



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Variaciones temporales del zooplancton del Lago del Círculo Militar
de Caracas (DC) y bases para la taxonomía molecular de
Thermocyclops decipiens (Copepoda, Cyclopoida).**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Jailyn Carrasquel como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutores: Dra. Guillermina Alonso
Dr. Ernesto González

Caracas, Venezuela
Mayo, 2010

A mis padres, al amor de mi vida y
a mi pequeña Angie...

RESUMEN

En Venezuela existe una gran cantidad de sistemas acuáticos, los cuales se han estudiado en base a sus características físicas, químicas y biológicas. Para el Lago del Círculo Militar no existen trabajos previos publicados sobre sus características limnológicas, así como tampoco de la comunidad de zooplancton que habitan en ese sistema acuático. Es por ello, que el objetivo de este proyecto fue estudiar las variaciones temporales de la composición y abundancia de la comunidad de zooplancton en este lago artificial.

Para realizar este estudio, se estimaron las variables fisicoquímicas: temperatura, oxígeno disuelto, pH, conductividad y transparencia del cuerpo de agua del lago, se colectó el zooplancton y se determinó la biomasa del fitoplancton.

La biomasa del fitoplancton estimada como concentración de clorofila-*a* varió entre 3,92 µg/l (30 de abril) y 21,16 µg/l (14 de mayo) con una media de 11,96 ± 7.27 µg/l. Se identificaron 13 entidades taxonómicas representadas por los Cyclopoida, Cladocera, Rotifera, Ostracoda y larva de Chironomidae (Diptera). El zooplancton de Lago del Círculo Militar estuvo dominado por los copépodos, excepto en el mes de mayo cuando los rotíferos fueron dominantes, mientras que los cladóceros permanecieron en bajas densidades durante el periodo de estudio al igual que los protozoarios y los ostrácodos. La abundancia del zooplancton en los estratos superficiales superó en más del doble la abundancia de los estratos más profundos en la mayoría de los casos, con valores entre 87 ind./l (9 de junio) y 420 ind./l (25 de junio). Considerando toda la columna de agua, la abundancia total del zooplancton varió entre 55 ind./l (9 de julio) y 203 ind./l (25 de junio), con una media de 146 ± 53 ind./l, lo cual representa un valor moderado de abundancia.

Entre los componentes del zooplancton se encuentra del copépodo Cyclopoida *Thermocyclops decipiens* (Kiefer, 1929), siendo un organismo presente en gran abundancia en los sistemas tropicales y un indicador del estado trófico de éstos; por ello se realizaron análisis moleculares de este organismo. Estudios moleculares en este copépodo no han sido realizados previamente en Venezuela, por lo que el mismo será de gran utilidad para conocer la secuencia molecular de esta especie en nuestro país, y en el futuro utilizar estos conocimientos como una herramienta en la sistemática de copépodos en un ecosistema determinado. Para ello, se amplificó la región del espaciador interno transcrito ITS2 del ADN ribosomal de los individuos *T. decipiens* que se recolectaron en el lago, por medio de ensayos de PCR y secuenciación.

La secuencia de la región ITS2 del ADN ribosomal de *T. decipiens*, cuya secuencia alineó 100% con las obtenidas en los estudios realizados en la misma especie en Brasil, indicando que las técnicas moleculares empleadas en este trabajo fueron exitosas, marcando así las bases para el estudio molecular de copépodos presentes en cuerpos de agua venezolanos.

Las técnicas moleculares son herramientas muy útiles en los estudios de la sistemática de copépodos, por lo que estos resultados podrán ser aplicados en el futuro cercano para el análisis taxonómico del zooplancton presente en cuerpos de agua venezolanos.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mis padres, por ser el soporte que me a mantenido firme durante toda mi existencia, a mi madre por enseñarme el cariño y la devoción, por estar ahí siempre con su amor incondicional y su abrazo oportuno, gracias mamá por ser la mujer que eres y la mejor madre. A mi padre por ser el hombre tan luchador que es, por siempre tener una broma y un gesto de cariño, por luchar cada día por tus hijos, gracias por enseñarme la paciencia y por ser mi padre. A los dos gracias por enseñarme valores y éticas y sembrar en mi su sabiduría.

Al amor de mi vida: Johan. Gracias por todos estos años y por los que vendrán, gracias por enseñarme lo que es luchar y seguir firme ante la vida, gracias por los consejos, el amor, los regaños, las risas, la felicidad, simplemente gracias por estar ahí, eres el hombre perfecto para mí y lo mejor que me ha pasado. A mi suegro el Sr. Miguel, por abrirme las puertas de su casa, por todo el apoyo y cariño, por brindarme no sólo un techo sino ser parte de su familia, a usted le debo mucho, y todo su apoyo nunca lo olvidare.

A mi amiga y hermana Carla por todo el apoyo incondicional, por estar ahí cuando más te he necesitado, gracias por escucharme y apoyarme, gracias por todos estos años de amistad y por estar junto mí en toda esta carrera en la UCV, eres la mejor! A mi amigo Efraín por siempre brindar su mano amiga y tenernos tanta paciencia, gracias por compartir todos estos años con nosotros y espero que esta amistad siga por muchos años más. A mi gran amiga Nadia, gracias por ser mi consejera por siempre tenernos en cuenta, gracias por apoyarme, escucharme y consolarme en los momentos difíciles, eres la mejor amiga y te quiero mucho.

A mi tutores (primero las damas), Dra. Guillermina Alonso, por su gran paciencia y confianza, gracias por estar siempre pendiente de mi tanto en el ámbito académico como el personal. Su diplomacia y firmeza dignas de admiración me ha enseñado que luchando duro si se puede conseguir con que uno desea. A mi tutor Dr. Ernesto González, también por su gran paciencia, por su cariño y por estar también pendiente de mi tanto académica como personalmente, usted sinceramente es uno de los mejores profesores que ha pisado la UCV, siempre dispuesto a enseñarnos la importancia del trabajo por este país. Gracias Profes!.

A todo el equipo del Lab. Virología Molecular del IVIC, Dra. Flor Pujol; Dra. Marisol Devesa; Lic. Carmen Luisa Loureiro; Lic. Domingo Garzaro; Dr. Héctor Rangel; Lic. Mireya Ponte; los señores Héctor Pereira y José Colmenares y por supuesto a mi gran amiga Lic. Idamelis Rodríguez. A todos gracias por los años que estuve trabajando con ustedes, son el mejor laboratorio de todo el IVIC, los quiero mucho. También agradezco enormemente a la

Dra. Ana Zita Fernández del Lab. Hemostasia y Genética Vascular del IVIC por todo su apoyo, su cariño, sus regaños, sus consejos y por ser mi guía durante tanto tiempo, Anita te quiero un montón!

A mis amigas María, Yolihect y Marisela, a pesar de la distancia se que el cariño nos mantiene unidas, gracias por todos esos momentos de risas que siempre atesoraré en mi memoria, gracias Yoli por esas ocurrencias, Marisela por siempre apoyarme y María por el robo en Cata ese es el mejor recuerdo, digno de contar a los nietos. Gracias también a mis amig@s Afrodita, Lilibeth, Lourdes, Diana, Analiett, Rosangela, Gustavo y Mauricio por compartir conmigo durante esta carrera, son los mejores compañeros que una puede encontrar, los quiero mucho.

A mis hermanos porque aunque no nos comunicamos a menudo se que ese lanzo de sangre siempre nos mantendrá unidos. A mi prima Yuraima por comportarse como una hermana mayor conmigo. También quiero agradecerles a toda la familia Fanelli – Andrzejewski por aceptarme como parte de su familia, gracias por todas las anécdotas y las risas.

A mis jurados, Dra. Evelyn Zoppi y el Dr. Juan Carlos Navarro por su asesoría y entusiasmo para con este trabajo, gracias por el apoyo y los consejos.

Al Prof. Andrés Correa de la Escuela de Física de Ciencias – UCV, porque a pesar de que nunca me dio clases siempre estuvo pendiente de mi en toda esta carrera. Gracias al Prof. Jorge Pérez por sus consejos, apoyo y cariño cuando lo necesité. También gracias a Renny por toda su ayuda en la biblioteca, al Dr. David Batista egresado de la Escuela de Matemática Ciencias – UCV y ahora miembro del departamento de Computational Science de San Diego State University, por su gran ayuda y apoyo y a mi amiga la Lic. Floritza Bustamante por sus recomendaciones profesionales y por sus consejos para con este trabajo de tesis y al Prof. Renato Nobrega por toda su ayuda en la parte estadística.

A la Universidad Central de Venezuela, y a los integrantes del Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos (IBE) y del Laboratorio de Limnología (IBE) por mi formación académica y mi superación personal y gracias al CeSAAN (IVIC) por sus servicios de secuenciación. También gracias al personal del Lago de Círculo Militar por su disposición para realizar este trabajo.

A todos gracias, se que no nombre a todos los que contribuyeron con mi desarrollo personal, pero aunque no estén escritos aquí están tallados en mi corazón, a todos mis más sinceros agradecimientos.

INDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	iii
AGRADECIMIENTOS	vi
INDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE TABLAS	xiii
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	
1. Estudios ecológicos en <i>Thermocyclops decipiens</i>	13
2. Estudios moleculares en <i>Thermocyclops decipiens</i>	14
3. Estudios en sistemas acuáticos y <i>Thermocyclops decipiens</i> en Venezuela	15
HIPOTESIS	19
OBJETIVOS	
General	20
Específicos	20

MATERIALES Y METODOS

1. Área de estudio	21
2. Estimaciones fisicoquímicas	22
3. Biomasa de fitoplancton	23
4. Abundancia del zooplancton	24
5. Análisis de datos	24
6. Identificación molecular de <i>Thermocyclops decipiens</i>	25
6.1. Extracción de ADN	25
6.2. Reacción de Cadena de la Polimerasa	28
6.3. Electroforesis en agarosa	30
6.4. Purificación de los Productos de PCR	31
6.5. Secuenciación de los productos de PCR	31
6.6. Análisis de secuencias	32

RESULTADOS

1.- Variables fisicoquímicas	33
1.1. Transparencia del agua	33
1.2. Temperatura del agua	34
1.3. Oxígeno disuelto	36
1.4. Conductividad	36
1.5. pH	37

2.- Variables biológicas	41
2.1. Biomasa del fitoplancton	41
2.2. Abundancia del zooplancton	41
3.- Análisis estadísticos	50
3.1 Análisis de Componentes Principales	51
3.2 Correlación de Pearson (r)	57
3.3 Análisis de la estructura comunitaria	59
3.4 Índices de diversidad y equidad	59
4.- Identificación molecular de <i>Thermocyclops decipiens</i>	60
4.1. Extracción de ADN y amplificación de la región ITS2	60
4.2. Secuencia de la región ITS2 del rADN de <i>T. decipiens</i>	64
DISCUSIÓN	69
CONCLUSIONES	79
BIBLIOGRAFIA	81

INDICE DE FIGURAS

	Pagina
1. Ejemplar hembra adulto de <i>Thermocyclops decipiens</i> .	6
2. Cuarto apéndice torácico de <i>T. decipiens</i> .	6
3. Receptáculo seminal de <i>T. decipiens</i> .	7
4. Apéndices caudales de <i>T. decipiens</i> .	7
5. Región de los espaciadores internos transcritos (ITS) del ADN ribosomal.	10
6. Imagen satelital del Lago Artificial del Círculo Militar Caracas.	21
7. <i>Chara</i> sp. y <i>Elodea</i> sp. presentes en el Lago del Circulo Militar.	22
8. Transparencia del agua en la estación de muestreo.	34
9. Perfiles de temperatura del agua en la estación de muestreo.	35
10. Perfiles de oxígeno disuelto en la estación de muestreo.	38
11. Perfiles de conductividad en la estación de muestreo.	39
12. Perfiles de pH en la estación de muestreo.	40
13. Perfiles de clorofila- <i>a</i> en la estación de muestreo.	44
14. Distribución de los principales grupos de zooplancton.	46
15. Abundancia total de los principales grupos de zooplancton.	48
16. Proporciones de los principales grupos de zooplancton.	48
17. Proporciones de las especies de zooplancton.	48
18. Proporción de los copépodos Cyclopoida y Calanoida.	49
19. Proporción de estadios de los copépodos Cyclopoida.	49
20. Proporción de estadios de los copépodos Calanoida.	49
21. Ordenación de las variables ambientales en CP1 y CP2.	51
22. Ordenación de las variables ambientales en CP2 y CP3	52

23. Ordenación de las variables ambientales por profundidad en CP1 y CP2	55
24. Ordenación de las variables ambientales por profundidad en CP2 y CP3	56
25. Producto de la estandarización de PCR de individuos Calanoida.	60
26. Producto de PCR para la región ITS2 <i>Thermocyclops decipiens</i> .	61
27. Productos de PCR purificados de la región ITS2.	62
28. Regiones de anclajes de los iniciadores ITS3 e ITS10.	63
29. Secuencia sentido de la región ITS2 del rADN de <i>T. decipiens</i>	64
30. Secuencia antisentido de la región ITS2 del rADN de <i>T. decipiens</i>	65
31. Secuencia sentido de la región ITS2 del rADN de <i>T. decipiens</i> de Brasil	65
32. Alineación de ITS2 de las especie <i>T. decipiens</i> de Brasil y Venezuela	66
33. Secuencia completa del rADN de <i>T. decipiens</i> .	67
34. Alineación de rADN de los copépodos <i>T. decipiens</i> y Calanoida.	68

INDICE DE TABLAS

	Pagina
1. Condiciones para la PCR de la región ITS2 de <i>T. decipiens</i> .	29
2. Condiciones de nubosidad, agitación y color del agua.	33
3. Lista de especies presentes en la Lago del Círculo Militar.	45
4. Autovalores, % de varianza explicada y acumulada en los componentes.	50
5. Coeficientes de Correlación (r) de los componentes principales.	50
6. Autovalores, % de varianza explicada y acumulada para profundidades	54
7. Coeficientes de Correlación (r) para las ACP por profundidades	54
8. Correlación de Pearson (r) entre las variables registradas	58
9. Índices de diversidad (H') y equidad (J)	59

INTRODUCCIÓN

En la actualidad los ecosistemas acuáticos representan los principales receptores de impactos antrópicos, cuyas aguas se enriquecen con nutrientes esenciales como nitrógeno y fósforo, lo cual es la causa de su eutrofización (Silva, 2003). Esto trae como consecuencia el cambio de las condiciones físicas y químicas del ambiente en el cual se desarrolla una amplia variedad de formas de vida, como lo es la comunidad planctónica.

El plancton constituye una de las principales comunidades de los cuerpos de agua dulce, representando la unidad básica de producción de materia orgánica en los ecosistemas lenticos. Estos organismos se caracterizan por su tamaño pequeño y por su limitada capacidad de locomoción. Los componentes más representativos del plancton dulceacuícola comprenden las bacterias, algas, protozoarios, rotíferos, cladóceros, copépodos y larvas de dípteros como *Chaoborus* y Chironomidae entre otros (Infante, 1988).

Los crustáceos zooplanctónicos, los cuales incluyen a los cladóceros y a los copépodos, son componentes importantes dentro de estos ecosistemas, debido a que permiten el flujo de energía y materia por constituir el vínculo principal entre el fitoplancton de talla pequeña y los carnívoros de gran tamaño como los peces (Horne y Goldman, 1994).

Estos crustáceos planctónicos están compuestos por branquiópodos y copépodos. De los distintos órdenes de branquiópodos, los más conocidos y estudiados son los cladóceros, los cuales son predominantemente dulceacuícolas y son pocas las especies marinas. Estos organismos se caracterizan principalmente por su caparazón quitinoso que cubre y protege la cabeza y el cuerpo. Poseen un tamaño comprendido entre los 0,2 y 3 mm (Wetzel, 2001). En la región torácica y abdominal el caparazón esta cerrado en el dorso y abierto en la parte ventral, dando la apariencia de dos valvas, aunque en realidad es una sola pieza cuticular plegada. El cuerpo de los cladóceros es transparente y no presenta segmentación (Infante,

1988). El segundo par de antenas es un gran apéndice nadador y constituye el órgano principal de locomoción (Wetzel, 2001). Por su parte, los copépodos son crustáceos más complejos, pudiéndose localizar en aguas continentales así como también en aguas marinas. En los ecosistemas tropicales, se han encontrado en los cuerpos de agua dulce a los órdenes Calanoida, Cyclopoida y Harpacticoida. Los Calanoida en su mayoría son filtradores de partículas finas, los Harpacticoida son bentónicos y principalmente raspadores de vegetación, mientras que los Cyclopoida se alimentan de pequeños invertebrados, larvas de peces y algas. Las comunidades de copépodos representan un alimento importante para los peces zooplantófagos, contribuyendo de esta manera al flujo de materia y energía dentro del sistema.

Los rotíferos son organismos que muestran un amplio margen de variabilidad en sus adaptaciones y variaciones morfológicas. En su mayoría, la forma del cuerpo es alargado distinguiéndose por tres regiones: cabeza, tronco y pie (Wetzel, 2001). El cuerpo está cubierto por una cutícula que puede ser delgada y flexible o puede estar provista de placas rígidas cuyo número, forma y posición son de gran utilidad en la sistemática (Infante, 1988). En la cabeza la región oral está rodeada por una o dos coronas de cilios cuyo movimiento sirve tanto para la locomoción, especialmente en las formas planctónicas, como para crear un movimiento direccional de partículas hacia el interior de la boca para la alimentación (Wetzel, 2001). Los rotíferos planctónicos viven en aguas bien oxigenadas y son escasos en zonas donde la concentración de oxígeno es baja (Infante, 1988).

Los protozoarios son organismos unicelulares como también pueden reunirse en colonias. Su tamaño varía desde unos pocos micrómetros hasta algunos milímetros, alimentándose principalmente de bacterias y pequeñas algas del plancton, como también de otros protozoarios (Infante, 1988).

Todos estos organismos zooplanctónicos poseen una distribución espacial y temporal influida por una serie de factores abióticos y bióticos. Dentro de los factores abióticos se encuentran la temperatura, radiación solar, disponibilidad de nutrientes, velocidad del viento, movimientos de las aguas y precipitaciones, siendo este último un factor importante en las regiones tropicales (Infante, 1988). Entre los factores bióticos se encuentran la relación con el fitoplancton que le sirve de alimento, con los animales de otras especies que actúan como presas o como depredadores, y la relación con los individuos de la misma especie, como por ejemplo la competencia por el alimento.

En cuanto a la distribución espacial de la comunidad de zooplancton en un cuerpo de agua, ésta se puede separar en dos componentes: la distribución vertical y la distribución horizontal. La distribución vertical del plancton depende en alto grado de los periodos de estratificación y mezcla (Infante, 1998). En el caso de ecosistemas lénticos como lagos y embalses, éstos presentan una columna de agua estratificada, proporcionando gradientes verticales en cuanto a la calidad del hábitat para el zooplancton. Los estratos superficiales (epilimnion) y las zonas profundas (hipolimnion) se separan por una capa donde la temperatura cambia rápidamente con la profundidad (termoclina), presentándose un gradiente de densidad. Estos estratos difieren entre sí con respecto a la temperatura, luz, disponibilidad del alimento y riesgo de depredación (Horne y Goldman, 1994). Durante la circulación profunda hay una mayor homogeneidad ambiental debido a la mezcla de las capas de agua en el sistema acuático, lo cual conlleva a una distribución vertical más uniforme (Infante, 1988). La luz es uno de los principales estímulos para la distribución vertical (Wetzel, 2001). La disponibilidad de luz junto con los nutrientes limitan la producción del fitoplancton, que a su vez afectan a las comunidades de zooplancton, ya que el fitoplancton es el principal alimento de los organismos zooplanctónicos (Infante, 1988). La concentración del oxígeno disuelto en los cuerpos de agua también influye en la distribución vertical, ya que la concentración de

mismo marca el límite hasta donde alcanzan a vivir las comunidades zooplanctónicas (Infante, 1988). Esto se debe a que el oxígeno disuelto es esencial para el metabolismo de todos los organismos acuáticos que presentan una respiración de tipo aeróbica. Por lo tanto, las propiedades de la distribución del oxígeno disuelto en los lagos son esenciales para comprender la distribución, el comportamiento y el crecimiento fisiológico de los organismos acuáticos (Carrillo, 2001).

La migración vertical también afecta la distribución vertical de la comunidad de zooplancton. Consiste en un cambio del hábitat en respuesta al beneficio que esto produce. El zooplancton de talla grande abandona el epilimnion cálido, iluminado y a menudo rico en alimentos durante el día y se dirige al hipolimnion frío y oscuro, donde el alimento puede estar en bajas cantidades; de esta manera evita la depredación por parte de los depredadores visuales como los peces. La comunidad zooplanctónica regresa a las capas superficiales en la noche cuando el riesgo de depredación es menor (Wetzel, 2001). Estos movimientos varían según las condiciones del cuerpo de agua en relación con la luz, estación, edad y sexo de las especies, siendo las hembras las que presentan mayores extensiones de sus migraciones comparadas con los machos (Wetzel, 2001).

Por otra parte, la distribución horizontal del zooplancton está basada en la variable espacio y este factor ha sido poco investigado. La migración horizontal que presentan algunas especies de zooplancton genera diferencias en cuanto a su distribución en el gradiente longitudinal. Esta migración consiste en que durante el transcurso del día, los organismos zooplanctónicos se mantienen refugiados en la vegetación, donde los peces de pequeño tamaño presentan dificultades para depredarlo. Una vez llegada la noche, cuando el riesgo de depredación disminuye, el zooplancton migra hacia las zonas de aguas abiertas (Siebeck, 1964). Uno de los factores que afectan la distribución horizontal de la comunidad de zooplancton es la disponibilidad de alimento. Cuando los recursos fitoplanctónicos son limitados por la

turbidez, el zooplancton puede consumir varios alimentos alternativos como el detrito orgánico y bacterias. Además, el crecimiento y reproducción del zooplancton dependen de la composición química (contenido de nitrógeno y fósforo) del alimento que consume (Blanco, 2003).

La comunidad planctónica interactúa tanto con el medio abiótico como con los otros organismos que forman parte del cuerpo de agua. La forma de interacción entre los organismos y su medio físico o con otras especies, determinan la densidad poblacional y la estructura espacial y temporal de las comunidades (Infante, 1988).

El zooplancton constituye un eslabón clave en la trama trófica de los sistemas acuáticos, por lo que el estudio de la dinámica de la comunidad del zooplancton puede constituir una herramienta importante en el análisis del funcionamiento de los ecosistemas y en establecimiento de pautas de manejos y usos (González y col., 2002). Este es el caso de lagos artificiales, donde la continua acción antrópica ejerce efectos variables sobre el ambiente acuático. Entre estos efectos, el más directo es la variación de la composición de las especies fitoplanctónicas, así como también la presencia de bacterias y detrito en el ambiente, de manera tal que la calidad y la cantidad de los alimentos disponibles para la comunidad de zooplancton favorece a especies de tamaño pequeño, como *Thermocyclops decipiens* (Kiefer, 1929) (Guimarães y col., 2007) (Fig. 1). Estos copéodos son miembros de Phylum Artropoda, Subphylum Crustacea. Los análisis de las diferencias morfológicas de los individuos de *T. decipiens* los ubican dentro de la clase Maxillopoda y el orden Cyclopoida. Se encuentran presentes en muchos cuerpos de agua tropicales, representando un componente importante en la biomasa de zooplancton (Silva y Matsumura-Tundisi, 2005). Es una especie de alta adaptabilidad para colonizar nuevos ambientes, como embalses y cuerpos de agua artificiales (Guimarães y col., 2007).



Fig.1. Ejemplar de *Thermocyclops decipiens*.

Silva y Matsumura-Tundisi (2005), por medio de estudios morfológicos diferenciales, pudieron caracterizar las comunidades de *T. decipiens* en cuerpos de aguas brasileños, determinando que las características anatómicas claves de estos organismos para su reconocimiento son su esclerito distal en el cuarto apéndice torácico, con espinas ornamentales prominentes en los márgenes distales y un tercer endopodito con una espina apical 2,4 veces más larga que la interna (Fig. 2).

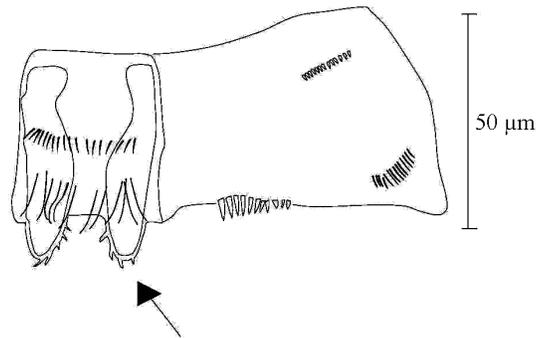


Fig. 2. Coxopodito y esclerito intercostal del cuarto apéndice torácico de *T. decipiens*. La flecha indica las ornamentaciones en el margen distal (Tomado de Silva, 2003).

El receptáculo seminal de las hembras posee proyecciones laterales ligeramente curvadas en las partes distal y proximal (Fig. 3).

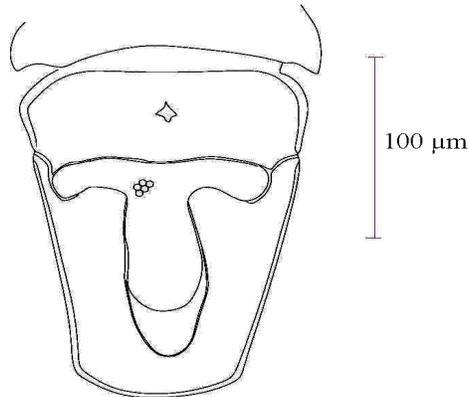


Fig. 3. Receptáculo seminal de *T. decipiens* (Tomado de Silva, 2003).

En la figura 4, se observan sus apéndices caudales, los cuales son 2,28 veces más largos que anchos, sus cerdas laterales están muy cercanas al margen distal y por último, las cerdas internas son tres veces más largas que las internas (Silva y Matsumura-Tundisi, 2005).

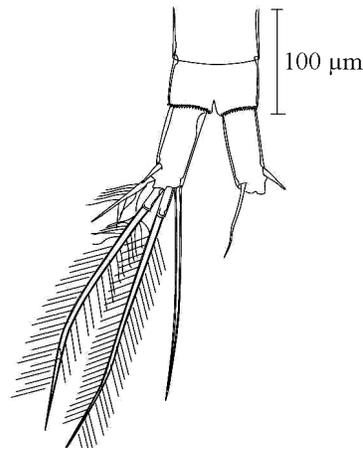


Fig. 4. Apéndices caudales de *T. decipiens* (Tomado de Silva, 2003).

Estos organismos existen en hábitats tales como charcas, embalses, estanques, lagos y pantanos (Gaviria y Aranguren, 2007). Es una especie Pantropical, euritópica en lagos, pantanos y aguas efímeras, ampliamente distribuida en Asia, África, Centro y Sur América, donde tiende a ser dominante en la comunidad de crustáceos de ambientes acuáticos mesotróficos a eutróficos (López y Bello, 1993). El aumento del estado trófico de cuerpos de agua como lagos o embalses, parece determinar la ocurrencia de *T. decipiens* en estos

ambientes (Guimarães y col., 2007). En la región Neotropical su presencia es escasa, pero se distribuyen ampliamente en Las Antillas, Colombia, Venezuela y Brasil (Guimarães y col., 2007). Los individuos de *T. decipiens* poseen hábitos de alimentación omnívora y digieren algas verde azules, alimentándose también de otros macroinvertebrados planctónicos y bentónicos (Leitão y col., 2006). También se alimentan de organismos como los nauplios, rotíferos y cladóceros (Andrade y López, 2005). Los individuos de *T. decipiens* son capaces de compensar las pérdidas por depredación mediante la reproducción, de forma tal que coexisten continuamente con los depredadores (López y Bello, 1993).

El tamaño de los copéodos varía de 0,3 a 5 mm, siendo la mayoría de las especies cercanas a 1 mm. Estudios realizados en Brasil han revelado que las hembras adultas de *T. decipiens* tienen un tamaño promedio de $823 \pm 21 \mu\text{m}$ (Silva y Matsumura-Tundisi, 2005). Esta especie acuática, por ser de tamaño pequeño, posee un ciclo de vida corto (Silva, 2003). Los crustáceos planctónicos tropicales poseen un rápido desarrollo y su tiempo de generacional usualmente menor a una semana.

Los conocimientos de citogenética sobre el número de cromosomas, el tamaño del ADN y los patrones de pérdida de cromatina han constituido una herramienta en la taxonomía de los copéodos Cyclopoida (Silva, 2003). La disminución de la cromatina es la pérdida de regiones cromosomales seleccionadas durante la diferenciación de las células embriónicas tempranas a células somáticas. Este hecho ha sido descrito en los taxa de variados ciliados, copéodos, insectos, nemátodos y mixinos (Drouin, 2006). La naturaleza del ADN eliminado ha sido ampliamente estudiada en estos grupos. Sin embargo, el estudio de estos organismos ha estado limitado debido al tamaño pequeño de los copéodos, lo cual hace difícil obtener suficiente cantidad de ADN de las células embriónica tempranas para la clonación y secuenciación (Drouin, 2006). La cantidad de ADN eliminado durante la disminución de cromatina puede variar mucho entre las especies. Estudios citológicos

muestran que la heterocromatina cubre la mayoría del ADN eliminado en los copépodos (Drouin, 2006).

Una herramienta molecular para la taxonomía de todos los seres vivos y aplicada a los copépodos, ha sido el estudio de las secuencias de ADN de los Espaciadores Internos Transcritos de los genes ribosomales (ITS, de sus siglas en inglés Internal Transcribed Spacer). Esta región ha sido ampliamente utilizada para el esclarecimiento de las relaciones existentes entre taxa a niveles inter e intragénicos, así como intraespecíficos (Buckler y Holtsford, 1996). El análisis molecular de la región de los Espaciadores Internos Transcritos ha sido considerado como una fuente útil para estudios filogenéticos. El ADN que codifica para los ARN ribosomales es una familia de genes multicopia, que existen como uno o más arreglos en tándem de unidades transcripcionales por célula, en las cuales la evolución concertada propagó rápidamente las mutaciones a todos los miembros de la familia genética, incluso si los arreglos estaban localizados en diferentes cromosomas (Li y Wilkerson, 2007). Los genes ribosomales y sus regiones espaciadoras asociadas, que en conjunto son llamados ADN ribosomal nuclear (nrADN), han sido ampliamente utilizados, ya que permiten la inferencia de relaciones filogenéticas entre taxas debido a que presentan secuencias de bases con porcentajes muy altos de homología intraespecies (Aguilar, 2002).

En la figura 5 se puede observar el arreglo del ADN ribosomal nuclear de un genoma eucariótico, típicamente consiste de unidades transcripcionales repetidas, cada una de ellas se compone de la unidad transcrita y de la región de los espaciadores externos no transcritos. En eucariotas, generalmente existen tres o cuatro subunidades de ARN ribosomal (18S, 5.8S, 28S). Cada unidad transcrita está compuesta del gen espaciador que codifica para la subunidad 18S, un espaciador interno transcrito (ITS1), el gen para la subunidad 5.8S, un ITS2 y el gen para la subunidad 28S (Li y Wilkerson, 2007).

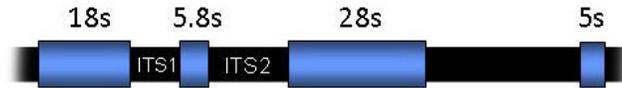


Fig. 5. Región de los espaciadores internos transcritos (ITS) del ADN ribosomal.

La evolución concertada y la recombinación sexual tienden a promover la uniformidad de los ITS dentro de los individuos de una población, es por ello que poseen estructuras conservadas importantes en los genes de los ribosomas maduros (Li y Wilkerson, 2007).

La secuencia de rADN es una fuente valiosa de información, debido a que las regiones que producen los ARN ribosomales son muy conservadas. Los espaciadores transcritos y no transcritos poseen alta interespecificidad y baja variedad intraespecífica, haciéndolas útil para explicar las relaciones de especies y también constituyen una base para la identificación de especies morfológicamente similares (Li y Wilkerson, 2007). Las regiones de ITS1 e ITS2 han sido utilizadas extensivamente en reconstrucciones filogenéticas de complejos de especies muy relacionadas, así como también el desarrollo de marcadores basados en el PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) especie-específico (Li y Wilkerson, 2007). Como ambas regiones ITS1 e ITS2 se encuentran flanqueando la subunidad 5.8S, la cual es una subunidad muy conservada, la probabilidad de obtener un producto de amplificación de esta región en el proceso de PCR es muy alta. Puesto que la subunidad 5.8S exhibe niveles muy bajos de variación en su secuencia, las cortas regiones de ITS1 e ITS2 son útiles para la taxonomía molecular entre géneros y especies relacionadas (Aguilar, 2002).

Las secuencias del ITS2 tienen la variación suficiente como para diagnosticar linajes a diferentes niveles jerárquicos, ya que se mantienen más conservadas entre las especies (Hershkovitz y Zimmer, 1996) y es muy variable entre diferentes especies. Debido a esto, se utiliza esta región para la identificación de niveles más próximos, como géneros y especies (Silva, 2003).

Algunos estudios filogenéticos basados en la secuencia de la región de ITS2 fueron realizados con éxito para algunos grupos de Arthropoda como Acari, Hymenoptera e Isopoda, posibilitando la distinción entre especies y grupos aislados (Silva, 2003). Estos estudios se realizaron con la técnica de PCR, que consiste en la amplificación de un fragmento del ADN de interés. En esta técnica se utiliza la propiedad natural de la ADN polimerasa (enzima que cataliza la síntesis de ADN) para replicar hebras de ADN. En el procedimiento se alternan ciclos de bajas y altas temperaturas que permiten separar las cadenas dobles de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación, para que se unan nuevamente a iniciadores específicos y así volver a ser replicadas.

El conocimiento sobre la variabilidad de la estructura de la comunidad de zooplancton a diferentes escalas es la base para entender y cuantificar los cambios en el ecosistema a través del tiempo en función de los cambios ambientales naturales o antrópicos, lo cual es de gran importancia para el mejoramiento del uso y manejo de los sistemas acuáticos.

Venezuela, como país tropical, posee una gran cantidad de ecosistemas acuáticos en los cuales las comunidades de zooplancton se desarrollan extensamente. Entre estas comunidades, las especies de copépodos Cyclopoida son las más abundantes y de mayor éxito en los ecosistemas dulceacuícolas. Entre los Cyclopoida, la especie *Thermocyclops decipiens* es dominante en sistemas eutróficos. Debido a este hecho, este organismo podría ser usado como una especie indicadora de ambientes eutróficos y de aguas de calidad baja, constituyendo una importante herramienta para el biomonitorio de ecosistemas acuáticos (Guimarães y col., 2007). Un estudio taxonómico de *T. decipiens* puede ser de vital importancia para la caracterización de un ecosistema acuático. Estudios moleculares en *T. decipiens* sólo se han realizado en conjunto en especies presentes en sistemas acuáticos de Estados Unidos y Brasil. Sin embargo, no se han realizado este tipo de estudios en los

organismos presentes en ecosistemas venezolanos. El análisis de las secuencias de ITS2 del rADN de estos individuos podría ser de gran utilidad para identificar individuos *T. decipiens* presentes en los ecosistemas acuáticos de nuestro país, y así utilizar estos conocimientos como base para la taxonomía molecular en linajes de copépodos en un ecosistema determinado.

ANTECEDENTES

1.- Estudios ecológicos en *Thermocyclops decipiens*

En muchos cuerpos de agua tropicales, *T. decipiens* representa la especie más abundante del zooplancton. A pesar de la presencia de este género en América de Sur, su alta abundancia no ha sido reportada en este continente, comparado con los continentes Africano y Asiático (Silva y Matsumura-Tundisi, 2005).

Silva y Matsumura-Tundisi (2005), en estudios realizados en cuerpos de agua del estado São Paulo de Brasil, encontraron que entre los Cyclopoida, el género *Thermocyclops* es característico de la región limnética de los lagos, donde por lo general *T. decipiens* es la especie más abundante, teniendo una amplia distribución geográfica en las zonas tropicales, dominando en embalses oligo-mesotróficos y en aguas eutróficas (Silva y Matsumura-Tundisi, 2005).

Otro estudio realizado en el estado de Ceará en Brasil por Leitão y col. (2006), reveló que la abundancia de esta especie también se ve afectada por las lluvias, cuando ocurre una supersaturación del oxígeno disuelto en los cuerpos de agua, gracias a la acción del viento que mezcla la columna de agua, así como también por la actividad fotosintética del fitoplancton en la oxigenación de la zona trofógena (Leitão y col., 2006). Debido a todos estos factores, la abundancia de *T. decipiens* aumenta marcadamente en los periodos de lluvias en los cuerpos de agua dulce someros. Estos periodos de lluvias, caracterizados por los fuertes vientos, son ideales para la reproducción de estos organismos. Las perturbaciones causadas por estas fuerzas pueden inducir a cambios en los cuerpos de agua, promoviendo un aumento en la disponibilidad de alimentos para el zooplancton por medio de cargas externas e internas de los afluentes y por la resuspensión de sedimentos (Leitão y col., 2006).

Guimarães y col. (2007), encontraron que la alta abundancia de copépodos Cyclopoida en sistemas eutróficos está relacionada con florecimientos de cianobacterias que forman grandes colonias, donde sólo estos copépodos, con hábitos alimenticios raspadores, podían consumir estas algas, representando así una importante fuente de alimento complementaria para estos organismos. La distribución de la especie *T. decipiens* está relacionada con las condiciones ambientales predominantes del hábitat. Esta especie predomina en cuerpos de agua con altas concentraciones de fósforo, así como también en aguas con marcadas concentraciones de fosfato y clorofila (Guimarães y col. 2007). Igualmente, *T. decipiens* ha sido registrada cerca de los tributarios donde los valores de conductividad eléctrica son altos y existen valores bajos de transparencia del agua. De esta manera, se corrobora que la dominancia de *T. decipiens* en un cuerpo de agua está altamente relacionada con el estado trófico del mismo, presentando sus mayores abundancias en aguas eutróficas.

2.- Estudios moleculares en copépodos.

Los estudios moleculares realizados en estos organismos han sido en su mayoría referentes a la pérdida de cromatina, a fines de estudiar su organización filogenética y la evolución de este grupo taxonómico (Silva, 2003). Estos estudios han permitido diferenciar especies de copépodos Cyclopoida que antes se consideraban de la misma especie por ser morfológicamente iguales. Este fue el caso de los estudios realizados por Grishanin y Akif'ev (1999) con individuos de *Cyclops strennus* de dos poblaciones diferentes, una recolectada en lagos alemanes y la otra en lagos rusos. A pesar que eran morfológicamente semejantes se consideraron especies diferentes, pues poseían tiempos de disminución de cromatina distintos y eliminaban cantidades diferentes de cromatina, además no poseían la misma cantidad de cromosomas, hecho que complica el intercrucamiento entre las especies.

Por otra parte, los análisis moleculares de los ITS en copépodos se han realizado en los órdenes Cyclopoida y Calanoida. Estos estudios se han efectuado con poblaciones de estos copépodos pertenecientes a lagos de Brasil y de Estados Unidos, mostrando una gran variación interespecífica de la región ITS y baja o ninguna variación intraespecífica, demostrando así que el análisis de esta región ITS es útil en la taxonomía de copépodos (Silva, 2003).

Silva, (2003) estudió 207 pares de bases de la región ITS2 en la población de la especie *Thermocyclops decipiens* presentes en ecosistemas acuáticos de Brasil a través del análisis de las secuencias de esta región, cuyos resultados establecieron bases en la identificación de las especies a través de este método, así como también en el análisis de su filogenia.

3.- Estudios en sistemas acuáticos y *Thermocyclops decipiens* en Venezuela

Saunders y Lewis (1988) realizaron estudios en el Lago de Valencia (Venezuela), el cual está sometido a efectos antrópicos, estando rodeado por dos grandes ciudades, Valencia y Maracay ubicadas en sus costas. La mayoría de los desperdicios de estas ciudades terminan en el lago aumentando la carga de nutrientes como fósforo y nitrógeno. Estos investigadores encontraron que en respuesta a esta alta carga de nutrientes, la comunidad de fitoplancton es altamente productiva, permitiendo la presencia de *T. decipiens* en altas densidades.

Esta misma situación fue observada por López y colaboradores (2001) en ecosistemas acuáticos de Venezuela, observando que las poblaciones de copépodos más abundantes fueron de *Thermocyclops decipiens*, *Thermocyclops minutus* y *Notodiaptomus* sp. *T. decipiens* tiende a ser la especie dominante en estos ambientes acuáticos. Así mismo, se observó que los cambios temporales de la biomasa en estos ambientes estuvieron determinados por la biomasa de los copépodos. Los organismos de *T. decipiens* en estos

embalses mostraron sus máximos valores de biomasa en los periodos de precipitación moderada (López y Bello, 1993; López y col., 2001).

Por su parte, Carrillo (2001), realizó un estudio en el embalse La Mariposa (Distrito Capital), reportando que la columna de agua siempre estuvo oxigenada, especialmente en los estratos superficiales debido a la acumulación de las algas que liberaron oxígeno al medio como producto final del proceso fotosintético favorecido por las altas temperaturas. Además, las concentraciones de oxígeno disuelto en este embalse se deben a dos factores: el bajo tiempo teórico de residencia de las aguas (dado que en 12 días es renovada completamente el agua de la cuenca) y el bombeo continuo de agua, proveniente del sistema Tuy que introduce agua en el cauce del río El Valle. Carrillo también registró un aumento gradual del nitrógeno total durante el periodo de estudio en los diferentes estratos de la columna de agua. Este aumento gradual se debió probablemente al aporte proveniente de sus principales tributarios, así como también por escorrentía desde las zonas aledañas y por el bombeo de agua de otros embalses. Otro elemento importante que influyó en el metabolismo del embalse fue el fósforo, el cual presentó la misma tendencia descrita para el nitrógeno. Las comunidades de fitoplancton respondieron directamente al aumento de las concentraciones de nitrógeno total y fósforo total, aumentando su biomasa dentro del cuerpo de agua. En cuanto a la comunidad de zooplancton, tanto las estaciones limnéticas como en las litorales se encontraron dominadas por los copépodos Cyclopoida durante el periodo de estudio, lo cual es característico de aguas eutrofizadas.

Por otro lado, Blanco (2003) encontró que en el embalse Agua Fría del estado Miranda, el cuerpo de agua presentaba condiciones de anoxia a partir de los 12 m de profundidad coincidiendo con el final de la época de sequía. Durante este tiempo, se encontró la mayor proporción de adultos de copépodos Cyclopoida, presentándose una gran cantidad de nauplios durante este periodo climático, lo que podría indicar que estos copépodos se

reprodujeron intensamente durante este tiempo. De igual manera, durante la época de lluvias, los Cyclopoida fueron abundantes, lo cual pudiera estar relacionado con la disponibilidad de alimento y con las condiciones ambientales asociadas.

Gavidia (2004), analizó las condiciones del embalse Tierra Blanca del estado Guárico, el cual presentaba una baja concentración de oxígeno disuelto en las capas profundas del embalse. Igualmente, los estratos superficiales presentaron bajos valores de concentración de nitrógeno total, esto pudo deberse al efecto de dilución por el bombeo de agua. Al igual que el nitrógeno, lo que concentraciones de fósforo total fueron mayores en los estratos profundos que en los superficiales, lo cual pudiera estar relacionado con las bajas concentraciones de oxígeno en el hipolimnion, lo que permitiría su liberación desde los sedimentos, además de la resuspensión por el bombeo de agua al embalse. Debido a estas condiciones, los copépodos Cyclopoida se distribuyeron mayormente en el estrato superficial de 0 a 2 m y de 2-4m. Los mayores valores de abundancia coincidieron con los máximos valores promedios de clorofila-*a*. En los meses de estudio, cuando la abundancia de zooplancton presentó una disminución drástica, también se registró la disminución de la biomasa de fitoplancton, coincidiendo con los menores valores de oxígeno disuelto en toda la columna de agua. En cuanto a la biomasa del zooplancton, los copépodos, por su mayor tamaño y su mayor abundancia en la mayoría de los meses de estudio, parecieron ser los responsables por el mayor porcentaje de biomasa total del zooplancton. El hecho que los copépodos presentaran sus mayores abundancias en los estratos de 0-2 m y de 2-4 m pudiera indicar una menor presión por parte de los depredadores visuales que la ejercida sobre los cladóceros, los cuales presentaron sus mayores abundancias en el estrato de 4-6 m.

Merayo (2007), realizó un estudio de abundancia de zooplancton en el embalse Clavellinos en el estado Sucre, encontrando que existe una mayor abundancia de organismos en estratos superficiales, coincidiendo con el hecho que estos estratos presentaban la mayor

concentración de oxígeno disuelto. Los copéodos demostraron una distribución más amplia en las distintas profundidades, seguido por los rotíferos, cladóceros y por último los ostrácodos. Durante este estudio, la comunidad de zooplancton estuvo dominada por la especie *Thermocyclops decipiens*, representando en promedio el 61% del total de los organismos zooplanctónicos.

Los estudios taxonómicos en Venezuela en los copéodos Cyclopoida, más específicamente *T. decipiens*, sólo se han realizado a nivel de identificación por medio de claves taxonómicas, las cuales poseen un sistema esquemático que guía al lector hacia el taxón al que pertenece el organismo que se está analizando para su identificación, basándose en sus características morfológicas claves propias de la especie. Sin embargo, estudios taxonómicos moleculares en esta especie no se han efectuado en el país, por lo que un estudio a nivel molecular en esta especie permitirá la obtención de una mayor información de su código genético, lo cual es una herramienta valiosa en la identificación taxonómica de las especies.

HIPOTESIS

El lago del Círculo Militar es un lago artificial y somero y por todo lo anterior se planteó como hipótesis que este lago con el transcurrir de la estación de sequía a la de lluvia, presentará cambios fisicoquímicos y biológicos en todo el cuerpo de agua, que a su vez afectará la biomasa del fitoplancton de este sistema y, por ende, también a la comunidad de zooplancton del lago del Círculo Militar. De esta manera, en el periodo de estudio las comunidades existentes en el lago del Círculo Militar se verán afectadas, en respuesta a los cambios fisicoquímicos del agua.

OBJETIVOS

Generales:

- Determinar la composición y las variaciones de abundancia del zooplancton del Lago del Círculo Militar (DC) durante la transición sequía – lluvia del año 2009 y establecer bases para la taxonomía molecular del copépodo Cyclopoida *Thermocyclops decipiens*.

Específicos:

- Estudiar la composición y abundancia del zooplancton del lago artificial del Círculo Militar.
- Determinar las variables fisicoquímicas y de clorofila-*a* del cuerpo de agua del lago artificial de Círculo Militar.
- Relacionar las variaciones temporales de abundancia del zooplancton con las variaciones de los factores fisicoquímicos y de la clorofila-*a*.
- Estandarizar el aislamiento del material genético de *Thermocyclops decipiens*.
- Estandarizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la taxonomía molecular de *Thermocyclops decipiens* por medio de la caracterización de la secuencia del espaciador ribosomal interno transcrito 2 (ITS2).

MATERIALES Y METODOS

1.- Área de estudio

Las muestras fueron tomadas quincenalmente en la estación más profunda (E) del Lago del Círculo Militar ubicado en Caracas, Venezuela durante la transición seca – lluvia y el inicio de la temporada de lluvias, entre abril y julio del año 2009. Este lago artificial se encuentra a una latitud de $10^{\circ} 28' 1.70''$ N y a una longitud de $66^{\circ} 53' 57.49''$ W, con una elevación de 890 m sobre el nivel del mar y posee una profundidad máxima de 3,8 m (Fig. 6). Este sistema fue clasificado como oligo-mesotrófico, según un estudio puntual realizado por Gordon y colaboradores (2008).



Fig. 6. Imagen satelital del Lago Artificial del Círculo Militar Caracas. Tomado de Google Earth

Las muestras para las estimaciones fisicoquímicas y de clorofila-*a* fueron tomadas metro a metro desde la superficie hasta la profundidad máxima de 3 m, haciendo uso de una botella de captación tipo van Dorn de 5 litros de capacidad.

El lecho del cuerpo de agua esta cubierto por un denso manto de *Chara* sp. y *Elodea* sp. durante el periodo de estudio; esta vegetación presentó un extenso desarrollo, alcanzando la superficie del agua en varias localidades del lago (Fig. 7).



Fig. 7.- *Chara* sp. y *Elodea* sp. presentes en el cuerpo de agua del Lago del Circulo Militar durante el periodo de estudio vistas desde la superficie del agua.

2.- Estimaciones fisicoquímicas

- Transparencia del agua: se midió por medio del disco de Secchi de 20 cm de diámetro.
- Temperatura del agua (0,1 °C) y conductividad (1 μ S/cm): se midieron utilizando una sonda multiparamétrica YSI modelo 3000-TLC.
- Oxígeno disuelto (0,1 mg/l): se estimó a través de un medidor de oxígeno YSI modelo 54 A.
- pH: fue medido con el equipo Hanna Instruments pH 211 Microprocessor pH Meter.

Las mediciones de temperatura del agua, oxígeno disuelto y pH, se realizaron desde la superficie hasta el fondo del lago, metro a metro.

3.- Biomasa de fitoplancton

La estimación de la concentración de clorofila-*a* se realizó por el método de extracción de pigmentos con etanol (Nusch y Palme, 1975). Se filtraron 250 ml de muestra a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C y se extrajo la clorofila-*a* con etanol 99%. Posteriormente se determinó la absorbancia del extracto a 665 y 750 nm en un espectrofotómetro Genesys 20 antes y después de acidificar con HCl 0,4 M.

Para calcular la concentración de clorofila-*a* en µg/l se utilizó la siguiente ecuación.

$$\text{Clorofila - a: } \frac{29,6(A^b - A^a) \times v}{V \times l}$$

En donde:

- A^b es la absorbancia del extracto original a 665 nm menos la absorbancia a 750 nm.
- A^a es la absorbancia a 665 nm menos la absorbancia a 750 nm después de acidificar.
- v es el volumen de etanol utilizado para la extracción (10ml).
- V es el volumen de agua de la muestra filtrado.
- l es la longitud del paso de luz en la cubeta del espectrofotómetro (1cm).

La absorbancia a 665 nm mide el pico de absorción de la clorofila-*a*, mientras que la absorbancia a 750 nm permitió corregir las lecturas a 665 nm (turbidez de la muestra).

4.- Abundancia de zooplancton

Los organismos zooplanctónicos fueron obtenidos mediante barridos verticales de 1m (1-0 m, 2-1 m, 3-2 m) en la columna de agua empleando una red de cierre con una luz de malla de 77 μ m. Las muestras de zooplancton se preservaron en formaldehído 4% hasta su análisis posterior en el laboratorio. Las estimaciones de abundancia del zooplancton se realizaron mediante conteos por duplicado de submuestras concentradas (30 ml) en cámaras de Sedgwick-Rafter (1ml) y la posterior observación e identificación al microscopio de luz con la ayuda de claves taxonómicas (Wetzel y Likens, 2000).

Del mismo modo, se tomaron muestras del zooplancton mediante barridos verticales de 2 m (2-0 m) en la columna de agua, las cuales fueron preservadas con etanol. Estas muestras fueron las empleadas para la extracción de ácidos nucleicos.

5.- Análisis de datos

Para analizar los patrones de las variables temporales fisicoquímicas y biológicas se realizó un análisis de componentes principales (ACP). Con este análisis se busca sintetizar los principales cambios quincenales en cuanto a las variables que pudieron modificar la estructura y distribución del zooplancton y así caracterizar la estructura comunitaria en base a estos agrupamientos. Este análisis fue realizado con el programa PAST para Windows v.2.0 (Harper y col., 2001).

Para correlacionar la abundancia total del zooplancton con las variables fisicoquímicas evaluados y la concentración de clorofila-*a*, se utilizó la prueba de correlación paramétrica de Pearson (*r*) (Yamane, 1979). Esta prueba se realizó con el programa STATISTICA para Windows v. 7.0 (StatSoft Inc. 2004).

Para evaluar si existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el orden por rangos de abundancia de las especies de zooplancton en la estación de muestreo, se aplicó el coeficiente de concordancia de Kendall (W) (Siegel y Castellan, 1995).

Por último, para estimar la diversidad y equidad del zooplancton en el lago del Círculo Militar, se utilizaron los índices de diversidad de Shannon y equidad de Pielou .

El índice de diversidad de Shannon se basa en suponer que todos los individuos se muestrean al azar de una población infinita y que todas las especies están representadas en la muestra (Shannon y Weaver, 1949).

$$H' = - \sum p_i \cdot \ln(p_i) \text{ donde } p_i = N_i/N.$$

Siendo N_i el número de individuos de la especie i y N el número total de individuos.

A partir de índice de Shannon se puede calcular un índice de equidad, donde el cociente entre la diversidad observada y la máxima esperada refleja cuán equitativa es la distribución de individuos en las especies (Pielou, 1975).

$$J = \frac{H'}{\ln(S)} \text{ donde } S \text{ es el número total de especies}$$

6.- **Identificación Molecular de *Thermocyclops decipiens***

6.1.- **Extracción de ADN**

La evaluación taxonómica de *T. decipiens* por medio del análisis de la secuencia de ITS2 se realizó mediante el uso de PCR convencional. Para este estudio previamente se estandarizó el método de Towner (Braga y col., 1999) con individuos Calanoida. Todo el material empleado para este ensayo fue previamente limpiado y esterilizado. Dicho método se describe a continuación:

- 1) Cuatro individuos hembras adultas del copépodo Cyclopoida *Thermocyclops decipiens* fueron triturados en 10 µl de buffer de extracción (NaCl 0,14 M, KCl 5mM y SDS 1%) bajo lupa con el uso de varillas de vidrio puntiagudas.
- 2) Los 10 µl de buffer de extracción conteniendo los copépodos triturados, se añadieron a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, se completó el volumen de buffer de extracción a 500 µl y luego se le agregaron 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml).
- 3) Se incubó a 55 °C por 3 horas seguido de una incubación a 100 °C por 5 minutos para inactivar completamente la proteinasa K (Schizas y col., 1997).
- 4) Se agregó 1 vol de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1.
- 5) Se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó por otros 5 min a 13500 xg.
- 6) La capa acuosa superior se colectó y precipitó con 0,1 vol de 3 M de sodio de acetato (pH 6,8), 2 vol de etanol (99% -20°C) y 1 µl de glicógeno (20 mg/l) cordialmente suministrado por la Lic. Floritza Bustamante.
- 7) Las muestras se mantuvieron a -20°C por 2 días, luego se centrifugaron por 10 min a 13500 xg.
- 8) Se descartó el sobrenadante resultante de la centrifugación y el sedimento fue lavado con 500 µl de etanol 70%, luego secado y resuspendido en 50 µl de agua miliQ.

Una vez obtenido material genético con el método de Towner estandarizado se procedió a la extracción de ADN de *Thermocyclops decipiens* con este método, el cual se realizó por duplicado. Además de la estandarización del método de Towner, se realizó un método de extracción de ADN alternativo igualmente con individuos Calanoida, en donde se estandarizó

el método de Silva (2003), usando el estuche comercial SV RNA Isolation de Promega®, el cual se describe a continuación:

- 1) Cuatro individuos de copépodos Calanoida adultos fueron triturados en 10 μ l del buffer de lisis del estuche comercial, luego se colocaron en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se completó el volumen a 175 μ l de buffer de lisis.
- 2) Se añadieron 10 μ l de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó a 55 °C por 3 horas seguido de una incubación a 100 °C por 5 minutos.
- 3) Luego de la incubación, se agregaron 3,5 μ l de β mercaptoetanol y se mezcló con la ayuda de un vortex.
- 4) Se añadieron 350 μ l de buffer de dilución (SV RNA Dilution Buffer) mezclando la solución invirtiendo el tubo de microcentrífuga varias veces.
- 5) Se incubó a una temperatura de 70 °C por 3 minutos máximo.
- 6) Se centrifugó a 13500 xg por 10 minutos.
- 7) Se agregaron 200 μ l de etanol 95% y se mezcló bien la solución.
- 8) Se pasó a la columna (Spin Column) suministrada por el estuche comercial y se centrifugó a 12000 xg por 1 minuto.
- 9) Se añadieron 600 μ l de drRNA Wash Solution y se centrifugó a 12000 xg por un minuto.
- 10) Luego se agregaron 250 μ l de drRNA Wash Solution y se centrifugó a 13500 xg por 2 minutos.
- 11) La columna fue transferida a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se añadieron 50 μ l de Nucleasa “free water” y se centrifugó a 12000 xg por un minuto.

6.2.- Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se utilizó el protocolo de análisis de PCR convencional para amplificar la región ITS2, el cual se describe a continuación (Silva, 2003):

- 1) Se prepararon cuatro reacciones prueba de PCR, una con un volumen final de 25 μl (dos reacciones) y otra de 50 μl de volumen final (dos reacciones), las cuales se muestran a continuación:

* 25 μl de reacción PCR:

- 0,2 μl de Taq Polimerasa
- 2,5 μl de Buffer
- 2,5 μl de cada iniciador a una concentración de 10 μM , cuyas secuencias son:

Región ITS3: 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'

Región ITS10: 5'-TACGGGCCTATCACCTCTACG-3'

Diseñados por Dra. Sarah Gerken de la Universidad de Alaska.

- 0,5 μl de desoxinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) a una concentración de 10 μM
- 0,75 μl de MgCl_2 a una concentración de 50 mM
- 11,05 μl de ddH₂O
- 5 μl del ADN aislado de los copépodos.

* 50 μl de reacción PCR:

- 0,5 μl de Taq Polimerasa
- 5 μl de Buffer
- 5 μl de cada iniciador (ITS3, ITS10) a una concentración de 10 μM ,

- 1 μ l de desoxinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) a una concentración de 10 μ M
- 1,5 μ l de MgCl₂ a una concentración de 50 mM
- 27 μ l de ddH₂O
- 5 μ l del ADN aislado de los copépodos.

Para comenzar la reacción, se calculó la cantidad adecuada de cada solución para el número total de reacciones a realizar, contando además de la cantidad de muestras, el control negativo. Luego se distribuyeron 20 μ l de la mezcla del PCR a 25 μ l en la cantidad de tubos eppendorf para las reacciones de PCR previamente identificadas y 45 μ l de la mezcla del PCR a 50 μ l a cada tubo para la reacción de PCR. Por último, se añadió la muestra de ADN correspondiente.

- 2) Se colocaron los tubos en la placa del termociclador, siguiendo las siguientes condiciones térmicas para la amplificación del ADN (Tabla 1):

Tabla 1. Condiciones para la amplificación por PCR de los genes de la región ITS2 de *T. decipiens*. (Silva, 2003).

Condición	Temp. (°C)	Tiempo	Ciclos
Calentamiento	95	45 s	1
Desnaturalización	95	30 s	30
Hibridación iniciadores	52	30 s	1
Extensión iniciadores	72	50 s	40
Extensión final	72	7 min	1
Preservación	4		

Una vez que las muestras fueron amplificadas, se preservaron a una temperatura de -20 °C para su análisis posterior.

Antes de realizar la reacción en cadena de la polimerasa con los individuos *Thermocyclops decipiens*, previamente se ensayó con el ADN extraído de copépodos Calanoida utilizados para la estandarización del método de Towner. El PCR fue realizado con las mismas condiciones mostradas en la Tabla 1.

6.3.- Electroforesis en agarosa

Para la visualización e identificación de los productos de PCR se utilizaron geles de agarosa al 0,8% en buffer TBE 1x (Stock 10x, Tris Base 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 0,02 M). Se mezclaron 5 µl de la muestra de amplificación con 2 µl de buffer de carga (Azul de Bromofenol 0,25% Xylem Cyanol 0,25% y Glicerol 30%). Además de las muestras, el gel de agarosa contenía en uno de sus bolsillos el marcador de peso molecular 100 Kb DNA Ladder Promega®. Las electroforesis se realizaron a voltajes entre 80 a 100 V. Posteriormente, se trató el gel con una solución de bromuro de etidio, a una concentración de 0,5 µg/ml durante 15 minutos y se eliminó el exceso del mismo colocando el gel en agua destilada durante 5 minutos. Por último, se observó el ADN empleando el equipo GelDoc 1000 (Bio Rad) que permitió observar el revelado de la imagen en una computadora mediante el software Multy Analyst (Bio Rad).

6.4.- Purificación de los productos de PCR

Los cuatro productos de PCR de *Thermocyclops decipiens* y los de estandarización con individuos de Calanoida fueron purificados empleando el estuche comercial Concert™ Rapid PCR Purification System GIBCO®. Las cuatro muestras de PCR de *T. decipiens* fueron mezcladas y luego purificadas para obtener así mayor concentración de ADN para la subsiguiente secuenciación. La purificación de estos fragmentos es necesaria para su secuenciación. Es importante destacar que para la purificación de los amplificados no se puede emplear Buffer TE porque contiene EDTA, motivo por el cual el ADN doble cadena purificado se resuspendió en 50 µl de agua miliQ.

6.5.- Secuenciación de los productos de PCR

La secuenciación de los amplificados fue realizada en el Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CeSAAN), ubicado en el Centro de Microbiología del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Se utilizó el secuenciador modelo ABI 3130XL (Applied biosystems). Para las reacciones secuencia se utilizaron los iniciadores que se emplearon en las reacciones de PCR.

6.6.- Análisis de las secuencias

La búsqueda de similaridad entre las secuencias obtenidas con las secuencias nucleotídicas reportadas en el banco de genes, fue realizada por medio de un alineamiento de las secuencias, comparándolas en la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Esto se llevó a cabo vía Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) empleando los servicios BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul y col., 1997).

También se utilizó el programa DNAMAN para Windows v. 5.2.2 para la alineación de las secuencias de ITS2 de *Thermocyclops decipiens* extraídas en Brasil y las secuencias obtenidas en este trabajo (Lynnon BioSoft, 2001).

RESULTADOS

1.- Variables fisicoquímicas

Durante el periodo de estudio se presentaron condiciones de cielo nublado en la mayoría de los muestreos, excepto el 27 de mayo cuando el cielo estuvo despejado. Se pudo notar que en la mayoría de los muestreos la superficie del agua estuvo quieta, excepto los días 27 de mayo y 9 de junio cuando se observó agitación en la misma. Por su parte, el color aparente de las aguas del Lago del Círculo Militar fue verde claro durante todo el periodo de estudio (Tabla 2).

Tabla 2.- Condiciones de nubosidad, agitación y color del agua en la estación de muestreo durante el periodo de estudio.

Mes (2009)	Hora	Nubosidad	Agitación	Color de las Aguas
30 de Abril	09:21 a.m.	8/8 (Nublado)	Muy Quieta	Verde Claro
14 de Mayo	8:27 am	7/8 (Nublado)	Quieta	Verde Claro
27 de Mayo	08:26 a.m.	2/8 (Despejado)	Agitada	Verde Claro
9 de Junio	1:06 pm	4/8 (Parcialmente nublado)	Agitada	Verde Claro
25 de Junio	08:09 a.m.	4/8 (Parcialmente nublado)	Muy Quieta	Verde Claro
9 de Julio	01:00 p.m.	7/8 (Nublado)	Muy Quieta	Verde Claro

1.1.- Transparencia del agua

En la figura 8 se muestran las variaciones de la transparencia de agua en el Lago del Círculo Militar. La máxima transparencia de 3,8 m se registró el 30 de Abril y la mínima de 2,9 m el 14 de Mayo. Los valores de transparencia de agua no variaron marcadamente durante el periodo de estudio; las medidas con el disco de Secchi revelaron que la zona eufótica se extendió a lo largo de toda la columna de agua. La transparencia media para el período de estudio fue de $3,25 \pm 0,3$ m.

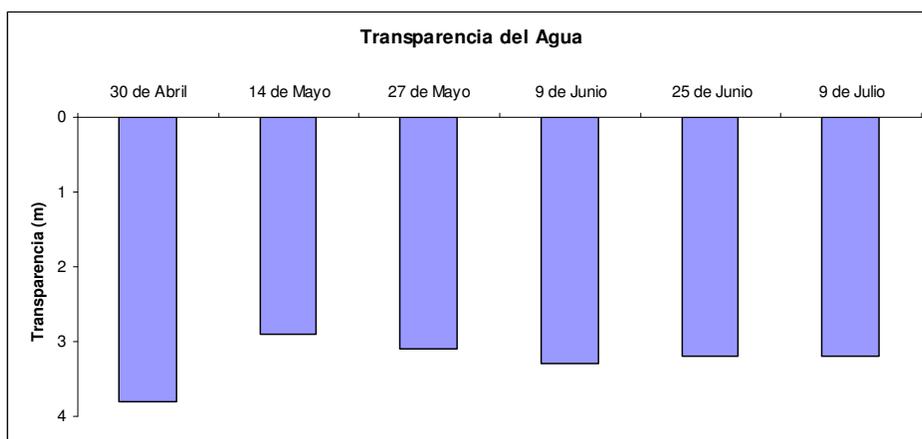


Fig. 8.- Transparencia del agua en la estación de muestreo durante el periodo de estudio.

1.2.- Temperatura del Agua

En la figura 9 se grafican los perfiles de la temperatura del agua del lago del Círculo Miliar. La temperatura no presentó una variación marcada en los valores registrados. No se presentó estratificación térmica a excepción de los días 9 de Junio y 9 de Julio, cuando hubo una clara estratificación, aunque debido a lo somero del lago, posiblemente estas estratificaciones fueron efímeras. Las mayores temperaturas se registraron en los estratos superficiales. Los valores extremos de temperatura fueron de 27,4 °C en la superficie del agua en los días 9 de Junio y 9 de Julio y de 26,1 °C, la cual se registró el 25 de Junio a lo largo de toda la columna de agua. En los días 9 de Junio y 9 de Julio se presentó la mayor diferencia de temperatura entre la superficie y el fondo, de 1,5 °C para el 9 de Junio y de 1,6 °C para el 9 de Julio (Fig. 9).

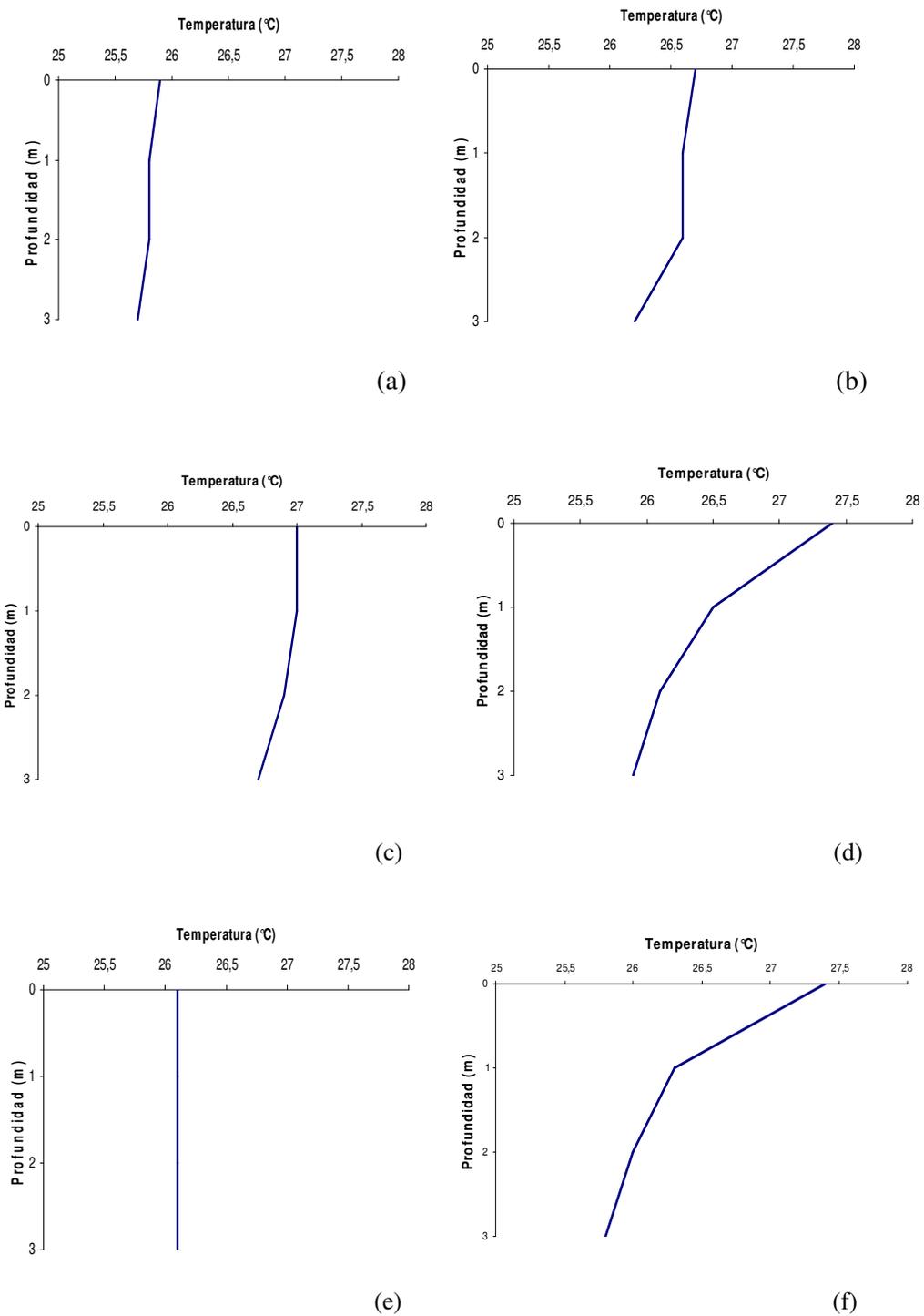


Fig. 9.- Perfiles de temperatura del agua en la estación de muestreo durante el periodo de estudio. (a) es el perfil de temperatura registrado para el 30 de abril del 2009, (b) perfil de temperatura para el 14 de mayo, (c) perfil de temperatura para el 27 de mayo, (d) perfil de temperatura para el 9 de junio, (e) perfil de temperatura para el 25 de junio y (f) el perfil de temperatura para el 9 de julio.

1.3.- Oxígeno disuelto

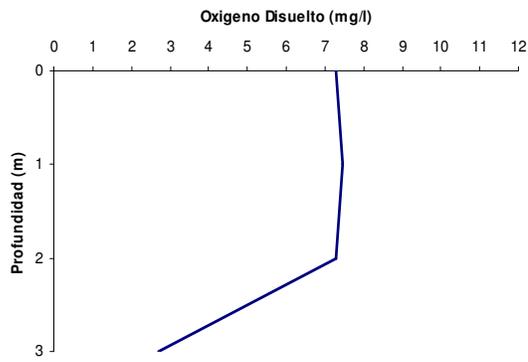
La figura 10 muestra las variaciones de las concentraciones de oxígeno disuelto a lo largo de la columna de agua durante el periodo de estudio. Las mayores concentraciones se registraron siempre en los estratos superficiales, con un valor extremo de 10,08 mg/l el 14 de Mayo de 2009. A partir de la superficie, las concentraciones de oxígeno disminuyeron de manera gradual y abrupta, registrándose los menores valores en los estratos profundos (3m), los cuales presentaron un extenso desarrollo de la vegetación sumergida. En dichos estratos, los valores registrados estuvieron alrededor de los 2 mg/l, con condiciones de hipoxia ($< 2\text{mg/l}$) durante el 27 de mayo y el 9 de julio (1,98 y 1,35 mg/l, respectivamente).

1.4.- Conductividad

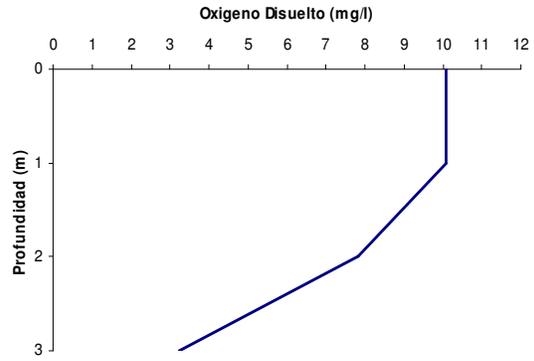
En la figura 11 se pueden observar los perfiles de conductividad en el cuerpo de agua durante el periodo de estudio. Pudo notarse que la conductividad aumentó gradualmente hacia los estratos profundos, registrándose un valor extremo de 410 $\mu\text{S/cm}$ el 27 de mayo. Por su parte, los menores valores se registraron en los estratos superficiales, con un valor mínimo de 347 $\mu\text{S/cm}$ el 30 de abril.

1.5.- pH

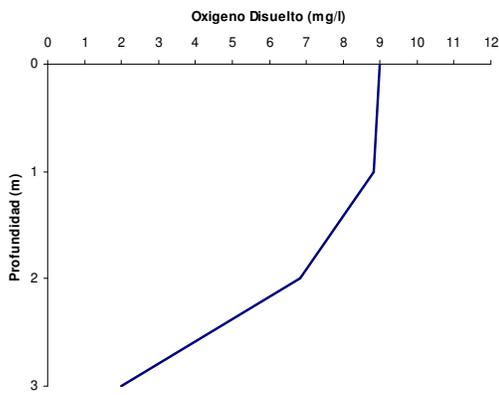
En la figura 12 se pueden apreciar las variaciones del pH en las aguas del lago durante el periodo de estudio. Se puede observar que las aguas mantuvieron condiciones alcalinas (pH siempre superior a las 7 unidades) durante todo el periodo de estudio, con valores extremos de 7,96 a 3 m durante el 9 de junio y de 9,23 en la superficie del agua el 9 de julio. Las condiciones de mayor homogeneidad relativa del pH a lo largo de la columna de agua se registraron los días 30 de abril y 25 de junio, en los cuales también se registró la mayor homogeneidad de temperatura en la columna de agua durante el periodo de estudio.



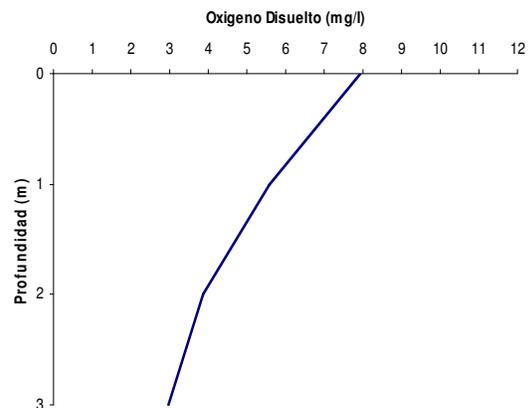
(a)



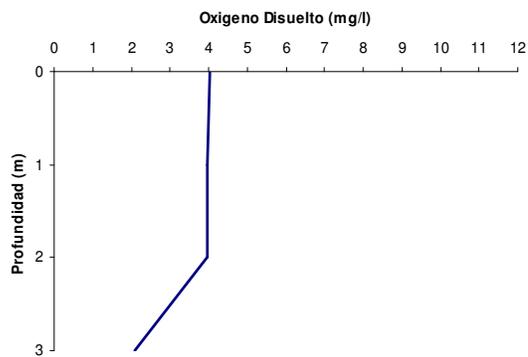
(b)



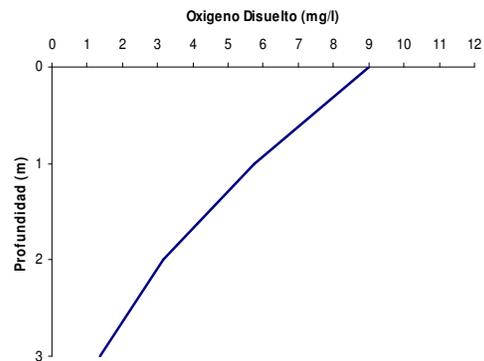
(c)



(d)

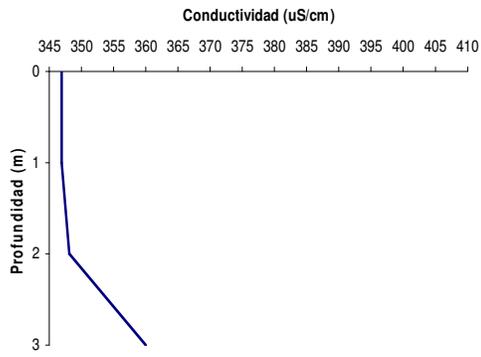


(e)

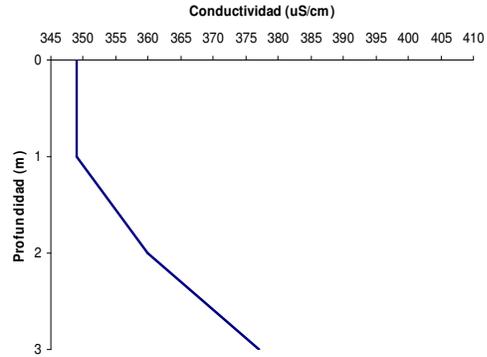


(f)

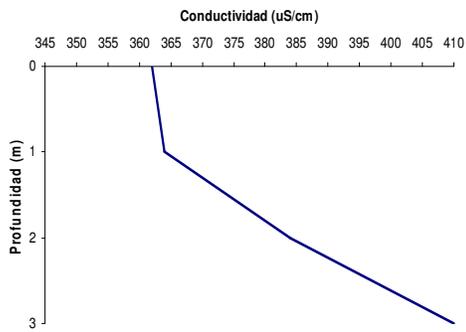
Fig. 10.- Perfiles de oxígeno disuelto en la estación de muestreo durante el periodo de estudio. (a) es el perfil de oxígeno disuelto registrado para el 30 de abril del 2009, (b) perfil de oxígeno disuelto para el 14 de mayo, (c) perfil de oxígeno disuelto para el 27 de mayo, (d) perfil de oxígeno disuelto para el 9 de junio, (e) perfil de oxígeno disuelto para el 25 de junio y (f) el perfil de oxígeno disuelto para el 9 de julio.



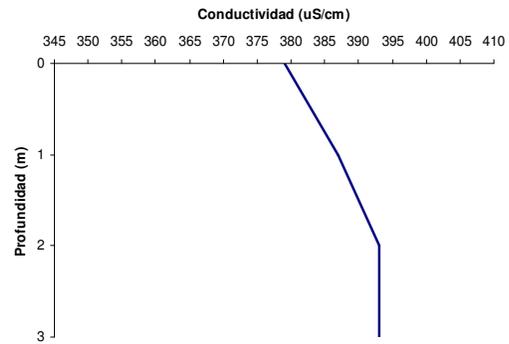
(a)



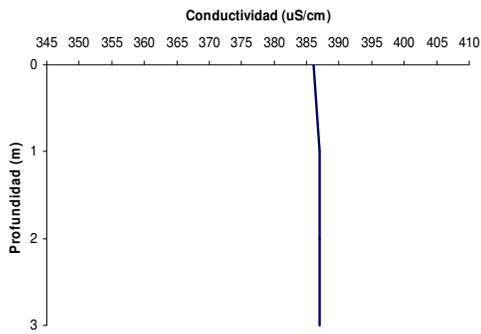
(b)



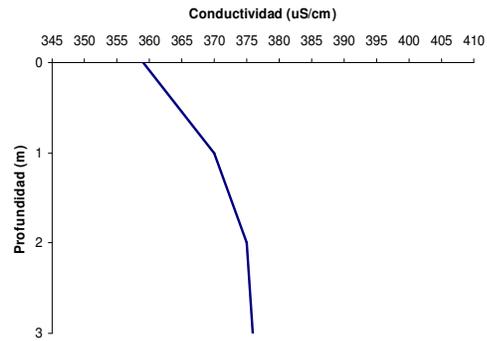
(c)



(d)



(e)



(f)

Fig. 11.- Perfiles de conductividad en la estación de muestreo durante el periodo de estudio. (a) es el perfil de conductividad registrado para el 30 de abril del 2009, (b) perfil de conductividad para el 14 de mayo, (c) perfil de conductividad para el 27 de mayo, (d) perfil de conductividad para el 9 de junio, (e) perfil de conductividad para el 25 de junio y (f) el perfil de conductividad para el 9 de julio.

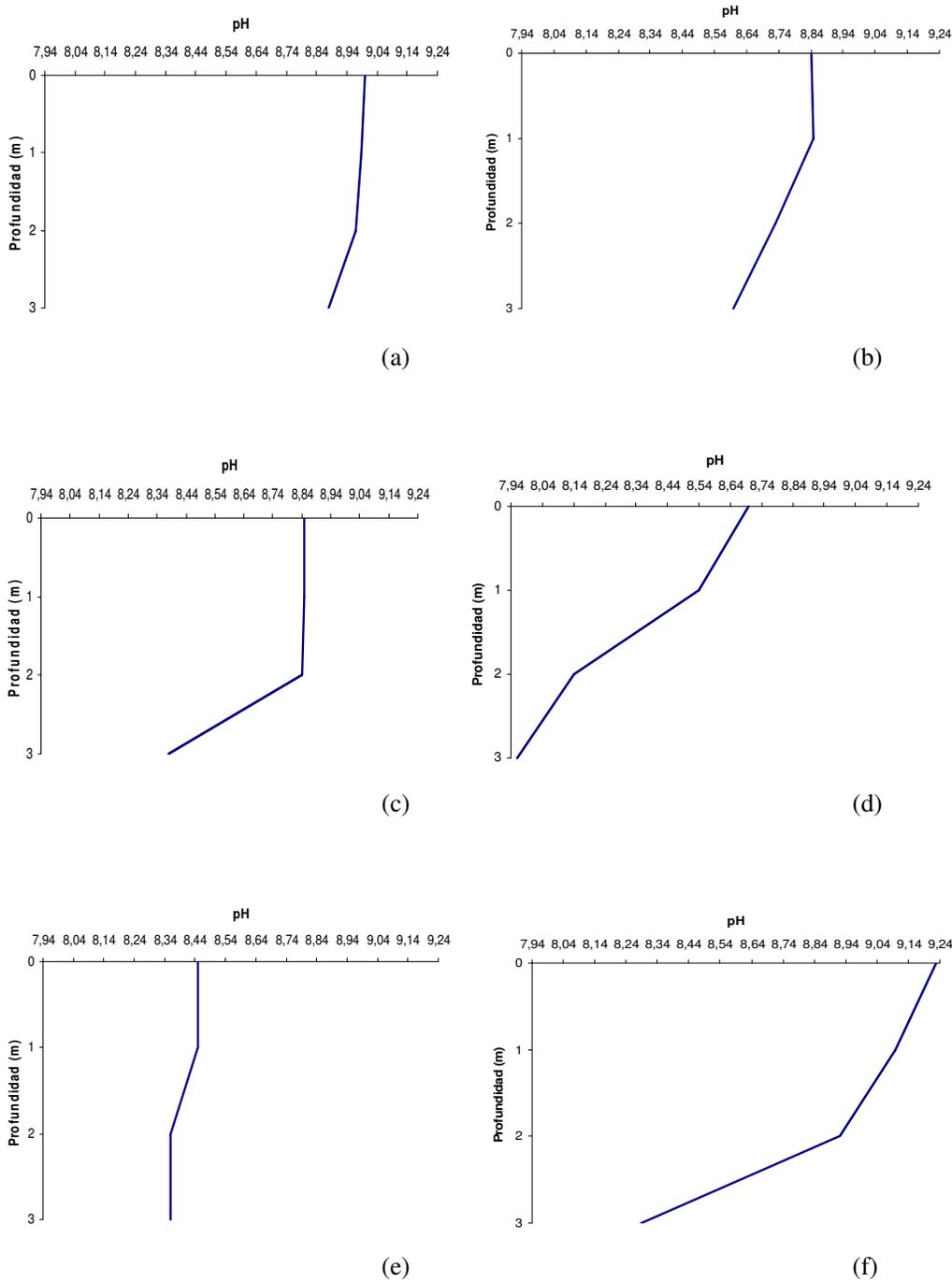


Fig. 12.- Perfiles de pH en la estación de muestreo durante el periodo de estudio. (a) es el perfil de pH registrado para el 30 de abril del 2009, (b) perfil de pH para el 14 de mayo, (c) perfil de pH para el 27 de mayo, (d) perfil de pH para el 9 de junio, (e) perfil de pH para el 25 de junio y (f) el perfil de pH para el 9 de julio.

2.- Variables Biológicas

2.1.- Biomasa del fitoplancton

La biomasa del fitoplancton por unidad de volumen se estimó como la concentración de clorofila-*a*. Como se observa en la figura 13, los niveles más altos de clorofila-*a* se registraron en los estratos subsuperficiales o profundos, nunca en la superficie. Los valores extremos registrados fueron de 39,07 $\mu\text{g/l}$ a 3 m el 14 de mayo, y de 2,66 $\mu\text{g/l}$ a 3 m de profundidad el 30 de abril. Los mayores valores de clorofila-*a* se registraron durante el mes de mayo (días 14 y 27, con medias para la columna de agua de 21,16 y 20,87 $\mu\text{g/l}$, respectivamente), mientras que los menores valores se registraron durante el muestreo del 30 de abril (con una media para la columna de agua de 3,92 $\mu\text{g/l}$). En toda la columna de agua, la concentración de clorofila-*a* varió entre 3,92 (30 de Abril) y 21,16 $\mu\text{g/l}$ (14 de Mayo), con una media de $11,96 \pm 7,27 \mu\text{g/l}$, valor que puede considerarse moderadamente alto.

2.2.- Abundancia del zooplancton

En la tabla 3 se presenta la lista de especies identificadas en el Lago del Círculo Militar. Se identificaron 13 entidades taxonómicas, de las cuales 5 pertenecen a los rotíferos, 2 a los cladóceros, 3 a los copépodos, seguidos por los ostrácodos y la larva de Chironomidae. En la figura 14 se puede observar la distribución de zooplancton por estrato durante el periodo de estudio. En general se observa una mayor abundancia de organismos en los estratos superficiales (entre 0 y 1 m de profundidad) que en el resto de la columna de agua.

Los copépodos (Calanoida + Cyclopoida) y los rotíferos fueron los grupos más abundantes en cada uno de los estratos estudiados, seguidos por los cladóceros, los ostrácodos y los

protozoarios. Las larvas de la familia Chironomidae sólo se encontraron en el muestreo del 30 de abril.

La abundancia del zooplancton en los estratos superficiales superó en más del doble la abundancia de los estratos más profundos en la mayoría de los casos, con valores entre 87 ind./l (9 de junio) y 420 ind./l (25 de junio). Para este estrato (1-0 m), la abundancia media fue de 274 ± 118 ind./l; en el estrato de 2-1 m la abundancia del zooplancton fue de 84 ± 29 ind./l, mientras que en el estrato 3-2 m fue de 80 ± 35 ind./l.

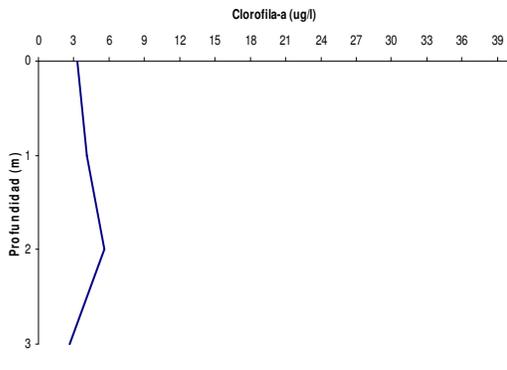
Considerando toda la columna de agua, la abundancia total del zooplancton varió entre 55 ind./l (9 de julio) y 203 ind./l (25 de junio), con una media de 146 ± 53 ind./l, lo cual representa un valor moderado de abundancia (Fig. 15).

La proporción del zooplancton en el Lago del Círculo Militar estuvo dominada por los copépodos (Calanoida + Cyclopoida) (Fig. 16), excepto en el mes de mayo cuando los rotíferos fueron dominantes, mientras que los cladóceros permanecieron en bajas densidades durante el periodo de estudio al igual que los protozoarios y los ostrácodos. De esta manera, los copépodos presentaron proporciones entre el 31 y 67% durante el periodo de estudio, mientras que las proporciones de los rotíferos variaron entre 22 y 61%. En promedio, las proporciones del resto de los grupos del zooplancton no superaron el 10%.

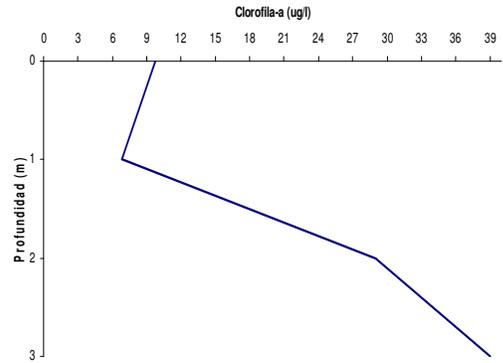
En cuanto a los copépodos, de los Cyclopoida *Mesocyclops* sp. fue el más abundante de este, *Arctodiaptomus* (A) sp fue el único copépodo Calanoida encontrado en el lago, de orden de los rotíferos dominó *Keratella* sp., mientras que *Diaphanosoma spinulosum* fue el cladócero más abundante en todo el periodo de estudio (Fig. 17).

Las proporciones de los copépodos Cyclopoida y Calanoida presentaron valores entre 39 y 61% en todo el periodo de estudio, siendo los Cyclopoida más abundantes en el mes de Mayo, mientras que los Calanoida fueron más abundantes durante el resto del periodo de estudio (Fig. 18).

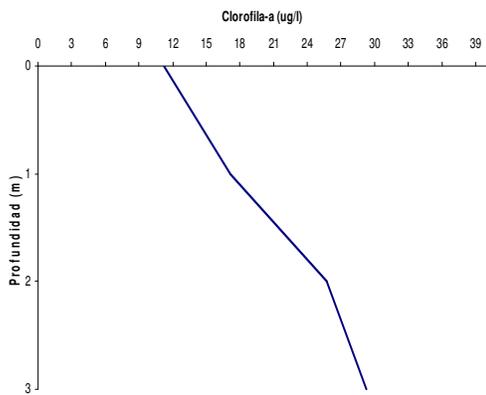
En la figura 19 se presentan las proporciones de los diferentes estadios de los copépodos Cyclopoida recolectados durante el periodo de estudio, observándose que los nauplios presentaron las mayores proporciones (entre 73 y 95%), mientras que para el estadio de copepodito las proporciones variaron entre 5 y 14% y los adultos no superaron el 10% durante todo el periodo de estudio. En la figura 20 se observan las proporciones de los diferentes estadios de los copépodos Calanoida; los nauplios fueron los más abundantes con proporciones entre 44 y 73%, seguidos por los copepoditos con proporciones entre 14 y 31%, mientras que los adultos mostraron proporciones entre 7 y 32%.



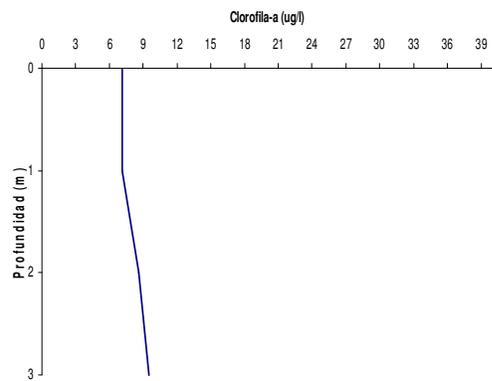
(a)



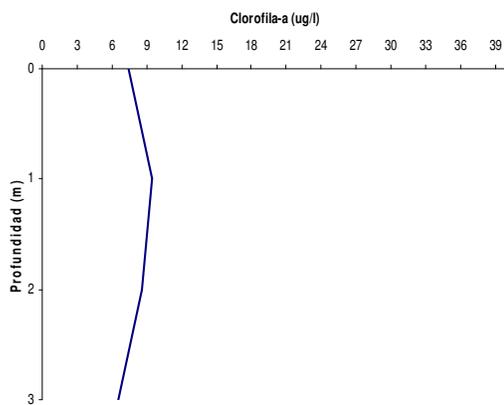
(b)



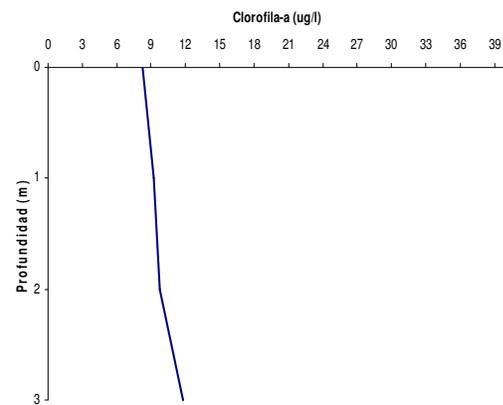
(c)



(d)



(e)

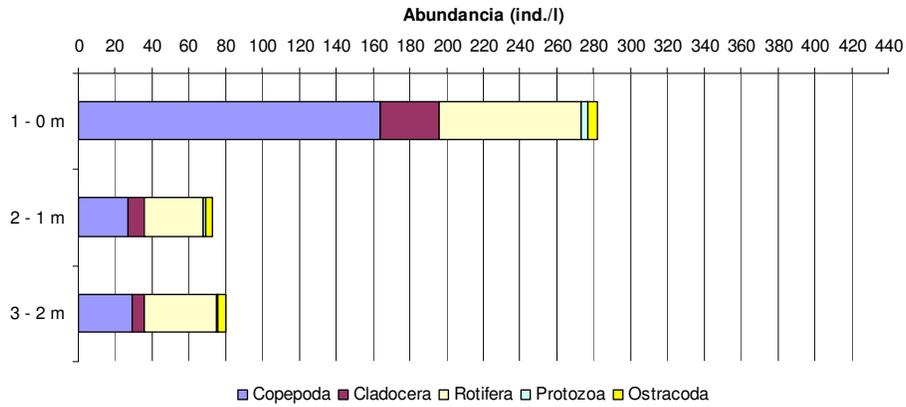


(f)

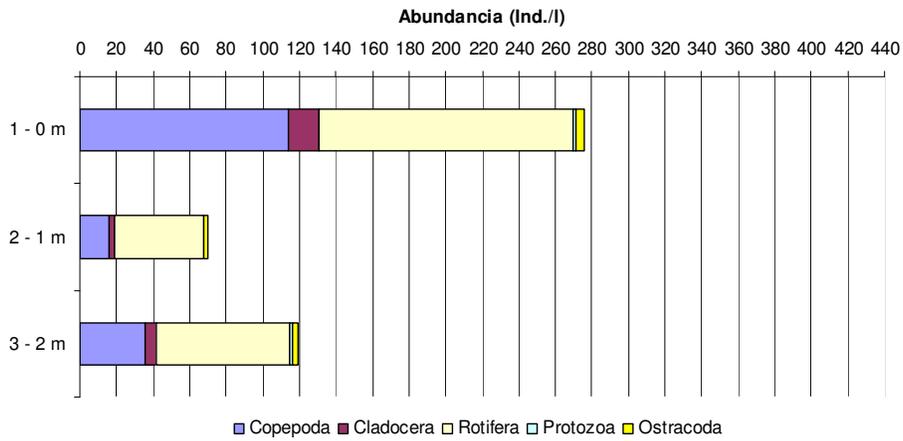
Fig. 13.- Perfiles de Clorofila-a en la estación de muestreo durante el periodo de estudio. (a) es el perfil de Clorofila-a registrado para el 30 de abril del 2009, (b) perfil de Clorofila-a para el 14 de mayo, (c) perfil de Clorofila-a para el 27 de mayo, (d) perfil de Clorofila-a para el 9 de junio, (e) perfil de Clorofila-a para el 25 de junio y (f) el perfil de Clorofila-a para el 9 de julio.

Tabla 3.- Lista de especies (a excepción de Ostrácoda) presentes en la Lago del Círculo Militar durante el periodo de estudio.

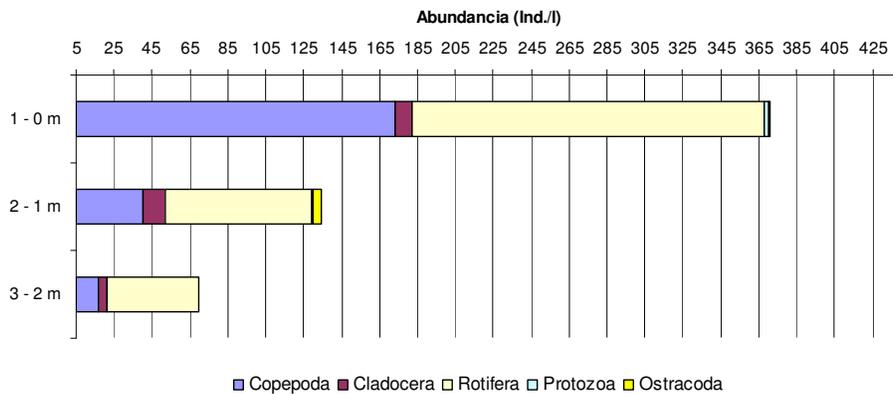
Copepoda Cyclopoida
<i>Thermocyclops decipiens</i>
<i>Mesocyclops sp.</i>
Copepoda Calanoida
<i>Arctodiaptomus (A) sp.</i>
Cladocera
<i>Ceriodaphnia cornuta</i>
<i>Diaphanosoma birgei</i>
Rotifera
<i>Keratella americana</i>
<i>Platylas patulus</i>
<i>Polyarthra remata</i>
<i>Hexarthra sp.</i>
<i>Keratella procurva</i>
Protozoa
<i>Trichodina sp.</i>
Ostracoda
Diptera
Chironomidae (Larva)



(a)

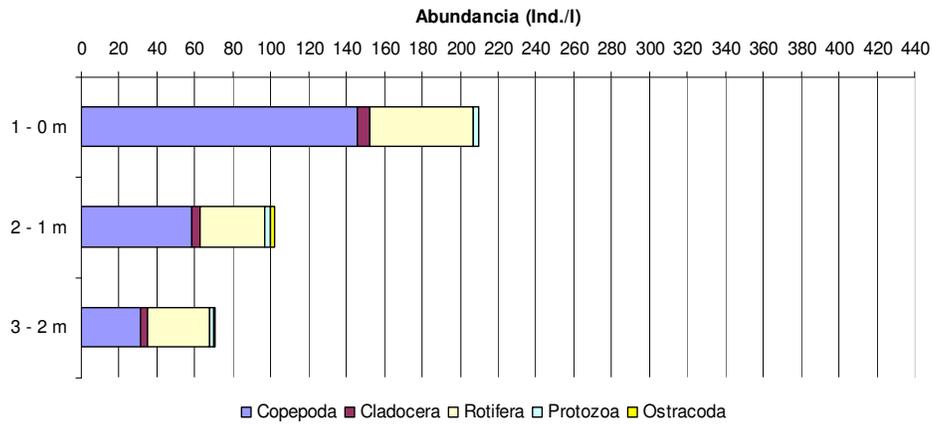


(b)

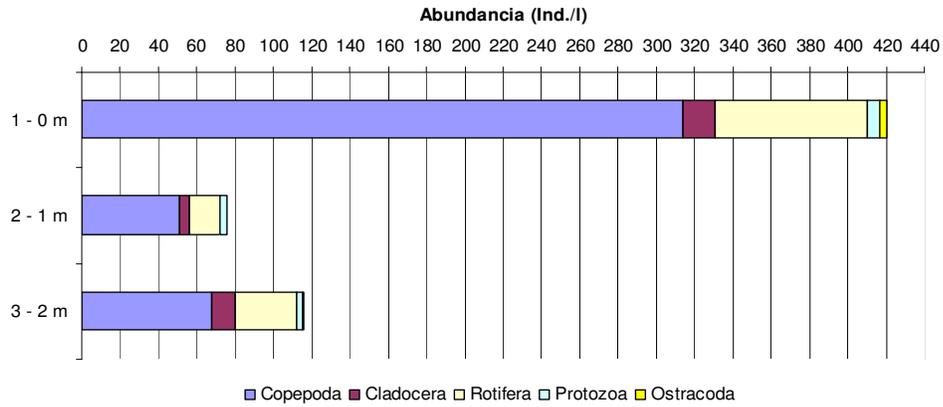


(c)

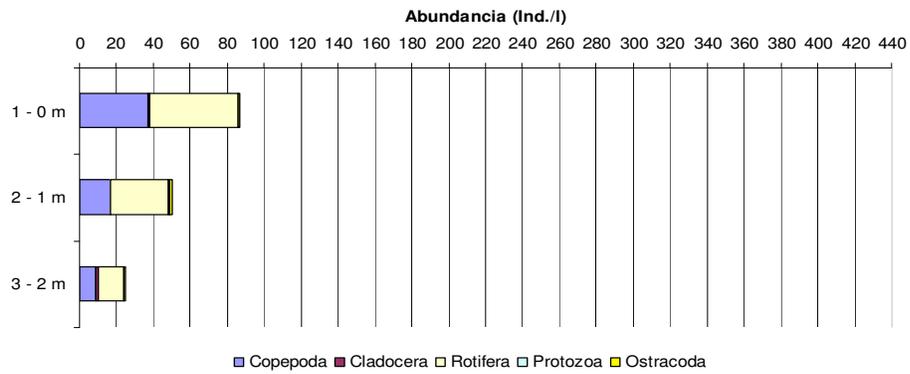
Fig. 14.- Distribución de los principales grupos de zooplancton en la estación de muestreo durante el periodo de estudio. (a) es la distribución del zooplancton registrada para el 30 de abril del 2009, (b) distribución para el 14 de mayo, (c) distribución para el 27 de mayo.



(d)



(e)



(f)

Fig. 14 (cont.). Distribución de los principales grupos de zooplancton en la estación de muestreo durante el periodo de estudio, (d) distribución para el 9 de junio, (e) distribución para el 25 de junio y (f) distribución para el 9 de julio.

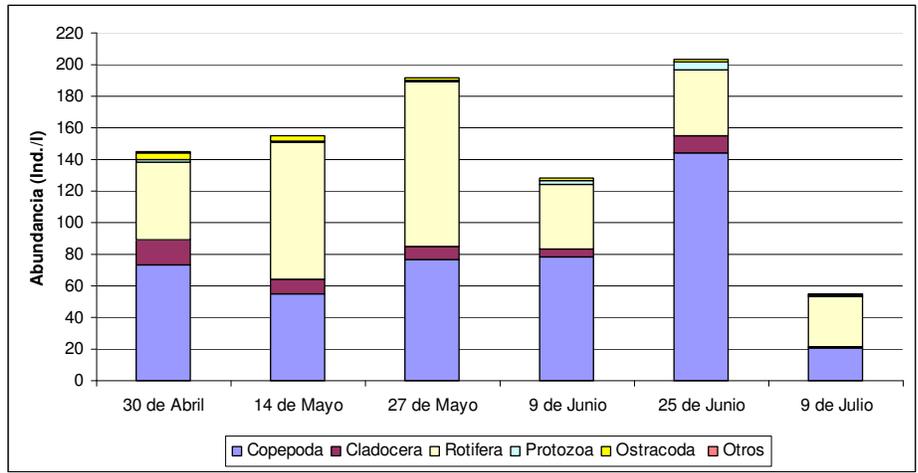


Fig. 15.- Abundancia total de los principales grupos de zooplancton en la estación de muestreo durante el periodo de estudio.

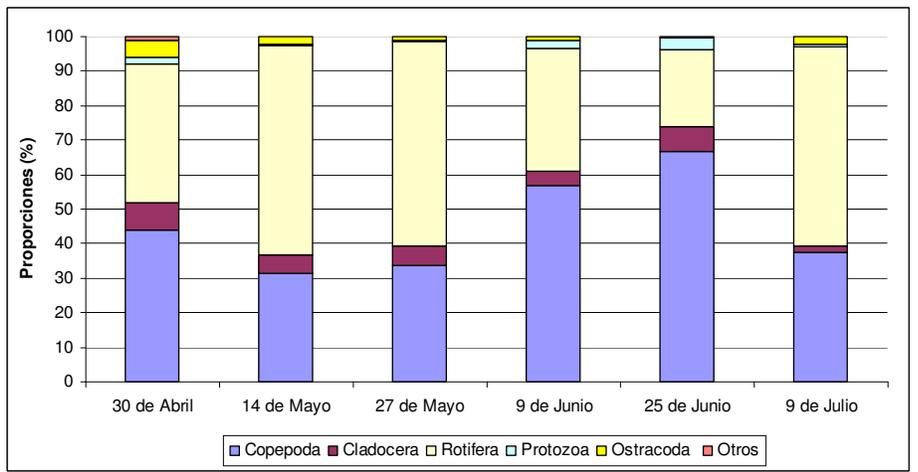


Fig. 16.- Proporciones de los principales grupos de zooplancton en la estación de muestreo durante el periodo de estudio.

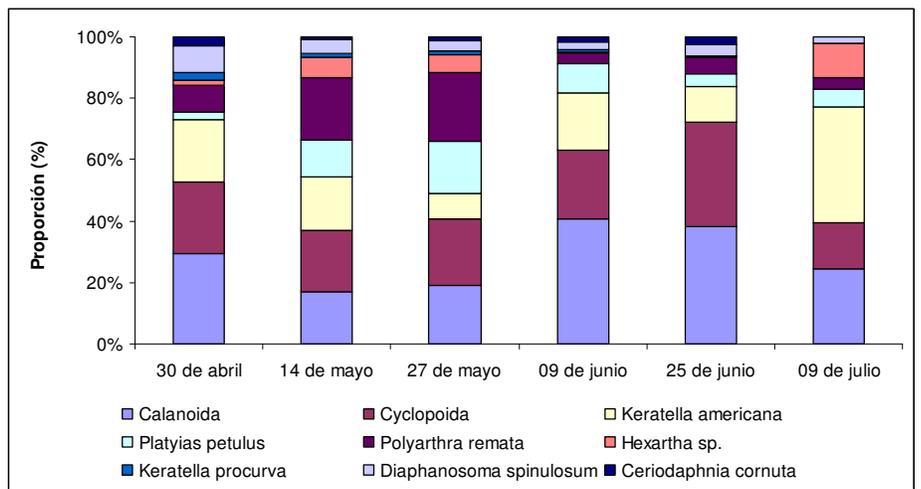


Fig. 17. Proporciones de las especies de zooplancton en la estación de muestreo durante el periodo de estudio.

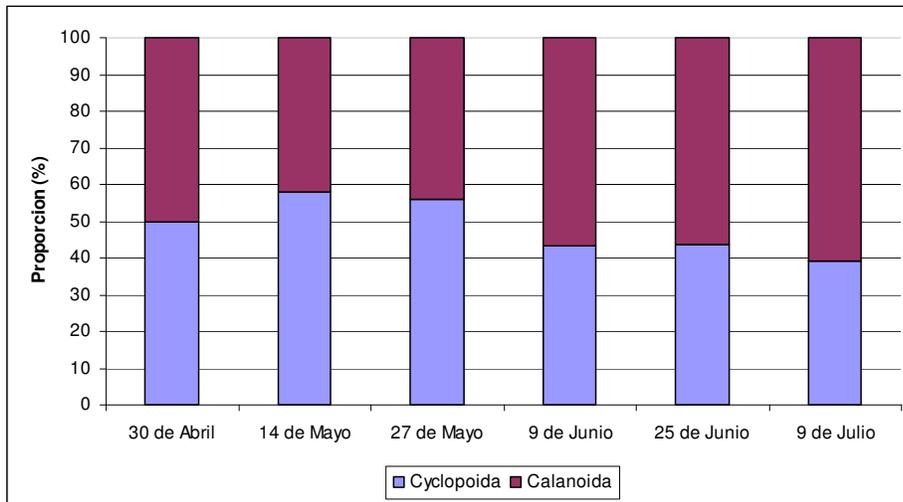


Fig. 18.- Proporción de los copépodos Cyclopoida y Calanoida en la estación de muestreo durante el periodo de estudio.

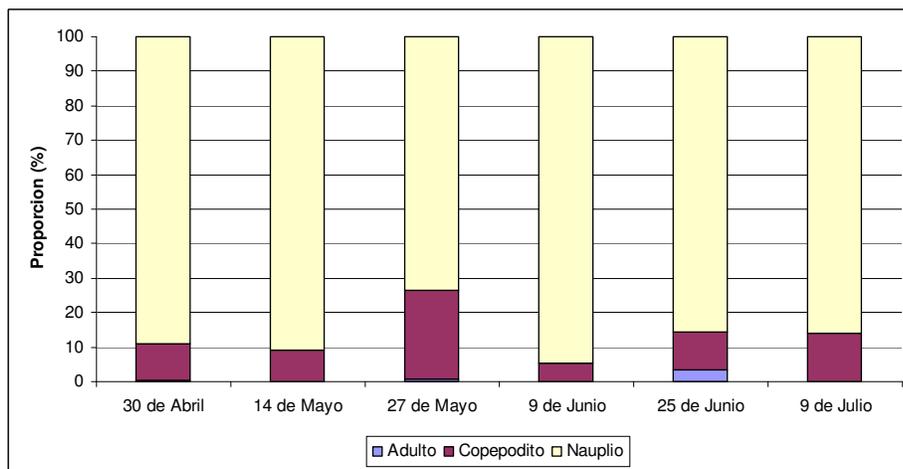


Fig. 19.- Proporción de estadios de los copépodos Cyclopoida en la estación de muestreo durante el periodo de estudio.

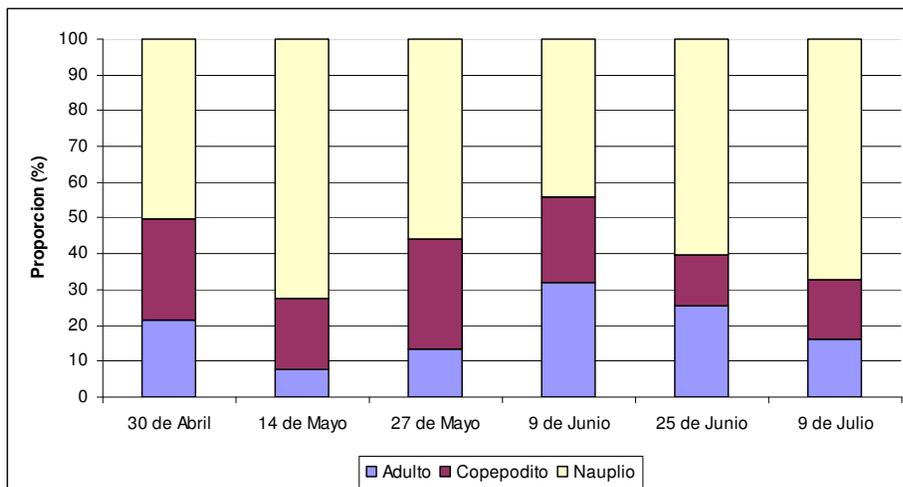


Fig. 20.- Proporción de estadios de los copépodos Calanoida en la estación de muestreo durante el periodo de estudio.

3.- Análisis estadísticos

3.1.- Análisis de Componentes Principales

Los resultados del ACP se muestran en la tabla 4, la cual expresa los autovalores (λ) y los porcentajes de varianza explicada y acumulada de los tres primeros componentes principales, mientras que la tabla 5 refleja los coeficientes de correlación de los tres primeros componentes principales considerados para el análisis, los cuales fueron ordenados de mayor a menor de acuerdo a estos valores de r . Para el análisis se utilizaron los tres primeros componentes principales, los cuales explicaron el 92,2% de la varianza de las variables fisicoquímicas, concentración de clorofila-*a* y abundancia total del zooplancton. Además, estos componentes principales presentaron valores de λ mayores al valor de Jolliffe Cut-Off el cual fue de 0,7.

Tabla 4.- Autovalores (λ), % de varianza explicada y acumulada en los tres primeros componentes.

CP	λ	% Varianza	% Var. Acumulada
1	3,07887	43,984	43,984
2	2,44304	34,901	78,885
3	0,931837	13,312	92,197

Tabla 5.- Coeficientes de Correlación (r) de los dos primeros componentes principales de las variables ambientales.

C. Pearson	CP1	CP2	CP3
Clorofila-a	0,9336	0,3374	0,06573
Transparencia	-0,8949	-0,1193	0,09712
Oxígeno	0,8735	-0,3109	-0,07702
Temperatura	0,6126	0,6015	0,4582
Conductividad	-0,3481	0,9141	0,1914
pH	0,3379	-0,8695	0,0772
Zooplancton	0,1814	0,5147	-0,8122

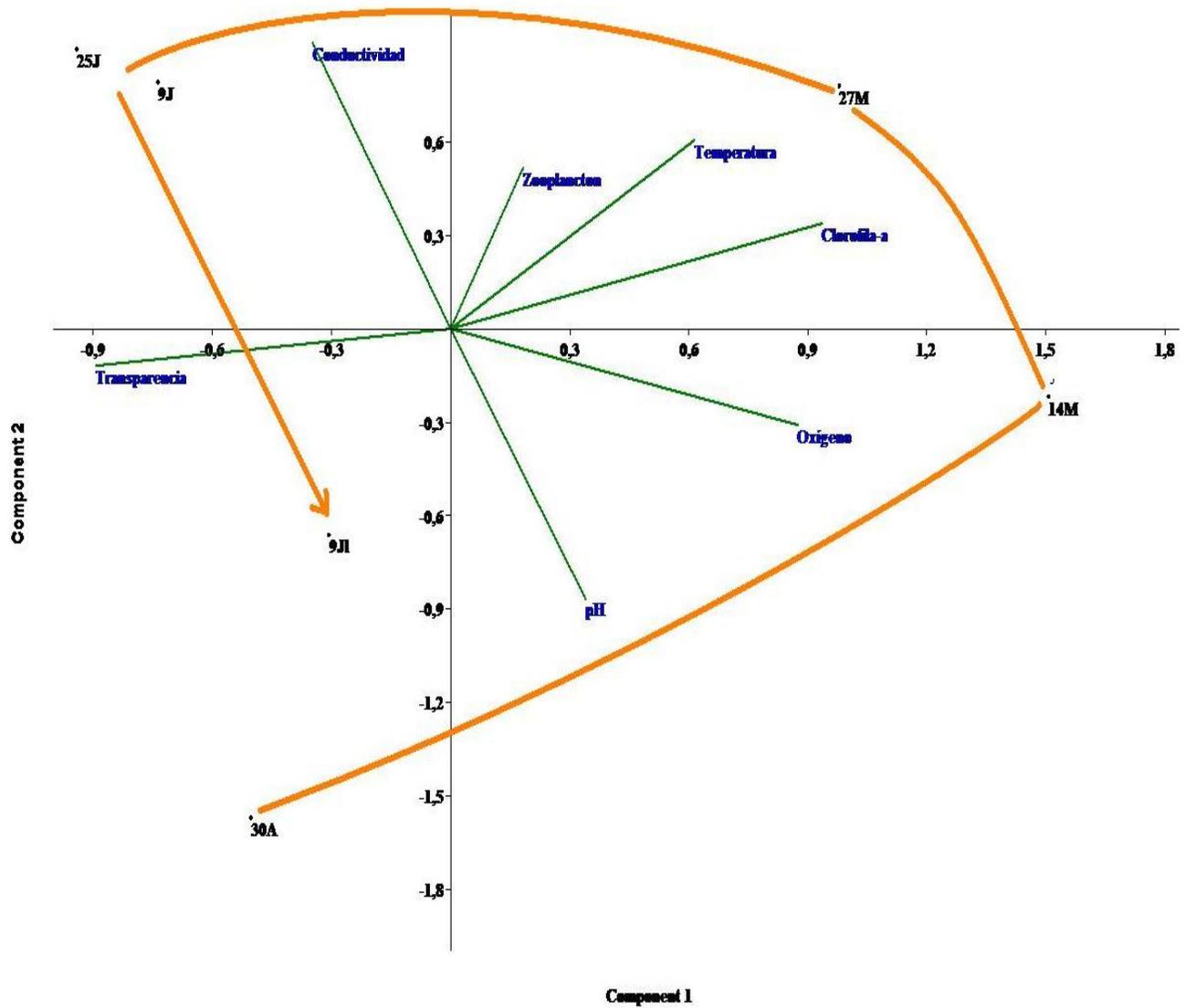


Fig. 21. Ordenación de las variables ambientales y abundancia de zooplancton sobre el primer y segundo componente principal. 30A: 30 de abril, 14M: 14 de mayo, 27M: 27 de mayo, 9J: 9 de junio, 25J: 25 de junio, 9JI: 9 de julio. La flecha indica la secuencia estacional.

Los biplots generados en el análisis (figuras 21 y 22) de las medias de las variables ambientales, clorofila-*a* y la abundancia total de la comunidad de zooplancton, refleja una clara tendencia a la asociación entre la abundancia de zooplancton y las variables ambientales.

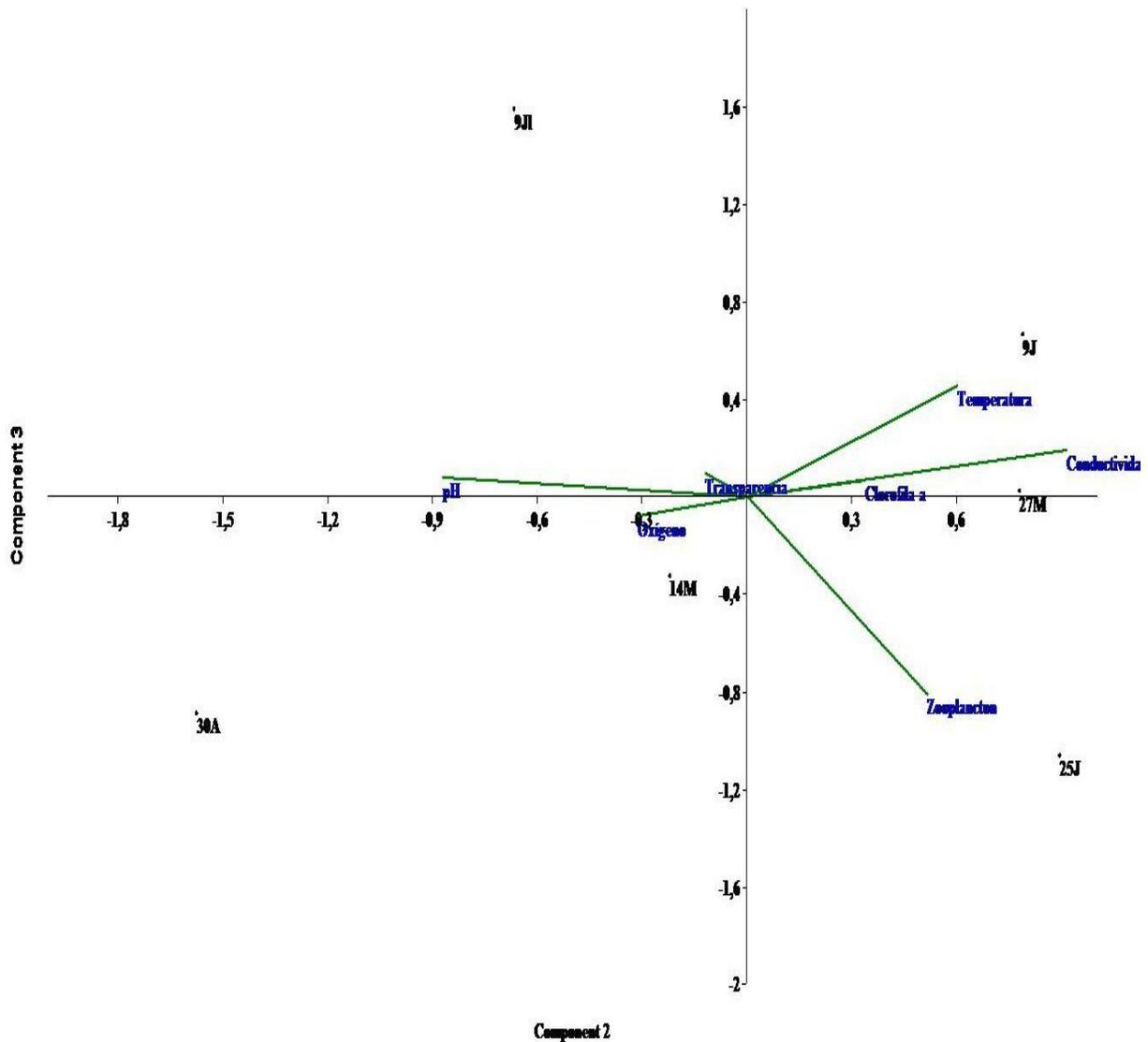


Fig. 22. Ordenación de las variables ambientales y abundancia de zooplancton sobre el segundo y tercer componente principal. 30A: 30 de abril, 14M: 14 de mayo, 27M: 27 de mayo, 9J: 9 de junio, 25J: 25 de junio, 9JI: 9 de julio.

El CP1 reveló que el mes de mayo presentó el mayor registro de clorofila-*a* y temperatura durante el periodo de estudio, además de mostrar la menor transparencia. Esta condición pudo estar relacionada con la igual mayor concentración de oxígeno disuelto registrada que se presentó en este mismo mes de estudio. A su vez, el CP1 reflejó que en el mes de junio se

registró la menor concentración de oxígeno disuelto, mientras que los días 9 de julio y 30 de abril fueron los más fríos de todo el periodo de muestreo, además de exhibir las menores concentraciones de clorofila-*a*, lo cual pudo estar relacionado con los altos valores de transparencia de agua registrados para estos días del periodo de estudio.

El CP2 por su parte muestra que el mes de junio presentó la mayor conductividad, lo cual estuvo relacionado con los bajos valores de pH registrados en este mismo mes. Este mismo patrón se observó el 14 de mayo y 9 de julio, los cuales presentaron las más bajas conductividades, pero sus registros de pH fueron los más altos de todo el periodo de estudio.

El CP3 destaca los muestreos en los cuales se encontraron las mayores abundancias de zooplancton. Se observó que el 25 de junio se registró la mayor abundancia total de zooplancton, seguido del mes de mayo, mientras que la menor abundancia total registrada fue el día 9 de julio, cuando comenzaron las precipitaciones, seguido por el 9 de junio.

En resumen, se observa que el zooplancton respondió a los cambios ambientales que se produjeron durante el periodo de estudio en el lago del Círculo Militar. Además, se puede observar en la figura 20 que se presentó una secuencia estacional durante todo el periodo de estudio, en la que en cada muestreo las características del ambiente acuático fueron cambiando, posiblemente por la transición de la temporada de sequía a la temporada de lluvias y el inicio de los meses lluviosos (julio).

Por otro lado, al realizar un análisis de componentes principales de las variables fisicoquímicas, biomasa de fitoplancton y abundancia total de zooplancton en cada estrato de la columna de agua, se puede observar las relaciones entre estas variables en cada profundidad de la columna de agua durante el periodo de estudio.

Así, la tabla 6 muestra los autovalores y los porcentajes de varianza explicada y acumulada de los tres primeros componentes principales, mientras que la tabla 7 refleja los coeficientes de correlación de los componentes principales considerados para el análisis, los cuales fueron

los tres primeros componentes principales por explicar el 79,2 % de la varianza de las variables fisicoquímicas, concentración de clorofila-*a* y abundancia total del zooplancton para cada profundidad del lago.

Tabla 6. Autovalores (λ), % de varianza explicada y acumulada en los tres primeros componentes para el análisis de las variables en cada profundidad del lago.

CP	λ	% Varianza	% Var. Acumulada
1	3,10728	44,39	44,39
2	1,39641	19,949	64,239
3	1,04967	14,995	79,234

Tabla 7.- Coeficientes de Correlación (r) de los dos primeros componentes principales de las variables ambientales.

C. Pearson	CP1	CP2	CP3
Oxígeno	0,9384	0,1739	0,03495
pH	0,8429	-0,07226	-0,1588
Conductividad	-0,7926	0,3913	0,1311
Transparencia	-0,7677	-0,03507	-0,2399
Clorofila- <i>a</i>	-0,2477	0,7784	-0,001458
Temperatura	0,483	0,775	-0,08541
Zooplancton	0,06358	-0,01024	0,9701

Los biplots generados (figuras 23 y 24) muestran una clara relación de las profundidades del lago con las variables ambientales y la abundancia total de zooplancton registrada en cada estrato.

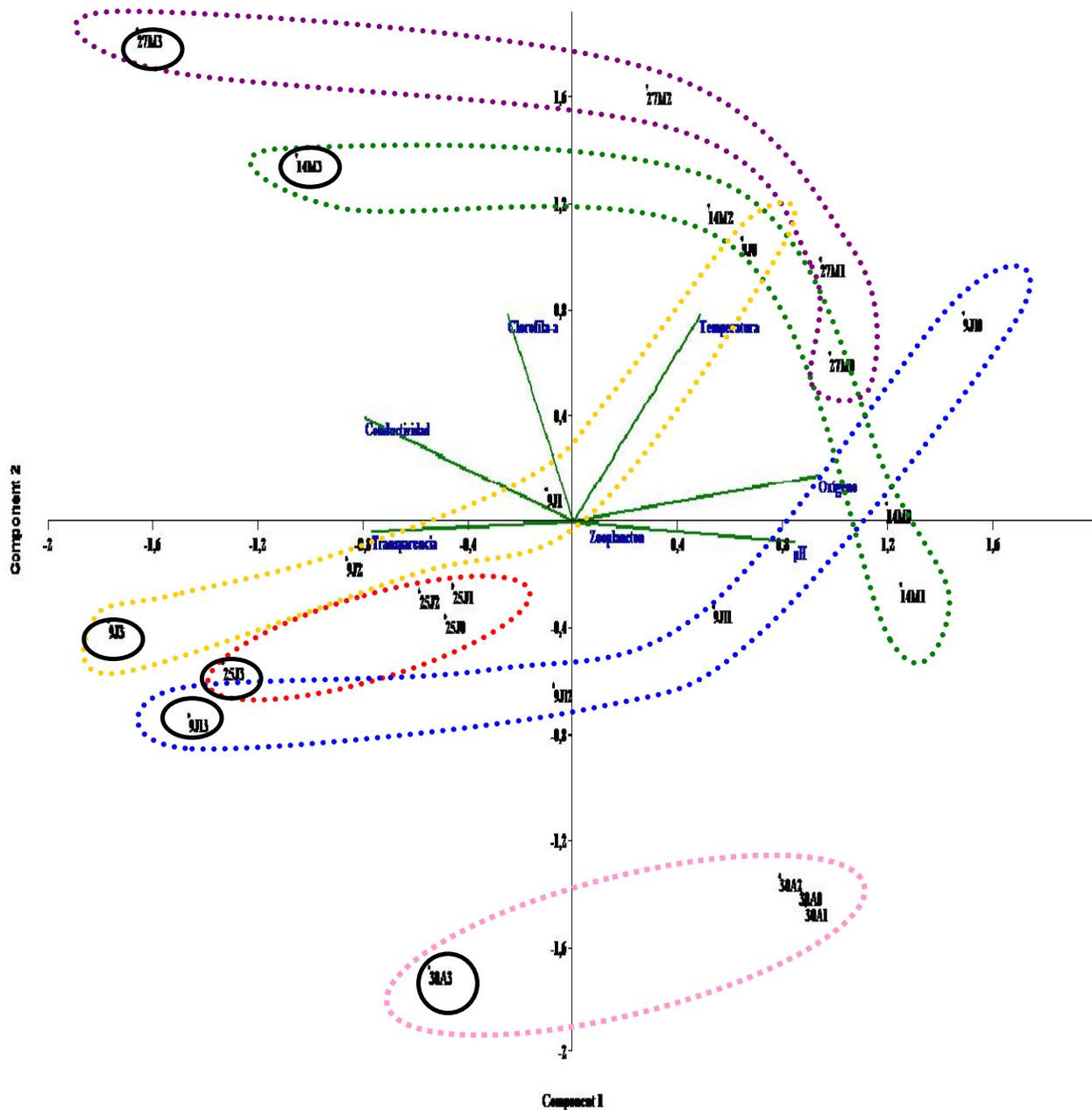


Fig. 23. Ordenación de las variables ambientales y abundancia total de zooplancton por estratos sobre el primer y segundo componente principal. 30A: 30 de abril (rosado), 14M: 14 de mayo (verde), 27M: 27 de mayo (morado), 9J: 9 de junio (amarillo), 25J: 25 de junio (rojo), 9J: 9 de julio (azul). 0: indica medida a 0 metros, 1: registro a un metro de profundidad, 2: a dos metros y 3: a tres metros (negro).

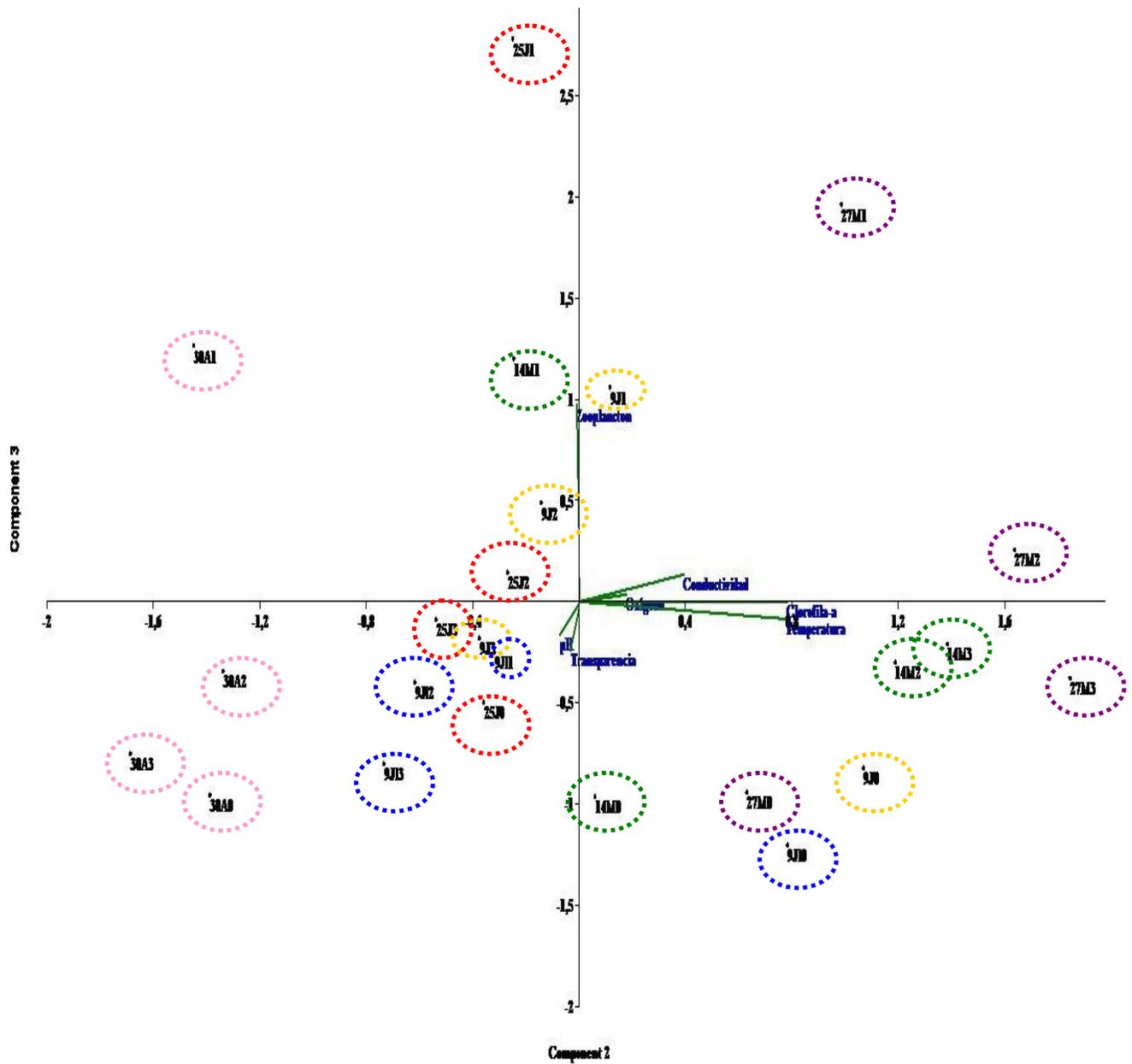


Fig. 24. Ordenación de las variables ambientales y abundancia total de zooplancton por estratos sobre el segundo y tercer componente principal. 30A: 30 de abril (rosado), 14M: 14 de mayo (verde), 27M: 27 de mayo (morado), 9J: 9 de junio (amarillo), 25J: 25 de junio (rojo), 9J: 9 de julio (azul). 0: indica medida a 0 metros, 1: registro a un metro de profundidad, 2: a dos metros y 3: a tres metros.

El CP1 revela que en los estratos 0 – 1 m del lago se registraron las mayores concentraciones de oxígeno disuelto y de pH debido probablemente a las altas tasas fotosintéticas por parte de las plantas sumergidas y del fitoplancton del lago. A su vez, en estos estratos se presentó la menor conductividad. En el mes de mayo se registraron las mayores concentraciones de oxígeno disuelto, seguido del estrato 1 - 2 m para el mismo mes, indicando que posiblemente la actividad fotosintética en este mes fue la más alta.

Los estratos 2 – 3 m registraron los mayores valores de conductividad debido a la alta concentración de sólidos disueltos en los estratos profundos del lago en comparación con los de la superficie. En el mes de mayo se registró la mayor conductividad para este estrato. Por su parte, estos estratos presentaron las menores concentraciones de oxígeno disuelto debido a que debieron predominar los procesos de descomposición de materia orgánica.

El CP2 muestra que los estratos 0 - 1 m fueron los más cálidos en comparación con el fondo, siendo mayo y el 9 de junio los muestreos en los que se registró la mayor temperatura en este estrato. En cambio los estratos 0 - 1 m del 25 de junio y 30 de abril fueron los más fríos en todo el periodo de estudio, en comparación con los demás días de muestreo para el mismo estrato. Para el 9 de julio, el cual representó el inicio de la temporada de lluvias, el estrato 0 - 1 m fue cálido debido a que el muestreo se ejecutó en horas del mediodía, cuando la radiación incidente fue más alta. Además, para este estrato se registraron las menores concentraciones de clorofila-*a*, indicando que pudo ocurrir una fotoinhibición.

Los estratos 1 – 2 m y 2 – 3 m presentaron las mayores concentraciones de clorofila-*a* así como también las menores temperaturas. En mayo se registró la mayor biomasa de fitoplancton para estos estratos.

El CP3 refleja que la abundancia total de zooplancton para el estrato 0 – 1 m fue la mayor en todo el periodo de estudio, siendo el 25 de junio y el mes de mayo los que presentaron las

mayores abundancias para este estrato. En julio se presentó la menor abundancia para este estrato, coincidiendo con la baja conductividad registrada para este estrato y con el inicio de la temporada de lluvias.

La menor abundancia total se registró en las profundidades 1- 2 m y 2- 3 m en todo el periodo de estudio, coincidiendo con los bajos valores de concentración de oxígeno disuelto.

3.2.- Correlación de Pearson (r)

La correlación de Pearson (r) arrojó resultados que se describen en la tabla 8, donde se puede apreciar la correlación existente entre las variables ambientales, clorofila-*a* y abundancia total de zooplancton.

Tabla 8. Correlación de Pearson (r) entre las variables registradas.

Variable	Temperatura	Transparencia	Oxígeno	Conductividad	pH	Clorofila-a	Zooplancton
Temperatura	1	-0,48	0,35	0,44	-0,23	0,8	0,09
Transparencia		1	-0,65	0,24	-0,14	-0,89	-0,23
Oxígeno			1	-0,61	0,5	0,67	0,07
Conductividad				1	-0,87	0	0,27
pH					1	0,05	-0,39
Clorofila-a						1	0,29
Zooplancton							1

La biomasa de fitoplancton, estimada como concentración de clorofila-*a*, se correlacionó de forma positiva con la concentración de oxígeno disuelto en la columna de agua con un valor de r de 0.67.

Por otro lado, la temperatura esta correlacionada positivamente con la concentración de clorofila-*a* con una valor de r = 0,80.

3.3.- Análisis de la estructura comunitaria

El coeficiente de concordancia de Kendall (W) arrojó un valor de $W = 0,36492$ por un $p < 0,00575$, indicando que la comunidad de zooplancton no presentó diferencias significativas en el rango de abundancia de las especies. En otras palabras, la estructura comunitaria fue similar a lo largo del periodo de estudio.

3.4.- Índices de diversidad y equidad

En la tabla 9 se puede observar que la diversidad de especies (H') durante todo el periodo de estudio varió entre 1,51 (9 de junio) y 1,92 (14 de mayo). En el mes de mayo se presentaron los mayores valores de índices de diversidad lo cual coincidió con los mayores valores de clorofila-*a*, oxígeno disuelto y temperatura. En el mes de junio los valores disminuyeron, coincidiendo con las menores concentraciones de oxígeno disuelto.

Tabla 9. Índices de diversidad (H') y equidad (J) calculados para todo el periodo de estudio.

Muestreo	H'	J
30 de Abril	1,80	0,82
14 de Mayo	1,92	0,87
27 de Mayo	1,88	0,85
9 de Junio	1,57	0,71
25 de Junio	1,51	0,73
9 de Julio	1,61	0,83

Por su parte, el índice de equidad (J) presentó una tendencia similar al de diversidad. Los valores de J variaron de 0,71 (9 de junio) a 0,87 (14 de mayo). El 9 de julio, la equidad aumentó a pesar de la baja abundancia del zooplancton posiblemente debido a que este menor valor de abundancia estuvo distribuido más uniformemente en menores cantidades en las especies presentes en comparación con el resto del periodo de estudio.

4.- Identificación molecular de *Thermocyclops decipiens*

4.1.- Extracción de ADN y amplificación de la región ITS2

La estandarización realizada con individuos de copépodos Calanoida, tanto para la extracción de ADN con el método de Towner como la reacción en cadena de la polimerasa, arrojaron resultados positivos, obteniéndose una amplificación satisfactoria del ADN de la región ITS2 (Fig. 25).

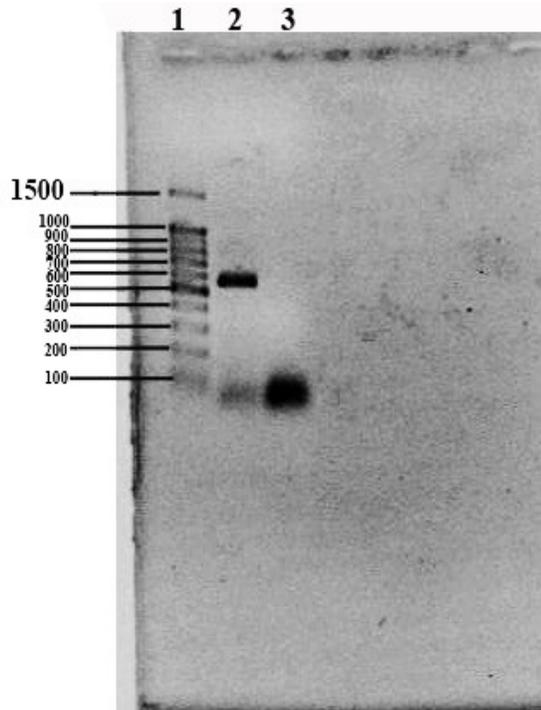


Fig. 25.- Registro fotográfico de la electroforesis con el producto de la estandarización de PCR del ITS2 de individuos Calanoida. Carril 1: marcador de peso molecular 100 Kb DNA Ladder Promega®, Carril 2: producto de PCR de los individuos Calanoida cuyo ADN fue extraído con la estandarización del método de Towner, Carril 3: control negativo.

En la figura 25 se observa que el producto de PCR obtenido en esta estandarización presentó un tamaño entre 500 y 600 pb. Además, se puede notar que el control negativo no arrojó un producto amplificado de PCR. El otro método de extracción de ADN con individuos

Calanoida también arrojó resultados positivos en el ensayo de PCR descrito anteriormente, obteniéndose producto de PCR del ITS2 del ADN ribosomal de estos organismos (Fig. 26).

Una vez obtenido un producto de PCR satisfactorio en el proceso de estandarización del método de Towner, se sometió el ADN extraído de los individuos del copépodo *Cyclopoida Thermocyclops decipiens*, extraído por el mismo método al ensayo del PCR. Al igual que en el ensayo con los con individuos Calanoida, el producto de PCR obtenido para el ITS2 de *T. decipiens* (Td) presentó un tamaño entre 500 y 600 pb (Fig. 26).

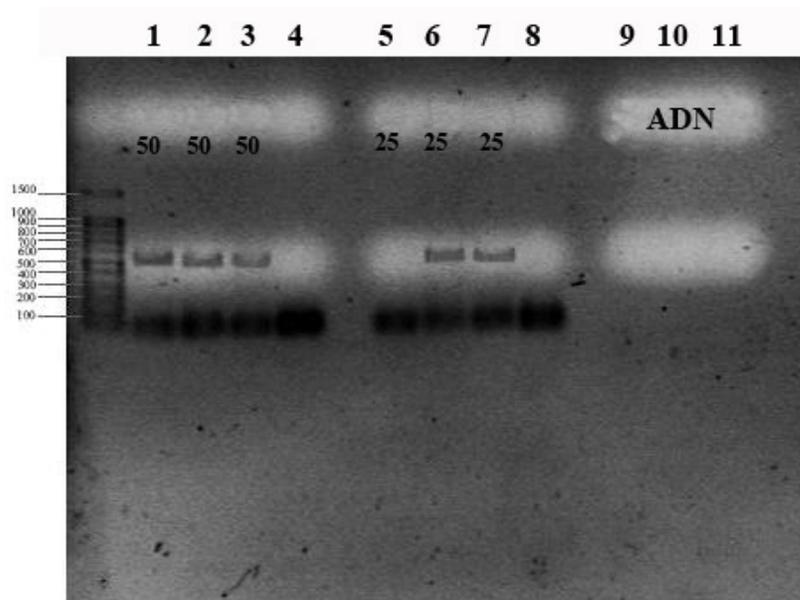


Fig. 26.- Producto de PCR para la región ITS2 del ADN ribosomal de *Thermocyclops decipiens* (Td) y el segundo método de estandarización. Carril 1: marcador de peso molecular 100 Kb DNA Ladder Promega®, Carril 2: producto de PCR para el segundo método de estandarización con individuos Calanoida empleando el estuche comercial SV RNA Isolation de Promega® con un volumen final de 50 μ l, Carril 3: productos de PCR de ITS2 de individuos *T. decipiens* con un volumen final de 50 μ l, Carril 5: producto de PCR de los individuos Calanoida con un volumen final de 25 μ l, Carril 6: PCR resultante de la región ITS2 de *T. decipiens* con un volumen final de reacción de 25 μ l. Carriles 9, 10 y 11: ADN extraídos respectivos de la estandarización con individuos Calanoida y de *Thermocyclops decipiens*. Carriles 4 y 8: controles negativos.

En la figura 26 se observa que los productos de PCR con un volumen final de 50 μ l dieron resultados positivos para la amplificación de la región ITS2 del ADN ribosomal de los copépodos. Cuando el volumen final de la reacción de PCR fue de 25 μ l, se obtuvo un amplificado para los copépodos *Cyclopoida T. decipiens*, pero no se obtuvo producto de

amplificación para los individuos Calanoida para este volumen de reacción de PCR. También se puede notar que al someter a electroforesis al ADN extraído de los copépodos, no se observó material genético en el gel de agarosa, sugiriendo un muy bajo rendimiento.

Una vez obtenidos los productos de PCR para la región ITS2 del ADN ribosomal de *Thermocyclops decipiens*, se procedió a secuenciar los amplificados de PCR. Para ello, previamente se purificaron los productos de PCR, y los cuatro amplificados de *T. decipiens* se mezclaron y se purificaron para obtener así mayor concentración del ADN para la secuenciación. En la figura 27 se muestran los productos purificados.

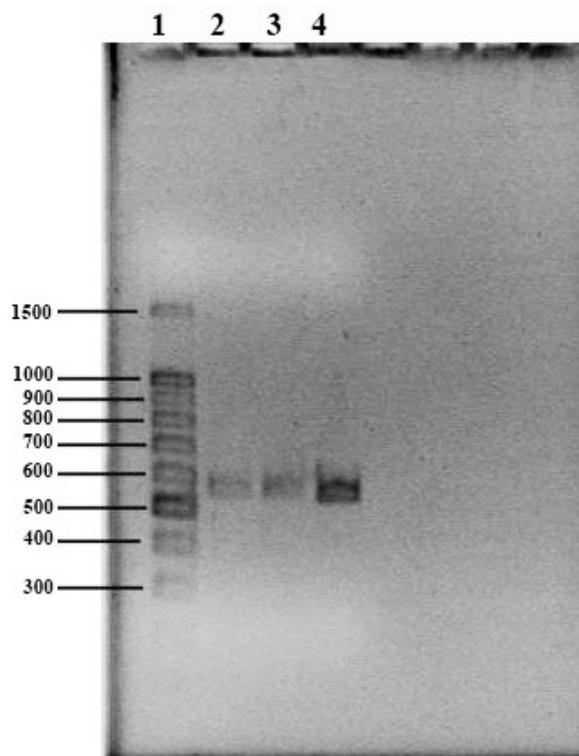


Fig. 27.- Productos de PCR purificados de la región ITS2 de las estandarización con individuos Calanoida y del ADN de *Thermocyclops decipiens*, Carril 1: marcador de peso molecular 100 Kb DNA Ladder Promega®, Carril 2: producto purificado del PCR de la estandarización del método de Towner con individuos Calanoida (E7J), Carril 3: producto purificado del PCR de la estandarización del método de Silva 2003 con individuos Calanoida (ET1) y Carril 4: producto purificado del PCR de *T. decipiens* (TD3) cuyo ADN fue extraído con el método de Towner previamente estandarizado con individuos Calanoida.

En la figura 27 se puede observar la concentración de las bandas de ADN producto del PCR para la región ITS2 del ADN ribosomal de los copépodos. La banda del producto de PCR

purificado de *Thermocyclops decipiens* fue la más concentrada de los tres productos de PCR sometidos al ensayo de secuenciación, teniendo todas estas bandas un tamaño entre 500 y 600 pb.

Los iniciadores ITS3 e ITS10 anclan en las regiones conservadas de 5.8S y 28S respectivamente del copépodos Cyclopoida *Cyclops insignis* (Número de acceso GenBank: EF532821.2) (Fig. 28). El ADN ribosomal de los copépodos posee un tamaño aproximado de 5700 pb, y en la zona de nuestro interés, la región 5.8S posee un tamaño aproximado de 170 pb, ITS2 un tamaño alrededor de 230 pb., y la región 28S un tamaño aproximado de 3500 pb.

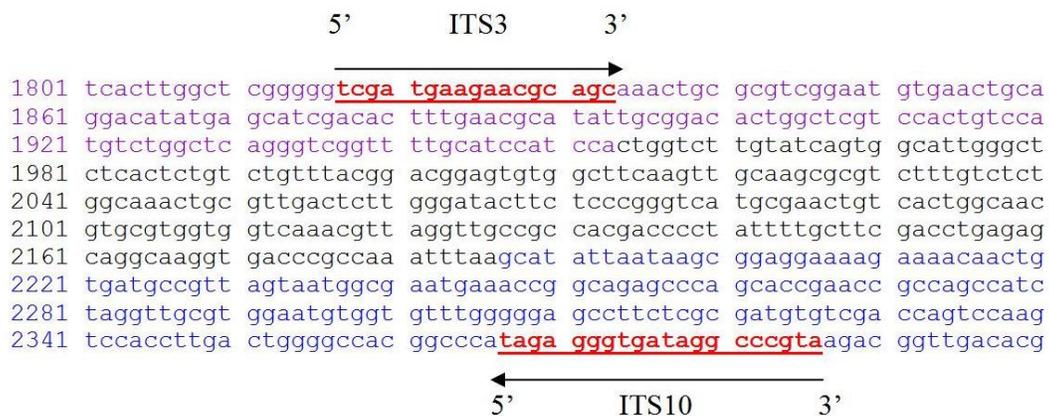


Fig. 28.- Regiones de anclajes de los iniciadores ITS3 e ITS10 para la amplificación de la región ITS2 del ADN ribosomal del copépodo Cyclopoida *Cyclops insignis* (Número de acceso GenBank: EF532821.2) La secuencia en color morado corresponde a la región 5.8S del ADN ribosomal, seguido por la secuencia de ITS2 y por ultimo en azul la secuencia de la región 28S. Las secuencias subrayadas y de color rojo corresponden a las zonas de anclaje de los iniciadores ITS3 e ITS10 respectivamente. Disponible en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (Consulta: 6 de abril de 2010).

En la figura 28 se puede observar que el iniciador sentido ITS3 ancla en la posición 1817 de la región 5.8S del ADN ribosomal, hasta la posición 1833. El primer antisentido ITS10 ancla en la posición 2386 y se extiende hasta la posición 2367 de la región 28S del ADN

ribosomal. En cuanto al ITS2, se amplifica un total alrededor de los 230 pb para *Cyclops insignis*, pero para *T. decipiens* este valor puede cambiar.

Cabe destacar que el análisis de hibridación de los iniciadores se realizó comparando con el ADN ribosomal de copépodo Cyclopoida *Cyclops insignis*, ya que dichos iniciadores anclan en regiones conservadas (5.8S y 28S) entre individuos Cyclopoida de diferentes especies.

4.2.- Secuencia de la región ITS2 del ADN ribosomal de *Thermocyclops decipiens*.

En las figura 29 y 30 se muestran las secuencias de la región ITS2 del ADN ribosomal de *T. decipiens*, tanto la secuencia sentido, amplificada con el iniciador ITS3 (Fig. 29), como la secuencia antisentido amplificada por el iniciador ITS10 (Fig. 30).

```
SEQ TD3_ITS3_E09: 484 bp; ITS2: 284 bp
Composition 91 A; 135 C; 145 G; 113 T; 0 OTHER
Percentage: 18.8% A; 27.9% C; 30.0% G; 23.3% T; 0.0%OTHER
Molecular Weight (kDa): ssDNA: 149.56 dsDNA: 298.42
```

ORIGIN

```
1      TATGAGCATC GACACTTTGA ACGCATATTG CGGGCGCTGG CTCGTCCACC GCCCATGTCT
61     GGCTCAGGGT CGGTTTTGCA TCCATCCAAA GTTTTTCTTT GGCATTGGGC TCTCGCTCTG
121    CCTCGGCATA GCGTGGCTTC AAGTTGCGAG CGCGTCTGAC TGTGACGGCT GCTCTGACTC
181    TTGGGCTCGT CCCGGGTCTG GCAAGTCGCG GTCGACGTGT GCTGGGGCAA GTCTCTTGCC
241    CCGGCGACCA CTCATTTTTT GACCTGAGAG CAGGCAAGGT GACCCGCCAA ATTTAAGCAT
301    ATTAATAAGC GGAGGAAAAG AAAACAAC TGATGCCCTT AGTAATGGCG AATGAAACGG
361    GCACAGCCCA GCACCGAACC GCCGGCCTTT GGTCGCGTGG AATGTGGTGT TCGGGGGAGC
421    CTCCTCGCGA CGTTTCTGCC GTTCCAAGTC CACCTTGACT GGGGCCACGG CCCGTAGAGG
481    GTGA
```

Fig. 29. Secuencia sentido de la región ITS2 del ADN ribosomal de *T. decipiens* (azul), amplificada con el iniciador ITS3.

SEQ TD3_ITS10_H09: 474 bp; ITS2: 284 bp
 Composition 107 A; 140 C; 129 G; 98 T; 0 OTHER
 Percentage: 22.6% A; 29.5% C; 27.2% G; 20.7% T; 0.0%OTHER
 Molecular Weight (kDa): ssDNA: 146.18 dsDNA: 292.25

ORIGIN

```

1   GTCGCGAGGA GGCTCCCCG AACACCACAT TCCACGCGAC CAAAGGCCGG CGGTTTCGGTG
61  CTGGGCTGTG CCCGTTTCAT TCGCCATTAC TAAGGGCATC ACAGTTGTTT TCTTTTCCTC
121 CGCTTATTAA TATGCTTAAA TTTGGCGGGT CACCTTGCCT GCTCTCAGGT CGAAAAATGA
181 GTGGTCGCCG GGGCAAGAGA CTTGCCCCAG CACACGTCGA CCGCGACTTG CCAGACCCGG
241 GACGAGCCCA AGAGTCAGAG CAGCCGTCAC AGTCAGACGC GCTCGCAACT TGAAGCCACG
301 CTATGCCGAG GCAGAGCGAG AGCCCAATGC CAAAGAAAAA CTTTGGATGG ATGCAAAACC
361 GACCCTGAGC CAGACATGGG CGGTGGACGA GCCAGCGCCC GCAATATGCG TTCAAAGTGT
421 CGATGCTCAT ATGTCCTGCA GTTCACATTC CGACGCGCAG TTTGCTGCGT TCTT
  
```

Fig. 30. Secuencia antisentido de la región ITS2 del ADN ribosomal de *T. decipiens* (azul), amplificada con el iniciador ITS10.

La región de ITS2 para el copépodo estudiado posee un tamaño de 284 pares de bases (Fig. 33), esto se pudo constatar al alinear la secuencia obtenida (Td) con la secuencia obtenida en Brasil para la misma especie, cuya secuencia está disponible en la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) bajo el código de GenBank: EF114367.1 (Fig. 31).

SEQ Gen Bank:EF114367.1, *Thermocyclops decipiens*, 305 bp. ITS2:284bp

```

1   CGACACTTTG AACGCATATT GCGGGCGCTG GCTCGTCCAC CGCCCATGTC TGGCTCAGGG
61  TCGGTTTTGC ATCCATCCAA AGTTTTTCTT TGGCATTGGG CTCTCGCTCT GCCTCGGCAT
121 AGCGTGGCTT CAAGTTGCGA GCGCGTCTGA CTGTGACGGC TGCTCTGACT CTTGGGCTCG
181 TCCCGGGTCT GGCAAGTCGC GGTGACGCTG TGCTGGGGCA AGTCTCTTGC CCCGGCGACC
241 ACTCATTTTT CGACCTGAGA GCAGGCAAGG TGACCCGCCA AATTTAAGCA TATTAATAAG
301 CGGAG
  
```

Fig. 31. Secuencia sentido de la región ITS2 del ADN ribosomal de *T. decipiens* (azul) obtenida en los estudios realizados en Brasil por Silva, 2003. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Consulta: 13 de abril de 2010)

La figura 32 muestra las secuencias obtenidas de *Thermocyclops decipiens* en Brasil y en Venezuela, las cuales alinearon en un 100%, lo cual indica que se mantiene la secuencia del espaciador interno transcrito en individuos de la misma especie, aun cuando esté en zonas geográficas distintas.

ef114367.1	NNNGNNNANNNNTNNNNNCNNNNNCNNNNNNNTNNNCGA	40
TD3_ITS3_E09TATGAGCATCGA	12
Consensus	cga	
ef114367.1	CACTTTGAACGCATATTGCGGGCGCTGGCTCGTCCACCGC	80
TD3_ITS3_E09	CACTTTGAACGCATATTGCGGGCGCTGGCTCGTCCACCGC	52
Consensus	cactttgaacgcataattgcgggcgctggctcgtcaccgc	
ef114367.1	CCATGTCTGGCTCAGGGTCGGTTTTGCATCCATCCAAAGT	120
TD3_ITS3_E09	CCATGTCTGGCTCAGGGTCGGTTTTGCATCCATCCAAAGT	92
Consensus	ccatgtctggctcagggtcggTTTTGCATCCATCCAAAGT	
ef114367.1	TTTCTTTGGCATTGGGCTCTCGCTCTGCCCTCGGCATAGC	160
TD3_ITS3_E09	TTTCTTTGGCATTGGGCTCTCGCTCTGCCCTCGGCATAGC	132
Consensus	tttctttggcattgggctctcgctctgctctgctcggcatagc	
ef114367.1	GTGGCTTCAAGTTGCGAGCGCGTCTGACTGTGACGGCTGC	200
TD3_ITS3_E09	GTGGCTTCAAGTTGCGAGCGCGTCTGACTGTGACGGCTGC	172
Consensus	gtggcttcaagttgcgagcgcgctctgactgtgacggctgc	
ef114367.1	TCTGACTCTTGGGCTCGTCCC GGCTGGCAAGTCGCGGT	240
TD3_ITS3_E09	TCTGACTCTTGGGCTCGTCCC GGCTGGCAAGTCGCGGT	212
Consensus	tctgactcttgggctcgTCCC GGCTGGCAAGTCGCGGT	
ef114367.1	CGACGTGTGCTGGGGCAAGTCTCTTGCCCCGGCGACCACT	280
TD3_ITS3_E09	CGACGTGTGCTGGGGCAAGTCTCTTGCCCCGGCGACCACT	252
Consensus	cgacgtgtgctggggcaagtctctTGCCCCGGCGACCACT	
ef114367.1	CATTTTTCGACCTGAGAGCAGGCAAGGTGACCCGCCAAAT	320
TD3_ITS3_E09	CATTTTTCGACCTGAGAGCAGGCAAGGTGACCCGCCAAAT	292
Consensus	catttttcgacctgagagcaggcaaggtgacccgccaaat	
ef114367.1	TTAAGCATATTAATAAGCGGAG.....	342
TD3_ITS3_E09	TTAAGCATATTAATAAGCGGAGGAAAAGAAAACAACCTGTG	332
Consensus	ttaagcatattaataagcggag	

Fig. 32. Alineación de las secuencias de ITS2 de la especie *T. decipiens* extraído en Brasil (ef114367.1) y la extraída en Venezuela (TD3_ITS3_E09), donde las flechas indican en inicio y el final de la secuencia ITS2.

En la figura 33 se muestra la secuencia completa doble cadena del rADN de *Thermocyclops decipiens*, que corresponde al ensamblaje de las secuencias TD3_ITS3 y TD3_ITS10, junto con las regiones donde anclaron los iniciadores ITS3 e ITS10 respectivamente. Se obtuvo un producto de PCR de un tamaño total de 543 pb. La secuencia 5.8S amplificada fue de 68 pb, ITS2 tiene un tamaño de 284 pb y la secuencia obtenida de 28S un tamaño de 191 pb.

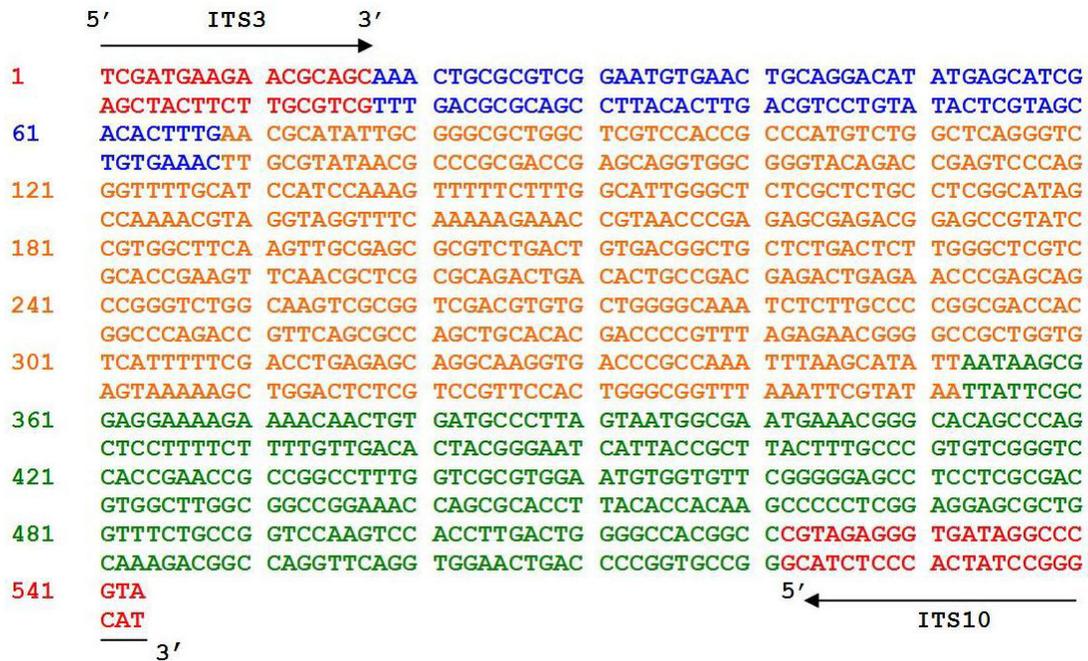


Fig. 33. Secuencia completa doble cadena del rADN de *Thermocyclops decipiens*. Las secuencias en azul corresponden a la región 5.8S del rADN del copépodo (68 pb), las secuencias en anaranjados corresponden a la región ITS2 (284 pb) y las secuencias en verde a la región 28S (191 pb). En rojo se muestran las zonas donde anclaron los iniciadores ITS3 e ITS10 en la región 5.8S y 28S respectivamente.

En cuanto a las secuencias del rADN de los individuos Calanoida utilizados en los métodos de estandarización, la muestra E7J no arrojó secuencia de la región ITS2, mientras que de la muestra ET1 sí se obtuvo una secuencia del rADN de este copépodo. En la figura 34 se muestra la alineación de las secuencias de *T. decipiens* y del copépodo Calanoida ET1.

Como puede observarse, las secuencias correspondientes a las regiones 5.8S y 28S alinean en un 100% por ser secuencias conservadas entre individuos de diferentes especies. En cambio, las secuencias de la región ITS2 son diferentes entre el copépodo Calanoida y Cyclopoida, teniendo una identidad del 32%, esto se debe a que la región ITS2 varía entre individuos de diferentes especies, corroborando la utilidad del análisis de esta secuencia en la identificación a nivel de especies de organismos zooplanctónicos empleando técnicas moleculares.

et1	.ATGAGCATCGACACTTGAACGCATATTGCGGACATGTG	39
TD3_ITS3_E09	TATGAGCATCGACACTTGAACGCATATTGCGGGCGCTGG	40
Consensus	atgagcatcgacactttgaacgcataattgogg c g	
et1	CTTGTTCATGTCCATGTTGGGTCAGGGTCGGTTGAACA	79
TD3_ITS3_E09	CTCGTCCACCGCCATGTCGGCTCAGGGTCGGTTTTCGA	80
Consensus	ct gt g ccatgt tgg tcagggtcggtt ca	
et1	TCCATCAGCAATGACTTGCTTGCTATGGCTGTCCCGCTC	119
TD3_ITS3_E09	TCCATCCAAAGTTTTTCITGGCATTGGCTCTCGCTCTG	120
Consensus	tccatc a t t tg at gg c ct	
et1	CCTAACGGGAAGTGGTGGCTCAAGTTG.ACTTGTGCAG	158
TD3_ITS3_E09	CCTC...GGCATAGCGTGGCTTCAAGTTGCGAGCGCTCT	157
Consensus	cct gg a g gt gc tcaagttg g g	
et1	TGCTCTGCCGAAAGACTCTTGGGTCTGTA AAAAGCCTGGGT	198
TD3_ITS3_E09	GACTGTGACGGCTGCTCTGACTCTTGGGCTCGTCCCGGGT	197
Consensus	ct tg cg g t g cc ggg	
et1	CGCAGCAGATAAGCCTGTACGGGGGATCGGCCGTATCAT	238
TD3_ITS3_E09	C.TGGCAAGTCGCGGTCCACGTGTGCTGGGGCAA.ATCTC	235
Consensus	c gca t t acg g g t gg c atc	
et1	GGGATCCGGTCGTACCAATTTTCTCTTTTCGACCTGACAT	278
TD3_ITS3_E09	TTGCCCGGGCG..ACCACTCATT...TTTCGACCTGAGAG	270
Consensus	g cg acca t tt ttogacctga a	
et1	CAAGCAAGACTACCCGCCAATTTAAGCATATTAATAAGC	318
TD3_ITS3_E09	CAGGCAAGGTGACCCGCCAATTTAAGCATATTAATAAGC	310
Consensus	ca gcaag accgcc aatttaagcatattaataagc	
et1	GGAGGAAAAGAAAACAACCTGTGATGCCCTTAGTAATGGCG	358
TD3_ITS3_E09	GGAGGAAAAGAAAACAACCTGTGATGCCCTTAGTAATGGCG	350
Consensus	ggaggaaaagaaaacaactgtgatgcccttagtaatggcg	
et1	AATGAAACGGGCACAGCCAGCACCGAACCGCCGGCCTTT	398
TD3_ITS3_E09	AATGAAACGGGCACAGCCAGCACCGAACCGCCGGCCTTT	390
Consensus	aatgaaacgggcacagccagcaccgaaccgccggccttt	
et1	GGTCGCGTGGAATGTGGIGTTCGGGGGAGCCTCCTCGCGA	438
TD3_ITS3_E09	GGTCGCGTGGAATGTGGIGTTCGGGGGAGCCTCCTCGCGA	430
Consensus	ggtcgcgtggaatgtggtgttcgggggagcctcctcgoga	
et1	CGTTTCTGCCGGTCCAAGTCCACCTTGACTGGGGCCACGG	478
TD3_ITS3_E09	CGTTTCTGCCGGTCCAAGTCCACCTTGACTGGGGCCACGG	470
Consensus	cqtttctgccqgtccaagtccaccttgactggggccacqg	

Fig. 34. Alineación de las secuencias del rADN de los copépodos *T. decipiens* (TD3) y el copépodo Calanoida utilizado en las estandarizaciones (ET1). Las flechas indican en inicio y final de la región ITS2 de cada copépodo.

DISCUSIÓN

El cuerpo de agua del lago artificial del Círculo Militar (DC) puede catalogarse como un lago somero, ya que su profundidad media es menor a los 3 m (Scheffer, 2004). Este tipo de lagos se caracteriza por su mezcla frecuente de la columna de agua, por la alta transparencia de sus aguas (en ambientes sin exceso de nutrientes) y por la densa vegetación sumergida. Debido a que existen pocos estudios de lagos someros en Venezuela, algunas de las comparaciones se harán en relación con otros cuerpos de agua en los que sí existen estudios previos (lagos y embalses), pero siempre dejando en claro que la dinámica de los lagos someros, y en especial la del lago artificial estudiado, también puede estar supeditada a perturbaciones externas generadas por el manejo que de estos cuerpos de agua se realiza, como por ejemplo el flujo de agua de manera irregular desde tuberías, todo lo cual debe generar condiciones de tensión sobre las comunidades biológicas, particularmente la del zooplancton.

Debido a que el lago del Círculo Militar es un lago somero, por su escasa profundidad no estratifica térmicamente de manera estable, lo que les da un carácter polimíctico (Echaniz y col., 2008). Esto le confiere en términos generales, cierta homogeneidad a la columna de agua.

El lago del Círculo Militar no presentó estratificación térmica, excepto el 9 de Junio y el 9 de Julio donde se observó una clara estratificación, pero por lo somero del lago estas estratificaciones térmicas no permanecen por largos periodos de tiempo, por lo que se puede clasificar el lago como polimíctico (Lewis, 1983). Además en todo el periodo de estudio, los análisis de campo fueron realizados en horas de la mañana excepto en estas fechas, cuyos análisis se realizaron en horas del mediodía, cuando la radiación solar fue mayor y por ende la temperatura en la superficie del agua fue mayor que en el resto de los muestreos, lo cual permitió registrar las mayores diferencias de la temperatura entre la superficie y el fondo del

lago, sin embargo, por lo somero del lago, esta estratificación debió ser efímera. En el resto del muestreo se registró una homogeneidad relativa en cuanto a la temperatura en toda la columna de agua, debido a la condición polimíctica y a lo somero del lago, mezclándose continuamente las aguas por acción del viento y por corrientes convectivas causadas por el enfriamiento del agua durante las horas nocturnas, lo cual es propio de sistemas someros (González y col., 2008).

El 25 de junio también se observó que el personal del lago le suministró agua al lago por medio de un conducto cercano a la estación de muestreo, lo cual seguramente contribuyó con la homogenización de la columna de agua.

Otro factor clave en el establecimiento de las condiciones de un ecosistema acuático es la distribución o concentración de oxígeno disuelto. El oxígeno no sólo determina la presencia o ausencia de los organismos, sino que también regula los fenómenos de oxidación-reducción que puedan darse en el sistema (Wetzel, 2001).

El oxígeno llega al agua por difusión de la atmósfera o por fotosíntesis. La difusión del oxígeno en un ecosistema acuático se lleva a cabo por medio de la circulación y movimientos del agua provocados por diferencia de densidad de las capas de agua o por los vientos (Roldán, 1992). La fotosíntesis es la otra fuente de oxígeno, pero este proceso sólo se presenta a la profundidad hasta la cual llega la luz solar, la cual es llamada zona eufótica, que como se observó en los perfiles de transparencia, se extendió por casi toda la columna de agua en el lago del Círculo Militar.

En los lagos tropicales, en la zona eufótica se lleva a cabo una fuerte actividad fotosintética favorecida por las altas temperaturas, lo que usualmente sobresatura esta zona de oxígeno disuelto; en cambio en la zona aufótica el contenido de oxígeno es bajo (Roldán, 1992). Durante el periodo de estudio se presentaron condiciones de hipoxia el 27 de mayo y el 9 de julio en el fondo del lago, debido a la degradación de materia orgánica, cuyo proceso se lleva

a cabo agotando rápidamente el oxígeno disponible. En estratos superficiales del lago, se registraron las mayores concentraciones de oxígeno disuelto debido al proceso de fotosíntesis del fitoplancton y de las plantas sumergidas en el lago que liberan oxígeno al sistema. A medida que aumentó la profundidad se disminuyó la concentración de oxígeno disuelto en el agua, disminuyendo abruptamente a partir de los dos metros de profundidad. Esto también se observó el 25 de junio cuando la concentración de oxígeno disuelto fue uniforme hasta los dos metros de profundidad, a partir de la cual disminuyó por los procesos de respiración y oxidación de materia orgánica (Mendoza, 1999).

A pesar de la alta transparencia del agua, que permitiría suponer que en toda la columna de agua se pueden efectuar los procesos fotosintéticos, la densa cobertura de la vegetación sumergida limitó la penetración de la luz a partir de los 2 m de profundidad, lo que causó la disminución abrupta en las concentraciones de oxígeno disuelto ya descritas.

El pH fue siempre mayor en los estratos superficiales durante el periodo de estudio, probablemente debido a la actividad fotosintética del fitoplancton y de las plantas sumergidas *Chara* sp y *Elodea* sp. En el fondo del lago, los valores de pH fueron menores que en la superficie lo cual pudo deberse al predominio de los procesos de respiración y descomposición de materia orgánica.

La transparencia media registrada del lago fue de $3,25 \pm 0,3$ m lo cual indica una baja cantidad de materiales sólidos en suspensión (seston). Esto se debe a que la transparencia del agua depende de la cantidad de materia orgánica e inorgánica que se encuentra en el cuerpo de agua, que a su vez determinan tanto la penetración de la luz como el grado de atenuación en la columna de agua. Esta alta transparencia del agua puede deberse al efecto de la vegetación sumergida de *Chara* sp. y *Elodea* sp. que contribuyen a una mayor transparencia del agua debido a diversos mecanismos relacionados con el papel de la vegetación acuática, absorbiendo nutrientes de agua y del sedimento (Ozimek y col., 1993) y

además actúan como refugio para el zooplancton de gran tamaño (Meerhoff y Mazzeo, 2004).

Los sólidos totales disueltos en un cuerpo de agua se miden por medio de la conductividad eléctrica. A través de esta medida se puede conocer la magnitud de la concentración iónica, por lo tanto se correlaciona con la salinidad. Los iones que influyen más en la conductividad son los llamados macronutrientes como el calcio, magnesio, potasio, sodio, carbonatos, cloruros y sulfatos (Roldán, 1992).

La conductividad fue generalmente mayor en los estratos profundos indicando una mayor concentración de sólidos disueltos en el fondo del lago. La conductividad media registrada durante el periodo de estudio para el lago fue de $373 \pm 15 \mu\text{S/cm}$. De esta forma, el lago puede clasificarse como de baja salinidad según el criterio de Serruya y Pollinger (1983) ya que su conductividad eléctrica fue menor a $500 \mu\text{S/cm}$.

La biomasa del fitoplancton estimada como concentración de clorofila-*a*, en la mayoría de los casos, fue mayor en los estratos subsuperficiales o profundos durante los periodos de muestreo, lo cual pudo ser indicativo de la fotoinhibición que ocurre en los estratos superficiales por la alta insolación y la alta transparencia del agua (Wetzel, 2001). En los casos en que los mayores valores de clorofila-*a* se registraron en los estratos superficiales, estos coincidieron con las condiciones de alta nubosidad, las cuales atenúan el paso de la radiación solar (Welch, 1980). La correlación negativa y significativa ($p < 0,05$) entre la concentración de clorofila-*a* y la transparencia del agua ($r = - 0,89$) parece confirmar esta aseveración.

Las diferencias en las concentraciones de clorofila-*a* encontradas a través del periodo de estudio pudieran deberse a que, en muchos lagos someros, tanto las partículas inorgánicas del sedimento y las células algales sufren un ciclo rápido de sedimentación y resuspensión (Scheffer, 2004). A veces, la resuspensión y el aumento de la turbidez de las aguas es debida

al oleaje, mientras que en otros casos es debida a la actividad de los peces. En el caso del sistema artificial bajo estudio, también el bombeo de agua pudiera haber resultado en un efecto importante de resuspensión de sedimentos, nutrientes y fitoplancton.

Con base a las características ambientales y al patrón de variaciones temporales descritas, se lograron establecer relaciones en cuanto al grado de asociación de las variables ambientales y las biológicas, que permitieron inferir patrones ecológicos de la comunidad de zooplancton del lago del Círculo Militar.

La composición de zooplancton estuvo dominada por los copépodos y los rotíferos, estos últimos dominaron en el lago durante el mes de mayo cuando se registraron las mayores concentraciones de oxígeno disuelto, lo que confirmaría la dependencia de este grupo del oxígeno disuelto (Infante, 1988). En el lago del Círculo Militar, las mayores abundancias de zooplancton en los estratos superficiales tal vez por la posible presencia de alimento, lo cual puede observarse en otros cuerpos de agua de Venezuela, como en el caso del embalse de Tierra Blanca (Gavidia, 2004).

En lo que concierne a los copépodos, se puede afirmar que estos parecieron reproducirse durante todo el periodo de estudio, a juzgar por la presencia de nauplios durante todo el estudio. Los nauplios de Calanoida fueron más abundantes en el periodo de estudio excepto en mayo, cuando abundaron los nauplios de Cyclopoida. La dominancia de los nauplios podría atribuirse al estrés físico o a la mortalidad elevada en los sucesivos estadios de desarrollo y posiblemente asociada a una depredación selectiva (Castillo, 1991; Carrillo, 2001).

La mayor proporción de copépodos Calanoida, en comparación con los Cyclopoida, tal vez se deba a la condición oligo-mesotrófica del sistema, de acuerdo con la relación de Calanoida / Cyclopoida – Cladocera que se usa como un indicador de la calidad de agua. Esta relación

en el lago del Círculo Militar fue de 1,55, indicando condiciones oligo-mesotróficas (Dussart y Defaye, 1995).

Varios autores declaran que el zooplancton de sistemas oligotróficos y oligo-mesotróficos responden de manera directa a las variaciones del fitoplancton (Gliwicz, 1969; Infante, 1988). Ejemplos de esta relación fueron detectados por González (2002) en el embalse oligotrófico Agua Fría (Edo. Miranda), en el que las variaciones del zooplancton siguieron, con un cierto desfase debido a sus tasas más lentas de crecimiento, a las variaciones del fitoplancton. Gavidia (2004), también detectó una respuesta relativamente inmediata a las variaciones en la biomasa del fitoplancton en la producción de nauplios y de copepoditos del embalse Tierra Blanca. Sin embargo, en el lago del Círculo Militar no se detectó una correlación significativa entre la biomasa del fitoplancton y la abundancia del zooplancton ($r = 0,29$). Por el contrario, se notó que la abundancia del zooplancton presentó su menor valor durante julio, mes en el que se inició la temporada de lluvias (Servicio de Meteorología de la Aviación, 2009) en la región en la que se encuentra ubicado el sistema bajo estudio (ciudad de Caracas), por lo que pareciera que la comunidad del zooplancton en el lago artificial del Círculo Militar pareció depender más de las variaciones abióticas más que de las bióticas. Esto también ha sido registrado en los embalses La Mariposa, Distrito Capital (Carrillo, 2001) y Clavellinos, Edo. Sucre (Merayo, 2007).

No se descarta que el manejo que se hace de este cuerpo de agua también afecte la dinámica del zooplancton. Ya se ha mencionado que en uno de los muestreos se notó que el lago era llenado con agua proveniente desde una tubería, lo cual, según información recibida, es una practica rutinaria en este lago artificial. Al respecto, Rocha y colaboradores (1999) comentan que las variaciones de volumen en los cuerpos de agua pueden afectar la abundancia y la producción de la comunidad planctónica, ya que generan cambios importantes en las condiciones físicas, químicas y biológicas de los ecosistemas dulceacuícolas.

En los lagos someros, el zooplancton de talla grande puede usar la vegetación como refugio contra la depredación de los peces durante las horas diurnas (Scheffer, 2004). En horas diurnas, el zooplancton puede ser encontrado cerca del lecho de vegetación sumergida, más que penetrar en ella. Sin embargo, este autor también señala que no es del todo claro que la vegetación sumergida proteja al zooplancton de la depredación de los peces, y que varios experimentos han demostrado que la efectividad del refugio depende, entre otras cosas, de las especies de peces presentes y de la densidad de la vegetación.

En el caso del zooplancton en el lago del Círculo Militar, la mayor abundancia del zooplancton siempre se registró en los niveles superficiales más que en aquellos cercanos a la vegetación sumergida, lo que pudiera explicarse por la ausencia o por un efecto débil de la depredación de los peces sobre esta comunidad, según lo registrado por Mavutti y Litterick (1981) en el lago tropical Naivasha (profundidad media de 6 metros).

Así, en el lago del Círculo Militar, considerando la falta de correlación entre la clorofila-*a* y la abundancia del zooplancton, además de la mayor abundancia zooplanctónica cerca de la superficie del agua por causa de un efecto débil de la depredación (que pudiera ser ejercida por los poecílicos – gupis – observados en el cuerpo de agua), puede reforzarse la idea de que la comunidad de animales planctónicos estuvo controlada más por las condiciones abióticas que por los factores bióticos.

El índice de diversidad incluye la riqueza de especies y considera cuán equitativa está distribuida la abundancia (equidad) de cada una de ellas (Shannon y Weaver, 1949). Así, tanto la presencia de las especies como de sus abundancias relativas influyeron en los valores del índice de Shannon. Así, normalmente, el índice de diversidad presentó valores que pudieran considerarse relativamente bajos, pues los copépodos (máximo de 3 especies presentes) mostraron abundancias relativas elevadas, con valores que llegaron a alcanzar el 67% del total; en mayo, cuando dominaron los rotíferos (grupo con mayor número de

especies en el lago), los valores del índice de diversidad resultaron los mayores del periodo de estudio. Esta misma tendencia se observó para el índice de equidad.

Los índices de diversidad y de equidad aplicados al zooplancton parecen concordar con los lo expresado anteriormente. Los cambios conjuntos de las condiciones ambientales, parecieron reflejarse en las variaciones en los valores de los índices aplicados a la comunidad del zooplancton.

El coeficiente de concordancia de Kendall, a pesar de ser un valor relativamente bajo, mostró que los rasgos de abundancia de las especies del zooplancton no difirieron significativamente a lo largo del periodo de estudio. Así, la estructura comunitaria fue parecida durante el periodo 30 de abril al 9 de julio, aunque debe hacerse la acotación de que este coeficiente no toma en cuenta los valores de abundancia, sino sólo los rangos de abundancia.

El ACP, por su parte, mostró que las variaciones observadas de las variables estudiadas siguieron una secuencia estacional, la cual fue seguida, por lo tanto, por la comunidad del zooplancton. Esta comunidad pareció ser controlada, entonces, por el ambiente físico y químico.

En el análisis taxonómico de especies de zooplancton, los caracteres morfológicos pueden ser engañosos para determinar una especie o para distinguirlas, ya que han sido encontradas especies morfológicamente idénticas, pero que poseen complementos cromosómicos divergentes, o viceversa (Wyngaard y Chinnappa, 1982).

En relación al copépodo Cyclopoida, el conocimiento de la diversidad de esta especie en cuerpos de agua dulce requiere un estudio cuidadoso de la identificación de estos organismos a nivel de especie, por ser estas entidades las que a nivel poblacional definen las características de un ambiente acuático (Silva, 2003).

A nivel de especie, varios estudios taxonómicos previos arrojaron identificaciones de especies erróneas, entre ellos las especies de *Mesocyclops* sp. y de *Thermocyclops* sp. debido

a las semejanzas morfológicas que poseen los individuos pertenecientes a cada género (Silva, 2003).

Igualmente, entre las especies de *Thermocyclops* sp. hay semejanzas aún mayores, de manera que la diferenciación morfológica para definir las a veces resultan muy sutiles. Por ejemplo, Fernando (2002), presenta descripciones muy parecidas para las especies *Thermocyclops crassus* y *Thermocyclops decipiens*, las cuales son diferenciadas por este autor por una pequeña curvatura en la espina interna del endopodito del cuarto par de patas en *T. decipiens*; *T. crassus*, según el autor, no presenta dicha curvatura.

Debido a estos hechos, se destaca la importancia del estudio molecular de estas especies de zooplancton para su correcta identificación taxonómica.

Las secuencias obtenidas para el copépodo Cyclopoida *Thermocyclops decipiens* por medio de las técnicas de extracción de ADN y de amplificación de la región del ITS2 del ADN ribosomal de estos individuos, mostraron que estas técnicas pueden ser aplicadas a individuos Cyclopoida. También se obtuvieron resultados óptimos para los individuos de los copépodos Calanoida utilizados en la estandarización de las técnicas moleculares, lo cual demuestra que las mismas pueden ser empleadas en la identificación molecular de diversas especies de copépodos.

Al alinear las secuencias obtenidas de *T. decipiens* en Venezuela y en Brasil se encontró una identidad del 100%, indicando que la secuencia del espaciador ribosomal se mantiene en individuos de la misma especie, aun tomando en cuenta la separación geográfica.

Los resultados obtenidos en la alineación de las secuencias de *T. decipiens*, junto con las secuencias de los Calanoida utilizados en las estandarizaciones, tuvieron una identidad del 50% proveniente solamente de las secuencias pertenecientes a las regiones conservadas 5.8 S y 28 S que se amplifica por el anclaje de los iniciadores. Las diferencias en las secuencias de los espaciadores entre diferentes especies y la total semejanza en las

secuencias provenientes de individuos de la misma especie confirman que estas técnicas moleculares son una herramienta útil en la taxonomía del zooplancton.

De esta manera, las técnicas de biología molecular ofrecen una nueva y poderosa herramienta en la taxonomía de los copépodos, independientemente de las características morfológicas cambiantes, formándose así una nueva senda en los estudios evolutivos y ecológicos de microcrustáceos presentes en los cuerpos de agua venezolanos.

CONCLUSIONES

- * El lago artificial del Círculo Militar (DC) por ser un sistema somero, pudo clasificarse como polimíctico. La columna de agua estuvo oxigenada, aunque se detectaron condiciones de hipoxía en el estrato profundo.
- * Las aguas mantuvieron condiciones alcalinas durante todo el periodo de estudio y de acuerdo con los valores de conductividad, se clasificó como de baja salinidad.
- * La biomasa del fitoplancton presentó valores de bajos a moderados.
- * Se identificaron 13 taxones, siendo los rotíferos el grupo más diverso representado por 5 especies, seguido por los copépodos con 3 especies, los cladóceros con 2 y, por último, los protozoarios, ostrácodos y dípteros representados por una especie cada uno.
- * La abundancia del zooplancton fue moderada durante el periodo de estudio. Se encontró mayor abundancia de organismos entre 0 y 1 metro de profundidad, siendo los copépodos y rotíferos los que presentaron las mayores abundancias.
- * El copépodo Cyclopoida *Mesocyclops* sp. fue el más abundante de este orden, , del grupo de los rotíferos dominó *Keratella* sp., mientras que *Diaphanosoma spinulosum* fue el cladóceros las abundante en todo el periodo de estudio
- * Los estadios juveniles (copepoditos y nauplios) presentaron las mayores abundancias dentro del grupo de los copépodos.
- * La comunidad del zooplancton pareció estar controlada por las variaciones físicas y químicas más que por la disponibilidad del alimento.
- * Con el método estandarizado de Towner se obtuvieron resultados positivos para la extracción de ADN de *Thermocyclops decipiens* y de ejemplares de copépodos Calanoida.

- * El producto de amplificación por la técnica de PCR fue de 543 pb.
- * La secuencia de la región ITS2 de *T. decipiens* tiene un tamaño de 284 pb.
- * Las secuencias de la región ITS2 de *T. decipiens* colectados del lago del Círculo Militar y las obtenidas a partir de ejemplares de embalses de Brasil alinearon en un 100%.
- * Las secuencias de la región ITS2 de *T. decipiens* y de los copéodos calanoida presentaron una identidad del 32%
- * Las técnicas de extracción de ADN y de PCR empleadas fueron eficientes para la identificación taxonómica de copéodos.

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, J. 2002. Especiación recombinacional y relaciones filogenéticas en *Satureja macrostema* var. *laevigata*. Tesis doctoral. Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México.
- Altschul, S., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl. Acid. Res.* **25**: 3389 – 3402.
- Andrade, A., López, C. 2005. Predatory interactions between *Thermocyclops decipiens* Kiefer (Copepoda: Cyclopoida) and two small cladocerans: behavior and prey post-encounter vulnerability. *Ann. Limnol.* **41**: 153 – 159.
- Blanco, Y. 2003. Distribución espacial del zooplancton en tres estaciones del Embalse Agua Fría (Estado Mérida). Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Braga, E., Zardoya, R., Meyer, A., Yen, J. 1999. Mitochondrial and nuclear rRNA based copepod phylogeny with emphasis on the Euchaetidae (Calanoida). *Marine Biology.* **133**: 79 – 90.
- Buckler, E., Holtsford, T. 1996. *Zea* systematics: ribosomal ITS evidence. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 612 – 622.

- Carrillo, V. 2001. Distribución espacial del zooplancton en el embalse La Mariposa (Distrito Capital) de julio a diciembre 2000. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

- Castillo, M. 1991. Estudio de la distribución del zooplancton en el embalse de Lagartijo, Edo. Miranda. Tesis de Licenciatura. Universidad Simon Bolivar. Caracas Venezuela.

- Drouin, G. 2006. Chromatin diminution in the copepod *Mesocyclops edax*: diminution of tandemly repeated DNA families from somatic cells. *Genome*. **49**: 657 – 665.

- Dussart, B., Dafaye, D., 1995. Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the World: Introduction to the Copepoda. Academic, Londres, Inglaterra. **277 p.**

- Echaniz, S., Vignatti, A., Bunino, P. 2008. El zooplancton de un lago somero hipereutrífico de la región central de Argentina: cambios después de una década. *Biota Neotropica*. **8**: 63-71.

- Fernanado, C. 2002. A guide to tropical freshwater zooplankton identification: Ecology and impact on fisheries. Backhuys Publishers. Leiden, Ther Netherlands. **291 pp.**

- Gavidia, J. 2004. Variaciones en la abundancia y en la biomasa del zooplancton en dos localidades del embalse Tierra Blanca, Estado Guarico. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

- Gaviria, S., Aranguren N. 2007. Especies de vida libre de la subclase Copepoda (Arthropoda, Crustacea) en aguas continentales de Colombia. *Biota Colombiana*. **8**: 53 – 68.

- Gliwicz, Z. 1969. Studies on the feeding of pelagic zooplankton in lakes with varying trophy. *Ekol. Pol.* **17**: 663-708

- González, E. 2002. Caracterización limnológica de los embalses Agua Fría (Estado Miranda) y Tierra Blanca (Estado Guarico). Proyecto S1-98001361, Etapa I. Caracterización limnológica del embalse Agua Fría (Parque Nacional Macarao, Estado Miranda). Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas Venezuela. **83 pp.**

- González, E., Ortaz, M., Matos, M., Mendoza, J., Peña, C., Carrillo, V. 2002. Zooplancton de dos embalses neotropicales con distintos estados tróficos. *Interciencia*. **27**: 551 – 558.

- González, E., Álvarez M., Barrero, M., Finol, H. 2008. Limnología y efecto de los impactos sobre los peces de interés comercial del embalse Suata (Edo. Aragua) y del lago de Valencia (Estados Aragua y Carabobo). Informe técnico Proyecto PG

03.00.6495.2006 CDCH-UCV. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

- Gordon, E., Rodríguez, M., Malaver, N., Fernández, M., Ortaz, M., Molina, C., Morales, L. González, E. 2008. Informe del estudio preliminar sobre las características fisicoquímicas, vegetación y fauna del lago del Círculo Militar. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Grishanin, A., Akif'ev, P. 1999. Interpopulation differentiation within *C. kolensis* and *C. strennus* (Crustacea: Copepoda): evidence from cytogenetic methods. *Hydrobiologia*. **417**: 37 – 42.
- Guimarães, G., Rodrigues, A., Rietzler, A., Maia-Barbosa, P. 2007. *Thermocyclops decipiens* (Kiefer, 1929) (Copepoda, Cyclopoida) as indicator of water quality in the state of Minas Gerais, Brazil. *Braz. Arch. of Bio. and Tech.* **50**: 695 – 705.
- Harper, D., Hammer, O., y Ryan, P. 2001. PAST. Paleontological Statistics software package for education and data analysis. V 2.0. Palaeontologia Electronica. USA.
- Hershkovitz, M., Zimmer, E. 1996. Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences. *Nucl. Acids Res.* **24**: 2857 – 2867.
- Horne, A. Goldman, C. 1994. Limnology. Segunda edición. Mc Graw - Hill. New York, E.U.A. **576 pp**

- Infante, A. 1988. El plancton de las aguas continentales. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Monografía N° 33. Washington DC. **130 pp**

- Leitão, A., Freire, R., Rocha O., Santaella, S. 2006. Zooplankton community composition and abundance of two Brazilian semiarid reservoirs. *Acta Limnol. Bras.* **18**: 451 – 468.

- Lewis, W. 1983. A revised classification of lakes base don mixing. *Can. J. Fish. Aq. Sci.* **40**: 1779 – 1787.

- Li, C., Wilkerson, R. 2007. Intragenomic rDNA ITS2 Variation in the Neotropical *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* Complex (Diptera: Culicidae). *Jour. of Her.* **98**: 51 – 59.

- López, C., Bello, C. 1993. Composición y variaciones estacionales de la comunidad de crustáceos planctónicos en el Embalse Socuy, Venezuela. *Ecotrópicos.* **6**: 30 – 42.

- López, C., Villalobos, M., González, E. 2001. Estudio sobre el zooplancton de los embalses de Venezuela: Estado actual y recomendaciones para futuras investigaciones. *Ciencia.* **9**: 217 – 234.

- Lynnon BioSoft. 2001. DNAMAN para Windows v. 5.2.2.

- Mavuti, K.M.; Litterick, M.R. 1981. Species composition and distribution of zooplankton in a tropical lake, Lake Naivasha, Kenya. *Arch. Hydrobiol.*, **93**: 52-58

- Meerhoff, M., Mazzeo, N. 2004. Importancia de las plantas flotantes libres de gran porte en la conservación y rehabilitación de lagos someros de Sudamérica. *Ecosistemas*. **2**: 1 – 11

- Mendoza, J. 1999. Variaciones en la abundancia del plancton y de las bacterias en el embalse la mariposa (Dtto. Federal, Venezuela). Periodo: noviembre 1998 – mayo 1999. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela

- Merayo, S. 2007. Zooplancton del embalse Clavellinos (Edo. Sucre). Variaciones temporales y espaciales de abundancia y biomasa. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

- National Center for Biotechnology Information [En línea]. [Consultado el 05 de abril del 2010]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

- Nusch, EA., Palme, G. 1975. Biologische Methoden für der Praxis der Gewässeruntersuchung, Bestimmung des Chlorophyll-*a* und Phaeopigment-gehaltes in Oberflächen-wäser. *GWF – Wasser/Abwasser*. **116**: 562 – 565.

- Ozimek, T., Van Dunk, E., Gulat, R. 1993. Growth and nutrient uptake by two species of *Elodea* in experimental conditions and their role in nutrient accumulation. *Hydrobiologia*. **251**: 13 – 18.

- Pielou, E. 1975. Ecological diversity. John Wiley & Sons Inc. New York. USA. **165 pp.**

- Rocha, O., Matsumura-Tundisi, T., Espíndola, E., Roche, K. y Rietzler, A. 1999. Ecological theory applied to reservoir zooplankton. In: Tundisi, J. Straskraba, M. Theoretical reservoir ecology and its applications. Brazilian Academy of Science / International Institute of Ecology, Backhuys Publishers. São Carlos, Brazil. **pp. 457-476.**

- Roldán, G. 1992. Fundamentos de limnología neotropical. Primera edición. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. **529 pp.**

- Saunders, J., Lewis, W. 1988. Composition and seasonality of the zooplankton community of Lake Valencia, Venezuela. *Jour. of Plank. Res.* **10**: 957 – 985.

- Scheffer, M. 2004. Ecology of shallow lakes. Population and Community Biology Series 22. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, **357 pp.**

- Schizas, N., Street, G., Coull, B., Chandler G., Quattro, J. 1997. An efficient DNA extraction method for small metazoans. *Molecular Marine Biology and Biotechnology.* **6**: 381 – 383.

- Serruya, C., Pollingher, U. 1983. Lakes of the warm belt. Cambridge University, Cambridge. **569 pp.**

- Servicio de Meteorología de la Aviación. [En línea]. 2009. [Consultado el 10 de febrero del 2010]. Disponible en: <http://www.meteorologia.mil.ve>

- Shannon, C., Weaver, W. 1949. The mathematical theory of Communications. University Illinois Press. Urbana. **117 pp.**

- Siebeck, O. 1964. Researches of the behavior of planktonic crustaceans in the littoral. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **15**: 746 – 751.

- Siegel, S., Castellan, N. 1995. Estadística no paramétrica aplicada a la conducta. Editorial Trillas. México. 437 pp

- Silva, W. 2003. Diversidade dos Cyclopoida (Copepoda, Crustacea) de água doce do Estado de São Paulo: Taxonomia, Ecologia e Genética. Tesis Doctoral. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, Brasil.

- Silva, W., Matsumura-Tundisi, T. 2005. Taxonomy, ecology, and geographical distribution of the species of the Genus *Thermocyclops* Kiefer, 1927 (Copepoda, Cyclopoida) in São Paulo State, Brazil, with description of a new species. *Braz. J. Biol.* **65**: 521 – 531.

- StatSoft Inc., 2004. STATISTICA para Windows v. 7. Tulsa, <http://www.statsoft.com>

- Welch, E. 1980. Ecological effects of waste water. Cambridge University Press. Cambridge, USA. **337 pp.**

- Wetzel, R. G. 2001. Limnology. Lake and River Ecosystem. Tercera edición. Acad. Press. San Diego, E.U.A.

- Wetzel R. G., Likens. G. E. 2000. Limnological analyses. Tercera edición. Springer. New York. E.U.A.

- Wyngaard, G. A. and C. C. Chinnappa. 1982. General biology and cytology of cycloids. In R. W. Harrison and R. C. Cowden, eds. Developmental Biology of Freshwater Invertebrates. Alan R. Liss, New York. **pp 485 – 533.**

- Yamane, T. 1979. Estadística. Tercera edición. Harper & Row Latinoamericana, Harla S.A. México, **771 pp.**