

UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y DE RECURSOS NATURALES

CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA

**VARIABILIDAD TEMPORAL EN EL CRECIMIENTO DE LARVAS
DE *HELCOGRAMMOIDES CHILENSIS* (PISCES: TRIPTERYGIIDAE)
DURANTE UN PERIODO DE TRANSICIÓN ESTACIONAL,
UTILIZANDO MICROESTRUCTURA DE OTOLITOS**

TESIS

PAMELA JOHANNA PALACIOS FUENTES

2011

PAMELA JOHANNA PALACIOS FUENTES

Trabajo de Titulación presentado en conformidad a los requisitos para obtener
el título profesional de Biólogo Marino

COMISIÓN DE TÍTULO:

Dr. Mauricio Landaeta Díaz

Director de Tesis

Universidad de Valparaíso

Prof. Fernando Balbontín Cavada

Miembro de la Comisión

Universidad de Valparaíso

Dr. Guido Plaza Pastene

Miembro de la Comisión

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	iii
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ANEXOS	xvii
RESUMEN	xviii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Biología de las larvas	3
1.1.1.- Control mareal de la dispersión	3
1.1.2.- Control de la dispersión por la luz de la luna	4
1.1.3.- Sobresaturación de depredadores sobre las crías	4
1.1.4.- Seguimiento de alimento para crías	4
1.1.5.- Reducción en la competencia larval	4
1.1.6.- Vinculación con el asentamiento	5
1.2.- Biología de los adultos	5

1.2.1.- <i>La luz de la luna afecta la habilidad de desovar o cuidar los huevos</i>	5
1.2.2.- <i>Sobresaturación de depredadores de huevos</i>	6
1.2.3.- <i>Defensa mejorada</i>	6
1.2.4.- <i>Costo del cuidado</i>	6
1.3.- <i>Ecología y biología de la Familia Tripterygiidae</i>	7
2. HIPÓTESIS	12
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo General	14
3.2. Objetivos Específicos	14
4. METODOLOGÍA	16
4.1. Sitio de estudio	16
4.2. Trabajo en terreno	16
4.3. Laboratorio	18
4.4. Análisis de datos	19
4.4.1 <i>Lectura y medición de microestructura de otolitos</i>	19
4.4.2. <i>Crecimiento somático</i>	20
4.4.3. <i>Estimación tasas de crecimiento</i>	21

4.4.3.1 Modelo lineal.....	21
4.4.3.2 Modelo de Laird-Gompertz.....	23
4.4.4. Análisis de crecimiento reciente	25
4.4.5. Retrocálculos de fechas de eclosión.....	26
5. RESULTADOS.....	28
5.1. Abundancia larval de <i>Helcogrammoides chilensis</i> en El Quisco en 2010	28
5.2. Estructura de tamaños.....	29
5.3. Morfología de otolitos	32
5.4. Tasas de crecimiento	38
5.5. Estado de condición.....	44
6. DISCUSIÓN	56
7. CONCLUSIONES	67
8. LITERATURA CITADA	68
9. ANEXOS	76
I. Effects of a parasitic copepod on the recent larval growth of a coastal rocky fish.....	77
II. Faster growth associated with the new moon phase: A case in larval triplefin <i>Helcogrammoides chilensis</i> (Pisces: Tripterygiidae) from central Chile.....	104

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero agradecer a Dios por todo lo que ha hecho en mi vida, ya que sin Él no podría haber llegado hasta acá, sé que es Él quien me ha dado las capacidades y la fuerza para poder terminar esta hermosa carrera, es Él quien me ha sostenido hasta hoy, y lo seguirá haciendo. Jamás podré terminar de darle las gracias por el amor ilimitado que me ha mostrado todos los días de mi vida.

A mi familia, Miguel, Cecilia y Marco. Dios me ha dado el privilegio de ser su hija y hermana, y creo que por ahora, sólo puedo agradecer el apoyo incondicional que han sido durante mi vida, por animarme a siempre confiar y depender de Dios, sobre todo en este proceso de convertirme en Bióloga Marina. Quiero darles infinitas gracias por su amor, su apoyo y su constante y valiente esfuerzo. Los amo con todo mi corazón.

A mi congregación, hermanos y amigos. Llegar a esta región fue un cambio muy grande para mí, y una vez más Dios demostró su amor para conmigo, ya que a través de ustedes nunca me sentí sola, me brindaron no sólo apoyo, si no su cariño y me cobijaron siempre que lo necesité. Claudia, Estefanía, Cami, Sebastián, Nadia, Keno, Michel, Paty, Mauro, Pao, tío Héctor, tía Moni... creo que no necesito mencionarlos individualmente, ya que todos ustedes saben perfectamente lo importante que son para mí.

A mi familia postiza, Jari, Rosita, Danilo, Camilita, Fafita, abuela Angélica, Claudio, Carlos y Vale. Dios me bendijo tanto al permitirme ser parte de su familia,

almorzando todos esos domingos juntos, con una constante preocupación y cariño hacia mí. Creo que decirles cuán agradecida estoy, jamás será suficiente y decirles cuánto los quiero, es poquísimo... han sido tan importantes para mí durante estos años. ¡Gracias!

A mis amigas, las “ellas”. ¿Recuerdan todos esos bailes de “tap” y risotadas que nos dábamos por la facultad? Recuerdo todas las veces que compartimos y que trabajamos juntas, momentos increíbles que jamás olvidaré, ya que son recuerdos que quedaron grabados en mi corazón y les agradezco su amistad durante estos seis años... que espero que sigan siendo muchos más. Le doy muchas gracias a Dios por su amistad.

Al “Team LABITP”, Jose, Franco y Coke. Fueron muchísimas horas que vivimos en el laboratorio, y no puedo dejar de agradecer el apoyo que me brindaron durante el transcurso de mi tesis. Muchas gracias por su disposición para trabajar, las tallas, los asados y juntas varias. Fue demasiado bacán ser parte de este laboratorio y trabajar junto a ustedes.

En especial al profe Mauricio, por sus palabras y consejos, por su apoyo, su ánimo y su entrega. Aún me sorprende el entusiasmo que nos traspasaba día a día y cómo nos animaba y motivaba a continuar con nuestras tesis y dar más de lo que aún nosotros pensábamos que podíamos. Una vez más, muchas gracias por abrirme las puertas de su laboratorio, fue un enorme privilegio para mí el ser parte del LABITI y aprender tanto de usted. Extiendo mis agradecimientos a Claudia, porque también ha sido una parte importante de nuestro paso por el LABITI.

Al Proyecto Fondecyt 1100424 “Early life history traits of Young-of-the-year intertidal fishes of Central Chile, as revealed by otolith microstructure analysis”, por el financiamiento de esta tesis y por la oportunidad de trabajar en este proyecto.

Y finalmente a Montemar. Tuve la bendición de estudiar y de formar parte de esta facultad. Muchísimas gracias a cada uno de los profesores que ayudaron a mi formación profesional y personal, y por su puesto a cada uno de los funcionarios de esta facultad, que siempre están dispuestos a ayudarnos en lo que necesitemos como estudiantes. Son una gran familia para nosotros.

“Los cielos cuentan la gloria de Dios, y el firmamento

anuncia la obra de sus manos”

Salmos 19:1

“Desde lo alto del cielo hasta el fondo del mar, todo es un reflejo de Su Majestad...

Maravilloso Dios”

Chris Tomlin

LISTA DE TABLAS

<u>Tabla</u>	<u>Página</u>
Tabla 1. Abundancias de larvas obtenidas en cada muestreo.....	28
Tabla 2. Análisis de regresión lineal del tamaño de los otolitos (radio, perímetro y área) en función de la longitud larval (LL) de <i>H. chilensis</i> . Se muestra el intercepto, pendiente, error estándar (ES) correspondiente, y los valores de F y P.....	30
Tabla 3. Estadística descriptiva del tamaño y volumen larval de <i>H. chilensis</i>	35
Tabla 4. Análisis de las regresiones lineales de la longitud larval (LL) versus el número de microincrementos para cada muestreo (L1, L2 y L3) y para la población total. Se muestra el intercepto, pendiente,	

error estándar (ES) correspondiente, y los valores de F y P..... 43

Tabla 5. Valores H por edad del test de Kruskal-Wallis y su

respectivo valor P..... 52

Tabla 6. Análisis de regresiones lineales de las trayectorias

Larvales de acuerdo a cada fase lunar. El intercepto corresponde

al ancho inicial del microincremento (μm) y la pendiente a la

tasa de crecimiento de los microincrementos estimada por los

modelos ($\mu\text{m microincremento}^{-1}$). EE = error estándar..... 53

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
Fig 1. <i>Helcogrammoides chilensis</i> en estados larvales (pelágicos) en (a) pre-flexión, (b) post-flexión y (c) en estado adulto (bentónico). Modificado de Williams & Springer (2000).....	8
Fig 2. Distribución de <i>Helcogrammoides chilensis</i> en Chile, entre Iquique (20°18' S) y Talcahuano (36°45' S).....	11
Fig 3. Zona de muestreo en la bahía El Quisco, Chile central.....	17
Fig 4. Histogramas de frecuencia de distribución de tamaños para los cruceros Lacost 1, 2 y 3 (a, b y c, respectivamente) y de distribución de volumen para los 3 muestreos (d, e y f)	31

Fig 5. Otolito de *H. chilensis*: **(a)** Lapillus (Larva 10,864 mm LL)
y **(b)** Sagitta (Larva 9,984 mm LL). Se muestran el núcleo, la marca
de eclosión y los anillos de crecimiento en rojo, la línea amarilla
corresponde a la medida entre el núcleo y la marca de eclosión y en
azul la medición de los últimos 5 microincrementos..... 34

Fig 6. Relaciones morfométricas entre las medidas de los otolitos
y la longitud larval (LL). En rojo se observa el otolito derecho
y en azul el otolito izquierdo..... 36

Fig 7. Valores promedio del grosor de cada microincremento de
los sagitta. Las barras verticales, indican una desviación estándar..... 37

Fig 8. Modelo de crecimiento **(a)** lineal para la longitud y
(b) exponencial para el volumen de *H. chilensis*, para
el período de muestreo..... 39

Fig 9. Modelo lineal de crecimiento para los muestreos Lacost 1, 2 y 3 (a, b y c, respectivamente).....	40
Fig 10. Curvas de crecimiento según el modelo lineal (rojo) y modelo Gompertz (negro).....	41
Fig 11. Tasa de crecimiento instantánea en función de la edad.....	42
Fig 12. Valores de ROGI para el total de los individuos por cada muestreo.....	45
Fig 13. Valores de ROGI para cada muestreo de acuerdo a su estadio de desarrollo: (a) Pre-flexión y (b) Post-flexión.....	46
Fig 14. Abundancias de eclosión de <i>H. chilensis</i> a lo largo del año.....	48

Fig 15. Frecuencias de eclosión de *H. chilensis*, de acuerdo al ciclo lunar. La luna cuarto creciente corresponde al día seis del ciclo lunar, la luna llena corresponde al día 14, la luna cuarto menguante corresponde al día 22 y la luna nueva corresponde al día 29..... 49

Fig 16. Frecuencias de eclosión de *H. chilensis*, de acuerdo al ciclo lunar para **(a)** Lacost 1, **(b)** Lacost 2 y **(c)** Lacost 3..... 50

Fig 17. Frecuencia de eclosión en el ciclo lunar. En rojo, se muestra la media angular (línea vertical) y el intervalo de confianza (95%) en horizontal, para **(a)** todos los individuos muestreados, **(b)** Lacost 1, **(c)** Lacost 2 y **(d)** Lacost 3..... 51

Fig 18. Grosor de los microincrementos de acuerdo a la edad de individuos que eclosionaron en distintas fases lunares..... 53

Fig 19. Valores promedio del grosor de cada microincremento para individuos que eclosionaron en (a) luna nueva (negra) y luna llena (rojo) y (b) luna cuarto menguante y cuarto creciente.....	54
---	----

Fig 20. Esquema de larva de <i>H. chilensis</i> de 10,1 mm de longitud larval, parasitada con 2 ectoparásitos de la familia Pennellidae en el estómago.....	55
--	----

LISTA DE ANEXOS

<u>Anexo</u>	<u>Página</u>
1. Effects of a parasitic copepod on the larval recent growth of a coastal rocky fish.....	77
2. Faster growth associated with the new moon phase: A case in larval triplefin <i>Helcogrammoides chilensis</i> (Pisces: <i>Triterygiidae</i>) from Central Chile.....	104

RESUMEN

El análisis de la microestructura de otolitos, ha resultado ser una herramienta importante en los estudios de estados tempranos de peces, ya que manifiestan cómo el crecimiento larval es afectado por factores ecológicos y oceanográficos. Las marcas grabadas en los otolitos registran la historia de vida de los peces, revelando el proceso que sucede entre las larvas recién eclosionadas y el asentamiento de las mismas. Estos microincrementos diarios determinan la edad de los individuos y proporcionan interesantes puntos de vista en cuanto a la influencia de los patrones de desove, eclosión y tasas de crecimiento larvales, y del asentamiento y sobrevivencia en las fases bentónicas de los peces. El principal objetivo de este estudio es establecer la variabilidad temporal de la tasa de crecimiento de las larvas de *Helcogrammoides chilensis*, en la bahía El Quisco (33°24'S, 71°43'W) entre fines de invierno y principios de primavera del 2010

Se llevaron a cabo 3 muestreos entre septiembre y octubre de 2010 en la bahía El Quisco, Chile central, en donde se recolectaron muestras de ictioplancton mediante una red bongo. De las muestras obtenidas, se separaron las larvas del trombollito de tres aletas, *Helcogrammoides chilensis*, para ser medidas y fotografiadas bajo una lupa esteromicroscópica. Se extrajeron los otolitos y bajo un microscopio electrónico, se les analizó la microestructura para establecer relaciones morfométricas en función de la longitud larval (LL), y conjuntamente se realizaron conteos de los microincrementos para estimar las tasas de crecimiento por muestreo y poblacional, índice de condición (ROGI), retrocálculos de la edad, fechas de eclosión y patrones de eclosión lunar.

Las larvas *H. chilensis* presentaron altas abundancias en la zona y durante el período de estudio (prom $\pm$ desviación estándar: $202,78 \pm 440,38$ individuos 1000 m^{-3}), con alta variabilidad en el tamaño (prom $\pm$ desviación estándar: $6,45 \pm 2,45$ mm), la que presentó diferencias significativas entre los 3 muestreos. La morfología de sus otolitos (área, perímetro y radio) presentaron relaciones significativas y positivas en función de la longitud larval. Los grosores de los microincrementos variaron entre 0,6 y 2,0 μm (prom $\pm$ desviación estándar: $1,3 \pm 0,2$ μm). Las edades observadas variaron desde 1 a 57 días y su tasa poblacional de crecimiento poblacional para la época de estudio fue de $0,15\text{ mm día}^{-1}$ (modelo lineal) y a nivel temporal (entre septiembre y octubre) no se observaron diferencias significativas, ni tampoco se observaron diferencias significativas en la condición larval poblacional entre los muestreos. La eclosión resultó preferentemente en luna nueva, aunque se observó eclosiones en luna cuarto creciente y cuarto menguante, destacándose un patrón semi-lunar de eclosión.

¿Por qué no existen diferencias significativas en las tasas de crecimiento, tamaños de eclosión y condición de las larvas de *H. chilensis* en el estudio? Dentro de las alternativas que podrían explicar esta situación, la principal es que hay factores extrínsecos y denso-independientes que están regulando la población (*e.g.* parasitismo, asociación de la eclosión con patrones semi-lunares). Un patrón semi-lunar confiere a *H. chilensis* ciertas ventajas, generadas por eclosiones en luna cuarto creciente, luna cuarto menguante y un máximo en luna nueva, como el aumento en la dispersión larval, y aumento del cuidado parental, adicionado a una disminución de la depredación y de la competencia por alimento.

1. INTRODUCCIÓN

Durante varias décadas ha existido la interrogante sobre los factores que determinan la estructura espacial y temporal de poblaciones de peces en la zona costera, debido a la complejidad de sus ciclos de vida. Es por esta razón que muchos estudios tienen como objetivo, describir los procesos que actúan sobre los estados larvales en la columna de agua, ya que éstos influirán en el pre-reclutamiento; es decir, afectarán el suministro de individuos que deben crecer, desarrollarse y sobrevivir a estos estadios tempranos antes de alcanzar un estado reproductivamente maduro, para finalmente ingresar y renovar la población adulta (Raventós & Macpherson 2001, Hernández-Miranda *et al.* 2009, Sponaugle 2010, Sogard 2011).

Alrededor de un 90% de los peces poseen una historia de vida compleja, la que incluye una larva planctónica (que refleja una fase dispersiva, Hernández-Miranda *et al.* 2003) y un juvenil bentónico (Vigliola & Meekan 2002). Durante este periodo de desarrollo las larvas deben pasar cierto tiempo en la columna de agua antes de llegar a un estado competente y asentarse, lo que se define como duración pelágica larval (DPL) (Kohn & Clements 2011).

La DPL está directamente relacionada con las tasas de crecimiento larvales (Suthers 1998, Bergenius *et al.* 2005), ya que el proceso de crecimiento refleja la interacción fisiológica de los individuos con los factores físicos y biológicos, los cuales podrán influir de manera directa o indirecta sobre las tasas de crecimiento (Bergenius *et al.* 2005). Es así

como aquellas larvas que crecen más lento (*i.e.* menores tasas de crecimiento) estarán más tiempo en el ambiente pelágico, y en consecuencia estarán más expuestas a factores biológicos (*e.g.* depredación, disponibilidad de alimento) y a factores ambientales (*e.g.* corrientes, barreras oceanográficas, cambios de temperatura y/o salinidad) que podrían afectar tanto la sobrevivencia como la dispersión larval (Kohn & Clements 2011). Por lo tanto, si además las larvas son transportadas lejos de los hábitats adecuados, se puede llegar a un período crítico en el momento del asentamiento desde el plancton al bentos (Marliave 1986), el que afectaría no sólo el reclutamiento sino también la población juvenil y por consiguiente a la población adulta (Sponaugle 2010).

El estado de condición larval es también un factor clave en la sobrevivencia de los estadios tempranos de peces. Una de las causas principales de mortalidad está en la alimentación subóptima o limitada, la que afecta directamente el crecimiento e interrumpe la formación de anillos de crecimiento, y se transforma en un punto de quiebre en éxito del desarrollo temprano (Suthers 1998, Aguilera *et al.* 2009). Es por esta razón que la condición larval resulta variable en el tiempo y en el espacio, y se convierte de esta manera en una herramienta que evalúa el efecto de las condiciones ambientales y estresantes en las larvas (Suthers 1998).

Otro factor importante a considerar que influye en la sobrevivencia de los estadios tempranos de peces, es la relación que existe entre el desove, la eclosión y el asentamiento y los regímenes mareales y ciclos lunares. En este sentido, algunos estudios postulan que las especies que desovan huevos bentónicos podrían estar relacionadas con ciclos semi-lunares de desove (Robertson *et al.* 1990, Sponaugle & Cowen 1994, Plaza *et al.* 2003), y

aquellas especies que desovan huevos planctónicos, con ciclos mensuales o asincrónicos (Sponaugle & Cowen 1994, Plaza *et al.* 2003).

El que distintas especies marinas, presenten sus actividades reproductivas asociadas a ciclos lunares sería explicado por diversas hipótesis que muestran el efecto que las condiciones ambientales relacionadas al ciclo lunar generan en el éxito reproductivo y se enfocan principalmente en la sobrevivencia de la descendencia (huevos planctónicos) (Robertson *et al.* 1990). Éstas se dividen en dos tipos:

1.1.- Biología de las larvas

1.1.1.- Control mareal de la dispersión

La primera de las hipótesis está relacionada con la dispersión de las larvas planctónicas, en la que la dispersión aumenta cuando aumenta la amplitud mareal. Por ende, los ciclos lunares de desove serán mejor desarrollados y correlacionados con los regímenes mareales en especies que ubican sus nidos en hábitats superficiales; además las mayores eclosiones deberían ocurrir durante la fase lunar, en las cuales las mareas dispersivas y las eclosiones larvales coincidan. Las máximas eclosiones y la cantidad de desoves durante un ciclo lunar de desove deberían seguir los cambios estacionales en el calendario lunar y tamaños de la serie de mareas adecuadas. Los ciclos de desove de una especie individual deberían variar en relación a la variación geográfica en el régimen mareal.

1.1.2.- Control de la dispersión por la luz de la luna

Las eclosiones deberían ser máximas durante las fases lunares cuando la luz de la luna es máxima durante los períodos de eclosión nocturnos, generando ciclos de desove unimodales.

1.1.3.- Sobresaturación de depredadores sobre las crías

La sincronización de la eclosión de varias especies, sobresaturan a los depredadores con larvas planctónicas. Para que esta hipótesis se cumpla, debe haber baja dispersión, ciclos de desove unimodales y pronunciada sincronía interespecífica en el mismo sitio.

1.1.4.- Seguimiento de alimento para crías

Los ciclos de desove coinciden con aquellos de invertebrados, cuya descendencia genera alimento para las larvas de peces. Para esto, diferentes especies en el mismo sitio deben tener ciclos de eclosión con forma similar y en el mismo tiempo.

1.1.5.- Reducción en la competencia larval

Las cohortes larvales que estén espaciadas temporalmente, reducen la competencia por el alimento entre ellas. Para esto, las cohortes deben ser generadas en forma discreta y uniforme en el tiempo, con baja dispersión y ciclos de desove semilunares o con períodos

más cortos de desove. Ciclos de desoves de alta frecuencia deben ser sincrónicos entre distintas poblaciones locales en el mismo sitio.

1.1.6.- Vinculación con el asentamiento

Se enfoca en el final de la vida larval. Propone que los patrones de la producción larval representan adaptaciones para maximizar el asentamiento de los juveniles planctónicos. Si las larvas presentan periodos de desarrollo fijos, y optan por fases lunares para el asentamiento, entonces habrá una selección del tiempo en el que las larvas son liberadas para que la mayoría llegue a ser competente para asentarse al momento seleccionado. En este caso, los ciclos de desove lunares deben ocurrir en especies que tienen edades relativamente fijas de asentamiento y en las cuales el asentamiento es preferentemente lunar. Los ciclos de desoves lunares pueden estar ausentes en especies que tienen asentamientos variables en edad que carezcan de periodos designados de asentamiento. Una sola población deber tener el mismo patrón de desove en la misma estación todos los años.

1.2.- Biología de los adultos

1.2.1.- La luz de la luna afecta la habilidad de desovar o cuidar los huevos

La luz de la luna permite que las hembras desoven cerca del amanecer, cuando los predadores diurnos de huevos están ausentes. Para que se cumpla esta hipótesis, los ciclos deberían ser lunares, unimodales y sincrónicos entre especies en el mismo y en otros sitios.

Si la luz de la luna afecta la actividad de desove en el amanecer, el ciclo debería tener su máximo entre la luna llena y cuarto menguante.

1.2.2.- Sobresaturación de depredadores de huevos

Esta hipótesis predice una alta sincronización y actividad infrecuente por una población local. La sincronización puede ser lunar con un máximo en cualquier fase, o esporádica. La población de depredadores debe ser saturable (*i.e.* incapaz de alimentarse de todos los huevos) cuando una población sincroniza su desove. Los grados de sincronía deben ser positivos con la fuerza de la presión de los depredadores

1.2.3.- Defensa mejorada

Los desoves deben ser altamente sincronizados y combinados con agregaciones espaciales de los nidos. El macho central de una colonia desovante debe procurar la menor pérdida de huevos debido a los depredadores. Los desoves pueden ser esporádicos o cíclicos en cualquier frecuencia y con máximos en cualquier fase lunar.

1.2.4.- Costo del cuidado

El cuidado parental genera un alto costo, y los machos deberían mostrar el costo que reduce la sobrevivencia de los huevos. Si la sobrevivencia de los huevos cambia en un ciclo de desove, debería ser menor al finalizar el ciclo. La sincronización de la población

de aquellas especies que exhiben cuidado parental, puede ser regular o esporádicas. Los ciclos lunares de desoves son más comunes en especies con cuidado parental que en las que no presentan este patrón.

1.3.- Ecología y biología de la Familia Tripterygiidae

Dentro de las familias de peces costeros que presentan un ciclo de vida con larva pelágica y juveniles bentónicos, está la familia Tripterygiidae, cuyos miembros son conocidos comúnmente como trombollitos de 3 aletas. Esta familia, que se caracteriza por presentar una aleta dorsal tripartita (Pérez 1979, Cancino *et al.* 2010), se divide en 29 géneros que comprenden 163 especies, presentan una distribución cosmopolita en zonas polares, tropicales y templadas (Kohn & Clements 2011). En Chile, esta familia está representada por 3 especies, *Helcogrammoides chilensis* (Cancino 1960) (Figura 1), *H. cunninghami* (Smitt, 1898) y *H. antarticus* (Tomo 1981) (Pérez 1979, Pequeño 1989, Williams & Springer 2001). *Helcogrammoides chilensis* se distribuye entre Iquique (20°18' S) y Talcahuano (36°45' S) (Figura 2), en el intermareal rocoso altamente expuesto (Williams & Springer 2001, Cancino *et al.* 2010).

Esta especie, al igual que la mayoría de los peces intermareales, realizan extensas excursiones lejos de las pozas intermareales durante los ciclos de marea alta (con condiciones más favorables) con el fin de satisfacer sus necesidades alimentarias (Berrios & Vargas 2004 *fide* Gibson 1982), que en el caso de los juveniles de esta especie, de

hábitos carnívoros (Berrios & Vargas 2004, Rojas & Ojeda 2010), corresponde principalmente a crustáceos de pequeño tamaño (*e.g.* anfípodos, isópodos y copépodos harpacticoídeos), es decir, presas de alta movilidad, pero con un alto valor energético (Muñoz & Ojeda 1998, Berrios & Vargas 2004).



Fig 1. *Helcogrammoides chilensis* en estados larvales (pelágicos) en **(a)** pre-flexión, **(b)** post-flexión y **(c)** en estado adulto (bentónico). Modificado de Williams & Springer (2000)

En cuanto a su desarrollo y tácticas reproductivas, la familia Tripterygiidae se caracteriza por depositar sus huevos en una sola capa en la zona submareal, adheridos al sustrato rocoso, mediante filamentos; durante este período, los machos cuidan del territorio y de los huevos (además de proporcionarles agua oxigenada y limpiarlos de detritus) hasta el momento en que eclosiona una larva planctónica de entre 3-6 mm de longitud, con ojos pigmentados, un pequeño saco vitelino y la boca abierta (Ruck 1973, Ruck 1980). Pérez (1979) estableció, específicamente para el estado larval de *H. chilensis*, las siguientes características diagnósticas: un melanóforo en el margen ventral del abdomen, 1 a 6 melanóforos estrellados en el dorso de la cabeza y 10 miómeros (vértebras) preanales. Las larvas están presente durante todo el año en la Bahía de Valparaíso (Pérez 1979), aunque entre Las Cruces y El Quisco (Chile central) son más abundantes en primavera, un período dominado por fuertes eventos físicos en la columna de agua y en el clima regional (e.g. inicio de eventos de surgencia) (Hernández-Miranda *et al.* 2003).

Hasta la fecha, existe una escasez de información con respecto a los estados tempranos de peces intermareales chilenos, particularmente para la especie *H. chilensis* (Pérez 1979, Quijada & Cáceres 2000). Por lo tanto, aún faltan estudios que permitan determinar cómo los procesos, tanto físicos como ecológicos, afectan el ciclo de vida de esta especie, y es de mucha relevancia encontrar una herramienta que permita comprender esta fase planctónica tan compleja.

El análisis de la microestructura de otolitos, estructuras calcáreas que se ubican en el sistema laberinto de los peces (Hovenkamp 1990) en las que los peces periódicamente se depositan una serie continua de microincrementos (Campana 1984), ha resultado ser una

herramienta importante en los estudios de estados tempranos de peces, ya que manifiestan cómo el crecimiento larval es afectado por factores ecológicos y oceanográficos, los cuales podrían gatillar variaciones en las tasas de sobrevivencia, mecanismos de transporte larval, dinámicas de dispersión y conectividad poblacional, reclutamiento, mortalidad, entre otros (Fey 2005, Gagliano & McCormick 2007a, Aguilera *et al.* 2009, Sponaugle 2010).

La historia de vida que se graba en los otolitos de los peces revela el proceso que sucede entre las larvas recién eclosionadas y el asentamiento de las mismas (Vigliola & Meekan 2002); y del mismo modo los microincrementos diarios y las marcas de asentamiento en los otolitos, determinan la edad de los individuos y hacen posible realizar retrocálculos para estimar fechas de eclosión, los que proporcionan interesantes puntos de vista en cuanto a la influencia de los patrones de desove, eclosión y tasas de crecimiento larvales, y del asentamiento y sobrevivencia en las fases bentónicas de los peces (Campana 1984, Hovenkamp & Witte 1991, Raventós & Macpherson 2001, Vigliola & Meekan 2002, Aguilera *et al.* 2009, Buratti & Santos 2010, Sponaugle 2010).

Generalmente, todos los eventos de transición que afecten a un pez, como por ejemplo la eclosión o el asentamiento, generarán un cambio en la depositación en los otolitos mostrando un registro claro de ese evento, con la excepción descrita en la especie *Scartichthys viridis*, que no presenta marcas definidas en sus otolitos (Hernández-Miranda *et al.* 2009). Esta información adicionada a los datos de edad y tamaño son fundamentales para mejorar el conocimiento de los estadios tempranos de peces (Buratti & Santos 2010).

Por las razones anteriormente mencionadas, se utilizará el método del análisis de microestructura de otolitos para establecer los patrones de crecimiento de las larvas de *Helcogrammoides chilensis*, capturadas durante fines de invierno y comienzos de primavera en una bahía somera de Chile central.



Fig 2. Distribución de *Helcogrammoides chilensis* en Chile, entre Iquique (20°18' S) y Talcahuano (36°45' S).

2. HIPÓTESIS

De acuerdo a lo establecido por Landaeta & Castro (2006), aquellos peces que poseen larvas planctónicas utilizan una variedad de tácticas reproductivas dependiendo del hábitat en que viven los adultos; pero muchas de las especies sincronizan sus actividades reproductivas con procesos físicos y ambientales para maximizar las posibilidades de sobrevivencia de los estados tempranos, es decir, los patrones estacionales de reproducción podrán funcionar como un mecanismo de acoplamiento con condiciones ambientales favorables (Hernández-Miranda *et al.* 2003, Landaeta & Castro 2006).

Bajo esta premisa, y teniendo en cuenta que las hembras de esta especie desovan a fines de invierno y principio de primavera, existirían entonces, 2 posibles opciones en cuanto al crecimiento de las larvas de *Helcogrammoides chilensis*:

Mientras transcurre la temporada reproductiva (*i.e.* hacia fines de primavera), las condiciones ambientales son altamente variables (por ejemplo, aumentan la temperatura del aire y la disponibilidad de alimento en la columna de agua, hay alta variación en la dirección e intensidad de los vientos, ingreso de parcelas de agua de baja temperatura producto de eventos de surgencia), y por lo tanto aquellos individuos que eclosionan en primavera tendrán una tasa de crecimiento distinta de aquellos que eclosionaron a fines de invierno.

H₀: La tasa de crecimiento de las larvas de *Helcogrammoides chilensis* varía, a medida que transcurre la temporada reproductiva y las condiciones ambientales son más favorables.

Por el contrario, la tasa de crecimiento puede mantenerse constante a pesar de que las condiciones ambientales mejoren. En el caso de los desoves parciales que presenta el género Tripterygiidae (Ruck 1973, 1980), las hembras de *H. chilensis*, al igual que en anchoveta *Engraulis ringens* y la merluza común *Merluccius gayi* podrían desovar huevos de menor tamaño (y en consecuencia de menor calidad, menores cantidades de vitelo y ácidos grasos, etc.) a medida que avanza la temporada de desove (Llanos-Rivera & Castro 2004, Landaeta & Castro 2012); esto conllevaría que aquellos individuos que eclosionan inicialmente poseen mayores longitudes larvales que aquellos que eclosionan al final de la temporada. La tasa de crecimiento es la misma para todos los individuos, independientemente de la época en que hayan eclosionado.

H₁: La tasa de crecimiento de las larvas de *Helcogrammoides chilensis* no varía significativamente a medida que transcurre la temporada reproductiva

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Establecer la variabilidad temporal de la tasa de crecimiento de las larvas del trombollito de tres aletas, *Helcogrammoides chilensis*, en la bahía El Quisco (33°24'S, 71°43'W), a medida que transcurre la temporada reproductiva entre fines de invierno y principios de primavera del 2010.

3.2. Objetivos Específicos

- 1) Evaluar si el crecimiento somático de las larvas (longitud larval) se ve reflejado a través de la morfometría de los otolitos (radio, perímetro y área).

- 2) Establecer la tasa de crecimiento poblacional para larvas de *H. chilensis* a partir de la relación entre el número de microincrementos en sus otolitos y la longitud de los individuos (edad v/s tamaño), y determinar la variabilidad temporal del crecimiento para *H. chilensis*.

- 3) Estimar el estado de condición de las larvas de *H. chilensis* mediante la relación entre el crecimiento reciente y el radio de los otolitos.

- 4) Determinar las fechas de eclosión, mediante un retrocálculo de la edad, y establecer un potencial patrón de eclosión de acuerdo al ciclo lunar.

4. METODOLOGÍA

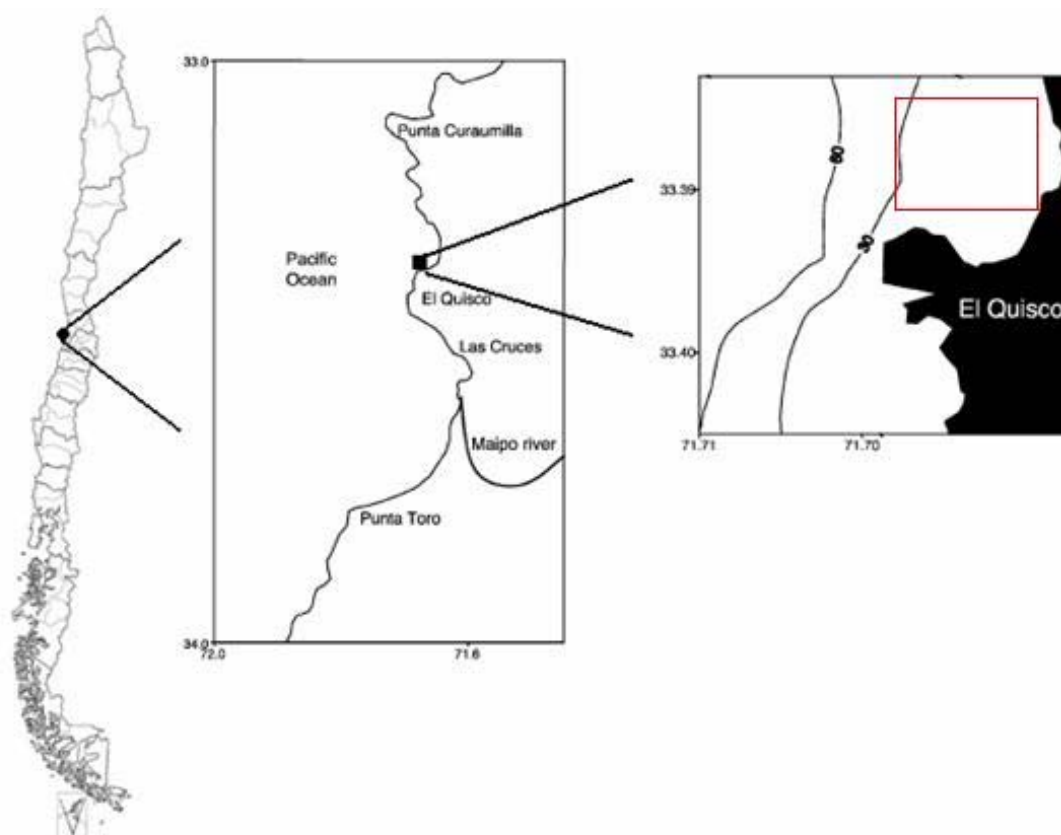
4.1. Sitio de estudio

La zona central de Chile, y en particular la zona de estudio, El Quisco ($33^{\circ}24'S$, $71^{\circ}43'W$), se caracteriza por presentar una plataforma continental angosta, con un quiebre que ocurre aproximadamente a 10 millas náuticas desde la costa. Si se considera además las características oceanográficas y meteorológicas de la zona, éstas muestran un claro patrón estacional, el cual es característico de estas latitudes, y presenta: (1) períodos intermitentes de surgencia y relajación entre finales de primavera e inicios de otoño, (2) altos niveles de estratificación e intrusión de aguas oceánicas durante el verano y (3) fuertes tormentas en invierno (Hernández-Miranda *et al.* 2003).

4.2. Trabajo en terreno

En la costa central de Chile a aproximadamente 1-2 millas náuticas de la zona de la bahía El Quisco (Figura 3), con profundidades entre 25 y 45 m, se llevaron a cabo 3 muestreos entre septiembre y octubre de 2010, denominadas LACOST (LARvas COSTeras) 1, 2 y 3, respectivamente. Cada muestreo se compuso de una transecta, con 5 a 8 lances,

ubicadas paralelas a la costa; a bordo de la lancha científica “Ilán”, perteneciente a la Pontificia Universidad Católica de Chile, y se obtuvieron muestras de ictioplancton mediante un arrastre doble oblicuo (a una velocidad de 1 a 2 nudos, desde la superficie hasta 20 m de profundidad por 15 min) con una red Bongo (60 cm de diámetro de boca y 300 μ m de apertura de malla) equipada con flujómetros TSK, para la estimación del volumen de agua filtrada. Las muestras de ictioplancton recolectadas fueron fijadas con formalina al 4% tamponada con borato de sodio, y antes de 24 h fueron traspasadas a



etanol al 96%.

Fig 3. Zona de muestreo en la bahía El Quisco, Chile central

4.3. Laboratorio

En el Laboratorio de Ictioplancton (LABITI) de la Facultad de Ciencias del Mar y Recursos Naturales de la Universidad de Valparaíso, las muestras se analizaron bajo una lupa estereomicroscópica Olympus SZ-61, para separar las larvas de peces e identificarlas hasta el nivel taxonómico más bajo posible. En el caso particular de las larvas de *Helcogrammoides chilensis*, éstas se identificaron según Ciechomski (1971) y Pérez (1979), y que se caracterizan por presentar un melanóforo en el margen ventral del abdomen, 3 melanóforos estrellados en el dorso de la cabeza y 10 miómeros (vértebras) preanales.

Las larvas de *H. chilensis* se examinaron bajo una lupa estereomicroscópica Olympus SZ-61 conectada a una cámara Moticam 5000 de 5.0 MPx, con la cual se fotografiaron, luego se midieron con ayuda del programa Motic Images Plus 2.0, tanto la altura del cuerpo al nivel de la inserción de la aleta pectoral (AC) como la longitud larval (LL). La longitud larval (LL) se midió de acuerdo al estado de desarrollo en que se encuentren las larvas; para aquellas larvas en pre-flexión se utilizó la longitud notocordal (LN) que corresponde al tamaño entre la punta del hocico y la punta del notocordo, y en el caso de las larvas en flexión y post-flexión, la longitud estándar (LE) que es medida entre la punta del hocico y la base de los radios hipurales. Estas medidas realizadas no se corrigieron por el encogimiento a causa de la fijación en formalina y preservación en etanol.

Para la extracción y medición de los otolitos se siguió el procedimiento establecido por Landaeta *et al.* (2010). Las larvas se colocaron individualmente en un portaobjeto, con una gota de etanol al 96%, el cual se ubicó sobre un filtro de luz polarizada en la lupa, para facilitar la distinción entre estructuras calcáreas y tisulares. A continuación y con ayuda de agujas entomológicas, se procedió a extraer los otolitos sagitta y lapillus tanto del lado derecho como izquierdo de la cabeza de las larvas (cuando fue posible), para luego fijarlos con resina epóxica en el mismo portaobjetos.

Bajo un microscopio Motic BA310 conectado a una cámara Moticam 2500 de 5 MPx, los otolitos sagitta y lapillus fueron observados, fotografiados y se les realizaron las siguientes mediciones: 3 veces consecutivas el radio (μm), una vez el perímetro (μm) y el área (μm^2). Además, se midieron los grosores de los microincrementos y la distancia desde el centro (núcleo) del otolito hasta la marca de eclosión (hatch mark).

4.4. Análisis de datos

4.4.1 Lectura y medición de microestructura de otolitos

A partir de 189 otolitos extraídos, se contó tres veces el número de microincrementos de cada otolito, contando desde una marca oscura y más gruesa cercana al núcleo, correspondiente a la marca de eclosión. Aunque no se ha validado la marca de eclosión en individuos de *H. chilensis*, recientemente se ha descrito y validado para larvas

recién eclosionadas de *Forsterygion nigripenne* (Kohn & Clements 2011). Se asume que cada microincremento es depositado diariamente, y que su conteo, corresponde a una medición de edad. La depositación diaria de anillos en la especie *H. chilensis*, ha sido comprobada recientemente a través de experimentos en laboratorio (Dr. (c) Mansur *com. pers.* Pontificia Universidad Católica de Chile) y para otras especies de la familia Tripterygiidae (*Forsterygion capito*, *F. varium*, *Ruanoho whero*, Kohn & Clements 2011).

Una vez que se obtuvieron las tres mediciones, se trabajó con el valor obtenido cuando éste se repitió en las tres ocasiones; con la moda cuando el valor se repitió sólo dos veces; o con el promedio cuando los tres valores fueron distintos. Luego se compararon las lecturas realizadas a partir de los otolitos sagitta derechos e izquierdos y se evaluó si existían diferencias significativas, mediante un test Wilcoxon para datos pareados. Dado que se no se presentaron diferencias significativas entre los otolitos derechos e izquierdos ($Z = 0,374$; $P = 0,71$), para las estimaciones de crecimiento, se utilizó el sagitta derecho para los análisis de crecimiento y cuándo éste no estuvo disponible, se utilizó el sagitta izquierdo.

4.4.2. Crecimiento somático

Para establecer si el crecimiento del otolito es un buen indicador del crecimiento somático de las larvas, con el software STATISTICA 7 se ajustó una regresión lineal por mínimos cuadrados entre la longitud larval (LL) (eje X) y el radio promedio (eje Y),

también se realizó el mismo ajuste entre la longitud larval (eje X) y el perímetro del otolito (eje Y), y posteriormente se ajustó un modelo potencial entre la longitud larval (eje X) y el área del otolito (eje Y) (Landaeta & Castro 2006, Landaeta *et al.* 2010). Además se realizaron comparaciones entre los ajustes de los modelos para los otolitos derecho e izquierdo mediante un test de pendientes múltiples.

4.4.3. Estimación tasas de crecimiento

La variabilidad del crecimiento de las larvas de *H. chilensis* por muestreo (Lacost 1, Lacost 2, Lacost 3) y total, se estimó utilizando sólo las mediciones de los sagitta derecho, mediante dos modelos:

4.4.3.1 Modelo lineal

Se estimaron las tasas de crecimiento (m) total y para cada muestreo, mediante una relación entre el número de microincrementos (eje Y) y la longitud larval (eje X) utilizando una regresión lineal por mínimos cuadrados, como se muestra a continuación:

$$L(t) = m \times t + b$$

En donde: $L(t)$ = Longitud de la larva (mm) al tiempo t

m = pendiente, es decir, la tasa de crecimiento integrada (mm día^{-1})

t = número de microincrementos (edad)

b = intercepto, longitud larval (mm) al momento de eclosión

Debido a que la relación entre longitud larval y tamaño del otolito puede ser muy variable, también se utilizó como medida de tamaño larval, el producto entre la longitud larval (LL) y la altura del cuerpo al cuadrado (AC^2). Luego se aplicaron ajustes lineales por mínimos cuadrados para la relación entre $LL \times AC^2$ y el número de microincrementos del otolito (Hovenkamp & Witte 1991).

Para establecer si es que existen diferencias significativas en las tasas de crecimiento entre los tres muestreos, se ejecutó una prueba de comparación de pendientes múltiples, o análisis de covarianza (ANCOVA); con lo cual se probará si es que las tasas de crecimiento recién calculadas son iguales o diferentes entre ellas (Zar 1999). En el caso de que el análisis de covarianzas concluya que las pendientes no son iguales, se utilizó un procedimiento de comparación múltiple, para determinar qué pendientes son diferentes de las otras, mediante el test de Tukey. De caso contrario, se realizó una comparación de las elevaciones de los ajustes lineales, de acuerdo a lo establecido por Zar (1999), para establecer si es que los interceptos son significativamente diferentes o no.

Una vez calculadas las tasas de crecimiento, se realizó una clave longitud-edad, a partir de la cual se estimó la edad de cada uno de los individuos muestreados de acuerdo a su tamaño.

4.4.3.2 Modelo de Laird-Gompertz

Se aplicó el modelo no lineal de Laird-Gompertz, a través del software PAST 2.12, a los datos de edad y longitud larval, y se graficó la curva sigmoide resultante. A partir del modelo, se estimó la tasa de crecimiento, como se muestra a continuación:

$$LL = LL_{\infty} e^{-K * e^{-g * t}}$$

En donde: LL = longitud larval a cualquier tiempo t

$$LL_{\infty} = \text{longitud asintótica} = LL_0 e^k$$

$$g = \text{tasa instantánea de crecimiento cuando } t = t_0$$

$$K = \text{parámetro adimensional}$$

$$LL_0 = \text{Longitud cuando } t = 0$$

t_0 = tiempo en el cual la tasa de crecimiento absoluto comienza a disminuir, o punto de inflexión de la curva

Tomando como referencia el modelo propuesto, se estimó además la tasa de crecimiento instantánea, como se muestra:

$$Ti_n = \frac{LL_n - LL_{n-1}}{Edad_n - Edad_{n-1}}$$

En donde: Ti_n = Tasa instantánea de crecimiento

LL_n = Longitud larval para la edad n

LL_{n-1} = Longitud larval para la edad anterior

$Edad_n$ = Edad estimada por el modelo

$Edad_{n-1}$ = Edad anterior, estimada por el modelo

Y finalmente se graficó la tasa instantánea de crecimiento en función de la edad estimada por el modelo.

4.4.4. Análisis de crecimiento reciente

Por otro lado, ya que es imposible comparar los anchos de los microincrementos directamente, debido a que son parcialmente dependientes del tamaño del otolito, se midió entonces el crecimiento reciente (ROGI) a partir del ancho de los 5 microincrementos marginales (Hovenkamp & Witte 1991), excluyendo del análisis al último microincremento el cual se considera parcialmente incompleto o en formación (Aguilera *et al.* 2009). El método para el cálculo del ROGI se basó en el análisis de los residuos de la relación entre el ancho de los 5 microincrementos marginales y el radio del otolito (estas variables serán transformadas previamente en logaritmo para disminuir la varianza). Debido a que es una medida de alejamiento de un individuo con respecto a la población, puede ser visto como un indicador de condición, por lo tanto si el ancho del incremento es mayor que el promedio de la población, entonces los residuos de la regresión son positivos y el crecimiento de los otolitos es superior a la media; y viceversa (Hovenkamp and Witte 1991, Aguilera *et al.* 2009).

A continuación se realizó un test ANOVA (o Kruskal Wallis en el caso de que los datos no sean normales) para establecer si es que existen diferencias significativas entre la condición de los 3 muestreos, mediante el software STATISTICA 7. En el caso de que sí las existan, entonces se realizó un test Tukey (o tipo Tukey no paramétrico) para determinar en qué fecha de muestreo se obtuvieron larvas en mejor condición.

4.4.5. Retrocálculos de fechas de eclosión

Una vez que se obtuvo la edad de todos los individuos de acuerdo al modelo lineal, se retrocalculó su fecha de eclosión, de acuerdo a la fecha en que fue muestreado el individuo. Después se graficaron las abundancias de eclosión en función de los días en que eclosionaron los huevos, considerando una escala lineal de 365 días, que corresponde a un año.

Luego se calculó la frecuencia de eclosión en función de la fecha de eclosión, considerando un ciclo lunar, es decir, un ciclo de 29 días. Para esto, se estableció arbitrariamente el día 1 como el siguiente día de una luna nueva (Robertson *et al.* 1990).

Para establecer si los datos tienen una periodicidad lunar, se utilizó estadística circular para el análisis de los datos (Russel & Levitin 1995), mediante el software PAST 2.12. En este análisis de regresión periódica, la variable independiente es una representación angular del tiempo (deBruyn & Meeuwig 2001). Se calculó el promedio angular de las fechas de eclosión, que corresponde al porcentaje promedio de actividad de eclosión en cada día lunar, y el intervalo de 95% de confianza (Robertson *et al.* 1990). Además se realizó el test de Rayleigh (Zar 1999) para determinar si es que las distribuciones de eclosión tuvieron un patrón uniforme dentro del ciclo lunar (Sponaugle & Cowen 1994), y el test de espaciación de Rao, que es más sensible a distribuciones bimodales y multimodales que otras pruebas, para probar la uniformidad en la distribución de los datos (Russell & Levitin 1995).

No fue necesario realizar una corrección por agrupamiento para los datos en estos análisis, dado que éste se vuelve insignificante para intervalos menores a 30° (Zar 1999).

Finalmente, para determinar si la eclosión durante diferentes fases del ciclo lunar tiene un efecto significativo en las tasas de crecimiento individual de las larvas (grosor de los microincrementos como proxy), se compararon los valores absolutos (grosor) y las tasas de incremento (grosor día⁻¹) de individuos eclosionados durante las cuatro fases de la luna (llena, nueva, cuarto creciente, menguante) a través de pruebas no paramétricas (prueba de Kruskal-Wallis) y de pendiente múltiple, respectivamente.

5. RESULTADOS

5.1. Abundancia larval de *Helcogrammoides chilensis* en El Quisco en 2010

La abundancia de larvas de *Helcogrammoides chilensis* en la bahía el Quisco varió entre 3,55 a 2344,44 individuos 1000 m^{-3} durante fines de invierno y comienzos de la primavera austral del 2010 (promedio $\pm$ desviación estándar: $202,78 \pm 440,38$ individuos 1000 m^{-3} , mediana: 81,01 individuos 1000 m^{-3}) (Tabla 1). Se encontraron diferencias significativas en las abundancias larvales entre los tres cruceros (test Karikal-Wallis, $H = 15,11$, $P < 0,001$), presentando las mayores abundancias en el segundo crucero (mediana = 231,37 individuos 1000 m^{-3}).

Tabla 1. Abundancias totales de larvas obtenidas en cada muestreo

Crucero	Fecha	Abundancia larvas de peces (ind*1000m ⁻³)	Abundancia <i>H. chilensis</i> (ind*1000m ⁻³)
Lacost 1	02-09-2010	11575,96	502,30
Lacost 2	09-09-2010	45625,79	5288,95
Lacost 3	04-10-2010	20252,24	1168,53
Total		77454,00	6959,78

5.2. Estructura de tamaños

Se analizaron 847 larvas de *Helcogrammoides chilensis* del total de larvas muestreadas, las cuales presentaron un rango de tamaño de 2,88 a 25,67 mm (promedio $\pm$ desviación estándar: $6,45 \pm 2,45$ mm) y un rango de volumen larval de 0,23 a 1710,25 mm³ (promedio $\pm$ desviación estándar: $10,25 \pm 60,04$ mm³) (Tabla 2).

Las distribuciones de tamaños (Figura 4) fueron comparadas con estadística no paramétrica, ya que los datos de longitud no presentaron distribución normal (test Shapiro-Wilks, $W=0,87$; $P<0,01$), ni tampoco los de volumen (test Shapiro-Wilks, $W=0,67$; $P<0,01$). Como se observa en la figura 4, los valores de longitud larval (LL), presentaron diferencias significativas entre los tres muestreos (test Kruskal-Wallis, $H = 291,84$; $P<0,01$), y cabe destacar que todos los muestreos fueron diferentes entre sí (test Tukey, $P<0,01$). Situación similar ocurrió en el caso del volumen larval, que también presentó diferencias significativas en sus distribuciones por muestreo (test Kruskal-Wallis; $H = 293$; $P<0,01$), y coincidentemente, los tres muestreos fueron diferentes entre sí (test Tukey, $P<0,01$).

Tabla 2. Estadística descriptiva del tamaño y volumen larval de *H. chilensis*

Crucero	<i>n</i>	Rango tamaño (mm)	Longitud promedio (mm)	Desviación Estándar	Rango volumen (mm ³)	Volumen promedio (mm ³)	Desviación Estándar
Lacost 1	88	3,04 - 25,67	7,25	3,56	0,23 - 51,82	9,91	9,68
Lacost 2	518	2,88 - 19,86	5,41	1,65	0,55 - 163,48	4,55	9,37
Lacost 3	241	3,11 - 16,68	8,39	2,09	0,54 - 1710,25	15,09	11,60
Total	847	2,88 - 25,67	6,45	2,45	0,23 - 1710.25	8,06	11,11

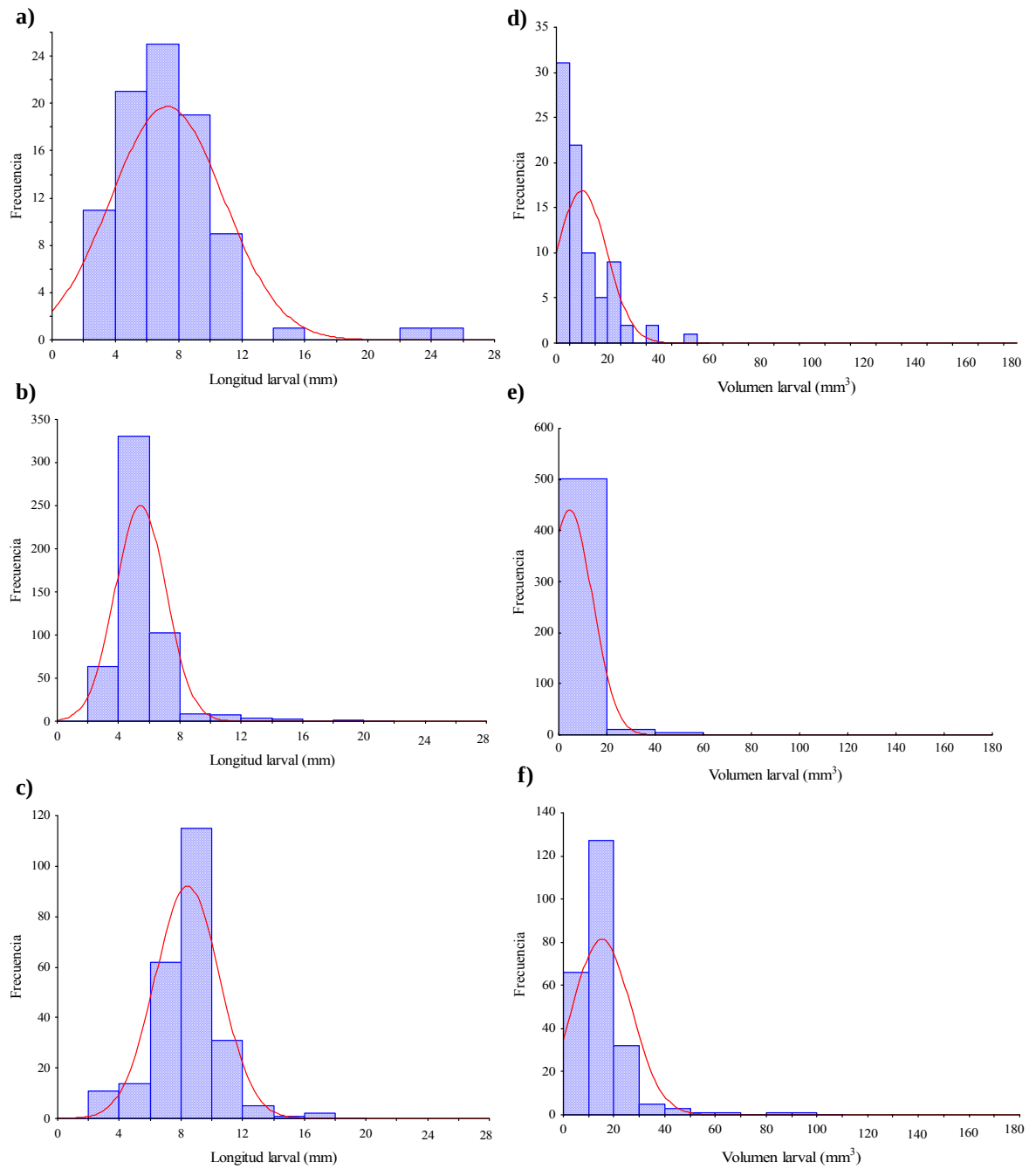


Fig 4. Histogramas de frecuencia de distribución de tamaños para el Lacost 1, 2 y 3 (**a, b y c**, respectivamente) y de distribución de volumen para los 3 muestreos (**d, e y f**).

5.3. Morfología de otolitos

Los otolitos de *H. chilensis*, tanto de sagitta como de lapillus, observados para larvas recientemente eclosionadas, eran completamente redondeados, por el contrario los otolitos de larvas de mayor longitud, presentaron una forma alargada en uno de sus extremos (Figura 5).

En cuanto a sus tamaños, el área de los sagitta varió entre $524,2 \mu\text{m}^2$ y $25440,2 \mu\text{m}^2$ (promedio $\pm$ desviación estándar: $5447,18 \pm 5207,82 \mu\text{m}^2$), el perímetro entre $82,4 \mu\text{m}$ y $570,1 \mu\text{m}$ (promedio $\pm$ desviación estándar: $240,56 \pm 107,69 \mu\text{m}$) y el radio entre $14,76 \mu\text{m}$ y $100,9 \mu\text{m}$ (promedio $\pm$ desviación estándar: $43,98 \pm 19,6 \mu\text{m}$). En el caso de los lapilli, el área varió entre $337,6 \mu\text{m}^2$ y $7642,8 \mu\text{m}^2$ (promedio $\pm$ desviación estándar: $2088,06 \pm 1589,48 \mu\text{m}^2$), el perímetro entre $12,4 \mu\text{m}$ y $311,9 \mu\text{m}$ (promedio $\pm$ desviación estándar: $154,28 \pm 56,02 \mu\text{m}$) y el radio entre $10,47 \mu\text{m}$ y $74,63 \mu\text{m}$ (promedio $\pm$ desviación estándar: $32,47 \pm 14,29 \mu\text{m}$). El radio promedio entre el núcleo y la marca de eclosión varió desde $10,1 \mu\text{m}$ a $16,9 \mu\text{m}$ (promedio $\pm$ desviación estándar: $13,94 \pm 1,31 \mu\text{m}$).

En la Tabla 3 se observan los modelos propuestos para el tamaño de los otolitos y la longitud larval (Figura 6), y dado que todos ellos presentan un alto nivel de significancia, se demuestra que existe una correspondencia entre el crecimiento de la larva y el crecimiento de los otolitos, es decir, el crecimiento somático de la larva se ve reflejado en el crecimiento de los otolitos. No se observaron diferencias significativas entre los modelos ajustados para los otolitos sagitta derecho e izquierdo, en cuanto a radio (test de pendientes

múltiples, $t=0,12$, $P<0,05$) y perímetro (test de pendientes múltiples, $t=0,17$, $P<0,05$). La misma situación ocurrió con los otolitos lapillus, en que no se observaron diferencias significativas entre los modelos para los derechos e izquierdos en radio (test de pendientes múltiples, $t=0,18$, $P<0,05$) y perímetro (test de pendientes múltiples, $t=0,19$, $P<0,05$).

Las lecturas de los microincrementos para los sagitta derecho e izquierdo, no presentaron diferencias significativas (test de Wilcoxon, $P = 0,71$). Cabe mencionar que los lapilli fueron excluidos del análisis de crecimiento debido a que su pequeño tamaño dificulta la lectura.

A pesar de que el grosor de los microincrementos presentó una alta variabilidad, se pudo observar que éstos aumentaban su ancho a medida que se alejaban de la marca de eclosión, y llegaban a su máximo en el sector más exterior del otolito. Todos los otolitos analizados, presentaron un patrón similar de formación de microincrementos. Los grosores de los microincrementos de los otolitos, variaron entre 0,6 y 2,0 μm (promedio $\pm$ desviación estándar: $1,28 \pm 0,24 \mu\text{m}$) y estos valores se ajustaron a un modelo lineal, dado por una pendiente de $0,007 \mu\text{m día}^{-1}$ y un intercepto de $1,14 \mu\text{m}$ ($R^2 = 0,845$) (Figura 7), por lo que se puede concluir que los anchos de microincrementos aumentan a medida que aumenta la edad de la especie.

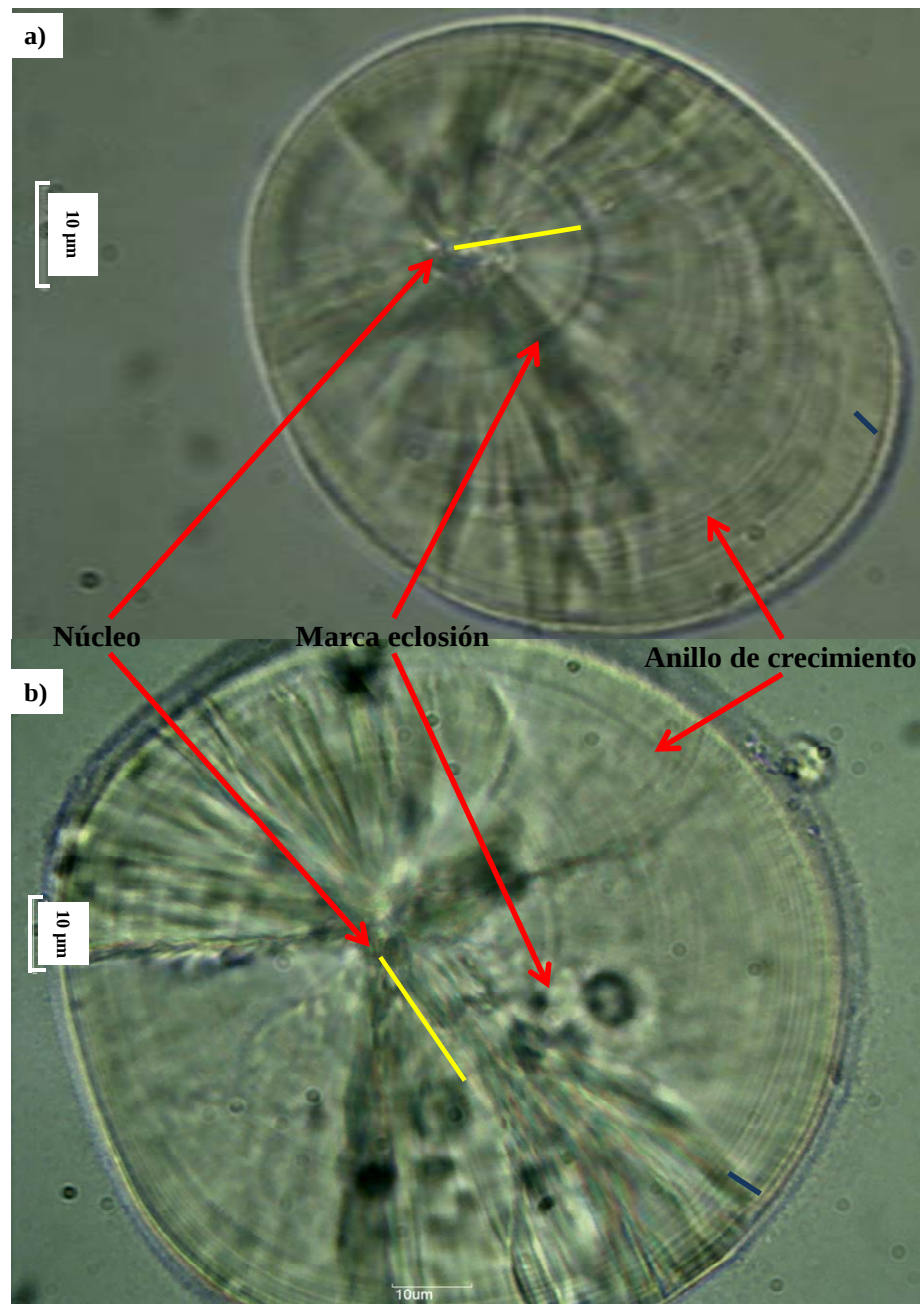


Fig 5. Otolito de *H. chilensis*: **(a)** Lapillus (Larva 10,864 mm LL) y **(b)** Sagitta (Larva 9,984 mm LL). Se muestran el núcleo, la marca de eclosión y los anillos de crecimiento en rojo, la línea amarilla corresponde a la medida entre el núcleo y la marca de eclosión y en azul la medición de los últimos 5 microincrementos.

Tabla 3. Análisis de regresión lineal del tamaño de los otolitos (radio, perímetro y área) en función de la longitud larval (LL) de *Helcogrammoides chilensis*. Se muestra el intercepto, pendiente, error estándar (EE) correspondiente, y los valores de F y P. SI, SD, LI y LD corresponden a sagitta izquierdo, sagitta derecho, lapillus izquierdo y lapillus derecho, respectivamente

	Intercepto	EE	Pendiente	EE	F	P
Radio SI vs LL	-20,89	2,10	7,97	0,25	1013,09	<0,01
Radio SD vs LL	-22,36	2,34	8,13	0,28	870,24	<0,01
Radio LI vs LL	-13,97	2,56	5,24	0,28	357,93	<0,01
Radio LD vs LL	-14,66	2,52	5,30	0,28	368,59	<0,01
Perímetro SI vs LL	-116,57	11,56	43,80	1,37	1017,20	<0,01
Perímetro SD vs LL	-124,69	12,76	44,72	1,50	887,28	<0,01
Perímetro LI vs LL	-25,87	12,66	20,39	1,37	222,46	<0,01
Perímetro LD vs LL	-19,55	10,34	19,33	1,13	295,21	<0,01
Área SI vs LL	-10430,07	732,55	1945,68	87,05	499,59	<0,01
Área SD vs LL	-11299,40	806,89	2048,77	94,90	466,04	<0,01
Área LI vs LL	-2789,09	390,78	553,67	42,19	172,21	<0,01
Área LD vs LL	-2626,07	331,94	522,84	36,13	209,38	<0,01

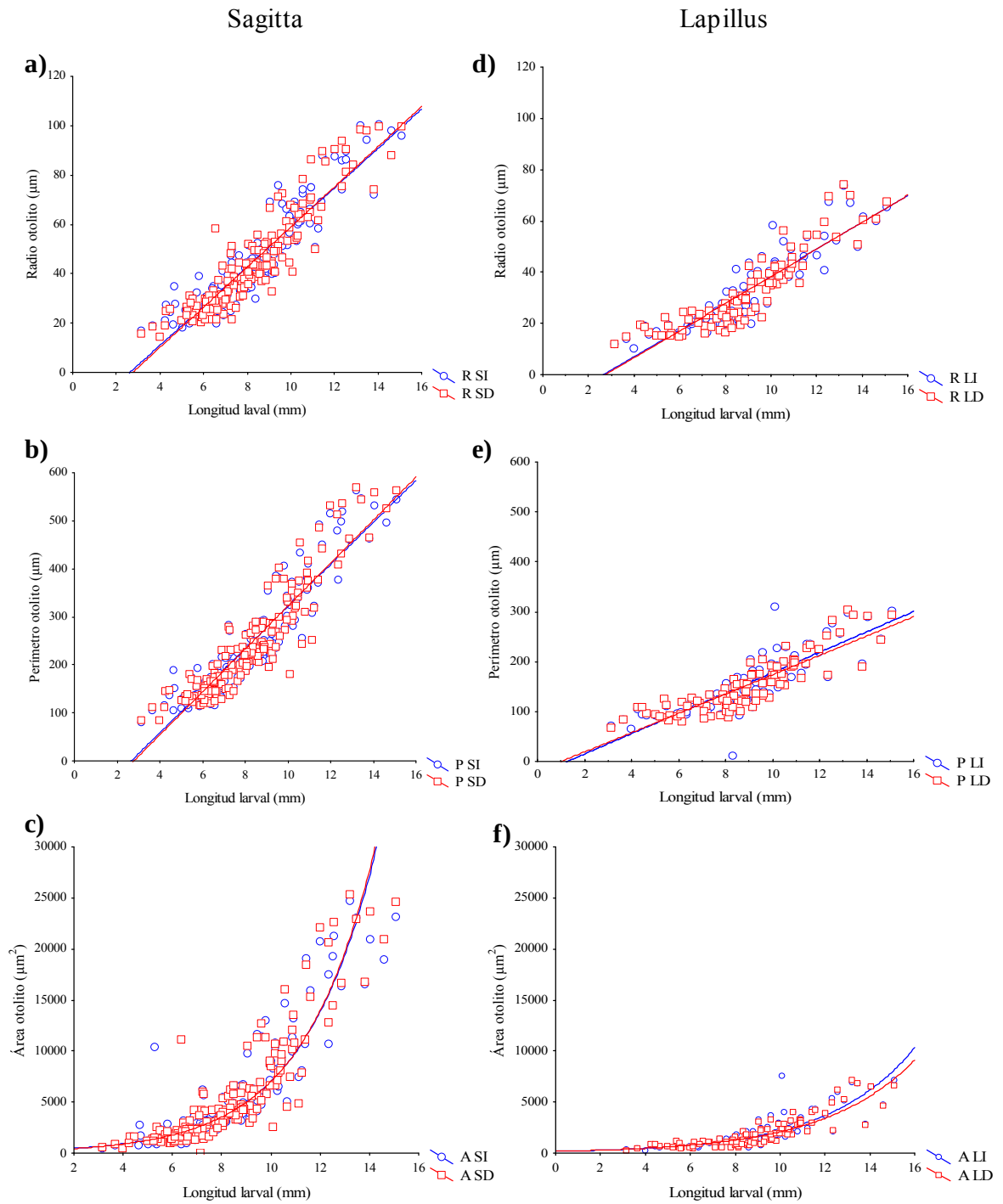


Fig 6. Relaciones morfométricas entre las medidas de los otolitos y la longitud larval (LL).

En rojo se observa el otolito derecho y en azul el otolito izquierdo.

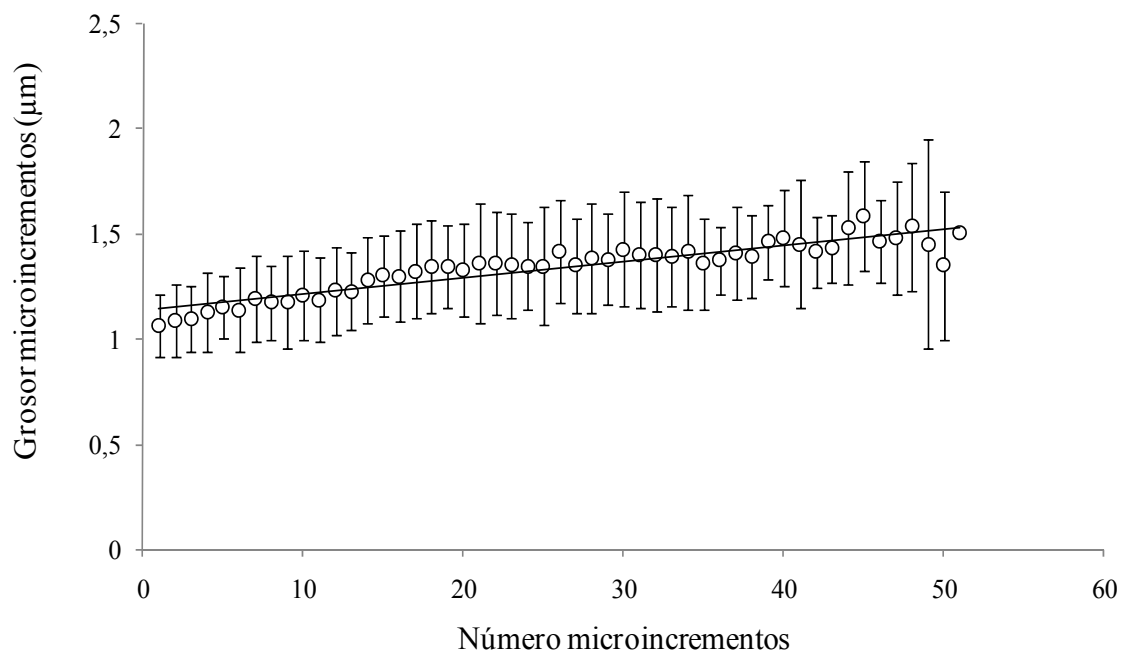


Fig 7. Valores promedio del grosor de cada microincremento de los sagitta. Las barras verticales, indican una desviación estándar.

5.4. Tasas de crecimiento

A partir de las lecturas de los microincrementos de los otolitos, se determinó que las edades estimadas corresponden entre 1 y 57 días, para un rango de longitud larval que varió entre 3,11 hasta 16,57 mm, respectivamente (n=189). La longitud promedio para aquellas larvas que presentaron un día de vida fue $3,556 \text{ mm} \pm 0,424 \text{ mm}$

El modelo de crecimiento total (Figura 8a), presentó un intercepto de 5,68 mm y una pendiente de $0,15 \text{ mm día}^{-1}$. Para el volumen larval en función de la edad (Figura 8b), este modelo exponencial presentó un intercepto de $4,45 \text{ mm}^3$ y una tasa de crecimiento de $0,05 \text{ mm}^3 \text{ día}^{-1}$.

Los parámetros de los modelos lineales ajustados para el crecimiento para *H. chilensis* por muestreo (Figura 9), se presentan en la Tabla 4. Los valores de las pendientes (i.e., tasa de crecimiento) para los tres modelos variaron entre 0,145 y $0,156 \text{ mm día}^{-1}$, para el caso de los interceptos (i.e., tamaño de eclosión), estos variaron entre 5,39 y 6,23 mm (Tabla 4).

Las tres pendientes que fueron calculadas a partir de su respectivo modelo lineal de crecimiento (por muestreo), no mostraron diferencias significativas (Análisis de Pendientes Múltiples $F=0,8406$; $P<0,05$).

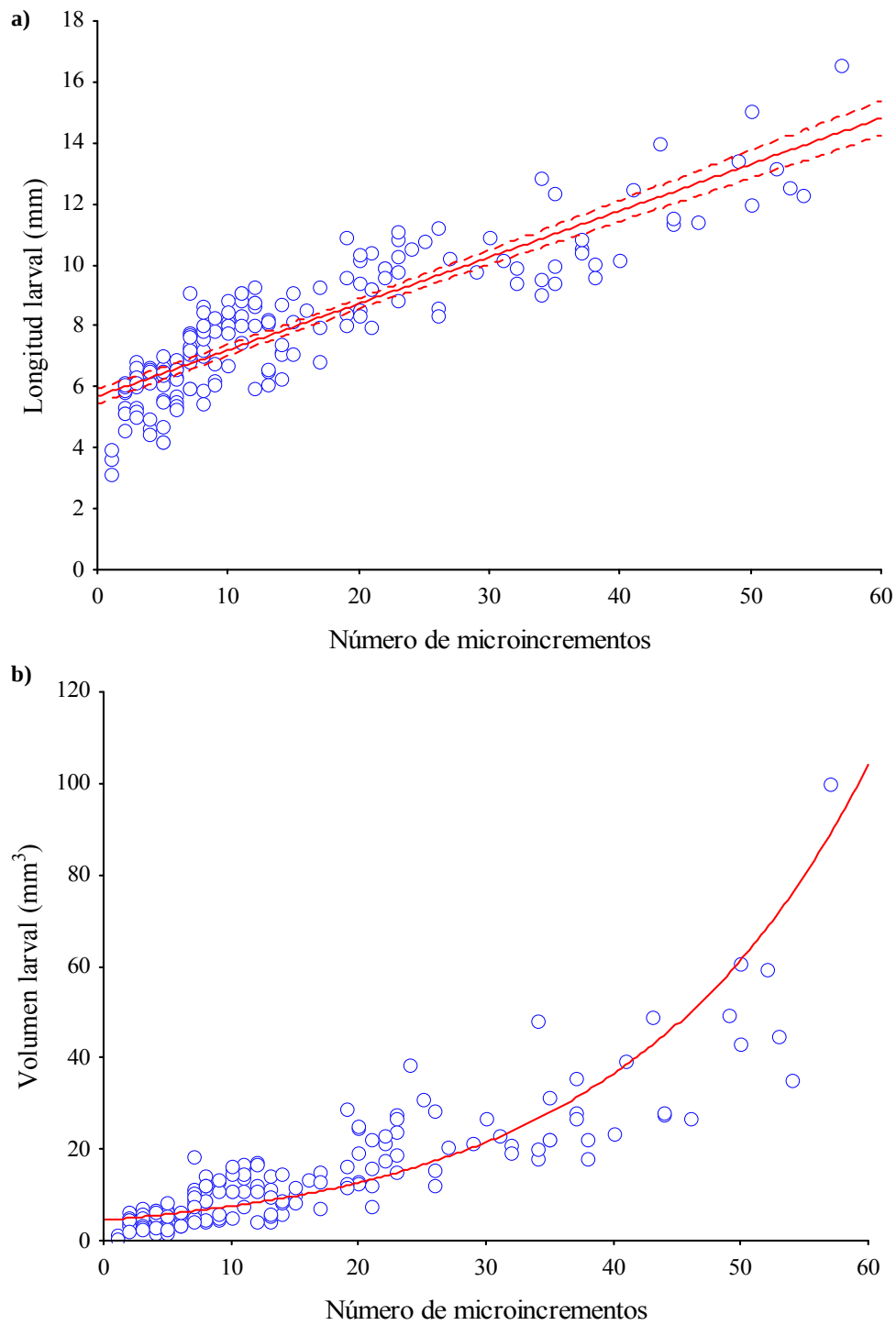


Fig 8. Modelo de crecimiento **(a)** lineal para la longitud y **(b)** exponencial para el volumen de *H. chilensis*, para el período de muestreo

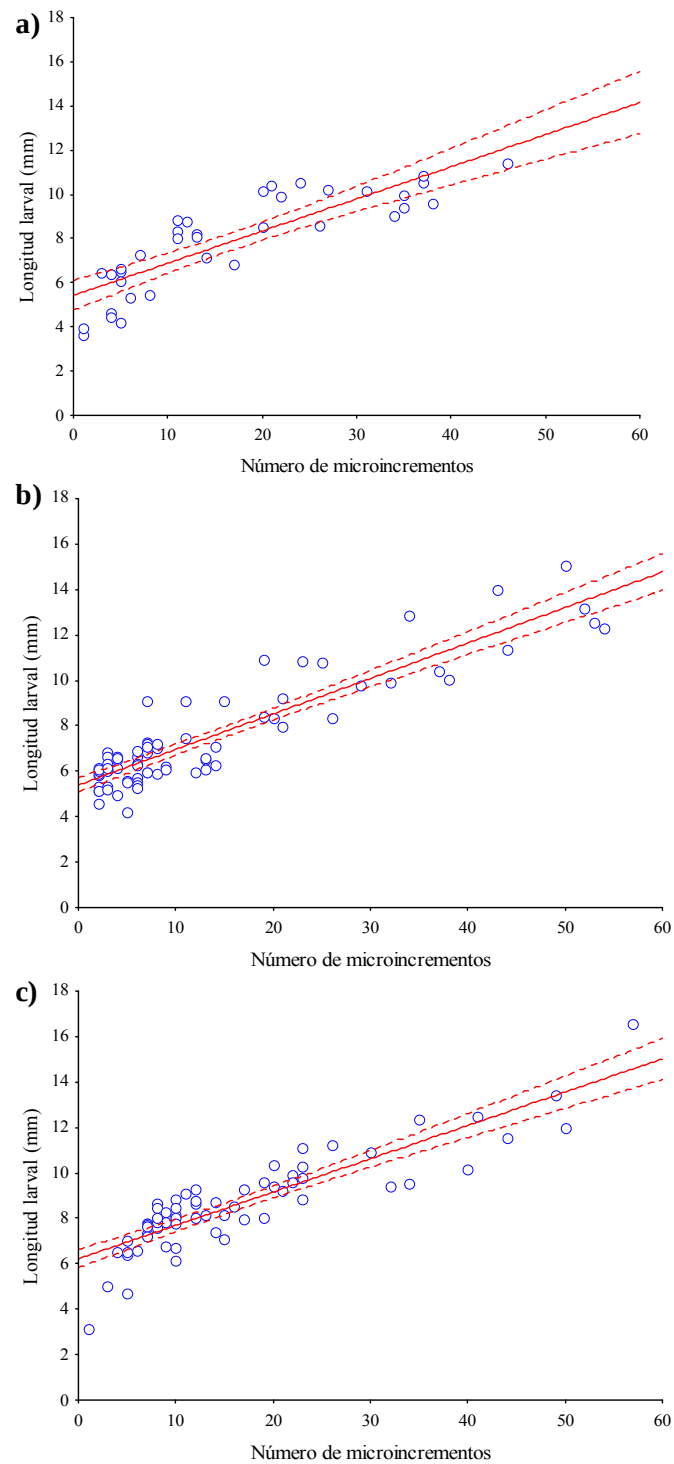


Fig 9. Modelo lineal de crecimiento para los Lacost 1, 2 y 3 (**a**, **b** y **c**, respectivamente).

De acuerdo al modelo de crecimiento Laird-Gompertz, se estimaron los parámetros de crecimiento, en el que la longitud asintótica (LL_{∞}) correspondió a 16,591 mm, el valor de $k = 1,19$, $g = 0,036 \text{ mm día}^{-1}$ y la tasa instantánea de crecimiento promedio resultó ser de $0,16 \text{ mm día}^{-1}$, con un intercepto de 5,04 mm (Figura 10).

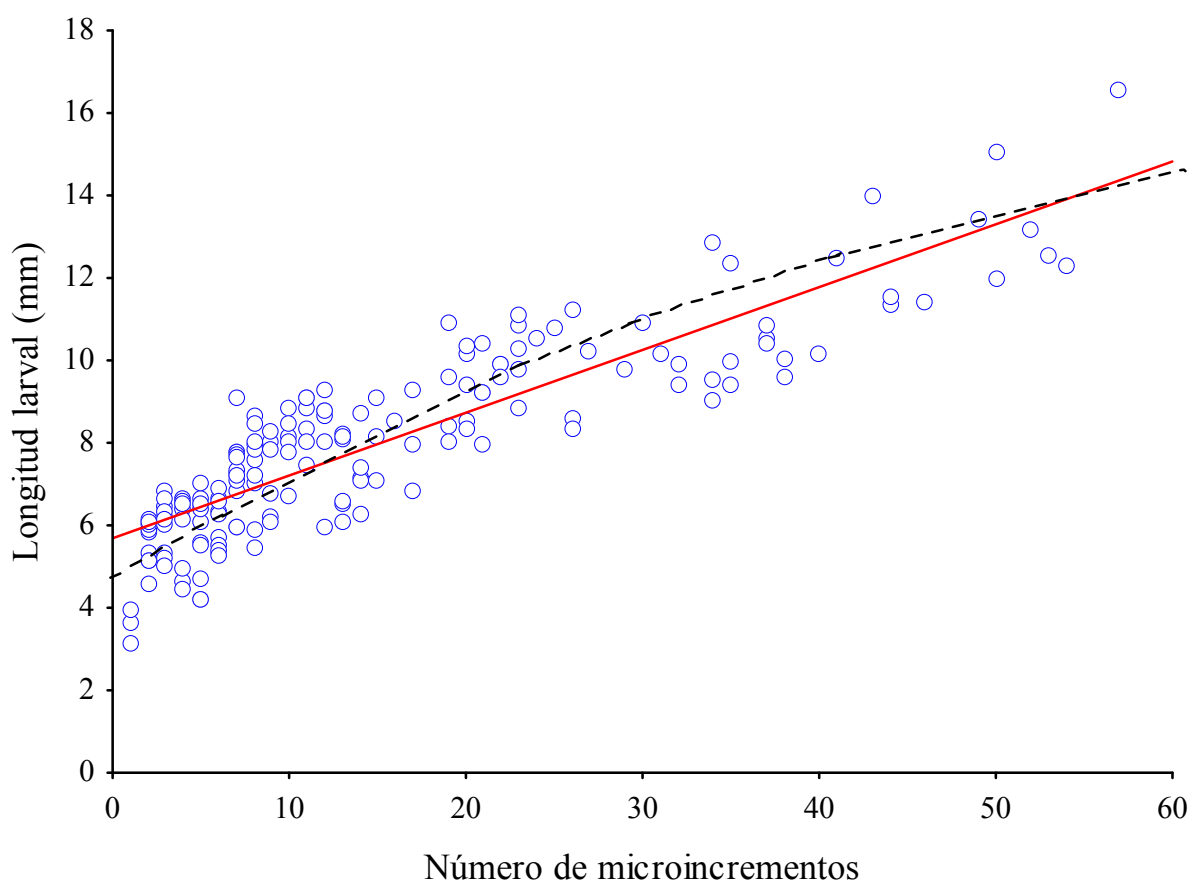


Fig 10. Curvas de crecimiento según el modelo lineal (rojo) y modelo Gompertz (negro)

Por otro lado, la tasa instantánea de crecimiento (Figura 11) varió entre 0,08 y 0,22 mm día⁻¹ (promedio $\pm$ desviación estándar: $0,16 \pm 0,05$ mm día⁻¹). Se observa que desde el momento de la eclosión, ocurrió un aumento en la tasa instantánea de crecimiento hasta llegar al máximo de 0,22 mm día⁻¹ entre los 5,5 y los 6,6 días, pero a partir de este máximo, la tasa instantánea de crecimiento comienza a disminuir a medida que transcurre el desarrollo larval (Figura 11).

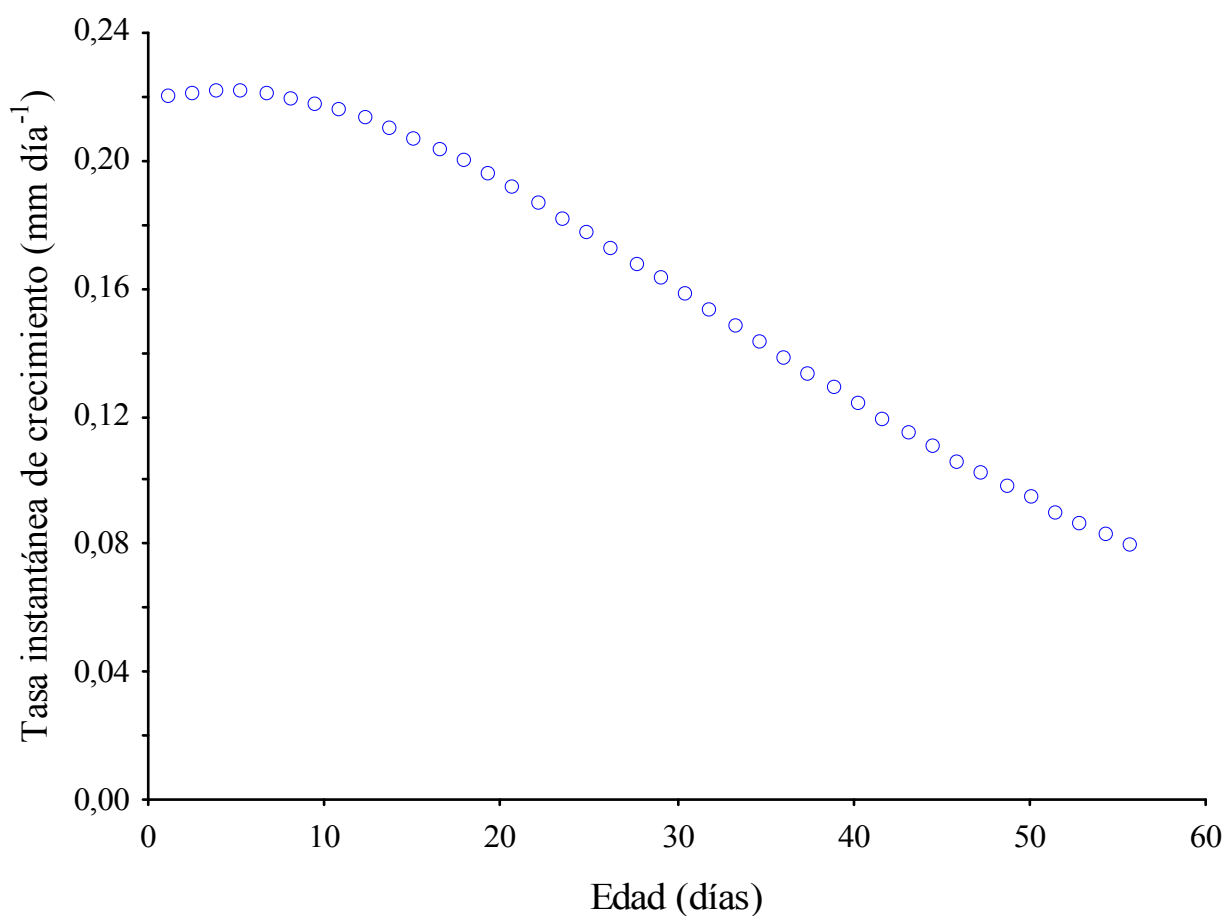


Fig 11. Tasa de crecimiento instantánea en función de la edad

Tabla 4. Análisis de las regresiones lineales de la longitud larval (LL) versus el número de microincrementos para cada muestreo (L1, L2 y L3) y para la población total. Se muestra el intercepto, pendiente, error estándar (EE) correspondiente, y los valores de F y P.

	Intercepto (mm)	EE	Pendiente (mm día ⁻¹)	EE	F	<i>P</i>
L1 - LL vs microincrementos	5,435	0,332	0,145	0,016	86,480	<0,01
L2 - LL vs microincrementos	5,396	0,160	0,156	0,008	347,84	<0,01
L3 - LL vs microincrementos	6,230	0,206	0,147	0,010	213,79	<0,01
Total - LL vs microincrementos	5,684	0,126	0,152	0,006	594,09	<0,01

5.5. Estado de condición

Los valores del índice de condición (ROGI) variaron entre -0,178 y 0,103, con un promedio de 0,000 y una mediana de 0,004. Estos valores no se ajustaron a una distribución normal ($W=0,96$; $P<0,01$).

En una mirada global (Figura 2) los valores de ROGI del Lacost 2 presentaron una mayor variabilidad y valores más extremos, pero en los tres muestreos se observa que la mediana de los individuos estuvo cercana del estimado poblacional, razón por la cual no se observaron diferencias significativas en los estados de condición de los 3 muestreos (Kruskal-Wallis $H = 2,28$, $P = 0,32$).

Para las larvas en pre-flexión (Figura 13a), se observó que aquellas pertenecientes al Lacost 2 poseen una menor condición que las larvas de los Lacost 1 y 3, a pesar de mostrar un mayor rango de datos. Esto no fue suficiente para generar diferencias significativas entre los tres muestreos (Kruskal-Wallis $H = 6,22$, $P = 0,45$).

En el caso de las larvas en post-flexión (Figura 13b) sucedió una situación diferente, ya que los tres muestreos presentaron una variabilidad de residuos (ROGI) similar, aunque la mediana de los residuos del Lacost 2 fue levemente mayor que las de los Lacost 1 y 3. Aunque de manera similar, los valores no presentaron diferencias significativas en los tres muestreos (Kruskal-Wallis $H = 5,01$, $P = 0,82$).

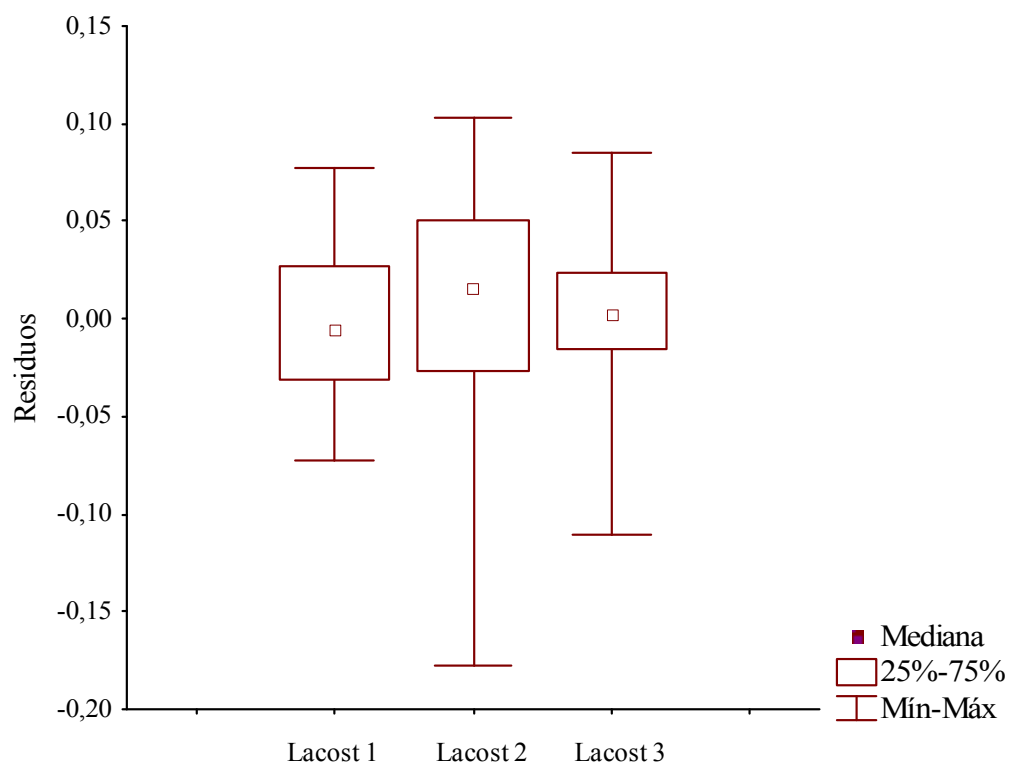


Fig 12. Valores de ROGI para el total de los individuos por cada muestreo

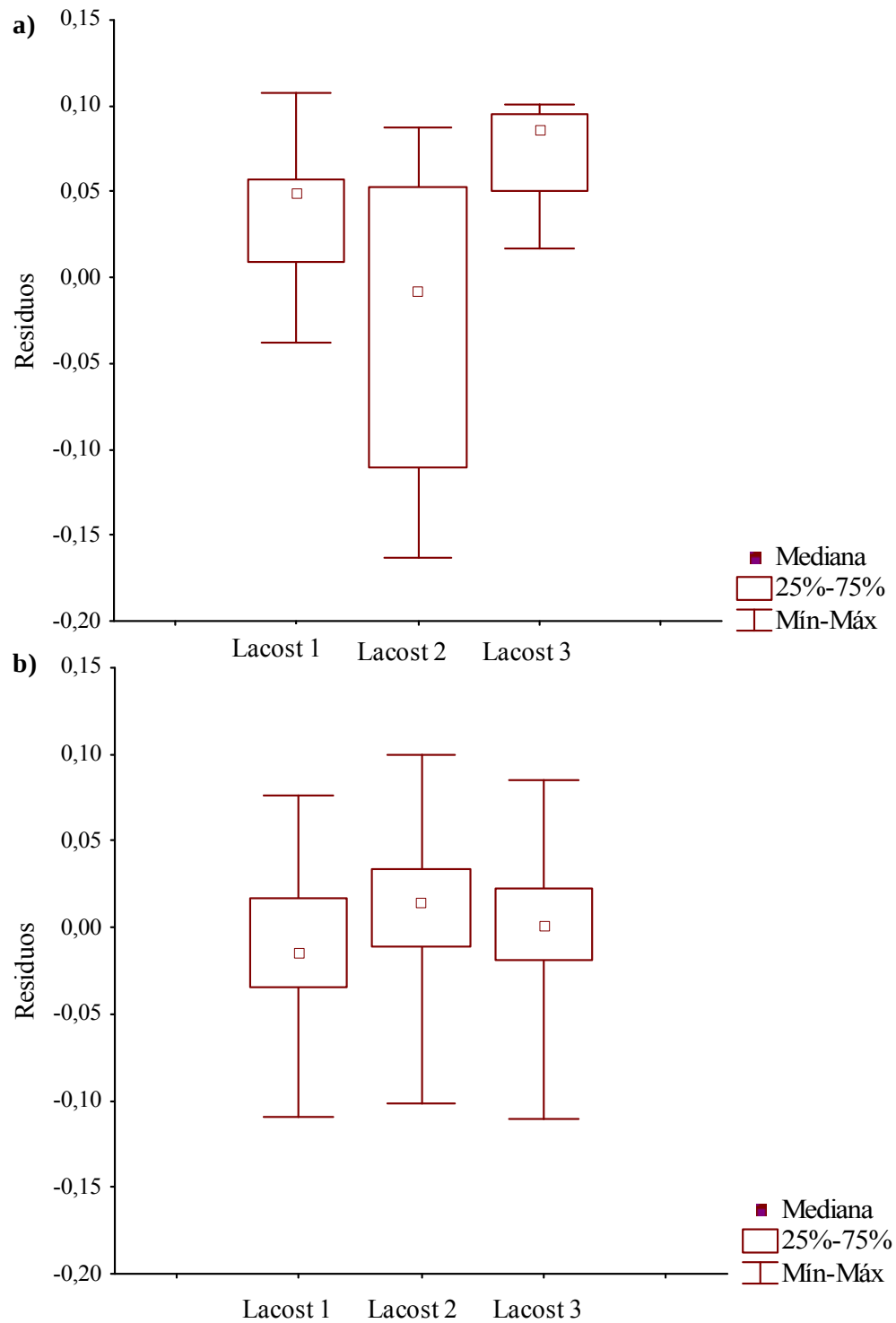


Fig 13. Valores de ROGI para cada muestreo de acuerdo a su estadio de desarrollo: **(a)** Pre-flexión y **(b)** Post-flexión

5.6. Fechas de eclosión y periodicidad lunar

Al realizar la clave longitud-edad, se pudo observar que la moda en las fechas de eclosión resultó en el día 251, es decir, el 8 de Septiembre de 2010 (promedio $\pm$ desviación estándar: $249,21 \pm 13,40$; mediana: 251), con un rango que comienza el día 23 de julio (día 204) y finaliza el 3 de octubre (día 276) (Figura 14).

En cuanto a la distribución de periodos de eclosión, se puede observar gráficamente, un máximo importante cercano al día 29 en el ciclo lunar, el que corresponde a la luna nueva, y dos aumentos importantes en los días 6 y 22, aproximadamente, que corresponden a luna cuarto creciente y cuarto menguante (Figura 15). Por lo tanto, y sumado al análisis de estadística circular (Figura 16a), el patrón de eclosión de *H. chilensis* no se encontró uniformemente distribuido en el ciclo lunar (test de Rayleigh $r = 0,52$; $P < 0,001$; test de Rao = 347,7; $P < 0,01$).

Esto se puede observar más en detalle al separar las distribuciones de fecha de eclosión por muestreo (Figura 16 b-d). Los análisis de estadística circular, indican que cada uno de estos muestreos no se distribuyeron de manera uniforme a lo largo del ciclo lunar. Para el Lacost 1 con un máximo importante cercano a la luna cuarto menguante (Figura 16a), el valor de r de Rayleigh corresponde a 0,40 ($P < 0,001$) y el valor de Rao a 249,5 ($P < 0,01$), en el caso del Lacost 2 con el máximo preponderante cercano a la luna nueva (Figura 16b), $r = 0,85$ ($P < 0,001$) y Rao = 344,1 ($P < 0,01$), y finalmente, para el Lacost 3 en la fase cuarto creciente (Figura 16c), $r = 0,36$ ($P < 0,001$) y Rao = 312,2 ($P < 0,01$).

A partir de los análisis de estadística circular, se calculó el promedio angular para las distribuciones de toda la población y de cada muestreo por separado. Para el total de la población, el día promedio de eclosión corresponde al día 28 del ciclo lunar (promedio angular: día 28 ; 95%: día 27 - día 28) (Figura 17a), para el Lacost 1 el día promedio de eclosión corresponde al día 21 del ciclo lunar (promedio angular: día 21; 95%: día 19 – día 23) (Figura 18b), para el Lacost 2 el día promedio de eclosión corresponde al día 28 del ciclo lunar (promedio angular: día 28; 95%: día 27 – día 28) (Figura 17c) y para el Lacost 3 el día promedio de eclosión corresponde al día 8 del ciclo lunar (promedio angular: día 8; 95%: día 7 – día 10) (Figura 17d).

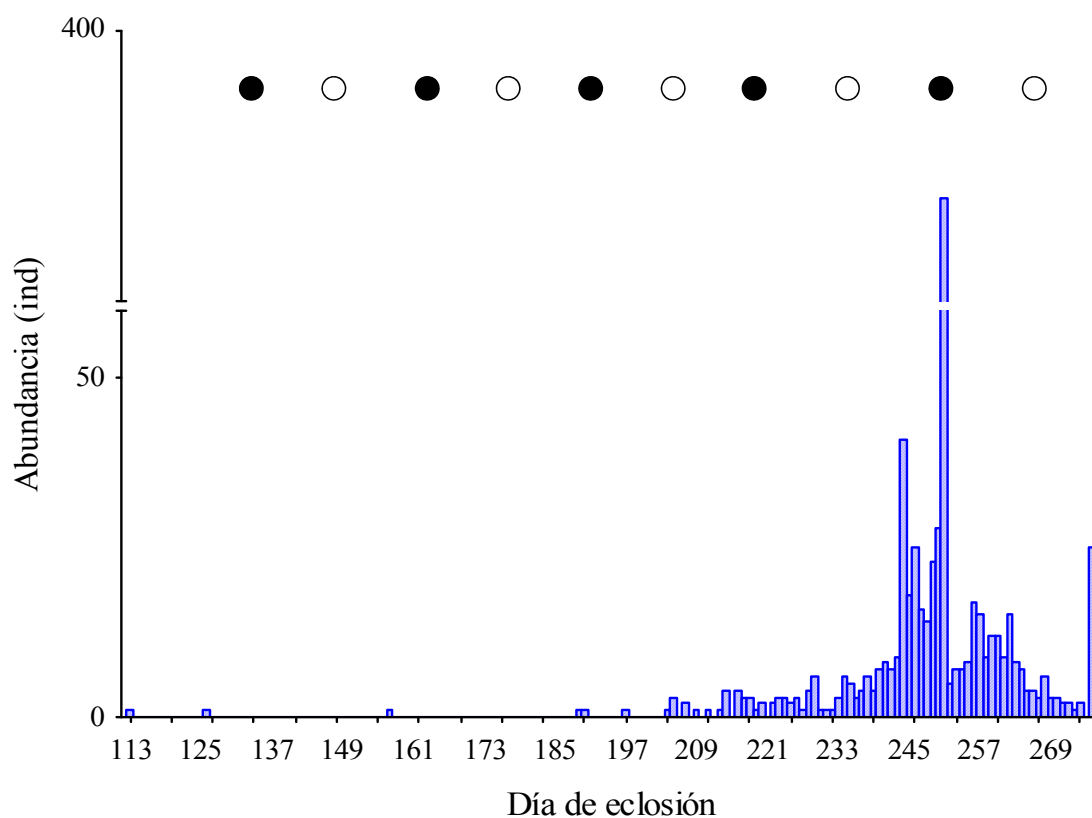


Fig 14. Abundancias de eclosión de *H. chilensis* a lo largo del año.

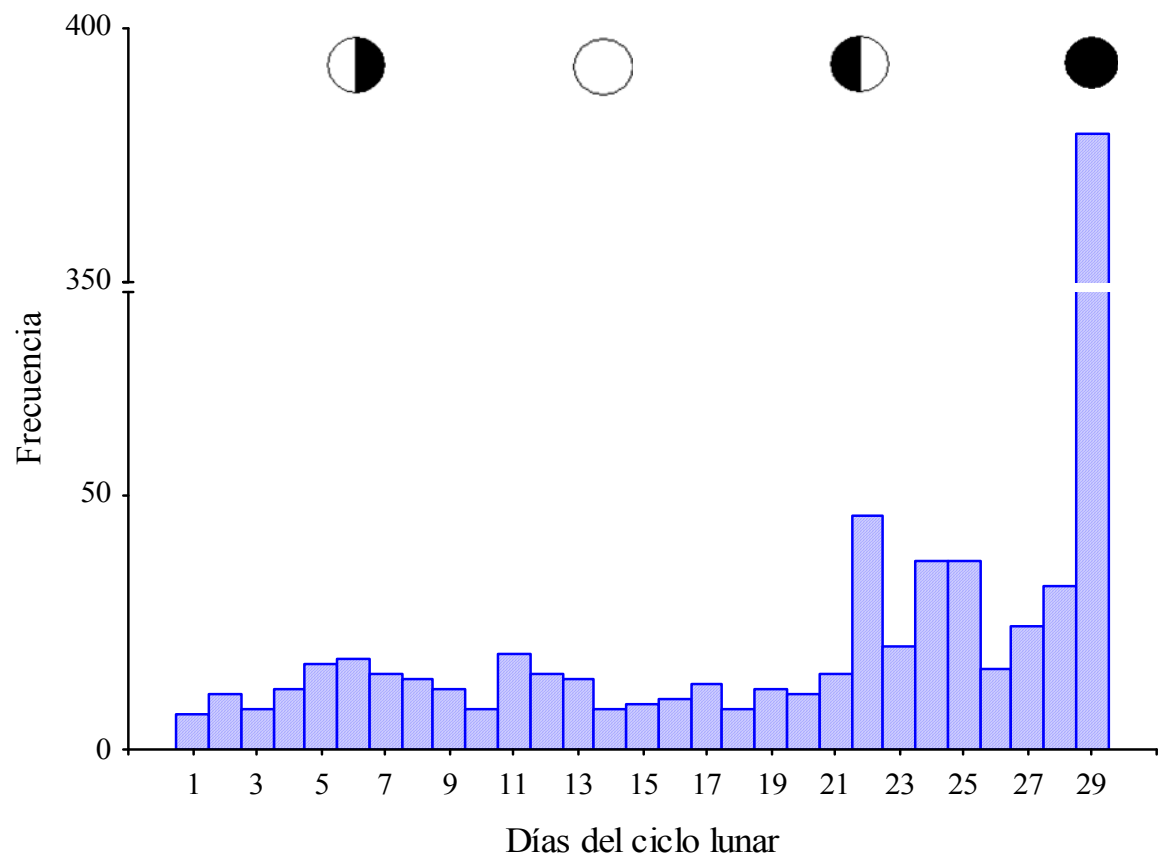


Fig 15. Frecuencias de eclosión de *H. chilensis*, de acuerdo al ciclo lunar. La luna cuarto creciente corresponde al día seis del ciclo lunar, la luna llena corresponde al día 14, la luna cuarto menguante corresponde al día 22 y la luna nueva corresponde al día 29.

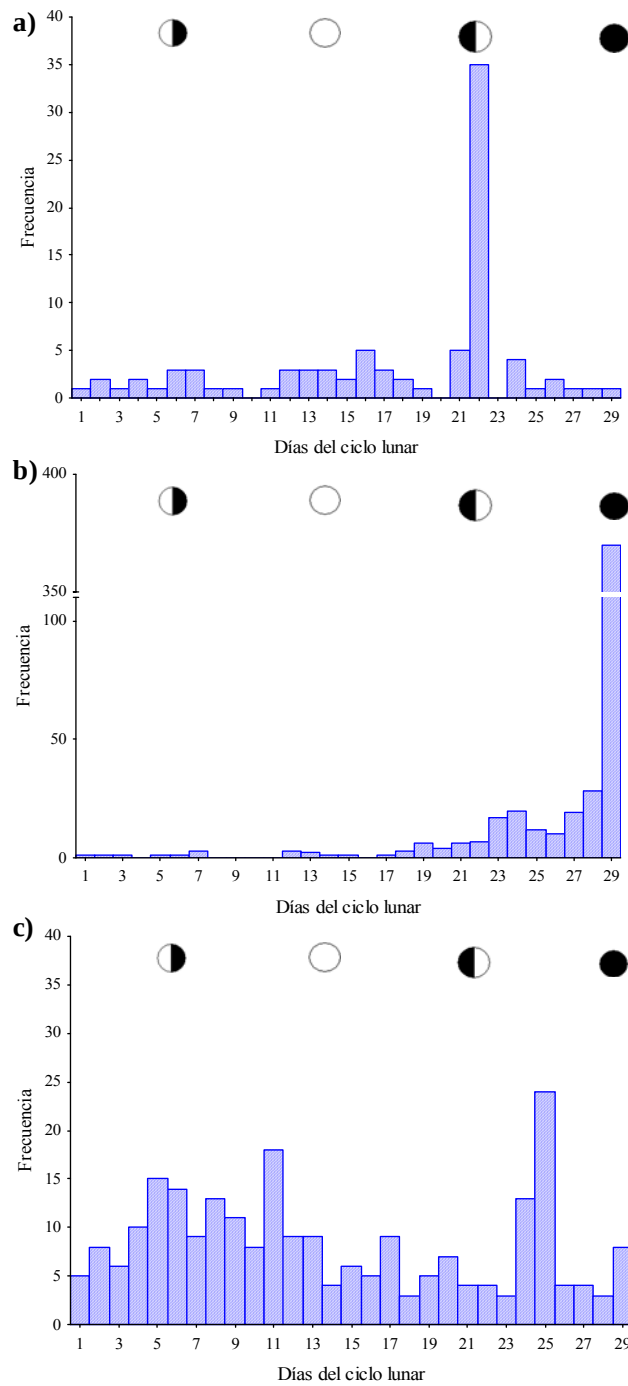


Fig 16. Frecuencias de eclosión de *H. chilensis*, de acuerdo al ciclo lunar para **(a)** Lacost 1, **(b)** Lacost 2 y **(c)** Lacost 3

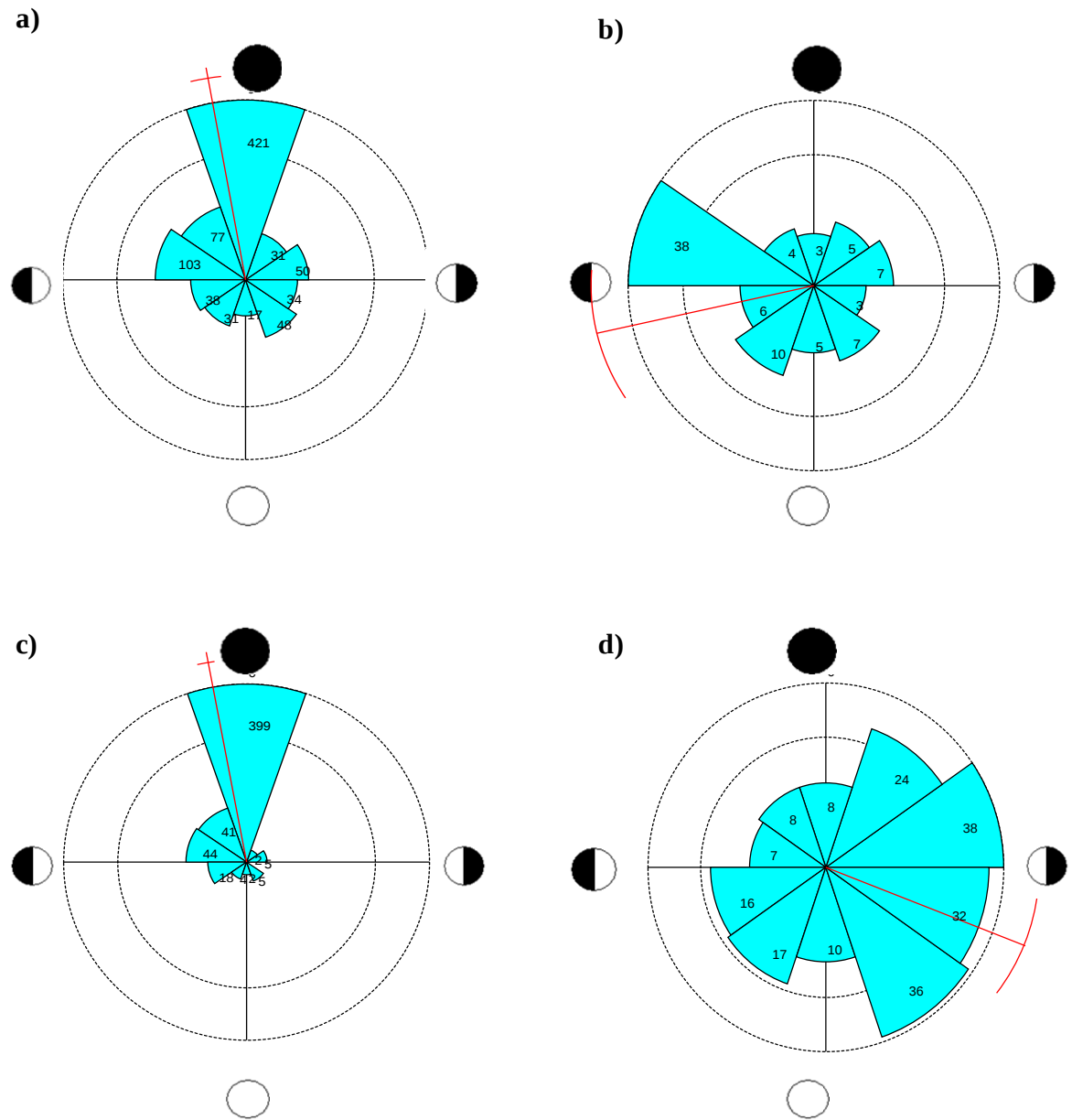


Fig 17. Frecuencia de eclosión en el ciclo lunar. En rojo, se muestra la media angular (línea vertical) y el intervalo de confianza (95%) en horizontal, para **(a)** todos los individuos muestreados, **(b)** Lacost 1, **(c)** Lacost 2 y **(d)** Lacost 3.

Los grosores de los microincrementos analizados en función de la edad larval en días no presentaron diferencias significativas (Tabla 5), para los individuos que eclosionaron en distintas fases lunares (Figura 18). Sin embargo, al realizar trayectorias de crecimiento, es decir, relaciones lineales entre el grosor de los microincrementos y el número de los microincrementos (Tabla 6), sí se observaron diferencias significativas ($F=96,05$, $P<0,001$) para aquellos individuos que eclosionaron en luna nueva, luna llena (Figura 19a), luna cuarto menguante y luna cuarto creciente (Figura 19b). Los individuos que presentaron una mayor pendiente ($0,014 \mu\text{m microincremento}^{-1}$) fueron aquellos que eclosionaron en luna nueva.

Tabla 5. Valores H del test de Kruskal-Wallis para los rangos de edad de *H. chilensis* y su respectivo valor P

Edad (días)	H	P
1-5	4,95	0,18
6-10	2,52	0,47
11-15	2,71	0,44
16-20	2,14	0,54
21-25	3,01	0,39
26-30	0,64	0,89
31-35	2,46	0,48
36-40	2,68	0,44

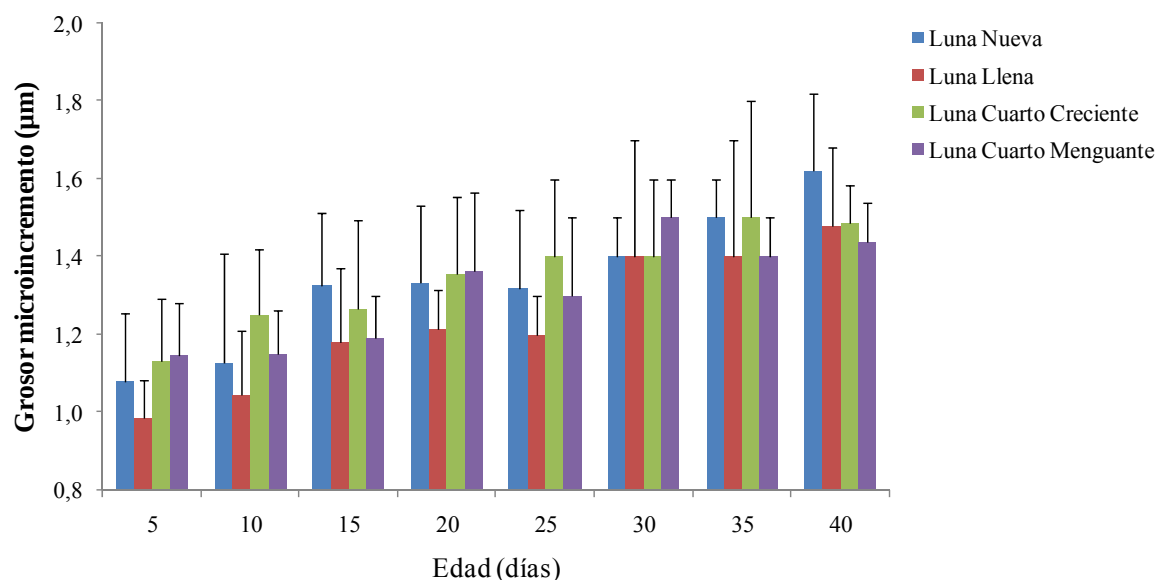


Fig 18. Grosor de los microincrementos de acuerdo a la edad de individuos que eclosionaron en distintas fases lunares para la especie *H. chilensis*.

Tabla 6. Análisis de regresiones lineales de las trayectorias larvales de acuerdo a cada fase lunar. El intercepto corresponde al ancho inicial del microincremento (μm) y la pendiente a la tasa de crecimiento de los microincrementos estimada por los modelos ($\mu\text{m microincremento}^{-1}$). EE = error estándar.

	Intercepto (μm)	EE	Pendiente ($\mu\text{m microincremento}^{-1}$)	EE	F	P
Luna nueva	1,04	0,037	0,015	0,0015	91,67	<0,01
Luna llena	0,98	0,025	0,012	0,0009	174,96	<0,01
Luna cuarto creciente	1,14	0,026	0,010	0,0011	87,56	<0,01
Luna cuarto menguante	1,12	0,032	0,009	0,0011	60,05	<0,01

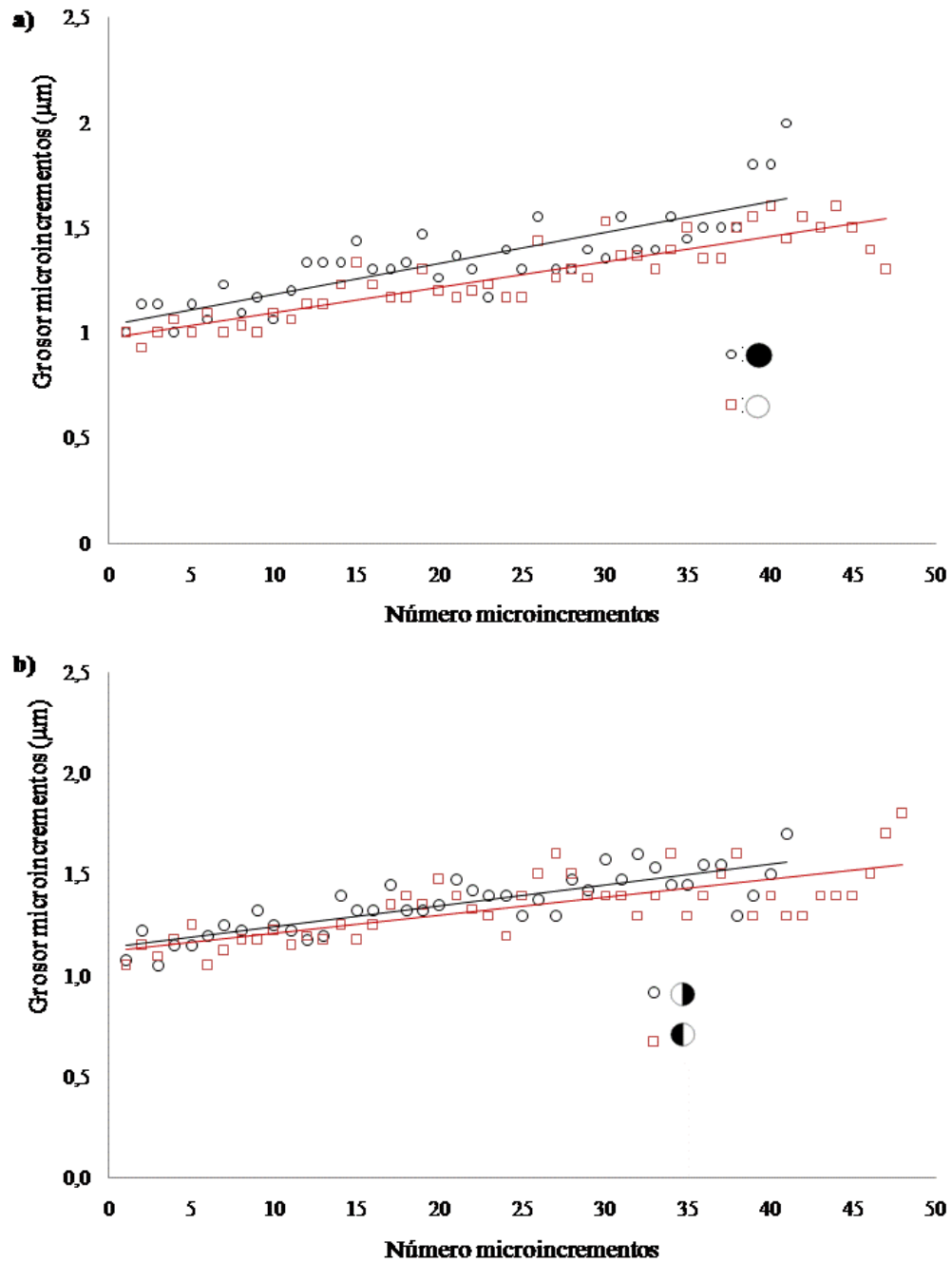


Fig 19. Trayectorias de crecimiento individual y valores promedio del grosor de cada microincremento para individuos que eclosionaron en **(a)** luna nueva (negra) y luna llena (rojo) y **(b)** luna cuarto menguante (rojo) y cuarto creciente (negro).

Por otro lado, durante el análisis se observó que algunas larvas de *H. chilensis* estaban parasitadas con copépodos ectoparásitos de la familia Pennellidae (correspondientes a estadios Chalimus I a IV), fijados a la parte ventral del estómago (Figura 19). El rango de prevalencia parasitaria varió entre 2,67% y 21,41%, y la intensidad parasitaria fue de entre 1 y 4 parásitos. En el Anexo I se incluye el análisis particular del efecto de los parásitos Pennellidae en las tasas de crecimiento y condición de las larvas de *H. chilensis*, a la forma de un manuscrito científico.

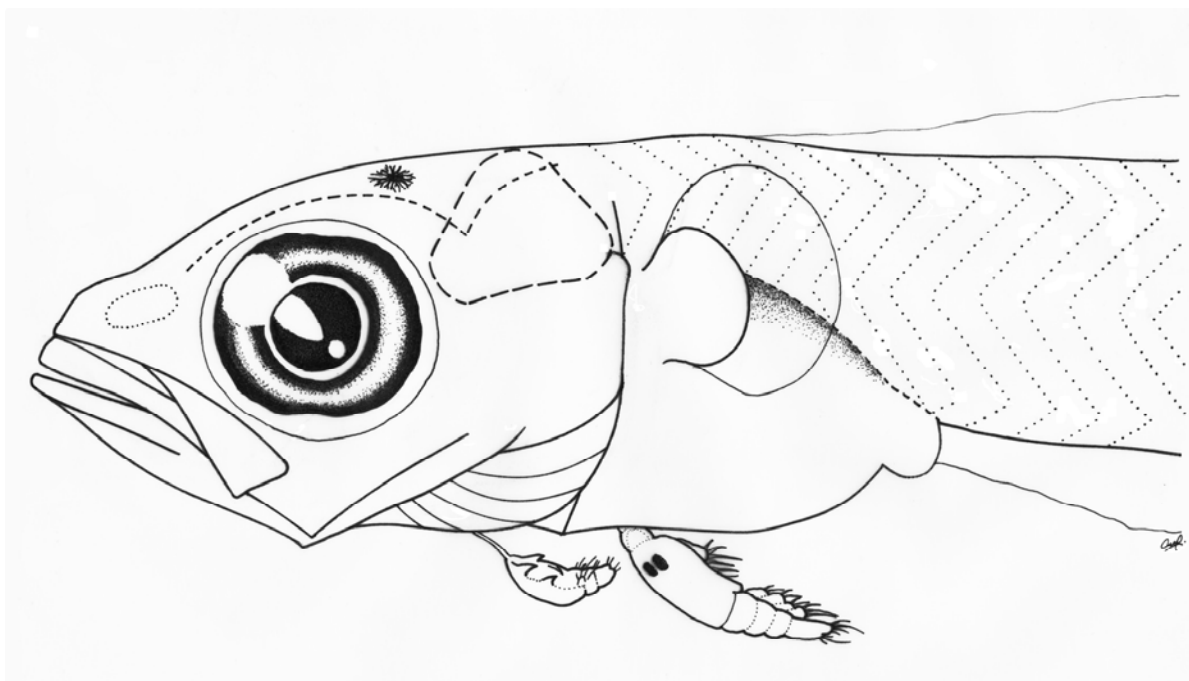


Fig 20. Esquema de larva de *H. chilensis* de 10,1 mm de longitud larval, parasitada con 2 ectoparásitos de la familia Pennellidae en el estómago.

6. DISCUSIÓN

Las larvas del trombollito de tres aletas, *Helcogrammoides chilensis* presentaron alta variabilidad en términos de longitud, con un rango desde los 2,88 mm a los 25,67 mm (promedio $\pm$ desviación estándar: $6,45 \pm 2,45$ mm). Las edades observadas variaron desde 1 a 57 días y las tasas de crecimiento estimadas para los 3 muestreos, no presentaron diferencias significativas, por lo tanto la tasa poblacional de crecimiento para el período y zona de estudio fue de $0,15 \text{ mm día}^{-1}$ (modelo lineal) y $0,16 \text{ mm día}^{-1}$ (modelo Gompertz). Del mismo modo, la condición larval, medida a través del ROGI, no presentó diferencias significativas entre los 3 muestreos; tampoco se observaron diferencias significativas cuando las larvas fueron separadas entre pre y post-flexión. La eclosión resultó preferentemente en luna nueva (día 28), aunque se observó una alta frecuencia de eclosión también en luna cuarto creciente y cuarto menguante, y por lo tanto esta especie presentaría un patrón semi-lunar de eclosión. Finalmente, los grosores de los microincrementos variaron entre 0,6 y 2,0 μm (promedio $\pm$ desviación estándar: $1,28 \pm 0,24 \mu\text{m}$) y se observó que la trayectoria de crecimiento de los microincrementos fue más rápida para los individuos eclosionados en luna nueva ($0,014 \mu\text{m microincremento}^{-1}$).

La larva de *H. chilensis* más pequeña observada en este estudio, presentó ojos pigmentados con un pequeño saco vitelino y midió 2,88 mm de LL, de menor tamaño al recolectado por Pérez (1979) para esta misma especie en la bahía de Valparaíso (4,81 mm), y también es menor comparado con otras especies de la misma familia: *Forsterygion capito*

4,90 mm (Ruck 1973), *F. varium* 5,85 mm (Ruck 1980), *Ruanoho decemdigitatus* 5,03 mm (Ruck 1980) y *Blennius tripennis* 5,72 mm (Ruck 1980), pero valores similares fueron encontrados en Argentina para la especie *H. cunninghami*, en donde el rango varió desde 3 a 27 mm (Ciechomski 1975). Los tamaños de eclosión, estimados por el modelo lineal, no presentaron diferencias significativas entre los muestreos, probablemente dado por la alta variabilidad en el tamaño de eclosión estimados en el estudio (rango: 5,39- 6,23 mm).

En cuanto al crecimiento, *H. chilensis* resultó poseer una tasa poblacional de crecimiento lenta ($0,15 \text{ mm día}^{-1}$ de acuerdo al modelo lineal y $0,16 \text{ mm día}^{-1}$ según el modelo Gompertz), una tasa menor que aquella calculada para juveniles de la misma especie ($0,18 \text{ mm día}^{-1}$, Plaza *et al.* en revisión), a pesar de que el tamaño de eclosión estimado para los individuos recolectados en Las Cruces por estos autores, fue mayor (10,27 mm) del estimado para los individuos de El Quisco (5,684 mm). Del mismo modo, otras especies de aguas chilenas con larvas pelágicas presentan tasas de crecimiento bajas, como el mote o camotillo *Normanichthys crockeri* ($0,15\text{-}0,20 \text{ mm día}^{-1}$, Landaeta *et al.* 2010), la cabrilla *Sebastes oculatus* ($0,15 \text{ mm día}^{-1}$, Landaeta & Castro 2006) y el pez linterna *Maurolicus parvipinnis*, ($0,136 \text{ mm día}^{-1}$, Landaeta *et al.* 2012), diferenciándose completamente de especies de vida pelágica con crecimiento rápido como la anchoveta *Engraulis ringens* ($0,47 \text{ mm día}^{-1}$, Hernández & Castro 2000), la sardina *Sardinops sagax* ($0,40\text{-}0,66 \text{ mm día}^{-1}$, Castillo *et al.* 1985) y la sardina fueguina *Sprattus fuegensis* ($0,448 \text{ mm día}^{-1}$, Landaeta *et al.* 2012).

Dentro del estudio, se observaron larvas de *H. chilensis* con un máximo de 57 días, lo que refleja que el DPL de esta especie, resulta de al menos 2 meses. Esta situación se

corresponde a lo registrado hasta el momento para distintas especies de esta familia estudiadas en Nueva Zelanda: *Forsterygion varium* ($65 \pm 2,32$ días), *F. capito* ($74,33 \pm 2,48$ días), *Ruanoho whero* ($63,92 \pm 1,71$ días) (Kohn & Clements 2011) y *F. lapillum* (≈ 50 días) (Smith & Shima 2011). Dado que estas especies fueron estudiadas en latitudes altas (zonas cercanas a Nueva Zelanda), al igual que el caso de lo que ocurre con *H. chilensis*, es que estas especies tienen un mayor DPL en comparación con otras especies de tripterígonos estudiadas en zonas tropicales con temperaturas del mar más altas (e.g. mar Mediterráneo), las que presentan DPL más cortas (entre 14 y 30 días), como *Trypterygion tripteronotus* ($17 \pm 1,4$ días) (Raventós & Macpherson 2001). Esto se debería a la correlación negativa entre la temperatura y la DPL (Raventós & Mcpherson 2001, Kohn & Clements 2011). La DPL no sólo estaría relacionada con la temperatura, ya que ciertos estudios revelan que podría existir una relación entre la dispersión larval y la DPL (Sponaugle 2010), aunque esta relación sería bastante débil ($r^2 = 0,07$; Kohn & Clements 2011). Además, la distribución espacial y la distancias de las larvas a las zonas de asentamiento también podría generar un efecto en la DPL, ya que ciertas especies con DPL cortos se encontrarían más cercanos a la costa que las larvas que tienen DPL más largos, las cuales se ubicarían mar afuera (Raventós & Macpherson 2001).

El análisis de los últimos 5 microincrementos tiene un excelente potencial como índice de crecimiento, ya que puede estimar tasas de crecimiento reciente, indicar si es que la condición de la larva ha aumentado o disminuido en función de su alimentación o procesos favorables o estresantes en la columna de agua (Fey 2005, Aguilera *et al.* 2009). En estudios realizados con *M. parvipinnis* y *S. fuegensis* en la Patagonia de Chile, el índice

de condición (ROGI) de la primera especie estuvo positivamente correlacionada con la salinidad y se encontró una relación significativa y lineal entre ambas variables, pero el ROGI de la segunda especie no estuvo correlacionada con la salinidad del agua de mar e inclusive el análisis de regresión lineal mostró que la pendiente de esta relación no era distinto de cero (Landaeta *et al.* 2012); este hecho demuestra que este análisis no es necesariamente adecuado para todas las especies, y en el caso de *H. chilensis*, podría no reflejar al 100% la condición individual de las larvas, ya que estarían enmascaradas en la alta variabilidad de longitudes y en el corto período de estudio. Además, se debe considerar que esta técnica es más fidedigna cuanto los microincrementos son de al menos 3 y 6 μm (Suthers 1998), lo cual puede ser una razón por la cual no se hayan encontrado diferencias significativas entre los muestreos, ya que en todos los casos el valor máximo de microincrementos medido resultó ser 2,0 μm .

Existen cuatro potenciales explicaciones para la falta de diferencias significativas en los tamaños de eclosión, las tasas de crecimiento y la condición larval (entre septiembre y octubre):

La primera alternativa estaría revelando la presencia de una homogeneidad en la dinámica de los estadios tempranos en la zona y durante el período de estudio. Esto implica que durante la ontogenia, esta especie es capaz de mantener estable su crecimiento, a pesar de las variaciones en las condiciones ambientales. Aunque alternativamente, también puede haber una heterogeneidad tan grande que los análisis estadísticos no son capaces de discernir entre ellos.

En segundo lugar, y dado que tampoco se observaron variaciones en los tamaños de eclosión, entonces no habría evidencias de una variabilidad en las posturas de huevos a una escala temporal de semanas, indicando que para este corto período y en la zona de estudio, no habría un efecto parental mayor. Aunque tal como se ha demostrado el efecto parental en otras especies (*e.g. Pomacentrus amboinensis*, Gagliano & McCormick 2007b; *Engraulis ringens*, Llanos-Rivera & Castro 2004; *Merluccius gayi*, Landaeta & Castro 2012), este estudio no permite concluir que no exista un efecto parental a largo plazo, ya que algunas especies de peces pelágicos y demersales han demostrado reducir el tamaño y la calidad de sus huevos mientras transcurre la temporada reproductiva (Llanos-Rivera & Castro 2004), y más aún, considerando que los adultos de *H. chilensis* depositan huevos sobre el submareal durante todo el año (Pérez 1979), sería esperable que en un plazo más largo de estudio, sí existiese una variación en el tamaño de los huevos o una disminución de la calidad de los mismos.

Por otro lado, estudios demuestran cómo los factores físicos se relacionan con factores biológicos para afectar, de manera directa o indirecta, el crecimiento de distintas especies, incluso a nivel ontogenético (Bergenius *et al.* 2005). Pero, como revela Fey (2005) en un estudio con larvas y juveniles de arenque (*Clupea* sp.) las condiciones de alimentación deben ser bastante extremas para revelar un cambio en las tasas de crecimiento, y además se observa un retraso de algunos días en la depositación de los microincrementos “delgados”, producto de malas condiciones de alimentación (Suthers 1998, Fey 2005, Aguilera *et al.* 2009). En el caso de las tasas de crecimiento, uno de los factores que las afecta es la temperatura (Hovenkamp 1990, Sponaugle 2010); algo similar

ocurre con el índice de condición (ROGI), en que la deposición de los microincrementos en los otolitos es afectada por variables como el fotoperiodo, la temperatura y los niveles de alimentación (Aguilera *et al.* 2009). Por ende, si bien no se encontraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento ni en la condición larval, dado el corto tiempo de estudio en el que se analizaron las larvas de *H. chilensis* (de sólo un mes), sería posible inferir que durante este mes no hubo ningún efecto ambiental mayor sobre las larvas que gatillase una variación en las tasas de crecimiento o en la condición de los individuos. Considerando además que este período está dominado por eventos de surgencias en los que la productividad primaria es más alta, la fuente de alimentos se convierte en una variable que no afectaría la condición de esta especie.

Por lo tanto, si en este período no se vieron afectadas las tasas de crecimiento, ¿es posible asumir, que aumentando el tiempo de estudio exista una variabilidad temporal en estas variables para la especie *H. chilensis*? O ¿son otros los factores que están mediando el crecimiento, la sobrevivencia y el asentamiento de esta especie?

La última alternativa podría estar relacionada con los mecanismos de regulación de la población. Es común, en especies que presenten un desarrollo bentónico y larvas planctónicas, que el suministro larval (entrada a la población) sea altamente variable y que existan factores denso-independientes que regulen la salida de la población (Lecchini *et al.* 2006). Para *H. chilensis*, en la zona y durante el tiempo de estudio, no hay evidencias suficientes para considerar que los factores denso-dependientes (como la competencia) regulen la población larval, pero sí existirían factores externos (denso-independientes, como la presencia de ectoparásitos) que podrían gatillar diferencias en las tasas de

crecimiento de ciertas cohortes que se acoplen con el ciclo del ectoparásito. Esto podría explicar el hecho de que las tasas de crecimiento no variaron entre los muestreos a nivel poblacional, pero sí se encontraron diferencias significativas entre el crecimiento de larvas que no presentaban parásitos y aquellas que sí presentaron parásitos (ver Anexo I). La infestación de parásitos en larvas se presenta dado que las larvas de peces están proceso de desarrollo de sus estados fisiológicos e inmunológicos y su delicada naturaleza les hace mucho más vulnerable a la infestación por parásitos que a los estados adultos (Fogelman & Grutter 2008).

Por otro lado, muchos estudios revelan la importancia que el crecimiento tiene para los estadios larvales de peces. Los tamaños de eclosión más grandes y mayores tasas de crecimiento resultan beneficiosos, ya que se reduce la DPL (Bergenius *et al.* 2005), aumentan las tasas de asentamiento (Sponaugle 2010) y de sobrevivencia después de este proceso (Gagliano & McCormick 2007a) y aumenta también el reclutamiento juvenil (Sponaugle 2010). A pesar de las ventajas que se han descrito para organismos con crecimiento rápido, existen otros estudios que no establecen ventajas tan evidentes en aumentar el tamaño al momento del asentamiento, por lo tanto la mortalidad no siempre está relacionada con el tamaño corporal (Gagliano & McCormick 2007a), sino que también está relacionada con factores ambientales, con la depredación, entre otros. Por lo tanto, ¿es beneficioso para todas las especies, crecer rápido y asentarse a tamaños grandes, considerando que la mortalidad puede estar relacionada con otros factores que escapan a los rasgos fisiológicos y morfológicos? En el caso de *Helcogrammoides chilensis* que presenta tasas de crecimiento lentas, debe buscar otras alternativas que garanticen la sobrevivencia

de la descendencia. Existen otros factores denso-independientes que podrían estar confiriéndole una ventaja a *H. chilensis* en la sobrevivencia de las larvas: la primera se relaciona con el desove, y corresponde a lo establecido por Sponaugle (2010), que muestra las ventajas de que una especie desove preferentemente en primavera, ya que al momento de asentarse, las larvas tendrán una mayor longitud a la edad que si desovan en verano.

El segundo factor denso-independiente está relacionado a la asociación de procesos reproductivos con patrones lunares o semi-lunares de eclosión (Christy 2003). Los ciclos reproductivos lunares y semi-lunares son bastante comunes en especies con distintos niveles de organización, como las esponjas, corales, moluscos, poliquetos, cangrejos, equinoideos (Sponaugle & Pinkard 2004), peces (Mizushima *et al.* 2000, Sponaugle & Pinkard 2004, Takemura *et al.* 2010), anfibios, aves terrestres y mamíferos (Grant *et al.* 2009).

De lo que se ha descrito en peces, los ciclos lunares son característicos de la familia Serranidae y Siganidae, y los ciclos semilunares, de las familias Fundulidae, Pomacentridae, Apogonidae, Atherinospidae, Tetraodontidae y Gobiidae (Takemura *et al.* 2010).

El que los ciclos lunares o semi-lunares sean comunes en los peces y otros organismos, se debe a que el ciclo lunar proporciona un conjunto sólido y predecible de señales ambientales para las especies marinas, a través de ciclos ambientales asociados, como los ciclos mareales, cambios en la intensidad de la luz de la luna, hora del amanecer, ciclo solar, entre otros (deBruyn & Meeuwig 2001, Takemura *et al.* 2010), que aseguran el movimiento, alimentación y reproducción en condiciones ambientales favorables para la

especie (deBruyn & Meeuwig 2001). Ante estas circunstancias, ¿cuáles son las ventajas para esta especie, poseer un patrón de eclosión semi-lunar?

En el caso de *H. chilensis*, una especie que exhibe cuidado parental, es común que se cumplan algunas hipótesis relacionadas con la biología de las larvas y biología de los adultos, en cuanto a la periodicidad lunar de reproducción. Dado que ésta presenta un patrón semi-lunar de eclosión, se ve privilegiada la evasión de depredadores para los huevos y larvas, además de una rápida dispersión de las larvas fuera de los lugares con mayor concentración de depredadores al momento de la eclosión (Takemura *et al.* 2010). La sincronización con patrones semi-lunares, está relacionada también con un aumento en la protección parental y disminución del costo asociado a la defensa de la descendencia (Robertson *et al.* 1990, Takemura *et al.* 2010).

En el patrón semi-lunar de *H. chilensis*, se observa el máximo principal de eclosión en luna nueva, de acuerdo a Robertson *et al.* (1990), esto privilegiaría la dispersión larval dadas las máximas mareas que se presentan asociadas a esta fase lunar, y como se mencionó anteriormente, ayuda a evitar a los depredadores que se alimentan de estas larvas.

Por otro lado, Ruck (1980) establece que existe una tendencia de los peces costeros a desovar menos huevos que otras especies, pero que ofrecen un cuidado parental más exhaustivo, lo que conlleva a una ventaja en esta zona que presenta condiciones físicas muy severas. Entonces, si los huevos son desovados en luna nueva, se está privilegiando el cuidado parental de los huevos, disminuyendo así la mortalidad de la descendencia (Robertson *et al.* 1990). Si además los huevos eclosionan en esta misma fase lunar, entonces, dada la baja luminosidad, las larvas tienen mayores probabilidades de escapar a

sus predadores, aumentando así su sobrevivencia. Ésta última se condice con el hecho de que no se presenten eclosiones en luna llena, en donde las larvas estarían altamente expuestas a predadores, dada la alta luminosidad que se presenta en esta fase.

El hecho de que se observen eclosiones en otras fases lunares, en luna cuarto menguante, luna cuarto creciente y luna nueva, indica que estas especies están eclosionando temporalmente espaciadas, lo que ayuda a disminuir la competencia por el alimento disponible en la columna de agua, ya que no todas las larvas eclosionan en el mismo tiempo, disminuyendo así la probabilidad de mortalidad por inanición (Robertson *et al.* 1990).

De acuerdo a lo establecido por Kohn & Clements (2011) para juveniles de la familia Tripterygiidae, los patrones de microincrementos en cada otolito se dividen en tres secciones. Una primera sección corresponde a anillos muy finos que varían entre 0,5 y 2 μm de grosor, seguido de una sección de microincrementos más ancha que varía de 5 a 10 μm y una sección final con anillos de entre 2 y 4 μm . Los grosores de los microincrementos de *H. chilensis* analizados durante este estudio, comprenden entonces a la primera sección más angosta, con un rango que varió entre 0,6 y 2 μm . Por otro lado, es importante destacar que la trayectoria de los microincrementos para aquellos individuos que eclosionan en luna nueva es más rápida que para los individuos que eclosionaron en otras fases lunares, lo se traduce como una mayor tasa de crecimiento individual para esos individuos, ya que tienden a depositar anillos gruesos a una tasa más alta que el resto de los individuos eclosionados en otras fases lunares.

Finalmente, es importante destacar que para esta especie, aún faltan estudios que puedan relacionar las tasas de crecimiento, tamaños de eclosión, condición larval y patrones de eclosión, con las tasas de mortalidad y tasas de asentamiento, para poder comprender de mejor manera la dinámica de la población y estimar el aporte larval que se asienta y finalmente recluta en la población adulta.

7. CONCLUSIONES

- 1) El crecimiento somático de las larvas fue reflejado en la microestructura de los otolitos, al presentar relaciones significativas entre las medidas de los otolitos y la longitud larval.
- 2) Dado que las tasas de crecimiento no variaron entre los tres muestreos, se establece que durante la época y en la zona de estudio, no existe una variabilidad estadísticamente significativa en el crecimiento de larvas de *H. chilensis*.
- 3) El análisis de ROGI demuestra que no hubo variaciones en el estado de condición de los individuos de la población estudiada, ni tampoco se presentaron diferencias significativas en la condición de las larvas separadas en pre o post flexión.
- 4) *Helcogrammoides chilensis* posee un patrón de eclosión semilunar, con el máximo más importante en luna nueva y otros dos en lunas cuarto creciente y cuarto menguante.

8. LITERATURA CITADA

Aguilera B, IA Catalán, I Palomera &MP Olivar. 2009. Otolith growth of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) larvae fed with constant or varying food levels. *Scientia Marina* 73(1): 173-182

Bergenius MAJ, MI McCormick, MG Meekan & DR Robertson. 2005. Environmental influences on larval duration, growth and magnitude of settlement of a coral reef fish. *Marine Biology* 147: 291-300

Berrios V & M Vargas. 2004. Estructura trófica de la asociación de peces intermareales de la costa rocosa del norte de Chile. *Revista de Biología Tropical* 52(1): 201-212

Buratti CC, BA Santos. 2010. Otolith microstructure and pelagic larval duration in two stocks of the Argentine hake, *Merluccius hubbsi*. *Fisheries Research* 106: 2-7

Campana SE. 1984. Lunar cycles of otolith growth in the juvenile starry flounder *Platichthys stellatus*. *Marine Biology* 80: 239-246.

Cancino C, K Farías, S Lampas, B González & V Cuevas. 2010. Descripción de los complejos estructurales óseos en *Helcogrammoides chilensis* (Blennioidei: Tripterygiidae) de la zona central de Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 45(1): 671-682

- Castillo G, E Aguilera, G Herrera, PA Bernal, JL Butler, J Chong, H González, C Oyarzún & C Veloso. 1985.** Larval growth rates of the pacific sardine *Sardinops sagax* off central Chile, determined by daily ring counts in otoliths. *Biología Pesquera* 14: 3-10.
- Christy JH. 2003.** Reproductive timing and larval dispersal of intertidal crabs: the predator avoidance hypothesis. *Revista Chilena de Historia Natural* 76: 177-185.
- Ciechomski J. 1971.** Estudio sobre los huevos y larvas de la sardina fueguina *Sprattus fuegensis* y de *Maurolicus muelleri*, hallados en aguas adyacentes al sector patagónico argentino. *Physis* 30: 557-567.
- Ciechomski J. 1975.** Características y distribución de postlarvas del acorazado, *Agonopsis chiloensis* (Jenyns, 1842) Jordan y Evermann, 1898 y de *Tripterygion cunninghami* Smitt, 1898 en aguas del Atlántico frente a la Argentina (Pisces). *Physis* 89: 309-317
- deBruyn AMH & JJ Meeuwig. 2011.** Detecting lunar cycles in marine ecology: periodic regression versus categorical ANOVA. *Marine Ecology Progress Series* 214: 307-310. doi:10.3354/meps214307
- Fey DP. 2005.** Is the marginal otolith increment width a reliable recent growth index for larval and juvenile herring? *Journal of Fish Biology* 66: 1962-1703. doi: 10.1111/j.1095-8649.2005.00716.x
- Fogelman RM & AS Grutter. 2008.** Mancae of the parasitic cymothoid isopod, *Anilocra apogonae*: early life history, host-specificity, and effect on growth and survival of preferred young cardinal fishes. *Coral Reefs* 27: 685–693. doi: 10.1007/s00338-008-0379-2.

Gagliano M & MI McCormick. 2007a. Compensating in the wild: is flexible growth the key to early juvenile survival? *Oikos* 116: 111-120. Doi: 10.1111/j.2006.0030-1299.15418.x

Gagliano M & MI McCormick. 2007b. Maternal condition influences phenotypic selection of offspring. *Journal of Animal Ecology* 76:174-182

Grant RA, EA Chadwick, T Halliday. 2009. The lunar cycle: a cue for amphibian reproductive phenology? *Animal Behaviour* 78: 349-357. doi: 10.1016/j.anbehav.2009.05.007

Hernández EH & LR Castro. 2000. Larval growth of the anchoveta *Engraulis ringens* during the winter spawning season off central Chile. *Fisheries Bulletin* 98: 704-710

Hernández-Miranda E, AT Palma & FP Ojeda. 2003. Larval fish assemblages in nearshore coastal waters off central Chile: temporal and spatial patterns. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 56: 1075-1092

Hernández-Miranda E, R Veas, CV Espinoza, SR Thorrold & P Ojeda. 2009. The use of otoliths and larval abundance for studying the spatial ecology of the blenny *Scartichthys viridis* (Valenciennes, 1836) in coastal central Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 44(3): 619-63

Hovenkamp F. 1990. Growth differences in larval plaice *Pleuronectes platessa* in the Southern Bight of the North Sea as indicated by otolith increments and RNA/DNA. *Marine Ecology Progress Series* 58: 205-215.

Hovenkamp F & JIJ Witte. 1991. Growth, otolith growth and RNA/DNA ratios of larval plaice *Pleuronectes platessa* in the North Sea 1987 to 1989. Marine Ecology Progress Series 70: 105-116.

Kohn Y & K Clements. 2011. Pelagic larval duration and population connectivity in New Zealand triplefin fishes (Tripterygiidae). Environmental Biology of Fishes 91(3): 275-286

Landaeta MF & LR Castro. 2006. Larval distribution and growth of the rockfish, *Sebastes capensis* (Sebastidae, Pisces), in the fjords of southern Chile. ICES Journal of Marine Science 63: 714-724. doi: 10.1016/j.icesjms.2006.01.002

Landaeta MF, PA Inostroza, A Ramírez, S Soto-Mendoza & LR Castro. 2010. Distribution patterns, larval growth and hatch dates of early stages of the mote sculpin *Normanichthys crockeri* (Scorpaeniformes, Normanichthyidae) in the upwelling ecosystem off central Chile. Revista de Biología Marina y Oceanografía 45(1): 575-588

Landaeta MF, GL López, N Suárez-Donoso, CA Bustos & F Balbontín. 2012. Larval fish distribution, growth and feeding in Patagonian fjords: potential effects of freshwater discharge. Environmental Biology of Fishes 93: 73-87. doi: 10.1007/s10641-011-9891-2

Landaeta MF & LR Castro. 2012. Seasonal and annual variation in Chilean hake *Merluccius gayi* spawning locations and egg size off central Chile. Progress in Oceanography 92-95: 166-177.

Lecchini D, Y Nakamura, J Grignon & M Tsuchiya. 2006. Evidence of density-independent mortality in a settling coral reef damselfish, *Chromis viridis*. Ichthyological Research 52:298-300. doi: 10.1007/s10228-006-0340-8

- Llanos-Rivera A & LR Castro. 2004.** Latitudinal and seasonal egg-size variation of the anchoveta (*Engraulis ringens*) off the Chilean coast. Fisheries Bulletin 102(1): 207-212
- Marliave J. 1986.** Lack of planktonic dispersal of rocky intertidal fish larvae. Transactions of the American Fisheries Society 115: 149-154
- Mizushima N, Y Nakashima & T Kuwamura. 2000.** Semilunar spawning cycle of the humbug damselfish *Dascyllus aruanus*. Journal of Ethology 18:105-108. doi: 10.1007/s101640070008
- Muñoz AA & FP Ojeda. 1998.** Guild structure of carnivorous intertidal fishes of the Chilean coast: implications of ontogenetic dietary shifts. Oecologia 114: 563-573.
- Pequeño G. 1989.** Peces de Chile: Lista sistemática, revisada y comentada. Revista de Biología Marina y Oceanografía 24(2): 1-132
- Pérez R. 1979.** Postembryonic development of *Tripterygion chilensis* Cancino 1955, in Valparaíso bay (Tripterygiidae: Perciformes). Revista de Biología Marina 16 (3): 319-329
- Plaza G, S Katayama & M Omori. 2003.** Timing of parturition, planktonic duration, and settlement patterns of the black rockfish, *Sebastes inermis*. Environmental Biology of Fishes 68: 229-239
- Plaza G, MF Landaeta, V Espinoza & P Ojeda.** Daily growth patterns of Young-of-year of six species of Chilean intertidal fishes. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. En revisión.

- Quijada PA & CW Cáceres. 2000.** Patrones de abundancia, composición trófica y distribución espacial del ensamble de peces intermareales de la zona centro-sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 73: 739-747
- Raventós N & E Macpherson. 2001.** Planktonic larval duration and settlement marks on the otoliths of Mediterranean littoral fishes. *Marine Biology* 138: 1115-1120. doi: 10.1007/s002270000535
- Robertson DR, CW Petersen & JD Brawn. 1990.** Lunar reproductive cycles of benthic brooding reef fishes: reflections of larval biology or adult biology? *Ecological Monographs* 60(3): 311-329
- Rojas JM & FP Ojeda. 2010.** Spatial distribution of intertidal fishes: a pattern dependent on body size and predation risk? *Environmental Biology of Fishes* 87: 175-185
- Ruck JG. 1973.** Development of *Tripterygion capito* and *T. robustum* (Pisces: Tripterygiidae). *Zoology Publications from Victoria University of Wellington* 63: 1-10
- Ruck JG. 1980.** Early development of *Forsterygion varium*, *Gilloblennius decemdigitatus*, and *G. tripennis* (Pisces: Tripterygiidae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 14: 313-326. doi: 10.1080/00288330.1980.9515874
- Russell GS & DJ Levitin. 1995.** An expanded table of probability values for Rao's Spacing Test. *Communications in statistics: Simulation and computation* 24: 879-888.

Smith AC & JS Shima. 2011. Variation in the effects of larval history on juvenile performance of a temperate reef fish. *Austral Ecology* (in press). doi: 10.1111/j.1442-9993.2010.02223.x

Sogard SM. 2011. Interannual variability in growth rates of early juvenile sablefish and the role of the environmental factors. *Bulletin of Marine Science* 87(4): 857-872. doi:10.5343/bms.2010.1045

Sponaugle S. 2010. Otolith microstructure reveals ecological and oceanographic processes important to ecosystem-based management. *Environmental Biology of Fishes* 89: 221-238. doi: 10.1007/s10641-010-9676-z

Sponaugle S & RK Cowen. 1994. Larval durations and recruitment patterns of two Caribbean gobies (Gobiidae): contrasting early life histories in demersal spawners. *Marine Biology* 120:133-143. doi: 10.1007/BF00381949

Sponaugle S & D Pinkard. 2004. Lunar cyclic population replenishment of a coral reef fish: shifting patterns following oceanic events. *Marine Ecology Progress Series* 267:267-280.

Suthers IM. 1998. Bigger? Fatter? Or is faster growth better? Considerations on condition in larval and juvenile coral-reef fish. *Australian Journal of Ecology* 23: 265-273

Takemura A, MS Rahman & YJ Park. 2010. External and internal controls of lunar-related reproductive rhythms in fishes. *Journal of Fish Biology* 76: 7-26. doi: 10.1111/j.1095-8649.2009.02481.x

Vigliola L & MG Meekan. 2002. Size at hatching and planktonic growth determine post-settlement survivorship of a coral reef fish. *Oecologia* 131: 89-93.

Williams J & V Springer. 2001. Review of the South American-Antartic Triplefin Fish Genus *Helcogrammoides* (Perciformes: Tripterygiidae). *Revista Biología Tropical* 49 (1): 117-123

Zar JH. 1999. Biostatistical Analysis, 663 pp. Prentice Hall, New Jersey.

9. ANEXOS

A partir de los resultados de esta tesis, se generaron dos manuscritos científicos, los cuales serán enviados a dos revistas de corriente principal:

I. Effects of a parasitic copepod on the recent larval growth of a coastal rocky fish

Manuscrito que será enviado a la revista **Parasitology Research**.

II. Faster growth associated with the new moon phase: A case in larval triplefin *Helcogrammoides chilensis* (Pisces: Tripterygiidae) from central Chile

Manuscrito que será enviado a la revista **Aquatic Ecology**.

Effects of a parasitic copepod on the recent larval growth of a coastal rocky fish

P. Palacios-Fuentes¹, M.F. Landaeta^{1,*}, G. Muñoz²,

G. Plaza³ and F.P. Ojeda⁴

1 Laboratorio de Ictioplancton (LABITI), Facultad de Ciencias del Mar y de Recursos Naturales, Universidad de Valparaíso. Avenida Borgoño 16344, Reñaca, Viña del Mar, Chile.

2 Laboratorio de Parasitología, Facultad de Ciencias del Mar y de Recursos Naturales, Universidad de Valparaíso. Avenida Borgoño 16344, Reñaca, Viña del Mar, Chile.

3 Escuela de Ciencias del Mar, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

4 Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

* Corresponding author. Telephone: +56-322507828, Fax: +56-322507859, email:

mauricio.landaeta@uv.cl

Running head: parasites affect growth of larval triplefin

Abstract

Parasites can infect larval, juvenile or adult marine fishes; however, effects on the growth and condition of fish larvae have been scarcely investigated. This study analysed the effects of a parasitic copepod on the growth within the larval stages for the Chilean triplefin *Helcogrammoides chilensis* (Tripterygiidae), based on the microstructure of sagitta otoliths. Fish larvae were collected during austral spring, 2010 off central Chile and their body length ranged from 5.1 to 16.6 mm (2 to 57 days old). They were parasitized with a pennellid larval copepod that was always externally attached to the ventral side of the fish gut. Prevalence of the copepod ranged from 2.7% to 20.8%, with 1-4 parasites per fish larvae. Relationships between otolith size (radius, perimeter) and larval size were equal for parasitized and unparasitized fish larvae. Larval growth was also similar between unparasitized (0.21 mm d^{-1}) and parasitized fish larvae (0.19 mm d^{-1}). However, at the same age, larvae with copepods were smaller, in both length and estimated body volume, than larvae without copepods. Recent Otolith Growth Index (ROGI), based on the residual analysis of the relationship between increment width of the outermost 5 microincrements and otolith radius, indicated that larval *H. chilensis* with copepods showed a reduction in recent growth and condition compared to those without evidence of copepods. Nevertheless, the parasite load (1 vs. 2 pennellids) did not reduce larval fish condition. The infestation of pennellids on coastal fish larvae therefore may induce an increase in the pelagic larval duration and potentially affect settlement rates of this intertidal fish.

Keywords: Pennellidae, *Helcogrammoides chilensis*, otolith, ROGI

Introduction

Parasite diversity in marine fish is widely known, especially for those fish that have economic importance, as a parasite may produce several kinds of negative effects in their host, such as mortality, somatic growth, reproduction and behaviour (Ho 2000; Pino-Marambio et al. 2007), that consequently could affect the commercial value of a biological resource. The major consequences of parasitism on any host may involve physiological or mechanical effects. Physiological effects include the drain of metabolic resources or a reaction of the host, locally or generally, to the invasion of tissues or secretions by the parasite, resulting in a decreased activity level (Nielson et al. 1987). Whereas mechanical effects imply that the presence of the parasites produces pressure on the tissues or organs of the host, altering their functionality (Costeau et al. 1991).

Young fish are in early immunological and general physiological development stages (Uribe et al. 2011), therefore they are likely to be more vulnerable to the effects of parasites than adult fish (Fogelman and Grutter 2008). For these reasons, larval and juvenile fish can be dramatically affected by parasites (*e.g.*, Cunningham et al. 2005; Fogelman and Grutter, 2008; Jones and Grutter 2008; Lacerda et al. 2009; Grutter et al. 2010a). For instance, postlarval fishes may suffer from stress caused by hydrodynamic drag at low Reynolds numbers due to the size of the parasites relative to the length of the fish, which may affect the ability of the host to capture prey and avoid predators (Felley et al. 1987). Indeed, the prey uptake by herring larvae infected with cestode *Scolex pleuronectis* was 50% lower than for unparasitised fish in the North Sea (Heath and Nicoll 1991). It is plausible therefore that a reduction of prey capture together with the direct impact of infestation depresses growth and survival of larvae and juvenile fish (Mladineo 2003; Jones and Grutter 2008). Some cases have been described

particularly for fish larvae; for example, anchoveta larvae parasitized with caligid copepods were smaller at the same age as those larvae without parasites (Herrera 1990); parasitized juvenile cardinal fish were 3-9% shorter than unparasitized fish (Fogelman and Grutter 2008). More recently, Grutter et al. (2010a) described that the coral reef fish, *Pomacentrus moluccensis*, with internal parasites had lower larval growth than those without parasites when growth rates were estimated from hatching or from after settlement.

For those fish species with a bipartite life cycle (pelagic, dispersive larval stage and demersal juvenile), infection of larvae with ecto- and/or endoparasites affecting larval growth may increase the pelagic larval duration (PLD), which is the time that an individual spends in the vulnerable larval stages, before settlement. Then, small length-at-age and/or low individual growth rates (the latter generally based on measurements of otolith microstructure) due to parasitism can be a proxy for estimating individual survival probabilities (Dower et al. 2009). Growth rates and growth history in fishes can be determined by analysing the microstructure of otoliths. The increment width has been utilised as an indicator of feeding rates (Folkvord et al., 1997; Aguilera et al., 2009), effects of environmental factors (Oozeki and Watanabe, 2000; Landaeta and Castro, 2006; Landaeta et al., 2011) and condition (Paperno et al., 1997).

The family Tripterygiidae is composed of 29 genera with 163 species in total, distributed worldwide, at polar, temperate and tropical regions (Kohn and Clements 2011). In Chile, tripterygiids are represented by 3 species, *Helcogrammoides chilensis* (Cancino 1960), *H. cunninghami* (Smitt 1898) (Pérez 1979; Pequeño 1989) and *H. antarcticus* (Tomo 1981) (Williams and Springer 2001; Cancino et al. 2010). Species of this family have a bipartite life cycle, demersal eggs that develop attached to the substrate (Rico et al., 2010), to hatch after 20 days into a planktonic larvae, which would settle within 2 to 3 months (Kohn and Clements

2011). Juvenile and adult stages show carnivore habits (Berrios and Vargas 2004; Boyle and Horn 2006; Rojas and Ojeda 2010), feeding on small size prey, with high motility and high energetic value (*e.g.* amphipods, isopods and harpacticoid copepods) (Muñoz and Ojeda 1998; Berrios and Vargas 2004). The Chilean triplefin, *Helcogrammoides chilensis*, distributed between Iquique (20°18' S) and Talcahuano (36°45'S), lives in the highly exposed rocky intertidal zone (Williams and Springer 2001; Cancino *et al.* 2010) where its larvae are highly abundant in plankton samples throughout the year in central Chile (Pérez, 1979; Hernández-Miranda *et al.*, 2003; Landaeta *et al.*, 2008).

Considering the high abundances of *Helcogrammoides chilensis* in central Chile, and the previous studies of ectoparasites, including copepods, in this species (Herrera, 1984), our objective is to determine potential effects of parasitic copepods on growth rates of *H. chilensis* larvae. Therefore, we hypothesise that copepods have a negative effect on recent growth and condition of intertidal fish larvae, which will be revealed in their otolith microstructure.

Methods

Field work

Three oceanographic samplings were carried out during September and October 2010, on-board the RV Ilán from Pontificia Universidad Católica de Chile. Hydrographic data were obtained through vertical tows of a conductivity-temperature-depth profiler (Seabird SBE-19 CTD) from surface to near bottom depths (~20 m) during dawn and at night-time (1900 to 2300 h). These were taken 1 nautical mile off El Quisco Bay (33°24'S, 71°43'W). Ichthyoplankton

samples were collected using a Bongo net (60 cm mouth diameter, 300 μm mesh size) equipped with two TSK flow meters to quantify the water filtered. Five to eight trawls at 1-2 knots were completed during each oceanographic sampling in the same location. Seawater filtered by the net ranged from 34.1 to 316.4 m^3/tow (mean $\pm$ one standard deviation: $201.5 \pm 76.5 \text{ m}^3/\text{tow}$). All plankton samples ($n = 38$) were initially fixed with 5% formalin buffered with sodium borate and after 12 h they were preserved in 96% ethanol.

Laboratory work

In the laboratory, all fish eggs and larvae were removed and counted, and larval triplefin *Helcogrammoides chilensis* were identified following Pérez (1979). A randomly selected group of undamaged larvae of *H. chilensis* were observed and the body length (BL) was measured to the nearest 0.01 mm from the tip of the upper maxilla to the tip of the notochord in preflexion larvae (notochord length), and to the base of the hypurals in flexion and postflexion larvae (standard length). Larval height (LH) was measured from the base of the pectoral fins, with a Motic camera of 5.0 MPx connected to a stereomicroscope, using Motic Images Plus 2.0 software. Estimation of larval volume was calculated as $\text{BL} \times (\text{LH})^2$ (Hovenkamp and Witte, 1991). No attempt was made to correct lengths for the effects of preservation. Larval triplefin were converted to abundance (numbers 1000 m^{-3}) by using the filtered volume estimated by flow meters.

External parasites were identified according to their buccal structure and appendages (Castro and Baeza 1986, 1989). The prevalence of parasites corresponds to the percentage of hosts parasitized from a sample, with a certain parasite species (Bush et al. 1997).

Left and right sagittal and lapilli otoliths were dissected from a subsample of randomly selected infected and non infected larvae ($n = 99$, from 5.13 to 16.57 mm length), as described by Landaeta and Castro (2006). Otoliths were embedded in epoxy resin on a glass slide and observed under transmitted light with a compound microscope Motic BA310 at 1,000x magnification under oil immersion. The longest radius of the otoliths was measured three times and the average was utilised; the perimeter and area of the otoliths were measured once using Moticam Image Plus 2.0 software. Fish age (days) was estimated by counting the number of increments starting from a conspicuous dark mark near the primordium (hatch check). Three independent readings were made on each sagitta; lapilli were difficult to read, and so their readings were discarded. From the readings, the mode was selected; if all counts were different, the mean value was estimated. Counts of left and right sagittal otoliths were the same (Wilcoxon paired test, $P = 0.86$), and therefore, counts of the left sagitta otolith were utilised for the analysis. Daily formation of the increments has been recently validated for *H. chilensis* (Lidia Mansur, Pontificia Universidad Católica de Chile, pers. comm.).

Data analysis

Least square linear regression analyses were performed between otolith measurements (radius, perimeter) and larval length for both unparasitized and parasitized larvae. Larval size and otolith area were related by exponential models. The relationships between otolith shape and body size from unparasitized and parasitized larvae were compared using multiple slope tests (Zar, 1999). Estimations of larval growth were carried out using least square linear regression models as a first approach, analyzed separately for both groups of *H. chilensis* larvae, where the slope corresponds to the population growth rate of each group, and then the

slopes were compared by multiple slope tests (Zar, 1999). Because growth rates were not significantly different between groups (multiple slope test, $|t| = 0.35$; $P > 0.05$), a residual analysis was done after a unique linear fit was adjusted for all larvae.

Increment widths cannot be compared directly (Hovenkamp and Witte 1991), because when microincrements, which were formed at different radii, are compared the increment of the largest radius will on average be wider. So, in order to estimate a recent otolith growth index (ROGI) for unparasitized and parasitized larvae, residuals of the relationship between the sum of the widths of the last five more recent increments and the radius of the otolith were calculated. The rationale for residual analysis is that since a residual is a measure of an individual's departure from the population, it can be viewed as an indicator of condition (Aguilera et al. 2009). According to this relationship, when increment width is larger than expected, the residuals of the regression will be positive, which means that otolith growth has been above average. When increment width is smaller than expected, the residuals will be negative, which means that otolith growth has been below average. Finally, ROGI of larvae with and without ectoparasites were compared by Mann-Whitney U test, as well as ROGI of larvae with 1 and 2 ectoparasite copepods.

Some authors have questioned the use of the residual analysis (García-Berthou 2001), so we proposed an alternative analysis to compare the larval condition between PL and UPL, in which both variables (sum of 5 outermost increment widths, excluding the last one, and largest radius of the sagitta otolith) were log transformed so that the variances would be independent of the mean. Later, a regression analysis was established for PL and independently for UPL so that finally both linear regressions were compared through a multiple slope test.

Results

Abundance of larval *Helcogrammoides chilensis* at El Quisco Bay ranged from 3.55 to 2344.44 individuals per 1000 m³ during austral spring, 2010 (mean $\pm$ standard deviation: 202.78 ± 440.38 individuals per 1000 m³, median: 81.01 individuals per 1000 m³). There were significant differences in larval abundance among cruises (Kruskal-Wallis test, $H = 15.11$, $P < 0.001$, Table I), with the largest abundance found during the second sampling (median = 231.37 individuals per 1000 m³). Prevalence of ectoparasites ranged from 2.7% to 20.8%, with the lowest prevalence detected during the second sampling (Table I). The number of ectoparasites found for larval *H. chilensis* ranged from 1 to 4, always attached to the ventral side of the gut, irrespective of the size of the larvae (Figure 1a, b).

Ectoparasites correspond to the chalimus stages (I to IV, having a frontal filament, Figure 2a, b) of the family Pennellidae, which are characterised by a proboscis (= buccal cone, Figure 2c). The first two pairs of legs are biramous while the third and fourth are uniramous (Figure 2d).

Otolith size estimators showed significant relationships with body size (Figure 3, Table II), indicating that somatic growth of the unparasitized (UPL) and parasitized (PL) larvae is reflected by the growth of the sagitta otoliths. There were no significant differences in the relationship between otolith radius and body length for UPL and PL groups (multiple slope test, $|t| = 1.93$, $P > 0.05$) nor between perimeter and body length ($|t| = 2.04$, $P > 0.05$). However, the otolith area of UPL grew faster as a function of the body length than otoliths of PL ($|t| = 1.735$, $P < 0.001$).

Age estimations made on the lecture of sagitta otoliths ranged from 2 to 57 days. During this period, linear regression models estimated larval growth rates of 0.19 mm d^{-1} for larval *H. chilensis* with ectoparasites and 0.21 mm d^{-1} for larvae without ectoparasites (Table III). However, there were no significant differences in the slope of the linear models (i.e., population larval growth rate) (multiple slope test, $|t| = 0.35$; $P < 0.05$) (Figure 4a). A linear model for both groups of data was adjusted (total in Table III), and the residual analyses indicate that residuals of PL were mostly negative (-0.096 ± 0.426), showing that larval *H. chilensis* with ectoparasites were shorter than predicted by the model. This trend was noticeably observed when comparisons were made between estimated larval volume ($\text{BL} \times (\text{LH})^2$) and age (Figure 4b) of UPL and PL. Although slopes of the models were similar (i.e., they grow at the same rate), intercept of the PL was smaller than for UPL (Table III), meaning that at the same age, PL were smaller in volume than UPL.

There was a significant relationship between the outermost 5 microincrements and sagitta radius ($n = 71$, $r^2 = 0.75$, $P < 0.01$) for all analysed larvae. Estimated ROGI values were significantly lower for PL compared to those of UPL (Mann-Whitney U test, $U = 308$, $P < 0.01$), showing a reduction in condition of parasitized larvae at least 5 days before capture. Accordingly, when the linear regressions of the logarithm of the outermost 5 microincrements and the logarithm of the radius between UPL (Figure 5a) and PL (Figure 5b) were compared, they showed a significant reduction in condition of PL (multiple slope test, $|t| = 3.83$, $P < 0.05$) (Table III). Finally, ROGI was similar for larval *H. chilensis* infested with one and two copepods (Mann-Whitney U test, $U = 164$, $P = 0.976$), meaning that a greater parasitic load did not trigger a heavier depression of larval recent growth and condition.

Discussion

Based on otolith microstructure, our study reveals the negative effect that the parasitism of chalimus pennellids cause on the recent growth and condition of larval triplefin *Helcogrammoides chilensis* in coastal waters of central Chile during the austral spring season.

Prevalence of ectoparasites was higher than measured in other fish larvae; for example, for larval anchoveta *Engraulis ringens*, prevalence ranged between 0.9 and 4.7% (Herrera 1990) and for larval anchovy *Anchoa* sp. prevalence was 3.6% (Felley et al. 1987). In larval *Pomacentrus moluccensis* prevalence was 4% and only digenea were observed (Grutter et al. 2010). This may be partially explained because demersal eggs might be more susceptible to predation than planktonic eggs, as the second are not associated with parental behaviour and have more superficial larvae by the time they hatch (Grutter et al. 2008). Despite this fact, it is interesting to note that parasitism by Pennellidae in adult fishes of *H. Chilensis* has not yet been observed (Muñoz and Delorme 2011); this could mean that these larvae are only intermediate and/or alternative hosts in the life cycle of pennellids.

Parasitized larvae showed a lower ROGI, implying that they are also in poorer condition (Grutter et al. 2010b). These differences in condition between PL and UPL groups may indicate a rapid response of individual larvae to parasitism, decreasing its instantaneous growth rates (i.e., during the past 5 days). This response is faster than that described for newly settled larvae of cardinal fish, which exhibited reduced growth within 10-15 days (Fogelman and Grutter 2008).

H. chilensis did not show more than 4 parasites in their ventral region. This fact is explained by Tucker et al. (2002), which suggest that parasitism intensity of a potential host

will be marked by the size of the available surface area of the host. Nevertheless, our data failed to demonstrate a significant difference in larval condition between larvae infested with one or two parasites. Similarly, Grutter et al. (2008) described that mortality rates did not vary significantly for different fishes exposed to 1 or 3 ectoparasites.

The larval stages of fishes are at great risk of parasitism and once they are infested, one of the consequences is the probability of direct mortality induced by parasites (Fogelman and Grutter 2008; Fogelman et al. 2009; Gutter et al. 2008; Grutter et al. 2010b). However, not all ectoparasites may directly cause lethal effects on fish larvae (Herrera 1990), but there are other sub-lethal effects or stresses generated in hosts (Felley *et al.* 1987), for example Rigby and Dufour (1996) propose an increased susceptibility to predation or a reduction in competitive fitness. These sub-lethal effects were reflected in a reduction of individual size of PL, 1.88% shorter than UPL, even though they grew at the same rate (*i.e.* similar slope). Similarly, newly settled larval *Apogon trimaculatus* infested with mancae of cymothoids grew at the same rate (similar slope), but were 9% shorter than uninfested individuals (Fogelman and Grutter 2008). For adult *Cheilodipterus quinquelineatus* infested with *Anilocra apogonae* the results were analogous, showing that infested fish were shorter and weighed less than unparasitised fish at the same age but, in both cases, growth rates did not vary among groups (Fogelman et al. 2009).

The consequences of attached ectoparasites on larvae include an increase in resistance within the viscous environment, which will affect their swimming ability. Once it is harder for larvae to swim, they have more difficulties escaping predators (Herrera 1990). The reduction in swimming ability is described by Grutter et al. (2008) for two fish species with *Gnathia* sp. attached, *Acanthochromis polyacanthus* and *Neopomacentrus azysron*, in which the fish

behaviour was altered and they had difficulty swimming or balancing and in some cases even became stationary at the bottom. Also, parasites by themselves increase larval visibility to predators (Herrera 1990).

All the consequences mentioned above cause greater energetic cost for the larvae, and retardation in their growth where both will indirectly affect their settlement and increase their PLD (Grutter et al. 2010b). In the extra time the larvae have to spend in the plankton, they are susceptible to predation and have difficulty foraging, jeopardizing their survival. In conclusion pennellids can indirectly affect survival rates of individual *Helcogrammoides chilensis* larvae.

Acknowledgements

Authors thank J. Contreras, C. Cortez, F. Salas-Berrios and R. Finke for their field work onboard RV Ilan, and M. Palacios and C. Fuentes for their constant support. Also we thank R. Castro (Universidad de Antofagasta) for his help in the identification of the ectoparasite and S. Goyen for her assistance with the revision of the english manuscript. This research was funded by Fondecyt 1100424 adjudicated to FPO, GP and MFL. Drawings were made by C. Cortez.

References

- Aguilera B, Catalán IA, Palomera I, Olivar MP (2009) Otolith growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) larvae fed with constant or varying food levels. *Sci Mar* 73:173–182. doi: 10.3989/scimar.2009.73n1173.
- Berrios V, Vargas M (2004) Estructura trófica de la asociación de peces intermareales de la costa rocosa del norte de Chile. *Rev Biol Trop* 52(1):201-212.

- Boyle KS, Horn MH (2006) Comparison of feeding guild structure and ecomorphology of intertidal fish assemblages from central California and central Chile. *Mar Ecol Prog Ser* 319:65-84. doi: [10.3354/meps319065](https://doi.org/10.3354/meps319065)
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *J Parasitol* 83(4):575-583
- Cancino C, Farías K, Lampas S, González B, Cuevas V (2010) Descripción de los complejos estructurales óseos en *Helcogrammoides chilensis* (Blennioidei: Tripterygiidae) de la zona central de Chile. *Rev Biol Mar* 45(1):671-682. doi: 10.4067/S0718-19572010000400011
- Coustau C, Renaud F, Delay B, Robbins I, Mathieu M (1991) Mechanisms involved in parasitic castration: *In vitro* effects of the trematode *Proserhynchus squamatus* on the gametogenesis and the nutrient storage metabolism of the marine bivalve mollusc *Mytilus edulis*. *Exp Parasitol* 73(1):36-43. doi: 10.1016/0014-4894(91)90005-H
- Castro R, Baeza H (1986) Premetamorphosis stages of two Pennellids (Copepoda, Siphonostomatoida) from their definitive hosts. *Crustaceana* 50(2):166-175.
- Castro R, Baeza H (1989) Characters for the pennellid taxonomy based on *Peniculus*, *Metapeniculus*, *Lernaeenicus* and *Lernaeocera* specimens revision with SEM. *Estud Oceanol* 8:21-45.
- Dower JF, Pepin P, Kim G-C (2009) Covariation in feeding success, size-at-age and growth in larval radiated shanny (*Ulvaria subbifurcata*): insights based on individuals. *J Plankton Res* 31:235-247. doi: 10.1093/plankt/fbn118

- Felley SM, Vecchione M, Hare SGF (1987) Incidence of ectoparasitic copepods on ichthyoplankton. *Copeia* 1987:778–782.
- Fogelman RM, Grutter AS (2008) Mancae of the parasitic cymothoid isopod, *Anilocra apogonae*: early life history, host-specificity, and effect on growth and survival of preferred young cardinal fishes. *Coral Reefs* 27:685–693. doi:10.1007/s00338-008-0379-2.
- Fogelman RM, Kuris AM, Grutter AS (2009) Parasitic castration of a vertebrate: Effect of the cymothoid isopod, *Anilocra apogonae*, on the five-lined cardinalfish, *Cheilodipterus quinquelineatus*. *Int J Parasitol* 39:577–583. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.10.013
- Folkvord A, Rukan K, Johannessen A, Moksness E (1997) Early life history of herring larvae in contrasting feeding environments determined by otolith microstructure analysis. *J Fish Biol* 51(Suppl. A):250–263. doi: 10.1111/j.1095-8649.1997.tb06102.x.
- García-Berthou E (2001) On the misuse of residuals in ecology: testing regression residuals vs. the analysis of covariance. *J Anim Ecol* 70:708–711
- Grutter AS, Pickering JL, McCallum H, McCormick MI (2008) Impact of micropredatory gnathiid isopods on young coral reef fishes. *Coral Reefs* 27:655–661. doi.: 10.1007/s00338-008-0377-4
- Grutter AS, Cribb TH, McCallum H, Pickering JL, McCormick MI (2010a) Effects of parasites on larval and juvenile stages of the coral reef fish *Pomacentrus moluccensis*. *Coral Reefs* 29:31–40. doi: 10.1007/s00338-009-0561-1.

- Grutter AS, Crean AJ, Curtis LM, Kuris AM, Warner RR, McCormick MI (2010b) Indirect effects of an ectoparasite reduce successful establishment of a damselfish at settlement. *Funct Ecol* 25(3): 586-594. doi: 10.1111/j.1365-2435.2010.01798.x
- Heath M, Nicoll N (1991) Infection of larval herring by helminth parasites in the North Sea and the effect on feeding incidence. *Cont Shelf Res* 11:1477–1489. doi: 10.1016/0278-4343(91)90022-X.
- Hernández-Miranda E, Palma AT, Ojeda FP (2003) Larval fish assemblages in nearshore coastal waters off central Chile: temporal and spatial patterns. *Estuar, Coast Shelf Science* 56:1075–1092. doi: 10.1016/S0272-7714(2)00308-6
- Herrera G (1990) Incidence of larval anchovy, *Engraulis ringens*, parasitized by caligid developmental stages. *Bull Mar Science* 47:571–575.
- Ho J-S (2000) The major problem of cage aquaculture in Asia relating to sea lice. *Proceedings of the First International Symposium on cage Aquaculture in Asia*, pp. 13-19.
- Hovenkamp F, Witte IJ (1991) Growth, otolith growth and RNA/DNA ratios of larval plaice *Pleuronectes platessa* in the North Sea 1987 and 1989. *Mar Ecol Progr Ser* 70:105–116. doi: [10.3354/meps070105](https://doi.org/10.3354/meps070105)
- Jones CM, Grutter AS (2008) Reef-based micropredators reduce the growth of post-settlement damselfish in captivity. *Coral Reefs* 27:677–684. doi: 10.1007/s00338-008-0383-6.
- Kohn Y, Clements K (2011) Pelagic larval duration and population connectivity in New Zealand triplefin fishes (Tripterygiidae). *Environ Biol Fishes* 91(3):275-286. doi 10.1007/s10641-011-9777-3

- Landaeta MF, Castro LR (2006) Larval distribution and growth of the rockfish, *Sebastes capensis* (Sebastidae, Pisces), in the fjords of southern Chile. ICES J Mar Sci 63:714–724. doi: 10.1016/j.icesjms.2006.01.002.
- Landaeta MF, Veas R, Letelier J, Castro LR (2008) Larval fish assemblages off central Chile upwelling ecosystem. Rev Biol Mar 43:569–584. doi: 10.4067/s0718-19572008000300016.
- Landaeta MF, López G, Suárez-Donoso N, Bustos CA, Balbontín F (2011) Larval fish distribution, growth and feeding in Patagonian fjords: potential effects of freshwater discharge. doi: 10.1007/s10641-011-9891-2.
- Pino-Marambio, J, Mordue AJ, Birkett M, Carvajal J, Asencio, G, Mellado A, Quiroz A (2007) Behavioural studies of host, non-host and mate location by the sea louse, *Caligus rogercresseyi* Boxshall & Bravo, 2000 (Copepoda: Caligidae). Aquacult 271:70-76.
- Mladineo I (2003) Life cycle of *Ceratothoa oestroides*, a cymothoid isopod parasite from sea bass *Dicentrarchus labrax* and sea bream *Sparus aurata*. Dis Aquat Org 57:97–101.
- Muñoz AA, Ojeda FP (1998) Guild structure of carnivorous intertidal fishes of the Chilean coast: implications of ontogenetic dietary shifts. Oecología 114:563-573. doi: [10.1007/s004420050481](https://doi.org/10.1007/s004420050481)
- Muñoz G, Delorme N (2011) Variaciones temporales de las comunidades de parásitos en peces intermareales de Chile central: hospedadores residentes vs temporales. Rev Biol Mar 46(3):313-327.
- Neilson JD, Perry RI, Scott JS, Valerio P (1987) Interactions of caligid ectoparasites and juvenile gadids on Georges Bank. Mar Ecol Progr Ser 39:221–232.

- Oozeki Y, Watanabe Y (2000) Comparison of somatic growth and otolith increment growth in laboratory-reared larvae of Pacific saury, *Cololabis saira*, under different temperature conditions. Mar Biol 136:349–359. doi: 10.1007/s002270050693.
- Paperno R, Targett TE, Greco PA (1997) Daily growth increments in otoliths of juvenile weakfish, *Cynoscion regalis*: experimental assessment of changes in increment width with changes in feeding rate, growth rate, and condition factor. Fish Bull 95:521–529.
- Pequeño G (1989) Peces de Chile. Lista sistemática revisada y comentada. Rev Biol Mar 24(2):1-132.
- Pérez R (1979) Postembryonic development of *Tripterygion chilensis* Cancino, 1955, in Valparaíso bay (Tripterygiidae: Perciformes). Rev Biol Mar 16:319–329.
- Rico A, Peralta R, López-Gappa J (2010) Recruitment variation in subtidal macrofouling assemblages of a Patagonic harbour (Argentina, south-western Atlantic). J Mar Biol Assoc UK 90:437-443. doi: 10.1017/s0025315409990920.
- Rigby MC, Dufour V (1996) Parasites of coral reef fish recruits, *Epinephelus merra* (Serranidae), in French Polynesia. J Parasitol 82:405–408
- Rojas JM, Ojeda FP (2010) Spatial distribution of intertidal fishes: a pattern dependent on body size and predation risk? Environ Biol Fishes 87:175-185. doi: 10.1007/s10641-010-9578-0
- Uribe C, Folch H, Enríquez R, Morán G (2011) Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. Vet Med 56(10): 486-503.
- Zar JH (1999) Biostatistical analysis. Fourth edition. Prentice Hall, New Jersey, 663 p.

Tables

Table I. Summary of results for larval abundance of triplefin *Helcogrammoides chilensis* (mean, standard deviation or SD, median) and ectoparasite prevalence, obtained during three cruises carried out during austral spring 2010 off El Quisco Bay, central Chile.

Date	N° Larvae	Larval abundance (ind 1000 m ³)	Median	Prevalence (%)
		Mean ± SD		
2 September 2010	86	49.81 ± 24.10	43.83	14.24
9 September 2010	539	542.16 ± 750.46	231.37	2.67
4 October 2010	259	88.72 ± 88.17	77.36	20.80

Table II. Linear regression analysis of otolith size (radius, perimeter and area of the sagitta) as a function of body length (BL), for unparasitized (UPL) and parasitized (PL) larvae of *Helcogrammoides chilensis*. Intercept, slope, corresponding standard errors (SE), F and P values are shown.

	Intercept	SE	Slope	SE	F	P
Radius UPL vs BL	-21.02	3.9	7.78	0.48	268.32	<0.01
Radius PL vs BL	-21.43	4.34	7.78	0.49	248.68	<0.01
Perimeter UPL vs BL	-119.64	20.41	42.89	2.47	301.69	<0.01
Perimeter PL vs BL	-127.35	19.2	43.15	2.2	383.52	<0.01
Log area UPL vs BL	0.92	0.16	2.91	0.18	273.03	<0.01
Log area PL vs BL	0.95	0.17	2.87	0.18	249.91	<0.01

Table III. Linear regression analysis of larval size (body length, BL, and larval volume, LV) as a function of age (microincrement counts, MC), for unparasitized (UPL), parasitized (PL) and total larvae of *Helcogrammoides chilensis*. It is also shown, the linear regression analysis of the logarithm of the outermost 5 microincrements (OM) as a function of the logarithm of the otolith radius for unparasitized (UPL), parasitized (PL) *H. chilensis*. Intercept, slope, corresponding standard errors (SE), F and P values are shown.

	Intercept	SE	Slope	SE	F	P
BL vs MC (UPL)	5.91	0.12	0.21	0.08	648.09	<0.01
BL vs MC (PL)	5.98	0.1	0.19	0.05	987.99	<0.01
BL vs MC (Total)	5.93	0.08	0.20	0.05	1415.7	<0.01
Log LV vs Log MC (UPL)	0.34	0.03	0.83	0.04	545.23	<0.01
Log LV vs Log MC (PL)	0.28	0.04	0.80	0.04	433.44	<0.01
Log Radius vs Log 5 OM (UPL)	0.09	0.04	0.41	0.02	93.41	<0.01
Log Radius vs Log 5 OM (PL)	0.17	0.06	0.35	0.04	348.01	<0.01

Figure captions

Figure 1. Anterior portion of larvae of triplefin *Helcogrammoides chilensis* parasitized with Pennellidae in the ventral side of the gut. a) preflexion larvae of 6.3 mm BL with one ectoparasite; b) postflexion larvae of 10.1 mm BL with two ectoparasites.

Figure 2. a) Chalimus copepod of family Pennellidae; b) frontal filament for attachment; c) detail of antennae and antennules and the proboscis; d) abdominal appendages

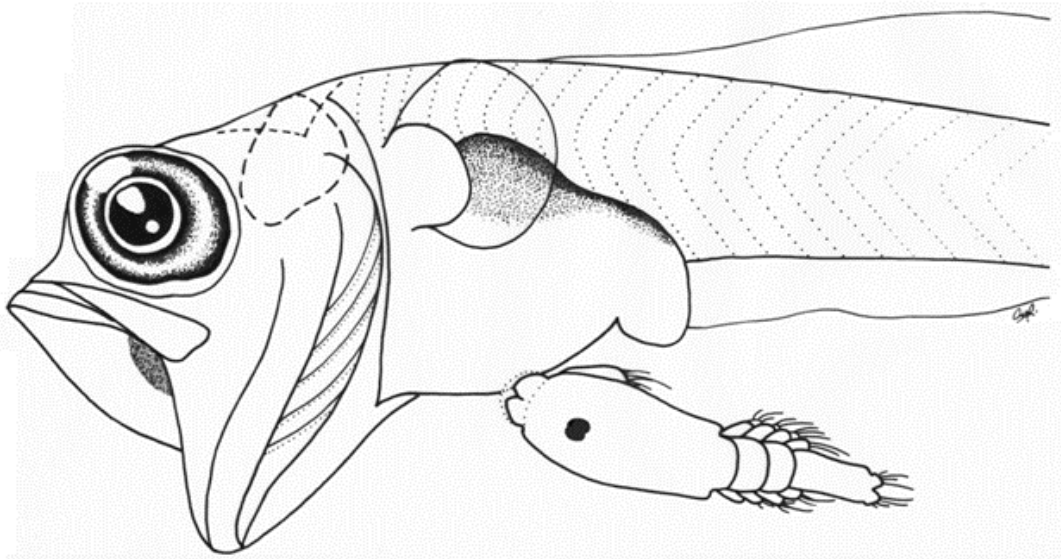
Figure 3. Relationships between otolith shape and larval size for unparasitized (UPL) and parasitized larvae (PL). a) Linear fit between sagitta radius and body length, b) linear fit between sagitta perimeter and body length and, c) exponential model for relationship between otolith area and larval length.

Figure 4. Larval growth of *Helcogrammoides chilensis* with caligid ectoparasites (PL, white squares) and without ectoparasites (UPL, black circles) in terms of a) body length (mm) and b) total volume (mm³).

Figure 5. Linear relationship between log-transformed data of sagitta radius and length of outermost 5 microincrements for a) unparasitized (white squares) and b) parasitized larvae (black circles).

Figure 6. Box and whiskers of ROGI values for a) unparasitized (UPL) and parasitized (PL) larvae of *Helcogrammoides chilensis* and b) for parasitized larvae with one (a) or two copepods (b). Median, quartiles, minimum and maximum values of ROGI are shown.

a



b

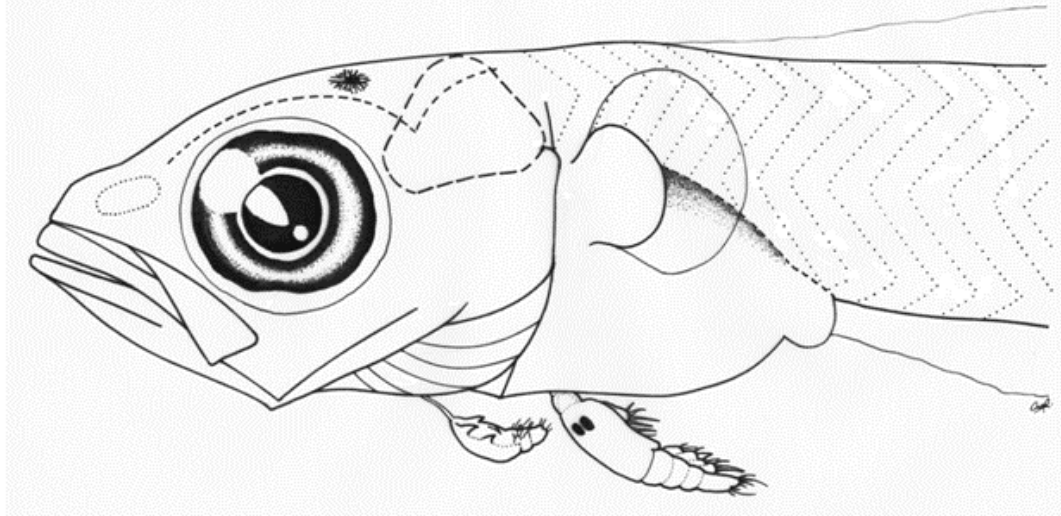
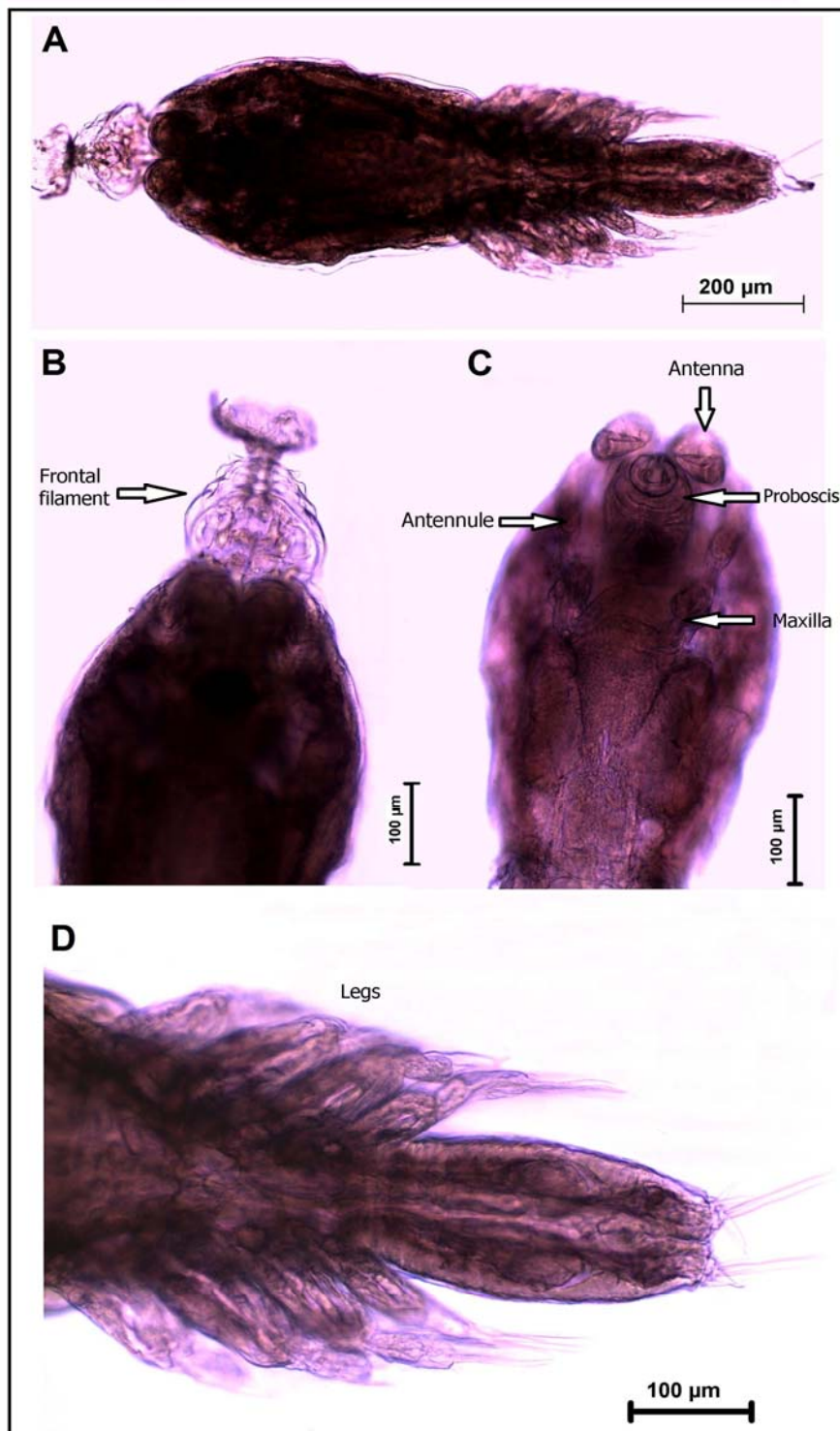


Figure 1



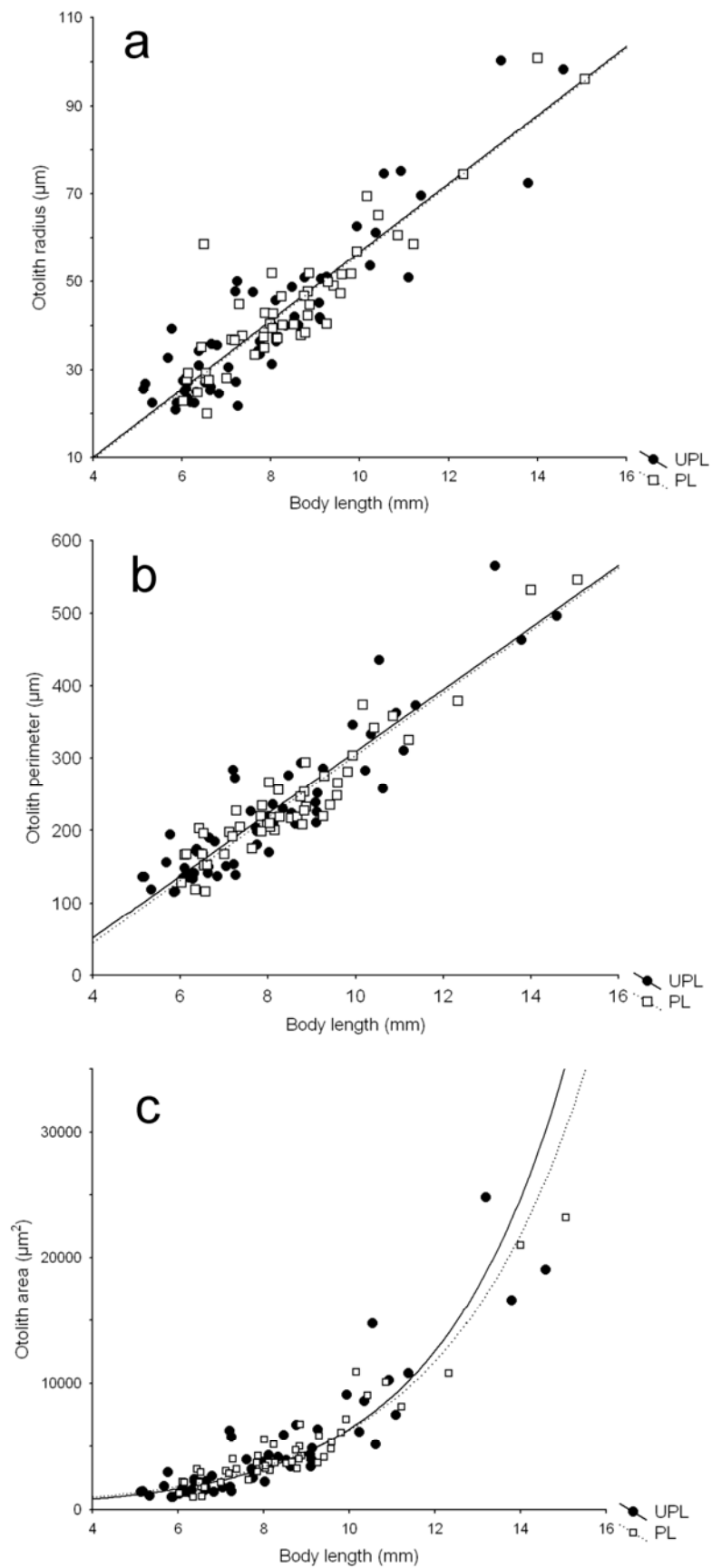


Figure 3

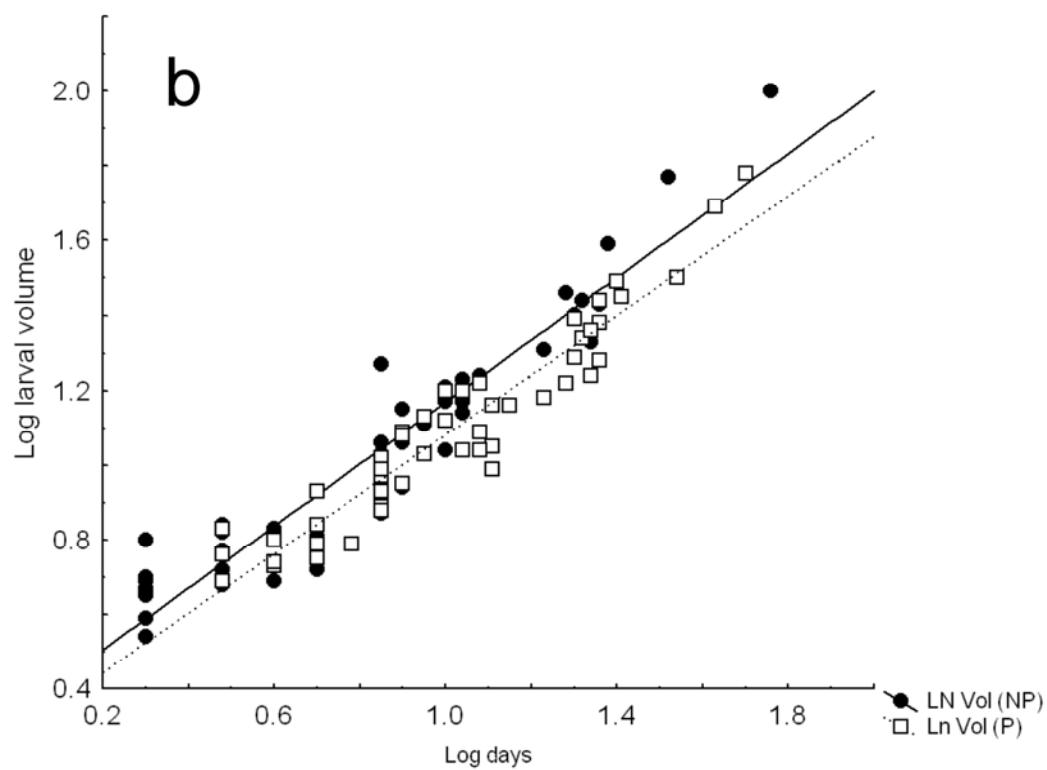
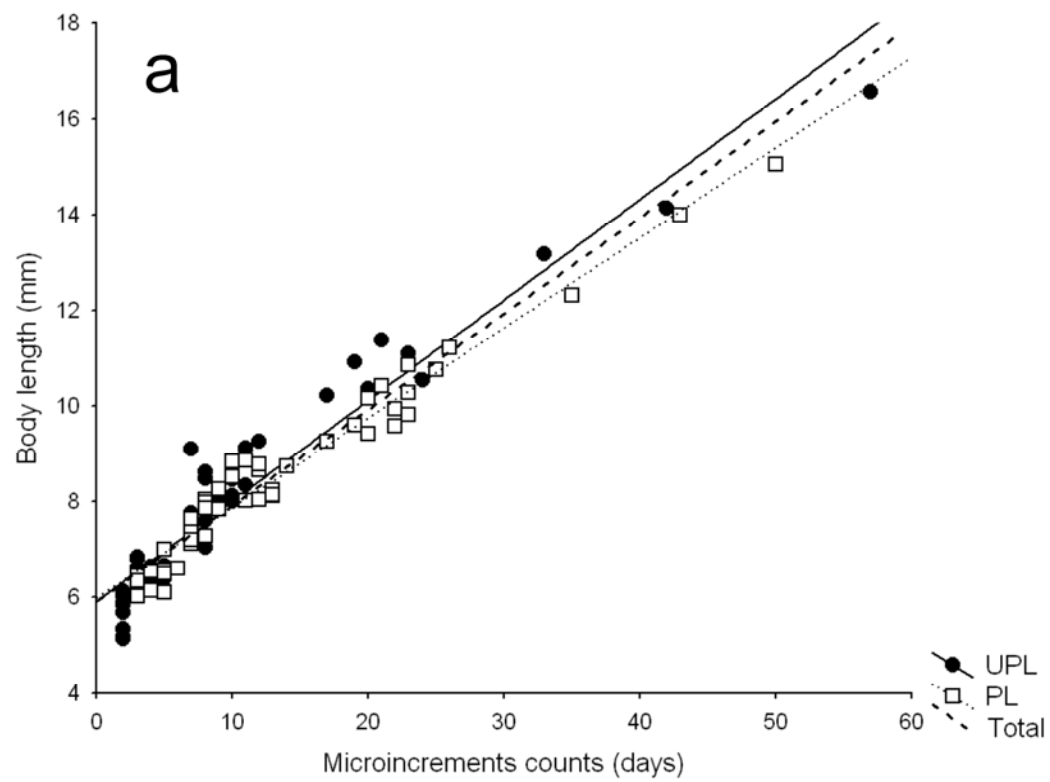


Figure 4

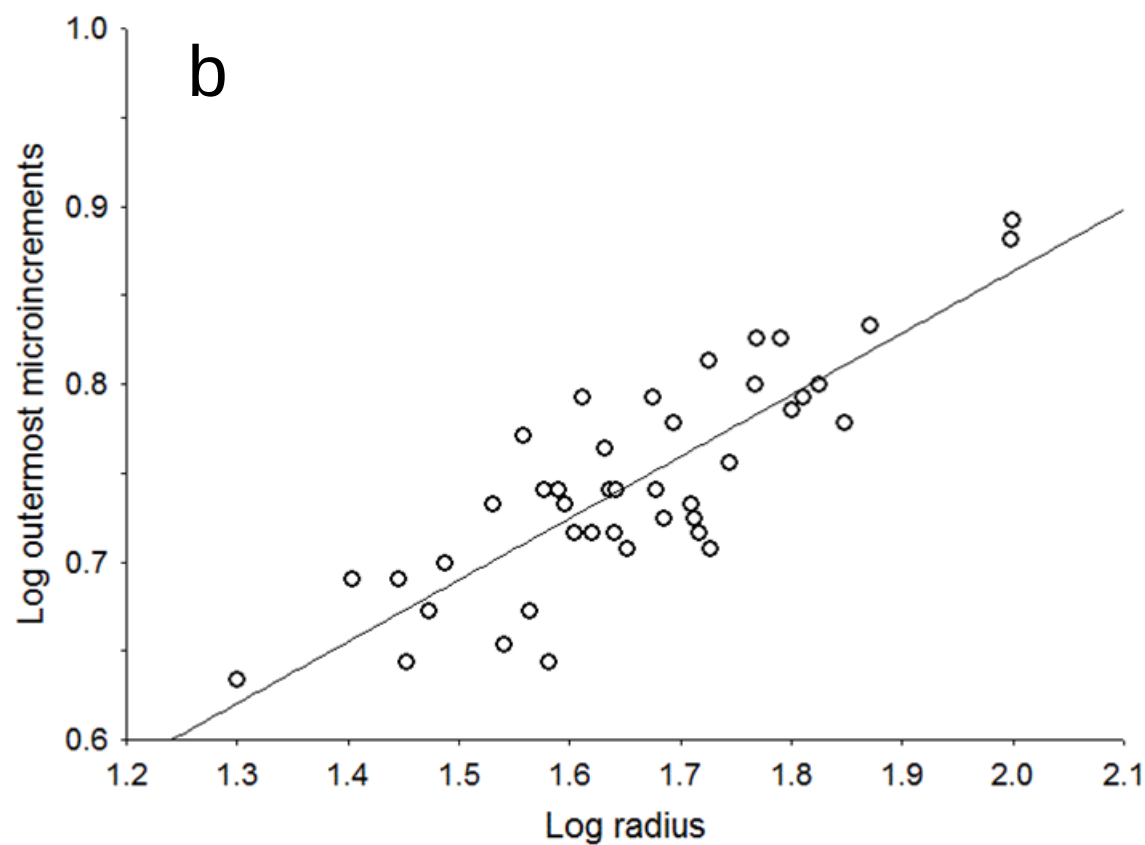
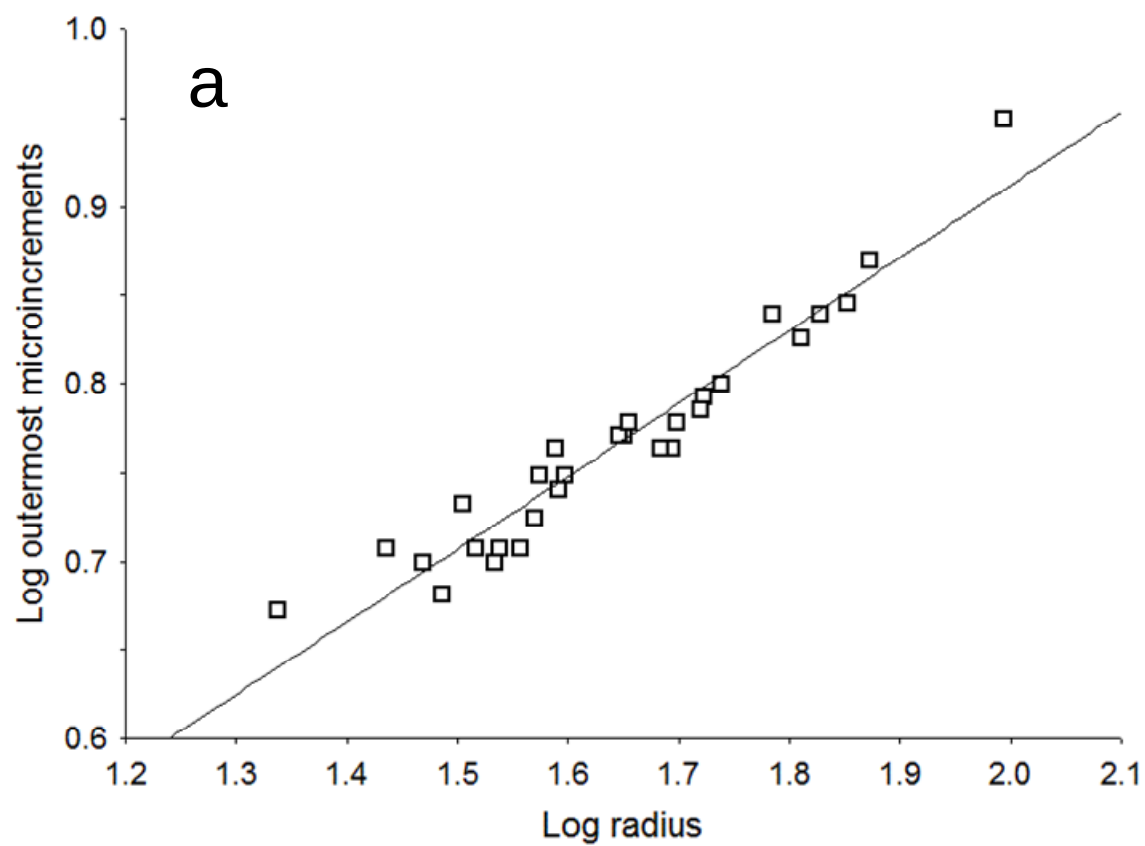


Figure 5

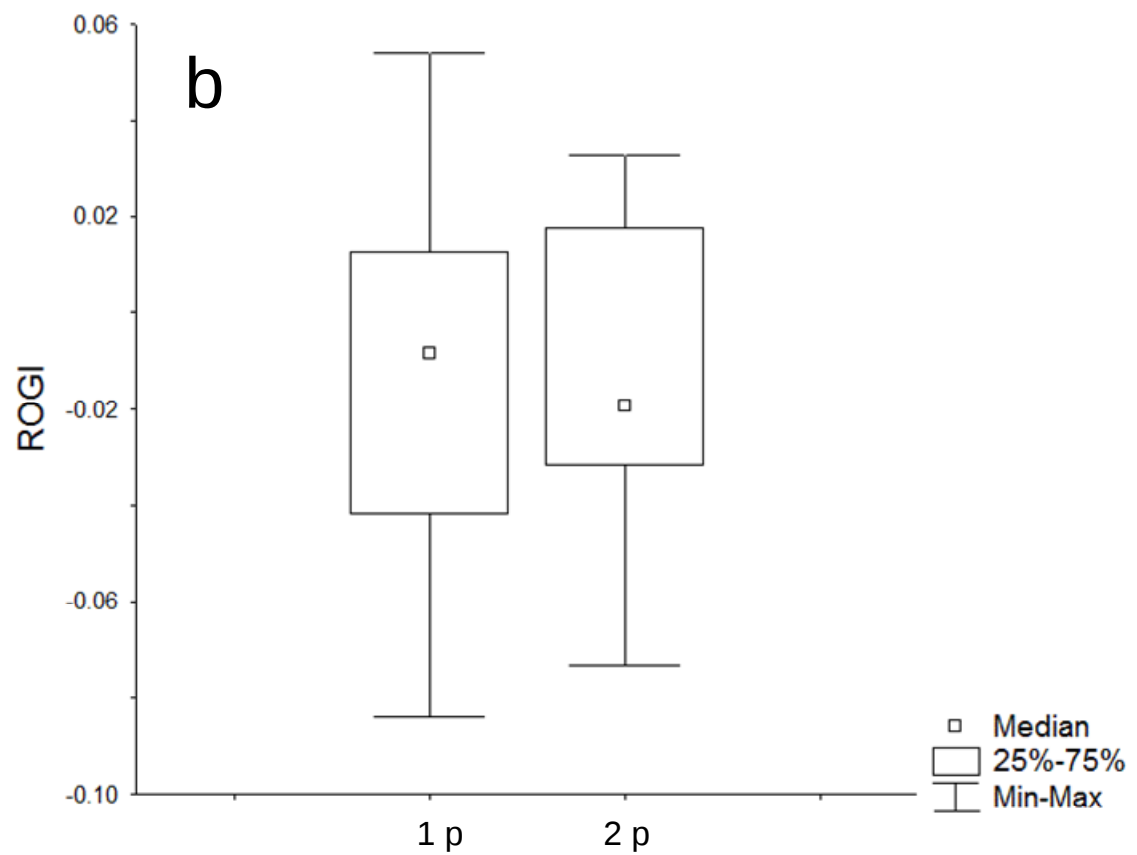
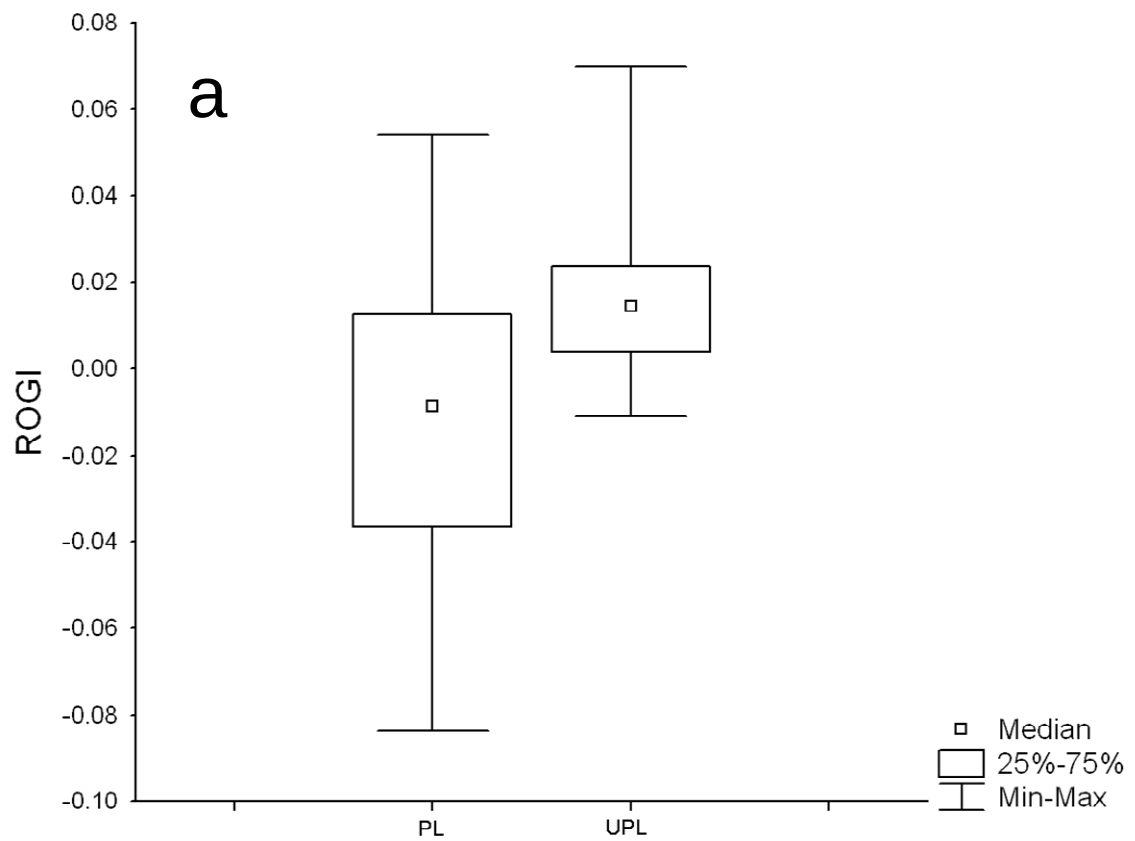


Figure 6

Faster growth associated with the new moon phase: A case in larval triplefin *Helcogrammoides chilensis* (Pisces: Tripterygiidae) from central Chile

Pámela Palacios-Fuentes¹, Mauricio F. Landaeta^{1,*}, Guido Plaza² and F. Patricio Ojeda³

1 Laboratorio de Ictioplancton (LABITI), Facultad de Ciencias del Mar y de Recursos Naturales, Universidad de Valparaíso, Avenida Borgoño 16344, Reñaca, Viña del Mar, Chile.

2 Escuela de Ciencias del Mar, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

3 Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

* To whom correspondence should be addressed. Email: mauricio.landaeta@uv.cl, Phone: +56-322507828, Fax: +56-322507859.

Running head: growth of larval *Helcogrammoides chilensis*

Abstract

A planktonic larval stage is part of a complex life cycle where for almost 90% of fishes this includes an adult associated to the benthos. In order to settle and recruit to the adult population, the individuals need to survive this larval stage using different tactics. The aim of this study is to determine hatching and larval growth patterns and the condition of triplefin *Helcogrammoides chilensis*, based on otolith microstructure. Fish larvae were collected during austral spring 2010 off central Chile and body length ranged from 2.88 to 25.67 mm (1 to 57 days old). The larval growth rate was estimated by a linear (0.15 mm day^{-1}) and a Gompertz model (0.16 mm day^{-1}), and did not vary among the three cruises conducted. Recent Otolith Growth Index (ROGI), based on the residual analysis of the relationship between increment width of the outermost 5 microincrements and otolith radius, did not vary among the three cruises, nor when the data was separated by development stage (pre or post-flexion). Preferably, hatching occurred in the new moon phase, although high frequencies were also observed in the first and third quarter moon phases, which reveals that this species presents a semi-lunar hatching pattern. Also, larvae hatched during the new moon showed faster growth trajectories (i.e. larger increases in microincrement widths) than larvae hatched during other lunar phases. Higher tides and the characteristic low luminosity of the new moon phase, may favour larval dispersion and also a higher survival rate as they are able to escape visual predators.

Keywords: Otolith, Semi-lunar hatching, ROGI, Growth trajectory, Gompertz

Introduction

Almost 90% of fishes have a complex life history, which includes a planktonic larva and an adult associated to the benthos (Vigliola and Meekan 2002). During the developmental period, larvae have to spend a long time in the water column before reaching a competent stage and in turn, settling. This concept is defined as Pelagic Larval Duration (PLD) (Kohn and Clements 2001).

The PLD is directly related to larval growth rates (Suthers 1998; Bergenius et al. 2005), as the growth process reveals the physiological interaction of the individuals with the physical and biological factors that influence larval growth rates directly or indirectly (Bergenius et al. 2005). For example, those larvae that present slower growth rates (*i.e.* slower growth) will spend more time in the pelagic environment, and by consequence will be more exposed to biological (*e.g.* predation, food availability) and environmental (*e.g.* currents, oceanographic barriers, temperature or salinity changes) factors which may affect survival and/or larval dispersion (Kohn and Clements 2011).

Larval condition is also a key factor in survival during early life stages. One of the main causes of mortality is found to be suboptimal feeding, which interrupts the microincrement formation affecting larval growth and becomes a turning point in the success of early development (Suthers 1998; Aguilera et al. 2009); therefore, the variability of larval condition in space and time, becomes a useful tool that evaluates the effect of environmental and stressful conditions on larvae (Suthers 1998).

Another important factor that influences early life survival, is the relationship established between spawning, hatching and settlement stages within tidal regimes and lunar

cycles. In this sense, some studies claim that species that spawn benthic eggs are related to semi-lunar spawning cycles (Roberson et al. 1990; Spoungle and Cowen 1994), and that those species that spawn planktonic eggs are related to monthly or asynchronous cycles (Spoungle and Cowen 1994). The fact that different marine species present reproductive activities associated with lunar cycles can be explained by various hypothesis, which focus primarily on offspring survival, that show the effect that environmental conditions, associated to lunar cycles, generate in reproductive success (Robertson et al. 1990).

Otolith microstructure analysis has become an important approach in understanding the early life stages of fishes, because they show how larval growth is altered by ecological and oceanographic factors, which can trigger variations in survival rates, larval transport mechanisms, dispersion dynamics and population connectivity, examples being recruitment, mortality, among others (Fey 2005, Gagliano and McCormick 2007a, Aguilera et al. 2009, Spoungle 2010).

The life history that is recorded on the fishes' otolith reveals the entire process that occurs between recently hatched larvae and their settlement (Vigliola and Meekan 2002); consequently, daily microincrements and hatch marks recorded on the otoliths can determine the age of individuals, which make it possible to backcalculate hatching dates. Such information provides us with new and interesting points of view related to the influence of spawning and hatching patterns, larval growth rates and the benthic stage, settlement and survival rates (Hovenkamp and Witte 1991; Raventós and Macpherson 2001; Vigliola and Meekan 2002; Aguilera et al. 2009; Spoungle 2010).

Tripterygiids, commonly known as triplefins as their dorsal fin is divided in three segments (Nelson 2006), are a family of 163 species from 29 genera (Kohn and Clements

2011) that are found worldwide in tropical, temperate and polar regions (Nelson 2006). In Chile, 3 species have been described however only from the genus *Helcogrammoides*, *Helcogrammoides chilensis* (Cancino 1960), *H. cunninghami* (Smitt, 1898) and *H. antarcticus* (Tomo 1981) (Cancino et al. 2010). In particular, with great relevance to this study, *H. chilensis* distributes between Iquique (20°18'S) and Talcahuano (36°45'S), inhabiting shallow waters along exposed rocky Chilean coasts (Williams and Springer 2001, Cancino et al. 2010).

The reproduction and development of tripterygiids is characterized by the spawning of benthic eggs in a single layer in the subtidal zone, attached by filaments to the rocky substrate. During this period, males guard and protect the territory and the eggs, as well as providing oxygenated water while cleaning them of detritus, until a 3-6 mm long planktonic larva hatches from the egg, with pigmented eyes, a small yolk sac and an open mouth (Ruck 1973, 1980). However, for *Helcogrammoides chilensis* there is no previous information about hatching patterns or larval ecology.

Three different questions will be assessed in this study:

- 1) How is *H. chilensis*' larval growth rate affected over time? Three different hypotheses are plausible to answer this question: larval growth rate increases, it decreases or it maintains stable over the study period.
- 2) Is *H. chilensis*' larval condition altered over time? The condition may increase, decrease or maintain stable over the study period.
- 3) Does *H. chilensis* show a hatching pattern related to the lunar cycle? *H. chilensis* hatching patterns may present a uniform distribution (*i.e.* hatching throughout the lunar month), it may

present a semi-lunar pattern (*i.e.* hatching during two lunar phases) or it may present a lunar pattern (*i.e.* hatching during one established lunar phase).

Materials and methods

Field work

Three oceanographic samplings were carried out during September and October 2010, on-board the RV Ilán from Pontificia Universidad Católica de Chile. Hydrographic data were obtained by vertical tows using a conductivity-temperature-depth profiler (Seabird SBE-19 CTD) from surface to near bottom depth (~20 m) during dawn and nighttime (1900 to 2300 h), at 1 nautical mile off El Quisco Bay (33°24'S, 71°43'W). Ichthyoplankton samples were collected using a Bongo net (60 cm mouth diameter, 300 µm mesh size) equipped with two TSK flow meters to quantify the water filtered. Between 5 to 8 tows at 1-2 knots were done during each oceanographic sampling in the same location. Filtered seawater by net ranged from 34.1 to 316.4 m³ (mean ± one standard deviation: 201.5 ± 76.5 m³). All plankton samples ($n = 38$) were initially fixed with 5% formalin, buffered with sodium borate and after 12 h they were preserved in 96% ethanol.

Laboratory analysis

In the laboratory, all fish larvae were sorted from the plankton samples. Identification of larval *Helcogrammoides chilensis* was carried out utilizing characteristics described by Ciechomski (1977) and Pérez (1979). Larval densities were expressed as individuals × 1000 m⁻³

³. Developmental stages of all larvae were classified as preflexion or postflexion (flexion and postflexion larvae pooled together). In addition, the body length (BL) of undamaged larvae ($n = 847$) was measured (notochord length, NL or standard length, SL) to the nearest 0.01 mm under a stereomicroscope Olympus SZ-61 with a video camera Moticam 2500 (5.0MPixel) connected to a PC with Moticam Image Plus 2.0 software. Larvae measurements were not corrected for shrinkage.

Left and right sagitta and lapilli otoliths were removed using insect needles from 189 larval *H. chilensis* (3.11–16.57 mm SL). Otoliths were embedded in epoxy resin on a glass slide. Age was determined by counting the number of daily otolith increments after a dark increment (the hatch mark) with a light microscope Motic BA310 at 1,000× magnification under oil immersion. A hatch mark formed on the first day after hatching was not validated for *H. chilensis*. However, a similar hatch mark has been described in recently hatched larvae of *Forsterygion nigripenne* (Kohn and Clements 2011). The longest radius of the sagitta was measured three times and the average was utilized, as well as the microincrement widths, using Moticam Image Plus 2.0 software.

Three independent readings were made however only on each sagitta; lapilli were difficult to read. Where increment counts between three readings were within 5% of each other, mode (or average, if all counts were different) was calculated and utilized for analysis. If readings varied >5% of each other, the otolith was discarded. Sagittae are considered ideal because we found that age estimates using the left and right sagittae within individuals were the same (Wilcoxon sign test, $P = 0.71$). Recently, the daily periodicity of growth increments for *H. chilensis* have been validated (Lidia Mansur, Pontificia Universidad Católica de Chile, pers.

comm.), as well as for other tripterygiids (*Forsterygion capito*, *F. varium*, *Ruanoho whero*, Kohn and Clements 2011).

Data analysis

Least square linear regression analyses were performed between microincrement counts (age) and larval length separately for each cruise, where the slope corresponds to the population growth rate, and the intercept to the estimated hatch size. To compare temporal variability in the population growth rate, slopes were compared with the multiple slope test (Zar 1999). Additionally, to estimate instantaneous growth rates, a Laird-Gompertz growth model was fitted as:

$$BL_t = BL_{\infty} \exp(-k \exp(-gt))$$

Where BL_t is BL (mm) at age t (days), BL_{∞} is the asymptotic length; g is the instantaneous rate of growth when $t = t_0$; k is a dimensionless parameter, such that kg is the instantaneous growth rate when $t = 0$, and t_0 is the time at which the (absolute) growth rate starts to decrease, that is, the inflection point of the curve (Ricker 1979).

Increment widths cannot be compared directly (Hovenkamp and Witte 1991). When increments which were formed at different radii are compared, the increment at the largest radius will on average be wider. To estimate a recent otolith growth index (ROGI), residuals of the relationship between the sum of the widths of the last five more recent increments and the radius of the otolith were calculated. The rationale for residual analysis is that since a residual is a measure of an individual's departure from the population, it can be viewed as an indicator of condition (Aguilera et al. 2009). According to this relationship, when increment width is

larger than expected, the residuals of the regression will be positive, which means that otolith growth has been above average. When the increment is smaller than expected, the residuals will be negative, which means that otolith growth has been below average. Both variables (sum of 5 outer increment widths, excluding the last one, and largest radius of the sagitta otolith) were log transformed so that the variances would be independent of the mean. This method has been successfully utilized to establish variability in the condition of fish larvae exposed to different environmental (salinity) conditions (Landaeta et al. 2012).

The hatching date composition of all measured larvae was estimated as follows. First, a larval length-at-age was obtained for the entire period of sampling, by using a global linear model. The length frequency distribution of larvae was then converted to an age-frequency distribution using the length-at-age key, from which the hatching dates composition was back-calculated.

Back-calculated hatching dates were related to the lunar cycle. For each sampling date, we counted the days since new moon (DNM) and thereby assigned DNM values from 0 to 29 to each date, where 0 represents the new moon. DNM values were converted to angles ($^{\circ}$) by dividing by 29 (the length, in days, of the lunar cycle) and then multiplying by 360° so that the data could be analysed using circular statistics. To assess whether hatching events showed lunar periodicity, we analysed data using Rao's spacing test (Batschelet 1981). Rao's spacing test is more powerful and robust than many other circular goodness-of-fit-tests (Russell and Levitin 1995), and is able to analyse bimodal and multimodal distributions, whereas other tests, such as the Rayleigh test and Watson's U^2 are not (Bergin 1991). Rao's spacing test is robust even for small sample sizes, but also shows a low frequency of type I errors when analysing data that shows no pattern. The only cases where Rao's spacing test fails are distributions that show

directional avoidance (Bergin 1991). We also used the Rayleigh test for departure from randomness. The null hypothesis that hatching events would be equally or randomly spaced throughout the lunar cycle was tested for each data set and overall. Angular mean and 95% confidence intervals were also calculated separately for larvae captured during the three cruises.

Finally, to test if individual larval growth trajectories (i.e., microincrement widths) are influenced by the timing of hatching within different lunar phases, the rate of increase in the microincrement widths of selected larvae hatched during the four lunar phases were compared, by using the multiple slope test (Zar 1999).

Results

Abundance and larval size distribution

A total of 847 larval *Helcogrammoides chilensis* were analysed having been collected during all three cruises (Table 1). Larval abundance at El Quisco Bay during September-October 2010 ranged between 3.55 and 2344.44 ind, 1000 m⁻³ at each sampling station (mean $\pm$ standard deviation: 202.78 ± 440.38 ind 1000 m⁻³). Total abundance during each sampling date ranged from 502.30 to 5288.95 1000 m⁻³ (Table 1). Significant differences were detected in larval abundance among cruises (Kruskal-Wallis test, $H = 15.11$, $P < 0.001$). Larval size varied from 2.88 to 25.67 mm (6.45 ± 2.45 mm), and differed significantly among cruises (Kruskal-Wallis test, $H = 291.84$, $P < 0.01$; Table 1), where larvae from the second cruise were the smallest of the samplings (Tukey test, $P < 0.01$, Fig. 1).

Otolith microstructure, age and growth of larvae

A total of 189 pairs of sagitta (left and right) were read and measured under the microscope. Sagitta microincrement widths ranged between 0.60 and 2.01 μm ($1.28 \pm 0.24 \mu\text{m}$). The hatch mark observed in sagitta otoliths of larval *H. chilensis* collected in September-October 2010 (Fig. 2) ranged from 10.11 to 16.90 μm ($13.94 \pm 1.31 \mu\text{m}$) measured from the core. Sagitta radius ranged from 14.76 to 100.90 μm ($32.47 \pm 14.29 \mu\text{m}$).

Microincrement counts (i.e., age) ranged from 1 to 57 days for all cruises. Linear models estimated population growth rates between 0.145 and 0.156 mm day^{-1} and hatch sizes from 5.39 to 6.23 mm BL (Table 2). However, there were no significant differences in the growth rates (i.e., slopes) among samples (multiple slope test, $F = 0.84$, $P < 0.05$); therefore, the global model was adjusted utilizing larval *H. chilensis* collected from all samples (Table 2). The parameters of the Gompertz model for all larvae were estimated to be $\text{BL}_{\infty} = 16.59 \text{ mm}$, $k = 1.19$ and $g = 0.036 \text{ mm day}^{-1}$. The predicted relationship between length and age for both models (linear and Gompertz) is given in Fig. 3a. The predicted instantaneous growth rate from the Gompertz model indicated the fastest increases in BL from hatch until 5-7 days post-hatching, when the growth rate reached its maximum (0.22 mm day^{-1}), after which larval *H. chilensis* underwent a steady decrease in the rate of growth in BL (Fig. 3b). The average of all instantaneous growth rates was $0.16 \pm 0.05 \text{ mm day}^{-1}$.

Temporal variation in the recent otolith growth index (ROGI)

Larval condition was analysed separately for each sample and by developmental stage (pre- and postflexion larvae). In general, ROGI values ranged from -0.178 (poor condition

during the last 5 days prior to capture) to 0.103 (good condition). In the scale of weeks, there was larger variability in the condition of preflexion larvae compared to postflexion larvae (Fig. 4a,b). No significant differences, however, were detected among samples, for preflexion larvae (Kruskal-Wallis test, $H = 6.22$, $P = 0.45$) nor for postflexion larvae (Kruskal-Wallis test, $H = 5.01$, $P = 0.82$).

Hatching patterns and lunar periodicity

The raw record of *Helcogrammoides chilensis* hatchings at El Quisco Bay over 2.4 months was simultaneously cyclic and episodic (Fig. 5). The record started July 23 (day 204) and finished October 3 (day 276). Some peaks were of much larger magnitude than others, but the overall timing of the peaks was semi-lunar (Fig. 5). Putting all back-calculated hatching data together, a large pulse of hatching during the new moon was noted (Fig. 6). Larvae captured during the first sampling hatched mostly near the 3rd quarter moon (mean angle vector = 21 d, 90% confidence = 19.03-22.99 d); during the second sampling, larvae hatched during new moon (mean angle vector = 28 d, 90% confidence = 27.03-28.29 d); finally, in the last cruise, the majority of the hatching occurred near the 1st quarter moon (mean angle vector = 9 d, 90% confidence = 7.56-10.28 d) (Fig. 6). Rayleigh and Rao's spacing tests evidenced that hatching patterns of larval *H. chilensis* were not uniform over the lunar cycle (Table 3).

Larval growth trajectories and lunar phases

The larval otolith-growth trajectories of fish differed according to when fish were hatched. There was high variation in the otolith growth trajectories among hatching lunar

phases (Fig. 7): fish hatched during the new moon tended to have higher larval growth rates ($0.014 \mu\text{m microincrement}^{-1}$) than fish hatched during other lunar phases (Table 4, multiple slope test, $F = 96.05$, $P < 0.001$).

Discussion

Larval triplefin, *Helcogrammoides chilensis* showed a high variability in its body length and age; however, the estimated larval growth rates did not vary among the three cruises during austral spring, showing relatively slow growth rates (between $0.15\text{-}0.16 \text{ mm day}^{-1}$). Similarly, larval condition, measured through the ROGI index did not vary among the three cruises, or when the data were separated by the development stage (pre or post-flexion). Hatching occurred preferably in the new moon phase (day 28), although a high frequency was also observed in the first and third quarter moon phases, which reveals that this species presents a semi-lunar hatching pattern. Finally, the growth trajectories (i.e., microincrement width) of those individuals hatched in the new moon phase were faster ($0.014 \mu\text{m microincrement}^{-1}$) than the individuals hatched in different moon phases.

The smallest *H. chilensis* larva observed in the study presented pigmented eyes, a small yolk sac and was 2.88 mm long. This larva was smaller than the one found by Pérez (1979) for the same species in Valparaíso Bay (4.81 mm), and is smaller compared to other species from the same family: *Forsterygion capito* 4.90 mm (Ruck 1973), *F. varium* 5.85 mm (Ruck 1980), *Ruanoho decemdigitatus* 5.03 mm (Ruck 1980) and *Blennius tripennis* 5.72 mm (Ruck 1980), although similar values were found in Argentina for *H. cunninghami* that presented a range from 3 to 27 mm (Ciechomski 1977).

Helcogrammoides chilensis showed slow population growth rates estimated with both models, a slower growth rate than those calculated for juveniles from the same species (0.18 mm día⁻¹, Plaza et al. in review). Similarly, some other species from Chilean waters with pelagic larvae show slow growth rates such as the mote sculpin *Normanichthys crockeri* (0.15-0.20 mm day⁻¹, Landaeta et al. 2010), rockfish *Sebastes oculatus* (0.15 mm day⁻¹, Landaeta and Castro 2006) and lightfish *Maurolicus parvipinnis*, (0.136 mm day⁻¹, Landaeta et al. 2012). These differ completely from species with faster growth such as anchovy *Engraulis ringens* (0.47 mm day⁻¹, Hernández and Castro 2000), herring *Sardinops sagax* (0.40-0.66 mm day⁻¹, Castillo et al. 1985) and the Falkland sprat *Sprattus fuegensis* (0.448 mm day⁻¹, Landaeta et al. 2012).

Through this study, the oldest larva found was 57 days old; this reflects that the PLD for this species is high, at least 2 months. This value is similar to those registered for other species from the Tripterygiidae family in New Zealand: *Forsterygion varium* (65 ± 2.32 days), *F. capito* (74.33 ± 2.48 days), *Ruanoho whero* (63.92 ± 1.71 days) (Kohn and Clements 2011) and *F. lapillum* (≈50 days) (Smith and Shima 2011). Given the fact that these species were studied in high latitude zones (coastal waters of New Zealand), exactly like *H. chilensis* this results in a higher PLD for this species compared with other tripterygiids studied in tropical zones with higher water temperatures (e.g. Mediterranean sea), which present shorter PLDs, such as *Trypterygion tripteronotus* (17 ± 1.4 days) (Raventós and Macpherson 2001). This situation occurs because there is a negative correlation between temperature and PLD (Raventós and Mcpherson 2001, Kohn and Clements 2011).

The ROGI analysis has an excellent potential as a growth index because it can estimate recent growth rates and it can indicate if the larval condition has increased or decreased

according to feeding or environmental processes in the water column (Fey 2005, Aguilera et al. 2009). Landaeta et al. (2012) studied the ROGI index for *M. parvipinnis* and *S. fuegensis* in Chilean Patagonia, and the ROGI of the first species was positively correlated with salinity where a significant and linear relationship was found between the two variables; but the ROGI analysis from the second species was not related to water salinity and the linear regression analysis showed that the slope did not differ from zero. This fact demonstrates that ROGI analysis is not necessarily suitable for every species and in this case, it could not reflect individual larval condition because the results could be disguised by high length variability or a short study period. Additionally, this technique is more reliable when the microincrements measure at least from 3 to 6 μm (Suthers 1998); this may be a reason why no significant differences were found between samples, because in every case the maximum microincrement value was 2 μm .

There are four potential explanations for the lack of significant differences in the hatch length, growth rates and larval condition during the study period (between September and October 2010).

The first alternative may reveal the presence of homogeneity in early life stage dynamics in the zone and study period. This implies that *H. chilensis* hatching batches maintain stable growth, even though changes in environmental conditions may occur in the study period. Alternatively, it can also reveal that none of the performed analysis are sensitive enough to detect the high heterogeneity presented among samples.

A second alternative includes a lack of variability in the egg depositions, since there were no differences between hatching lengths on a weekly scale. This could indicate that for the short period utilized and in the study zone, a significant parental effect could influence

variability in growth rates or ROGI is not found. But, as evidence suggests in other studies for different species (e.g. *Pomacentrus amboinensis* Gagliano and McCormick 2007b, *Engraulis ringens* Llanos-Rivera and Castro 2004, *Merluccius gayi* Landaeta and Castro 2012), there is a significant size and quality reduction in the eggs as the reproductive season progresses. Given this information, this study cannot conclude that there will not be a parental effect in the long term.

Thirdly, some physical factors related to biological factors may affect growth directly or indirectly in different species, even on an ontogenetic level (Bergenius et al. 2005). But, as Fey (2005) reveals in a study made with larva and juveniles of herring (*Clupea* sp.), feeding conditions have to be extreme to produce a change in growth rates, and also observed is a retardation of a few days in the deposition of “thinner” microincrements due to poor feeding conditions (Suthers 1998, Fey 2005, Aguilera et al. 2009). Growth rates are influenced by temperature (Hovenkamp 1990, Spounagle 2010), and similarly ROGI is affected by photoperiod, temperature and feeding levels (Aguileta et al. 2009) and salinity (Landaeta et al. 2012). As any significant differences in growth rate and larval condition was detected in the study period (only four weeks), it can be inferred that during this period there was no great environmental variations that could trigger a change in growth rates or larval condition.

The last alternative is related to population regulatory mechanisms. It is common in species which present benthic eggs and planktonic larvae, for larval supply (input to the population) to be highly variable and for there to be density-independent factors regulating the output of the population (Lecchini et al. 2006). There is a lack of evidence when considering density-dependent factors (such as competition) regulating the *H. chilensis* population in the zone and time of study, but there might be some density-independent factors (such as parasite

load) that can generate differences in the growth rates of organisms coupled with the parasites cycle. This could explain the lack of differences in growth rates at a population level between samples, and the presence of individual differences between parasitized larva and non-parasitized larva (Palacios-Fuentes et al. in review).

Higher growth rates imply some advantages for the species with such tactics as a reduced PLD (Bergenius et al. 2005), higher settlement rates (Spounagle 2010), and higher survivorship after settlement (Gagliano and McCormick 2007a) and higher recruitment rates (Spounagle 2010). So, given that *Helcogrammoides chilensis* has a slow growth rate, it has to find another alternative that can guarantee offspring survival. In this sense, there is another density-independent factor that might be giving an advantage to the species, which is related to the association between reproductive processes and lunar or semi-lunar hatching patterns (Christy 2003).

These types of reproductive cycles are found in a lot of different species including sponges, corals, mollusks, polychaetes, crabs, echinoids (Spounagle and Pinkard 2004), fishes (Mizushima et al. 2000), amphibians, birds and mammals (Grant et al. 2009). Periodicity in moon-related cues appears to be related to changes in the intensity of moonlight, time of moonrise, the solar cycle and the movement pattern of the moon across the night sky (Leatherland et al. 1992). All these changes provide a set of environmental cues that assure transportation, foraging and reproduction in favourable environmental conditions (deBruyn & Meeuwig 2001, Takemura et al. 2010). In addition, it is likely that fishes are aware of gravitational (tidal) and geophysical forces that occur as a result of the changing position of the earth relative to the moon and sun.

Synchrony of larval release with a semi-lunar cycle is related to a better defence of the broods in colonial nesting species (such as *Helcogrammoides chilensis*), with a consequent reduction in mortality rates, and a decrease in the cost of parental care of offspring (Robertson et al. 1990).

H. chilensis exhibits a semi-lunar pattern, with a hatching maximum in the new moon phase. According to Robertson et al. (1990), this situation would favour larval dispersion given the higher tides that characterize the new moon phase. Warranting consideration is that the new moon phase is related to low luminosity, which provides a higher probability for the recently hatched larvae to escape from their predators, increasing their survival rates. This situation is correlated with the lack of significant hatching in the full moon phase, because high luminosity makes the recently hatched larvae evident to the predators.

Hatching not only in the new moon phase, but also in the first and third quarter moon, indicates that *H. chilensis* hatching pattern is temporarily spaced, which reduces competition for the recently hatched larvae in the water column, as not all larvae hatch at the same time, therefore reducing the probability of mortality from starvation (Robertson et al. 1990).

Increment widths measured in larval *H. chilensis* were similar to those increments close to the nucleus measured in otoliths of juvenile triplefins from New Zealand, described as very fine (between 0.5 and 2 μm) and dark (Kohn and Clements 2011). The microincrement trajectories were higher for those individuals that hatched in a new moon phase; this reveals a higher individual growth rate compared to those hatched in different phases.

There is a lack of information on the reproductive biology and early life history of *H. chilensis*, therefore it is important to continue studies of this type to fully comprehend the

dynamics of the population and estimate the larval supply that is settling and finally recruiting to the adult population.

Acknowledgements

Authors want to thank to Jorge Contreras, María José Ochoa-Muñoz, Franco Salas-Berrios and Dr. Randy Finke for their field work onboard RV Ilan, and Dr. (c) Lidia Mansur for comments and support. This research was funded by a FONDECYT grant n° 1100424, to FPO, GP and MFL.

References

- Aguilera B, Catalán IA, Palomera I, Olivar MP (2009) Otolith growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) larvae fed with constant or varying food levels. *Sci Mar* 73:173-182. doi: 10.3989/scimar.2009.73n1173
- Batschelet E (1981) Circular statistics in biology. Academic Press, New York
- Bergenius MAJ, McCormick MI, Meekan MG, Robertson DR (2005) Environmental influences on larval duration, growth and magnitude of settlement of a coral reef fish. *Mar Biol* 147: 291-300
- Bergin TM (1991) A comparison of goodness-of-fit tests for analysis of nest orientation in western kingbirds (*Tyrannus verticalis*). *Condor* 93:164-171

- Cancino C, Farías K, Lampas S, González B, Cuevas V (2010) Descripción de los complejos estructurales óseos en *Helcogrammoides chilensis* (Blennioidei: Tripterygiidae) de la zona central de Chile. Rev Biol Mar 45: 671-682
- Castillo G, Aguilera E, Herrera G, Bernal PA, Butler JL, Chong J, González H, Oyarzún C, Veloso C (1985) Larval Growth rates of the pacific sardine *Sardinops sagax* off central Chile, determined by daily ring counts in otoliths. Biol Pesq 14: 3-10.
- Christy JH (2003) Reproductive timing and larval dispersal of intertidal crabs: the predator avoidance hypothesis. Rev Chil Hist Nat 76: 177-185.
- Ciechomski JD (1977) Características y distribución de postlarvas del acorazado, *Agonopsis chiloensis* (Jenyns, 1842) Jordan y Evermann, 1898 y de *Tripterygion cunninghami* Smitt, 1898 en aguas del Atlántico frente a la Argentina (Pisces). Physis A 84:309-317
- deBruyn AMH, Meeuwig JJ (2011) Detecting lunar cycles in marine ecology: periodic regression versus categorical ANOVA. Mar Ecol Prog Ser 214: 307-310. doi:10.3354/meps214307
- Fey DP (2005) Is the marginal otolith increment width a reliable recent growth index for larval and juvenile herring? J Fish Biol 66: 1962-1703. doi: 10.1111/j.1095-8649.2005.00716.x
- Gagliano M, McCormick MI (2007a) Compensating in the wild: is flexible growth the key to early juvenile survival? Oikos 116: 111-120. Doi: 10.1111/j.2006.0030-1299.15418.x
- Gagliano M, McCormick MI (2007b) Maternal condition influences phenotypic selection of offspring. J Anim Ecol 76:174-182

- Grant RA, Chadwick EA, Halliday T (2009) The lunar cycle: a cue for amphibian reproductive phenology? *Anim Behav* 78: 349-357. doi: 10.1016/j.anbehav.2009.05.007
- Hernández EH, Castro LR (2000) Larval growth of the anchoveta *Engraulis ringens* during the winter spawning season off central Chile. *Fish Bull* 98: 704-710
- Hovenkamp F (1990) Growth differences in larval plaice *Pleuronectes platessa* in the Southern Bight of the North Sea as indicates by otolith increments and RNA/DNA. *Mar Ecol Prog Ser* 58: 205-215.
- Hovenkamp F, Witte JIJ (1991) Growth, otolith growth and RNA/DNA ratios of larval plaice *Pleuronectes platessa* in the North Sea 1987 and 1989. *Mar Ecol Prog Ser* 70:105-116
- Kohn YY, Clements KD (2011) Pelagic larval duration and population connectivity in New Zealand triplefin fishes (Tripterygiidae). *Environ Biol Fish* 91:275-286. doi: 10.1007/s10641-011-9777-3
- Landaeta MF, Castro LR (2006) Larval distribution and growth of the rockfish, *Sebastes capensis* (Sebastidae, Pisces), in the fjords of southern Chile. *ICES J Mar Science* 63: 714-724. doi: 10.1016/j.icesjms.2006.01.002
- Landaeta MF, Castro LR (2012) Seasonal and annual variation in Chilean hake *Merluccius gayi* spawning locations and egg size off central Chile. *Prog Oceanogr* 92-95:166-177. doi: 10.1016/j.pocean.2011.07.002
- Landaeta MF, Inostroza PA, Ramírez A, Soto-Mendoza S, Castro LR (2010) Distribution patterns, larval growth and hatch dates of early stages of the mote sculpin *Normanichthys*

- crockery* (Scorpaeniformes, Normanichthyidae) in the upwelling ecosystem off central Chile. *Rev Biol Mar Oceanogr* 45(1): 575-588
- Landaeta MF, López G, Suárez-Donoso N, Bustos CA, Balbontín F (2012) Larval fish distribution, growth and feeding in Patagonian fjords: potential effects of freshwater discharge. *Environ Biol Fish* 93:73-87. doi: 10.1007/s10641-011-9891-2
- Leatherland JF, Farbridge KJ, Boujard T (1992) Lunar and semi-lunar rhythms in fishes. In: Ali MA (ed) *Rhythms in fishes*, Plenum Press, New York, pp 83-107
- Lecchini D, Nakamura Y, Grignon J, Tsuchiya M (2006) Evidence of density-independent mortality in a settling coral reef damselfish, *Chromis viridis*. *Ichthyological Research* 52:298-300. doi: 10.1007/s10228-006-0340-8
- Llanos-Rivera A, Castro LR (2004) Latitudinal and seasonal egg-size variation of the anchoveta (*Engraulis ringens*) off the Chilean coast. *Fish Bull* 102(1): 207-212
- Mizushima N, Nakashima Y, Kuwamura T (2000) Semilunar spawning cycle of the humbug damselfish *Dascyllus aruanus*. *J Ethol* 18:105-108. doi: 10.1007/s101640070008
- Nelson JS (2006) *Fishes of the World*. John Wiley and Sons, New Jersey
- Pérez R (1979) Desarrollo postembrionario de *Triptyerygion chilensis* Cancino 1955, en la Bahía de Valparaíso (Triptyerygiidae: Perciformes). *Rev Biol Mar* 16:319-329
- Palacios-Fuentes P, Landaeta MF, Muñoz G, Plaza G, Ojeda FP (in review) Effects of a parasitic copepod on the larval recent growth of a coastal rocky fish. *J Fish Biol*.

- Plaza G, Landaeta MF, Espinoza V, Ojeda P (in review) Daily growth patterns of young-of-year of six species of Chilean intertidal fishes. J Mar Biol Assoc U K.
- Raventós N, Macpherson E (2001) Planktonic larval duration and settlement marks on the otoliths of Mediterranean littoral fishes. Mar Biol 138: 1115-1120. doi: 10.1007/s002270000535
- Ricker WE (1979) Growth rates and models. In: Hoar WS, Randall DJ, Brett JR (eds) Fish Physiology VIII Bioenergetics and growth, Academic Press, New York, pp 677-743
- Robertson DR, Petersen CW, Brawn JD (1990) Lunar reproductive cycles of benthic-brooding reef fish: reflections of larval biology or adult biology? Ecol Monogr 60:311-329.
- Ruck JG (1973) Development of *Tripterygion capito* and *T. robustum* (Pisces: Tripterygiidae). Zool Publ Vic Univ Wellingt 63: 1-10
- Ruck JG (1980) Early development of *Forsterygion varium*, *Gilloblennius decemdigitatus*, and *G. tripennis* (Pisces: Tripterygiidae). N Z J Mar Freshw Res 14: 313-326. doi: 10.1080/00288330.1980.9515874
- Russell GS, Levitin DJ (1995) An expanded table of probability values for Rao's spacing test. Commun Statist Simula 24:879-888
- Sponaugle S (2010) Otolith microstructure reveals ecological and oceanographic processes important to ecosystem-based management. Environ Biol Fishes 89: 221-238. doi: 10.1007/s10641-010-9676-z

- Sponaugle S, Cowen RK (1994) Larval durations and recruitment patterns of two Caribbean gobies (Gobiidae): contrasting early life histories in demersal spawners. *Mar Biol* 120:133-143. doi: 10.1007/BF00381949
- Sponaugle S, Pinkard D (2004) Lunar cyclic population replenishment of a coral reef fish: shifting patterns following oceanic events. *Mar Ecol Prog Ser* 267:267-280
- Suthers IM (1998) Bigger? Fatter? Or is faster growth better? Considerations on condition in larval and juvenile coral-reef fish. *Aust J Ecol* 23: 265-273
- Takemura A, Rahman MS, Park YJ (2010) External and internal controls of lunar-related reproductive rhythms in fishes. *J Fish Biol* 76:7-26. doi: 10.1111/j.1095-8649.2009.02481.x
- Vigliola L, Meekan MG (2002) Size at hatching and planktonic growth determine post-settlement survivorship of a coral reef fish. *Oecol* 131: 89-93.
- Williams JT, Springer VG (2001) Review of the South American Antarctic triplefin fish genus *Helcogrammoides* (Perciformes: Tripterygiidae). *Rev Biol Trop* 49 Suppl. 1:117-123
- Zar JH (1999) Biostatistical analysis. Prentice Hall, New Jersey

Tables

Table 1. Temporal variations in the number of larval *Helcogrammoides chilensis*, abundance (ind 1000 m⁻³) and size (length, mm). SD = one standard deviation.

Sampling date	<i>N</i>	Total abundance (ind 1000 m ⁻³)	Size range (mm)	Mean size ± SD
2 September 2010	88	502.30	3.04 - 25.67	7.25 ± 3.56
9 September 2010	518	5288.95	2.88 - 19.86	5.41 ± 1.65
4 October 2010	241	1168.78	3.11 - 16.68	8.39 ± 2.09

Table 2. Least square linear models of population growth of larval *Helcogrammoides chilensis* for each sampling cruise and for all seasons (global model). The intercept corresponds to the hatch size (mm) and the slope to the growth rate (mm day⁻¹) estimated for the models. SE = one standard error.

	Intercept	SE	Slope	SE	F	<i>P</i>
2 September 2010	5.435	0.332	0.145	0.016	86.48	<0.01
9 September 2010	5.396	0.160	0.156	0.008	347.84	<0.01
4 October 2010	6.230	0.206	0.147	0.010	213.79	<0.01
Global model	5.684	0.126	0.152	0.006	594.09	<0.01

Table 3. Rayleigh and Rao's spacing tests for the distribution of back-calculated hatching events over the lunar month for *Helcogrammoides chilensis*.

Sampling	Rayleigh R	<i>P</i>	Rao's U	<i>P</i>
2 September 2010	0.385	< 0.001	248	< 0.001
9 September 2010	0.849	< 0.001	518	< 0.001
4 October 2010	0.362	< 0.001	312	< 0.001
Global model	0.519	< 0.001	347	< 0.001

Table 4. Least square linear models of larval trajectories according to the lunar phase. The intercept corresponds to the initial microincrement width (μm) and the slope to the microincrement increase rate ($\mu\text{m microincrement}^{-1}$) estimated for the models. SE = one standard error.

	Intercept	SE	Slope	SE	F	<i>P</i>
New moon	1.04	0.037	0.015	0.0015	91.67	<0.01
Full moon	0.98	0.025	0.012	0.0009	174.96	<0.01
1st quarter moon	1.14	0.026	0.010	0.0011	87,56	<0.01
3rd quarter moon	1.12	0.032	0.009	0.0011	60.05	<0.01

Figure captions

Figure 1. Size distribution frequency histograms for the three oceanographic samplings carried out in 2010: a) September 2nd, b) September 9th and c) October 4th.

Figure 2. *Helcogrammoides chilensis* otolith microstructure: a) Larval lapillus and b) Larval sagitta. N: Nucleus, HM: Hatch mark, MI: microincrements. The segmented line corresponds to the measure from the nucleus to the hatch mark and the continuous line to the width of the 5 marginal microincrements.

Figure 3. a) Larval growth of *Helcogrammoides chilensis*; the continuous line corresponds to the growth according to the linear model and the segmented line, to the growth according to the Gompertz model. b) Instant growth rates based on age, according to the Gompertz model.

Figure 4. ROGI values of *H. chilensis* from the 3 samples according to their development stage: a) pre-flexion and b) post-flexion. Median, quartiles, minimum and maximum values of ROGI are shown.

Figure 5. Distribution of hatching abundances of *H. chilensis* throughout the year. Filled circles represent new moon and open circles, full moon.

Figure 6. Distribution of hatching over the lunar cycle for a) all sampled larvae, b) larvae sampled on September 2nd, c) on September 9th and d) on October 4th . The perpendicular line corresponds to the angular media and the horizontal line, to the 95% confidence interval.

Figure 7. Larval otolith growth trajectories for a) individuals hatched in full or new moon and b) hatched in first or third quarter moon.

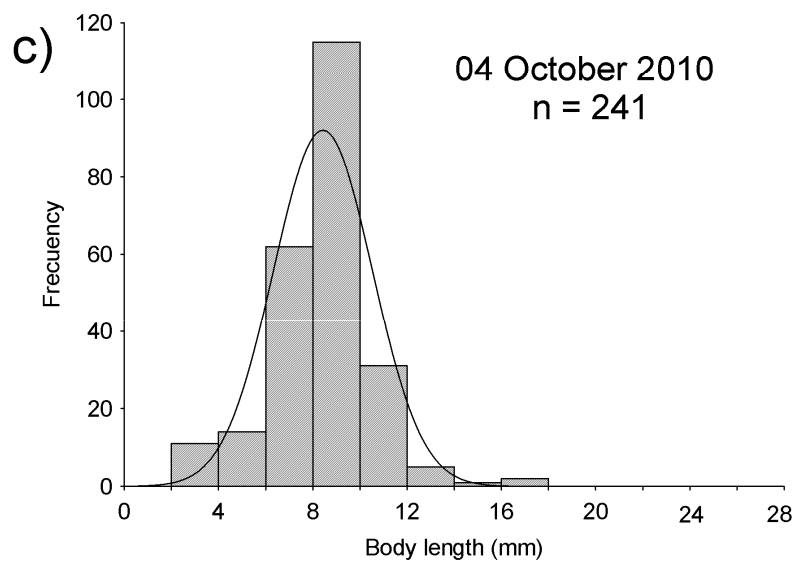
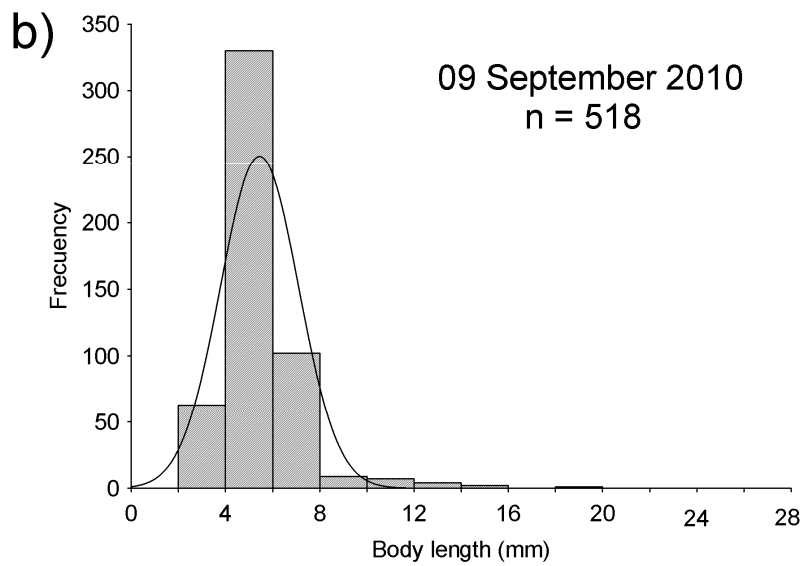
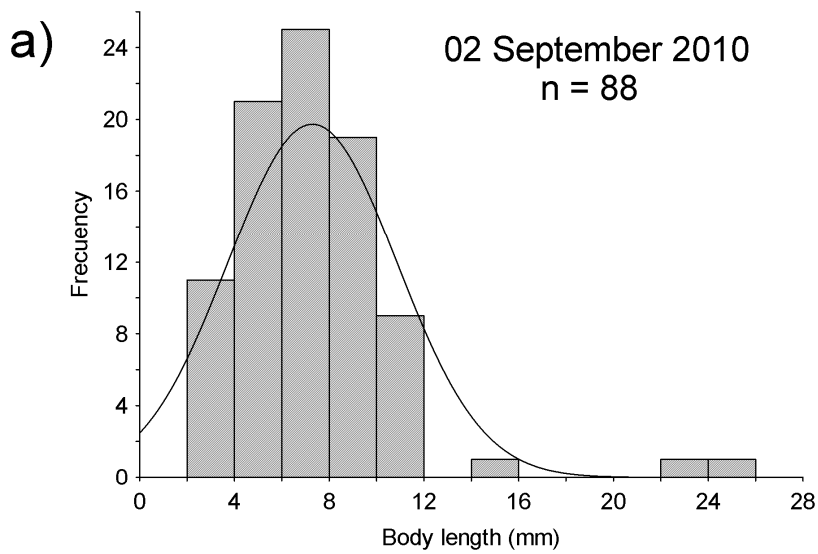


Figure 1

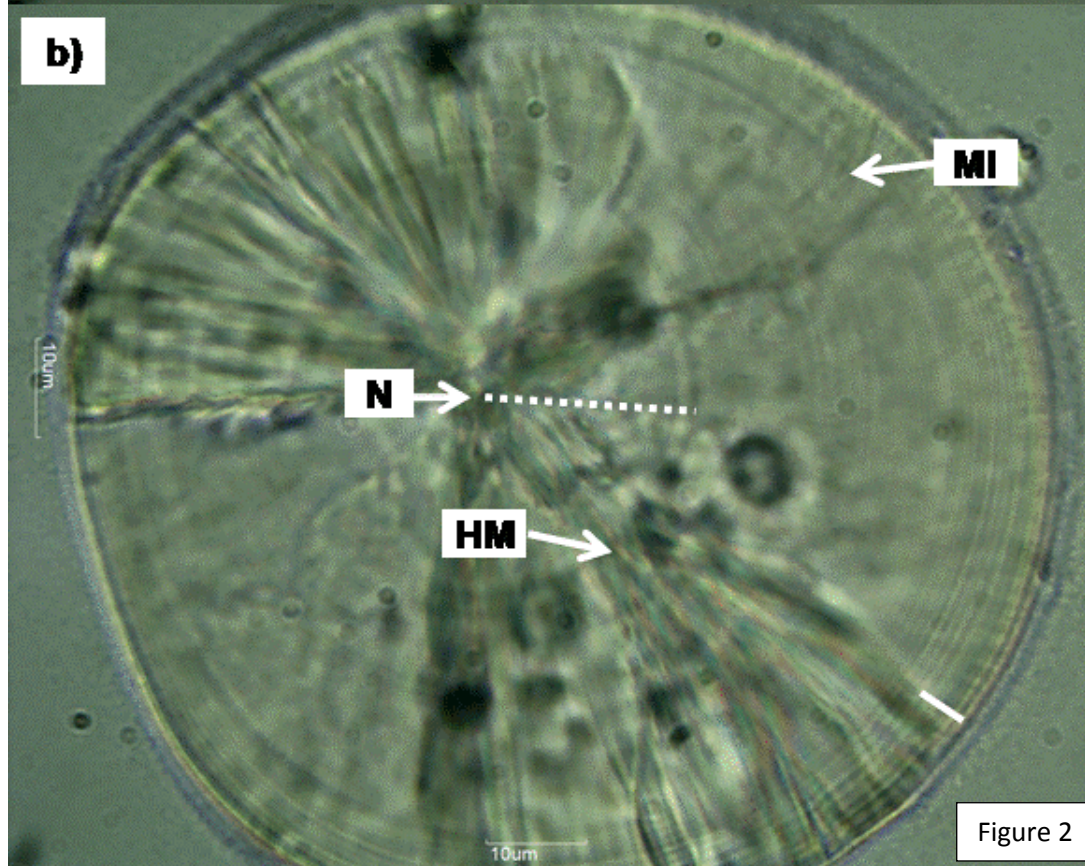
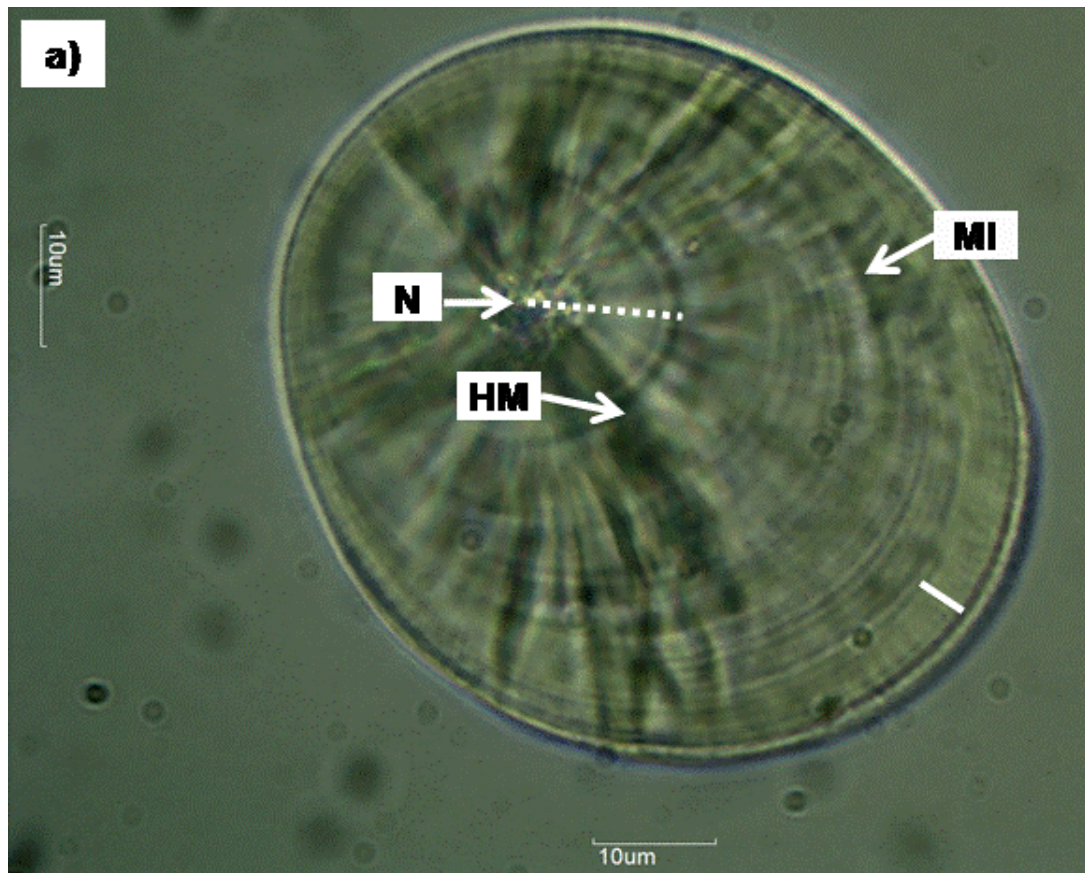


Figure 2

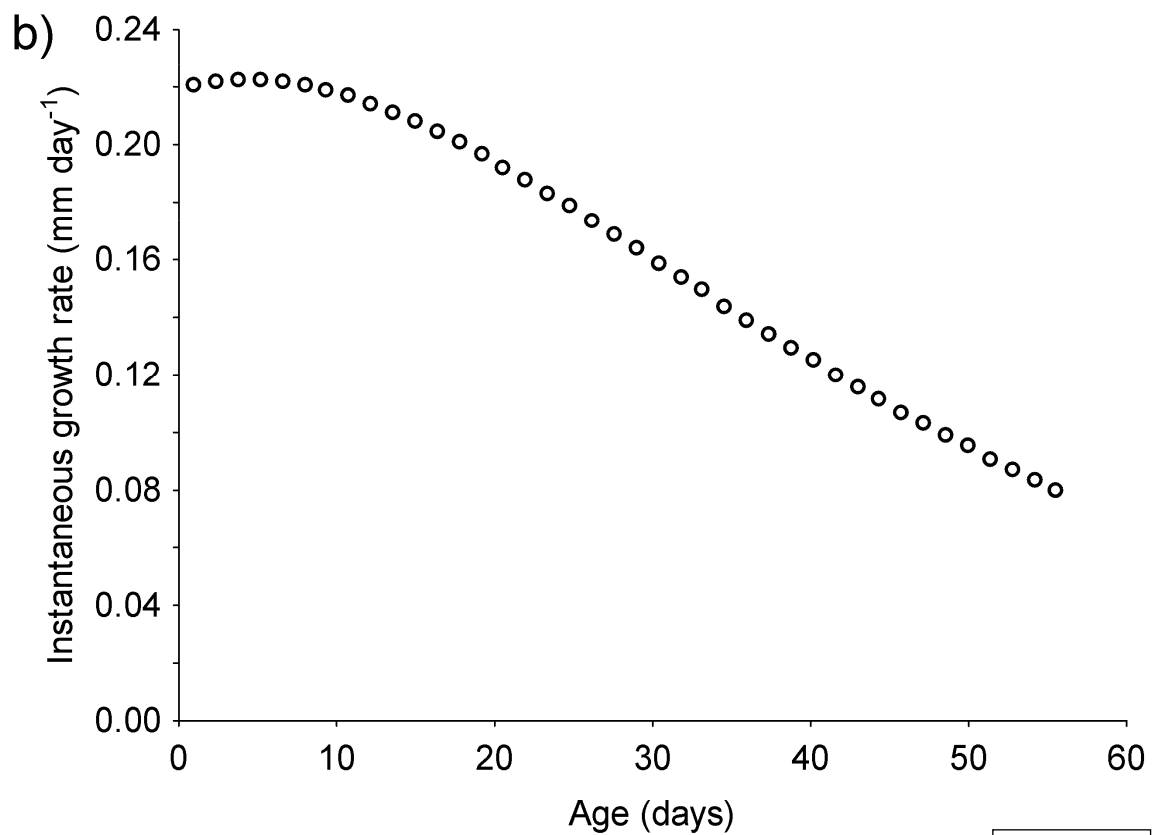
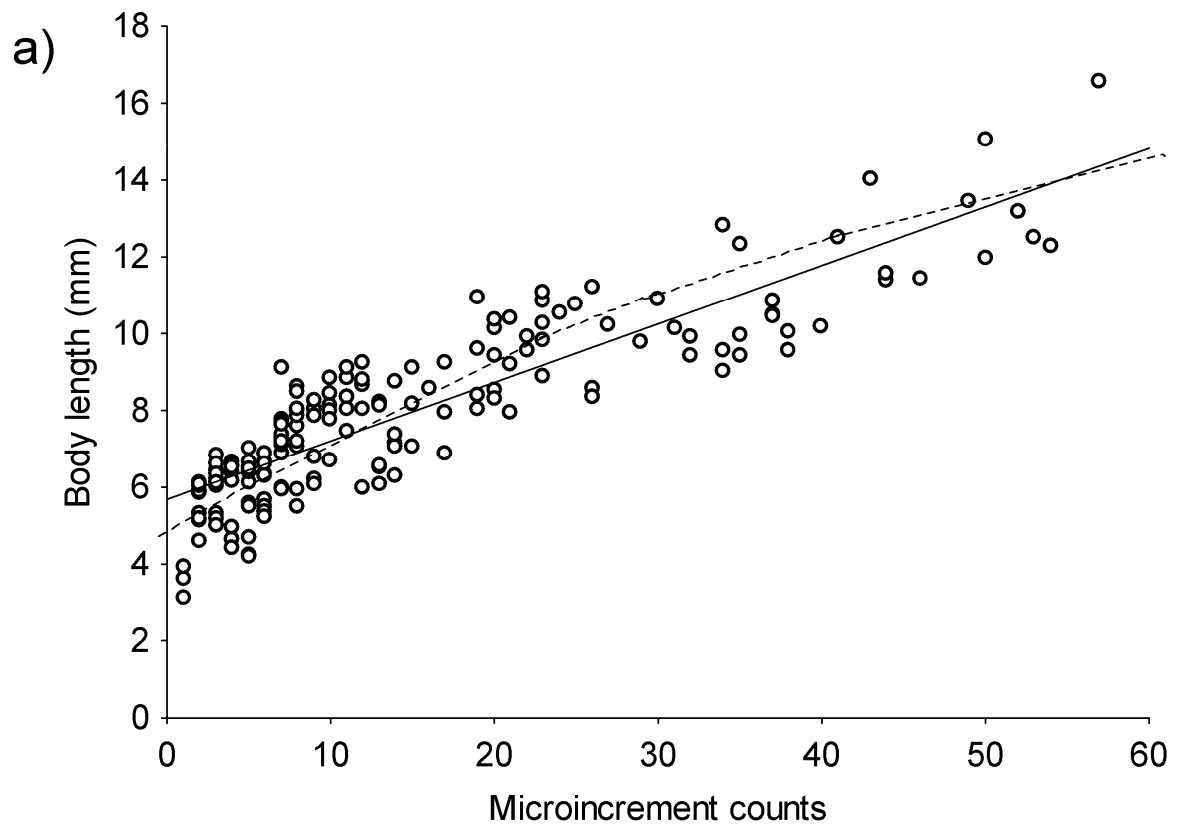


Figure 3

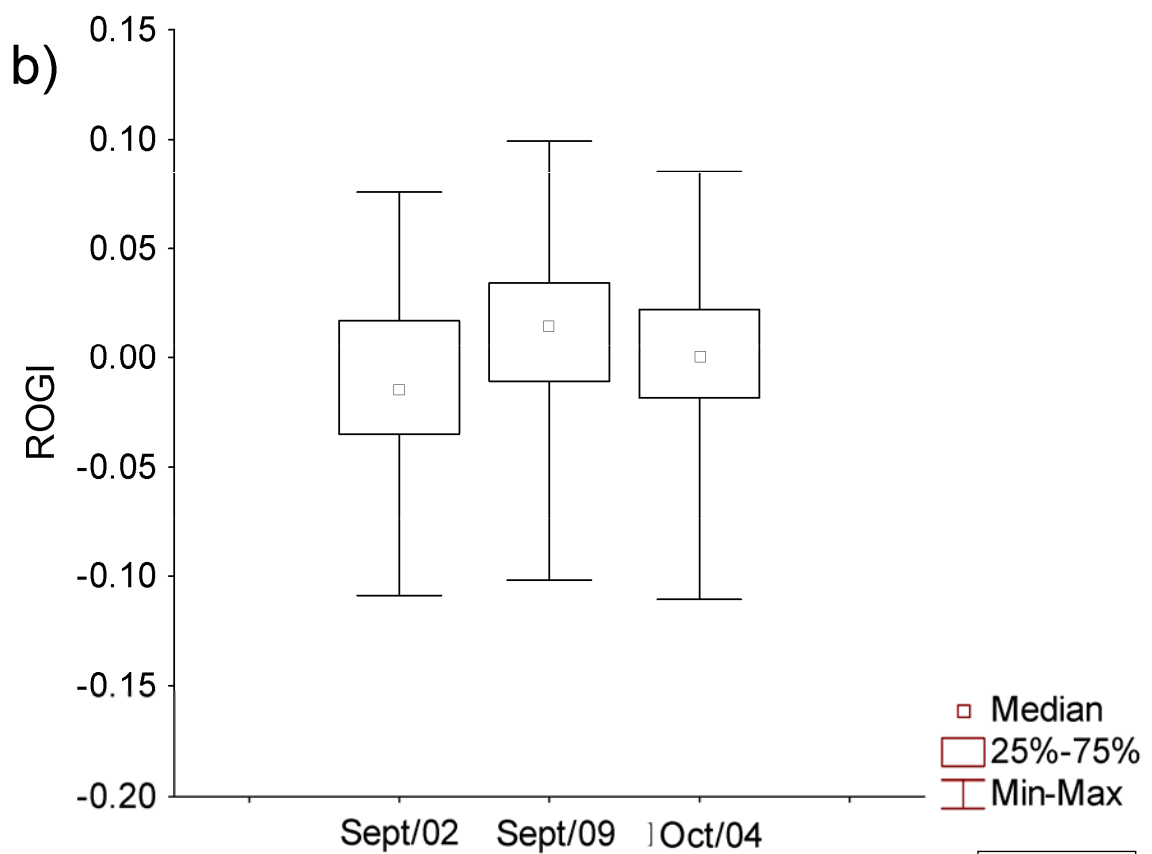
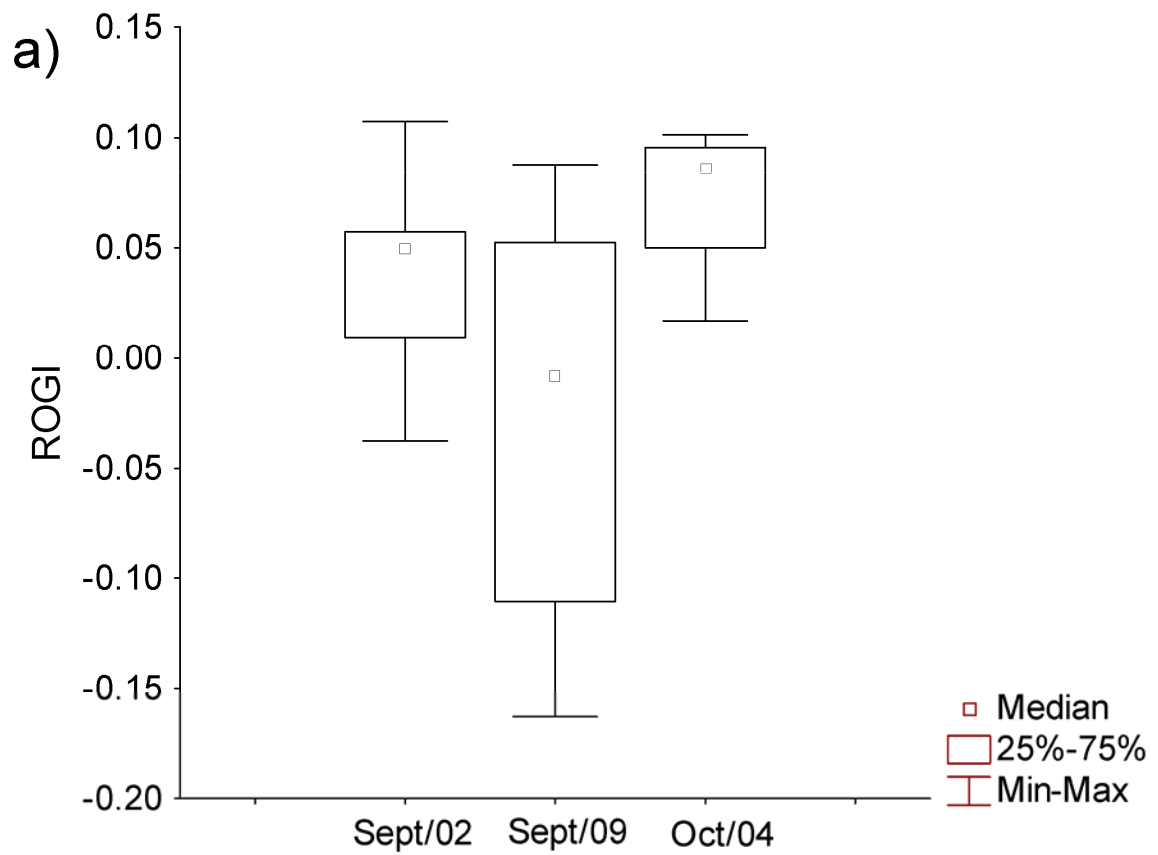


Figure 4

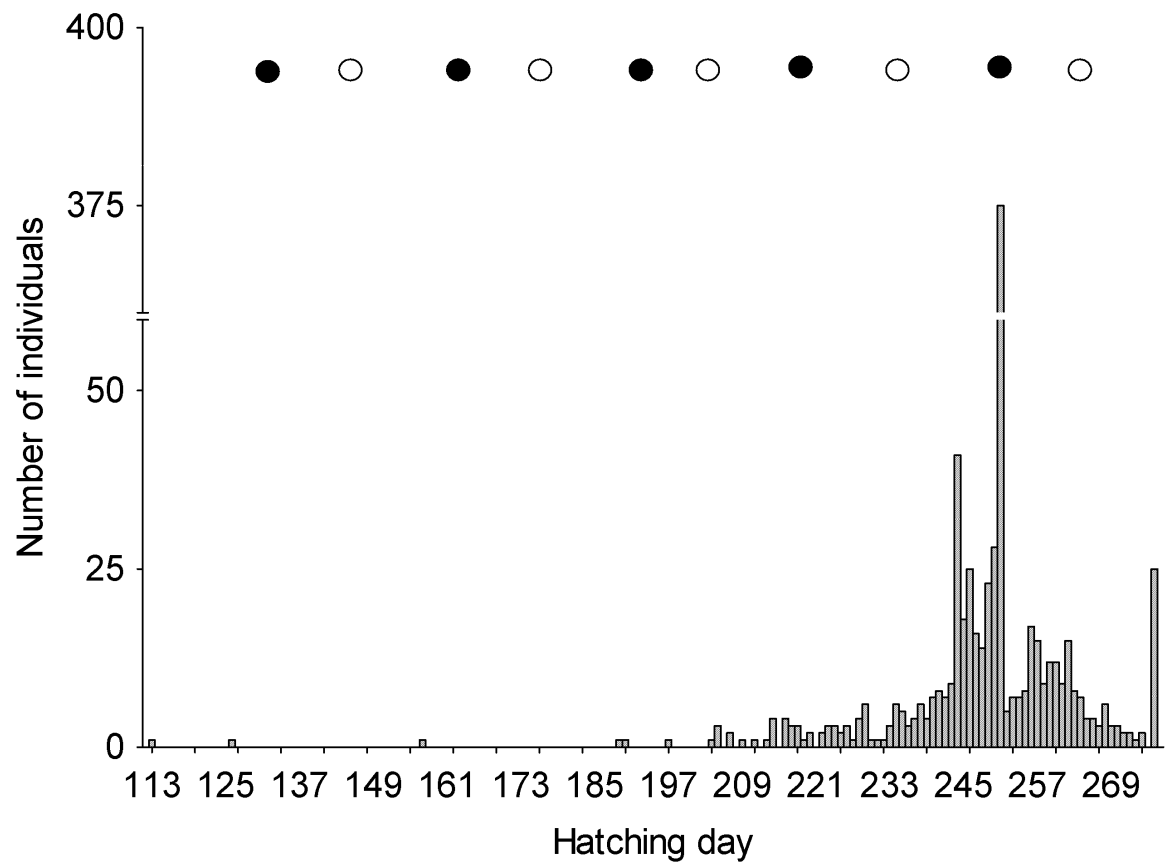


Figure 5

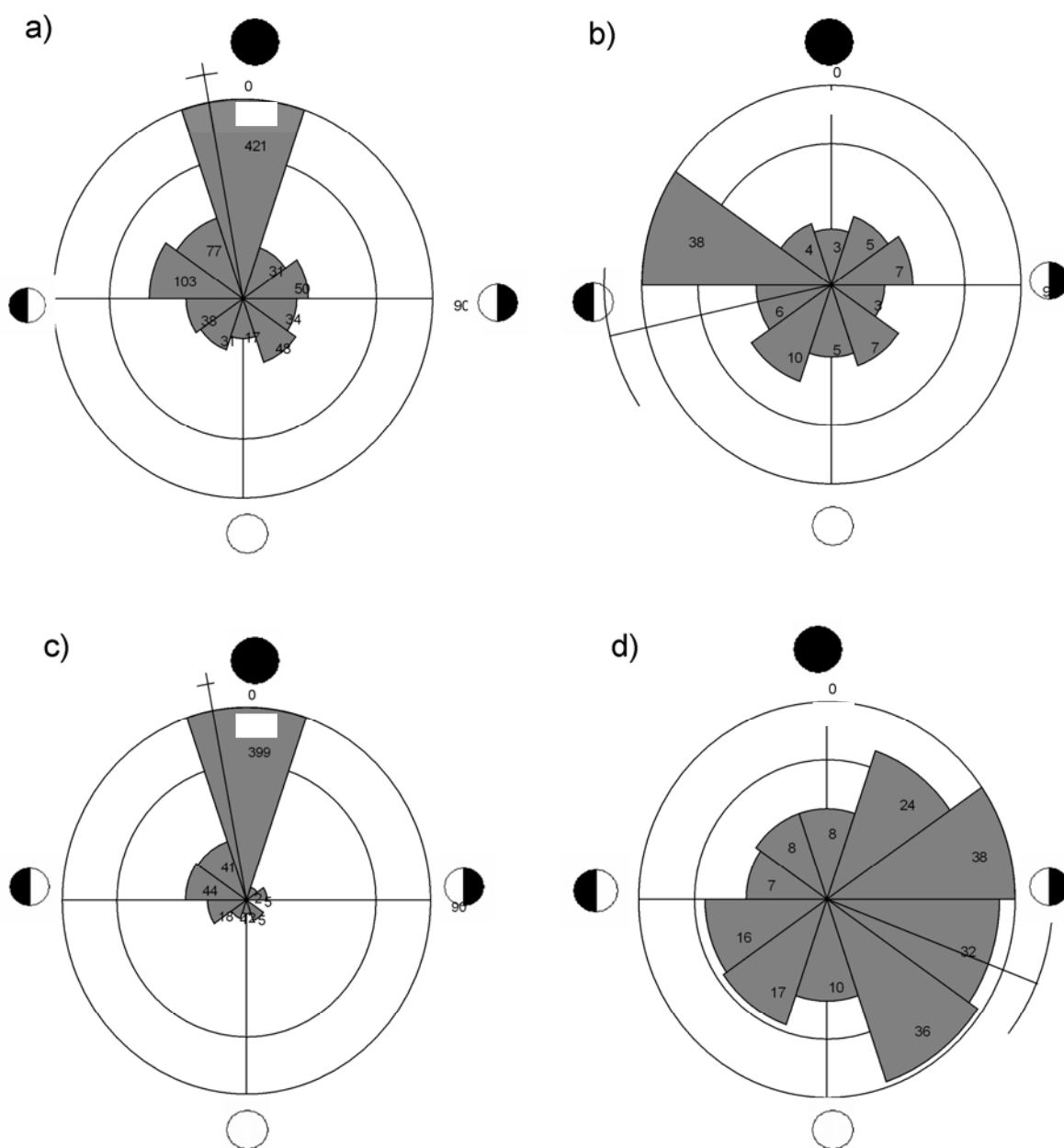


Figure 6

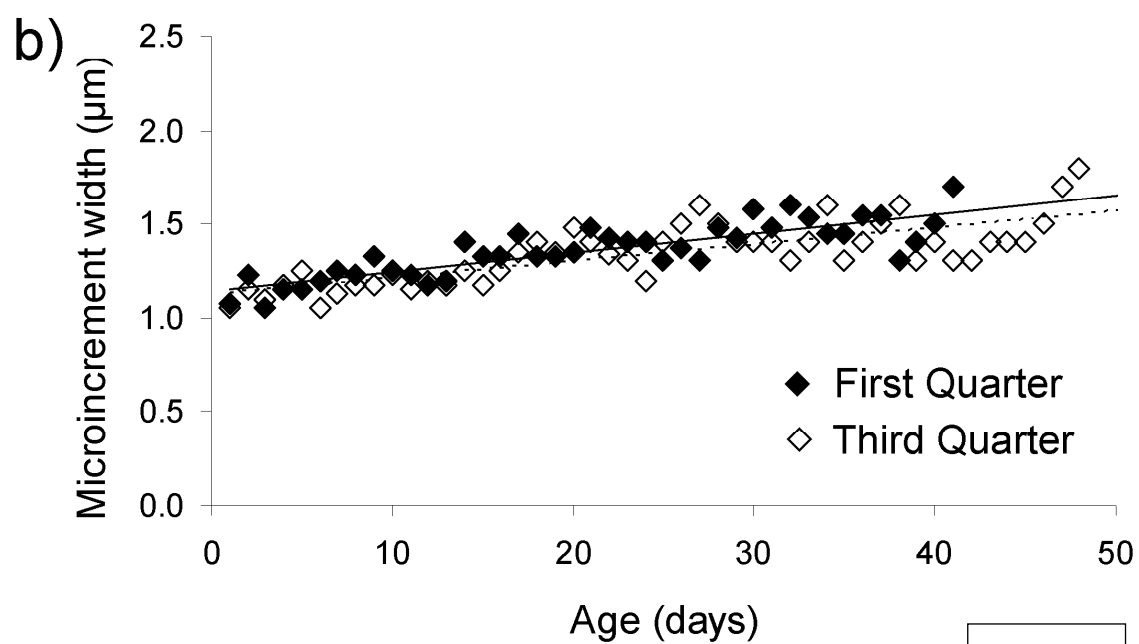
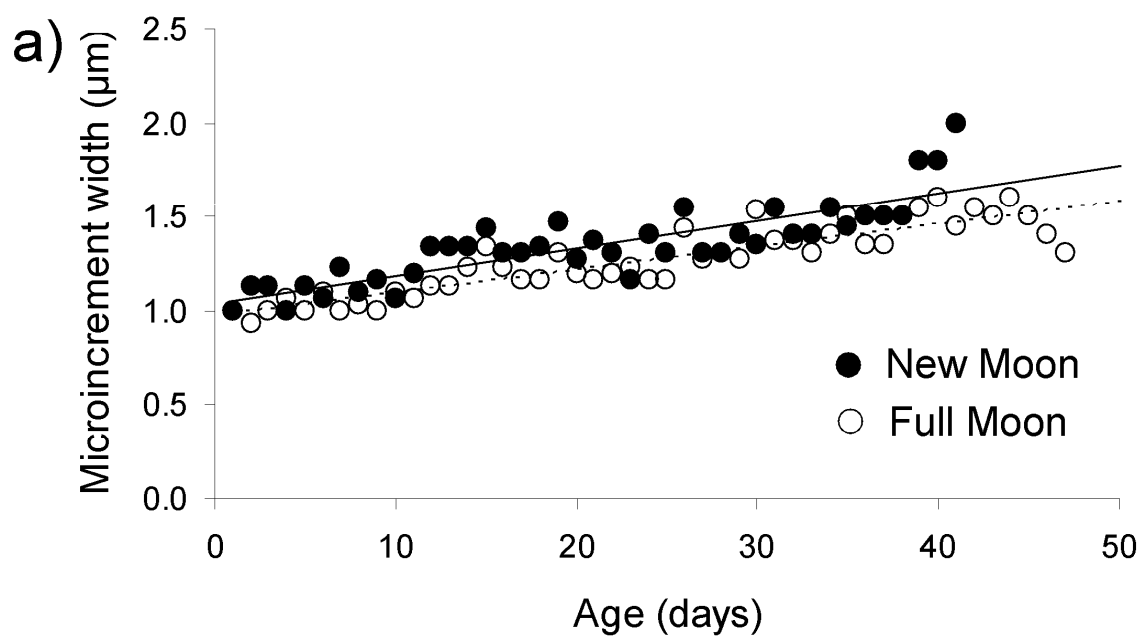


Figure 7