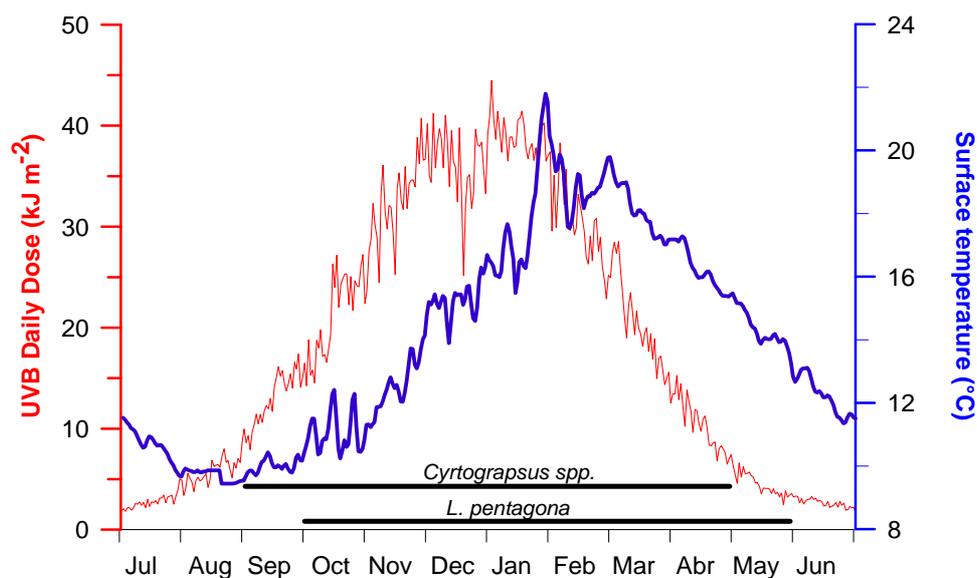
The spawning season for the three studied species encompass spring–summer and early autumn. Thus adults and larvae are exposed to relatively high temperatures and solar radiation conditions (Figure 5). The daily doses of solar UV-B reaching the sea surface varied from about 2 to 45  $\text{kJ m}^{-2}$ , while the surface water temperature changed from about 10 to 22 °C in the study area. The maximum UV-B irradiance in the area can be up to 1.8  $\text{W m}^{-2}$  during noon time [42], which is much less than the irradiances received in tropical areas [43].

Sea surface temperature had significant variability throughout the year, being coldest in August and hottest in February (range of *circa* 10 to 22 °C). Our experimental conditions fall within the normal variability of both temperature and UVR in Patagonia. Indeed, two of the irradiance conditions used in our experiments were lower and one was higher than the highest irradiances reached in summer at noon time. Additionally, the temperatures used represent two extremes at which larvae are developing *in situ*. In our study, 100 % mortality of larvae was reached in all irradiance-temperature experiments, even at doses that were lower than the highest reached in the area.

In the Patagonia area, wind strength strongly conditions the depth of the upper mixing layer (UML) which in turn, modulates the mean irradiance received by plankton organisms [44]. Moreover, Patagonia is characterized by the presence of strong winds, predominantly from west, during the spring and summer [45]. Wind is also important in re-suspending particulate material (mainly in coastal areas), thus increasing the attenuation of solar radiation in the water column. As reported in an earlier

study [46] carried out in Bahía Camarones (250 km from our study area), the UV-B penetration at 1% of the surface irradiance was 3.5 m depth (*i.e.*,  $K_{UVB} = 1.27 \text{ m}^{-1}$ ), whereas UV-A and PAR penetrated deeper, down to 7 and 15 m, respectively. Based on these values of penetration of solar radiation, which are representative for our study area, we calculated the UV-B irradiance/dose in the water column and we compared them with the parameters obtained from the sigmoid fit (Figure 1). For example, the intermediate irradiance of  $1.22 \text{ W m}^{-2}$  would be encountered at <30 cm depth at noon when the maximum irradiance of  $1.8 \text{ W m}^{-2}$  is measured at the surface; in the case of the irradiance of  $0.76 \text{ W m}^{-2}$ , it would be found at a depth <0.68 m. Based on these values, the  $Th_d$  would be reached after at least for 5 hours in the case of *L. pentagona*, and after 6.5–10 hours for *Cyrtograpsus* spp., depending on the water temperature. However, larvae and plankton are moving in the water column, rather than staying still at a fixed depth. Thus, we also need to consider the depth distribution of the species, in order to infer the degree of stress caused by both solar radiation and temperature.

**Figure 5.** Surface UV-B daily doses (red line) and surface water temperature (blue line) throughout the year in the study area (see Figure 6). The horizontal lines indicate the spawning season for *Cyrtograpsus* spp. and *L. pentagona*.



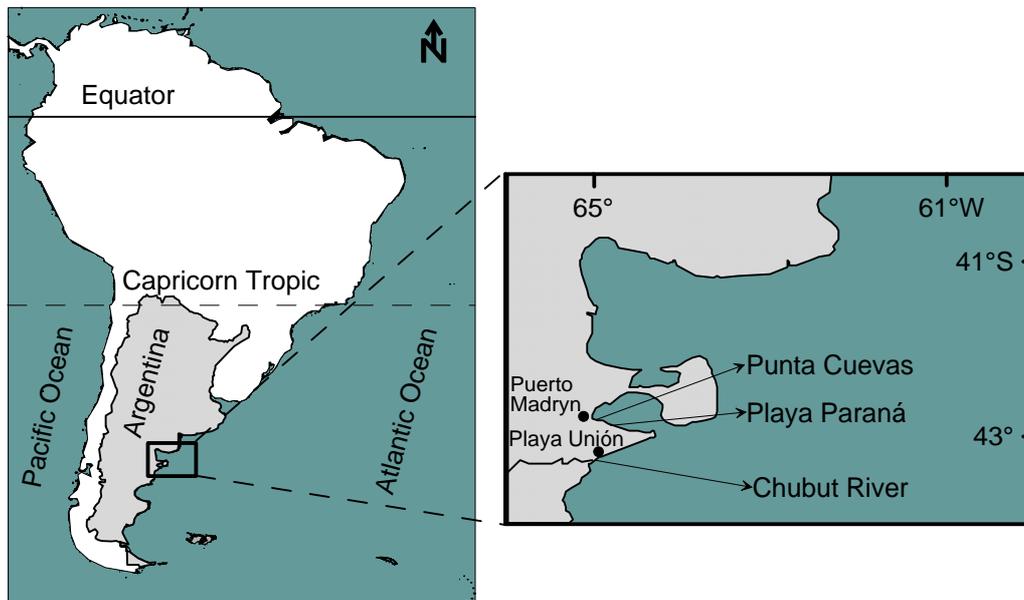
It should be noted that the adults of *Cyrtograpsus* (the two less UVR-sensitive species) are normally found at places receiving high solar radiation levels, such as the shallow sub-tidal and intertidal zones. On the other hand, adults of *L. pentagona* had a deeper distribution [20]. Still, the three species considered in this study have their spawning season during spring-summer-fall (mainly between September and April) and thus they are exposed to a wide range of irradiances as shown in Figure 5. In addition, the larvae have vertical migrations in the water column, as seen in most planktonic species [47,48]. They therefore receive irradiance that not only varies with the season, but also with their position in the water column. A recent study of vertical behavior within Patagonian larval crabs [28] demonstrated that most of *L. pentagona* larvae inhabit the upper layers of the water column at night and that they swim downwards during daytime. On the other hand, a lower percentage of larvae of the *Cyrtograpsus* spp. were observed in the upper water column near the surface in shallow places during daylight. However, the larvae of the *Cyrtograpsus* spp. seem to be advected far

away from the coastal area where high grazing pressure occurs, and return to the coastal site when they are at the Megalopa phase, as only the first two stages of Zoea and the Megalopa were found in coastal samples, while the other three larval stages (ZIII, ZIV and ZV) were found far away from the coast [28]. We do not know however, if there is any change in sensitivity of the larvae as they develop through the different stages. However, larvae staying in coastal areas might be exposed to less radiation than in open waters as a result of differential turbidity (*i.e.*, turbidity is higher in coastal areas). Despite the fact that the larvae *in situ* seem to be receiving a dose that is lower than the calculated UV-B  $Th_d$ , (and thus little mortality would be expected), one cannot rule out that ambient UV-B levels may increase as result of climate change [5]. Furthermore, there are other indirect effects, such as changes in food-chain interactions, that can be more influential than direct effects on individual organisms at any single trophic level [49,50]. In addition, sub-lethal effects such as the lower growth rates observed in cod larvae [8], the increase in respiration rates in *Daphnia catawba* [51], or the high oxygen consumption and swimming activity occurring in juvenile rainbow trouts [52], might occur at low doses and thus are not considered in our survival experiments.

### 3. Experimental Section

#### 3.1. Sampling/maintenance of specimens

Ovigerous females (*i.e.*, near to spawning) of the crabs *Cyrtograpsus altimanus* (Rathbun, 1914), *Cyrtograpsus angulatus* (Dana, 1851), and *Leucippa pentagona* (Milne Edwards, 1833) were collected during spring, summer, and autumn of the years 2007 and 2008 to obtain newly hatched larvae. The specimens were collected from different places in the Patagonian coast (Chubut Province, Argentina) (Figure 6): *C. altimanus* were obtained during low tide from intertidal rock pools in Punta Cuevas, while *L. pentagona* were collected from Playa Paraná by scuba diving. *C. angulatus* females were obtained from the Chubut River estuary using traps. All specimens were immediately taken to the laboratory at the Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU, 15–60 min from the sampling site) where they were kept in aquaria under a 12:12 light: dark photoperiod in a controlled-temperature chamber (at 15 or 20 °C, depending on the experiment, see below) for at least two days, when the experiments were performed to determine the combined effects of UVR and temperature on survival (see below). Specimens were fed once a week with fish meat, after which the seawater was replaced. Prior to the hatch period, females were transferred to an individual aquarium to get a pool of larvae (Zoea I) from the same female, thus reducing the potential variability between organisms within any one experiment. The aquaria were checked twice a day and only larvae less than 16 h from hatching were used in the experiments. A lamp providing dim light was placed in one side of each aquarium to allow larvae to swim towards the illuminated corner, where they were collected using a pipette. In this way, we selected healthy and photoactive larvae that were then used in the experiments.

**Figure 6.** Map showing the sampling sites and their relative position in South America.

### 3.2. Experimental set up

For each survival experiment, 20 larvae (recently hatched Zoea I from the same female) were placed in 180-mL glass beakers (10 cm of diameter) with 100 mL of sterilized seawater and exposed for *circa* 12 hours under artificial UVR-PAR using a solar simulator (Hönle system, Sol 1200, Germany). Three quality radiation treatments, each one with three replicates, were implemented on each experiment as follows: (1) Treatment PAB, larvae receiving full radiation (PAR + UV-A + UV-B, 290–700 nm), glass beakers covered with Ultraphan 290 or acetate film to screen out UV-C emitted by the solar simulator; (2) Treatment PA, larvae receiving radiation in the range 320–700 nm (UV-A + PAR), glass beakers covered with Folex UV cut-off filter (Montagefolie, No. 10155099) and (3) Treatment P (control), larvae receiving radiation in the range 400–700 nm (only PAR), glass beakers covered with Ultraphan UV Opak Digefra film. The transmission characteristics of filters and materials were previously reported [10]. The nine experimental units (*i.e.*, the three radiation treatments and the three replicates) were randomly distributed on a black water bath container at 15 or 20 °C under the solar simulator. The irradiance level was fixed for each experiment by placing all beakers ( $n = 9$ ) at the same distance from the solar simulator. Three different irradiance levels were used in different experiments (Table 1). At least one experiment was done with each species under any one radiation-temperature combination.

**Table 1.** Irradiance levels (in  $\text{W m}^{-2}$ ) used in the experiments.

Distance to the solar simulator (m)	PAR ( $\text{W m}^{-2}$ )	UV-A ( $\text{W m}^{-2}$ )	UV-B ( $\text{W m}^{-2}$ )
0.56	223.5	89.4	2.19
0.85	125.8	49.1	1.22
1.09	84.5	30	0.76

### 3.3. Mortality determinations

During the irradiation period, the beakers (three at a time) containing the larvae were taken out of the radiation source every 1–2 hours, and live and dead larvae were counted. Since larvae of the three species used in all the experiments had positive phototactic orientations, we considered ecologically dead those individuals that did not react towards a dim light source in one side of the receptacle. This counting procedure took less than 2 minutes, therefore the time away from the radiation source was considered negligible. Mortality was defined as the percentage of dead larvae, with respect to the total number ( $n = 20$ ) of larvae in the beaker.

### 3.4. Analysis of UV absorbing compounds

UV-absorbing compounds were measured in the whole larvae as well as in the hepatopancreas (digestive gland), muscles, gonads, embryos and exoskeleton of female adult specimens and in hepatopancreas, muscles and exoskeleton of male adult specimens. Samples (duplicates or triplicates) were obtained at the beginning, middle, and at the end of the spawning season to assess for intra-seasonal differences. Fresh samples were placed in 15-mL centrifuge tubes with 5 mL of absolute methanol, sonicated for 20 minutes at 25 °C, and extracted for at least 1 hour. We are aware that UV-absorbing compounds are slightly underestimated by this procedure, as it was shown that 20% methanol is the best extraction solvent for these compounds [53]. However, since no significant differences were found previously in our laboratory between the two extraction methods, and because we were limited by the amount of sample, we considered this procedure to be appropriate for the purposes of our investigation. After the extraction period, the samples were centrifuged for 15 minutes at 1,500 rpm and the spectral characteristics of the supernatants were measured from 280 to 750 nm via a scanning spectrophotometer (Hewlett Packard model 8453E). The estimation of the amount of UV-absorbing compounds was obtained by peak analysis at 310–360 nm [54]. The amount of UV-absorbing compounds was normalized per gram of dry weight, which was determined by drying sub-samples in the oven at 35 °C for 24 hours until constant weight.

### 3.5. Analysis of carotenoids

The same spectra obtained to determine UV-absorbing compounds were also used to estimate total carotenoids concentration. This was calculated from the absorbance spectra, using the formula of Hairston [55] as:  $C = (D \times V \times 10^4)/(E \times W)$ , where  $C$  is the carotenoid concentration in the sample (in  $\mu\text{g mg}^{-1}$  dry weight);  $D$ , the absorbance at 472 nm;  $V$ , the volume of the extract (in mL);  $E$ , the extinction coefficient (2,500); and  $W$ , the dry weight (in mg) of the sample.

### 3.6. Radiation/temperature data

The irradiance levels under the solar simulator were measured using a broadband filter radiometer ELDONET (Real Time Computers, Inc.) that has channels for UV-B (280–315 nm), UV-A (315–400 nm), and Photosynthetic Active Radiation (PAR, 400–700 nm). Field radiation data was also obtained with an ELDONET radiometer (Real Time Computer Inc.) that is permanently installed on the roof of the Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU). Sea surface temperature data was

obtained with a digital thermometer at 50 cm depth hanging in a buoy at a site near Punta Cuevas and Playa Paraná (data provided by F. Dellatorre). The thermometer registered data every 5 minutes and the data was stored in a datalogger. Temperature data was similar to that measured in the estuary of Chubut River [56].

### 3.7. Statistical Analysis

Mortality data vs. exposure time were plotted for each irradiance-temperature condition and for each of the species selected. Sigmoid curves were considered the best fit, and threshold (Th) and lethal dose 50 (LD<sub>50</sub>) were determined from these curves. One-way ANOVA tests were used to determine significant differences in Th, mortality rate, and LD<sub>50</sub> among irradiances, temperatures and species. Two-ways ANOVA tests were used to determine interactions between factors (*i.e.*, irradiance and temperature) [57]. Because the amount of UV-absorbing compounds and total carotenoids did not follow homocedasticity, intra-seasonal differences and differences among tissues were statistically analyzed using the non-parametric Kruskal Wallis test [57].

## 4. Conclusions

The results of this work seem straightforward: On the one hand, we have gained knowledge on the combined effects of UVR and temperature on three crab species of Patagonian waters (which have been poorly sampled in the context of global change). On the other hand, our data allowed us to speculate on the potential implications of these stressors on crab larvae characteristics within the area. Our data also suggests a great variability amongst species, not only in the acclimation capacity (*i.e.*, amount and body distribution of protecting compounds) but also in their response to the combined effects of UVR and temperature. Some of these acclimations and responses could be partially related to their habitat location and to the amount of solar radiation received. The lack of intra-seasonal differences suggests that other mechanisms, rather than simple acclimation to low and high irradiances, seem to be acting. One such mechanism seems to be presence of UV-absorbing and carotenoids compounds, whose concentrations within tissues are more related to the diet than to the irradiance conditions. Another one, as suggested by the increased UV-B tolerance at increasing temperatures in some of the species, is the enzymatic repair activity that seems to be enhanced at higher temperature. Nevertheless, while this latter mechanism seems to be important in *C. angulatus* larvae, it seems to be weak and not stimulated (by an increase in temperature) in *L. pentagona* larvae. Overall, our results suggest that *C. altimanus* is the most UV-B-resistant species and that this seems to be the result of both well-developed repair mechanisms and the presence of protective compounds. Nevertheless, all the larvae tested had a UV-B LD<sub>50</sub> that is significantly lower than the daily incident UV-B irradiance at the surface. This would not only affect the survival of these species but also would condition their distribution in the water column. Of the three species, only the *Cyrtograpsus* larvae had a significant increase in the LD<sub>50</sub> with increasing temperature, suggesting that these species would be more suitable for success under the eventual temperature increase (due to climate change). The fate of the other species in the case of increasing temperature, or with respect to the potential changes in behavior of all species (*i.e.*, swimming to depth, distribution towards more turbid waters, *etc.*), as well any potential sub-lethal effects, however, remains unknown.

## Acknowledgements

We thank Pedro J. Barón and Fernando G. Dellatorre for their suggestions and support at the time of obtaining and maintaining crabs specimens used in this study. We also thank Virginia Villafaña for her comments and corrections to the Ms. We thank the comments and suggestions of two anonymous reviewers. This work was supported by Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica—ANPCyT (PICT No. 2007-01651) and Fundación Playa Unión. This work is in partial fulfillment for a Ph. D. degree of R. D. Hernandez Moresino. This is Contribution No. 116 of Estación de Fotobiología Playa Unión.

## References

1. Harley, C.D.G.; Hughes, A.R.; Hultgre, K.M.; Miner, B.G.; Sorte, C.J.B.; Thornber, C.S.; Rodriguez, L.F.; Tomanek, L.; Williams, S.L. The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecol. Lett.* **2006**, *9*, 228–241.
2. Nelson, G.C.; Bennet, E.; Berhe, A.A.; Cassman, K.; DeFries, R.; Dietz, T.; Dobermann, A.; Dobson, A.; Janetos, A.; Levy, M.; Marco, D.; Nakicenovic, N.; O'Neill, B.; Norgaard, R.; Petschel-Held, G.; Ojima, D.; Pingali, P.; Watson, R.; Zurek, M. Anthropogenic drivers of ecosystem change: An overview. *Ecol. Soc.* **2006**, *11*, 29.
3. De Mora, S.J.; Demers, S.; Vernet, M. *The Effects of UV Radiation on Marine Ecosystems*; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2000; pp. 1–324.
4. Helbling, E.W.; Zagarese, H.E. *UV Effects in Aquatic Organisms and Ecosystems*; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2003; pp. 1–575.
5. Häder, D.P.; Kumar, H.D.; Smith, R.C.; Worrest, R.C. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2007**, *6*, 267–285.
6. Setlow, R.B.; Grist, E.; Thompson, K.; Woodhead, A.D. Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 6666–6670.
7. Vega, M.P.; Pizarro, R.A. Oxidative stress and defence mechanisms of the freshwater cladoceran *Daphnia longispina* exposed to UV radiation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2000**, *54*, 121–125.
8. Lesser, M.P.; Farrell, J.H.; Walker, C.W. Oxidative stress, DNA damage and p53 expression in the larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to ultraviolet (290–400 nm) radiation. *J. Exp. Biol.* **2001**, *204*, 157–164.
9. Buma, A.G.J.; Boelen, P.; Jeffrey, W.H. UVR-induced DNA damage in aquatic organisms. In *UV Effects in Aquatic Organisms and Ecosystems*; Helbling, E.W., Zagarese, H.E., Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2003; pp. 291–327.
10. Villafaña, V.E.; Sundbäck, K.; Figueroa, F.L.; Helbling, E.W. Photosynthesis in the aquatic environment as affected by UVR. In *UV Effects in Aquatic Organisms and Ecosystems*; Helbling, E.W., Zagarese, H.E., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2003; pp. 357–397.
11. Anger, K.; Thatje, S.; Lovrich, G.; Calcagno, J. Larval and early juvenile development of *Paralomis granulosa* reared at different temperatures: tolerance of cold and food limitation in a lithodid crab from high latitudes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2003**, *253*, 243–251.

12. Williamson, C.E.; Grad, G.; De Lange, H.J.; Gilroy, S. Temperature-dependent ultraviolet responses in zooplankton: Implications of climate change. *Limnol. Oceanogr.* **2002**, *47*, 1844–1848.
13. MacFadyen, E.J.; Williamson, C.E.; Grad, G.; Lowery, M.; Jeffrey, W.H.; Mitchell, D.L. Molecular response to climate change: Temperature dependence of UV-induced DNA damage and repair in the freshwater crustacean *Daphnia pulicaria*. *Global Change Biol.* **2004**, *10*, 408–416.
14. Lamare, M.D.; Barker, M.F.; Lesser, M.P.; Marshall, C. DNA photorepair in echinoid embryos: Effects of temperature on repair rate in Antarctic and non-Antarctic species. *J. Exp. Biol.* **2006**, *209*, 5017–5028.
15. Hoffman, J.R.; Hansen, L.J.; Klinger, T. Interactions between UV radiation and temperature limit inferences from single-factor experiments. *J. Phycol.* **2003**, *39*, 268–272.
16. Lesser, M.P. Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnol. Oceanogr.* **1996**, *41*, 271–283.
17. Persaud, A.D.; Williamson, C.E. Ultraviolet and temperature effects on planktonic rotifers and crustaceans in northern temperate lakes. *Freshwater Biol.* **2005**, *50*, 467–476.
18. Dunlap, W.C.; Shick, J.M. Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in coral reef organisms: A biochemical and environmental perspective. *J. Phycol.* **1998**, *34*, 418–430.
19. Banaszak, A.T. Photoprotective physiological and biochemical responses of aquatic organisms. In *UV Effects in Aquatic Organisms and Ecosystems*; Helbling, E.W., Zagarese, H.E., Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2003; pp. 329–356.
20. Spivak, E.D. Los crustáceos decápodos del Atlántico sudoccidental (25°–55°S): Distribución y ciclos de vida. *Invest. Mar.* **1997**, *25*, 69–91.
21. Arntz, W.E.; Gorny, M.; Soto, R.; Lardies, M.; Retamal, M.; Wehrtmann, I.S. Species composition and distribution of decapod crustaceans in the waters off Patagonia and Tierra del Fuego, South America. *Sci. Mar.* **1999**, *63*, 303–314.
22. Moreno, C.A.; Jara, H.F. Ecological studies on fish fauna associated with *Macrocystis pyrifera* belts in the south of Fuegian Islands, Chile. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1984**, *15*, 99–107.
23. Delhey, J.K.V.; Carrete, M.; Martínez, M.M. Diet and feeding behaviour of Olrog's Gull *Larus atlanticus* in Bahía Blanca, Argentina. *Ardea* **2001**, *89*, 319–329.
24. Boschi, E.E. Las pesquerías de crustáceos decápodos en el litoral de la República Argentina. *Invest. Mar.* **1997**, *25*, 19–40.
25. Wyngaard, J.G.; Iorio, M.I.; Boschi, E.E. ¿Es viable el desarrollo de pesquerías de cangrejos en la Argentina? *INIDEP* **2001**, *101*, 9 (In Spanish).
26. Morgan, S.G. Life and death in the plankton: Larval mortality and adaptation. In *Ecology of Marine Invertebrate Larvae*; Young, C.M., Sewell, M.A., Rice, M.E., Eds.; CSC Press: Boca Raton, FL, USA, 1995; pp. 279–321.
27. Pechenik, J.A. Larval experience and latent effects—metamorphosis is not a new beginning. *Int. Comp. Biol.* **2006**, *46*, 323–333.
28. Dellatorre, F.G. Influencia de factores ambientales sobre la distribución y el asentamiento de larvas de cangrejos braquiuros y anomuros con potencial pesquero en Golfo Nuevo. Ph. D Thesis, Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Argentina, 2009.

29. IPCC. *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press: New York, NY, USA, 2007; p. 996.
30. Damkaer, D.M.; Dey, D.B.; Heron, G.A. Dose/dose rate responses of shrimp larvae to UV-B radiation. *Oecologia* **1981**, *48*, 178–182.
31. Damkaer, D.M.; Dey, D.B. UV damage and photoreactivation potentials of larval shrimp, *Pandalus platyceros*, and adult euphausiids, *Thysanoessa raschii*. *Oecologia* **1983**, *60*, 169–175.
32. Hovel, K.A.; Morgan, S.G. Susceptibility of estuarine crab larvae to ultraviolet radiation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1999**, *237*, 107–125.
33. Grad, G.; Williamson, C.E.; Karapelou, D.M. Zooplankton survival and reproduction responses to damaging UV radiation: A test of reciprocity and photoenzymatic repair. *Limnol. Oceanogr.* **2001**, *46*, 584–591.
34. Roy, S. Strategies for the minimization of UV-induced damage. In *The Effects of UV Radiation in the Marine Environment*; De Mora, S.J., Demers, S., Vernet, M., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2000; pp. 177–205.
35. Carroll, A.K.; Shick, J.M. Dietary accumulation of UV-absorbing mycosporine-like aminoacids (MAAs) by the gree sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Mar. Biol.* **1996**, *124*, 561–569.
36. Newman, S.J.; Dunlap, W.C.; Nicol, S.; Ritz, D. Antarctic krill (*Euphausia superba*) acquire a UV-absorbing mycosporine-like amino acid from dietary algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2000**, *255*, 93–110.
37. Gonçalves, R.J.; Villafañe, V.E.; Helbling, E.W. Photorepair activity and protective compounds in two freshwater zooplankton species (*Daphnia menucoensis* and *Metacyclops mendocinus*) from Patagonia, Argentina. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 996–1000.
38. Helbling, E.W.; Menchi, C.F.; Villafañe, V.E. Bioaccumulation and role of UV-absorbing compounds in two marine crustacean species from Patagonia, Argentina. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 820–825.
39. Moeller, R.E.; Gilroy, S.; Williamson, C.E.; Grad, G.; Sommaruga, R. Dietary acquisition of photoprotective compounds (mycosporine-like amino acids, carotenoids) and acclimation to ultraviolet radiation in a freshwater copepod. *Limnol. Oceanogr.* **2005**, *50*, 427–439.
40. Riemer, U.; Lamare, M.D.; Peake, B.M. Temporal concentrations of sunscreen compounds (Mycosporine-like Amino Acids) in phytoplankton and in the New Zealand krill, *Nyctiphanes australis* G.O. Sars. *J. Plankton. Res.* **2007**, *29*, 1077–1086.
41. Persaud, A.D.; Moeller, R.E.; Williamson, C.E.; Burns, C.W. Photoprotective compounds in weakly and strongly pigmented copepods and co-occurring cladocerans. *Freshwater Biol.* **2007**, *52*, 2121–2133.
42. Villafañe, V.E.; Marcoval, M.A.; Helbling, E.W. Photosynthesis versus irradiance characteristics in phytoplankton assemblages off Patagonia (Argentina): Temporal variability and solar UVR effects. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2004**, *284*, 23–34.
43. Gao, K.; Li, G.; Helbling, E.W.; Villafañe, V.E. Variability of UVR effects on photosynthesis of summer phytoplankton assemblages from a tropical coastal area of the South China Sea. *Photochem. Photobiol.* **2007**, *83*, 802–809.

44. Helbling, E.W.; Villafaña, V.E.; Holm-Hansen, O. Effects of ultraviolet radiation on Antarctic marine phytoplankton photosynthesis with particular attention to the influence of mixing. In *Ultraviolet Radiation in Antarctica: Measurements and Biological Effects*; Weiler, C.S., Penhale, P.A., Eds.; American Geophysical Union: Washington, DC, USA, 1994; pp. 207–227.
45. Villafaña, V.E.; Barbieri, E.S.; Helbling, E.W. Annual patterns of ultraviolet radiation effects on temperate marine phytoplankton off Patagonia, Argentina. *J. Plankton. Res.* **2004**, *26*, 167–174.
46. Helbling, E.W.; Barbieri, E.S.; Marcoval, M.A.; Gonçalves, R.J.; Villafaña, V.E. Impact of solar ultraviolet radiation on marine phytoplankton of Patagonia, Argentina. *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 807–818.
47. Alonso, C.; Zagarese, H.E.; Rocco, V.; Barriga, J.P.; Battini, M.A. Surface avoidance by freshwater zooplankton: Field evidence on the role of ultraviolet radiation. *Limnol. Oceanogr.* **2004**, *49*, 225–232.
48. Queiroga, H.; Blanton, J. Interactions between behaviour and physical forcing in the control of horizontal transport of Decapod Crustacean larvae. *Adv. Mar. Biol.* **2005**, *47*, 107–214.
49. Hessen, D.; De Lange, H.J.; Van Donk, E. UV-induced changes in phytoplankton cells and its effects on grazers. *Freshwater Biol.* **1997**, *38*, 513–524.
50. Williamson, C.E.; Hargreaves, B.R.; Orr, P.S.; Lovera, P.A. Does UV play a role in changes in predation and zooplankton community structure in acidified lakes? *Limnol. Oceanogr.* **1999**, *44*, 774–783.
51. Fischer, J.M.; Fields, P.A.; Pryzbylkowski, P.G.; Nicolai, J.L.; Neale, P.J. Sublethal exposure to UV radiation affects respiration rates of the freshwater cladoceran *Daphnia catawba*. *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 547–550.
52. Alemanni, M.E.; Lozada, M.; Zagarese, H.E. Assessing sublethal effects of ultraviolet radiation in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, *2*, 867–870.
53. Tartarotti, B.; Sommaruga, R. The effect of different methanol concentrations and temperatures on the extraction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in algae and zooplankton. *Arch. Hydrobiol.* **2002**, *154*, 691–703.
54. Helbling, E.W.; Chalker, B.E.; Dunlap, W.C.; Holm-Hansen, O.; Villafaña, V.E. Photoacclimation of antarctic marine diatoms to solar ultraviolet radiation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1996**, *204*, 85–101.
55. Hairston, N.G., Jr. The adaptive significance of color polymorphism in two species of *Diaptomus* (Copepoda). *Limnol. Oceanogr.* **1979**, *24*, 15–37.
56. Helbling, E.W.; Pérez, D.E.; Medina, C.D.; Lagunas, M.G.; Villafaña, V.E. Phytoplankton distribution and photosynthesis dynamics in the Chubut River estuary (Patagonia, Argentina) throughout tidal cycles. *Limnol. Oceanogr.* **2010**, *55*, 55–65.
57. Zar, J.H. *Biostatistical Analysis*, 4th ed.; Prentice Hall: Englewood Cliffs, NJ, USA, 1999.

*Samples Availability:* Available from the authors.

***Anexo 2:***

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Experimental Marine Biology and Ecology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jembe](http://www.elsevier.com/locate/jembe)Sublethal effects of ultraviolet radiation on crab larvae of *Cyrtograpsus altimanus*

Rodrigo D. Hernández Moresino, Rodrigo J. Gonçalves, E. Walter Helbling\*

Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU) and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Casilla de Correos No 15 (9103) Rawson, Chubut, Argentina

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 20 July 2011

Accepted 26 July 2011

Available online 19 August 2011

## Keywords:

Decapoda

Development

Larvae

Molting

Swimming behavior

Ultraviolet radiation

## ABSTRACT

Ultraviolet radiation (UVR, 280–400 nm) is known to be lethal to several aquatic species; however, more subtle, 'sublethal' effects of UVR have recently received more attention. Larvae of the crab *Cyrtograpsus altimanus* are a transient component of the plankton community in the Atlantic northern Patagonia (Argentina) and thus they may be exposed to solar UVR in both open and coastal waters. The aim of this study was to determine if previous sublethal UVR exposure on larvae of *C. altimanus* affects development, body size and motility. Larvae which were pre-exposed to UVR had a delay/absence of molting from Zoea I to Zoea II, coupled to arrested body growth, but showed enhanced swimming behavior. In contrast, the control group (i.e., exposed only to visible light) molted from Zoea I to Zoea II after 6–9 days, with a significant increase in body size, and did not change their motility. Since hatching of this species occurs in summer (i.e., season with highest UVR levels) our results suggest that, by significantly affecting development, growth and motility, natural UVR may influence the plankton–benthos coupling in coastal waters.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

It is widely known that solar ultraviolet radiation (UVR 280–400 nm) can produce several harmful effects on aquatic organisms and ecosystems. Previous studies addressed the effects of increased levels of ultraviolet-B radiation (UVB, 280–315 nm), highlighting the susceptibility of marine ecosystems (de Mora et al., 2000; Helbling and Zagarese, 2003). UVR may directly damage cellular targets such as DNA, proteins and/or membranes (Sinha and Häder, 2002). Ultraviolet-A radiation (UVA, 315–400 nm) may also produce reactive oxygen species (ROS) with its concomitant negative effects (Lesser et al., 2001; Vega and Pizarro, 2000). In general terms, UVR may produce a direct and immediate decrease in survival (i.e., 'lethal exposure') or indirect, more subtle effects that do not include immediate mortality (i.e., 'sublethal exposure').

Early life stages of marine organisms, particularly eggs and larvae, are usually regarded as being more vulnerable to solar UVR radiation than older stages (Häder et al., 2011). Many planktonic organisms have mechanisms to avoid or to minimize UVR-induced damage (e.g. behavioral avoidance, bioaccumulation of UVR-absorbing compounds, efficient DNA repair systems, etc.) but they may still be affected by solar radiation even when there is no immediate or evident effects on survival. The ecological implications of this 'sublethal exposure' on natural populations have not been extensively studied. For example, UVR may affect early stages of an organism (i.e., eggs, larvae) but its

effects might be observed during subsequent developmental stages (i.e., juveniles, adults) even when UVR ceased to be a stress factor. In fact, indirect effects were observed in larvae of *Rana temporaria* several weeks after metamorphosis; in this case, the duration of the larval period and developmental abnormalities increased, while the body weight decreased (Pahkala et al., 2001). Ulterior effects of early exposure to sublethal UVR have also been determined for gastropods, bivalves, echinoderms, polychaetes, crustaceans, bryozoans, urochordates, and vertebrates (Pechenik, 2006). Other effects of sublethal UVR exposure on zooplankton include those on feeding and respiratory rates (Fischer et al., 2006; Freitag et al., 1998; Ylönen et al., 2004), delayed metamorphosis or settlement (Kuffner, 2001; Pahkala et al., 2001), malformations (Adams and Shick, 2001; Lermarda et al., 2009), body lesions and reduced growth rates (Browman et al., 2000), vertical distribution (Shick et al., 1996), swimming motility (Alemanni et al., 2003; Gonçalves et al., 2007), protein synthesis (Tartarotti and Torres, 2009), among others.

In coastal zones of the Atlantic Patagonia (Argentina), the varunid crab *Cyrtograpsus altimanus* (Brachyura: Grapsoidea) (Rathbun, 1914), is a typical, highly abundant species in rocky intertidal pools and on shallow sandy bottoms (Scelzo and Lichtschein de Bastida, 1979). Its larvae, together with those of *Cyrtograpsus angulatus*, contribute with a significant share (35%) of the total amount of larvae in local coastal waters (Dellatorre, 2009). Settlement of adults occurs after the metamorphosis of the planktonic larvae, which may be exposed to solar UVR in their natural environment. However, a previous study carried out with *C. altimanus* showed that the first larval stage (Zoea I) is highly tolerant (in terms of survival) to short-term exposure under artificial UVB radiation, as compared to other crab species (Hernández Moresino and Helbling, 2010). However, and

\* Corresponding author. Tel.: +54 2965 498 019.

E-mail addresses: [rodrihm@efpu.org.ar](mailto:rodrihm@efpu.org.ar) (R.D. Hernández Moresino), [rodrigo@efpu.org.ar](mailto:rodrigo@efpu.org.ar) (R.J. Gonçalves), [whelbling@efpu.org.ar](mailto:whelbling@efpu.org.ar) (E.W. Helbling).  
URL: <http://www.efpu.org.ar> (E.W. Helbling).

to the best of our knowledge, there is no information on sublethal effects after exposure to UVR in *C. altimanus*. Thus, the aim of the present study was to evaluate changes in morphology, development and swimming behavior of larvae of *C. altimanus* as may occur after an initial exposure to sublethal UVR levels. To this aim, we exposed Zoea I larvae to a sublethal UVR dose under artificial conditions and followed possible changes in their development and swimming behavior for ~2 weeks after that initial exposure.

## 2. Materials and methods

This study was carried out during austral summer (March) of 2010 and 2011 with zoea larvae of *C. altimanus*. The source of these specimens were ovigerous females collected during low tide from intertidal rocky pools at Puerto Madryn (42°46' S, 65°02' W), Chubut, Argentina.

The collected females were kept in an aquarium that was placed in a culture chamber (MiniCella) at 19–20 °C with bubbling and a 12:12 h photoperiod, for ca. 48 h; after this period larvae started to hatch. Three experiments were done, each one using newly hatched larvae that were exposed under a solar simulator (Hönle, Sol 1200) at 109 cm from the lamp. The irradiances output from the lamp were 84.5, 30, and 0.76 W m<sup>-2</sup> for PAR, UVA and UVB, respectively. These irradiance conditions, together with the exposure time (120 min) – that resulted in a UVB dose of 5.5 kJ m<sup>-2</sup> – were chosen based on preliminary tests and previous studies conducted with this species (Hernández Moresino and Helbling, 2010). This latter study determined that neither PAR, nor UVA had significant effects on larvae mortality, whereas mortality occurred just after the incubation period with UVB doses of >22.5 kJ m<sup>-2</sup> (i.e., after 495 min under UVB irradiance of 0.76 W m<sup>-2</sup>). Considering this for the present study we chose the same irradiance level (i.e., 0.76 W m<sup>-2</sup>), but a much shorter time of ca 25% (i.e., 120 min), giving a UVB dose of 5.5 kJ m<sup>-2</sup>; this sublethal dose was used to carry out our experiments. It should be noted that the summer daily doses of UVB reaching the sea surface over the Patagonian region often exceed 30 kJ m<sup>-2</sup> (up to 45 kJ m<sup>-2</sup>) while noon UVB irradiance can be as high as 1.8 W m<sup>-2</sup> (Villafañe et al., 2004).

Pools of 300 larvae were used in each experiment, with larvae of less than 16 h from hatching. They were sorted, using a wide-mouth plastic pipette, into two aquaria (17 × 17 × 4 cm; length × width × depth) containing 300 ml of sterilized seawater and exposed under two radiation treatments: 1) One aquarium – UVR treatment – was covered with a filter film (Ultraplan 290) to eliminate any UVC output from the lamp, so that the pool of larvae received full radiation (PAR + UVA + UVB); 2) One aquarium – PAR treatment or control – was covered with a film filter (Ultraplan UV Opak Digefra) so that larvae received only PAR. The transmission characteristics of these filters are published elsewhere (Villafañe et al., 2003).

After the exposure period, both aquaria were removed from the solar simulator and kept in the same culture chamber at 19–20 °C. The aquaria were gently bubbled and larvae were fed with a mix of diatoms – *Thalassiosira weissflogii* and *Phaeodactylum tricorutum* (final concentration of 6–8 × 10<sup>4</sup> cell ml<sup>-1</sup>). The culture chamber had a photoperiod of 12:12 h and an irradiance level of 250 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> of PAR. The water and food in both aquaria were renewed completely every 2 days (but 3 days between days 6 and 9), and dead larvae were counted, removed, and fixed with 4% formaldehyde for size measurements. The low proportion of dead individuals (<5%) that was observed in both treatments during the three experiments was most likely the result of a combination of factors such as culturing conditions, container effects, handling, etc. rather than exposure to UVR. In addition, every two days (before renewing the water and food) 20 larvae from each treatment were collected and video recorded for motility measurements as explained below. Data from the three experiments were used to determine

changes in body size and larval stages, while data from only two of these were used for motility measurements. We decided to leave one experiment without manipulation (as may occur during video recording and motility measurements) to establish if it might have caused any stress that could have affected the development of larvae. However, we did not find any differences between this experiment and the other two; therefore data from the three were used to determine changes in body size and development.

### 2.1. Size measurements

Fixed larvae were examined under a stereoscope for malformations as well as to determine body size using the Micro Image Analysis Software (MIAS 2003, ver. 1.3B). Between 5 and 10 individuals per radiation treatment were measured every 2 days in each experiment. Total length, length from the rostral to the dorsal spin, length of the carapace, and carapace surface were measured in each individual. From all these variables, the length of the carapace was chosen as an estimation of body size, as it was the one that displayed less variability.

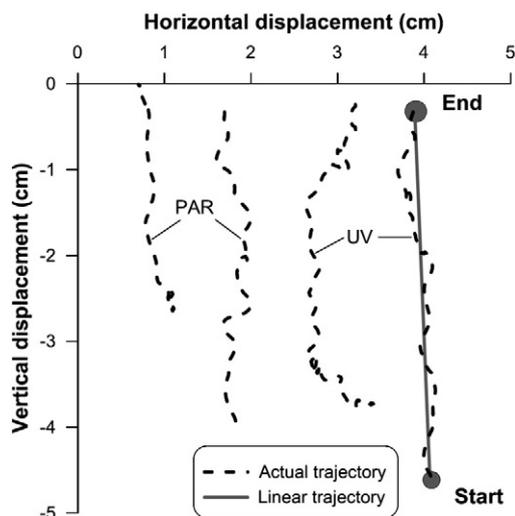
### 2.2. Larval stage determination

Larval stages were determined in fixed samples by counting the number of plumosae setae present in the exopodite of the second pair of maxillipeds; the first two larval stages, Zoea I and II, have four and six setae, respectively. Another distinguishable feature was the length of the facial spin or the size of the carapace, that were shorter and smaller in Zoea I as compared to Zoea II (Scelzo and Lichtschein de Bastida, 1979).

### 2.3. Motility measurements

Every 2 days, 20 larvae were randomly chosen (therefore representing the pool of individuals under each radiation treatment) and placed in a rectangular glass vessel (6 × 5 × 1 cm, vertical × horizontal × optical depth) with 25 ml of sterilized seawater, so that the filmed surface had an area of 25 cm<sup>2</sup> (vessel filled with a 5 cm water column). Before starting the video recordings, larvae were acclimated for ca. 1 min in the dark, which was enough time to dissipate the weak turbulence generated by introducing the individual into the vessel. After less than 1 min, the normal swimming behavior of larvae was observed. Then they were video-recorded during 1 min in darkness, using infrared light (IR) and an IR-sensitive video camera (Sony DCR SR85) at 30 fps. In this way (i.e., filming in darkness) the normal swimming behavior was not altered (e.g., due to differential phototactic behavior produced by non-regular angular distribution of light inside the vessel, etc.). It should be noted that when the individuals moved near the water surface (i.e., <0.5 cm), optical artifacts precluded larvae detection and measurements of swimming speed. Therefore, only clearly visible, defined trajectories were analyzed in this study. More than one of the detected trajectories could belong to any given individual, so the overall motility data for each video of the 20 individuals was considered as representative of their treatment (UVR or PAR) at that stage of the development. After video recording, the larvae were returned to their original container until the next measurement; all the procedure took less than 5 min. Fig. 1 shows some examples of upward swimming (hereafter “tracks”) of two larvae exposed to the different radiation treatments. Non-exposed larvae (at day 0) remained near the water surface (i.e., in the top 0.5 cm of the water column) thus their movements were not analyzed; larval motility at days 2, 4, 6, 9 and 11 after exposure was measured for both radiation treatments.

Video recordings were transformed into individual images (one image per frame) and were pre-processed and binarized (i.e., leaving only the moving larvae as white objects in a dark background) using the software ImageJ (Abramoff et al., 2004). These binary images were



**Fig. 1.** Examples of upward swimming trajectories ('tracks') of larvae, indicating the actual (broken lines) and linear (solid line) trajectories. The -5 value of the Y axis indicates the bottom of the video-recording vessel (i.e., 0 cm is the water surface).

then analyzed to obtain the X–Y position of each detected larva within each frame, using the software CellProfiler (Lamprecht et al., 2007).

In general, these larvae have two types of displacements: (1) a vertical passive sinking, and (2) an almost vertical active upward swimming. We focused in the upward movements (i.e., tracks) as these imply a metabolic cost. From the analysis of these tracks, we obtained swimming velocity, angle displacement with respect to a vertical, linearity, X–Y position and traveled distance for each larva. Linearity of a trajectory between points A and B was calculated as the ratio of the linear distance between these two points and the actual distance traveled by the larvae (i.e., a straight trajectory has a linearity of 1).

To avoid confounding effects from comparing swimming speed of individuals with different sizes (i.e., growth during larval development), the velocity was 'normalized' with body size, thus the velocity is expressed as *body size*  $s^{-1}$ . As no significant body size differences were found between preserved versus live larvae (one-way ANOVA,  $F_{(1,18)} = 0.45$ ,  $P = 0.51$ ) we used the size measurements from the fixed samples to normalize the motility variables.

#### 2.4. Statistical analysis

Due to the effective space under the solar simulator, we were unable to fit replicates for each sublethal exposure. However, replicates were obtained by conducting the same exposure experiment under equal conditions three times, each one with a fresh group of newly-hatched larvae.

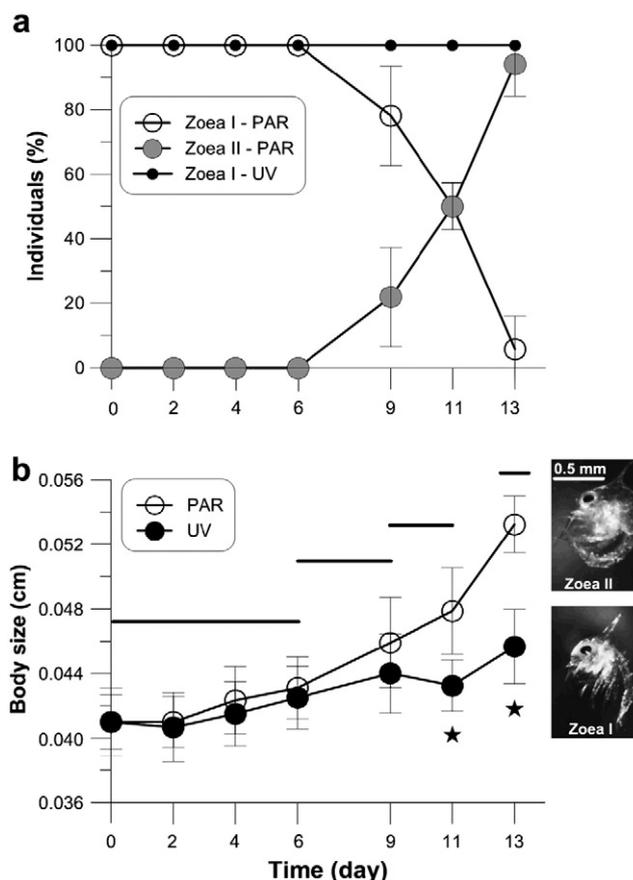
There was a small but non-negligible chance of selecting the same larvae more than once for the motility measurements. In addition, all the variables (i.e., body size, modal velocity, vertical position, actual displacement and linearity) were repeated measurements throughout the time, and no homoscedasticity was observed among days. Therefore, a non-parametric (Friedman) test was used considering multiple dependent-samples comparisons. When the results of the Friedman tests were significant, pair dependent-samples comparisons were done using the non-parametric Wilcoxon test.

Linear regressions were used to fit the modal velocity, number of tracks, actual displacement, linearity versus the time (sampling days), and the significance of the slopes were determined using an ANOVA test. One-way ANOVA was used to test for differences between radiation treatments, on specific days (Zar, 1999). We used the R Software Package version 2.11 to test for significance (which was fixed at  $P < 0.05$ ).

### 3. Results

#### 3.1. Molting and growth

Fig. 2 shows the differential development and body size in larvae pre-exposed to PAR-only or PAR + UVR. There were significant changes in the developmental stages (Fig. 2a) and in body size (Fig. 2b) between the two radiation treatments. The larvae that received UVR remained as Zoea I during the whole experimental period, not reaching the Zoea II stage (Fig. 2a). On the other hand, larvae that received only PAR started to molt from Zoea I to Zoea II between days 6 and 9, reaching ca 50% of the second larval stage on day 11, and 100% of Zoea II at the end of the experiment (Fig. 2a). No malformations were observed in any of the radiation treatments at any time of development. The body size of larvae (Fig. 2b) in the UVR treatment ranged from 0.041 to 0.045 cm and did not show a significant increase during the experiment (Friedman test,  $X^2_{(N=2, df=6)} = 11.58$ ,  $P = 0.07$ ). On the other hand, the body size of larvae in the PAR treatment had a significant increase (Friedman test,  $X^2_{(N=2, df=6)} = 20.15$ ,  $P < 0.01$ ) from 0.041 (SD = 0.004) to 0.054 (SD = 0.003) cm after 13 days. The differential increase in body size among larvae from the two radiation treatments resulted in significantly larger larvae in the PAR treatment as compared to those in the UVR treatment, on day 11 (ANOVA,  $F_{(1, 4)} = 8.49$ ,  $P < 0.01$ ) and on day 13 (ANOVA,  $F_{(1, 4)} = 14.82$ ,  $P < 0.01$ ).



**Fig. 2.** Molt and growth of larvae after exposure to UVR (black circles) and to PAR (white and gray circles). a) Proportion (%) of Zoea I and Zoea II. b) Body size of larvae (in cm) throughout the experimental period (13 days). Symbols represent the mean of three experiments except for day 6 in which one sample was lost ( $n = 2$ ). The vertical lines indicate the standard deviations, while the asterisks indicate significant differences among radiation treatments ( $P < 0.05$ ). The horizontal lines in panel b connect the PAR treatment samples that were not significantly different (Wilcoxon test).

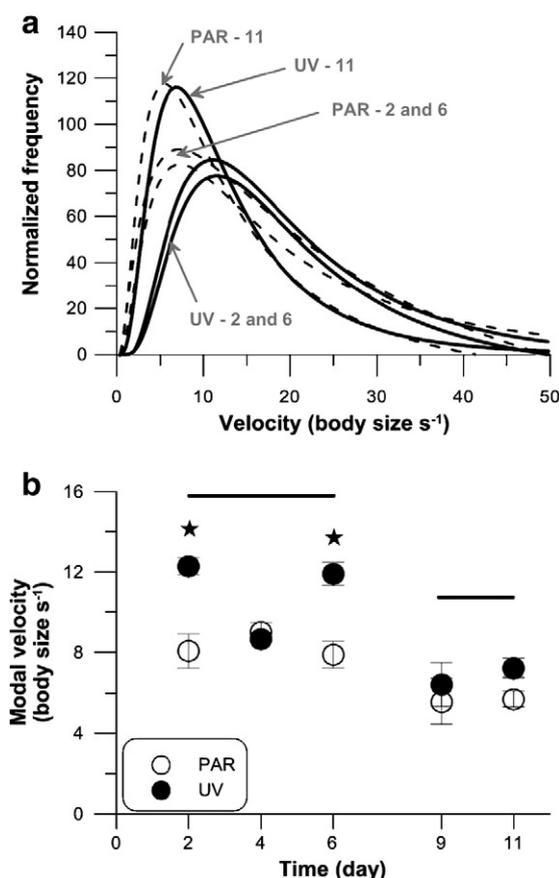
### 3.2. Motility

A general pattern of motility was observed in every video recording: a variable amount of larvae stayed very near the water surface, while the rest performed the sink-and-swim-up motion described above. None of the individuals in any video session was observed to stay quiet at the bottom or at a particular depth (i.e., any individual which was not at the surface performed the “sink and swim up” pattern). Therefore for every track that was accounted, a previous sink was always observed. A LogNormal function was the best fit for the larvae swimming speed frequencies distribution (Fig. 3); the frequency distributions shifted towards slowest velocities in both treatments as the experiments progressed (Fig. 3a). Differences were observed between radiation treatments only at days 2 and 6 when comparing the modal velocity (i.e., the most frequent value) (Fig. 3b) (ANOVA,  $F_{(1, 2)}=39.49$ ,  $P=0.02$  and  $F_{(1, 2)}=41.97$ ,  $P=0.02$ , respectively) with larvae pre-exposed to UVR having higher modal velocity than those that received only PAR (Fig. 3b). As depicted by the modal velocity throughout the experiments, there was a significant slowing down of the swimming speed at the two last days (9 and 11, as compared to days 2, 4 and 6) (Friedman test,  $X^2_{(N=4, df=4)}=12.00$ ,  $P=0.02$ ; Wilcoxon signed-ranks test,  $T=2.52$ ,  $N=8$ ,  $P=0.01$ ).

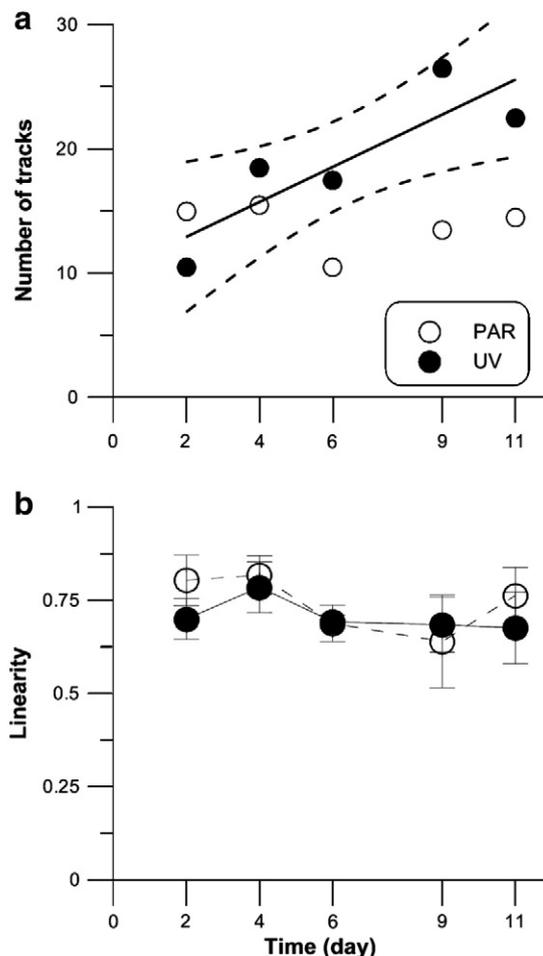
As 20 larvae were filmed in each video for motility measurements, observing less than 20 tracks indicated that some larvae migrated down while others stayed at the surface and thus these latter were not accounted for motility measurements. On the other hand, when more

than 20 tracks were observed this would reflect that a) at least one individual did more than one downward/upward excursion and b) higher overall motility on that treatment. The number of observed tracks did not show significant changes for the PAR treatment and remained between 10 and 15 (Fig. 4a), indicating that these were the maximum number of larvae moving down (and then up) while the rest of them stayed at the surface. In the UVR treatment, however, the number of tracks increased significantly as the experiment progressed (i.e., 10 tracks at day 2 to 26 tracks at day 9), with a significant linear increase of 1.41 per day ( $r^2=0.64$ ,  $F_{(1, 8)}=8.65$ ,  $P=0.02$ ). The locomotion pattern was in general highly linear (Fig. 4b), and there were no differences among radiation treatments or sampling days (mean overall value of 0.71,  $SD=0.09$ ,  $N=20$ ).

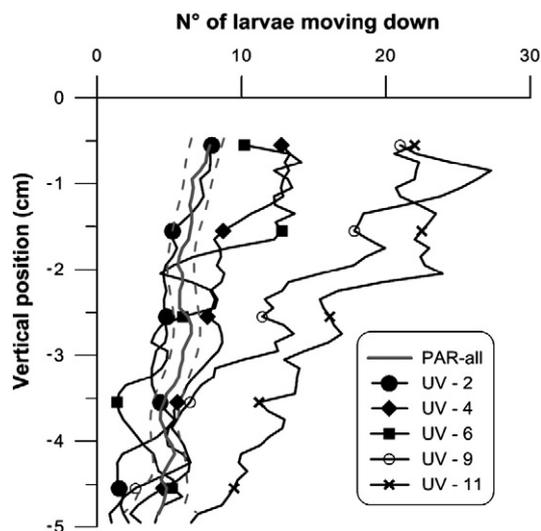
In order to relate the changes in the number of tracks recorded (Fig. 4) with the actual vertical position of larvae, the time-integrated vertical distribution of larvae during the upward swimming path was obtained by considering all the occurrences of larvae at different depths (i.e., swimming up) during the one-min video, using 0.1 cm depth intervals (Fig. 5). The average larval occurrence at any specific depth was then plotted against their vertical position (i.e., depth) for each sampling day. There were no significant differences in the amount of larvae as a function of their vertical position in the PAR treatment, indicating that not only the number of tracks did not change (Fig. 4), but also that the number of “sink events” did not change during the experiment. However, larvae that received UVR had a higher number of occurrences at all depths in the water column



**Fig. 3.** Swimming speed during the experiments. a) Mean frequency distributions of two experiments for both radiation treatments as adjusted by LogNormal curves. b) Modal velocity (expressed as body size s<sup>-1</sup>) determined from the LogNormal frequency distributions. The vertical lines indicate the half mean range, while the asterisks indicate significant differences among radiation treatments ( $P<0.05$ ). The horizontal lines indicate samples that were not significantly different pooling the two radiation treatments (Wilcoxon test).



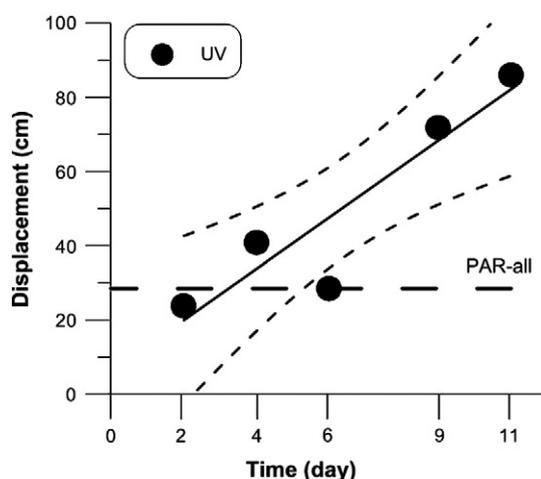
**Fig. 4.** Motility as a function of time, as determined by tracks number and linearity. a) Average number of tracks. Broken lines indicate the 95% confidence limits for the linear fit (solid line); b) Linearity of the tracks. Vertical error bars indicate the half mean range.



**Fig. 5.** Larval position in the water column as a function of time for the two experiments. For the UVR treatment, each black solid line indicates the number of larvae encountered at the corresponding depth for each day. The gray solid and broken lines indicate the mean distribution and 95% confidence limit, respectively, for larvae in the PAR treatment for all days. For simplicity, symbols are shown every 1 cm.

(below the top 0.5 cm), showing an increased overall activity in this treatment. As the total amount of individuals was the same in every video (i.e., 20 larvae), we can also infer from Fig. 5 that the number of individuals at the surface (i.e., excluded from our analysis –see above) decreased in the UVR treatment during the experiment: initially (days 2–6) there were between 5 and 10 occurrences at all depths, which means that more larvae stayed at the surface as compared to the last part of the experiment (days 9 and 11) when more occurrences were observed below 0.5 cm (i.e., less larvae stayed at the surface).

The overall higher activity in the UVR treatment was also confirmed by calculating the integrated vertical displacement of larvae, which resulted in a linear increase as the experiments progressed (Fig. 6). In this way we quantified the increased deeper distribution of the larvae that received UVR with a linear increase of 6.92 cm per day for the whole pool of larvae moving below the 0.5 cm depth ( $r^2 = 0.65$ ,  $F_{(1, 8)} = 14.86$ ,  $P < 0.01$ ).



**Fig. 6.** Actual overall displacement of larvae in the UVR treatment, calculated from the occurrences versus vertical position, as a function of time. Thin, solid and broken lines indicate the linear fit and the 95% confidence limits for the UVR treatment. The thick broken line indicates the constant larvae displacement under the PAR treatment, for comparison.

#### 4. Discussion

Most studies dealing with UVR upon invertebrate larvae have focused on lethal-exposure effects such as survival rate (Browman et al., 2000; Wübben and Vareschi, 2001; Hernández Moresino and Helbling, 2010). Sublethal effects, however, may be also very important, especially when early stages are the targets for UVR. Our results show that molting, body size and motility of *C. altimanus* larvae are affected by sublethal pre-exposure to UVR. In the following paragraphs we will discuss how these UVR effects might affect the behavior and reproductive success of *C. altimanus* from Patagonian waters.

It has been observed that molting of decapods larvae is usually delayed under unfavorable conditions such as changes in temperature, salinity, nutrition, and water chemistry (Anger 2003 and references therein). In our study, we further determined that a sublethal dose of UVR may also act as an additional stress factor, resulting in a delay/absence of molting, and thus extending the duration of a particular developmental stage. Since *C. altimanus* settles on the bottom when they reach the juvenile stage, this extended larval period will lead to a longer planktonic stage. This in turn, most likely would decrease its survival due to starvation, exposure to other physical stress, predators (among others) as seen in other studies (Morgan, 1995). In addition, a longer planktonic stage would expose larvae to more UVR, with the potential of higher mortality as observed in previous studies carried out with this crab species (Hernández Moresino and Helbling, 2010). A delayed metamorphosis, preceding the benthic juvenile form, may also affect post-metamorphic performance (e.g., reduction of growth, survival and development rates) as observed in juvenile decapods that had an extended time of larvae stage (Gebauer et al., 2003), this being a rather general pattern for many organisms. For example, energy reserves, metamorphosis and growth rates might be affected, as observed in fish larvae from the Lake Pyhäselkä (Pechenik, 2006; Ylönen et al., 2004), in the barnacle *Balanus amphitrite* (Thiyagarajan et al., 2007) and in several marine invertebrates – see review by Pechenik (2006). Under this scenario, the chances of a given larva to become a reproductive member of the population decreases, with the concomitant cost for the population.

Molting is also very important, as body size depends on it. For example, the body length of brachyuran crab larvae increases linearly with the consecutive larval stages (Anger, 2001). In many zooplankton organisms, size has a key importance for feeding, searching ability and predation risk, as observed for fish larvae (Miller et al., 1988). In our study, the absence of molting in the UVR-pre-exposed larvae had a direct impact on their body size as they did not grow during the experiment. On the other hand, PAR only-exposed larvae reached a size that is within the “normal” growth range (Scelzo and Lichtschein de Bastida, 1979).

It could be argued that any sublethal UVR-induced impact would decrease the swimming activity, as seen for frog larvae (Hatch and Blaustein, 2000), although it does not seem to be a general feature – e.g., swimming behavior of juvenile trout can be enhanced under UVR exposure (Alemanni et al., 2003). In terms of swimming speed, our results support the hypothesis of a velocity reduction due to UVR (Fig. 3a and b). However, in terms of overall activity the contrary can also be argued, as UVR larvae were increasingly active during their development as compared to those in the PAR treatment (Figs. 4–6). This was observed as more tracks (Fig. 4a), but as linearity was unchanged (Fig. 4b), it was ultimately translated into more effective cumulative displacement (Fig. 6). This is especially important in terms of energy budget since the displacement was obtained by measuring the active vertical movement during the upward swimming of individuals. Therefore larvae exerted the necessary upward force during these displacements (Fig. 6), and thus the active upward swimming involved a metabolic cost, unlike the passive sinking mode. As the individual

has to outperform gravity plus drag by exerting an upward momentum, Fig. 6 also suggest that more energy was needed as the displacement increased over time in the UVR treatment. Regarding the vertical distribution of these displacements, they in turn resulted in a higher number of occurrences at any depth as compared to the PAR treatment (Fig. 5). This increased activity and its concomitant energetic cost might leave less energy for molting/growth, which ultimately would result in a delay/absence of molting. The increased activity moving down in the water column might be due to (1) a natural mechanism of the larvae to “escape” from the water surface where UVR is high, and/or (2) a tendency to spend more time ‘sinking’ to increase the probability of encounter food particles – i.e., these crabs feed while they are sinking (Anger, 2001). This pattern was not observed in the PAR-only exposed larvae that had the same distribution in the water column at all times but, most important, more than 50% of the PAR larvae always remained near the surface. This would indicate that food might not be a limitation, but rather, the downward excursions might be more related to the need of changing their position in the water column to avoid UVR or, alternatively, it was a particular behavior related to their lack of molting.

Our laboratory results suggest that larvae of *C. altimanus* may avoid surface layers when they have been previously exposed to UVR (Fig. 5). In an ecological context, the changes in the vertical position of larvae (i.e., away from a potential UVR-exposure at the surface) may strongly affect their dispersal behavior. It has been shown that the larvae of *C. altimanus* are dispersed near the surface after hatching from the shallow coastal area towards offshore waters (Dellatorre, 2009). Thus, larvae that stay less time near the surface would have fewer chances for dispersal, and they may not be able to reach favorable areas for their next stage of development.

In their natural environment, it is expected that larvae will have one or several mechanisms to avoid or minimize UVR damage. Some of them are the diel vertical migration (Alonso et al., 2004; Queiroga and Blanton, 2005), DNA repair mechanisms (Gonçalves et al., 2002; Mitchell et al., 2009), and acquisition of protective compounds through diet (e.g., carotenoids, mycosporine-like amino acids) (Banaszak, 2003; Helbling et al., 2002; Newman et al., 2000). We have previously shown that *C. altimanus* larvae have UV-absorbing compounds and carotenoids ((Hernández Moresino and Helbling, 2010)). However, our set up of experiments did not allow for the induction of these compounds by feeding the adults or the larvae with food rich in UV-absorbing compounds. So our results were obtained with the “normal” concentration of this compounds that the larvae had in nature, and of course this would vary from one location to another, depending on the food availability.

It should be noted however, that the overall performance of *C. altimanus* larvae will be the result of the interaction of several factors that can act synergistically or antagonistically (Dunne 2010). In our case, we tested one of the potential stressors (i.e., UVR) and our results indicate that sublethal UVR doses might have more consequences for the population and the ecosystem than previously thought. It remains to be explored if this negative effect – as observed in molting, body size and motility – can be counteracted by changes in other variables as seen in previous studies that observed, for example, that higher temperature can reduce UVR-induced damage in other zooplankton species (MacFadyen et al., 2004; Sanders et al., 2005; Cooke et al., 2006).

## Acknowledgements

We thank R. Blum for her help with larval maintenance and video recording. We also thank P. Barón for loaning of equipment and V. Villafañe for her comments and suggestions on the Ms. This work was partially supported by Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica–ANPCyT (PICT No. 2007–01651) and Fundación Playa

Unión. This work is in partial fulfillment for a Ph. D. degree of R. D. Hernández Moresino. This is Contribution No. 126 of Estación de Fotobiología Playa Unión. [SS]

## References

- Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., Ram, S.J., 2004. Image processing with Image. *J. Biophotonics Int.* 11 (7), 36–42.
- Adams, N.L., Shick, J.M., 2001. Mycosporine-like amino acids prevent UVB-induced abnormalities during early development of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Mar. Biol.* 138, 267–280.
- Alemanni, M.E., Lozada, M., Zagarese, H.E., 2003. Assessing sublethal effects of ultraviolet radiation in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Photochem. Photobiol. Sci.* 2, 867–870.
- Alonso, C., Zagarese, H.E., Rocco, V., Barriga, J.P., Battini, M.A., 2004. Surface avoidance by freshwater zooplankton: field evidence on the role of ultraviolet radiation. *Limnol. Oceanogr.* 49 (1), 225–232.
- Anger, K., 2001. The Biology of Decapod Crustacean Larvae. A. A. Balkema, Lisse – The Netherlands. 419 pp.
- Anger, K., Thatje, S., Lovrich, G., Calcagno, J., 2003. Larval and early juvenile development of *Paralomis granulosa* reared at different temperatures: tolerance of cold and food limitation in a lithodid crab from high latitudes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 253, 243–251.
- Banaszak, A.T., 2003. Photoprotective physiological and biochemical responses of aquatic organisms. In: Helbling, E.W., Zagarese, H.E. (Eds.), *UV Effects in Aquatic Organisms and Ecosystems*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 329–356.
- Browman, H.I., Alonso Rodríguez, C., Béland, F., Cullen, J.J., Davis, R.F., Kouwenberg, J.H.M., Kuhn, P.S., McArthur, B.L., Runge, J.A., St-Pierre, J.F., Vetter, R.D., 2000. Impact of ultraviolet radiation on marine crustacean zooplankton and ichthyoplankton: a synthesis of results from the estuary and Gulf of St. Lawrence, Canada. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 199, 293–311.
- Cooke, S.L., Williamson, C.E., Saros, J.E., 2006. How do temperature, dissolved organic matter and nutrients influence the response of *Leptodiantomus ashlandi* to UV radiation in a subalpine lake? *Freshwater Biol.* 51, 827–837.
- de Mora, S., Demers, S., Vernet, M., 2000. The Effect of UV Radiation in the Marine Environment. Cambridge University Press, Cambridge. 324 pp.
- Dellatorre, F.G., 2009. Influencia de factores ambientales sobre la distribución y el asentamiento de larvas de cangrejos braquiuros y anomuros con potencial pesquero en Golfo Nuevo. Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Argentina. pp. 229.
- Fischer, J.M., Fields, P.A., Pryzbylowski, P.G., Nicolai, J.L., Neale, P.J., 2006. Sublethal exposure to UV radiation affects respiration rates of the freshwater cladoceran *Daphnia catwba*. *Photochem. Photobiol.* 82, 547–550.
- Freitag, J.F., Steeger, H.U., Storz, U.C., Paul, R.J., 1998. Sublethal impairment of respiratory control in plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae induced by UV-B radiation, determined using a novel biocybernetical approach. *Mar. Biol.* 132, 1–8.
- Gebauer, P., Paschke, K., Anger, K., 2003. Delayed metamorphosis in decapod crustaceans: evidence and consequences. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 76, 169–175.
- Gonçalves, R.J., Villafañe, V.E., Helbling, E.W., 2002. Photorepair activity and protective compounds in two freshwater zooplankton species (*Daphnia menucensis* and *Metacyclops mendocinus*) from Patagonia, Argentina. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1, 996–1000.
- Gonçalves, R.J., Barbieri, E.S., Villafañe, V.E., Helbling, E.W., 2007. Motility of *Daphnia spinulata* as affected by solar radiation throughout an annual cycle in mid-latitudes of Patagonia. *Photochem. Photobiol.* 83, 824–832.
- Häder, D.-P., Helbling, E.W., Williamson, C.E., Worrest, R.C., 2011. Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem. Photobiol. Sci.* 10, 242–260.
- Hatch, A.C., Blaustein, A.R., 2000. Combined effects of UV-B, nitrate, and now pH reduce the survival and activity level of larval cascades frogs (*Rana cascadae*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39 (4), 494–499.
- Helbling, E.W., Zagarese, H.E., 2003. UV Effects in Aquatic Organisms and Ecosystems. The Royal Society of Chemistry, Cambridge. 1–575 pp.
- Helbling, E.W., Menchi, C.F., Villafañe, V.E., 2002. Bioaccumulation and role of UV-absorbing compounds in two marine crustacean species from Patagonia, Argentina. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1, 820–825.
- Hernández Moresino, R.D., Helbling, E.W., 2010. Combined effects of UVR and temperature on the survival of crab larvae (Zoea I) from Patagonia: the role of UV-absorbing compounds. *Mar. Drugs* 8, 1681–1698.
- Kuffner, I.B., 2001. Effects of ultraviolet (UV) radiation on larval settlement of the reef coral *Pocillopora damicornis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 217, 251–261.
- Lamprecht, M.R., Sabatini, D.M., Carpenter, A.E., 2007. Cell Profiler™: free, versatile software for automated biological image analysis. *Biotechniques* 42, 71–75.
- Lermada, M.P., Urrutia, C., Novoa, V., Rudolph, A., 2009. Efecto del EDTA sobre la toxicidad del cromo (VI) en el desarrollo larval de *Petrolisthes laevigatus* (Guérin, 1835). *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 44 (1), 137–143.
- Lesser, M.P., Farrell, J.H., Walker, C.W., 2001. Oxidative stress, DNA damage and p53 expression in the larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to ultraviolet (290–400 nm) radiation. *J. Exp. Biol.* 204, 157–164.
- MacFadyen, E.J., Williamson, C.E., Grad, G., Lowery, M., Wade, J.H., Mitchell, D.L., 2004. Molecular response to climate change: temperature dependence of UV-induced DNA damage and repair in the freshwater crustacean *Daphnia pulicaria*. *Global Change Biol.* 10, 408–416.

- Miller, T.J., Crowder, L.B., Rice, J.A., Marschall, E.A., 1988. Larval size and recruitment mechanisms in fishes: toward a conceptual framework. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45 (9), 1657–1670.
- Mitchell, D.L., Adams-Deutsch, T., Olson, M.H., 2009. Dose dependence of DNA repair in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae exposed to UV-B radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 8 (1), 75–81.
- Morgan, S.G., 1995. Life and death in the plankton: larval mortality and adaptation. In: McEdward, L. (Ed.), *Ecology of Marine Invertebrate Larvae*. CSC Press, Boca Raton, pp. 279–321.
- Newman, S.J., Dunlap, W.C., Nicol, S., Ritz, D., 2000. Antarctic krill (*Euphausia superba*) acquire a UV-absorbing mycosporine-like amino acid from dietary algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 255, 93–110.
- Pahkala, M., Laurila, A., Merilä, J., 2001. Carry-over effects of ultraviolet-B radiation on larval fitness in *Rana temporaria*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 268, 1699–1706.
- Pechenik, J.A., 2006. Larval experience and latent effects—metamorphosis is not a new beginning. *Integr. Comp. Biol.* 46 (3), 323–333.
- Queiroga, H., Blanton, J., 2005. Interactions between behaviour and physical forcing in the control of horizontal transport of Decapod Crustacean larvae. *Adv. Mar. Biol.* 47, 107–214.
- Sanders, R.W., Macaluso, A.L., Sardina, T.J., Mitchell, D.L., 2005. Photoreactivation in two freshwater ciliates: differential responses to variations in UV-B flux and temperature. *Aquat. Microb. Ecol.* 40, 283–292.
- Scelzo, M.A., Lichtschein de Bastida, V., 1979. The larval development and metamorphosis of the crab *Cyrtograpsus altimanus* Rathbun, 1914 (Brachyura, Grapsidae) in the laboratory, with observations on the ecology of the specie. *Physica A* 38 (94), 103–126.
- Shick, J.M., Lesser, M.P., Jokiel, P.L., 1996. Effects of ultraviolet radiation on corals and other coral reef organisms. *Glob. Change Biol.* 2, 527–545.
- Sinha, R.P., Häder, D.-P., 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1, 225–236.
- Tartarotti, B., Torres, J.J., 2009. Sublethal stress: impact of solar UV radiation on protein synthesis in the copepod *Acartia tonsa*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 375, 106–113.
- Thiyagarajan, V., Pechenik, J.A., Gosselin, L.A., Qian, P.Y., 2007. Juvenile growth in barnacles: combined effect of delayed metamorphosis and sub-lethal exposure of cyprids to low-salinity stress. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 344, 173–184.
- Vega, M.P., Pizarro, R.A., 2000. Oxidative stress and defence mechanisms of the freshwater cladoceran *Daphnia longispina* exposed to UV radiation. *J. Photochem. Photobiol. B* 54, 121–125.
- Villafañe, V.E., Sundbäck, K., Figueroa, F.L., Helbling, E.W., 2003. Photosynthesis in the aquatic environment as affected by UVR. In: Helbling, E.W., Zagarese, H.E. (Eds.), *UV Effects in Aquatic Organisms and Ecosystems*. Royal Society of Chemistry, pp. 357–397.
- Villafañe, V.E., Marcoval, M.A., Helbling, E.W., 2004. Photosynthesis versus irradiance characteristics in phytoplankton assemblages off Patagonia (Argentina): temporal variability and solar UVR effects. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 284, 23–34.
- Wübben, D.L., Vareschi, E., 2001. Differential UVB-sensitivities of five New Zealand freshwater zooplankton species. *N.Z. J. Mar. Freshwat. Res.* 35, 635–645.
- Ylönen, O., Heikkilä, J., Karjalainen, J., 2004. Metabolic depression in UV-B exposed larval coregonids. *Annu. Zool. Fenn.* 41, 577–585.
- Zar, J.H., 1999. *Biostatistical Analysis*, 4th ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.