



Universidad Austral de Chile

Sede Puerto Montt
Escuela de Acuicultura y Pesquerías

“Evaluación de sistemas de cultivo y dietas para juveniles de *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda, Lithodidae), y obtención de un indicador fisiológico que permita la identificación de individuos con alta tasa de crecimiento, bajo condiciones de laboratorio”

Tesis para optar al Título de Ingeniero en Acuicultura

Profesor patrocinante: Dr. Kurt Paschke

Instituto de Acuicultura

SERGIO ANDRÉS LOYOLA REHBEIN

PUERTO MONTT-CHILE

2009

The most beautiful thing we can experience is the mysterious.

It is the source of all true art and science.

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, en especial a mis padres Carlos y Maria Eugenia y a mi hermano Carlos. Su constante sacrificio y apoyo son motivo de profundo orgullo e inspiración.

Al Dr. Kurt Paschke, excelente persona, docente e investigador, de quién he aprendido mucho. Gracias por su apoyo, en especial durante el proceso de escritura de este manuscrito.

A la Dra. Paulina Gebauer, por su ayuda y apoyo en el desarrollo y finalización de este manuscrito. Gracias por los comentarios y la confianza entregados.

A mi gran amigo, el Dr. Carlos Rosas. Gracias por su permanente disponibilidad y su genial sentido del humor. Agradezco su ayuda y participación en esta tesis.

A todos mis amigos y compañeros de la promoción 2004 de Ingeniería en Acuicultura. Gracias a todos por su compañía y apoyo, en especial a mis amigos Mauricio y Cristian.

Gracias al equipo LECOFIC. A Mauricio Urbina y Juan Pablo Cumillaf por el mantenimiento de las condiciones experimentales, a Sebastián Osoreo por el apoyo en el análisis bioquímico, a Alejandro Riedemann por despejar algunas dudas estadísticas, y a Oscar Barría, Cristian Segura, y Aura Barría por su compañía. Gracias a todos por su apoyo.

Agradezco al proyecto fondef D05I10217 por el financiamiento para realizar esta tesis.

ÍNDICE

Agradecimientos	I
Índice	II
Índice de Figuras	V
Índice de Tablas	VIII
Abstract	IX
Resumen	X
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis	6
1.2 Objetivos	7
1.2.1 <i>Objetivo General</i>	7
1.2.2 <i>Objetivos Especificos</i>	7
2 MATERIALES Y MÉTODOS	8
2.1 Animales Experimentales	8
2.2 Diseño Experimental	9
2.3 Consumo de Oxígeno	10
2.4 Excreción de Nitrógeno	11
2.5 Análisis de Muestras	11
2.6 Cuantificación de Metabolitos	13
2.6.1 <i>Proteínas totales (P)</i>	13
2.6.2 <i>Lípidos totales(L)</i>	14
2.6.3 <i>Glucosa (GLU)</i>	15
2.6.4 <i>Glucógeno (GLY)</i>	16
	II

2.6.5 <i>Triglicéridos (TAG)</i>	16
2.7 Cuantificación de Ácidos Nucleicos	17
2.7.1 <i>Ácido Ribonucleico total (RNA)</i>	18
2.7.2 <i>Ácido Desoxirribonucleico total (DNA)</i>	18
2.8 Cálculo de Índices	19
2.9 Análisis de Datos	22
3 RESULTADOS	23
3.1 Sobrevivencia	23
3.2 Crecimiento	23
3.2.1 <i>Peso y tamaño</i>	23
3.2.2 <i>Tasa de crecimiento</i>	24
3.2.3 <i>Exuvias</i>	27
3.2.4 <i>Biomasa total</i>	28
3.3 Metabolitos	29
3.3.1 <i>Proteínas totales</i>	29
3.3.2 <i>Lípidos totales</i>	29
3.3.3 <i>Glucosa</i>	30
3.3.4 <i>Glucógeno</i>	32
3.3.5 <i>Triglicéridos</i>	32
3.4 Ácidos Nucleicos	34
3.4.1 <i>Ribonucleico total</i>	34
3.4.2 <i>Ácido Desoxirribonucleico total</i>	34
3.5 Fisiología	36

3.5.1 <i>Consumo de Oxígeno</i>	36
3.5.2 <i>Excreción de Nitrógeno</i>	36
3.5.3 <i>Razón O:N</i>	38
3.6 Correlación de Variables e Índices	38
4 DISCUSIÓN	40
4.1 Sobrevivencia	40
4.2 Crecimiento	41
4.3 Metabolitos	43
4.3.1 <i>Proteínas totales</i>	43
4.3.2 <i>Lípidos totales</i>	44
4.3.3 <i>Glucosa</i>	44
4.3.5 <i>Glucógeno</i>	45
4.3.4 <i>Triglicéridos</i>	45
4.4 Ácidos Nucleicos	46
4.4.1 <i>Ácido Ribonucleico total</i>	46
4.4.2 <i>Ácido Desoxirribonucleico total</i>	46
4.5 Fisiología	47
4.5.1 <i>Consumo de Oxígeno</i>	47
4.5.2 <i>Excreción de Nitrógeno</i>	47
4.5.3 <i>Razón O:N</i>	48
4.6 Índices de condición	49
5 BIBLIOGRAFÍA	52

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.- *L. santolla*. Desembarques de centolla (en toneladas de centolla capturada) a nivel nacional (FAO, 2007). 2
- Figura 2.- *L. santolla*. Curva de crecimiento (en milímetros de largo de caparazón) de individuos juveniles en condiciones de laboratorio (Paschke *et. al.*, 2006). 4
- Figura 3.- *L. santolla*. Diseño experimental. Considerando el momento de cambio (de sistema de mantención masivo-individual) y de alimentación (artemia-chorito-dieta inerte). Para efectos de esta tesis se considerará un $n = 7$ individuos para cada tratamiento. 9
- Figura 4.- *L. santolla*. Preparación (a) y lectura (b) de las muestras para análisis bioquímico en el LECOFIC, Universidad Austral de Chile, sede Puerto Montt. 12
- Figura 5.- *L. santolla*. Supervivencia (en porcentaje) para cada tratamiento. Valores promedio + desviación estándar (solo para cultivo masivo). Distintas letras representan diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA, $p < 0,05$). 24

Figura 6.- *L. santolla*. Crecimiento en miligramos de peso seco, DW (A-B) y milímetros de largo de caparazón, CL (C-D) para cada tratamiento, considerando el inicio (día 0), intermedio (día 67) y final (día 138) del experimento. Valores promedio + desviación estándar. Distintas letras representan diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de 2 vías, $p < 0,05$). 25

Figura 7.- *L. santolla*. Tasa de crecimiento en miligramos de peso seco por día (A-B) y largo de caparazón en milímetros por día (C-D) para cada tratamiento (ver leyenda en figura 5), considerando las mediciones intermedia (día 67) y final (día 138) del experimento. Valores promedio + desviación estándar. Distintas letras representan diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de 2 vías, $p < 0,05$). 26

Figura 8.- *L. santolla*. Intervalo de tiempo entre cada muda (días) para cada dieta dentro del sistema de cultivo individual. Valores promedio + desviación estándar. Distintas letras representan diferencias significativas entre tratamientos (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). 27

Figura 9.- *L. santolla*. Composición proximal (proteínas (A-B), lípidos (C-D) y glucosa (E-F)) en microgramos por miligramo de individuo para cada tratamiento (ver leyenda en figura 6), considerando el inicio (día 0), intermedio (día 67) y final (día 138) del experimento. Valores promedio + desviación estándar. Distintas letras representan diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de 2 vías, $p < 0,05$). 31

Figura 10.- *L. santolla*. Composición de las reservas energéticas (glucógeno (A-B) y triglicéridos (C-D)) en microgramos por miligramo de individuo para cada tratamiento (ver leyenda en figura 6), considerando el inicio (día 0), intermedio (día 67) y final (día 138) del experimento. Valores promedio + desviación estándar. Distintas letras representan diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de 2 vías, $p < 0,05$). 33

Figura 11.- *L. santolla*. Niveles de ácidos nucleicos (ácido ribonucleico (A-B) y ácido desoxirribonucleico (C-D)) en microgramos por miligramo de individuo para cada tratamiento (ver leyenda en figura 6), considerando el inicio (día 0), intermedio (día 67) y final (día 138) del experimento. Valores promedio + desviación estándar. Distintas letras representan diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de 2 vías, $p < 0,05$). 35

Figura 12.- *L. santolla*. Tasas de consumo de oxígeno ($\mu\text{g O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) (A-B), excreción de nitrógeno ($\mu\text{g N-NH}_3 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) (C-D), y razón O:N (E-F) para cada tratamiento (ver leyenda en figura 6), considerando el inicio (día 0), intermedio (día 67) y final (día 138) del experimento. Valores promedio + desviación estándar. Distintas letras representan diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de 2 vías, $p < 0,05$). 37

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- <i>L. santolla</i> . Composición proximal (porcentaje de proteínas, lípidos y carbohidratos) de las dietas.	10
Tabla 2.- <i>L. santolla</i> . Producción total de biomasa (miligramos) para cada tratamiento al final de experimento. Valores promedio.	28
Tabla 3.- <i>L. santolla</i> . Correlación entre la tasa de crecimiento en peso seco ($\text{mg}\cdot\text{día}^{-1}$) de todos los tratamientos y las variables metabólicas y fisiológicas medidas e índices derivados de estas. Valores del coeficiente de correlación de Pearson (R).	39

RESÚMEN

La centolla austral, *Lithodes santolla*, es un cangrejo litódido que habita las aguas templado-frías de la costa Pacífica al sur del paralelo 40° S en la zona sur austral de Sudamérica. Su alta demanda y valor comercial, junto con una pesquería en estado preocupante han fomentado iniciativas para el desarrollo de su cultivo a escala comercial, el cual en etapa experimental ha encontrado una alta variabilidad en el crecimiento de los individuos. El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto del sistema de cultivo y dieta sobre los juveniles de *L. santolla*, junto con la obtención de un indicador fisiológico y/o bioquímico que permita la identificación de individuos con alta tasa de crecimiento. Individuos juveniles fueron mantenidos bajo seis tratamientos distintos, derivados de la interacción de tres dietas (pellet, chorito y artemia) y dos sistemas de cultivo (individual y masivo), durante 138 días. Los parámetros fisiológicos y bioquímicos de los juveniles de *L. santolla* fueron afectados por las condiciones de alimentación y cultivo, teniendo como mejor tratamiento a la interacción entre la dieta artemia y el sistema de cultivo masivo, logrando las tasas de crecimiento más altas y la mayor producción de biomasa. Los individuos con mayor tasa de crecimiento exhibieron un alto coeficiente de asociación con los índices P:DNA, RNA:DNA y O:N como índice no invasivo, por lo cual se recomienda la utilización de estos como indicadores de crecimiento.

ABSTRACT

The southern king crab, *Lithodes santolla*, is a lithodid crab inhabiting the cold-temperate waters of the Pacific coast in the southern part of South America, south of the 40° S parallel. Its high demand and commercial value together with a concerning state of the fisheries has encouraged initiatives for the development of a commercial-scale culture which, in its experimental phase, has encountered a high variability in the growth of the individuals. The aim of this thesis is to evaluate the effect of the culture system and the diet over *L. santolla* juveniles, and to obtain a physiological and/or biochemical index which allows the detection of individuals with high growth rates. Juvenile individuals were reared under six different treatments, derived from the interaction between three diets (pellet, mussel and artemia) and two culture systems (individual and massive), for 138 days. The physiological and biochemical parameters of juvenile *L. santolla* were affected by the culture and feeding conditions, being the interaction of artemia diet and massive culture system the best treatment, achieving the higher growth rates and biomass production. Individuals with a high growth rate showed a high association with the P:DNA and RNA:DNA indexes and also the O:N as a non-invasive index, therefore the use of these indexes as growth indicators is recommended.

1 INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, los cangrejos litódidos constituyen recursos naturales de alto valor comercial. Estos organismos habitan las aguas templado-frías de ambos hemisferios, presentando un mayor número de especies en la zona norte del Océano Pacífico (Zaklan, 2001), sector en el que varias especies son explotadas desde principios de siglo, entre ellas: *Paralithodes camtschaticus* (red king crab), *P. platypus* (blue king crab) y *Lithodes aequispina* (golden king crab). En Chile la centolla austral, *Lithodes santolla*, habita las aguas templado-frías de la costa Pacífica al sur del paralelo 40° S en la zona sur austral de Sudamérica. Como organismo submareal estricto se distribuye entre los 5 y 700 metros de profundidad, en aguas con temperaturas entre 3 y 15° C (Retamal, 1999). Su explotación con fines comerciales data desde hace más de 70 años, aprovechando su alta densidad y el acceso relativamente sencillo a este recurso que ocurre a bajas profundidades (Lovrich, 1997), concentrándose principalmente en el archipiélago de Tierra del Fuego. Las capturas de centolla se mantuvieron bajo las 500 t hasta mediados de los años 70 (Figura 1). En la década siguiente, con el colapso de la pesquería de *P. camtschaticus* en el mar de Bering (Blau, 1985), se produjo un incremento muy importante en las capturas a nivel nacional como consecuencia del aumento de las exportaciones de este recurso, llegando a un máximo de 2.755 t en 1983, desde entonces las exportaciones han seguido aumentando debido a la alta demanda en el mercado internacional, acrecentada en momentos por la ocurrencia de nuevos declives en las pesquerías, como el de *P. platypus* en la década del 90.

Los desembarques de *L. santolla* tienen como principal destino a Japón y Estados Unidos, concentrando aproximadamente un 90% de las exportaciones (FAO, 2007), sin embargo su pesquería está clasificada en estado preocupante por la Subsecretaría de pesca (Guzmán *et. al.*, 2005), ante lo cual han surgido iniciativas que buscan realizar la investigación y desarrollo del cultivo de esta especie. Es así como en nuestro país, en el año 2002, comienza el desarrollo experimental del cultivo de *L. santolla*, realizado en el Laboratorio de Ecofisiología de Crustáceos (LECOFIC) de la Universidad Austral de Chile, sede Puerto Montt, financiado por los proyectos Fondef D99I1087, D02I1163 y D05I10217. Esta iniciativa también ha sido abordada por otros países en donde se realiza pesca extractiva de litódidos con fines comerciales, principalmente con *P. camtschaticus* (Persselin, 2006; Kovatcheva, 2006; Stevens, 2006).

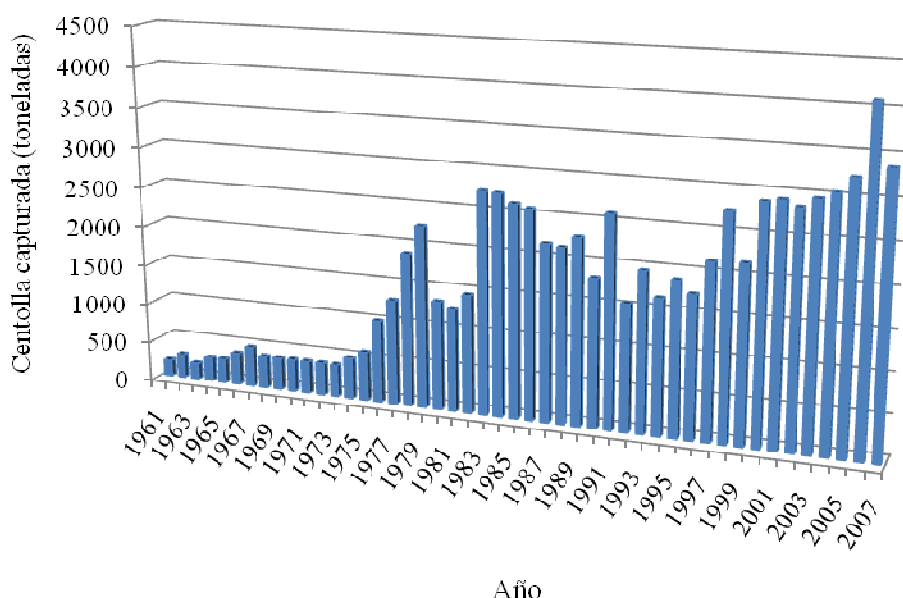


Figura 1.- *L. santolla*. Desembarques de centolla (en toneladas de centolla capturada) a nivel nacional (FAO, 2007).

En el desarrollo experimental del cultivo de *L. santolla* se ha encontrado una alta variabilidad en el crecimiento de individuos juveniles, especialmente después del cuarto mes de edad en adelante (Figura 2). En este ámbito las variaciones individuales tanto en crecimiento como en conducta ya han sido reportadas en crustáceos (Wolff, 1978; Atema & Cobb, 1980; Pérez-Rostro & Ibarra, 2003). Una de las grandes causas de estas variaciones, ampliamente reconocida en distintas especies, es la conformación de jerarquías de dominancia, con individuos dominantes exhibiendo mayor apetito y crecimiento (Jobling *et al.*, 1995). Sin embargo, estas diferencias individuales son no sólo una consecuencia de las interacciones entre los individuos, sino también inherente a éstos, y por ende, genéticamente ligada (Valente *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 2005; Silverstein *et al.*, 2005).

El crecimiento es un factor productivo de alta importancia por muchas razones, entre las cuales destacan los costos de alimentación, que en la acuicultura varían entre un 30 y un 70% del costo variable de producción (Shang, 1990). Dado que, por una parte, el origen de la esta variabilidad en el crecimiento es probablemente complejo, interactuando varios factores simultáneamente, y que tal variabilidad tiene importantes efectos en la producción de este recurso, resulta de gran interés el conocer la forma en que factores como el tipo de alimento suministrado y las variaciones del entorno o sistema de cultivo modifican las reacciones internas de estos organismos a distintos niveles, a lo cual se suma el interés de obtener medidas puntuales de índices de crecimiento, las cuales son muy útiles en estudios de fisiología comparativa y en la evaluación del funcionamiento de los organismos en la acuicultura, entre otros (Anger, 2001).

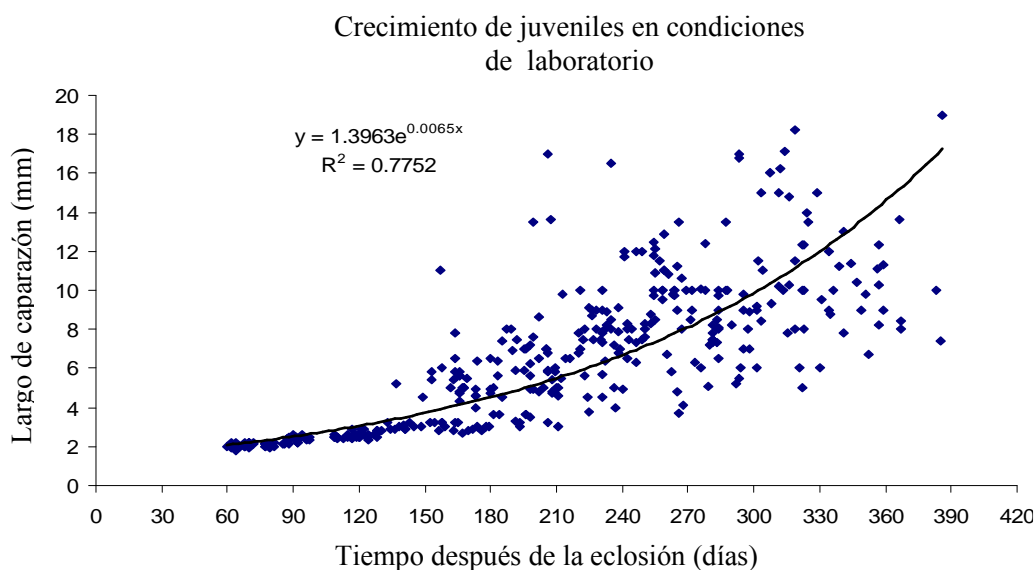


Figura 2.- *L. santolla*. Curva de crecimiento (en milímetros de largo de caparazón) de individuos juveniles en condiciones de laboratorio (Paschke *et al.*, 2006).

Individuos en pleno proceso de crecimiento requieren reservas energéticas para poder mantenerse en niveles óptimos de condición fisiológica, es decir, aquellos individuos con mejores reservas energéticas poseerán una condición fisiológica de alto nivel y, por lo tanto, es de esperar que tengan un mejor crecimiento y supervivencia (Anger, 2001). Algunas relaciones utilizadas, basadas en el peso seco (DW), contenidos totales y porcentuales de lípidos (L), proteínas (P) y acilglicéridos (TAG), han servido como indicadores de condición fisiológica (Anger, 2001). Los índices derivados de ácidos nucleicos, en particular, la proporción RNA:DNA también han sido utilizados como medidores indirectos, a nivel de individuo, de las tasas instantáneas de acumulación de biomasa en peces (Bulow, 1970; Buckley, 1984;), moluscos (Chícharo *et al.*, 2001; Okumura *et al.*, 2002) y crustáceos (Juinio & Cobb 1994; Jayaprakas & Sambhu 1996; James-Pirri & Cobb 1997; Lemos *et al.*, 2002;

Chícharo *et al.*, 2007). La relación RNA:DNA se basa asumiendo que la cantidad de DNA es estable bajo distintas situaciones ambientales en las células somáticas de cada especie, mientras que la cantidad de RNA varía directamente según la tasa de síntesis proteica (Bulow, 1987). Así, organismos en buen estado tienden a poseer un alto valor en la relación RNA:DNA en comparación a aquellos en mal estado (Bulow, 1987; Robinson & Ware, 1988). La característica común de todas estas técnicas, es el hecho de que se realizan post-mortem.

Técnicas que permiten la medición de índices de condición fisiológica en individuos vivos, mediante procedimientos no invasivos son, por ejemplo, la cuantificación del consumo de oxígeno y la excreción de nitrógeno, las cuales consideran sólo la incubación de los organismos. Un indicador derivado de la interacción entre estas variables es la relación oxígeno:nitrógeno (O:N). Ésta es comúnmente aceptada como indicador del sustrato metabólico utilizado para la producción de energía (Mayzaud & Conover, 1988). La utilización de esta puede permitir la estimación de crecimiento de un organismo al conocer el sustrato metabólico utilizado (proteínas, lípidos y/o carbohidratos).

1.1 Hipótesis

H₀₁: Los parámetros fisiológicos de individuos juveniles de *L. santolla* no son afectados por las condiciones de alimentación y cultivo.

H₀₂: Los individuos juveniles de *L. santolla* con mayor tasa de crecimiento no presentan asociación con un indicador fisiológico.

1.2 Objetivos

1.2.1 *Objetivo General*

Evaluar el efecto del sistema de cultivo y la dieta sobre juveniles de *L. santolla*, junto con la obtención de un indicador fisiológico y/o bioquímico que permita la identificación de individuos con alta tasa de crecimiento, bajo condiciones de laboratorio.

1.2.2 *Objetivos Específicos*

.- Describir y cuantificar el efecto de la dieta y el sistema de cultivo sobre la supervivencia de juveniles de *L. santolla*.

.- Describir y cuantificar el efecto de la dieta y el sistema de cultivo sobre el crecimiento de juveniles de *L. santolla*.

.- Describir y cuantificar el efecto de la dieta y el sistema de cultivo sobre la fisiología, concentración de metabolitos y ácidos nucleicos de juveniles de *L. santolla*.

.- Analizar la correlación entre el crecimiento y distintos índices fisiológicos y bioquímicos en juveniles de *L. santolla*.

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 Animales Experimentales

Los individuos juveniles de *L. santolla* fueron obtenidos del Laboratorio de Ecofisiología de Crustáceos (LECOFIC) de la Universidad Austral de Chile, Campus Puerto Montt. Esto se consiguió luego del desove de una hembra ovígera obtenida desde el ambiente natural y acondicionada en laboratorio, manteniéndolos en un sistema de cultivo larval, posteriormente, ser sometidos a distintas condiciones de dieta y densidad de cultivo.

Animales recién metamorfoseados, juvenil I (provenientes de la misma progenie), se mantuvieron en sistemas de cultivo larval, alimentados con nauplii de *Artemia*. Una vez que los juveniles alcanzaron la talla predeterminada para experimentación, 2.5mm largo de caparazón, fueron separados en los respectivos tratamientos. La talla predeterminada para el experimento se basó en los resultados obtenidos de la curva de crecimiento del proyecto FONDEF D02I1163, cuando los individuos aún presentan un crecimiento similar (Figura 2). Todos los tratamientos se realizaron con agua de mar circulante a 12°C y una densidad constante.

2.2 Diseño experimental

Para este estudio se consideraron 2 factores a evaluar: la dieta (pellet - chorito - adultos de artemia) (Tabla 1) y el sistema de cultivo (individual - masivo). La combinación de estos dos factores forma seis tratamientos distintos entre sí. El tiempo también fue considerado como factor al analizar las variables fisiológicas y bioquímicas correspondientes a los días 0, 67 y 138. Cada tratamiento individual constó de 30 animales, cada uno de ellos considerado como réplica del tratamiento. Cada tratamiento masivo comprendió tres réplicas, cada una de ellas compuesta de 30 individuos (Figura 3). Se monitoreó diariamente la mortalidad y la presencia de exuvias. Los experimentos se controlaron por 138 días, incluyendo como mínimo 2 mudas durante el transcurso del experimento, considerando sólo la segunda muda como efecto de las condiciones experimentales.

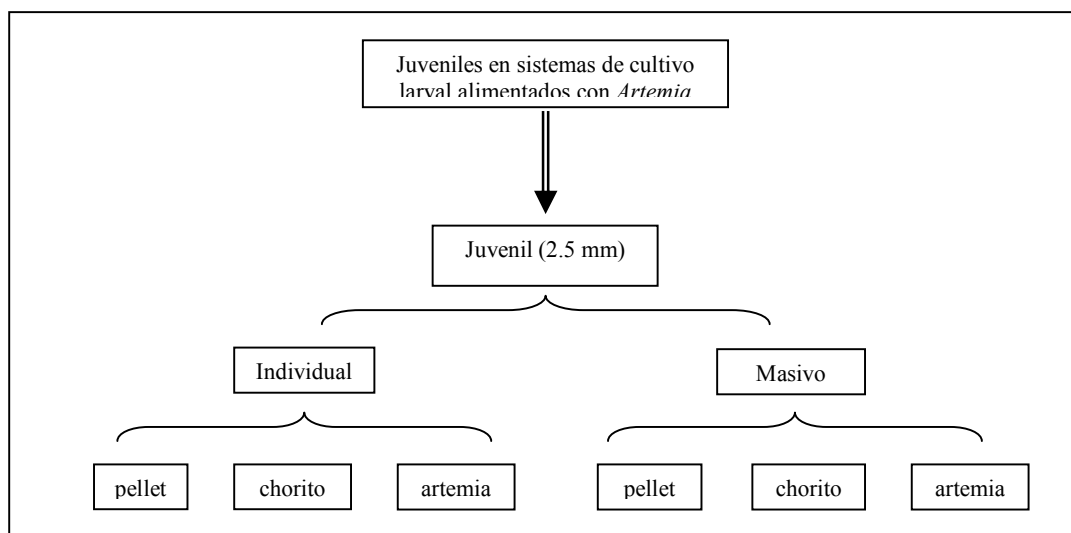


Figura 3.- *L. santolla*. Diseño experimental. Considerando el momento de cambio de sistema de cultivo (individual-masivo) y de alimentación (pellet-*Mytilus*-*Artemia*).

Tabla 1.- *L. santolla*. Composición proximal (porcentaje de proteínas, lípidos y carbohidratos) de las dietas.

Dieta	Proteínas (%)	Lípidos (%)	Carbohidratos (%)
<u>pellet (Farías, com. pers.)</u>	46,6 ± 0,9	13,5 ± 2,2	30,3 ± 10,1
<u>chorito (Okumu & Stirling, 1998)</u>	35,5 ± 7,5	12,7 ± 4,5	15,5 ± 7,5
artemia (Landau, 1987)	50,8 ± 0,2	10,7 ± 0,7	3,6 ± 0,3

2.3 Consumo de Oxígeno

El consumo de oxígeno fue determinado mediante la incubación de los animales en cámaras respirométricas de 60ml, con agua de mar (30 PSU y 12° C) filtrada a 1 µm y esterilizada con UV. Cada cámara se conectó a un micro-sensor de oxígeno de flujo FTCH-TF, conectado a un equipo Presens, Modelo MICROX TX-3. La concentración de oxígeno se monitoreó hasta que esta se mantuvo estable. Se realizaron 3 mediciones de oxígeno, al inicio, al cabo de una hora y al cabo de dos horas. El equipo entregó los datos de concentración en miligramos de oxígeno por litro, por lo cual se procedió a realizar las correspondientes transformaciones, obteniendo primero la cantidad de oxígeno consumido en la cámara y luego dividiéndola por el peso del individuo y luego por el número de horas que duró la incubación. El consumo de oxígeno se midió bajo metabolismo rutinario, definido como el metabolismo mínimo de actividad (Wilmer *et. al.*, 2000).

2.4 Excreción de Nitrógeno

Luego de las estimaciones del consumo de oxígeno, en las mismas cámaras respirométricas, los animales fueron incubados por 3 horas en 20ml de agua de mar (30 PSU y 12° C) filtrada a 1 μm y esterilizada con UV. Transcurrido este tiempo, se tomaron 250 μl en triplicado por cada muestra para la reacción colorimétrica siguiendo el método de indofenol de Koroleff & Grasshoff (1983), adaptado para microplacas de titración (Paschke, 1998), utilizando un lector de placas (Thermo™ Multiscan Spectrum®).

2.5 Análisis de Muestras

Al finalizar las incubaciones y sus respectivas mediciones los animales fueron lavados con agua destilada para extraer las sales superficiales, luego estos fueron fotografiados (Canon PowerShot S80) y las imágenes procesadas por un software gráfico (Media Cybernetics Inc., Image-Pro Plus) para estimar la longitud del largo de caparazón (CL). Después se procedió a congelar las muestras a -80°C en un ultrafreezer (Thermo Scientific™, Forma Series 700). Posteriormente se liofilizaron los individuos (Savant, Novalyphe NL 150), para luego pesarlos en una balanza Precisa 95SM, Germany para estimar su peso seco (DW), en seguida se almacenaron en un ultrafreezer a -80°C para su posterior análisis. Para efectos del análisis bioquímico de muestras de esta tesis se consideró un $n = 7$ para cada tratamiento.

Los individuos liofilizados fueron homogenizados en un gabinete de trabajo tipo campana de laboratorio, sin extractor (Figura 4-a). Previo al procesamiento de las muestras, el gabinete fue higienizado con inactivador de enzimas nucleasas (Gene Choice™, RNase free®) y mantenido con luz UV durante la noche previa al análisis. Los materiales a utilizar fueron previamente lavados con dimetil pirocarbonato (DMPC) al 0,1%, incubándolos (37°C, toda la noche) y posteriormente autoclavándolos por 15 minutos para inhibir la acción de nucleasas. La homogenización de la muestra se realizó con un mortero triturador de tejido (Kontes Scientific™, Rnase-Free Disposable Pellet Pestles®), impulsado por un motor inalámbrico (Kontes Scientific™, Pellet Pestle® Cordless Motor), ambos libres de nucleasas, en un microtubo de 1,5ml con 1000µl de agua ultrapura (Barnstead™, Easypure® II) libre de nucleasas (tratada con DMPC al 0,1% incubada (37°C, toda la noche) y posteriormente autoclavada por 15min) mantenido en hielo. Finalmente, el tejido homogeneizado fue separado en submuestras, para ser sometidas a análisis de cuantificación de ácidos nucleicos y metabolitos.

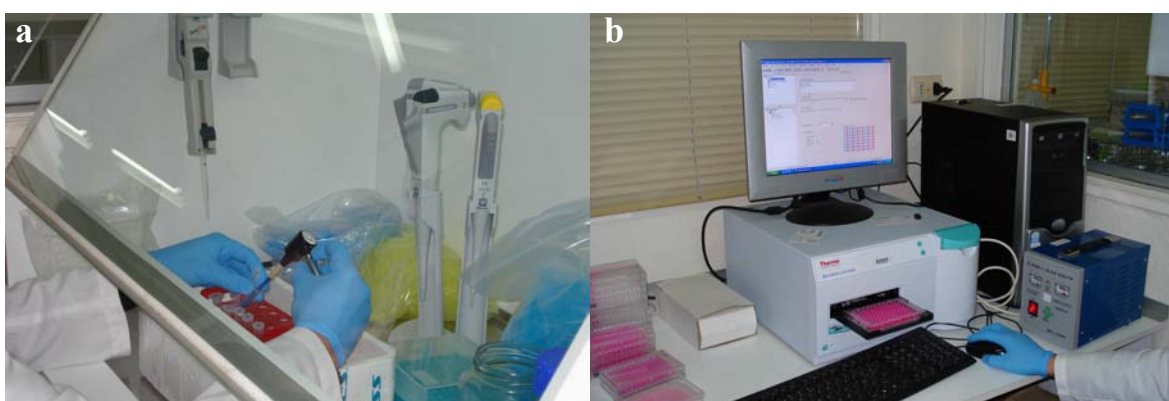


Figura 4.- *L. santolla*. Preparación (a) y lectura (b) de las muestras para análisis bioquímico en el LECOFIG, Universidad Austral de Chile, sede Puerto Montt.

2.6 Cuantificación de Metabolitos

La submuestra obtenida para la cuantificación de metabolitos fue homogeneizada nuevamente en un sonicador (Branson Sonifier 150) y desde este homogeneizado final se extrajo la cantidad requerida para cada protocolo de cuantificación, siendo sometidos a sus respectivas centrifugaciones.

2.6.1 *Proteínas totales (P)*

Las proteínas totales se cuantificaron según el método espectrofotométrico del ácido bicinconínico para proteínas (Thermo Scientific™ Bicinchoninic acid method, micro BSA Protein Assay Kit.), el método se basa en la detección del ion cuproso (Cu^{+1}), el cual se forma cuando el ión cúprico (Cu^{+2}) de las proteínas es reducido en un ambiente alcalino. Un producto de color púrpura se forma por la quelación de dos moléculas de BCA con un ión cuproso (Cu^{+1}). Este complejo soluble en agua presenta una fuerte absorbancia a 562 nm siendo linealmente positiva a medida que aumenta la concentración de proteínas.

En microtubos Eppendorf® previamente rotulados se agregaron 30µl del homogeneizado inicial, el cual se diluyó en 280µl de agua ultrapura, agitándose en un vortex, luego se llevaron 150µl por duplicado a una microplaca de titración (Costar® 3595). La solución estándar ($2\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) se diluyó para obtener la solución de trabajo (WSPro): 75µl de solución de trabajo fue diluido en 925µl de agua destilada ($0,15\mu\text{g BSA } \mu\text{l}^{-1}$). Luego se procedió a realizar la curva de calibración por duplicado en la microplaca y posteriormente se preparó el reactivo de trabajo (WR) (para una microplaca: 7500µl de Reactivo A, mas 7400µl

de Reactivo B, más 300µl Reactivo C, los cuales se mezclaron en fresco), de esta mezcla se agregaron 150µl a cada muestra y a la curva de calibración. Se agitó por 10 segundos en el lector de microplacas y luego se incubó (37°C, dos horas) en un thermomixer (Eppendorf™, Thermomixer®). Transcurrido el tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos, protegido de la luz. Finalmente se leyó la absorbancia a 562 nm en el lector de microplacas (Figura 4-b).

2.6.2 Lípidos totales (L)

Los lípidos totales se cuantificaron de acuerdo al método de sulfosfosvainillina para lípidos totales según Zöllner & Kirsh (1962), utilizando colesterol como estándar. Los lípidos séricos incluyendo el colesterol, forman con el ácido sulfúrico un Ion de carbono que reacciona con la fosfovainillina produciendo un complejo de color violeta cuya intensidad se mide colorimétricamente.

En microtubos Eppendorf® previamente rotulados se depositaron 60µl del homogeneizado inicial, luego a cada tubo se le agregaron 450µl de cloroformo metanol (CHCl₃/CH₃OH) (2:1) agitándose en vortex. Luego los microtubos fueron centrifugados (8000g, 4°C, 20 min). Posteriormente, se traspasaron 350µl de la fase inferior, conteniendo los lípidos, a un nuevo set de microtubos rotulados, dejando que se evapore el solvente con las tapas abiertas. El estándar (3µg·µl⁻¹) se diluyó para preparar la solución de trabajo (WSCol): 200µl de solución estándar se diluyeron en 400µl de CHCl₃/CH₃OH a 4°C (1µg·µl⁻¹), luego se procedió a realizar la curva de calibración por duplicado. La curva de calibración se dejó evaporar al igual que las muestras. Una vez evaporadas las muestras y la curva de calibración,

se procedió a resuspender los lípidos en 100µl de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) y agitándose en vortex. Inmediatamente después, las muestras con el ácido se calentaron a 100°C durante 10 minutos con las tapas cerradas. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos y se agitó en un vortex, llevando 20µl en duplicado a la microplaca. Por último se agregaron 300µl del reactivo fosfovainillina y se midió la absorbancia a 530 nm en el lector de microplacas (Figura 4-b).

2.6.3 Glucosa (Glu)

La glucosa fue cuantificada utilizando un método enzimático (Kit #K606-100, BioVision), en el cual la solución Glucosa Enzyme Mix oxida en forma específica la glucosa, generando un producto que reacciona con un colorante en particular.

Se agregaron 50µl del homogeneizado por duplicado a la microplaca. Para obtener la solución de trabajo (WSGlu), 5µl de solución Glucose Standard (100mM µl⁻¹) fueron diluidos en 1.245µl de Glucose Assay Buffer, con esta solución se procedió a realizar la curva de calibración. Luego, a cada muestra se le agregaron 50µl del reactivo de trabajo (RMGlu) (para una microplaca: 4600µl Glucose Assay Buffer + 200µl Glucose Probe + 200µl Glucose Enzyme Mix). La microplaca se introdujo al lector y se agitó por 10 segundos, enseguida se incubó (37°C, 30min) y se dejó enfriar por 20 minutos protegido de la luz. Finalmente, se leyó la absorbancia a 570nm en el lector de microplacas (Figura 4-b), presentando un rango de detección entre 1 y 10.000µM.

2.6.4 *Glicógeno (Gly)*

El glicógeno fue cuantificado utilizando un método enzimático (Kit #K646-100, BioVision), en el cual la glucoamilasa hidroliza el glicógeno, generando glucosa, la cual es oxidada en forma específica para reaccionar con la solución OxiRed probe, para generar color.

Se agregaron 50µl del homogeneizado por duplicado a la microplaca. Para obtener la solución de trabajo (WSGly), 10µl de solución Glycogen Standard (2mg ml⁻¹) fueron diluidos en 90µl de Glucosa Assay Buffer, con esta solución se procedió a realizar la curva de calibración. Luego se agregaron 2µl de Hydrolysis Enzyme Mix a las muestras y a la curva de calibración, dejando un blanco para cada muestra sin la adición del mix. Se introdujo la microplaca al lector y se agitó por 10 segundos, enseguida se incubó (T° ambiente, 30min, protegido de la luz). A continuación se preparó el reactivo de trabajo (RMGly) (para una microplaca: 4600µl Development Buffer + 200µl Development Enzyme Mix + 200µl OxiRed Probe) y se adicionaron 50µl de este a cada muestra y a la curva de calibración. Se introdujo la microplaca al lector y se agitó por 10 segundos, enseguida se incubó (T° ambiente, 30min, protegido de la luz) y se leyó la absorbancia a 570nm en el lector de microplacas (Figura 4-b), con un rango de detección de 0,0004 a 2mg·ml⁻¹.

2.6.5 *Triglicéridos (TAG)*

Los triglicéridos se cuantificaron utilizando un método enzimático (Kit #K622-100, BioVision), en el cual los triglicéridos son convertidos en ácidos grasos libres y glicerol, este último se oxida, generando un producto que reacciona con la solución Triglyceride Probe, generando color.

Se agregaron 50µl del homogeneizado por duplicado a la microplaca. Para obtener la solución de trabajo (WSTry), 35µl de solución Triglyceride Standard fueron diluidos en 90µl de Triglyceride Assay Buffer (0,5 mM), con esta solución se procedió a realizar la curva de calibración. Posteriormente se agregaron 2µl de Lipasa a las muestras y a la curva de calibración, dejando un blanco para cada muestra sin la adición de la lipasa. Se introdujo la microplaca en el lector y se agitó por 10 segundos, enseguida se incubó (T° ambiente, 20min, protegido de la luz). A continuación se adicionaron 50µl del reactivo de trabajo (RMTry) (para una microplaca: 4.600µl Triglyceride Assay Buffer + 200µl Triglyceride Probe + 200µl Triglyceride Enzyme Mix) a cada muestra y a la curva de calibración. Se introdujo la microplaca el lector y se agitó por 10 segundos, luego se incubó (T° ambiente, 60min, protegido de la luz) y se leyó la absorbancia a 570nm en el lector de microplacas (Figura 4-b), con un rango de detección de 2pmol a 10nmol.

2.7 Cuantificación de Ácidos Nucleicos

Siguiendo los protocolos para el aislamiento de RNA, DNA y proteínas de Applied Biosystems, 600µl del homogeneizado fueron agregados a un microtubo libre de nucleasas conteniendo 400µl de TRI Reagent® Solution (Molecular Research Center Inc.), se homogenizó utilizando un vórtex y luego se realizó una centrifugación (12.000g, 4°C, 10min). Al finalizar la centrifugación se procedió a realizar los pasos descritos para la extracción de cada ácido nucleico.

2.7.1 *Ácido Ribonucleico total (RNA)*

La fase acuosa, conteniendo el RNA, fue separada de la interfase y la fase orgánica, que contenían DNA y proteínas, y luego traspasada a un nuevo tubo libre de nucleasas para ser incubada en 500µl de isopropanol por 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó (12.000g, 4°C, 8min) y se descartó el sobrenadante. El pellet fue lavado en 1.000µl de etanol 75% y se centrifugó nuevamente (7.500g, 4°C, 5min), descartando el sobrenadante y secando al aire el pellet de RNA. El pellet fue resuspendido en 500µl de agua libre de nucleasas agitándose a 600RPM en un thermomixer (Eppendorf™). Finalmente se llevaron 220µl por duplicado a una microplaca de titración UV (Greiner Bio-One™, 96 Well UV-Star®) y se cuantificó la concentración de RNA ($\mu\text{g RNA}\cdot\text{ml}^{-1}$) mediante espectrofotometría UV en un lector de microplacas (Thermo™ Multiscan Spectrum®) a 260 y 280 nm (Figura 4-b), realizando una estimación de pureza (A260/A280).

2.7.2 *Ácido Desoxirribonucleico total (DNA)*

Posteriormente a la extracción de la fase acuosa, la interfase y la fase orgánica, conteniendo DNA y proteínas, fueron incubadas en etanol 100% y centrifugadas (2.000g, 4°C, 5min), luego se descartó el sobrenadante, se realizó un lavado con 1.000µl de solución *DNA Wash* (citrato trisódico 0,1M en etanol 10%), se incubó (T° ambiente, 30min) y se centrifugó (2.000g, 4°C, 5min), el lavado fue repetido nuevamente junto con su posterior incubación y la centrifugación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1.500µl de etanol 75% y se incubó (T° ambiente, 15 min), después se centrifugó (2.000g, 4°C, 5min) y se descartó el sobrenadante y se secó al aire por 5 minutos. En seguida se agregaron 150µl de NaOH 8mM y se mezcló mediante pipeteo, se centrifugó (12.000g, 4°C, 10min) y se transfirió el

sobrenadante conteniendo el DNA a un nuevo tubo libre de nucleasas en donde se le agregaron 120 μ l de HEPES 0,1mM y 400 μ l EDTA 1mM. Finalmente se llevaron 220 μ l por duplicado a una microplaca de titración UV y se cuantificó la concentración de DNA (μ g DNA \cdot ml⁻¹) mediante espectrofotometría UV en el lector de microplacas a 260 y 280 nm (Figura 4-b), realizando una estimación de pureza (A260/A280).

2.8 Cálculo de Índices

Con las distintas variables cuantificadas se estimaron los siguientes índices:

2.8.1 *Índice O:N*

La relación O:N se basa en la relación atómica entre el oxígeno consumidos y el nitrógeno excretado. Para su cálculo se divide el consumo de oxígeno y la excreción de nitrógeno por sus respectivos pesos moleculares.

2.8.2 *Índice RNA:DNA*

La relación RNA:DNA se basa en la relación entre el RNA participando en síntesis proteica y el DNA presente en el núcleo de la célula. Para su cálculo se dividen sus respectivas concentraciones.

2.8.3 *Índice L:P*

La relación L:P estima el grado de uso de cada pool, teniendo valores altos ante el uso del pool de proteínas y valores bajos para el uso de lípidos. Para su cálculo se dividen sus respectivas concentraciones.

2.8.4 *Índice TAG:L*

La relación TAG:L se basa en la estimación de la cantidad de contenido lipídico que corresponde a reservas energéticas. Para su cálculo se dividen sus respectivas concentraciones.

2.8.5 *Índice FOSF:L*

La relación FOSF:L basa en la estimación de la cantidad de contenido lipídico que corresponde a composición de membranas. Esta se obtiene realizando una estimación del contenido de fosfolípidos de los individuos, restándole a los lípidos totales la concentración de triglicéridos. Posteriormente esta estimación de la concentración de fosfolípidos se divide por los lípidos totales.

2.8.6 *Índice DW:DNA*

La relación DW:DNA será utilizada para comparar el tamaño promedio de las células. Para su cálculo se dividen las respectivas concentraciones.

2.8.7 *Índice P:DNA*

La relación P:DNA estima el contenido proteico promedio por célula. Para su cálculo se dividen las respectivas concentraciones.

2.8.8 *Índice TAG:P*

La relación TAG:DNA estima la condición bioenergética, considerando que el pool de triglicéridos representa la fuente predominante de energía para los procesos energéticos y que la fracción de proteínas se relaciona principalmente con estructuración de tejidos.

2.9 Análisis de Datos

Se utilizó un análisis de varianza (ANDEVA) a dos vías para evaluar el efecto de sistema de cultivo y dieta para un tiempo de cultivo dado. Del mismo modo, para cada sistema de cultivo se utilizó el mismo tipo de análisis de varianza considerando como factores la dieta y los intervalos de tiempo para determinar su efecto sobre las variables de respuesta medidas. De esta forma se logró determinar en primer lugar si existieron diferencias en el crecimiento de los animales entre tratamientos y luego en las distintas variables cuantificadas, previa confirmación de requisitos para análisis paramétrico (normalidad por Kolmogorov-Smirnof y homocedasticidad por test de Levene). Para lograr que todos los datos cumplieran con estos requisitos se realizaron las siguientes transformaciones: para los valores de la tasa de crecimiento en peso seco al día 67 se utilizó una transformación angular (Freeman & Tuckey, 1950); para los valores de la tasa de crecimiento en largo de caparazón al día 67 se utilizó la transformación de la raíz cuadrada propuesta por Bartlett (1936) y para los valores de esta misma tasa al día 138 se utilizó la conversión cuadrática descrita por Zar (1999). La transformación logarítmica (Zar, 1999) fue realizada para los datos de consumo de oxígeno en cultivo individual y excreción de nitrógeno en ambos cultivos. El intervalo de tiempo entre cada muda fue analizado con un test de Kruskal-Wallis. Tratamientos diferentes fueron identificados mediante test *a posteriori* de Tukey o Dunn, en caso de análisis paramétrico o no, respectivamente. El grado de asociación entre el crecimiento obtenido y los diferentes indicadores fisiológicos y bioquímicos fue determinado por medio del análisis de correlación de Pearson. Se trabajó con $\alpha = 0.05$.

3 RESULTADOS

3.1 Supervivencia

La supervivencia de *L. santolla* se vio afectada por el tipo de dieta suministrada, registrándose los valores más altos para los individuos alimentados con artemia, superando aproximadamente en un 11 y un 55% a las dietas chorito y pellet respectivamente. En la dieta artemia, los organismos con supervivencia más alta fueron los que se mantuvieron en cultivo individual, con un 82,5% (Figura 5).

3.2 Crecimiento

3.2.1 *Peso y tamaño*

Los animales mantenidos bajo las tres dietas lograron un incremento significativo en el crecimiento, tanto en peso seco como en largo de caparazón. Al final del experimento, los animales alimentados con artemia lograron los pesos y tallas más altos tanto para el sistema de cultivo individual, alcanzando en promedio $33,3 \pm 4,3$ mg y $6,2 \pm 4,3$ mm, como para el cultivo masivo, en promedio $57,8 \pm 11$ mg y $7,6 \pm 0,5$ mm, este tratamiento alcanzó los valores más altos en forma significativa (Figura 6).

3.2.2 Tasas de crecimiento

La tasa de crecimiento en peso seco ($\text{mg}\cdot\text{día}^{-1}$) fue significativamente más alta para la dieta de artemia. El incremento en el largo de caparazón ($\text{mm}\cdot\text{día}^{-1}$) presentó el mismo comportamiento, logrando diferencias significativas en ambos sistemas de cultivo al final del experimento (Figura 7). Dentro de la dieta de artemia las tasas de crecimiento más altas, tanto en peso seco como en largo de caparazón, fueron para los organismos mantenidos en cultivo masivo, en promedio $0,40 \pm 0,08 \text{ mg}\cdot\text{día}^{-1}$ y $0,038 \pm 0,004 \text{ mm}\cdot\text{día}^{-1}$, respectivamente.

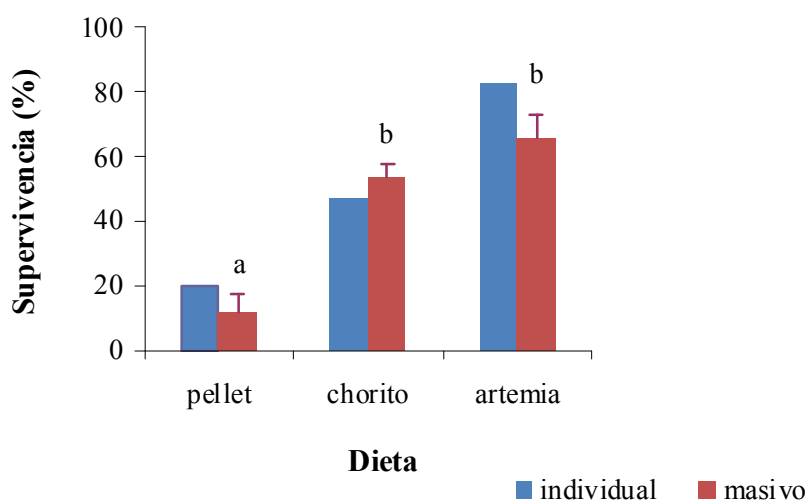


Figura 5.- *L. santolla*. Supervivencia (en porcentaje) para cada tratamiento. Valores promedio + desviación estándar (sólo para cultivo masivo). Distintas letras representan diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA, $p < 0,05$).

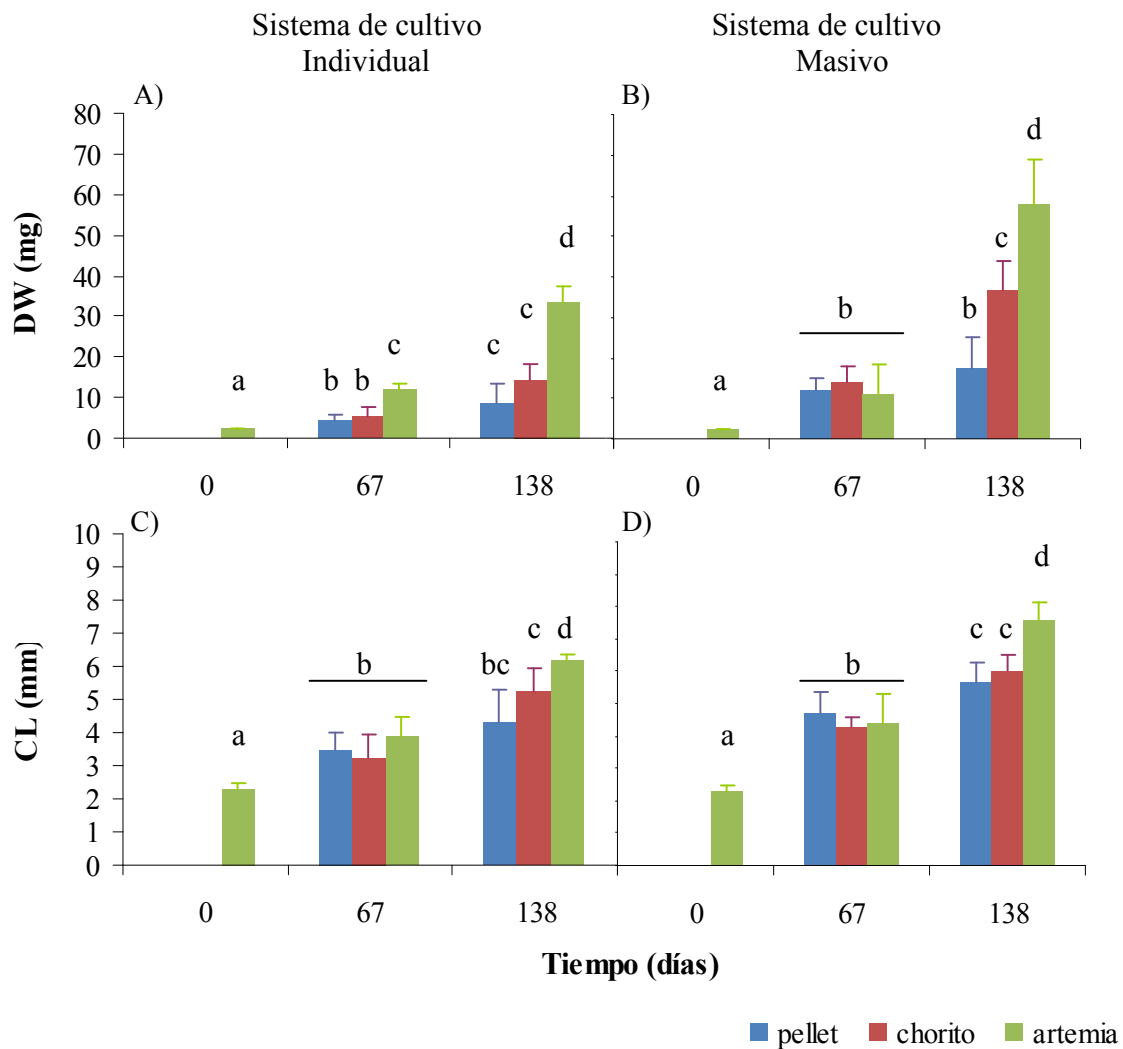


Figura 6.- *L. santolla*. Crecimiento en miligramos de peso seco, DW (A-B) y milímetros de largo de caparazón, CL (C-D) para cada tratamiento, considerando el inicio (día 0), intermedio (día 67) y final (día 138) del experimento. Valores promedio + desviación estándar. Distintas letras representan diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de 2 vías, $p < 0,05$).

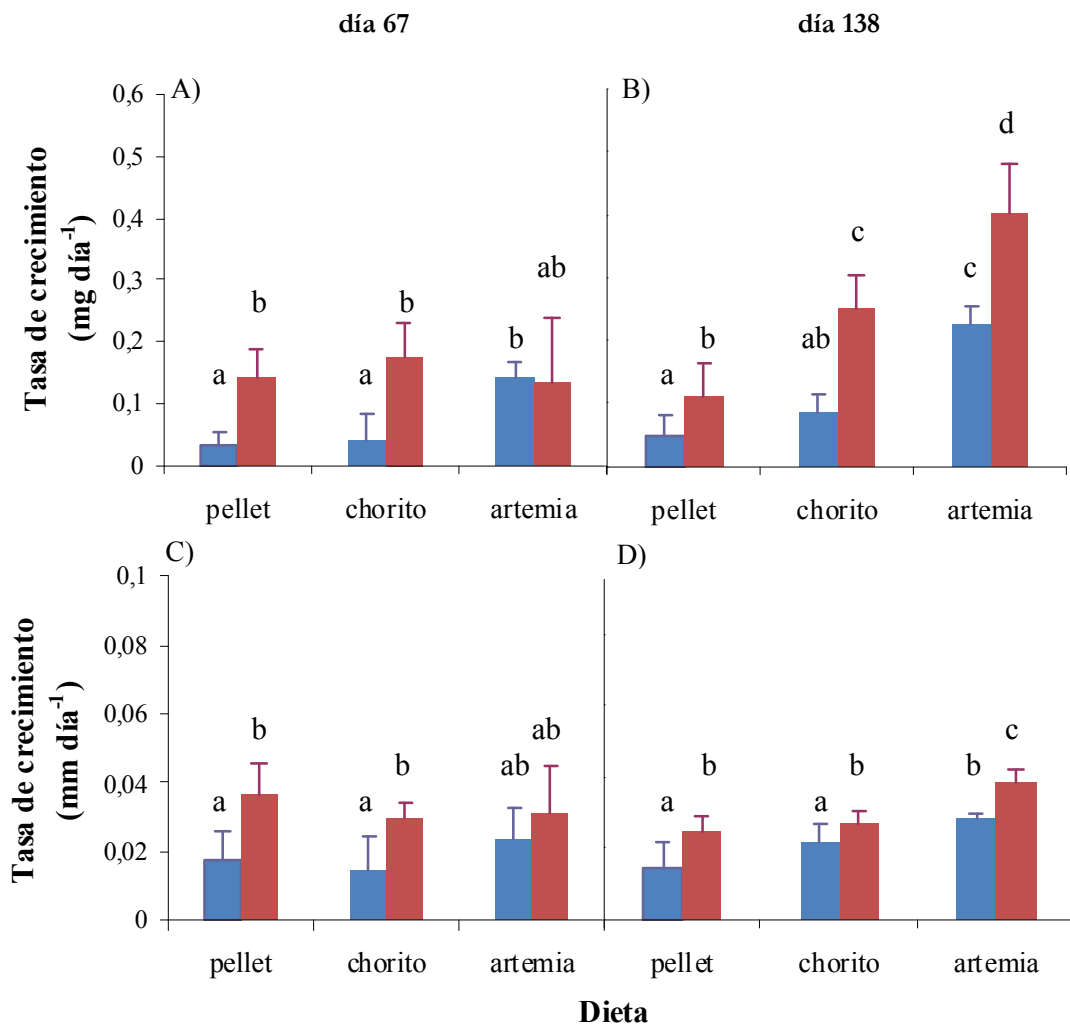


Figura 7.- *L. santolla*. Tasa de crecimiento en miligramos de peso seco por día (A-B) y largo de caparazón en milímetros por día (C-D) para cada tratamiento (ver leyenda en figura 5), considerando las mediciones intermedia (día 67) y final (día 138) del experimento. Valores promedio + desviación estándar. Distintas letras representan diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de 2 vías, $p < 0,05$).

3.2.3 Exuvias

Las dietas también tuvieron un efecto en el intervalo entre cada muda de *L. santolla*, presentando una duración de tiempo significativamente más baja entre cada muda (o el mayor número de mudas en el mismo período de tiempo) para los individuos alimentados con artemia, en promedio $17,7 \pm 4,2$ días. Las dietas chorito y pellet no tuvieron diferencias entre sí, con un valor promedio de $28,7 \pm 13,8$ días (Figura 8).

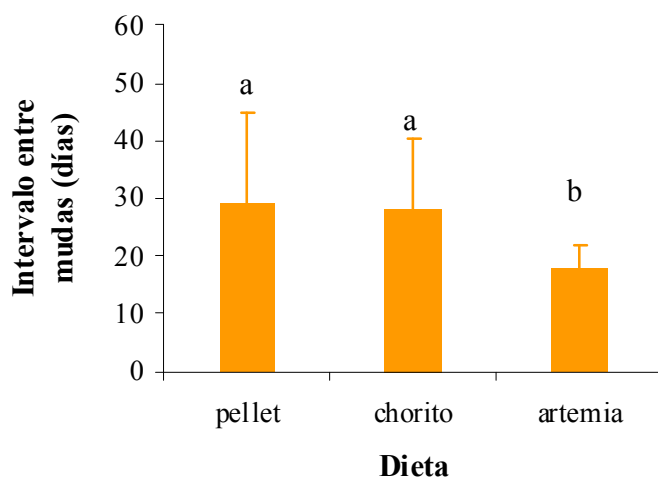


Figura 8.- *L. santolla*. Intervalo de tiempo entre cada muda (días) para cada dieta dentro del sistema de cultivo individual. Valores promedio + desviación estándar. Distintas letras representan diferencias significativas entre tratamientos (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

3.2.4 Biomasa total

Las condiciones de cultivo tuvieron un efecto en la biomasa total producida al final del experimento, presentando las biomazas más altas en cultivo masivo, dentro de este cultivo la biomasa producida por los individuos alimentados con la dieta artemia fue la más alta. Esta fue un 37,4% más alta que en cultivo individual para la misma dieta (Tabla 2).

Tabla 2.- *L. santolla*. Producción total de biomasa (miligramos) para cada tratamiento al final de experimento. Valores promedio.

Sistema de cultivo	Dieta	Supervivencia (%)	n inicial	n final	peso final (mg)	biomasa producida (mg)
individual	pellet	20,0	30	7	8,7	60,9
	chorito	47,5	30	14	14,2	198,8
	artemia	82,5	30	24	33,3	799,2
masivo	pellet	11,4	30	3	17,4	52,2
	chorito	53,8	30	16	36,7	587,2
	artemia	65,7	30	19	57,8	1098,2

3.3 Metabolitos

3.3.1 *Proteínas totales*

La concentración de proteínas totales fue similar entre tratamientos, sin embargo, existió un incremento significativo a través el tiempo para todos los tratamientos con respecto al inicio del experimento (Figura 9, A-B). La concentración de proteínas al inicio del experimento fue, en promedio $50,9 \pm 18,9 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, al día 67 estos valores fueron, en promedio $170,9 \pm 26,8 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, para el cultivo individual y, en promedio $205,1 \pm 52,9 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, para el cultivo masivo. Al final del experimento esta concentración fue de $211,6 \pm 46,8 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ y $228,8 \pm 33,6 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ en cultivo individual y masivo, respectivamente.

3.3.2 *Lípidos totales*

Los lípidos totales no presentaron diferencias significativas entre tratamientos. Con respecto al inicio del experimento, hubo un incremento significativo en la concentración de lípidos en el tiempo para todos los tratamientos al día 67 (Figura 9, C-D). Esta concentración disminuyó en forma significativa entre el día 67 y el 138 para las tres dietas en cultivo individual y para la dieta pellet en cultivo masivo. Los lípidos totales al inicio del experimento fueron, en promedio $22,4 \pm 3,7 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$. Al día 67 fueron de $41,8 \pm 8,9 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ y $38,3 \pm 6,5 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ para el cultivo individual y masivo respectivamente. Al final del experimento (día 138) las concentraciones fueron $24,3 \pm 9,9 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ para el cultivo individual y $30,44 \pm 10,8 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ para el cultivo masivo.

3.3.3 Glucosa

La glucosa no presentó diferencias significativas entre los tratamientos. Al día 67 se registró un incremento significativo de este metabolito a través el tiempo con respecto al inicio del experimento sólo para la dieta artemia en cultivo individual. Entre el intermedio y el final del experimento esta concentración aumentó en forma significativa sólo para la dieta chorito en cultivo individual. Al día 138 la glucosa fue más alta, con respecto al inicio, para todos los tratamientos excepto la dieta artemia en cultivo masivo (Figura 9, E-F). La glucosa al inicio del experimento fue de $1,9 \pm 0,6 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$. Al día 67 la concentración fue de $3,3 \pm 2,1 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ y $3,7 \pm 2,5 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ para el cultivo individual y masivo respectivamente. Para el día 138 las concentraciones fueron en promedio $5,3 \pm 2,5 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, para el cultivo individual y $5,3 \pm 2,4 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, para el cultivo masivo.

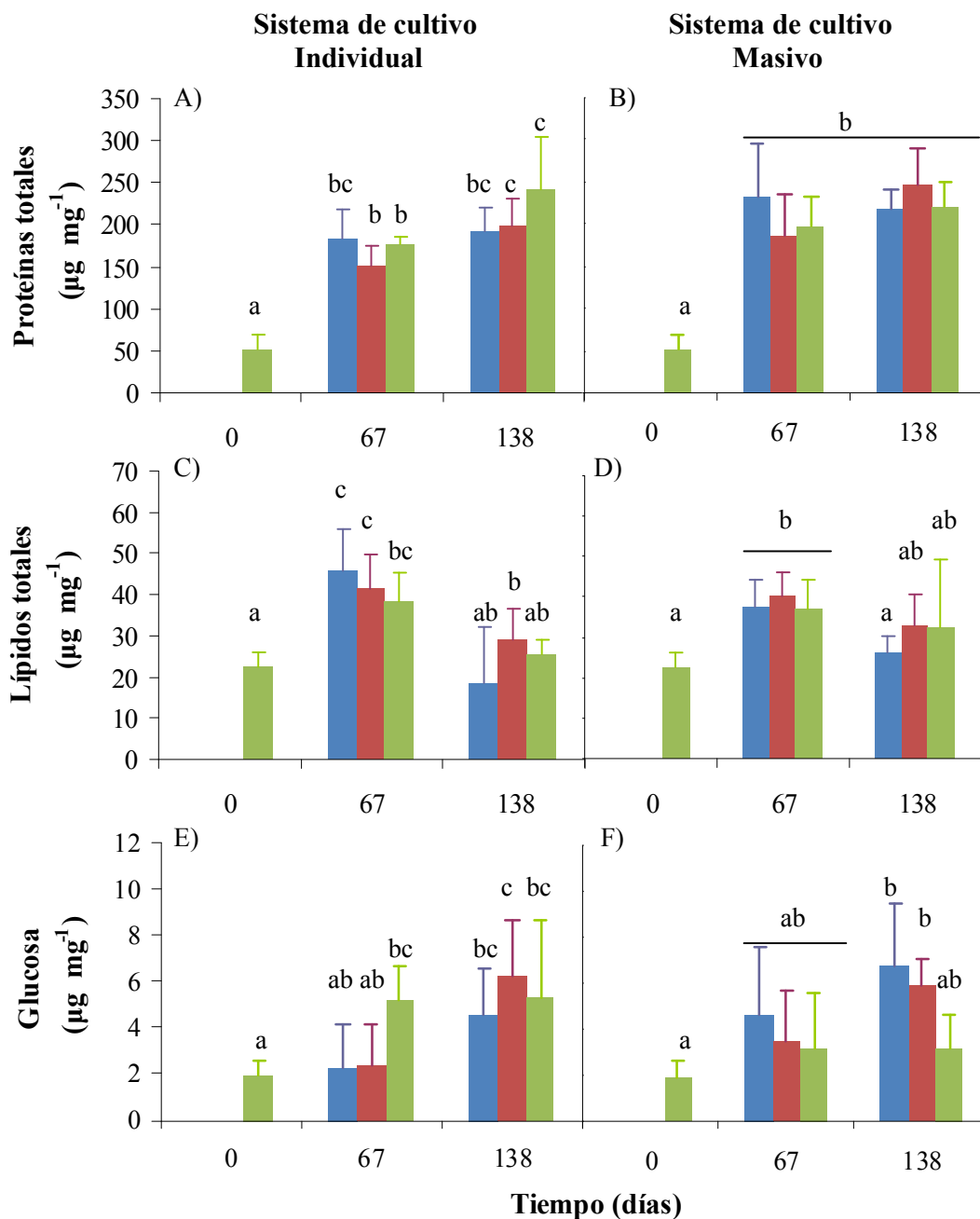


Figura 9.- *L. santolla*. Composición proximal (proteínas (A-B), lípidos (C-D) y glucosa (E-F)) en microgramos por miligramo de individuo para cada tratamiento (ver leyenda en figura 6), considerando el inicio (día 0), intermedio (día 67) y final (día 138) del experimento. Valores promedio + desviación estándar. Distintas letras representan diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de 2 vías, $p < 0,05$).

3.3.4 *Glucógeno*

La concentración de glucógeno al día 67 no presentó diferencias significativas con respecto al inicio del experimento. Entre las dietas en cultivo masivo tampoco se encontraron diferencias, pero la dieta artemia fue significativamente más alta dentro del cultivo individual, en promedio $26,5 \pm 20 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$. Entre los días 67 y 138 esta concentración manifestó un incremento significativo sólo para la dieta chorito en cultivo masivo. Al día 138, el tratamiento con más alta concentración de este metabolito fue la dieta chorito en cultivo masivo, en promedio $53,3 \pm 18,4 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Figura 10, A-B).

3.3.5 *Triglicéridos*

Los niveles de triglicéridos, con una concentración inicial de $7,8 \pm 2,3 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, registraron un incremento significativo a través del tiempo para todos los tratamientos hasta el día 67, excepto para la dieta artemia en cultivo masivo. Entre los días 67 y 138 esta concentración disminuyó en todos los tratamientos, pero sólo en forma significativa para las dietas en cultivo individual (Figura 10, C-D). Al día 138, el tratamiento con una concentración de este metabolito significativamente más alta fue la dieta chorito en cultivo masivo, en promedio $17,1 \pm 2,2 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, sin embargo las dietas pellet y chorito en cultivo individual al día 67 presentaron la concentración significativamente mas alta de triglicéridos, en promedio $22,1 \pm 2,5 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$.

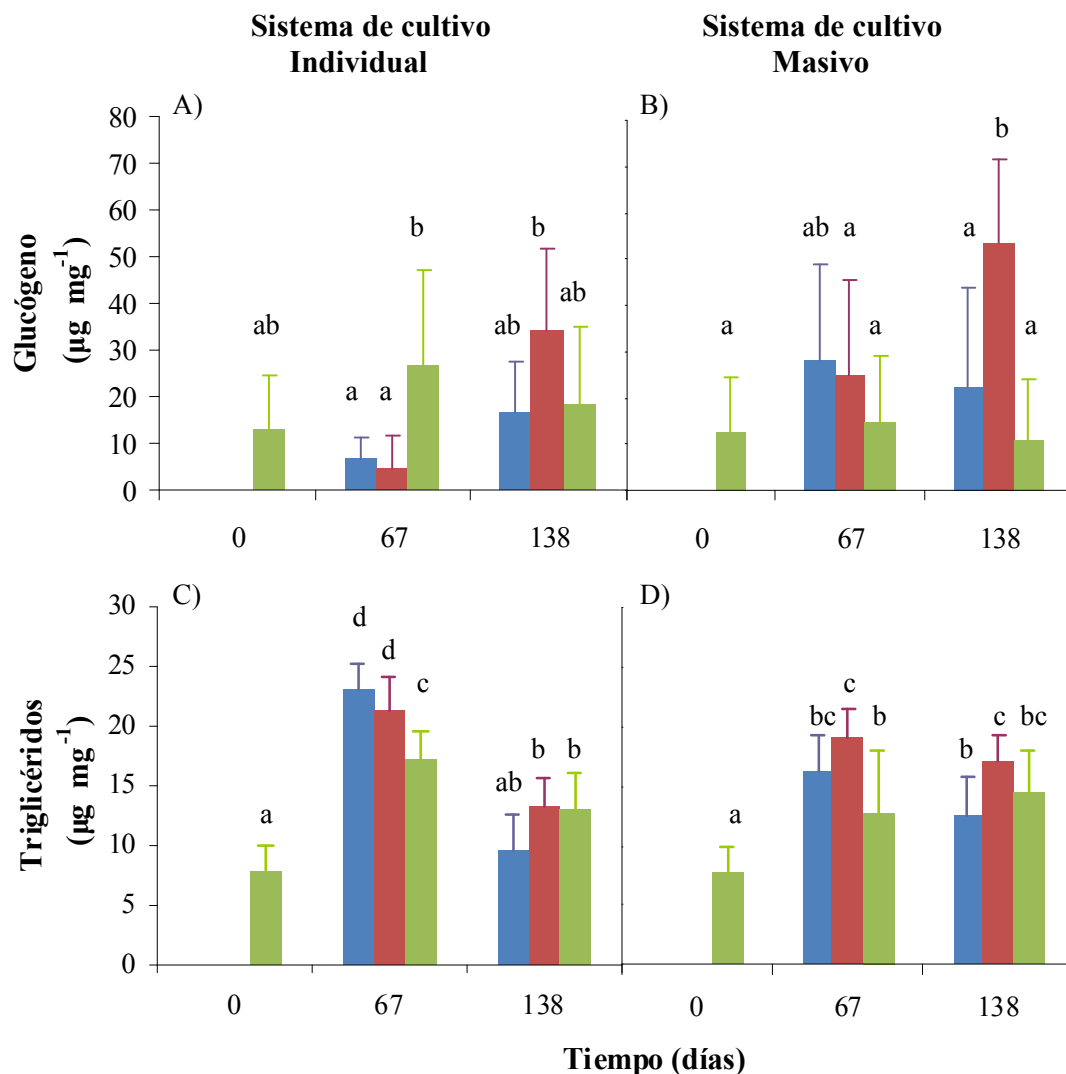


Figura 10.- *L. santolla*. Composición de las reservas energéticas (glucógeno (A-B) y triglicéridos (C-D)) en microgramos por miligramo de individuo para cada tratamiento (ver leyenda en figura 6), considerando el inicio (día 0), intermedio (día 67) y final (día 138) del experimento. Valores promedio + desviación estándar. Distintas letras representan diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de 2 vías, $p < 0,05$).

3.4 Ácidos Nucleicos

3.4.1 *Ácido Ribonucleico total*

La concentración de ácido ribonucleico (RNA) fue significativamente más alta para la dieta artemia en cultivo individual, manteniéndose durante el tiempo, en promedio $3,5 \pm 1,3 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$. En este mismo sistema de cultivo hubo un incremento significativo en los niveles de RNA para las dietas pellet y chorito entre los días 67 y 138. En cultivo masivo no hubo diferencias significativas entre dietas, ni tampoco incrementos a lo largo del tiempo, con un valor promedio de $3,9 \pm 2 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Figura 11, A-B).

3.4.2 *Ácido Desoxirribonucleico total*

Con respecto al comienzo del experimento, con un valor inicial de $1,55 \pm 0,8 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, la cantidad de ácido desoxirribonucleico (DNA) por miligramo de individuo tuvo un incremento significativo al día 138 para las dietas chorito y artemia en cultivo individual y, dentro del cultivo masivo, para la dieta artemia al día 67 y la dieta chorito al día 138 (Figura 11, C-D). Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre tratamientos y tampoco entre los días 67 y 138, con un valor promedio de $3,9 \pm 2,3 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$.

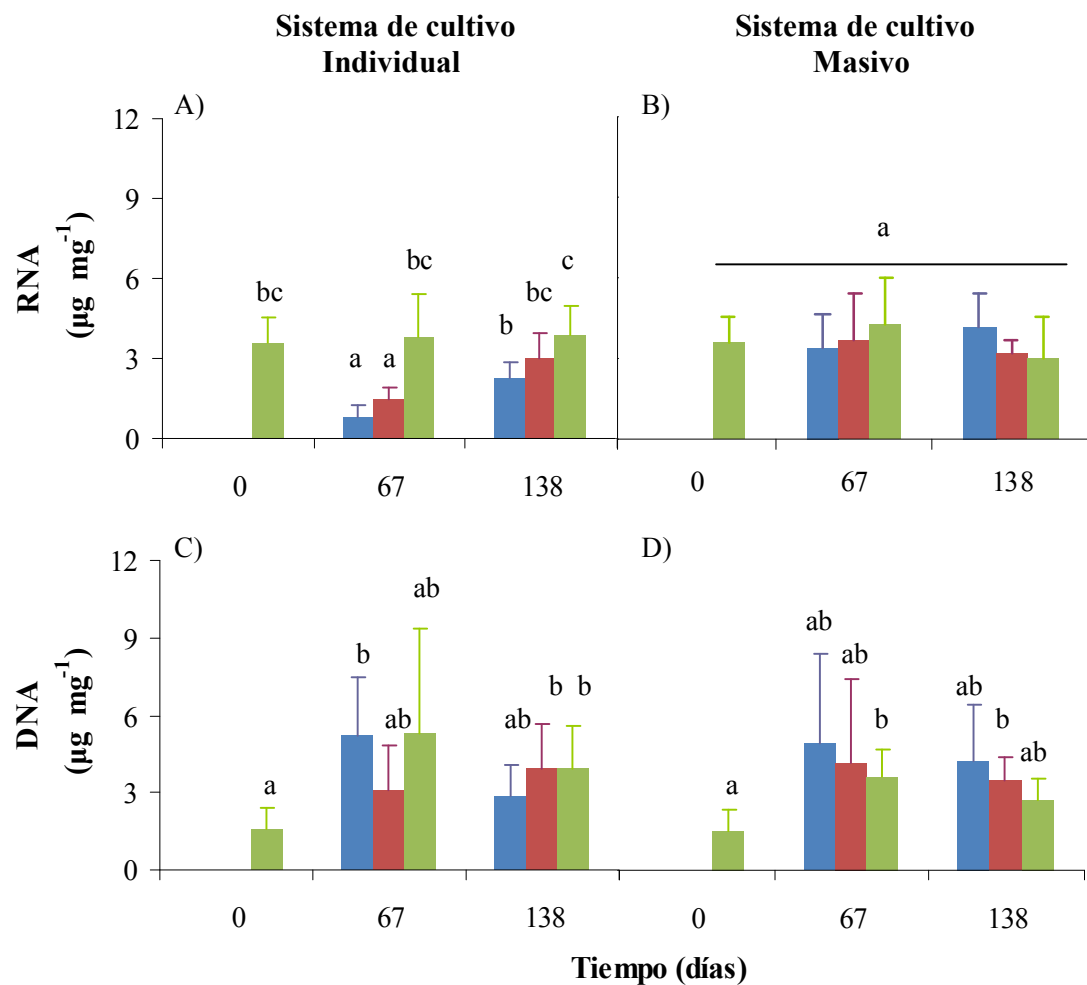


Figura 11.- *L. santolla*. Niveles de ácidos nucleicos (ácido ribonucleico (A-B) y ácido desoxirribonucleico (C-D)) en microgramos por miligramo de individuo para cada tratamiento (ver leyenda en figura 6), considerando el inicio (día 0), intermedio (día 67) y final (día 138) del experimento. Valores promedio + desviación estándar. Distintas letras representan diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de 2 vías, $p < 0,05$).

3.5 Fisiología

3.5.1 Consumo de Oxígeno

El consumo de oxígeno fue similar para todos los tratamientos excepto para la dieta pellet en cultivo individual, que presentó un consumo significativamente más alto al día 67, con $1078 \pm 395 \mu\text{g O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Figura 12, A-B). Al día 138 este sistema de cultivo presentó un consumo promedio de $584 \pm 169 \mu\text{g O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. En cultivo masivo, las dietas pellet y chorito exhibieron un consumo significativamente más alto con respecto al inicio, pero sin diferenciarse en forma significativa de los otros tratamientos, los valores fueron, en promedio $892 \pm 458 \mu\text{g O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para el día 67 y $787 \pm 154 \mu\text{g O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para el día 138.

3.5.2 Excreción de Nitrógeno

En cultivo individual la excreción de nitrógeno al día 67 fue significativamente más alta para los individuos alimentados con pellet y chorito, al día 138 la excreción se mantuvo alta para la dieta pellet. En el cultivo masivo sólo hubo diferencias entre tratamientos el día 138, con la dieta artemia exhibiendo una excreción más alta que chorito en forma significativa. La excreción de nitrógeno de la dieta artemia se mantuvo estable en el tiempo, pero fue significativamente más alta en el cultivo masivo, en promedio $18,7 \pm 6,7 \mu\text{g N-NH}_3 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, contra $10,1 \pm 2,1 \mu\text{g N-NH}_3 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ del cultivo individual (Figura 12, C-D).

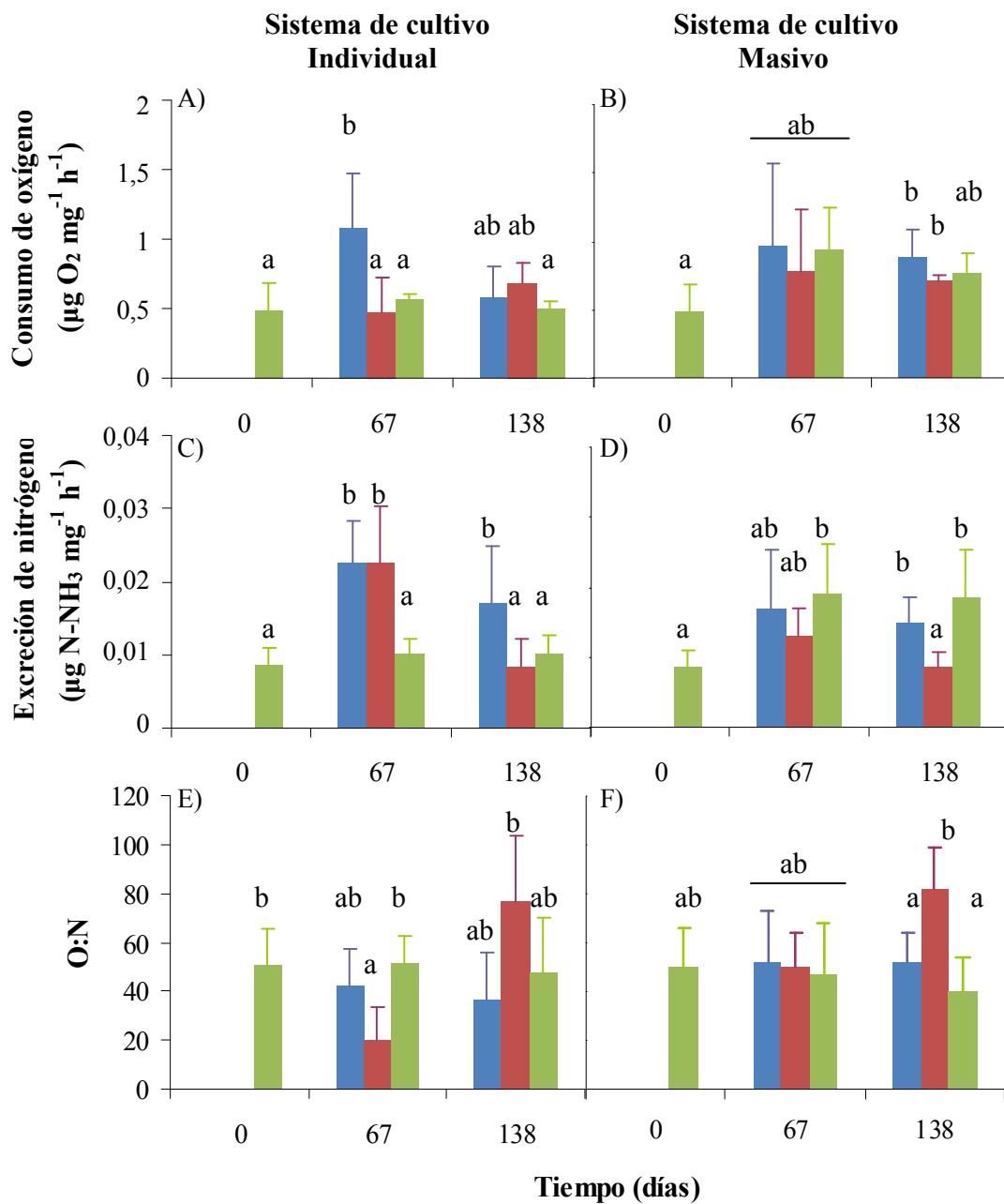


Figura 12.- *L. santolla*. Tasas de consumo de oxígeno ($\mu\text{g O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) (A-B), excreción de nitrógeno ($\mu\text{g N-NH}_3 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) (C-D), y razón O:N (E-F) para cada tratamiento (ver leyenda en figura 6), considerando el inicio (día 0), intermedio (día 67) y final (día 138) del experimento. Valores promedio + desviación estándar. Distintas letras representan diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de 2 vías, $p < 0,05$).

3.5.3 Razón O:N

La razón O:N se mantuvo cercana a un valor de 50, presentando diferencias significativas para la dieta chorito en cultivo individual al día 67 (Figura 12, E-F). Al final del experimento, esta dieta obtuvo un alto valor para este índice en ambos cultivos, con un valor en promedio de 78,5, presentando diferencias significativas sólo en cultivo masivo.

3.6 Correlación de Variables e Índices

Los coeficientes de correlación de Pearson indicaron que todas las variables cuantificadas por individuo presentan una asociación significativa con la tasa de crecimiento en peso seco, mientras que las mismas variables estandarizadas por el peso seco de los individuos sólo presentaron una asociación significativa negativa para la excreción de nitrógeno y positiva para la concentración de proteínas (Tabla 3). Los índices presentaron asociaciones en forma significativa con respecto a la tasa de crecimiento para P:DNA, RNA:DNA, DW:DNA, L:P y O:N.

Tabla 3.- *L. santolla*. Correlación entre la tasa de crecimiento en peso seco ($\text{mg}\cdot\text{día}^{-1}$) de todos los tratamientos y las variables metabólicas y fisiológicas medidas e índices derivados de estas. Valores del coeficiente de correlación de Pearson (R).

Variable	R	Variable	R	Índice	R
Consumo de oxígeno ($\mu\text{g O}_2 \text{ ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	0,883 ***	Consumo de oxígeno ($\mu\text{g O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	-0,091	O:N	0,236 *
Excreción de nitrógeno ($\mu\text{g N-NH}_3 \text{ ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	0,773 ***	Excreción de nitrógeno ($\mu\text{g N-NH}_3 \text{ mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	-0,339 *	RNA:DNA	0,413 **
RNA ($\mu\text{g ind}^{-1}$)	0,816 ***	RNA ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	0,176	L:P	-0,321 *
DNA ($\mu\text{g ind}^{-1}$)	0,684 ***	DNA ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	-0,177	TAG:L	0,139
Proteínas ($\mu\text{g ind}^{-1}$)	0,875 ***	Proteínas ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	0,289 *	FOSF:L	-0,139
Lípidos ($\mu\text{g ind}^{-1}$)	0,911 ***	Lípidos ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	-0,162	DW:DNA	0,331 *
Glucosa ($\mu\text{g ind}^{-1}$)	0,655 ***	Glucosa ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	0,043	P:DNA	0,573 ***
Glucógeno ($\mu\text{g ind}^{-1}$)	0,490 ***	Glucógeno ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	0,194	TAG:P	-0,237
Triglicéridos ($\mu\text{g ind}^{-1}$)	0,898 ***	Triglicéridos ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	-0,091		
Fosfolípidos ($\mu\text{g ind}^{-1}$)	0,552 ***	Fosfolípidos ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	-0,142		

*($p < 0,05$); **($p < 0,01$); ***($p < 0,001$).

4 DISCUSIÓN

4.1 Supervivencia

La supervivencia fue más alta para los individuos alimentados con artemia, sin presentar diferencias significativas con respecto a la dieta chorito, siendo la dieta pellet la que obtuvo la supervivencia más baja. En general, los valores de supervivencia fueron más altos en cultivo individual, a excepción de la dieta chorito. El canibalismo es una de las principales fuentes de mortalidad en muchos animales, y es reconocido como la mayor causa de mortalidad de cangrejos juveniles tanto en ambiente natural como en cultivo (Luppi *et al.*, 2001; Zmora *et al.*, 2005). En litódidos el canibalismo es bastante alto (Borisov *et al.*, 2005; Stevens & Swiney, 2005), por tanto, es muy probable que en cultivo masivo se hayan presentado eventos de depredación entre centollas, y con mayor razón si la dieta o la frecuencia de alimentación no logró satisfacer los requerimientos nutricionales de los individuos. Kington (1999) concluyó que un efecto de lixiviación parcial de los nutrientes esenciales presentes en el pellet disminuyó considerablemente el crecimiento y la sobrevivencia en *Jasus edwardsii*. Este fenómeno puede estar sucediendo con la dieta inerte utilizada en este estudio y, de ser así, probablemente la dieta no logró satisfacer los requerimientos nutricionales de los individuos y puede estar afectando la supervivencia de los juveniles de *L. santolla*. Los nutrientes esenciales, al no poder ser sintetizados *de novo* por los organismos, dejan de estar presentes en las distintas rutas metabólicas que los requieren (Rosas & Carrillo, 2006). Esto podría solucionarse al incrementar la frecuencia de alimentación (Kington, 1999; Oh & Hartnoll, 2000; Thomas *et al.*, 2003), sin embargo, esto implicaría un aumento considerable en los costos de producción.

4.2 Crecimiento

En crustáceos, el crecimiento es un proceso discontinuo que ocurre por una sucesión de mudas a lo largo del tiempo (Hartnoll, 1982), y se considera que está compuesto de dos componentes, el incremento en tamaño durante la muda y la duración de tiempo entre cada muda. Estos dos procesos exhiben diferentes respuestas a factores intrínsecos y extrínsecos. Las centollas alimentadas con artemia exhibieron el crecimiento más alto y presentaron el período de tiempo más bajo entre cada muda. Esto podría estar relacionado con la síntesis de componentes como los eicosanoides, que son derivados de ácidos grasos poliinsaturados como 20:4n-6 y 20:5n-3 (Sheen & Wu, 2002). Estos componentes están presentes en la cepa de artemia utilizada como dieta (Landau, 1987) en mayor cantidad que en mitílidos (Okumu & Stirling, 1998). Además, al comparar la composición nutricional de las dietas, se puede observar que la dieta artemia posee altos valores de proteínas y lípidos, siendo la oferta más completa de alimento, entregando mayores recursos nutritivos para que los organismos puedan expresar su potencial de crecimiento con respecto a las otras dietas. En cultivo masivo, el canibalismo permite la obtención de un mayor crecimiento (Marshall *et al.*, 2005; Møller *et al.*, 2008) ya que al depredar a otras centollas, los juveniles obtendrán un mayor volumen de alimento y, por ende, un ingreso adicional de nutrientes con respecto a la misma dieta en cultivo individual, logrando así un mejor crecimiento. De hecho, la mayor producción de biomasa total al finalizar el experimento se logra con la dieta artemia en cultivo masivo, ya que, pese a el menor porcentaje de supervivencia, los individuos crecieron más.

Los crecimientos más altos fueron alcanzados con la dieta artemia, esta dieta fue significativamente más alta que pellet y chorito en ambos sistemas de cultivo. El crecimiento para dietas inertes suele ser más bajo comparado con las dietas naturales (Kington, 1999; Crear *et al.*, 2000), sobre todo si ocurre un efecto parcial o leve de lixiviación del pellet (Cuzon *et al.*, 1982; D'Abramo & Sheen, 1993). Aunque la dieta es la principal fuente de materia y energía, también las fuentes endógenas han demostrado ser fuente importante de moléculas y energía (Rosas & Carrillo, 2006). Considerando que los juveniles provienen de la misma madre, es probable que la mayoría de ellos sean hijos del mismo padre, lo que hace pensar que presentan el mismo potencial de crecimiento, sólo que algunas dietas les entregan un mejor sustrato para expresarlo, en este caso la dieta artemia. Sin embargo, la variable genética no puede ser descartada, ya que la fisiología reproductiva de los litódidos presenta posibilidades para la ocurrencia de paternidad múltiple, con una fecundación externa por medio de la depositación de espermatozoides alrededor del gonoporo de la hembra (Nyblade, 1987; Donaldson & Byersdorfer, 2005). En el litódido *Hapalogaster dentata* se ha observado un aumento significativo en la cantidad de espermatozoides depositados ante un posible competidor durante el apareamiento (Sato & Goshima, 2007). Los estudios de paternidad en cangrejos no son muchos (Urbani *et al.*, 1998; Bilodeau *et al.*, 2005), sin embargo, se ha encontrado evidencia genética de paternidad múltiple en otros anomuros (Toonen, 2004).

4.3 Metabolitos

4.3.1 *Proteínas totales*

El metabolismo de las proteínas domina los costos totales de crecimiento en animales acuáticos (Jobling, 1985), y sus componentes proteicos, como aminoácidos y péptidos, son aprovechados en distintos niveles para la síntesis de diversas moléculas de importancia fisiológica y nutricional, como la hemocianina, cuyos niveles son afectados por el porcentaje de proteínas en la dieta (Rosas *et al.*, 2004), y las enzimas digestivas. Finalmente es en las células del músculo donde son utilizados para la síntesis de tejido nuevo, enzimas y otras moléculas (Rosas & Carrillo, 2006). En este estudio, la concentración de proteínas totales no registró diferencias significativas entre tratamientos, pese a que está fuertemente vinculada al valor nutricional de la dieta (Fraser & Rogers, 2007). Sin embargo, esta concentración presenta una asociación positiva en forma significativa con respecto a la tasa de crecimiento ($\text{mg} \cdot \text{día}^{-1}$).

El crecimiento de los crustáceos es afectado no sólo por la cantidad de proteína en la dieta, sino también por la disponibilidad de esta y su composición de aminoácidos esenciales (Fraser & Rogers, 2007), esto implica la necesidad de lograr satisfacer los requerimientos de aminoácidos esenciales para estos organismos, quienes no tienen la capacidad de sintetizarlos *de novo*. Al analizar la composición nutricional de las dietas se puede observar que el porcentaje de proteínas es más alto en artemia, para la cual la cantidad de aminoácidos esenciales también es bastante alta (Landau, 1987). En cultivo masivo la concentración proteica promedio fue más alta, lo cual indica una posible consecuencia del canibalismo.

4.3.2 *Lípidos totales*

Si bien los lípidos, además de representar una importante reserva de energía debido a su contenido altamente calórico, constituyen elementos esenciales en la estructura y función de las células, son precursores de hormonas esteroideas y de mediadores intercelulares, y además son imprescindibles para el crecimiento y la maduración (Holland, 1978; Rosas & Carrillo, 2006), éstos no presentaron diferencias entre tratamientos en los días de medición. Esto no quiere decir que no exista un efecto de estos en el crecimiento, ya que el crecimiento de los crustáceos es afectado no sólo por la cantidad de lípidos en la dieta, sino también por la calidad de estos, la cual ha sido demostrada en varias ocasiones (Kanazawa *et al.*, 1979; D'Abramo & Sheen, 1993; Xu *et al.*, 1994; Merican & Shim, 1996, 1997). Si bien la dieta artemia no presenta una gran diferencia en el porcentaje de lípidos, si se destaca presentando una alta composición de ácidos grasos esenciales (Landau, 1987). Por otra parte, los niveles significativamente más bajos de lípidos totales para el día 138 en cultivo individual pueden deberse a que el aumento en peso de los individuos utilizó gran parte de la fracción de lípidos, lo cual aparentemente no fue compensado, pudiendo ser una de las causas la frecuencia de alimentación (Kington, 1999; Oh & Hartnoll, 2000). En cultivo masivo los organismos presentan mayor concentración de lípidos, reflejando nuevamente un posible efecto del canibalismo en el aumento de esta fracción.

4.3.3 *Glucosa*

La glucosa se mantuvo a una baja concentración, presentando valores significativamente más altos, con respecto al inicio del experimento, al día 138. Esta baja concentración se debe al rol clave de la glucosa en el metabolismo energético, ya que los carbohidratos libres son utilizados rápidamente, por lo cual esta fracción permanece baja en relación con la cantidad de

proteínas y lípidos (Rosas & Carrillo, 2006). Los carbohidratos, pese a no ser esenciales para los crustáceos (Anger, 2001), son almacenados como reserva en forma de glucógeno en el hepatopáncreas, para ser utilizados frente a situaciones de estrés.

4.3.4 *Glucógeno*

Aunque el glucógeno es utilizado para la formación del exoesqueleto y su síntesis es fundamental en el crecimiento, los niveles de glucógeno no presentaron un incremento significativo en el tiempo, excepto para la dieta chorito en cultivo masivo al día 138, lo cual se explicaría por el alto nivel y de los carbohidratos de esta dieta. Nuevamente se observa un efecto del sistema de cultivo sobre este metabolito, aumentando su concentración en cultivo masivo. Sin embargo, una gran cantidad de glucógeno acumulado en el hepatopáncreas no necesariamente significa mayor crecimiento, ya que su almacenamiento se realiza en bajas cantidades (Gibson & Barker, 1979), saturándose en altas concentraciones e incluso actuando como barrera, impidiendo la absorción de aminoácidos e inhibiendo el crecimiento (Rosas & Carrillo, 2006).

4.3.5 *Triglicéridos*

Los niveles de triglicéridos se vieron afectados significativamente por la dieta. La mayoría de estos son sintetizados y procesados en las células R del hepatopáncreas (Dall *et al.*, 1992). Al día 67 la concentración fue más alta para las dietas pellet y chorito en cultivo individual. Sin embargo, al final del experimento los niveles más altos se encontraron en los individuos alimentados con chorito en cultivo masivo. La reserva de triglicéridos es una de las fuentes de energía predominantes para los distintos procesos energéticos, y puede ser rápidamente movilizada ante distintos tipos de estrés (Sasaki, 1984; Pollero *et al.*, 1992; Chen & Lai, 1993).

Si bien los individuos alimentados con estas dietas lograron distintos crecimientos, el nivel de sus reservas lipídicas fue más alto sólo para la dieta chorito. El efecto del sistema de cultivo sobre este metabolito también se puede apreciar, ya que aumentó su concentración en cultivo masivo.

4.4 Ácidos Nucleicos

4.4.1 *Ácido Ribonucleico total*

La concentración de RNA fue significativamente más alta para la dieta artemia en cultivo individual, manteniéndose durante el tiempo, lo cual coincide con la alta tasa de crecimiento obtenida para este tratamiento, considerando que los procesos de crecimiento y desarrollo están fuertemente asociados con la producción y metabolismo de los ácidos nucleicos (Anger, 2001), y que la cantidad de RNA transportando información desde el núcleo hacia los ribosomas debería ser proporcional a la tasa de síntesis de proteínas.

4.4.2 *Ácido Desoxirribonucleico total*

Al no encontrar diferencias en la concentración de DNA entre los tratamientos durante el experimento se corroboró que el contenido de DNA por célula es constante en las células somáticas (Leslie, 1955), independiente de las condiciones de cultivo a las que se sometieron los individuos.

4.5 Fisiología

4.5.1 Consumo de Oxígeno

El consumo de oxígeno fue significativamente más alto para la dieta pellet en cultivo individual al día 67 y para el cultivo masivo en general, lo cual refleja una mayor actividad metabólica (Burggren & Roberts, 1991; Hochachka & Somero, 2002), relacionada directamente con la fosforilación oxidativa en la mitocondria (Lehninger *et al.*, 1993), en respuesta a un alto requerimiento de energía. Sin embargo, el consumo de oxígeno también implica una pérdida energética, estimada en aproximadamente $14\text{J}\cdot\text{mg}^{-1}$ para animales que utilizan sustratos nutricionales en forma equilibrada como fuente de energía (Cuzon *et al.*, 2006). Esto implica que la alta tasa de consumo de oxígeno presentada por las centollas alimentadas con pellet en cultivo individual no se transformó en un buen crecimiento ya que esta dieta ofreció un sustrato de baja calidad, siendo insuficiente para satisfacer los requerimientos de energía de los individuos alimentados con ella. En cultivo masivo el aumento puede deberse al efecto del canibalismo por aumento de la ingesta y posterior asimilación de las centollas depredadas.

4.5.2 Excreción de Nitrógeno

En cultivo individual la excreción de nitrógeno al día 67 fue significativamente más alta para los individuos alimentados con chorito y pellet, este último mantuvo la alta excreción hasta el final de experimento, de la misma manera, la excreción de nitrógeno de la dieta artemia fue significativamente más alta en el cultivo masivo, indicando un alto catabolismo de proteínas y ácidos nucleicos (Bidigare, 1983; Regnault, 1987). Si bien un alto porcentaje de proteína en el alimento aumentará la excreción (Nelson & Kropp, 1985; Rosas *et al.*, 1996), la cantidad y

calidad de esta no sólo afectará la cantidad de nitrógeno excretado, sino también las rutas metabólicas que se utilizarán (Regnault, 1987; Greenaway, 1991).

4.5.3 Razón O:N

Los valores obtenidos para la razón O:N, según Mayzaud & Conover (1988), indican diferencias en el sustrato metabolizado según la dieta y el sistema de cultivo. Para la dieta artemia se realizó un uso equilibrado de sustratos (50% proteínas y 50% lípidos y carbohidratos) para satisfacer las demandas de energía para el crecimiento y las funciones básicas a lo largo del tiempo e independiente del sistema de cultivo. Para la dieta chorito al día 67 se indicó un alto uso de sustrato proteico en cultivo individual y un uso equilibrado en cultivo masivo, al día 138 se indicó un alto uso de lípidos y carbohidratos para ambos sistemas de cultivo, lo cual puede tener relación con la variación propia de la composición proximal de esta dieta durante las estaciones (Okumu & Stirling, 1998), considerando que el experimento duró 138 días. Otro punto a considerar es el de la frecuencia de alimentación, ya que organismos más grandes necesitan mayor cantidad de alimento (Oh & Hartnoll, 2000). Para la dieta pellet se indicó un uso muy cercano al equilibrio, con mayor uso de proteínas en cultivo individual y un uso equilibrado en cultivo masivo. Este uso equilibrado indica que, de existir un efecto de lixiviación del pellet, probablemente este provoca sólo una pérdida parcial de los nutrientes.

4.6 Índices de condición

Los índices P:DNA, RNA:DNA, DW:DNA y O:N presentaron una asociación significativa y positiva con respecto a la tasa de crecimiento ($\text{mg}\cdot\text{día}^{-1}$), mientras que el índice L:P presentó una asociación negativa. P:DNA y RNA:DNA presentaron los mayores coeficientes de correlación, con una alta significatividad. El índice DW:DNA, además de ser indicador del tamaño celular, puede ser utilizado también como medidor de la actividad metabólica celular, al igual que el índice P:DNA, ya que existe evidencia de que células grandes tienden a ser más activas que células pequeñas (Smith *et al.*, 1999), por lo tanto, el nivel de correlación obtenido para estos índices apunta a que los individuos con un mayor tamaño y actividad celular tuvieron una alta tasa de crecimiento ($\text{mg}\cdot\text{día}^{-1}$), junto con una alta actividad metabólica celular, lo cual ya ha sido demostrado en otros organismos acuáticos (Foster, 1990; Mathers *et al.*, 1993; Johannsson *et al.*, 2008). Sin embargo, esta alta actividad metabólica no se ve reflejada por el consumo de oxígeno, el cual no presenta una asociación significativa con respecto a la tasa de crecimiento.

El índice RNA:DNA ha demostrado ser un indicador de la actividad sintetizadora por célula y, por ende, ha sido relacionado con el crecimiento y la calidad de los organismos (Clemmesen, 1994; Wagner *et al.*, 1998). Entre los crustáceos decápodos, en juveniles de langostas (Juinio & Cobb, 1994) y larvas de camarones peneidos (Jayaprakas & Sambhu, 1996). En larvas de langosta (*Homarus americanus*), una relación cercana entre la proporción RNA:DNA y el crecimiento fue descrito con un modelo de regresión, que considera también

efectos de temperaturas (Juinio & Cobb, 1994). Este modelo ha sido utilizado como un instrumento rutinario para las estimaciones *in situ* de los índices de crecimiento de larvas de langostas (James-Pirri & Cobb, 1997). Larvas de camarones peneidos mostraron un índice de RNA:DNA reducido para indicar el crecimiento disminuido durante la exposición a la tensión de contaminación (Galindo *et al.*, 1996). Sin embargo, este índice se ve afectado por factores como el sexo (Chícharo & Chícharo, 2008) y el estado de desarrollo (Anger & Hirche, 1990; Chícharo & Chícharo, 2008), provocando en ocasiones irregularidad en sus valores. La asociación obtenida para este índice revela que los individuos con mayor actividad sintetizadora por célula tuvieron una alta tasa de crecimiento ($\text{mg}\cdot\text{día}^{-1}$).

La asociación negativa presentada entre la tasa de crecimiento ($\text{mg}\cdot\text{día}^{-1}$) y la interacción entre las fracciones de lípidos y proteínas descrita mediante el índice L:P indica que sólo aquellos individuos que incrementaron su biomasa mediante una mayor síntesis proteica presentaron una alta tasa de crecimiento, lo cual se puede deber a la frecuencia de alimentación y la cantidad entregada de este. La asociación con la tasa de crecimiento ($\text{mg}\cdot\text{día}^{-1}$) presentada por el índice O:N indica que este índice podría no sólo limitarse a la estimación del sustrato metabólico utilizado, para lo cual está ampliamente demostrado su uso (Mayzaud & Conover, 1988), sino que además permitiría identificar individuos con altas tasas de crecimiento.

Finalmente, se rechazan ambas hipótesis ya que las condiciones de alimentación y cultivo influyeron directamente sobre los parámetros fisiológicos de individuos juveniles de *L. santolla*. Además, los juveniles con mayor tasa de crecimiento presentaron una asociación significativa entre los índices P:DNA, RNA:DNA, DW:DNA y O:N con respecto a la tasa de crecimiento ($\text{mg}\cdot\text{día}^{-1}$). El mejor tratamiento obtenido correspondió a la interacción entre la dieta artemia y el sistema de cultivo masivo, logrando las tasas de crecimiento más altas y el mejor porcentaje de supervivencia. Aunque este porcentaje de supervivencia es más alto en cultivo individual, debido al canibalismo, un menor número de juveniles sobrevivientes en cultivo masivo logran la mayor producción de biomasa al final del experimento. Los individuos juveniles de *L. santolla* con mayor tasa de crecimiento exhibieron una asociación con algunos indicadores fisiológicos. Los índices bioquímicos P:DNA y RNA:DNA presentaron coeficientes de asociación altamente significativos, por lo cual se recomienda la utilización de estos como indicadores de la tasa de crecimiento ($\text{mg}\cdot\text{día}^{-1}$). Debido a la ventaja de ser un procedimiento no invasivo, también se recomienda el uso del índice O:N como indicador de la tasa de crecimiento.

5 BIBLIOGRAFÍA

ANGER, K., 2001. The biology of decapod crustacean larvae. Crustacean issues 14. AA Balkema Publishers, Swets and Zeitlinger, Lisse, 420 pp.

ANGER, K. & H.-J. HIRCHE, 1990. Nucleic acids and growth of larval and early juvenile spider crab, *Hyas araneus*. *Mar. Biol.*, 105: 403-411.

ATEMA, J. & J.S. COBB, 1980. Social behavior. En: Cobb, J.S. & B.F. Phillips (Eds.), The Biology and Management of Lobsters. Physiology and Behavior, vol. 1. Academic Press, New York, pp. 409-450.

BARTLETT, M.S., 1936. The square root transformation in analysis of variance. *J. Royal Statist. Soc. Suppl.*, 3: 68-78.

BIDIGARE, R.R., 1983. Nitrogen excretion by marine zooplankton. En: Carpenter, E.J. & D.G. Capone (eds), Nitrogen in the Marine Environment. New York: Academic Press. p. 385-409.

BILODEAU, A.L., D.L. FELDER & J.E. NEIGEL, 2005. Multiple paternity in the thalassinidean ghost shrimp *Callichirus islagrande* (Crustacea: Decapoda: Callinassidae). *Mar. Biol.*, 146: 381-385.

- BLAU, S.F., 1985. Overview and comparison of the major red king crab (*Paralithodes camtschatica*) surveys and fisheries in western Alaska 1969-1984. En: Proceedings of the International King Crab Symposium. University of Alaska Sea Grant, AK-SG 85-12, Fairbanks, p. 23-47.
- BORISOV, R., A. EPELBAUM, N.V. KRYAKHOVA & N.P. KOVATCHEVA, 2005. Cannibalism of the red king crab at the early life history stages reared under laboratory conditions. En: Kotenev et al., (eds.), Materials of the Second International Scientific and Practical Conference Marine Coastal Ecosystems: Seaweeds, Invertebrates and Products of their Processing, Arkhangelsk, October 2005. VNIRO Publishing, Moscow, p. 120-122.
- BUCKLEY, L., 1984. RNA:DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. *Mar. Biol.*, 80: 291-298.
- BULOW, J.F., 1970. RNA-DNA ratios as indicators of recent growth rates of fish. *J. Fish. Res. Bd. Canada.*, 27: 2343-2349.
- BULOW, J.F., 1987. RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish: A review. In *The age and growth of fish*; Summerfelt, R.C. & Hall, G.E. Eds.; Iowa State University Press: Ames, Iowa. 45-64 pp.
- BURGGREN, W.W. & J.L. ROBERTS, 1991. Respiration and metabolism. En: Prosser, C.L. (ed), Environmental and metabolic animal physiology. New York: Wiley. p. 353-435.

- CHEN, J.-C. & S.-H. LAI, 1993. Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia-N excretion of juvenile *Penaeus japonicus* Bate. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 165: 161-170.
- CHÍCHARO, M.A., L. CHÍCHARO, F. ALVES, A. AMARAL, A. PEREIRA & J. REGALA, 2001. Diel variation of the DNA:RNA ratios in *Crassostrea angulata* (Lamarck) and *Ruditapes decussatus* (Linnaeus 1758) (Mollusca, Bivalvia). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 259: 121-129.
- CHÍCHARO, M.A., L. CHÍCHARO, A. AMARAL & P. MORAIS, 2007. Sex effect on ratios and concentrations of DNA and RNA in three marine organisms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 332: 241-245.
- CHÍCHARO, M.A. & L. CHÍCHARO, 2008. RNA:DNA Ratio and other nucleic acid derived indices in marine ecology. Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 9: 1453-1471.
- CLEMMESSEN, C., 1994. The effect of food availability, age or size on the RNA:DNA of individually measured herring larvae: Laboratory calibration. *Mar. Biol.*, 118: 377-382.
- CREAR, B.J., C.W. THOMAS, P.R. HART & C.G. CARTER, 2000. Growth of juvenile southern rock lobsters, *Jasus edwardsii*, is influenced by diet and temperature, whilst survival is influenced by diet and tank environment. *Aquaculture* 190, 169–182.

- CUZON, G., M. HEW, D. COGNIE & P. SOLETSCHNIK, 1982. Time lag effect of feeding on growth of juvenile shrimp, *Penaeus japonicus* (Bate). *Aquaculture*, 29: 33-44.
- CUZON, G., G. GAXIOLA & C. ROSAS, 2006. Balance Energético y Requerimientos de Energía. En: Rosas, C., O. Castillo, R. Wilson & E. R. Andreatta (eds.): Estado Actual y Perspectivas de la Nutrición de los Camarones Pendidos Cultivados en Iberoamérica: pp. 198-228.
- D'ABRAMO, L.R. & S. SHEEN, 1993. Nutritional requirements, feed formulations and feeding practices for intensive culture of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Rev. Fish. Sci.*, 2: 1-21.
- DALL, W., A. CHANDUMPAI & D.M. SMITH, 1992. Fatty acid composition of organs and tissues of the tiger prawn *Penaeus esculentus* during the moulting cycle and during starvation. *Mar. Biol.* 113: 45-55.
- DONALDSON, W.E. & S.C. BYERDORSFER, 2005. Biological Field Techniques for Lithodid Crabs. University of Alaska Sea Grant College Program, Fairbanks, Alaska. Publication Number AK-SG-05-03. 76 pp.
- FAO, 2007. Estadísticas de Captura, Desembarques y Productos procesados. En: FISHSTAT Plus. <http://FAOSTAT.FAO.ORG/>.

- FOSTER, A.R., 1990. Growth and protein turnover in fish. PhD thesis, University of Aberdeen.
- FRASER, K.P & A.D. ROGERS, 2007. Protein Metabolism in Marine Animals: The Underlying Mechanism of Growth. *Advances in Marine Biology*, 52: 267-362.
- FREEMAN, M.F & J.W. TUCKEY, 1950. Transformations related to the angular and the square root. *Ann. Math. Statist.*, 21: 607-611.
- GALINDO, R.J.; J.A. MEDINA & L.C. VILLAGRANA, 1996. Physiological and biochemical changes in shrimp larvae (*Penaeus vannamei*) intoxicated with organochlorine pesticides. *Mar. Poll. Bull.*, 32: 872-875.
- GIBSON, R., & P.L. BARKER, 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 17: 285-346.
- GREENAWAY, P., 1991. Nitrogenous excretion in aquatic and terrestrial crustaceans. *Mem. Queensland Mus.* 31: 215-227.
- GUZMAN, L., E. DAZA., S. CORNEJO & C. CANALES, 2005. Diagnostico biológico pesquero de centolla en la región de Magallanes. En: XI congreso Latinoamericano de ciencias del mar. Viña del Mar. Chile.

- HARTNOLL, R.G., 1982. Growth. En: Bliss, D.E. (Ed.), *The Biology of Crustacea. Embryology, Morphology and Genetics*, vol. 2. Academic Press, New York, USA, pp. 111– 196.
- HOCHACHKA, P.W. & G.N. SOMERO, 2002. *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution*. Oxford ; New York : Oxford University Press.
- HOLLAND, D.L., 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. En: Malins, D.C. & Sargent, J.R. (eds), *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology 4*: 85-123.
- JAMES-PIRRI, M.J. & J.S. COBB, 1997. Growth rates of planktonic and newly settled American lobsters *Homarus americanus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 160: 233-240.
- JAYAPRAKAS, V. & C. SAMBHU, 1996. Growth response of white prawn, *Penaeus indicus*, to dietary L-carnitine. *Asian Fish. Sci.*, 9: 209-219.
- JOBLING, M., 1985. Growth. En: Tytler, P. & P. Calow, (eds), *Fish Energetics: New Perspectives*. Croom Helm, London. pp. 213-230.
- JOBLING, M., A. ARNESEN, B. BAARDVIK, J. CHRISTIANSEN, & E. JØRGENSEN, 1995. Monitoring feeding behaviour and food intake: methods and applications. *Aquacult. Nutr.*, 1: 131-143.

- JOHANSSON, O.E., K.L. BOWEN, C.M. WOOD, R.W. SMITH, C. CHU, L.G. RUDSTAM & B. BOSCARINO, 2008. Relating nucleic acid and protein indices to growth in *Mysis relicta*: ration, cycling temperature and metabolism. *Aquat. Biol.* 4: 33-46.
- JUINIO, M.A. & J.S. COBB, 1994. Estimation of recent growth of field-caught postlarval American lobsters, *Homarus americanus*, from RNA:DNA ratios. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51(2): 286-294.
- KANAZAWA A., S. TESHIMA & K. ONO, 1979. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity of bioconversion of linolenic acid in highly unsaturated fatty acid. *Comp. Biochem. Physiol.*, 63: 295-298.
- KINGTON, S.W., 1999. Factors influencing the on-growing and restocking of *Jasus edwardsii*. MSc Thesis, University of Auckland, Auckland.
- KOROLEFF, F. & K. GRASSHOFF, 1983. Determination of nutrients. Determination of ammonia. In: Methods for Sea water Analysis, edited by Grasshoff, K., Ehrhardt, M. and Kremling, K. Weinheim: Verlag Chemie GmbH.
- KOVATCHEVA, N. P., 2006. Red King Crab (*Paralithodes camtschaticus*) Reproduction and Cultivation in Artificial Conditions in Russia. En: Alaska Crab Stock Enhancement and Rehabilitation. Workshop proceedings, Kodiak, Alaska, B. Stevens (Ed.). Alaska Sea Grant College Program University of Alaska Fairbanks, Anchorage: 15-22.

- LANDAU, M., 1987. Nutritional Composition of the Great Salt Lake Strain of Brine Shrimp Reared in a Manure/Aquaculture System. *The Southwestern Naturalist* 32: 61-65.
- LEHNINGER, A.L., D.L. NELSON & M.M. COX, 1993. Principles of Biochemistry. 2 ed. New York: Worth Publishers.
- LEMOS, D., F.L. GARCIA-CARREÑO, P. HERNÁNDEZ & A. NAVARRETE DEL TORO, 2002. Ontogenetic variation in digestive proteinase activity, RNA and DNA content of larval and postlarval white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Aquaculture.*, 214: 363-380.
- LESLIE, I., 1955. The nucleic acid content of tissues and cells. En: Chargaff, E. & J.-N. Davidson, (eds), New York: Academic Press. The Nucleic Acids: *Chemistry and Biology* 2: 1-50.
- LOVRICH, G.A., 1997. La pesquería mixta de las centollas *Lithodes santolla* y *Paralomis granulosa* (Anomura: Lithodidae) en Tierra del Fuego, Argentina. *Invest. Mar.* (Valparaiso) 25: 41 -57.
- LUPPI, T.A., E.D. SPIVAK, & K. ANGER, 2001. Experimental studies on predation and cannibalism of the settlers of *Chasmagnathus granulata* and *Cyrtograpsus angulatus* (Brachyura: grapsidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 265: 29-48.

- MARSHALL, S., K. WARBURTON, B. PATERSON, & D. MANN, 2005. Cannibalism in juvenile blueswimmer crabs, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1766): effects of body size moult stage and refuge availability. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 90: 65-82.
- MARTINS, C., J. SCHRAMA & J. VERRETH, 2005. The consistency of individual differences in growth, feed efficiency and feeding behaviour in African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) housed individually. *Aquaculture Research*, 36: 1509-1516.
- MATHERS, E.M., D.F. HOULIHAN, I. MCCARTHY & L.J. BURREN, 1993. Rates of growth and protein synthesis correlated with nucleic acid content in fry of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects of age and temperature. *J. Fish Biol.*, 43: 245-263.
- MAYZAUD, P. & R.J. CONOVER, 1988. O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. Review. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 45: 289-302.
- MERICAN, Z.O. & K.F. SHIM, 1996. Qualitative requirements of essential fatty acid for juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 147: 275-291.
- MERICAN, Z.O. & K.F. SHIM, 1997. Qualitative requirements of linolenic and docosahexaenoic acid for juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 157: 277-295.
- MØLLER, H., S.Y. LEE, B. PATERSON & D. MANN, 2008. Cannibalism contributes significantly to the diet of cultured sand crabs, *Portunus pelagicus* (L.): A dual stable isotope study. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 361: 75-82.

- NELSON, S.G. & R.K. KROPP, 1985. Ammonia excretion and nitrogen assimilation by the tropical freshwater prawn *Macrobrachium lar* (Crustacea, Palaemonidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 81: 699-704.
- NYBLADE, C.F., 1987. Phylum or Subphylum Crustacea, Class Malacostraca, Order Decapoda, Anomura. En: Strathmann, M.F. (ed). Reproduction and development of marine invertebrates of the Northern Pacific Coast: data and methods for the study of eggs, embryos and larvae. University of Washington Press, Seattle, WA, p. 441-450.
- OH, C-W. & R.G. HARTNOLL, 2000. Effects of Food Supply on the Growth and Survival of the Common Shrimp, *Crangon crangon* (Linnaeus, 1758) (Decapoda, Caridea). *Crustaceana*, 73: 83-99.
- OKUMU, I. & H.P. STIRLING, 1998. Seasonal variations in the meat weight, condition index and biochemical composition of mussels (*Mytilus edulis* L.) in suspended culture in two Scottish sea lochs. *Aquaculture*, 159: 249-261.
- OKUMURA, T., T. NAGASAWA, I. HAYASHI & Y. SATO, 2002. Effects of starvation on RNA:DNA ratio, glycogen content, and C:N ratio in columellar muscle of the Japanese turban shell *Turbo (Batillus) cornutus* (Gastropoda). *Fisheries Science*, 68: 306-312.

- PASCHKE, K., 1998. Untersuchungen zum Energiestoffwechsel während der Embryonalentwicklung der Nordsee-Garnele *Crangon crangon* (Linnaeus 1758) (Decapoda: Caridea). PhD Dissertation, Fachbereich Biologie, Universität Hamburg, pp. 93.
- PASCHKE, K., P. GEBAUER & T. HAUSEN, 2006. Cultivation of *Lithodes santolla* in Chile: advances in the last six years using multiple approaches in Puerto Montt, Chile. En: Alaska Crab Stock Enhancement and Rehabilitation. Workshop proceedings, Kodiak, Alaska, B. Stevens (Ed.). Alaska Sea Grant College Program University of Alaska Fairbanks, Anchorage: 65-70.
- PÉREZ-ROSTRO, C. & A. IBARRA, 2003. Quantitative genetic parameter estimates for size and growth rate traits in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone 1931) when reared indoors. *Aquaculture Research*, 34: 543-553.
- PERSSELIN, S., 2006. Cultivation of King Crab Larvae at the Kodiak Fisheries Research Center, Kodiak, Alaska. En: Alaska Crab Stock Enhancement and Rehabilitation. Workshop proceedings, Kodiak, Alaska, B. Stevens (Ed.). Alaska Sea Grant College Program University of Alaska Fairbanks, Anchorage: 9-14.
- POLLERO, R.J., C.E. IRAZÚ & M. GONZÁLEZ BARÓ, 1992. Effect of environmental temperature on mitochondrial β -oxidation activity in gills and hepatopancreas of the freshwater shrimp *Macrobrachium borellii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 102: 721-725.

REGNAULT, M., 1987. Nitrogen excretion in marine and fresh-water crustacea. *Biol. Rev.* 62: 1-24.

RETAMAL, M., 1999. Decápodos de Chile. CD- Rom. ETI. Universidad de Concepción. Springer-Verlag.

ROBINSON, S.M. & D. WARE, 1988. Ontogenetic development of growth rates in larval Pacific herring, *Clupea harengus pallasi*, measured with RNA/DNA ratios in the Strait of Georgia, British Columbia. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45: 1422-1429.

ROSAS, C. & O. CARRILLO, 2006. Principales Rutas Metabólicas. Utilización de la Energía. En: Rosas, C., O. Castillo, R. Wilson & E. R. Andreatta (eds.): Estado Actual y Perspectivas de la Nutrición de los Camarones Pendidos Cultivados en Iberoamérica: 61-88.

ROSAS, C., E. L. COOPER, C. PASCUAL, R. BRITO, R. GELABERT, T. MORENO, G. MIRANDA & A. SÁNCHEZ, 2004. Indicators of physiological and immunological status of *Litopenaeus setiferus* wild populations (Crustacea, Penaeidae). *Mar. Biol.*, 145: 401–413.

ROSAS, C., A. SÁNCHEZ, E. DÍAZ, L.A. SOTO, G. GAXIOLA & R. BRITO, 1996. Effect of dietary protein level on apparent heat increment and post-prandial nitrogen excretion of *Penaeus setiferus*, *P. schmitti*, *P. duorarum*, and *P. notialis* postlarvae. *J. World Aquacult. Soc.* 27: 92-102.

- SASAKI, G.C., 1984. Biochemical changes associated with embryonic and larval development in the American lobster *Homarus americanus* Milne Edwards. PhD thesis, Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, MA, and Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA.
- SATO, T. & S. GOSHIMA, 2007. Effects of risk of sperm competition, female size, and male size on number of ejaculated sperm in the stone crab *Hapalogaster dentata*. *Journal of Crustacean Biology*, 27(4): 570-575.
- SHANG, Y.C., 1990. Aquaculture Economic Analysis: An Introduction. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- SHEEN, S.S. & S.W. WU, 2002. Essential fatty acid requirements of juvenile mud crab, *Scylla serrata* (Forskål 1775) (Decapoda, Scyllaridae). *Crustaceana*, 75: 1387-1401.
- SILVERSTEIN, J., M. HOSTUTTLE & K. BLEMINGS, 2005. Strain differences in feed efficiency measured as residual feed intake in individually reared rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aqua. Res.*, 36: 704-711.
- SMITH, R.W., D.F. HOULINAN, G.E. NILSSON & J. ALEXADRE, 1999. Tissue specific changes in RNA synthesis *in vivo* during anoxia in crucian carp. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 277: 690-697.

- STEVENS, B.G. & K.M. SWINEY, 2005. Post-settlement effects of habitat type and predator size on cannibalism of glaucothoe and juveniles of red king crab *Paralithodes camtschaticus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 321: 1-11.
- STEVENS, B.G., 2006. King Crab Cultivation and Stock Enhancement in Japan and the United States: A Brief History. En: Alaska Crab Stock Enhancement and Rehabilitation. Workshop proceedings, Kodiak, Alaska, B. Stevens (Ed.). Alaska Sea Grant College Program University of Alaska Fairbanks, Anchorage: 23-32.
- THOMAS, C.W., C.G. CARTER & B.J. CREAM, 2003. Feed availability and its relationship to survival, growth, dominance and the agonistic behaviour of the southern rock lobster, *Jasus edwardsii* in captivity. *Aquaculture* 215: 45-65.
- TOONEN, R., 2004. Genetic evidence of multiple paternity of broods in the intertidal crab *Petrolisthes cinctipes*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 270: 259-263.
- URBANI, N., B. SAINTE-MARIE, J.M. SEVIGNY, D. ZADWORNÝ & U. KUHNLEIN, 1998. Sperm competition and paternity assurance during the first breeding period of female snow crab (*Chionoecetes opilio*) (Brachyura: Majidae). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55: 1104-1113.
- VALENTE L.M., E.F. GOMES & B. FAUCONNEAU, 1998. Biochemical growth characterization of fast and slow-growing rainbow trout strains: effect of cell proliferation and size. *Fish Physiol. Biochem.*, 18: 213-224.

- WAGNER, M., E. DURBIN & L. BUCKLEY, 1998. RNA:DNA ratios as indicators of nutritional condition in the copepod *Calanus finmarchicus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 162: 173-181.
- WILMER, P., G. STONE & I. JOHNSTON, 2000. Environmental Physiology of Animals. Blackwell Science, Ltd. Oxford. 641pp.
- WOLF, T., 1978. Maximum Size of Lobsters (*Homarus*) (Decapoda, Nephropidae) *Crustaceana*, 34: 1-14.
- XU, X.L., W.J. JI, J.D. CASTELL & R.K. O'DOR, 1994. Influence of dietary lipid sources on fecundity, egg hatchability and fatty acid composition of Chinese prawn (*Penaeus chinensis*) broodstock. *Aquaculture*, 119: 359-370.
- ZAKLAN, S.D., 2001. Review of the Family Lithodidae (Crustacea: Anomura: Paguroidea): Distribution, Biology, and Fisheries. En: Crabs in Cold Water Regions: Biology, Management, and Economics. A.J. Paul, E.G. Dawe, R. Elner, G.S. Jamieson, G.H. Kruse, R.S. Otto, B. Sainte-Marie, T.C. Shirley, and D. Woodby (eds.). University of Alaska Sea Grant, AK-SG-02-01, Fairbanks. 876 pp.
- ZAR, J., 1999. Biostatistical Analysis. 4th Edition. Pearson Education. Singapore. pp. 718.

ZMORA, O., A. FINDIESEN, J. STUBBLEFIELD, V. FRENKEL, & Y. ZOHAR, 2005. Large-scale juvenile production of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Aquaculture*, 244: 129-139.

ZÖLLNER, N. & K. KIRSCH, 1962. Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulfophosphovanillin-Reaktion. *Z. ges. Exp. Med.*, 135: 545-561.