



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología Marina

PROFESOR PATROCINANTE:

Dr. Kurt Paschke La Manna

Instituto de Acuicultura

**Cambios fisiológicos y bioquímicos durante el desarrollo temprano de
Lithodes santolla (Molina, 1782) (Decapoda: Lithodidae) y *Petrolisthes
laevigatus* (Guérin, 1835) (Decapoda: Porcellanidae): una comparación
dentro del infraorden Anomura**

**Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
Título de Biólogo Marino**

**Eduardo Andrés Surot Navarro
Valdivia - Chile
2006**

Dedicatoria

Dedicada a mis padres que me apoyaron sin descanso durante todo este camino y me incentivaron a seguir adelante.

Agradecimientos

Agradezco al proyecto FONDEF D02I1163 por haber financiado y colaborado en forma importante el desarrollo de mi tesis. Agradezco también al Dr. Paschke por darme las facilidades para realizar mi trabajo y a la Dra. Gebauer por mantener el apoyo constante y ayudarme en los momentos difíciles.

Agradezco a mis padres que me han apoyado en este largo camino, a mis amigos que siempre me brindaron su mano y al equipo LECOFIC especialmente a mis compañeros de innumerables chelas y playa, Ángel, Juan Pablo, Mauricio, Hugo y al humorista de Jorgito que me apoyaron e incentivaron a seguir siempre adelante.

Índice

1. Resumen	1
Abstract	2
2. Introducción	3
2.1. Hipótesis de trabajo	8
2.2. Objetivo(s) general(es)	8
2.3. Objetivos específicos	8
3. Material y métodos	
3.1. Obtención y mantención de hembras	9
3.2. Cultivo larval	11
3.3. Fisiología	
3.3.1. Obtención de muestras	12
3.3.2. Tasa de excreción de amonio	12
3.3.3. Tasa respiratoria	13
3.3.4. Determinación del peso húmedo	13
3.3.5. Determinación del peso seco	14
3.4. Análisis bioquímicos	14
3.4.1. Proteínas	14
3.4.2. Lípidos	15
3.5. Análisis de imágenes	15
3.6. Determinación de estadios embrionarios	16
3.7. Análisis estadístico	17

4. Resultados	
4.1. Desarrollo temprano	
4.1.1. Fisiología	
4.1.1.1. Tasa de respiración	18
4.1.1.2. Tasa de excreción de amonio	21
4.1.1.3. Peso	23
4.1.2. Análisis bioquímicos	
4.1.2.1. Proteínas	26
4.1.2.2. Lípidos	27
4.1.2.3. Relación Lípido: Proteína	29
4.2. Período de ayuno	
4.2.1. Tasa respiratoria	30
4.2.2. Tasa de excreción de amonio	32
4.2.3. Peso	34
4.2.4. Largo y ancho de caparazón	37
4.2.5 Análisis bioquímicos	39
4.3. Tamaño embrionario y larval y mancha ocular	42
5. Discusión	47
Conclusión	56
6. Bibliografía	57

Índice de Figuras

Fig. 1. Área de recolección de hembras de <i>P. laevigatus</i> .	10
Fig. 2. Tasa respiratoria durante el desarrollo temprano de <i>L. santolla</i> y <i>P. laevigatus</i> .	18
Fig. 3. Tasa respiratoria peso-especifica durante el desarrollo temprano de <i>L. santolla</i> y <i>P. laevigatus</i> .	20
Fig.4. Tasa de excreción de amonio durante el desarrollo temprano <i>L. santolla</i> y <i>P. laevigatus</i> .	21
Fig. 5. Tasa de excreción peso- especifica durante el desarrollo temprano de <i>L. santolla</i> y <i>P. laevigatus</i> .	22
Fig.6. Peso húmedo durante el desarrollo temprano de <i>L. santolla</i> y <i>P. laevigatus</i> .	23
Fig. 7. Peso seco de <i>L. santolla</i> y <i>P. laevigatus</i> durante el desarrollo temprano.	24
Fig.8. Contenido de agua de <i>L. santolla</i> y <i>P. laevigatus</i> durante el desarrollo temprano.	25
Fig. 9. Contenido de proteínas totales durante el desarrollo embrionario y larval de <i>L. santolla</i> y <i>P. laevigatus</i> .	26
Fig. 10. Contenido de lípidos totales de <i>L. santolla</i> y <i>P. laevigatus</i> durante el desarrollo embrionario y larval.	27
Fig. 11. Relación lípido:proteína durante el desarrollo temprano de <i>L. santolla</i> y <i>P. laevigatus</i> .	29

Fig. 12. Tasa respiratoria de zoea I de <i>P. laevigatus</i> en presencia y ausencia de alimento.	30
Fig. 13. Tasa respiratoria peso-especifica de zoea I de <i>P. laevigatus</i> en ausencia y presencia de alimento.	31
Fig. 14. Tasa de excreción de amonio de <i>P. laevigatus</i> en ausencia y presencia de alimento.	32
Fig. 15. Tasa de excreción peso-especifica de zoea I de <i>P. laevigatus</i> sometidas a ayuno y presencia de alimento.	33
Fig. 16. Peso húmedo de zoea I de <i>P. laevigatus</i> tus bajo condiciones de ayuno y en presencia de alimento.	34
Fig. 17. Peso seco de zoea I de <i>P. laevigatus</i> en ausencia y presencia de alimento.	35
Fig. 18. Contenido de agua de <i>P. laevigatus</i> bajo condiciones de ausencia y presencia de alimento.	36
Fig. 19. Largo de caparazón de zoea I de <i>P. laevigatus</i> en ausencia y presencia de alimento.	37
Fig. 20. Ancho de caparazón de zoea I de <i>P. laevigatus</i> en ausencia y presencia de alimento.	37
Fig. 21. Contenido de proteínas de zoea I de <i>P. laevigatus</i> durante períodos de ausencia y presencia de alimento.	39
Fig. 22. Contenido de lípidos de zoea I de <i>P. laevigatus</i> en ausencia y presencia de alimento.	39

Fig. 23. Relación lípido: proteína de zoea I de *P. laevigatus* en presencia y ausencia de alimento. 40

Fig. 24. Desarrollo de mancha ocular de *L. santolla* y *P. laevigatus* durante el desarrollo embrionario. 46

Índice de tablas

Tabla 1. Características utilizadas para determinar el estadio de desarrollo embrionario de <i>L. santolla</i> y <i>P. laevigatus</i> .	16
Tabla 2. Diámetros mayor y menor, volumen del huevo de <i>L. santolla</i> durante el desarrollo embrionario.	43
Tabla 3. Diámetros mayor y menor, volumen del huevo de <i>P. laevigatus</i> durante el desarrollo embrionario.	44
Tabla 4. Largo y ancho de caparazón durante el desarrollo larval de <i>L. santolla</i> .	45
Tabla 5. Largo y ancho de caparazón durante el desarrollo larval de <i>P. laevigatus</i> .	45

1. Resumen

El desarrollo embrionario y larval corresponden a fases importantes dentro del ciclo de vida de invertebrados marinos. Estudios relacionados al desarrollo embrionario de crustáceos son escasos y se enfocan principalmente en fecundidad, volumen y rendimiento reproductivo. La fisiología y bioquímica larval se ha estudiado con un poco más de detalle, aunque, el conocimiento de estas fases aún es escaso. El presente estudio analiza el desarrollo temprano de *Lithodes santolla* (Molina, 1782) y *Petrolisthes laevis* (Guérin, 1835) en términos de la fisiología y bioquímica durante el desarrollo, comparando ambas especies respecto al modo de desarrollo presente, planctotrofía (*P. laevis*) y lecitotrofía (*L. santolla*). Durante el desarrollo temprano se presentan diferencias en la fisiología y bioquímica entre *L. santolla* y *P. laevis*. Se observan variaciones fisiológicas y bioquímicas de los primeros días larvales de *P. laevis* respecto al suministro de alimento. Las diferencias observadas entre ambos modos de desarrollo analizados estarían dadas por la disponibilidad de energía que los individuos presentan al momento de la eclosión. Asimismo, períodos prolongados de ayuno producirían daños serios en individuos planctotróficos. Las mayores tasas fisiológicas encontradas para el desarrollo planctotrófico de *P. laevis* indicarían un metabolismo más activo en comparación al desarrollo lecitotrófico de *L. santolla*. Sin embargo las menores tasas fisiológicas observadas para *L. santolla* podrían corresponder a un mecanismo de ahorro de energía. Los resultados sugieren que la disponibilidad de energía que presente un individuo en términos de planctotrofía o lecitotrofía determina las respuestas fisiológicas durante el desarrollo embrionario y larval.

Abstract

The embryonic and larval development are important stages in the cycle of life of marine invertebrates. There aren't many studies about the early embryonic development of crustaceans and if any they are focused mainly fecundity, egg volume and reproductive output. There are some more studies about the larval biochemistry and physiology but the knowledge about these stages is still rare. The present research analyzes further about the development of *Lithodes santolla* (Molina, 1782) and *Petrolisthes laevigatus* (Guérin, 1835). This paper regards to the physiology and biochemistry of the development mode shown in both species, planktotrophy on the one hand and lecithotrophy on the other hand. Noticeable differences can be observed in relation to the physiological and biochemical aspects in both species during the early larval stage of *P. laevigatus*, these differences are given by food supplies. According to the observations made it can be concluded that each sample analyzed is influenced by the amount of energy they have specially at the hatching period. Therefore it can also be said that planktotrophic individuals would be seriously affected if they are left out under long periods of starvation. There are greater physiological rates for planktotrophic development rather than lecithotrophy. This would indicate a more active metabolism for *P. laevigatus* against *L. santolla*. The minor rates observed for *L. santolla* could be considered a sort of mechanism to save energy. On the basis of the data observed it could be suggested that the amount of energy each individual has. In terms its planktotrophy or lecithotrophy determines the physiological answers that individual has during the embryonic and larval stages.

2. Introducción

Los invertebrados marinos presentan una variedad de modos reproductivos y de desarrollo, presentándose desarrollos bentónicos y/o planctónicos en la mayoría de ellos. La morfología y ecología de las fases larvales de invertebrados varía ampliamente, lo cual ha sido estudiado en detalle (Albornoz & Wehrtmann, 1996, Walter & Lesster, 2000, Cuesta & Anger, 2001, Thatje & Lovrich, 2003). Las fases larvales son funcional y estructuralmente distintas a su fase adulta y generalmente ocupan nichos ecológicos distintos.

La importancia de las fases larvales radica en la dispersión que éstas puedan presentar en la columna de agua lo que permite una variación en el flujo génico y en la especiación de una población. A su vez las larvas de invertebrados marinos juegan un rol importante en el meroplancton mediando en los flujos de energía entre los niveles tróficos del ecosistema (Lemos & Phan, 2001).

Los crustáceos decápodos en su mayoría presentan ciclos de vida complejos con modos bifásicos de desarrollo (Anger, 2001). Dentro de los modos de desarrollo presentes para este modo bifásico se pueden encontrar diversas categorías. La primera categorización establecida fue realizada por Thorson en la década de los 50, refiriéndose al tipo de alimentación presente durante la vida larval. Así se encuentran larvas planctotróficas, las cuales deben ser capaces de alimentarse en el plancton para poder continuar su desarrollo hacia la metamorfosis. La segunda categoría se refiere a

larvas que no requieren de suministro externo de alimento para concluir su desarrollo, este modo es denominado como lecitotrofía, y está basado en reservas vitelogénicas entregadas por la hembra al huevo. Se piensa que ambos tipos de desarrollo son parte de una dicotomía evolutiva del desarrollo, producto de una limitación de alimento (para referencias ver Diesel *et al.*, 2000). Igualmente se ha establecido que especies de latitudes altas presentan mayor grado de lecitotrofía (Thorson, 1950). Este mismo patrón estaría dado por la profundidad (para referencias ver Anger, 2001 y Collin, 2003). Se presume que larvas planctotróficas se desarrollan de huevos pequeños pero numerosos los cuales poseen reservas únicamente para completar el desarrollo embrionario. Por otra parte, las larvas lecitotróficas serían precedidas de huevos grandes y escasos (Levin *et al.*, 1987, McEdward, 1997).

A pesar del rol que cumplen las fases larvales de crustáceos decápodos en aspectos de reclutamiento, dinámica poblacional y ecología entre otros, el conocimiento del desarrollo larval de crustáceos es escaso comparado con lo estudiado sobre juveniles y adultos (Anger, 2001). La mayoría de las publicaciones se encuentra enfocada en aspectos ecológicos y morfológicos encontrándose relativamente pocos estudios sobre fisiología y bioquímica del desarrollo temprano. El desarrollo de técnicas más avanzadas ha permitido el estudio de diversos parámetros fisiológicos y bioquímicos durante el desarrollo larval de crustáceos decápodos (consumo de oxígeno, osmolalidad de la hemolinfa, composición elemental, composición química) (Anger, 2001). La determinación de estos parámetros indica el nivel nutricional y el estado en el

que se encuentran los individuos durante su desarrollo, dando cuenta del metabolismo presente.

El desarrollo embrionario es una parte fundamental de lo anteriormente descrito, ya que es la base de las fases larvales. Sin embargo, no se han realizado estudios enfocados a conocer costos energéticos asociados con el desarrollo. La mayoría de los estudios realizados sobre huevos de crustáceos decápodos se centran en fecundidad, volumen y rendimiento reproductivo, entre otros (Lardies & Wehrtmann, 1996, López *et al.*, 1997, Hernáez & Palma, 2003). Una serie de estudios se han enfocado a la embriología de crustáceos decápodos asociando caracteres especiales durante el desarrollo, como influencia de la temperatura, dinámica poblacional, composición química y diferenciación de órganos y sistemas (para referencias ver Helluy & Beltz, 1991).

Si bien aspectos sobre fisiología del desarrollo no han sido estudiados en extenso, la determinación de tasas fisiológicas juega un rol importante en entender el metabolismo de un individuo. Este último se considera como una conversión de energía del alimento a reservas internas (Anger, 2001), siendo afectado por una serie de factores como temperatura, salinidad, consumo de oxígeno, excreción y tipo de alimentación (Anger, 2001). Nutrición, crecimiento, composición química y metabolismo son los aspectos más estudiados del desarrollo temprano. Sin embargo, la mayoría son estudiados como parámetros aislados y no en un contexto energético general. Esto contrasta con la gran cantidad de datos disponibles sobre adultos y juveniles, en particular para especies con valor comercial. Nutricionalmente el metabolismo ha sido estudiado en especies

planctotróficas y lecitotróficas (para referencias ver Vavra & Manahan, 1999 y Anger, 2001), sin embargo, la mayoría de las veces se han estudiado separadamente y no se han realizado comparaciones entre ambos modos de desarrollo.

En el presente estudio se analiza el desarrollo temprano, comprendiendo desarrollo embrionario y larval, de *Lithodes santolla* (Molina, 1782) y *Petrolisthes laevis* (Guérin, 1835) en términos de la fisiología y bioquímica del desarrollo. El conocimiento sobre ambas especies es escaso. De *L. santolla* se conocen parte de los aspectos reproductivos. La especie presenta fecundación externa, llegando a portar 30000 huevos por hembra los que son incubados por un período de 9 a 10 meses (Vinuesa, 1982, 1984, Guzmán & Ríos, 1986). Posterior a la eclosión se presentan tres estadios zoea y uno megalopa antes de la metamorfosis a primer juvenil. El desarrollo larval se extiende por aproximadamente 48 días a 12°C (Escobar, 2003) período durante el cual los individuos no requieren suministro externo de alimento (McLaughlin *et al.*, 2001, Lovrich *et al.*, 2003, Kattner *et al.*, 2003, Escobar, 2003). Estudios sobre el desarrollo embrionario de esta especie no han sido realizados.

Siendo una especie que habita el intermareal medio y superior, las hembras de *P. laevis* portan hasta 1141 huevos (Lardies & Wehrtmann, 1996), con un período de incubación de 1,5 a 5 meses (Gebauer, 2004). Durante el desarrollo larval se presentan dos estadios zoea y uno megalopa (Albornoz & Wehrtmann, 1996), los cuales se desarrollan por un período de 60 días a una temperatura de 13°C (Mascetti & Wehrtmann, 1996). Todos los estadios larvales requieren suministro externo de

alimento (Mascetti & Wehrtmann, 1996). El estudio sobre el desarrollo embrionario es igualmente escaso, la mayoría de los estudios realizados sobre porcelánidos en Chile se enfocan en fecundidad, volumen y rendimiento reproductivo de las especies por lo que aspectos fisiológicos y energéticos son desconocidos (Albornoz & Wehrtmann, 1996, López *et al.*, 1997, Hernáez & Palma, 2003, Lardies *et al.*, 2004).

2.1. Hipótesis de trabajo:

- ✓ La disponibilidad de energía durante el desarrollo temprano determina las tasas fisiológicas durante el desarrollo embrionario y larval.

2.2. Objetivo(s) general(es)

- ✓ Evaluar tasas fisiológicas *L. santolla* y *P. laevigatus* durante el desarrollo temprano.
- ✓ Evaluar variables bioquímicas de ambas especies a lo largo del desarrollo temprano.
- ✓ Estimar costos energéticos asociados con el desarrollo temprano.
- ✓ Estimar efectos asociados a la ausencia de alimento durante el desarrollo larval de *P. laevigatus*.

2.3. Objetivos específicos

- ✓ Cuantificar variables fisiológicas, respiración y excreción, de embriones y larvas de ambas especies.
- ✓ Cuantificar variables bioquímicas de embriones y larvas de ambas especies.
- ✓ Cuantificar cambios fisiológicos y bioquímicos asociados al desarrollo temprano de ambas especies.
- ✓ Establecer tasas indicadoras de estado nutricional (relación lípido: proteína).

3. Material y métodos

3.1. Obtención y mantención de hembras

Las hembras de *Petrolisthes laevigatus* fueron recolectadas del intermareal rocoso de la Playa de Pelluhuin, Balneario Pelluco, Puerto Montt (X Región, Chile) (41°29'55" S, 72°53'09" W) (Fig. 1). Los individuos fueron trasladados al Laboratorio de Ecofisiología de Crustáceos (LECOFIC) de la Universidad Austral de Chile, Campus Puerto Montt (X Región, Chile), donde se mantuvieron en estanques de 50 litros con agua de mar filtrada (10 y 5 µm) y ultravioletizada, a temperatura de 12°C y aireación constante.

Las hembras de *Lithodes santolla* utilizadas fueron seleccionadas del stock de hembras mantenidas en laboratorio del proyecto FONDEF D02I1163. Las hembras seleccionadas fueron mantenidas en estanques de 500 litros con agua de mar filtrada (10 y 5 µm) y ultravioletizada, a temperatura (12°C) y aireación constantes.



Figura 1. Área de recolección de hembras de *P. laevigatus* (O).

3.2. Cultivo larval

Las hembras ovíferas con un estado avanzado del desarrollo embrionario fueron trasladadas a estanques acondicionados para la captura de larvas. Las hembras fueron mantenidas en estanques de 50 litros en agua de mar filtrada (10 y 5 μm) y ultravioletizada, a temperatura (12°C) y aireación constantes.

La colecta de larvas se realizó diariamente por tamices recibiendo el efluente de los estanques. Se prepararon bandejas de cultivo en las cuales las larvas recién eclosionadas fueron mantenidas con un flujo continuo de agua, aireación y temperatura (12°C) constantes.

Las larvas de *L. santolla* fueron cultivadas sin alimento hasta la muda a primer juvenil ya que estudios anteriores han mostrado que no requieren suministro de alimento externo (McLaughlin *et al.*, 2001, Lovrich *et al.*, 2003, Kattner *et al.*, 2003). Las larvas de *P. laevigatus* se alimentaron diariamente *ad libitum* con nauplius de *Artemia sp.*. El alimento suministrado para larvas de *P. laevigatus* fue previamente tamizado (320 μm) eliminando cistos, los que fueron perjudiciales en cultivos preliminares. Se mantuvo grupos control de larvas de *P. laevigatus* sin alimento, con el fin de determinar variables fisiológicas y bioquímicas durante el período de ayuno.

3.3. Fisiología

3.3.1. Obtención de muestras

La determinación fisiológica y bioquímica de embriones de ambas especies en estudio se realizó en base a embriones tomados directamente de los pleópodos de las hembras, contabilizándose el número para los análisis

Para la determinación de las variables fisiológicas y bioquímicas se muestrearon los estadios larvales de ambas especies de los cultivos larvales respectivos. El número de larvas analizadas dependió de la condición de cultivo y estadio de desarrollo.

3.3.2 Tasa de excreción de amonio

La tasa de excreción de amonio ($\text{NH}_3\text{-H}^+$) de embriones y larvas de ambas especies se determinó por medio de la metodología de Koroleff (1983) modificada para tomar un volumen de muestra de 1250 μl .

Para poder obtener una concentración factible de ser medida por el método, se realizó una incubación de 20 y 100 individuos, para embriones de *L. santolla* y *P. laevigatus*, respectivamente, por 24 horas en un volumen de 5 ml de agua de mar filtrada (0.45 μm). Para el caso de los estadios larvales, se realizó una incubación de 10 y 50 larvas de *L. santolla* y *P. laevigatus*, respectivamente, por 4 horas en un volumen aproximado de 10 ml de agua de mar filtrada (0.45 μm). La incubación de los individuos se realizó a una temperatura constante de 12 °C proporcionado por un baño termorregulado (Termo Neslab RTE-7).

3.3.3. Tasa respiratoria

La tasa respiratoria se determinó posterior a la cuantificación de amonio y en base a los mismos individuos analizados. Se utilizó un oxígenómetro MICROX TX3 (Presens GmbH, Alemania) para determinar los mg/L de oxígeno presentes en un estado inicial y un estado final de incubación.

La medición del consumo de oxígeno se realizó por un período de incubación de 4 horas para embriones y 1 hora para larvas de ambas especies, utilizando los mismos volúmenes que para la cuantificación de amonio. La incubación de los individuos se realizó a una temperatura constante de 12 °C proporcionado por un baño termorregulado (Termo Neslab RTE-7).

3.3.4. Determinación del peso húmedo

Para la determinación del peso húmedo de embriones y larvas de *L. santolla* y *P. laevigatus* se utilizaron los individuos sometidos a análisis fisiológicos de excreción y respiración. Los individuos fueron lavados con agua destilada, con el fin de retirar residuos de sales externas que pudieran entorpecer la determinación del peso, secados con papel absorbente y dispuestos en tubos de microcentrifuga prepesados. El peso húmedo se determinó en una balanza Precisa 290 SCS Balances con 0.01 mg de precisión. Luego de la determinación del peso húmedo las muestras fueron congeladas a -30°C (Electrolux Medical Refrigeration MF120) hasta el momento de la liofilización de la muestra.

3.3.5. Determinación del peso seco

La determinación del peso seco fue realizada de las muestras de peso húmedo congeladas. Las muestras fueron liofilizadas (Savant Novalyphe NL150) por un período de 24 horas, pesadas (Precisa 290 SCS Balances) y congeladas a -30°C (Electrolux Medical Refrigeration MF120) hasta la realización de análisis bioquímicos.

3.4. Análisis bioquímicos

Se realizaron análisis bioquímicos enfocados a cuantificar la concentración de proteínas y lípidos presentes en embriones y larvas de *Lithodes santolla* y *Petrolisthes laevis*. Para la determinación bioquímica la muestra liofilizada fue resuspendida en 1000 μl de agua destilada, fue sonicada por un disruptor celular (Microson XL2000, Misonix) y separada en triplicado para análisis de lípidos (100 μl de homogenizado+1000 μl de cloroformo-metanol ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 2+1)) y proteínas (150 μl de homogenizado+500 μl de ácido tricloro acético (TCA 20%)).

3.4.1. Proteínas

Posterior a una incubación a 100°C y una centrifugación a 10.000 rpm del triplicado de las muestras para proteínas, se separó el pellet, dirigido a análisis proteico, del sobrenadante que fue descartado.

El pellet, resuspendido en 1000 μl NaOH 1M e incubado a 56°C por un período de 30 minutos, fue sometido a una reacción de color usando la metodología de Lowry (Lowry et al., 1951) con suero de albúmina de bovino (BSA) (2 mg BSA ml^{-1}) como estándar, leído por espectrofotometría a 750 nm (Spectronic Genesys 5).

3.4.2. Lípidos

Los lípidos totales se midieron por el método de sulfo-fosfo-vainillina (Zöllner & Kirsch, 1962), mediante el cual, luego de una centrifugación a 8000 G por 20 minutos a 4°C el solvente del triplicado de lípidos fue evaporado a 56°C por 120 minutos. La muestra digerida químicamente con ácido sulfúrico concentrado es medida a 530 nm (Spectronic Genesys 5) tras la acción de una solución de vainillina y ácido fosfórico, con colesterol (3 mg colesterol*ml⁻¹ CHCl₃/CH₃OH 2+1) como estándar.

3.5. Análisis de imágenes

Los individuos destinados a estudios fisiológicos fueron grabados en VHS con una cámara de video incorporada a una lupa binocular (Olympus, Tokio 330287) junto a una medida de calibración (papel milimetrado). Las imágenes fueron posteriormente digitalizadas y analizadas por el programa Scion Image Beta 4.0.2 (www.scioncorp.com). Los datos entregados de las imágenes de embriones permitieron el cálculo del volumen total del huevo, diámetros mayor y menor del huevo y tamaño de mancha ocular. Para calcular el volumen del huevo se utilizó la fórmula de volumen de elipsoide de revolución (Valdes *et al.*, 1991). Para el caso de las fases larvales se obtuvieron datos de largo y ancho de caparazón durante el desarrollo.

3.6. Determinación de estadios embrionarios

Para la determinación de los estadios de desarrollo embrionario se realizaron seis categorías de división, de acuerdo al grado de avance del embrión obtenido del análisis de imágenes realizado.

Tabla 1. Características utilizadas para determinar el estadio de desarrollo embrionario de *L. santolla* y *P. laevigatus*.

Estadio de Desarrollo	Características
Estadio I	No se observa desarrollo visible del embrión.
Estadio II	Embrión visible. 10-20% del volumen del huevo.
Estadio III	Embrión visible. 20-40% del volumen del huevo. Mancha ocular inicial, visible como línea oblicua pigmentada.
Estadio IV	Embrión visible. 40-60% del volumen del huevo. Mancha ocular creciente forma ovalada.
Estadio V	Embrión visible. 60-80% del volumen del huevo. Mancha ocular grande y oscura.
Estadio VI	Embrión terminal. 80-90% del volumen del huevo. Globo ocular bien desarrollado y fuertemente pigmentado.

3.7. Análisis estadístico

Para determinar si existieron diferencias significativas de las distintas variables fisiológicas (tasa de excreción, tasa respiratoria, peso húmedo, peso seco) y de las variables bioquímicas (lípidos y proteínas) durante el desarrollo embrionario y larval de *L. santolla* y *P. laevigatus*, se realizaron análisis de varianza de una vía (ANDEVA) entre las variables mencionadas y el tipo de desarrollo en ambas especies. Para identificar él o los tratamientos diferentes se utilizó un test de Tukey para datos que poseían homogeneidad de varianza o transformados cuando correspondía.

Para determinar si hubo diferencias significativas de las variables fisiológicas (tasa de excreción, tasa respiratoria, peso húmedo, peso seco) y bioquímicas (lípidos y proteínas) durante y entre los primeros días de larvas de *P. laevigatus* con presencia y ausencia de alimento se realizaron análisis de varianza de una vía (ANDEVA).

Los datos que no presentaron homogeneidad de varianza fueron evaluados por un análisis de Kruskal-Wallis y test de Dunn. Para ambos análisis, los resultados se consideraron significativos con $P < 0.05$.

4. Resultados

4.1. Desarrollo temprano

4.1.1. Fisiología

4.1.1.1. Tasa de respiración

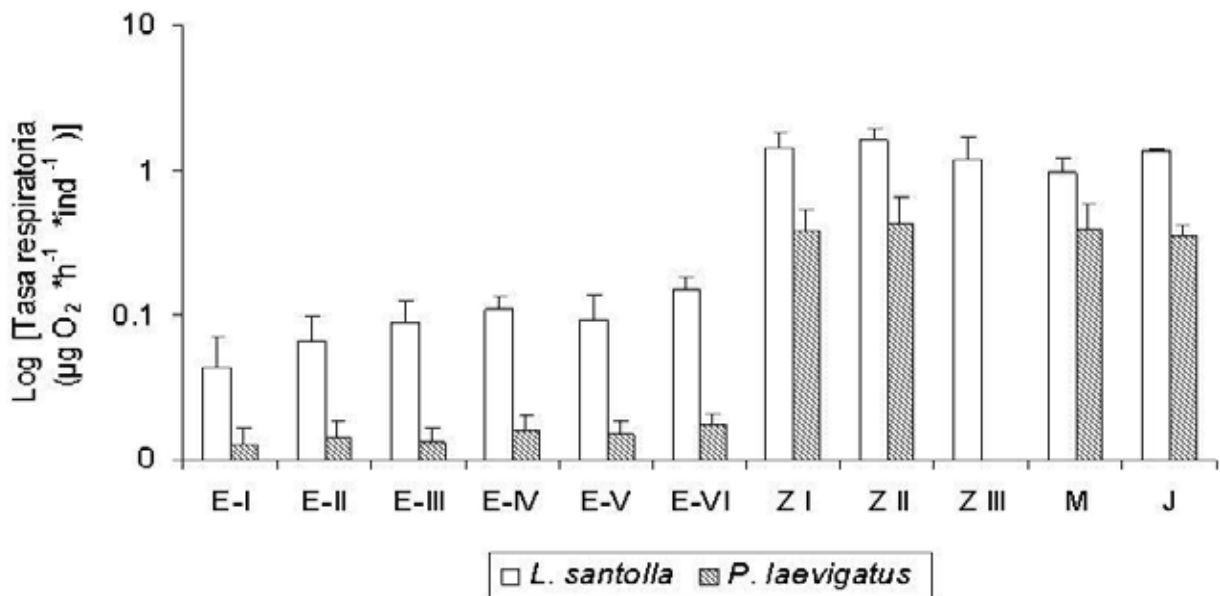


Figura 2. Tasa respiratoria durante el desarrollo de *L. santolla* y *P. laevigatus*. Valores promedio + desviación estándar. (E I- E VI: estadios embrionarios; ZI-ZIII: estadios zoea; M: megalopa; J: primer juvenil).

La tasa respiratoria de *L. santolla* aumenta significativamente durante el desarrollo temprano, observándose valores de $0,0436 \mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$ y $1,3340 \mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$ en los inicios del desarrollo embrionario y finales del desarrollo larval, respectivamente (Fig. 2) ($F_{10,137}=124,481$, $P=<0,001$). *P. laevigatus* también aumenta su tasa respiratoria a lo largo del desarrollo con valores de $0,0129 \mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$ para inicios

del desarrollo embrionario y $0,3539 \mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$ en un estadio de primer juvenil (Fig. 2), encontrándose diferencias significativas ($F_{9,112}=315,001$, $P=<0,001$). Las diferencias observadas en la tasa respiratoria durante el desarrollo entre *L. santolla* y *P. laevigatus* mostraron ser estadísticamente significativas entre los estadios de desarrollo analizados ($F_{20,240}=195,474$, $P=<0,001$).

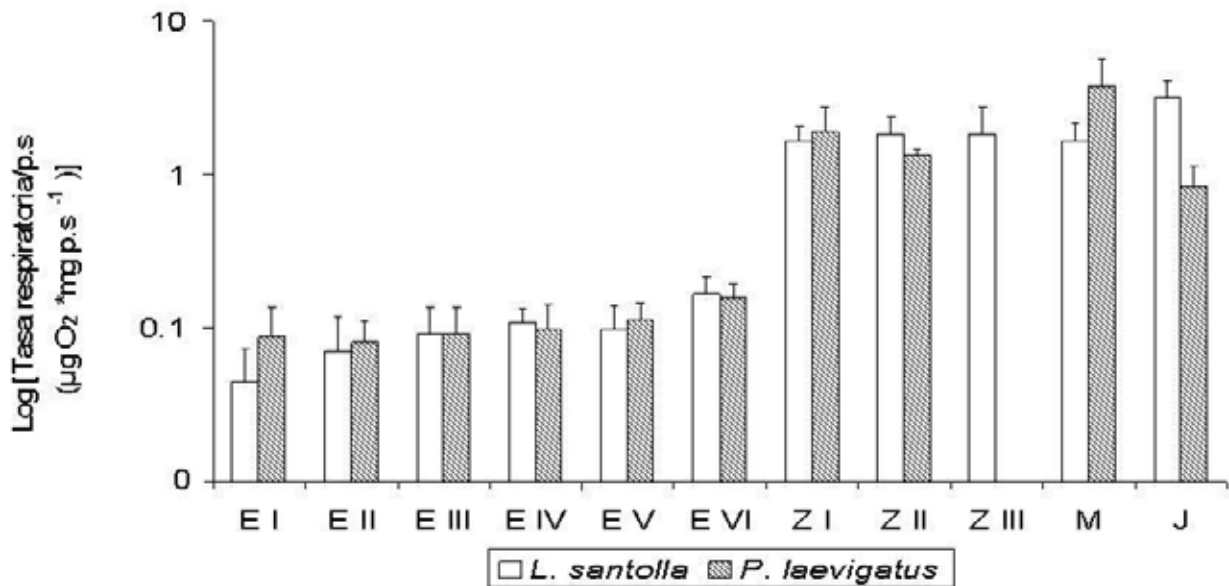


Figura 3. Tasa respiratoria expresada por mg de peso seco (p.s) durante el desarrollo de *L.santolla* y *P. laevigatus*. Valores promedio + desviación estándar. Ver detalles Fig. 2.

La tasa respiratoria peso específica de *L. santolla* aumenta de $0,0452 \mu\text{g O}_2^* \text{mg p.s}^{-1}$ a $3,21 \mu\text{g O}_2^* \text{h}^{-1} * \text{mg p.s}^{-1}$ (Fig. 3) Para *P. laevigatus* el aumento varía de $0,0881 \mu\text{g O}_2^* \text{mg p.s}^{-1}$ a $3,78 \mu\text{g O}_2^* \text{mg p.s}^{-1}$ hasta el estadio megalopa, con una caída importante en el primer juvenil (Fig. 3). Se encontraron diferencias significativas de la tasa respiratoria peso-específica durante el desarrollo de *L. santolla* ($F_{10,147}=137,187$, $P<0,001$) y *P. laevigatus* ($H=86,151$, $P<0,001$). Las diferencias presentes entre ambas especies estudiadas fueron significativas entre los estadios de desarrollo analizados ($F_{20, 240}=83,284$, $P<0,001$).

4.1.1.2. Tasa de excreción de amonio

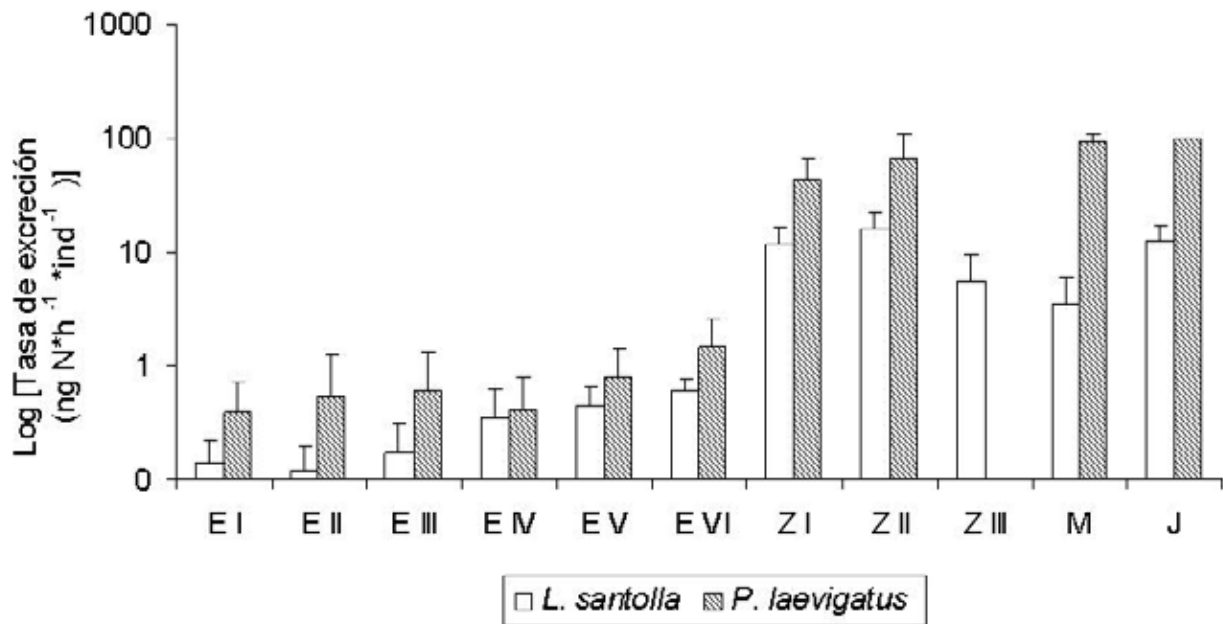


Figura 4. Tasa de excreción de *L. santolla* y *P. laevigatus* para el desarrollo temprano.

Valores promedio + desviación estándar. Ver detalles Fig. 2.

Al igual que la tasa respiratoria se produce un aumento importante de la tasa de excreción de amonio (99%) (Fig. 4). Se encontró un aumento significativo de la tasa excretoria de *L. santolla* variando de 0,1394 ng N*h⁻¹*ind⁻¹ a 12,396 ng N*h⁻¹*ind⁻¹, para inicios del desarrollo embrionario y primer juvenil, respectivamente ($F_{10,137}=99.979$, $P<0.001$). *P. laevigatus* incrementa la tasa excretoria de 0,388 ng N*h⁻¹*ind⁻¹ a 100,13 ng N*h⁻¹*ind⁻¹ de embrión inicial a primer juvenil, respectivamente, encontrándose diferencias significativas durante el desarrollo ($H=84,638$, $P<0,001$) (Fig. 4). Se encontraron diferencias significativas entre los estados de desarrollo analizados entre ambas especies ($H=204,795$, $P<0,001$).

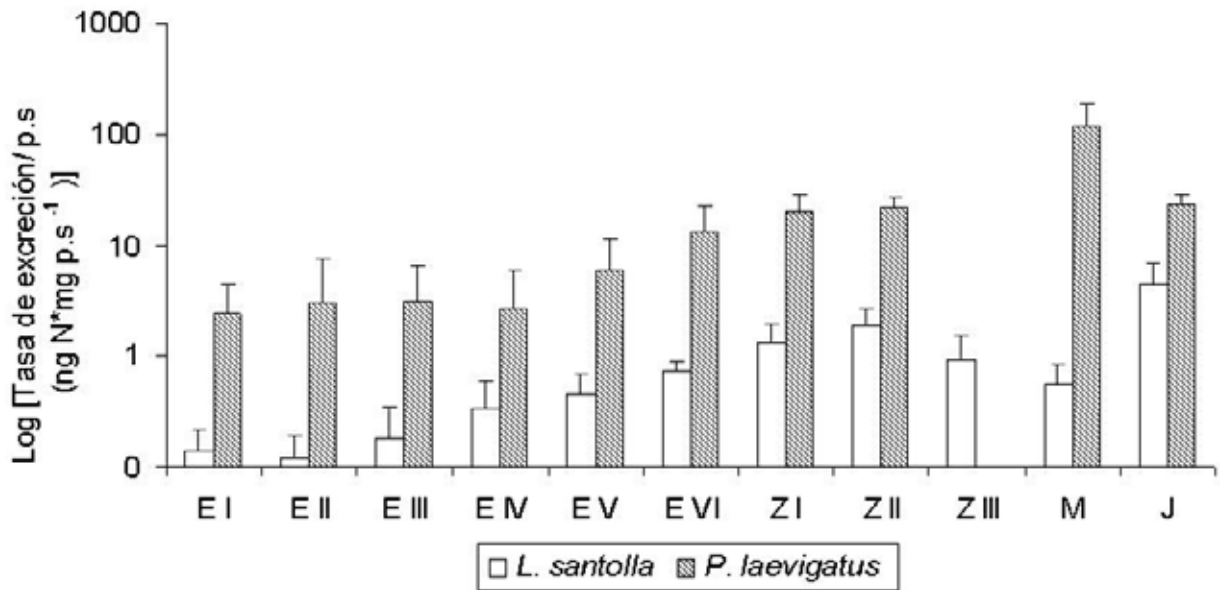


Figura 5. Tasa de excreción expresada por mg de peso seco (p.s) para embriones y larvas de *L. santolla* y *P. laevigatus*. Valores promedio + desviación estándar. Ver detalles Fig. 2.

La tasa de excreción peso-específica de *L. santolla* aumenta de 0,14 ng N* mg p.s⁻¹ a inicios del desarrollo embrionario a 4,4 ng N* mg p.s⁻¹ (Fig. 5), por su parte, *P. laevigatus* muestra un aumento de 2,38 ng N* mg p.s⁻¹ a 118 ng N* mg p.s⁻¹ (Fig. 5), estos resultados mostraron ser significativos durante el desarrollo de *L. santolla* ($F_{10,147}=33,281$, $P<0,001$) y *P. laevigatus* ($F_{9,123}=2,175$, $P=0,029$). Las diferencias observadas en la tasa de excreción entre *L. santolla* y *P. laevigatus* mostraron ser significativas entre los estados de desarrollo analizados ($H=208,716$, $P<0,001$).

4.1.1.3. Peso

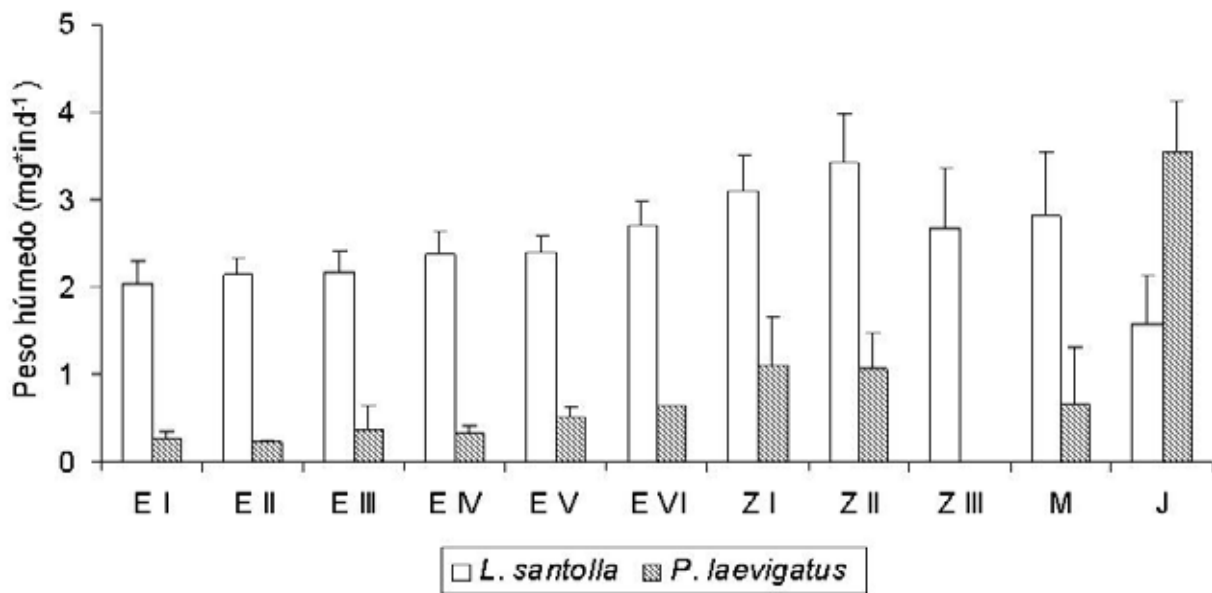


Figura 6. Peso húmedo durante el desarrollo temprano de *L. santolla* y *P. laevigatus*.

Valores promedio + desviación estándar. Ver detalles Fig. 2.

El peso húmedo aumenta durante el desarrollo temprano de ambas especies (Fig. 6). *L. santolla* crece en peso húmedo hasta zoea II, de 2,04 mg*ind⁻¹ a 3,42 mg*ind⁻¹, luego muestra una caída en primer juvenil. Por otra parte *P. laevigatus* aumenta constantemente su peso húmedo, de 0,271 mg*ind⁻¹ a 0,671 mg*ind⁻¹ para un embrión inicial y primer juvenil, respectivamente (Fig. 6). El aumento máximo en ambas especies alcanzó 40 % para *L. santolla* y 59% para *P. laevigatus*, existiendo diferencias significativas a lo largo del desarrollo de ambas especies (*L. santolla*, $H=86,981$, $P<0,001$; *P. laevigatus*, $H=86,678$, $P<0,001$). Entre *L. santolla* y *P. laevigatus* se encontraron diferencias significativas del peso húmedo entre los estados de desarrollo analizados ($H=240,578$, $P<0,001$).

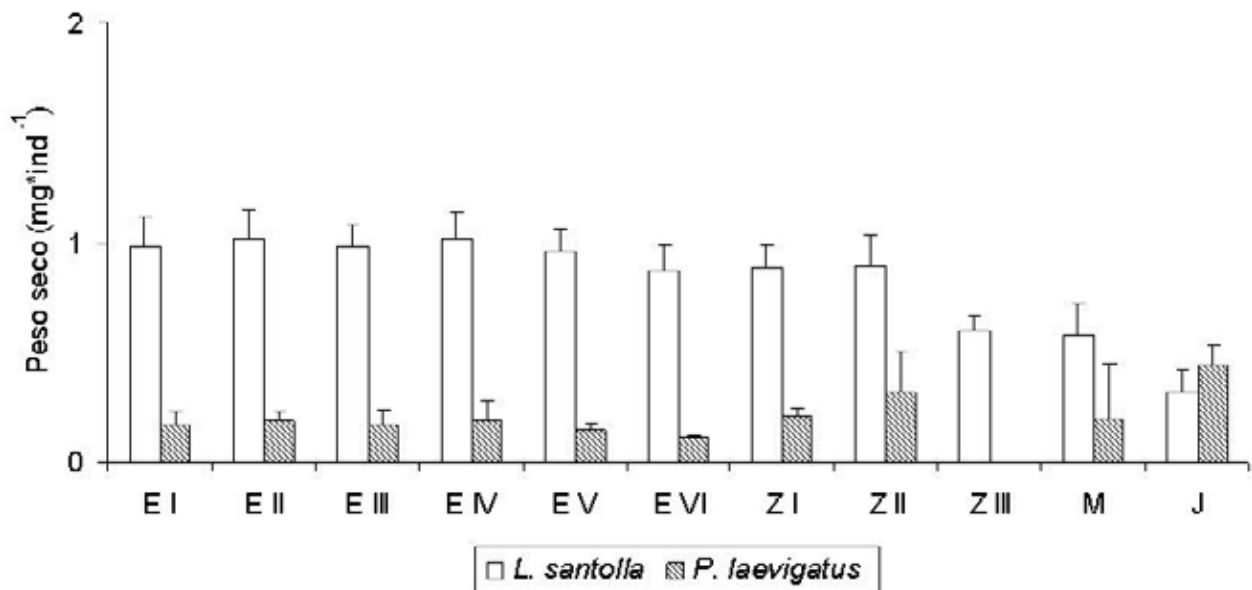


Figura 7. Peso seco de *L. santolla* y *P. laevigatus* durante el desarrollo temprano.

Valores promedio + desviación estándar. Ver detalles Fig.2.

El peso seco en *L. santolla* disminuye significativamente durante el desarrollo, de 974 $\mu\text{g} \cdot \text{ind}^{-1}$ a 317 $\mu\text{g} \cdot \text{ind}^{-1}$ ($F_{10,137}=34,059$, $P<0,001$), con un decrecimiento de 67% (Fig. 7). Por su parte, *P. laevigatus* aumenta significativamente su peso seco de 171 $\mu\text{g} \cdot \text{ind}^{-1}$ a 441 $\mu\text{g} \cdot \text{ind}^{-1}$ ($H=32,862$, $P<0,001$), consignando un incremento de 61% (Fig. 7). Las diferencias observadas entre las dos especies estudiadas mostraron ser estadísticamente significativas entre los estados de desarrollo analizados ($H=227,405$, $P<0,001$).

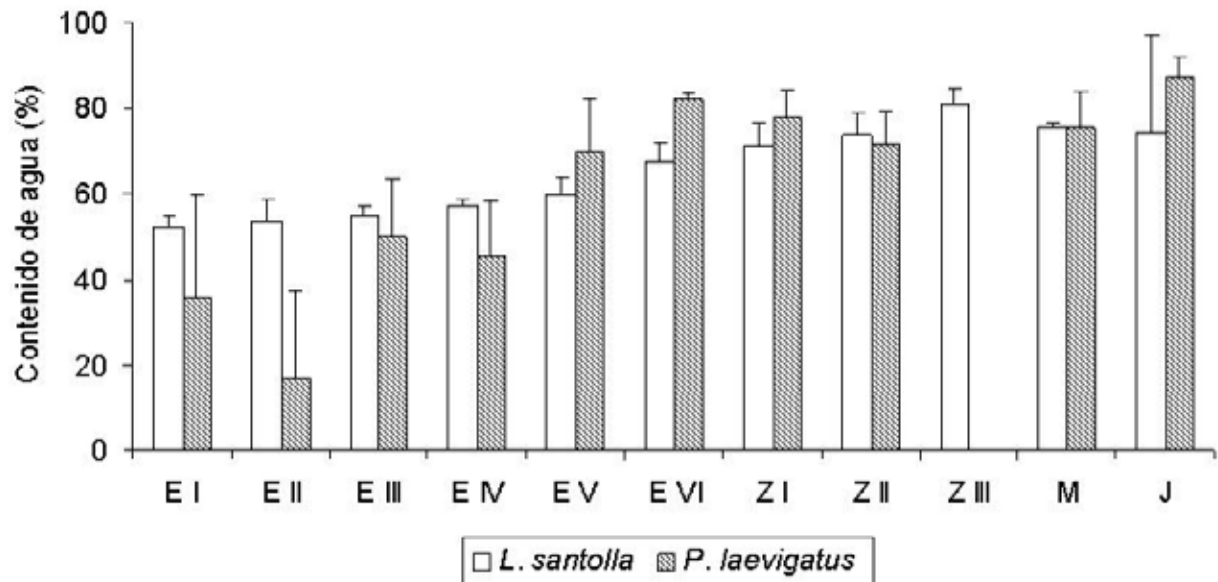


Figura 8. Contenido de agua de *L. santolla* y *P. laevigatus* durante el desarrollo temprano. Valores promedio + desviación estándar. Ver detalles Fig. 2.

De acuerdo a los pesos anteriores el contenido de agua aumenta significativamente durante el desarrollo temprano de ambas especies, de un 52 a un 74% para *L. santolla* ($F_{10, 137}=18,666$, $P<0,001$) y de un 35 a un 87% para *P. laevigatus* ($F_{9, 114}=41,484$, $P<0,001$) (Fig. 8). Sin embargo, las diferencias observadas entre ambas especies no fueron estadísticamente significativas entre los estados de desarrollo analizados ($F_{20, 251}=1,072$, $P=0,379$).

4.1.2. Análisis bioquímicos

4.1.2.1. Proteínas

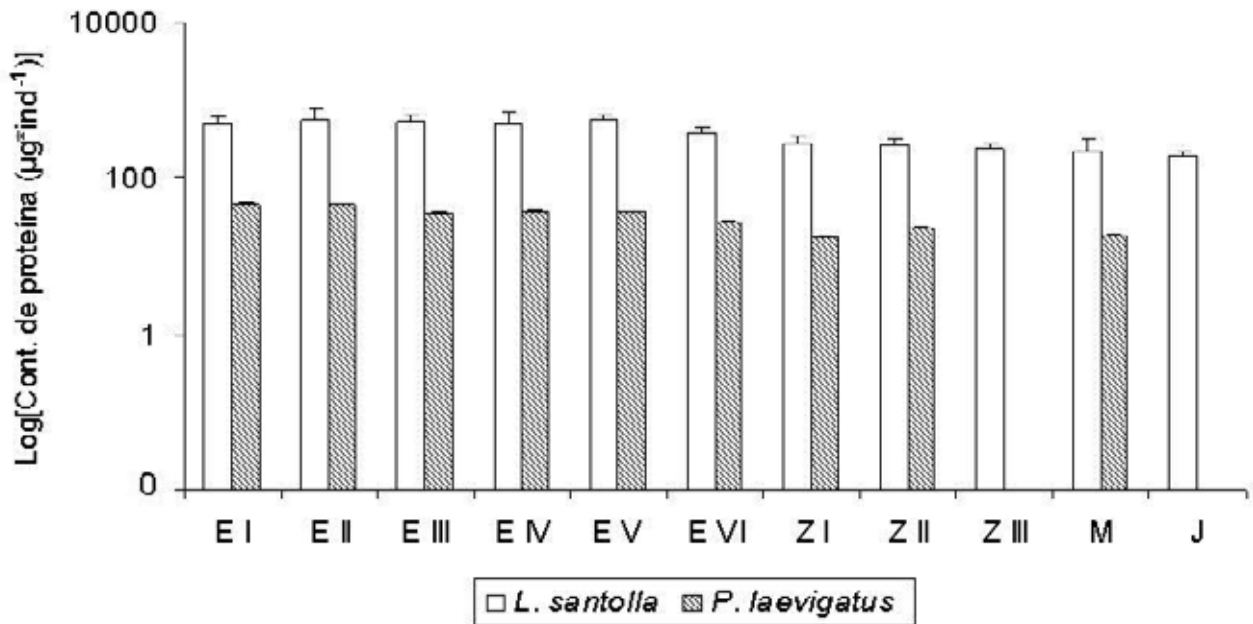


Figura 9. Contenido de proteínas totales durante el desarrollo embrionario y larval de *L. santolla* y *P. laevigatus*. Valores promedio + desviación estándar. Ver detalles Fig. 2.

Se encontraron diferencias significativas de la concentración de proteínas totales durante el desarrollo temprano de *L. santolla*, alcanzando valores extremos entre 517 µg (59% de peso seco) a inicios del desarrollo embrionario hasta 194 µg (22% de peso seco) a finales del desarrollo larval (Fig. 9) ($F_{10,43}=9,488$, $P<0,001$). Por otro lado, la concentración de proteínas totales de *P. laevigatus* decrece durante el desarrollo embrionario en orden al 58% (46.57 µg a 27 µg), durante el desarrollo larval la concentración de proteínas totales varía entre 17 y 22 µg con una caída en el estadio megalopa (Fig. 9), encontrándose diferencias significativas durante el

desarrollo temprano de *P. laevigatus* ($F_{8, 37}=7,867$, $P<0,001$). Las diferencias observadas en la concentración de proteínas totales entre ambas especies estudiadas mostraron ser significativas entre los estados de desarrollo analizados ($F_{18, 80}=98,102$, $P<0,001$).

4.1.2.2. Lípidos

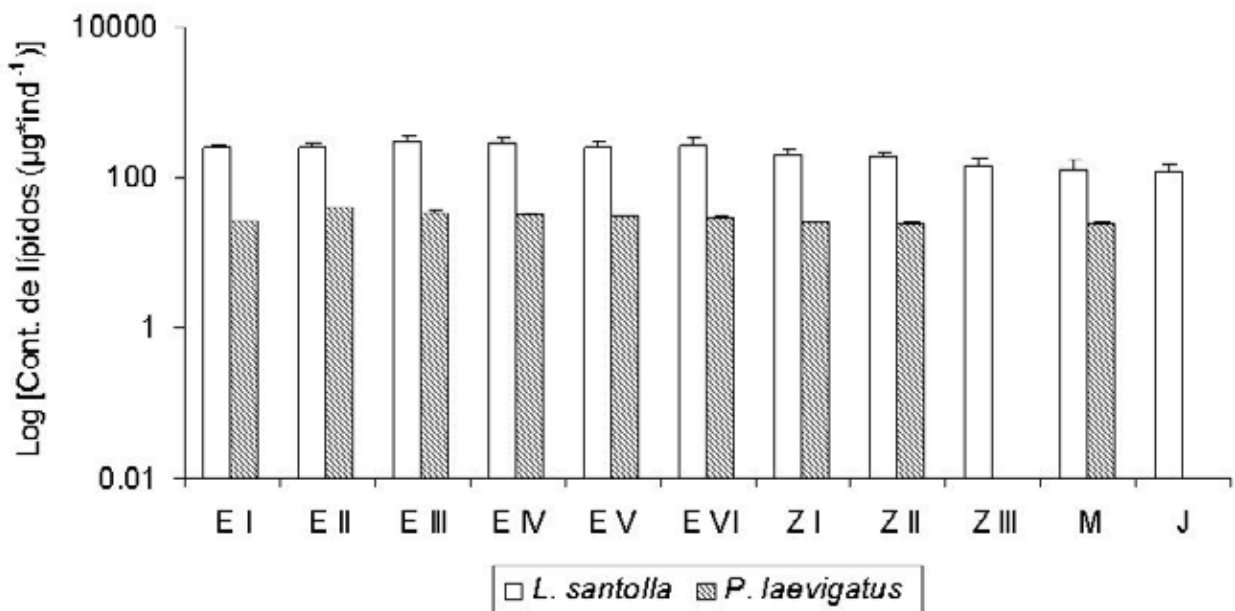


Figura 10. Contenido de lípidos totales de *L. santolla* y *P. laevigatus* durante el desarrollo embrionario y larval. Valores promedio + desviación estándar. Ver detalles Fig. 2.

Al igual que la concentración de proteínas, la concentración de lípidos totales decrece significativamente durante el desarrollo temprano de *L. santolla* de 254 µg (30% del peso seco) a inicios del desarrollo embrionario a 121 µg (14% del peso seco) a finales

del desarrollo larval (Fig. 10) ($F_{10,43}=13,022$, $P<0,001$). La concentración de lípidos totales durante el desarrollo de *P. laevigatus* no muestra una variación importante en el desarrollo embrionario, sin embargo durante el desarrollo larval la concentración lipídica aumenta de a 34 μg en zoea I a 37 μg en megalopa, con un máximo en el estadio de zoea II (Fig. 10), aunque no se encontraron diferencias significativas durante el desarrollo temprano de *P. laevigatus* ($F_{8,37}=1,64$, $P=0,147$). Las diferencias observadas entre la concentración de lípidos totales entre *L. santolla* y *P. laevigatus* fueron significativas entre los estados de desarrollo analizados ($H=90,056$, $P=<0,001$).

4.1.2.3. Relación Lípido: Proteína

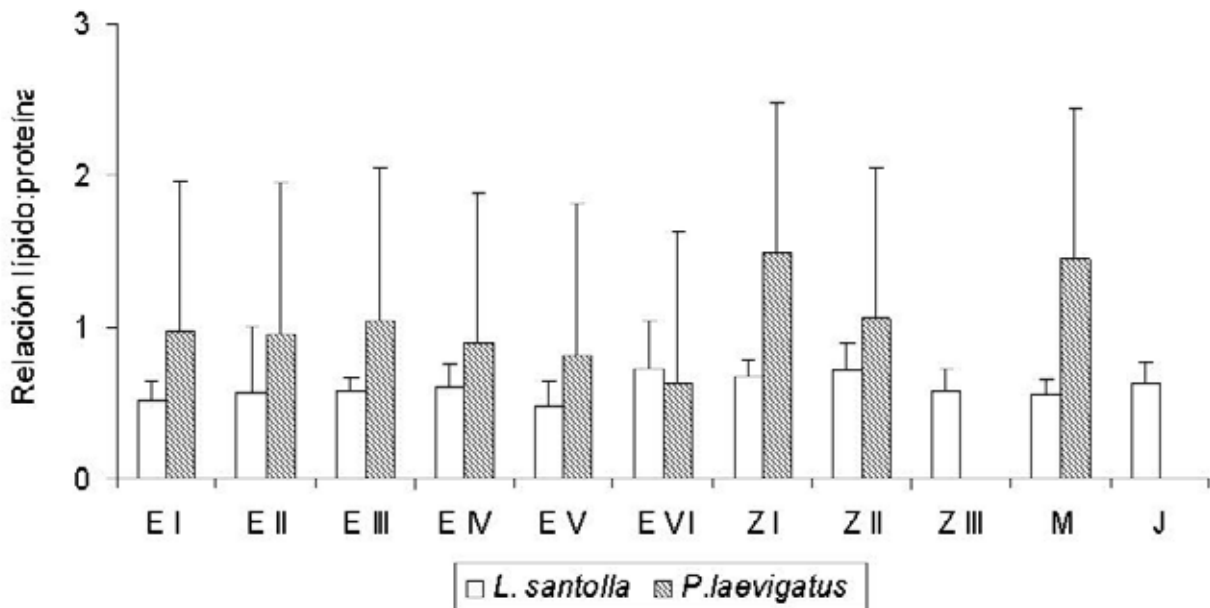


Figura 11. Relación lípido: proteína durante el desarrollo de *L. santolla* y *P. laevisgatus*. Valores promedio + desviación estándar. Ver detalles Fig. 2.

La relación lípido: proteína aumenta a lo largo del desarrollo embrionario y larval de ambas especies mostrando valores similares (Fig. 11), de 0,54 a 0,62 para embriones iniciales y primer juvenil de *L. santolla*, respectivamente, y de 0,97 a 1,45 para embriones iniciales y megalopa de *P. laevisgatus*, respectivamente, encontrándose valores máximos de la razón lípido: proteína en los estadios zoea I (Fig. 11). Se encontraron diferencias significativas durante el desarrollo de *P. laevisgatus* ($F_{8,37}=2,324$, $P=0,039$), y de *L. santolla* ($F_{10,43}=0,793$, $P<0,001$). Entre las especies estudiadas, la relación lípido: proteína mostró diferencias significativas entre los estados de desarrollo analizados ($F_{18,80}=5,861$, $P<0,001$).

4.2. Período de ayuno

4.2.1. Tasa respiratoria

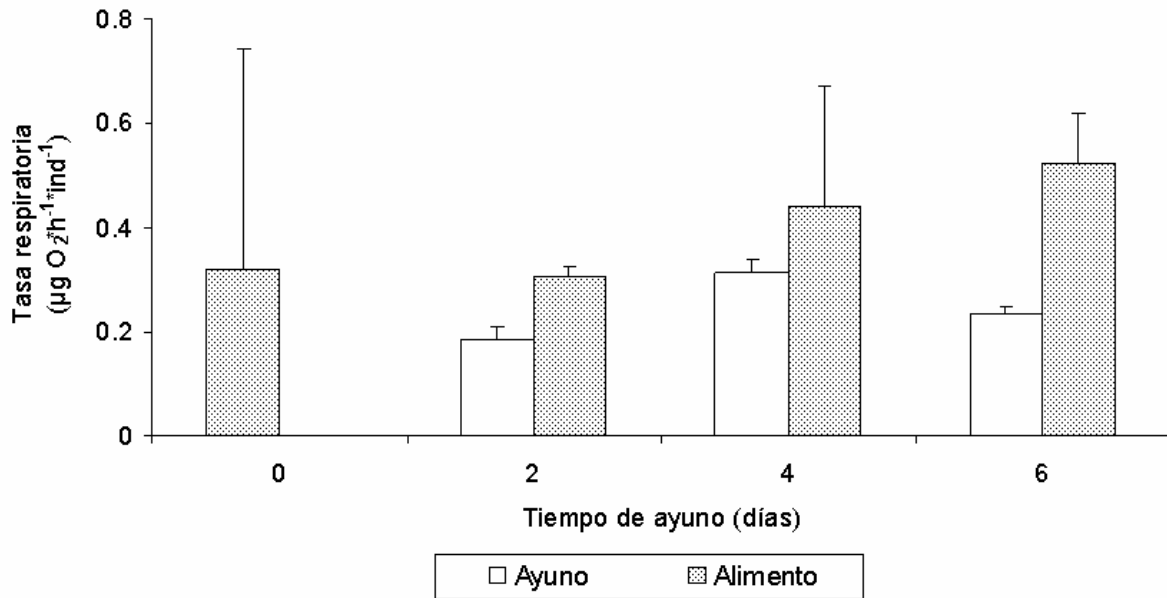


Figura 12. Tasa respiratoria de zoea I de *P. laevigatus* en presencia y ausencia de alimento. Valores promedio + desviación estándar.

Durante el período de ayuno en las larvas de *P. laevigatus* se observó una tendencia a la disminución de las tasas fisiológicas. La tasa respiratoria cae 27% durante el período de ayuno ($0,319 \mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$ a $0,233 \mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$) encontrándose diferencias significativas ($F_{3,12}=37,040$, $P<0,001$) (Fig. 12). Las larvas alimentadas aumentan su tasa respiratoria en 45% ($0,3041 \mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$ a $0,520 \mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$), aunque no se encontraron diferencias significativas ($H=3,231$, $P=0,212$) (Fig. 12). Las diferencias observadas entre el grupo de larvas sometidas a ayuno y el grupo con presencia de alimento mostraron ser significativas entre el período de experimentación ($H=17,770$, $P=0,003$).

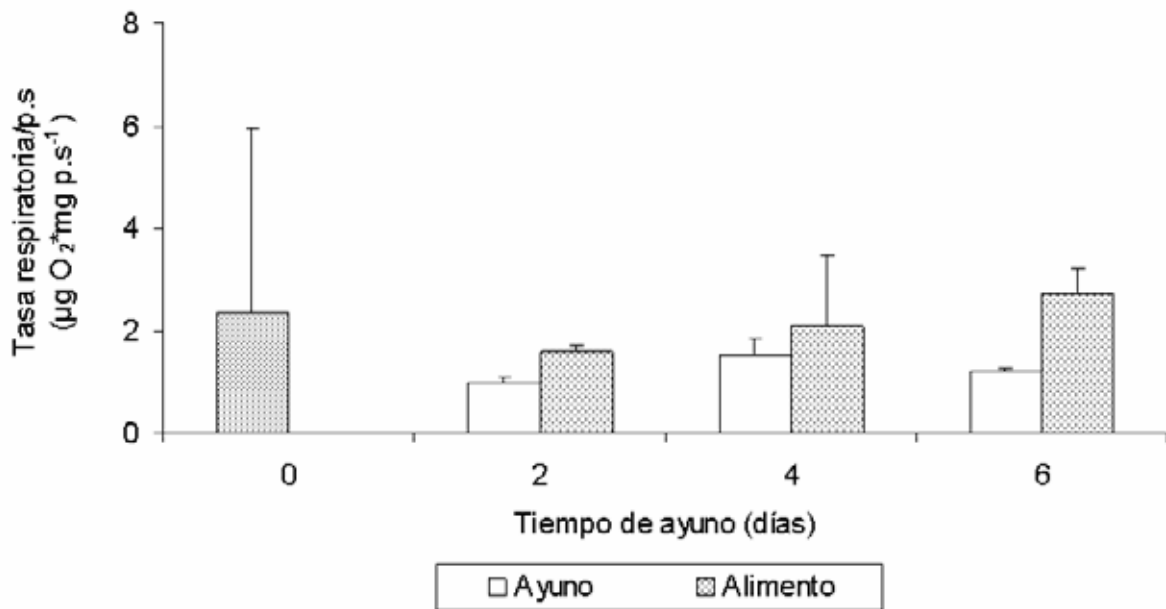


Figura 13. Tasa respiratoria expresada en mg de peso seco (p.s) de zoea I de *P. laevigatus* en ausencia y presencia de alimento. Valores promedio + desviación estándar.

Igualmente la tasa respiratoria peso específica decrece en larvas sometidas a ayuno, en orden al 50%, sin embargo no se observan diferencias significativas ($F_{3,12}=0.451$, $P=0.721$) ($2.35 \mu\text{g O}_2^* \text{mg p.s}^{-1}$ a $1.19 \mu\text{g O}_2^* \text{mg p.s}^{-1}$, día 0 a día 6, respectivamente) y un aumento en las larvas alimentadas ($1.57 \mu\text{g O}_2^* \text{mg p.s}^{-1}$ a $2.69 \mu\text{g O}_2^* \text{mg p.s}^{-1}$, día 2 a día 6, respectivamente), alrededor de 40% , sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los días de alimento ($H=3,231$, $P= 0,212$) (Fig. 13). Entre el grupo ayunado y el grupo con presencia de alimento se encontraron diferencias significativas entre el período de experimentación ($H=16,030$, $P=0,007$).

4.2.2. Tasa de excreción de amonio

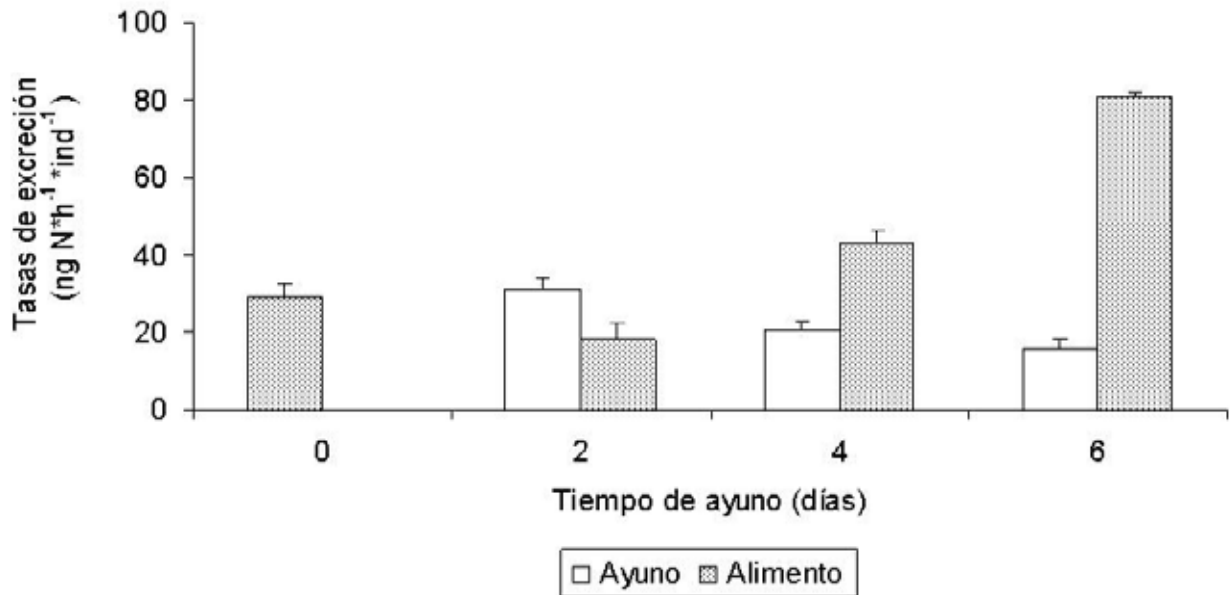


Figura 14. Tasa de excreción de amonio de *P. laevigatus* bajo condiciones de ausencia y presencia de alimento. Valores promedio + desviación estándar.

La tasa excretoria disminuye significativamente en orden al 46% de 28,9 ng N·h⁻¹·ind⁻¹ a inicios del período experimental a 15,6 ng N·h⁻¹·ind⁻¹ a fines del período de ayuno ($F_{3,12}=25,247$, $P<0,001$) los individuos que presentaron disponibilidad de alimento aumentaron su tasa excretoria significativamente de 18,11 ng N·h⁻¹·ind⁻¹ a 80,9 ng N·h⁻¹·ind⁻¹ ($F_{3,14}=13,253$, $P<0,001$) aumentando en 77% (Fig. 14). Las diferencias observadas entre los grupos con ausencia y presencia de alimento mostraron ser significativas entre el período de experimentación analizado ($H=18,830$, $P=0,002$).

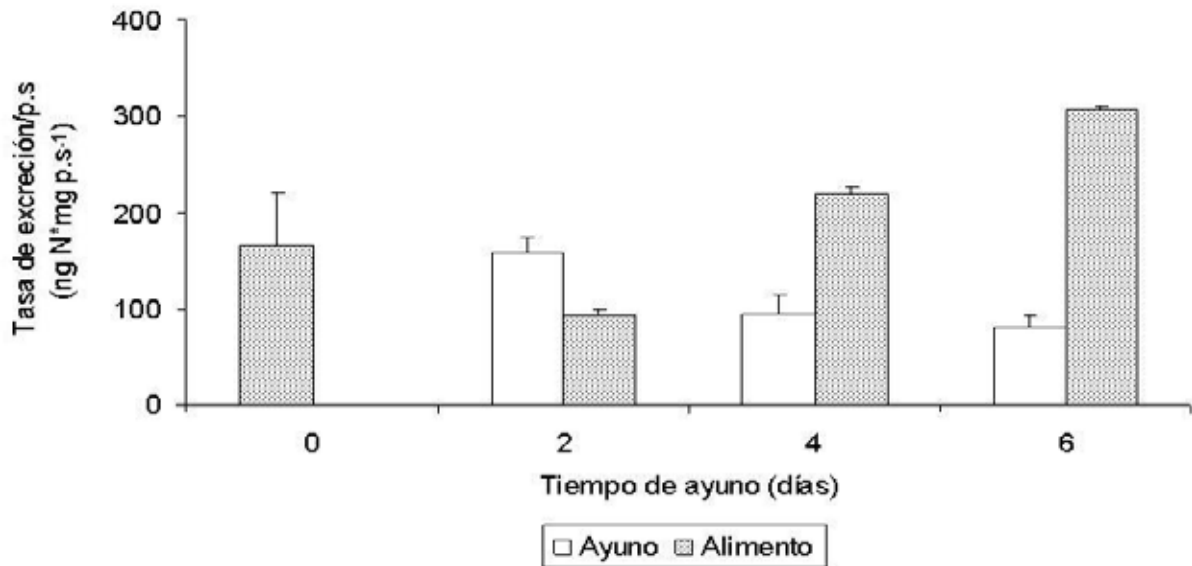


Figura 15. Tasa de excreción expresada por mg de peso seco (p.s) de zoea I de *P. laevigatus* sometidas a ayuno y presencia de alimento. Valores promedio + desviación estándar.

La tasa excretoria peso específica muestra una disminución significativa durante el período de ayuno variando de 164,74 ng N* mg p.s⁻¹ a 80,19 ng N* mg p.s⁻¹ (52%) ($F_{3,12}=23,723$, $P<0,001$), en tanto que un individuo en presencia de alimento aumenta significativamente su tasa de 93,49 ng N* mg p.s⁻¹ a 181,25 ng N* mg p.s⁻¹ (52% de aumento) ($F_{3,14}=14,851$, $P<0,001$) (Fig. 15). Se presentaron diferencias significativas entre el grupo sometido a ayuno y el grupo en presencia de alimento durante el período de experimentación ($H=18,870$, $P=0,002$).

4.2.3. Peso

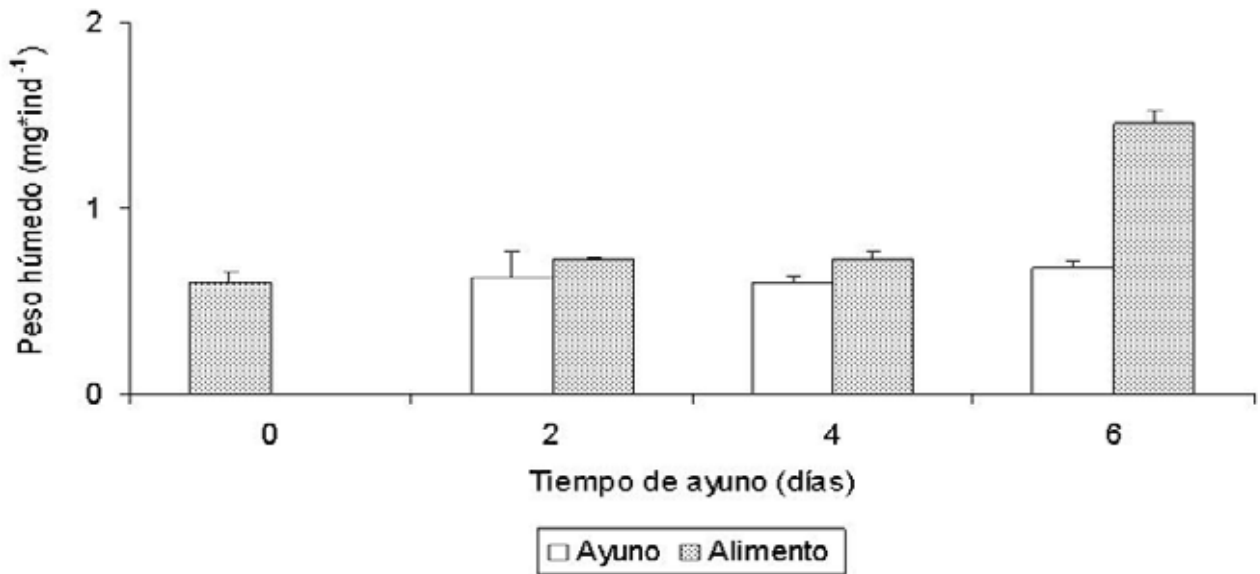


Figura 16. Peso húmedo de zoea I de *P. laevigatus* bajo condiciones de ayuno y en presencia de alimento. Valores promedio + desviación estándar.

El peso húmedo de individuos ayunados aumenta levemente a lo largo del período sin alimento, alrededor de 12% (Fig. 16), no encontrándose diferencias significativas ($F_{3,12}=0.844$, $P=0.496$), asimismo los individuos en presencia de alimento muestran un aumento significativo del peso húmedo especialmente en el día 6 de desarrollo (51%) (Fig. 16) ($F_{3,14}=12.832$, $P<0.001$). Las diferencias observadas entre ambos grupos analizados fueron estadísticamente significativas durante el período de experimentación ($F_{5,18}=5.374$, $P=0.003$).

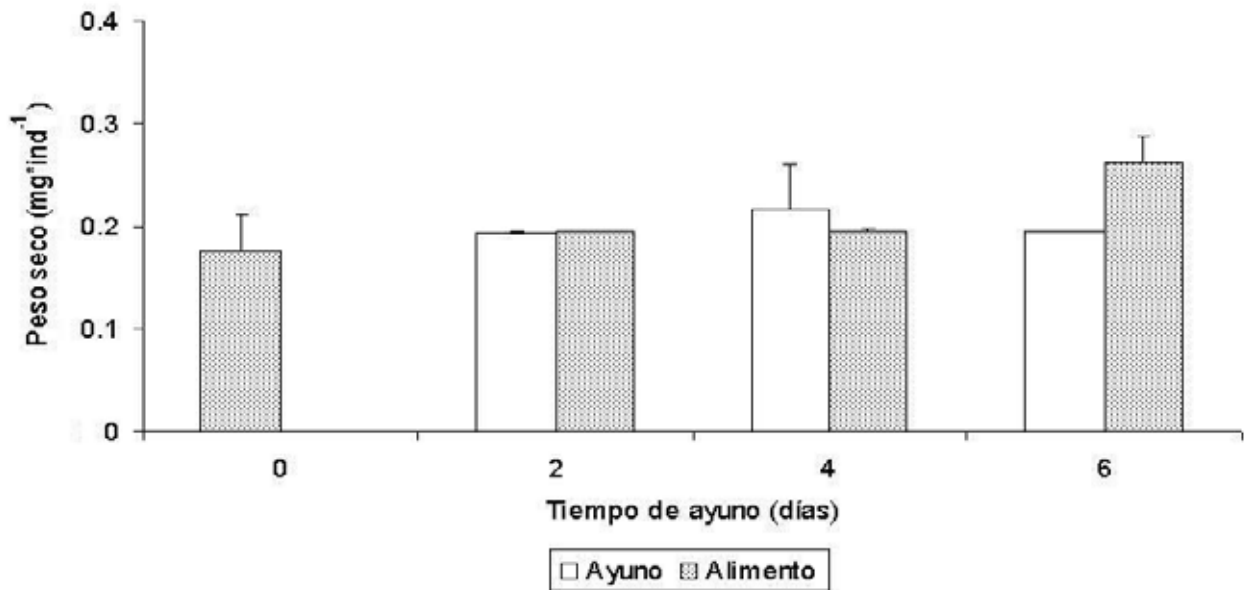


Figura 17. Peso seco de zoea I de *P. laevigatus* en ausencia y presencia de alimento disponible. Valores promedio + desviación estándar.

El peso seco de los individuos sin presencia de alimento se mantiene relativamente constante a lo largo del período de ayuno aumentando en orden al 9%, no encontrándose diferencias significativas (Fig. 17) ($F_{3,12}=1,368$, $P=0,299$). Por otra parte los individuos que presentaron alimento disponible aumentaron su peso seco alrededor de 30%, sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los días de experimentación ($H=4,919$, $P=0,178$) (Fig. 17). Las diferencias observadas entre los grupos en presencia y ausencia de alimento durante el período de experimentación no fueron significativas ($F_{5,18}=1,336$, $P=0,294$).

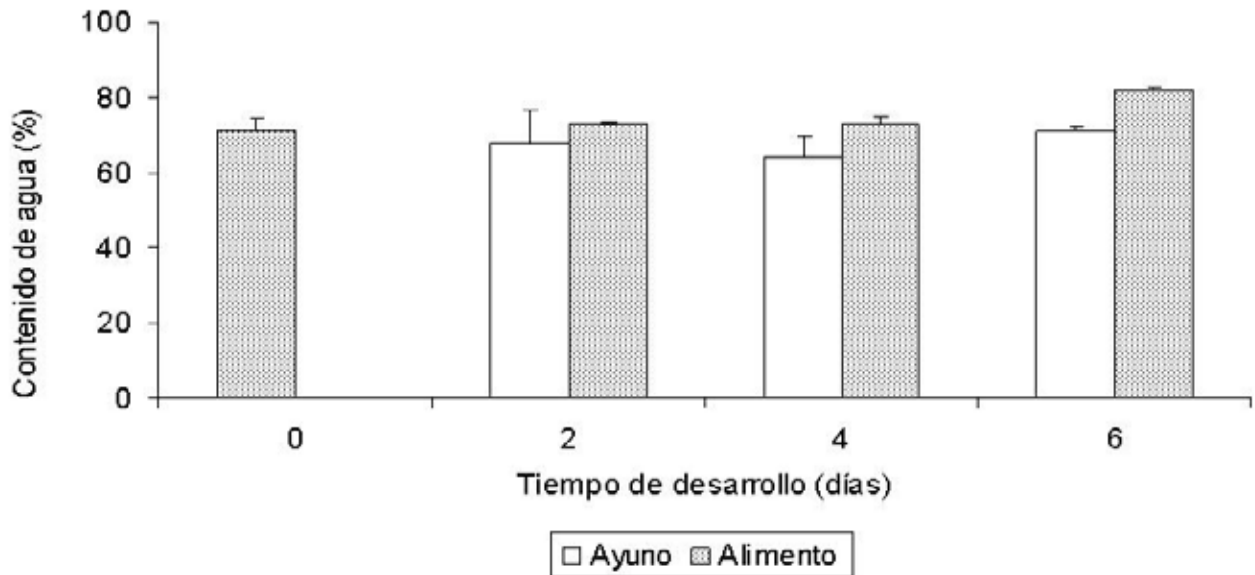


Figura 18. Contenido de agua de *P. laevigatus* bajo condiciones de ausencia y presencia de alimento. Valores promedio + desviación estándar.

El contenido de agua de individuos con período de ayuno aumenta ligeramente a lo largo del desarrollo, aunque no se encontraron diferencias significativas durante el tiempo de ayuno (Fig. 18) ($F_{3,12}=1.410$, $P=0.288$). En presencia de alimento los individuos aumentan su contenido de agua de 73 a 86%, no encontrándose diferencias significativas entre el período de experimentación analizado ($F_{3,14}=1.091$, $P=0.390$) (Fig. 18). Se encontraron diferencias significativas entre los grupos en presencia y ausencia de alimento durante el período de experimentación ($F_{5,18}=5.693$, $P=0.003$).

4.2.4. Largo y ancho de caparazón

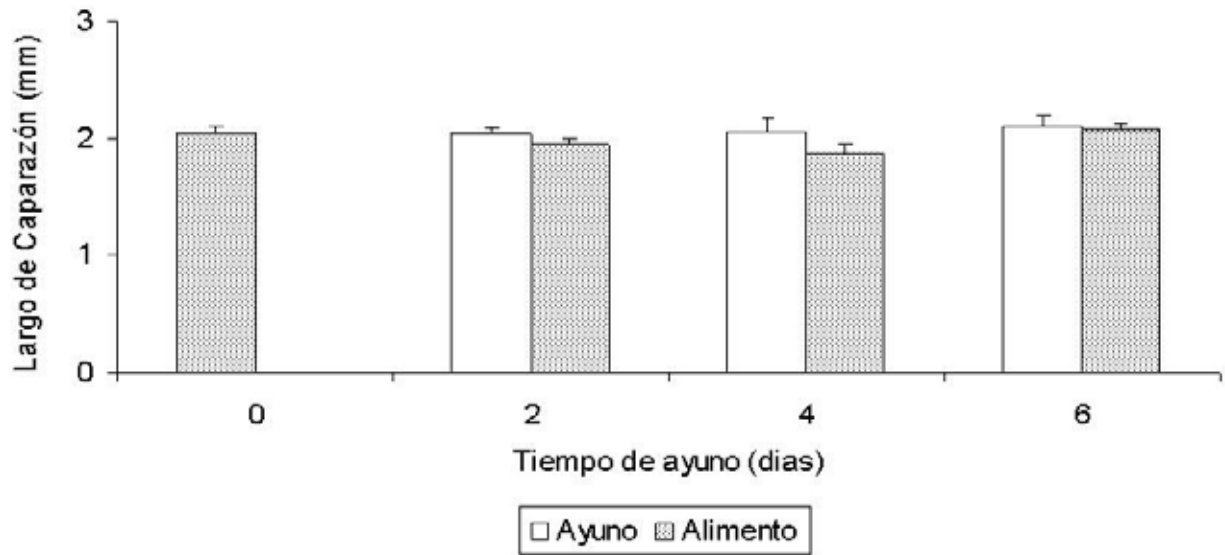


Figura 19. Largo de caparazón de zoea I de *P. laevigatus* bajo condiciones de ausencia y presencia de alimento. Valores promedio + desviación estándar.

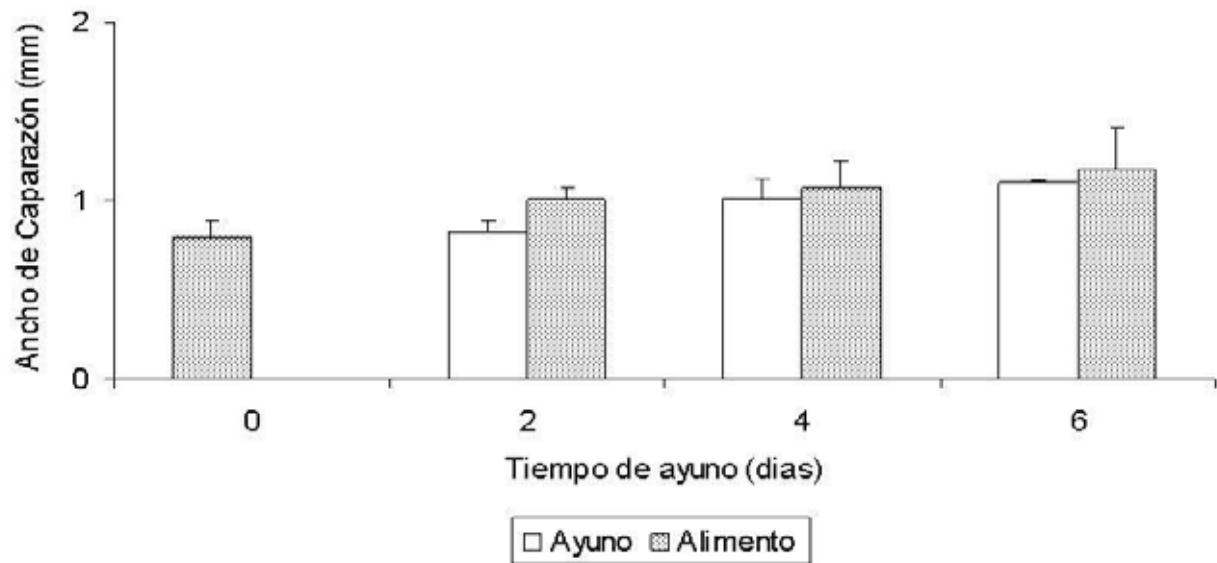


Figura 20. Ancho de caparazón de zoea I de *P. laevigatus* bajo condiciones de ausencia y presencia de alimento. Valores promedio + desviación estándar.

La determinación del largo y ancho de caparazón muestra un aumento de ambas variables tanto en individuos ayunados como los con presencia de alimento. Los individuos ayunados aumentan su largo de caparazón en orden al 5% de 2,04 mm a 2,11 mm (Fig. 19), en tanto que el ancho de caparazón incrementa alrededor de un 20% (Fig. 20). El largo de caparazón no mostró diferencias significativas durante el período de ayuno ($F_{3,12}=0,75$, $P=0,543$), en tanto que sí se encontraron diferencias significativas en la determinación del ancho de caparazón durante el período de experimentación ($F_{3,12}=13,915$, $P<0,001$). Los individuos que presentaron alimento disponible aumentaron significativamente el largo de caparazón en orden al 30% (Fig. 19) ($F_{3,12}=29,733$, $P=<0,001$), sin embargo no se encontraron diferencias significativas en el ancho de caparazón determinado durante el período inicial de desarrollo (Fig. 20) ($F_{3,12}=0,773$, $P=0,531$). Entre los grupos en ausencia y presencia de alimento se encontraron diferencias significativas en el largo de caparazón durante el período de experimentación ($F_{5,18}=10,939$, $P=<0,001$), sin embargo no se encontraron diferencias significativas en el ancho de caparazón observados para los grupos en ausencia y presencia de alimento durante el período de experimentación ($F_{5,18}= 2,238$, $P=0,095$).

4.2.5. Análisis bioquímicos

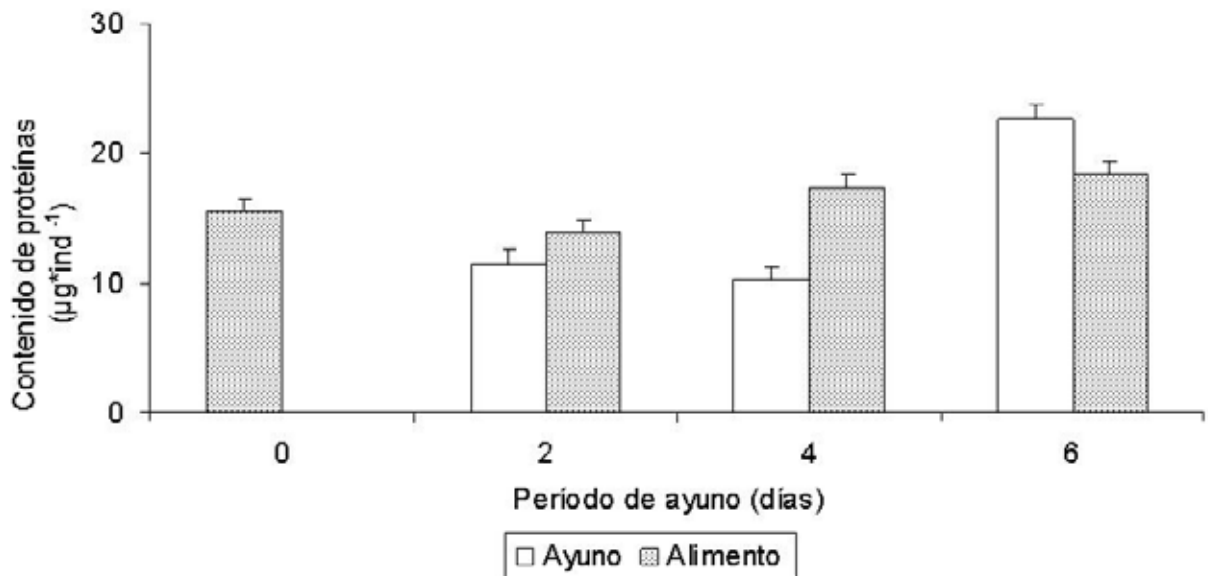


Figura 21. Contenido de proteínas de *P. laevigatus* durante períodos de ausencia y presencia de alimento. Valores promedio + desviación estándar.

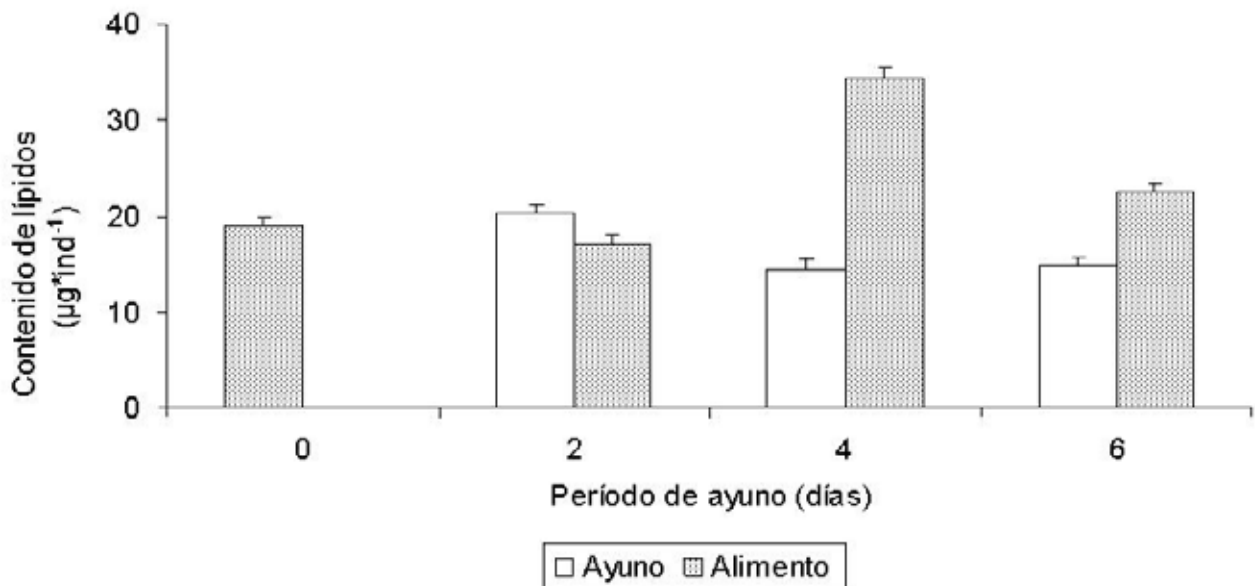


Figura 22. Contenido de lípidos de zoea I de *P. laevigatus* durante períodos de ausencia y presencia de alimento. Valores promedio + desviación estándar.

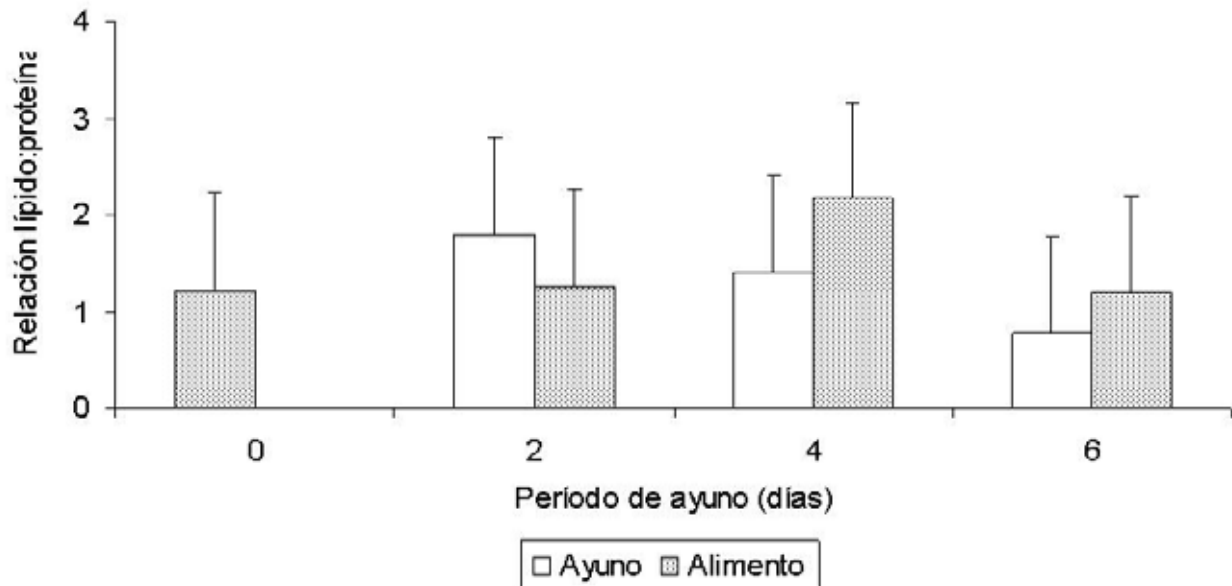


Figura 23. Relación lípido: proteína de zoea I de *P. laevigatus* en presencia y ausencia de alimento. Valores promedio + desviación estándar.

La concentración de proteínas totales disminuye a lo largo del período de ayuno, sin encontrarse diferencias significativas ($F_{3,8}=2,190$, $P=0,167$). Sin embargo las larvas alimentadas aumentan su concentración proteica (Fig. 21), no encontrándose diferencias significativas ($F_{2,6}=1,502$, $P=0,269$). La concentración de lípidos totales de los individuos sometidos a ayuno disminuyó durante el período de experimentación (Fig. 22), aunque no se encontraron diferencias significativas ($F_{3,8}=0,728$, $P=0,563$). Las larvas alimentadas, por otra parte muestran un patrón creciente en la concentración de lípidos totales durante el período analizado, sin encontrarse diferencias significativas durante este período ($F_{2,6}=0,164$, $P=0,851$). La relación lípido: proteína decrece para los individuos ayunados sin embargo las larvas con

presencia de alimento presentan una caída en el día 6 de desarrollo (Fig. 23), no encontrándose diferencias significativas en ambas condiciones (Ayuno, $F_{3,8}=2,145$, $P=0,173$; Alimento, $F_{2,6}=0,200$, $P=0,822$). Las diferencias observadas para proteínas, lípidos y la relación lípido: proteína entre los grupos en presencia y ausencia de alimento durante el período de experimentación no fueron significativas (proteínas: $F_{6,13}=2,169$, $P=0,114$; lípidos: $F_{6,13}=2,537$, $P=0,075$; relación lípido: proteína: $F_{6,13}=1,670$, $P=0,206$).

4.3. Tamaño embrionario y larval y mancha ocular

El volumen del huevo de *L. santolla* aumenta significativamente de 2.31 mm³ a 3.70 mm³ (H=31.429, P=<0.001) (Tabla 2), en tanto que *P. laevigatus* aumenta su volumen de huevo 0.24 mm³ 0.38 mm³ (Tabla 3), no encontrándose diferencias significativas (F_{5,79}=1.233, P=0.301). Para ambas especies el volumen del huevo presenta un aumento de 38% durante el desarrollo embrionario, encontrándose diferencias significativas entre *L. santolla* y *P. laevigatus* durante los estados de desarrollo analizados (F_{11, 166}=373,415, P=<0,001).

A su vez los diámetros mayor y menor del huevo de ambas especies aumentaron a lo largo del desarrollo en orden al 15% (Tablas 2 y 3). Se encontraron diferencias significativas en los diámetros mayor y menor entre *L. santolla* y *P. laevigatus* durante el desarrollo embrionario (diámetro mayor: F_{11,166}= 373,533, P=<0,001; diámetro menor: F_{11,166}=347,841, P=<0,001).

El largo de caparazón (LC) muestra un aumento en orden al 7% para *L. santolla* y *P. laevigatus* durante el desarrollo larval (Tabla 4 y 5) encontrándose diferencias significativas para el desarrollo de ambas especies (*L. santolla*: H=9,742, P=0,045; *P. laevigatus*: F_{3,33}=6,1002, P=0,002). Por otra parte, el ancho de caparazón (AC) mostró un aumento de 11% en *L. santolla* y 40% en *P. laevigatus* (Tabla 4), encontrándose diferencias significativas en el desarrollo larval de ambas especies (*L. santolla*: H=11,475, P=0,022; *P. laevigatus*: F_{3,33}= 12,277, P=<0,001). Las diferencias observadas en el largo y ancho de caparazón durante el desarrollo larval entre ambas

especies fueron igualmente significativas (LC: $H=19,670$, $P=<0,001$; AC: $H=23,695$, $P=<0,001$).

Tabla 2. Diámetros mayor y menor, volumen del huevo de *L. santolla* durante el desarrollo embrionario. (E I- E VI: estadios embrionarios).

	Diam. mayor (mm)		Diam. menor (mm)		Vol. huevo(mm ³)	
Estadios	Prom.	D.E	Prom.	D.E	Prom.	D.E
E-I	1.87	0.17	1.52	0.15	2.31	0.67
E-II	1.9	0.07	1.58	0.07	2.48	0.27
E-III	1.94	0.15	1.61	0.13	2.69	0.67
E-IV	2.18	0.93	1.78	0.15	3.67	0.85
E-V	2.14	0.18	1.71	0.17	3.37	1.01
E-VI	2.19	0.12	1.78	0.14	3.7	0.79
n=93		N=93		n=93		
F=12.645		F=8.607		H=31.429		
P=<0.001		P=<0.001		P=<0.001		

Tabla 3. Diámetros mayor y menor, volumen del huevo a lo largo del desarrollo embrionario de *P. laevigatus*. (E I- E VI: estadios embrionarios).

Estadios	Diam. mayor (mm)		Diam. menor (mm)		Vol. huevo(mm ³)	
	Prom.	D.E	Prom.	D.E	Prom.	D.E
E-I	0.85	0.06	0.72	0.05	0.24	0.05
E-II	0.91	0.18	0.76	0.14	0.31	0.27
E-III	0.91	0.05	0.76	0.05	0.27	0.05
E-IV	0.98	0.07	0.75	0.05	0.28	0.06
E-V	0.90	0.05	0.75	0.05	0.27	0.05
E-VI	1.01	0.09	0.84	0.08	0.38	0.1
n=85		N=85		n=85		
F=2.333		F=1.738		F=1.233		
P=0.05		P=0.136		P=0.301		

Tabla 4. Largo (LC) y Ancho (AC) de caparazón durante el desarrollo larval de *L. santolla*. (ZI- ZIII: estadios zoea, M: megalopa, J: primer juvenil).

Estadio	LC (mm)		AC (mm)	
	Prom.	D.E	Prom.	D.E
Z I	2.340	0.169	1.614	0.169
Z II	2.574	0.175	1.725	0.136
Z III	2.573	0.046	1.722	0.076
M	2.603	0.056	1.650	0.026
J	2.489	0.191	1.737	0.127
n=56			n=56	
H=9.742			H=11.475	
P=0.045			P=0.022	

Tabla 5. Largo (LC) y Ancho (AC) de caparazón durante el desarrollo larval de *P. laevigatus*. (ZI- ZIII: estadios zoea, M: megalopa, J: primer juvenil).

Estadio	LC (mm)		AC (mm)	
	Prom.	D.E	Prom.	D.E
Z I	2.012	0.148	1.128	0.208
Z II	2.355	0.338	1.369	0.376
M	2.239	0.059	1.863	0.175
J	2.153	0.164	1.862	0.186
n=47			n=47	
F=6.102			F=12.277	
P=0.002			P=<0.001	

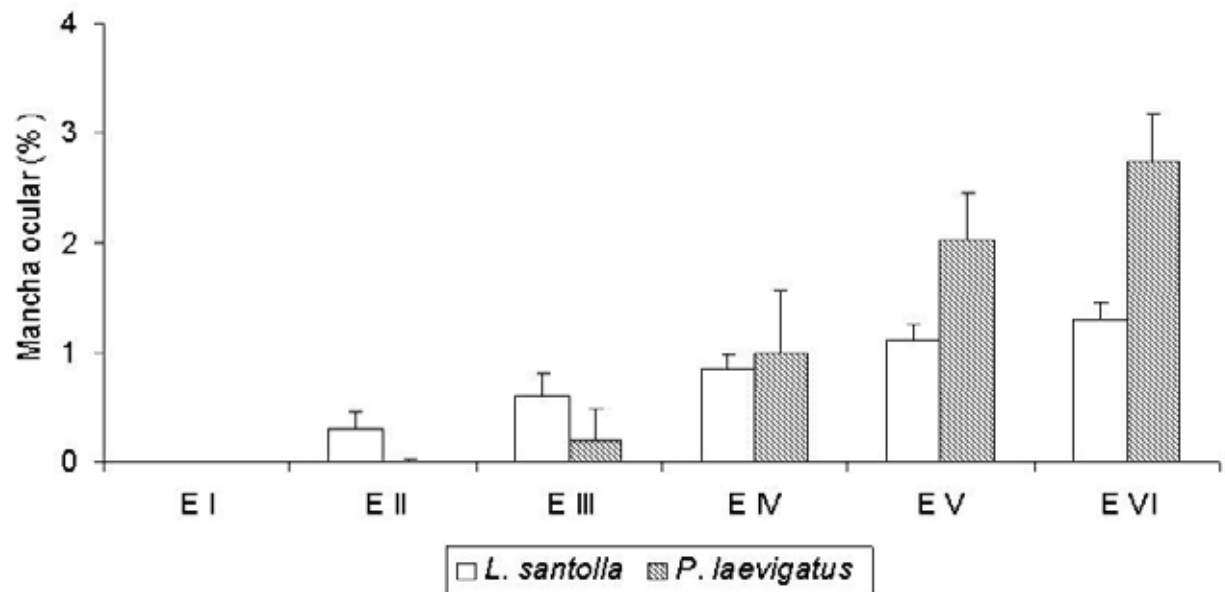


Figura 24. Desarrollo de mancha ocular de *L. santolla* y *P. laevigatus* durante el desarrollo embrionario. Valores promedio + desviación estándar. (E I- E VI: estadios embrionarios)

El desarrollo de mancha ocular aumenta significativamente durante el desarrollo embrionario de *L. santolla* alrededor de 70% ($H=79.858$, $P<0.001$). *P. laevigatus* muestra un aumento de 90% en el desarrollo del sistema ocular, encontrándose diferencias significativas durante el desarrollo ($F_{5,79}=99.723$, $P<0.001$). Las diferencias observadas entre ambas especies estudiadas mostraron ser significativas entre los estados de desarrollo analizados ($H=147,455$, $P<0,001$).

5. Discusión

Se encontraron diferencias significativas en las variables fisiológicas y bioquímicas durante el desarrollo temprano de *L. santolla* y *P. laevigatus* lo que estaría indicando algún tipo de disparidad entre ambos modos de desarrollo. Respecto a la tasa respiratoria se observa una tendencia creciente durante el desarrollo temprano de ambas especies con una fuerte transición desde estadio embrionario a fase larval. Según Petersen & Anger (1997) los cambios en la tasa de respiración durante la embriogénesis reflejan variaciones en la actividad metabólica de un individuo. De acuerdo a lo anterior, los resultados obtenidos muestran un aumento del metabolismo para ambas especies durante el desarrollo temprano.

Sin embargo para el desarrollo larval de *L. santolla* se presenta una disminución de la tasa respiratoria en los estadios de zoea III y megalopa. Esta caída en la respiración también ha sido observada en otras especies de litódidos (Anger, 1996) y se asocian a un cambio conductual provocado principalmente por el asentamiento del individuo (Escobar, 2003). Esta disminución se encuentra igualmente asociada a la tasa de excreción de amonio, observándose una tendencia similar. Si bien no se han realizado estudios en detalle sobre el desarrollo embrionario y larval de ambas especies, los resultados obtenidos para *L. santolla* son concordantes a los obtenidos para otras especies de litódidos (Anger, 1996). Debido a la escasez de estudios sobre fisiología larval de porcelánidos los datos obtenidos no pueden ser comparados con otras especies de la familia, sin embargo los resultados muestran ser similares a estudios

realizados en otras especies de crustáceos (Anger *et al.*, 1990, Lemos & Phan, 2001, Harper & Reiber, 2004, Meyer & Oettl, 2005). Para el caso de embriones las tasas respiratorias de ambas especies concuerdan con valores encontrados para otras especies (Naylor *et al.*, 1999, Baeza & Fernández, 2002, Fernández *et al.*, 2003).

Las variaciones en la excreción corresponden también a un indicador del estado metabólico de un individuo, aunque las pérdidas contempladas por este punto son mucho menores a las causadas por la respiración (Escobar, 2003). En larvas de crustáceos decápodos y en la mayoría de los crustáceos el amonio es el único producto de excreción, mostrando el metabolismo de productos nitrogenados como proteínas y aminoácidos (Anger, 2001). Sin embargo son relativamente pocos los estudios realizados sobre excreción en larvas de crustáceos (para referencias ver Anger, 2001). La excreción de crustáceos decápodos así como también otras tasas metabólicas son influenciadas por muchos factores, como etapas del ciclo de la muda, condiciones de alimentación y nivel de actividad (Comoglio *et al.*, 2005). Las tasas de excreción de amonio por individuo encontradas no muestran diferencias importantes en el desarrollo, sin embargo la tasa de excreción por unidad de peso es altamente superior para *P. laevigatus* en relación a *L. santolla*. Lo anterior indicaría un metabolismo particularmente alto en *P. laevigatus*, donde las proteínas son una fuente importante de energía. Esto se apoya con la disminución de la concentración de proteínas totales observada a lo largo del desarrollo embrionario y larval. Se ha descrito que *L. santolla* por otra parte poseería estrategias para el ahorro de energía durante el desarrollo larval

como parte de su lecitotrofía (Kattner *et al.*, 2003), la baja cantidad de amonio excretado podría sumarse a este tipo de estrategias.

Las menores tasas de excreción y respiración observadas durante el desarrollo larval de *L. santolla* podrían estar asociadas a un comportamiento menos activo (Vinuesa 1982, 1984, Escobar, 2003) interpretándose igualmente como una adaptación de ahorro de energía. Este cambio de comportamiento estaría asociado a una deriva demersal en lugar de una natación planctónica relacionado a un desarrollo lecitotrófico (Thatje *et al.*, 2004). *P. laevigatus*, presenta un comportamiento más activo lo cual es importante durante la vida planctotrófica en cuanto a alimentación, escape de depredadores, dispersión, y vida en un medio más rico en presas.

En cuanto al tamaño del huevo, éste generalmente indica una mayor concentración de nutrientes al interior del huevo, aunque el tamaño también podría estar afectado por otro tipo de factores (Thatje *et al.*, 2004). Los tamaños de huevo encontrados para *L. santolla* y *P. laevigatus* relacionados al contenido bioquímico de éstos muestran una diferencia importante entre las especies estudiadas. Las altas concentraciones de proteínas observadas entran en el rango encontrado para otras especies (para referencias ver Amsler & George, 1984). Se ha establecido que las proteínas son el componente más importante seguido de los lípidos y que estos últimos son la mayor fuente de energía durante el desarrollo embrionario (Petersen & Anger, 1997, Heras *et al.*, 2000, García-Guerrero *et al.*, 2003). La concentración de lípidos totales varían de acuerdo al estado fisiológico, sin embargo el patrón de lípidos es similar en muchos

organismos (para literatura ver Graeve & Wehrtmann, 2003). La degradación de lípidos durante el desarrollo embrionario de crustáceos generalmente se encuentra entre 40-60% del total del peso inicial (Petersen & Anger, 1997). Los resultados obtenidos se encuentran dentro de este rango observándose alrededor de 50 % de utilización de lípidos en *L. santolla* y 30% para *P. laevigatus* durante el desarrollo embrionario. La menor utilización de lípidos durante el desarrollo embrionario de *L. santolla* podría corresponder a algún mecanismo de ahorro de energía como se ha descrito para el caso de las fases larvales (Kattner *et al.* 2003).

Por otro lado durante el desarrollo larval, *L. santolla* utilizaría dos fracciones bioquímicas de su biomasa (lípidos y proteínas) como fuentes energéticas durante el desarrollo larval (Kattner *et al.* 2003). Estudios previos han mostrado la utilización de proteínas como una fuente de energía durante el desarrollo embrionario pudiendo también reincorporarse como tejido al igual que aminoácidos libres (Clarke *et al.*, 1990, Gardner, 2001, Silbert *et al.*, 2004, Rosa *et al.*, 2005). La presencia de una disminución del contenido de proteínas observadas durante el desarrollo temprano ha sido atribuido como mecanismo para conservar la energía lipídica (Amsler & George, 1984), la cual se ha descrito presenta mayor importancia como aporte energético (Petersen & Anger, 1997, Heras *et al.*, 2000, García-Guerrero *et al.*, 2003). Estos mecanismos de ahorro de energía se contraponen con los observados en larvas planctotróficas de crustáceos las que al momento de la eclosión poseen pocas reservas, por lo que presentan altas demandas energéticas y nutricionales, dependiendo fuertemente de la disponibilidad de alimento para crecer y metamorfosear (Morais *et al.* 2002). Esta alta demanda de

energía podría explicar las altas tasas de excreción observadas para *P. laevigatus* en comparación con las de *L. santolla*. Sin embargo, las altas tasas de excreción observadas para *P. laevigatus* también podrían ser explicadas debido a la digestión de proteínas del alimento (Anger *et al.*, 1989).

En general se cree que las especies de profundidad, como *L. santolla*, tienden a producir huevos más grandes, con un mayor tiempo de desarrollo y más reservas lipídicas como una forma de disminuir la mortalidad larval con la profundidad (King & Butler, 1985, Mauchline 1988). Por el contrario, las especies litorales, como *P. laevigatus*, cuyas larvas son liberadas y dispersadas desde la costa presentan una mayor mortalidad larval por depredación y deriva, para este caso se producirían huevos más pequeños con el fin de tener una mayor descendencia (Pollock & Melville-Smith 1993).

Por otro lado, también se ha establecido que huevos de especies de latitudes altas presentan mayor tamaño que los de especies de latitudes bajas, este patrón también estaría dado por efectos de profundidad (para referencias ver Collin, 2003 y Anger, 2001). Esta tendencia se observa a través de los porcelánidos de Chile. Para el caso de porcelánidos encontrados en aguas templadas se reportan volúmenes de huevo sustancialmente menores (López *et al.*, 1997, Hernáez & Palma, 2003) que los reportados para porcelánidos de aguas frías (Lardies *et al.*, 1996). Los resultados obtenidos para *P. laevigatus* muestran volúmenes de huevo similares a los obtenidos por Lardies *et al.* (1996), sin embargo la mayor diferencia en tamaño ocurre hacia fines

del desarrollo lo que podría estar marcado por el aumento de peso húmedo y contenido de agua observados. El aumento del volumen del huevo durante la incubación se ha descrito para muchas especies de crustáceos (Clarke *et al.*, 1990, Biesiot & Perry, 1995, Wehrtmann & Graeve, 1998, Wehrtmann & Kattner, 1998). Este aumento del volumen del huevo estaría asociado a una entrada de agua, provocando un aumento del peso húmedo acompañado de una disminución del peso seco durante el desarrollo (Biesiot & Perry, 1995, Lardies *et al.*, 1996, Wehrtmann & Kattner, 1998). Estudios realizados en cuanto al desarrollo embrionario de *L. santolla* y de otros litódidos no se han realizado por lo que los resultados obtenidos en cuanto a tamaño del huevo no pueden ser comparados.

El contenido de agua presente en huevos de crustáceos varía entre 60% para un estadio inicial del desarrollo a 70-80% en estadios terminales (Valdes *et al.*, 1991). Antes de la eclosión la permeabilidad de la membrana del huevo aumentaría permitiendo la entrada de agua (para referencias ver Rosa *et al.*, 2005). Si bien no está claro si este aumento en el contenido de agua está dado por una absorción o por una retención de agua producida metabólicamente (Amsler & George, 1984), el contenido de agua aumentaría hacia finales del desarrollo embrionario lo que ayudaría en la ruptura de la membrana y a la eclosión de la larva (Valdes *et al.*, 1991). Debido a factores de desecación que pudiera presentar *P. laevigatus* relacionado al ambiente en el que habita, la membrana del huevo sería de mayor grosor a la de huevos de *L. santolla* por lo que la presión osmótica interna al momento de la eclosión sería mayor incitando a una mayor absorción de agua, aunque se requieren estudios relacionados a

la membrana del huevo para afirmarlo categóricamente. El contenido de agua también se encuentra relacionado a los períodos de muda durante el desarrollo larval ya que el espacio entre cutículas antigua y nueva es ocupado por agua facilitando así la exuviación (Pardo *et al.*, 1997).

Respecto al desarrollo del sistema ocular, se cree que la presencia de ojos pedunculados en crustáceos decápodos implicaría una gran importancia para este grupo (Cronin & Jonkins, 2001). El desarrollo del sistema ocular también sería importante como control de la profundidad y en eventos de migración vertical (Cronin & Jonkins, 2001). Particularmente en larvas de anomuros el ojo es altamente complejo siendo utilizado especialmente en especies planctotróficas para la regulación de la profundidad de acuerdo a niveles lumínicos y para evitar depredadores (Anger, 2001). De acuerdo a los resultados obtenidos *P. laevigatus* presenta un mayor desarrollo del sistema ocular que *L. santolla*, dado por el modo de desarrollo que presenta la especie. El hecho que las larvas de *L. santolla* presente un comportamiento demersal y que *P. laevigatus* se ubique en las zonas superiores de la columna de agua influiría también en la formación de un sistema ocular más desarrollado. Por otra parte la mayor velocidad de natación observada en larvas de *P. laevigatus* sumado al desarrollo ocular presentado le permitirían un escape más efectivo de los depredadores.

En cuanto a la ausencia de alimento, el aumento en peso y tamaño de larvas de *P. laevigatus* sometidas a períodos de ayuno indicarían que la energía disponible es utilizada con fines de mantención aunque el crecimiento del individuo igualmente se

realiza pero a un ritmo más lento. Pardo *et al.* (1997) postula que larvas de *P. violaceus* tendrían una alta capacidad de asimilación lo que se vería compensado con una baja resistencia a períodos de ayuno. En *P. laevigatus* podría ocurrir un fenómeno similar siendo capaces de retomar el crecimiento tras un corto período de inanición, aunque se requieren estudios que reafirmen esto. El tipo de alimentación que presenten los individuos durante su desarrollo también es de importancia, Mascetti & Wehrtmann (1996) y Sulkin *et al.* (1998) determinaron que las larvas de crustáceos son capaces de alimentarse de fitoplancton aunque una dieta estricta de microalgas no es capaz de mantener el desarrollo. La disminución en la tasa lípido: proteína se ha descrito como indicador del llamado “punto de no retorno” ya que se comienzan a utilizar lípidos estructurales como fuente de energía (Anger, 2001). Mascetti & Wehrtmann (1996) establecieron que larvas de *P. laevigatus* sometidas a períodos de ayuno no son capaces de continuar con su desarrollo hacia zoea II, esta tendencia también es observada en los resultados fisiológicos y bioquímicos obtenidos en este estudio. Por otra parte la disminución de la tasa lípido: proteína observada para los individuos que presentaron alimento podría estar asociado a eventos de muda. En general las larvas de crustáceos pueden soportar cortos períodos de ayuno, al contrario de larvas de otros invertebrados (moluscos y equinodermos) (para referencias ver Olson & Olson, 1989).

Finalmente, las respuestas encontradas en la fisiología de *L. santolla* y *P. laevigatus* estarían dadas por la disponibilidad de energía que presentaron durante su desarrollo. *L. santolla* si bien posee un mayor contenido de energía, por el modo de desarrollo lecitotrófico existente, presenta una utilización más económica de la energía disponible

tanto durante el desarrollo embrionario como larval (Kattner *et al.*, 2003) lo que de alguna manera estaría modulando sus respuestas fisiológicas hacia tasas menores a las esperadas. *P. laevigatus*, por otro lado, dispone de menores reservas energéticas, principalmente durante el desarrollo embrionario, las cuales son utilizadas mayoritariamente en la formación de un individuo adaptado para un medio con un alto grado de depredación, presentándose altas tasas de excreción y respiración, dando cuenta de un metabolismo más acelerado en comparación al de *L. santolla*, esto sumado a un sistema ocular más desarrollado y una mayor actividad.

Por último, en la comparación de ambas especies estudiadas, los resultados obtenidos muestran una modulación de las tasas fisiológicas de acuerdo al modo de desarrollo presente. Especies planctotróficas presentan un mayor metabolismo durante el desarrollo temprano que especies lecitotróficas por lo que muestran respuestas fisiológicas más elevadas. Por otro lado especies lecitotróficas presentan menores tasas fisiológicas como forma de conservar energía en vista a mantener un desarrollo larval sin alimento. Sin embargo se requieren estudios orientados a conocer si existe una menor utilización de las reservas como una forma de ahorro de energía o se presenta una mejor utilización de ellas por parte de especies lecitotróficas.

Conclusión

Las diferencias observadas entre ambos modos de desarrollo analizados estarían dadas por la disponibilidad de energía que los individuos presentan al momento de la eclosión. Así en un modo de desarrollo planctotrófico las tasas fisiológicas aumentan en torno a la ingesta de alimento, e individuos frente al ayuno disminuyen sus respuestas fisiológicas. Por otra parte, períodos prolongados de ayuno producen daños severos en los individuos los cuales no son capaces de continuar su desarrollo. Las mayores tasas fisiológicas encontradas para el desarrollo planctotrófico de *P. laevigatus* indican un metabolismo más activo en comparación al desarrollo lecitotrófico de *L. santolla*.

Las menores tasas fisiológicas encontradas en el desarrollo lecitotrófico de *L. santolla* podrían corresponder a un mecanismo de ahorro de energía para poder continuar con el desarrollo. Otros mecanismos de ahorro de energía estarían dados por cambios en el sustrato metabólico utilizado, presentándose las proteínas como una fuente de energía adicional.

De esta manera la disponibilidad de energía que presente un individuo en términos de captura de alimento (planctotrofía) o utilización de reservas (lecitotrofía) determina las respuestas fisiológicas durante el desarrollo embrionario y larval en ambos modos de desarrollo.

6. Bibilografía

- Anger, K. (1996) Physiological and biochemical changes during lecithotrophic larval development and early juvenile growth in the northern stone crab, *Lithodes maja* (Decapoda: Anomura). *Mar. Biol.* 126, 283–296.
- Anger, K., Harms, J., Pueschel, C. & Seeger, B. (1989) Physiological and biochemical changes during the larval development of a brachyuran crab reared under constant conditions in the laboratory. *Helgolaender. Meeresunters.* 43, 225-244.
- Anger, K., Montu, M. & de Bakker, C. (1990) Energy partitioning during larval development of the hermit crab *Pagurus bernhardus* reared in the laboratory. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 141, 119–129.
- Anger, K. (2001) The biology of decapod crustacean larvae. Ed. Balkema Publishers, Netherlands. 420 pp.
- Albornoz, L. & Wehrtmann, I. (1996) Aspects of the reproductive biology of *Petrolisthes laevigatus* (Guérin, 1835) (Decapoda, Anomura, Porcellanidae). Part II. Description of the larval development, including the first crab stage, cultivated under laboratory conditions. *Arch. Fish. Mar. Res.* 43 (2), 137-157.

- Amsler, M. & George, R. (1984) Seasonal variation in the biochemical composition of the embryos of *Callinectes sapidus* Rathbun. *Jour. Crust. Biol.*, 4 (4), 546-553.
- Baeza, J. & Fernández, M. (2002) Active brood care in *Cancer setosus* (Crustacea: Decapoda) the relationship between female behaviour embryo oxygen consumption and the cost of brooding. *Functional Ecology*, 16, 241- 251.
- Biesiot, P. & Perry, H. (1995) Biochemical composition of the deep-sea red crab *Chaceon quinquedens* (Geryonidae): organic reserves of developing embryos and adults. *Mar. Biol.*, 124, 407–416.
- Clarke, A., Brown, J. & Holmes, L. (1990) The biochemical composition of eggs from *Macrobrachium rosenbergii* in relation to embryonic development. *Comp. Biochem. Physiol. B* 96, 505– 511.
- Collin, R. (2003) Worldwide patterns in mode of development in calyptraeid gastropods. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 247, 103-122.
- Comoglio, L., Smolko, L. & Amin, O. (2005) Effects of starvation on oxygen consumption, ammonia excretion and biochemical composition of the hepatopancreas on adult males of the False Southern King crab *Paralomis granulosa* (Crustacea, Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 140, 411-416.

- Cronin, T. & Jinks, R. (2001) Ontogeny of Vision in Marine Crustaceans. *Amer. Zool.*, 41, 1098–1107.
- Cuesta, J. A. & Anger, K. (2001) Larval morphology of the sesarmid crab *Armases angustipes* Dana, 1852 (Decapoda, Brachyura, Grapsidea). *J. Crustac. Biol.*, 21, 821–838.
- Diesel, R., Schubartz, C. & Schuh, M. (2000) A reconstruction of the invasion of land by Jamaican crabs (Grapsidae: Sesarminae). *J. Zool., Lond.* 250, 141-160.
- Escobar, H. (2003) Desarrollo de condiciones de cultivo larvario de la centolla *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda, Lithodidae): efecto en la sobrevivencia, fisiología y comportamiento natatorio. Tesis, Escuela de Acuicultura, Facultad de Pesquerías y oceanografía, Universidad Austral de Chile, 105 pp.
- Fernández, M., Ruiz-Tagle, N., Cifuentes, S., Pörtner, H. & Arntz, W. (2003) Oxygen-dependent asynchrony of embryonic development in embryo masses of brachyuran crabs. *Mar. Biol.*, 142, 559-565.
- Garcia-Guerrero M, Racotta I. & Villareal, H. (2003) Variation in lipid, protein and carbohydrate content during the embryonic development of the crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *J Crustac Biol.*, 23, 1–6.

- Gardner, C. (2001) Composition of eggs in relation to embryonic development and female size in giant crabs (*Pseudocarcinus gigas* (Lamarck)). *Mar. Freshw. Res.*, 52, 333– 338.
- Gebauer, P. (2004) Factores físicos y biológicos involucrados en el cierre del eslabón larval y reclutamiento de *Petrolisthes laevigatus* (Guérin, 1835) (Decapoda: Porcellanidae) en el seno de Reloncaví. Tesis Doctoral. Universidad Austral de Chile, 99 pp.
- Graeve, M. & Wehrtmann, I. (2003) Lipid and fatty acid composition of Antarctic shrimp eggs (Decapoda: Caridea). *Polar Biol.*, 26, 55– 61.
- Guzmán, L. & Rios, C. (1986) La doble exponencial, una nueva función para describir la relación talla / fecundidad en la centolla (*Lithodes antarcticus* Jacquinot). En: P. Arenas (de.). La pesca en Chile, Escuelas de Ciencias del Mar, Valparaíso, 103-112.
- Harper, S. & Reiber, C. (2004) Physiological development of the embryonic and larval crayfish heart. *Biol. Bull.*, 206, 78-86.
- Helluy, S.M., & Beltz, B. (1991) Embryonic development of the American lobster (*Homarus americanus*): quantitative staging and characterization of an embryonic molt cycle. *Biol. Bull.*, 180, 372-386.

- Heras, H., Gonzalez-Baro, M. & Pollero, R. (2000) Lipid and fatty acid composition and energy partitioning during development in the shrimp *Machrobrachium borellii*. *Lipids*, 35, 645–651.
- Hernández, P. & Palma, S. (2003) Fecundidad, volumen del huevo y rendimiento reproductivo de cinco especies de porcelánidos intermareales del norte de Chile (Decapoda, Porcellanidae). *Invest. Mar. Valparaíso*, 31 (2), 35-46.
- Kattner, G., Graeve, M., Calcagno, J.A., Lovrich, G.A., Thatje, S. & Anger, K. (2003) Lipid, fatty acid and protein utilization during lecithotrophic larval development of *Lithodes santolla* (Molina) and *Paralomis granulosa* (Jacquinot). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 292, 61–74.
- King, M. & Butler, A. (1985) Relationship of life-history patterns to depth in deep-water caridean shrimps (Crustacea: Natantia). *Mar Biol* 86:129–138.
- Koroleff, F. (1983) Determination of ammonia. In: Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K. Ž. Eds. , *Methods of Seawater Analysis*. 2nd edn. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 150–157.

- Lardies, M. & Wehrtmann, I. (1996) Aspects of the reproductive biology of *Petrolisthes laevigatus* (Guérin, 1835) (Decapoda: Anomura: Porcellanidae). I. Reproductive output and chemical composition of eggs during embryonic development. *Arc. Fish. Mar. Res.*, 43(2), 121-135.
- Lardies, M., Rojas, J. & Wehrtmann, I. (2004) Breeding biology and population structure of the intertidal crab *Petrolisthes laevigatus* (Anomura: Porcellanidae) in central-southern Chile. *Journal of Natural History*, 38, 375-388.
- Levin, L.A., Caswell, H., DePatra, K.D. & Creed, E.L. (1987) Demographic consequences of larval development mode: Planktotrophy vs. lecithotrophy in *Streblospio benedicti*. *Ecology*, 68, 1877-1886.
- Lemos, D. & Phan, V. (2001) Energy partitioning into growth, respiration, excretion and exuvia during larval development of the shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Aquaculture*, 199, 131-143.
- López, L., Jeri, T., González, C. & Rodríguez, S. (1997) Fecundidad y esfuerzo reproductivo de *Petrolisthes granulosus* (Guérin, 1835) en Iquique, Chile (Decapoda, Anomura, Porcellanidae). *Invest. Mar. Valparaíso*, 25, 159-165.

- Lovrich, G.A., Thatje, S., Calcagno, J.A., Anger, K. & Kaffenberger, A. (2003) Changes in biomass and chemical composition during lecithotrophic larval development of the southern king crab, *Lithodes santolla* (Molina). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 288, 65–79.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. & Randall, R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Mascetti, P. & Wehrtmann, I. (1996) Aspects of the reproductive biology of *Petrolisthes laevigatus* (Guérin, 1835) (Decapoda, Anomura, Porcellanidae). Part III. Effects of starvation and different types of diet on larval development under laboratory conditions. *Arch. Fish. Mar. Res.*, 43 (2), 159-170.
- Mauchline, J. (1988) Egg and brood sizes of oceanic pelagic crustaceans. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 43, 251–258.
- McEdward, L. (1997) Reproductive strategies of marine benthic invertebrates revisited: facultative feeding by planktotrophic larvae. *The American Naturalist*, 150 (1), 48-72.
- McLaughlin, P.A., Anger, K., Kaffenberger, A. & Lovrich, G.A. (2001) Megalopal and early juvenile development in *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda: Anomura; Paguroidea: Lithodidae), with notes on zoeal variations. *Invertebr. Reprod. Dev.*, 40, 53–67.

- Meyer, B. & Oetl., B. (2005) Effects of short-term starvation on composition and metabolism of larval Antarctic krill *Euphausia superba*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 292: 263-270.
- Morais, S., Narciso, L., Calado, R., Nunes, M. & Rosa, R. (2002) Lipid dynamics during the embryonic development of *Plesionika martia* (Decapoda:Pandalidae), *Palaemon serratus* and *P. elegans* (Decapoda: Palaemonidae): relation to metabolic consumption. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 242, 195-204.
- Naylor, J.K., Taylor, E.W. & Bennett, D.B. (1999) Oxygen uptake of developing eggs of *Cancer pagurus* (Crustacea:Decapoda: Cancridae) and consequent behaviour of the ovigerous females. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 79, 305–315.
- Olson, R. & Olson, M. (1989) Food limitation of plantotrophic marine invertebrate larvae: does it control recruitment success?. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 20, 225-247.
- Pardo, L., Véliz, D., Wehrtmann, I. & Anger, K. (1997) Efecto de períodos de ayuno en el crecimiento de la zoea I de *Petrolisthes violaceus* (Guérin, 1831) (Decapoda: Anomura: Porcellanidae). *Invest. Mar. Valparaíso*, 25, 255-262.

- Petersen, S. & Anger, K. (1997) Chemical and physiological changes during the embryonic development of the spider crab, *Hyas araneus* L. (Decapoda: Majidae). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 117, 299-306.
- Pollock, D. & Melville-Smith, R. (1993) Decapod life histories and reproductive dynamics in relation to oceanography off Southern Africa. *S.Afr. J. Mar. Sci.*, 13, 205-212.
- Rosa, R., Calado, R., Andrade, A., Narciso, L. & Nunes, M. (2005) Changes in amino acids and lipids during embryogenesis of European lobster, *Homarus gammarus* (Crustacea: Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 140, 241-249.
- Sibert, V., Oullet, P. & Brethes, J.C. (2004) Changes in yolk total proteins and lipid components and embryonic growth rates during lobster (*Homarus americanus*) egg development under a simulated seasonal temperature cycle. *Mar. Biol.*, 144, 1075–1086.
- Sulkin, S., Lehto, J., Strom, S. & Hutchinson, D. (1998) Nutritional role of protists in the diet of first stage larvae of the Dungeness crab *Cancer magister*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 169, 237–242.
- Thatje, S., Lovrich, G., Torres, G., Hagen, W. & Anger, K. (2004) Changes in biomass, lipid, fatty acid and elemental composition during the abbreviated larval development

of the subantarctic shrimp *Campylonotus vegans*. *Jour. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 301, 159-174.

Thatje, S. & Lovrich, G.A. (2003) Decapodid and early juvenile development in the protandrous shrimp *Campylonotus vagans* Bate, 1888 (Crustacea: Decapoda: Caridea), with notes on larval morphology. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 83 (1), 103 – 109.

Thorson, G. (1950) Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biol. Reviews*, 25 (1), 1-45.

Valdes, L., Alvarez-Ossorio, M. & Gonzalez-Gurriarán, E. (1991) Incubation of eggs of *Necora puber* (L., 1767) (Decapoda, Brachyura, Portunidae). Volume and biomass changes in embryonic development. *Crustaceana*, 60 (2), 163: 177.

Vavra, J. & Manahan, D. (1999) Protein metabolism in lecithotrophic larvae (Gastropoda: *Haliotis rufescens*). *Biol. Bull.* 196, 177–186.

Vinuesa, J. (1982) Biología de la reproducción y el desarrollo embrionario y larval de la centolla, *Lithodes antarcticus* Jacquinot, en le Canal Beagle, Tierra del Fuego. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 144 pp.

- Vinuesa, J. (1984) Sistema reproductor, ciclo y madurez gonadal de la centolla (*Lithodes antarcticus*) del Canal Beagle. Contribución N° 441 INIDEP Mar del Plata. República Argentina, 75-95.
- Walter, G. & Lester, R. (2000). The cypris larvae of the parasitic barnacle *Heterosaccus lunatus* (Crustacea, Cirripedia, Rhizocephala): some laboratory observations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 254, 249-257.
- Wehrtmann, I. & Graeve, M. (1998) Lipid composition and utilization in developing eggs of two tropical marine caridean shrimps (Decapoda: Caridea: Alpheidae: Palaemonidae). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 121, 457–463.
- Wehrtmann, I. & Kattner, G. (1998) Changes in volume, biomass, and fatty acids of developing eggs in *Nauticaris magellanica* (Decapoda: Caridea): a latitudinal comparison. *J. Crustac. Biol.*, 18 (3), 413–422.
- Zöllner, N. & Kirsch, K. (1962) Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemein sulfophosphovanillin-Reaktion. *Z.ges. exp. Med.*, 135, 545-561.