

METAMORFOSIS DE LARVAS PLANCTONICAS DE *Concholepas concholepas* ("LOCO") (MOLLUSCA; GASTROPODA; MURICIDAE).

Trabajo presentado en las XII Jornadas de Ciencias del Mar, Santiago, mayo 1992.

NIBALDO C. INESTROSA^{1*}, MAURICIO GONZALEZ¹ Y ELISEO O. CAMPOS¹

Nibaldo C. Inestrosa^{1*}, Mauricio Gonzalez¹ y Eliseo O. Campos¹
:Metamorphosis of planktonic larvae of *Concholepas concholepas* ("loco")
(Mollusca; Gastropoda; Muricidae).

To study the settlement and metamorphosis of the mollusc *Concholepas concholepas* we evaluate the effect of excess potassium ions in larvae of different developmental stages, including larvae captured in the plankton. The results establish the factibility to use the potassium ion as a simple technological tool to trigger the metamorphosis of competent larvae. We also studied some molecular changes that occurs during the development of "loco". From the analysis of the behavioral repertoire observed during the induction of settlement and metamorphosis, we establish the temporal course of the metamorphic process, which include: attachment to the substrate, deciliation, reduction of the velar lobes, exit of the tentacles and loss of the velum. Finally the metamorphosed larvae moves to the water-air interphase and start to develop the teleoconch.

Key words: metamorphosis, *Concholepas concholepas*, potassium ion, planktonic larvae.

1) Unidad de Neurobiología Molecular, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

* Correspondencia: Dr. Nibaldo C. Inestrosa, Unidad de Neurobiología Molecular P. Universidad Católica de Chile. Casilla 114-D, Santiago. FAX: 2-2225515

INTRODUCCION

El molusco *Concholepas concholepas* "loco" (Bruguiere, 1789) (Mollusca; Gastropoda; Muricidae) es un recurso marino de gran importancia socioeconómica en nuestro país, el que en los últimos años ha sido sometido a una captura indiscriminada, obligando a una veda indefinida con el propósito de evitar su extinción (Castilla, 1988).

El ciclo de vida del "loco" comprende una fase embrionaria intracapsular luego de la cual emergen larvas capacitadas para mantenerse en el plancton

(Ramorino, 1979; Gallardo, 1979), desde donde y posiblemente en respuesta a una serie de señales químicas ambientales, son capaces de fijarse a un sustrato y metamorfosear (Rodríguez *et al.*, 1992). Para larvas de "loco" sin embargo, no se conocen las señales ambientales que desencadenan el asentamiento y la metamorfosis. De esto se desprende, que esta es una de las etapas limitantes del potencial cultivo de la especie (Inestrosa *et al.*, 1990).

En el manejo del asentamiento y metamorfosis de invertebrados marinos, se ha utilizado con algún éxito una téc-

nica que consiste en la manipulación de las concentraciones iónicas del agua de mar (Rodríguez *et al.*, 1992). Así por ejemplo, el uso del ión potasio permite en una serie de larvas de moluscos que ellas se fijen y completen el proceso de metamorfosis (Yool *et al.*, 1986; Pechenik & Heyman, 1987; Todd *et al.*, 1991). A pesar de esto, la eficacia del ión potasio no es absoluta, de hecho Nell & Holliday (1986) encontraron solo un 19% de metamorfosis en el bivalvo *Saccostrea commercialis*, y Eyster & Pechenik (1987) no observaron ningún efecto del ión potasio en la inducción de larvas de *Mytilus edulis*.

Con estos antecedentes iniciamos hace algunos años el estudio del efecto de los cambios iónicos del agua de mar sobre larvas de "loco" con el objeto de inducir el asentamiento y la metamorfosis. En el presente trabajo se presentan datos acerca del efecto del ión potasio sobre la metamorfosis del "loco", incluyendo una evaluación de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE), junto al mensajero intracelular AMP cíclico (AMPc).

Parte de estos resultados han sido comunicados previamente en forma preliminar (Inestrosa, 1991; Inestrosa *et al.*, 1992a; 1992b).

MATERIALES Y METODOS

a) LARVAS DE *Concholepas concholepas*.

Los huevos y larvas velíferas, se obtuvieron de cápsulas colectadas en el intermareal de Las Cruces (V Región) y de cápsulas provenientes de reproductores mantenidos en el Laboratorio Biológico Pesquero del Instituto de Fomento

Pesquero (IPOP) en Putemún, Chiloé (X Región), cedidas gentilmente Ariel Pinto, René Vega y Eduardo Bustos.

Las larvas tetralobuladas (DiSalvo, 1988) de diferentes tamaños (700 a 1400 μm) fueron cultivadas a partir de cápsulas depositadas por los reproductores que se mantienen en Putemún.

Las larvas planctónicas fueron colectadas del plancton en la zona de Coquimbo (IV Región) y en la zona central (V Región) con tamaños de 1500 a 1800 μm y en Valdivia (X Región) con tamaños entre 1500 a 2000 μm de diámetro anteroposterior. Una vez capturadas (aproximadamente 250 larvas) estas fueron inmediatamente trasladadas a la Unidad de Neurobiología Molecular de nuestra Universidad en Santiago, en donde se mantuvieron individualmente en frascos de cultivo estériles con 30 ml de agua de mar filtrada (Millipore 0,45 μm) a 18 \pm 2°C con cambios cada 24 horas.

b) ENSAYOS CON EL IÓN POTASIO E INDUCCIÓN DE METAMORFOSIS.

MOVILIDAD LARVAL: los ensayos de movilidad de las larvas velíferas se realizaron en placas Linbro de 25 pocillos agregando 20 a 30 larvas a cada pocillo, en triplicado, en 0,5 ml de agua de mar filtrada (0,45 μm) agregando la concentración de cloruro de potasio necesaria para alcanzar el exceso requerido (agua de mar normal 9 mM potasio). Se definió como larvas no activas a aquellas que permanecen en el fondo del pocillo con el velo retraído y los cilios inactivos. Las larvas activas se definieron como aquellas con cilios velares activos, natación activa y pié activo.

INDUCCION DE METAMORFOSIS: a larvas planctónicas colocadas en frascos individuales, se les agregó 11 mM de cloruro de potasio en exceso (20 mM final), manteniéndose estas condiciones hasta que se detectó asentamiento y metamorfosis. Los controles se incubaron sólo en agua de mar filtrada. El medio de incubación se renovó cada 24 horas y el estado de las larvas se verificó cada 6, 12 y 24 horas utilizando una lupa estereoscópica. Las principales características de las larvas planctónicas y metamorfoseadas por inducción con el ión potasio se evaluaron en un sistema de microscopía intravital *in vivo*, con un microscopio Optiphot Nikon, acoplado a una cámara de video conectada a un video monitor VHS de cuyas imágenes se procedió a realizar fotografías. Este equipo fue facilitado por el Dr. Mauricio Boric del Departamento de Ciencias Fisiológicas de nuestra Facultad.

c) ENSAYOS DE AChE Y BuChE.

Las enzimas fueron analizadas mediante geles de poliacrilamida no-denaturantes, luego de homogenizar las distintas muestras en un amortiguador Tris-HCl 50 mM (pH 7,2) y Triton X-100 al 0,5% en presencia de una mezcla de antiproteasas (González *et al.*, 1990). Las actividades enzimáticas se evidenciaron por la tinción histoquímica descrita por Karnovsky y Roots (1964).

d) MEDICION DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE AMPc.

La extracción del AMPc se realizó por homogenización de las muestras en ácido perclórico 0,5 N, obteniéndose

luego de centrifugar, un sobrenadante que fue neutralizado con KOH hasta un pH cercano a 6. El perclorato de potasio se descartó por centrifugación y los niveles de AMPc fueron determinados en el sobrenadante. La cuantificación del nucleótido se realizó mediante un método radioisotópico de competencia, que se basa en la unión específica del AMPc a una proteína ligante (subunidad reguladora de la proteína quinasa), (Gilman, 1970).

e) DETERMINACION DE PROTEINAS.

Las proteínas se determinaron por el método de Lowry *et al.* (1951), utilizando como estándar albúmina sérica de bovino.

RESULTADOS Y DISCUSION

INDUCCION DE METAMORFOSIS EN *Concholepas concholepas* POR AUMENTO DE LA CONCENTRACION DEL ION POTASIO.

En el análisis de la conducta de las larvas velíferas expuestas a concentraciones crecientes del ión potasio, se puede observar (Fig. 1) que es posible inducir el asentamiento de larvas de *Concholepas concholepas*. Este asentamiento resulta de la detención específica del movimiento de los cilios mayores del aparato velar de las larvas. El efecto es dependiente de la concentración del ión potasio y es reversible en el tiempo estudiado (60 minutos), lo que indica que no existe toxicidad del cloruro de potasio al menos hasta 30mM (concentración final) ya que el efecto desaparece al remover el exceso de potasio del medio de incubación.

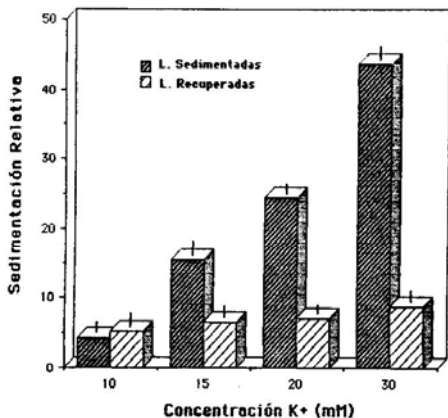


Figura 1. Efecto de distintas concentraciones del ión potasio sobre el asentamiento de larvas velíferas de *Concholepas concholepas*.

Larvas velíferas (n=20) fueron incubadas (por 60 min) en agua de mar filtrada con concentraciones crecientes de exceso de potasio para obtener las concentraciones finales indicadas. Posteriormente las larvas fueron lavadas en agua de mar normal, para recuperar su movilidad. Los resultados se expresan en porcentaje como el promedio \pm ES.

En los estudios de inducción de metamorfosis hemos podido establecer la factibilidad de utilizar el ión potasio como inductor de este proceso (Inestrosa *et al.*, 1992a). Del análisis de las observaciones conductuales registradas durante la inducción de asentamiento y metamorfosis de larvas de "loco" por el ión potasio, se lograron establecer las características más relevantes de este proceso, las que incluyen: (a) fijación al sustrato; (b) deciliación y, (c) pérdida del aparato velar y salida de los tentáculos. Como se

observa en la Fig. 2A, las larvas en contacto con el sustrato, previo a la exposición con el ión potasio, presentan los tentáculos retraídos en el interior de la protoconcha, los que por lo tanto no aparecen expuestos fuera de la misma. Esto se debe a que los lóbulos velares se encuentran también retraídos hacia el interior de la protoconcha. Esta situación cambia drásticamente, en larvas inducidas por el ión potasio, en las que el velo desaparece y los tentáculos aparecen ahora fuera de la protoconcha (Fig. 2B).

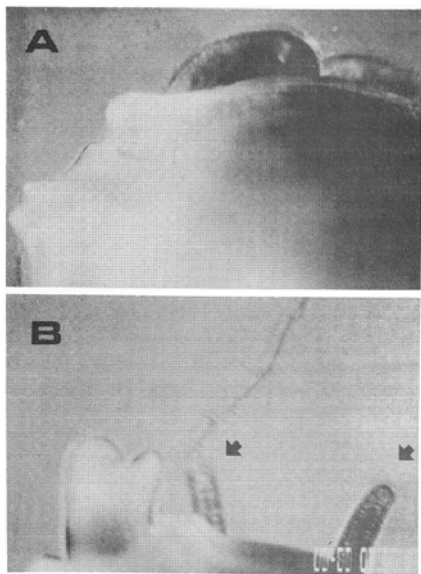


Figura 2. Larvas planctónicas y metamorfoseadas de *Concholepas concholepas*.

Larvas planctónicas de "loco" fueron incubadas en agua de mar con 20 mM de cloruro de potasio (concentración final) y examinadas cada 6 horas en un sistema de microscopía acoplado a video VHS, para registrar los eventos de metamorfosis.

A) Vista ventral de una larva planctónica, en que no se aprecian los tentáculos.

B) Larva metamorfoseada, inducida por el ión potasio(24 horas), donde se aprecian los tentáculos fuera de la protoconcha.

El campo completo de las fotografías es 1000 μm .

En los individuos metamorfoseados, inducidos por el ión potasio, la teloconcha aparece a las 20 horas post-metamorfosis y la máxima frecuencia se alcanza alrededor de las 44 horas. La formación de la teloconcha ocurre inicialmente en el borde de crecimiento próximo al canal del sifón (Fig. 3A) para posteriormente, y a medida que se producen nuevas capas de aposición de la teloconcha, abarcar la

totalidad del borde de crecimiento (Fig. 3A flechas, 3B). En una vista ventral el límite de la nueva teloconcha se observa claramente (anillos blancos) junto al término del manto pigmentado (Fig. 3C). Observaciones similares fueron comunicadas por DiSalvo (1988) para una larva capturada en el mar que metamorfoseó espontáneamente.

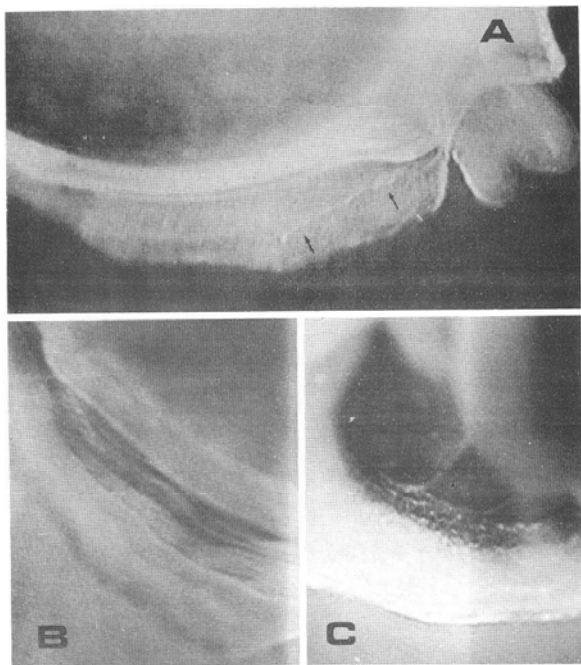


Figura 3. Desarrollo de la teloconcha en *Concholepas concholepas*.

- A) Muestra el comienzo del crecimiento de la teloconcha. El desarrollo comienza junto al canal del sifón. Las flechas indican las capas de crecimiento de la teloconcha.
 B) Muestra una larva metamórfica de estado más avanzado, donde se observan varias capas de la teloconcha.
 C) Muestra una vista ventral de la misma larva metamórfica de B), en la cual es muy claro el límite entre la teloconcha no pigmentada y el manto pigmentado.
 El campo completo de la fotografía es igual al de la Fig. 2.

Una vez establecida la factibilidad de inducir la metamorfosis de larvas de "loco" por aumento de la concentración del ión potasio en el agua de mar, se procedió a realizar un estudio de la cinética de inducción de la metamorfosis en larvas planctónicas capturadas con red de

neuston en distintas regiones del país. En la Fig. 4 se muestra el tamaño relativo de las larvas capturadas con las que se realizaron los experimentos. La cinética de inducción de metamorfosis por el ión potasio se presenta en la Fig. 5.

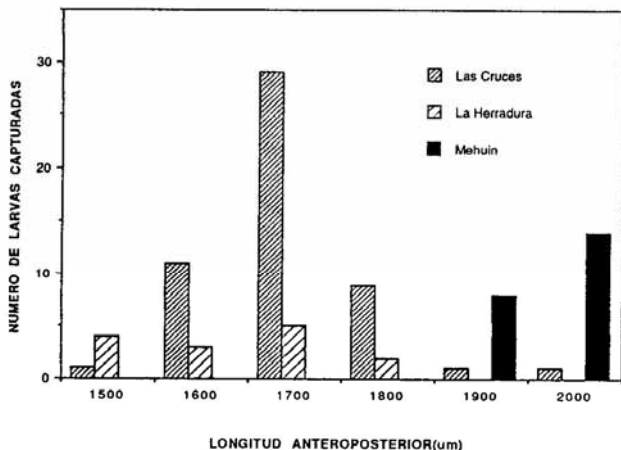


Figura 4. Número y tamaño de larvas planctónicas de *Concholepas concholepas* capturadas en las distintas regiones de Chile.

Las larvas planctónicas fueron colectadas con red de arrastre en La Herradura (Coquimbo), Las Cruces-Quintay en la zona central y en Mehuín (Valdivia). Una vez en nuestro laboratorio cada larva fue medida y su tamaño aproximado a los valores enteros descritos en la figura.

Es claro que dentro de las primeras 50 horas de exposición al ión potasio, las larvas de todas las regiones estudiadas inician metamorfosis. También es claro, que las larvas colectadas en la zona central (Las Cruces) y en el sur (Mehuín) son más sensibles al efecto inductor del ión

potasio, ya que estas larvas inician antes el proceso de metamorfosis. Larvas planctónicas controles mantenidas en agua de mar filtrada (Millipore 0,45 μm) no presentan metamorfosis espontánea por al menos 10 días después de iniciada la incubación. En larvas provenientes de

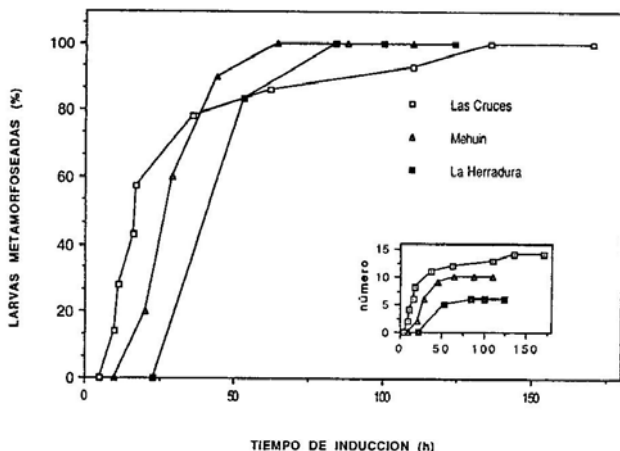


Figura 5. Cinética de la metamorfosis, inducida por el ión potasio, de larvas planctónicas de *Concholepas concholepas* obtenidas en distintas regiones del país.

Las larvas de "loco" obtenidas de la zona norte (Coquimbo), de la zona central (Las Cruces) y de la zona sur (Mehuín) del país, fueron incubadas en agua de mar filtrada (Millipore 0,45 μ m) con 11 mM de potasio en exceso (20 mM final). Las observaciones se realizaron cada 6 horas, para seguir los eventos asociados a la metamorfosis de las larvas.

la zona norte del país (Coquimbo), los eventos de metamorfosis se registraron a partir de las 46 horas. Este tiempo es mayor que el observado para las larvas provenientes de la zona sur del país (Mehuín), donde el mayor número de eventos de metamorfosis se presentan alrededor de las 24 horas de incubación en exceso del ión potasio. Esto sugiere que las larvas del norte presentarían un retraso en la respuesta al ión potasio lo que podría estar relacionado con: (a) la diferencia de tamaño observada entre la po-

blación de larvas colectadas en el norte (1500-1800 μ m) y la población de larvas del sur (1900-2000 μ m) (Fig. 4); (b) con el estado nutricional de las larvas, o bien (c) con la diferencia de temperatura entre el sitio de colección de las larvas y la temperatura de inducción. Finalmente en la Fig. 6, se presentan datos que indican la relación entre el tamaño de las larvas capturadas en Las Cruces (Fig. 6A) y Coquimbo (Fig. 6B) y el porcentaje de larvas expuestas al ión potasio, que fueron capaces de pasar metamorfosis.

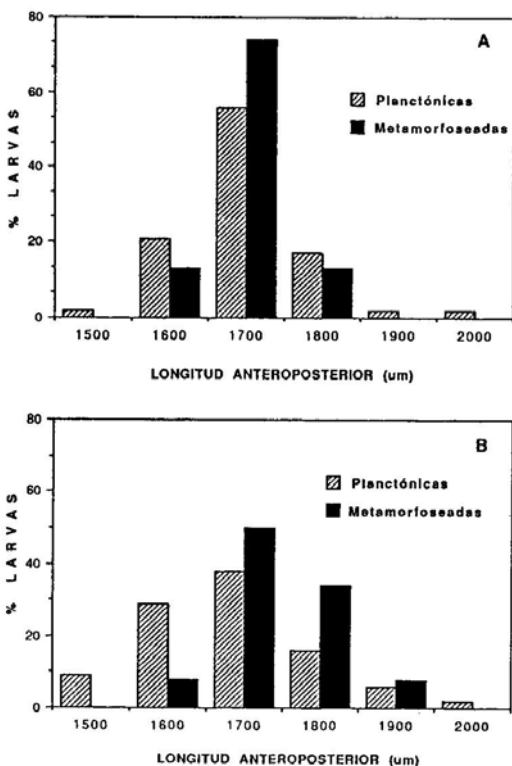


Figura 6. Porcentaje de larvas planctónicas de *Concholepas concholepas* capturadas y metamorfoseadas en función de su tamaño relativo.

Se muestra el porcentaje de larvas planctónicas capturadas de un tamaño particular y el porcentaje de dichas larvas que fueron inducidas a metamorfosear con el aumento de la concentración del ión potasio en agua de mar filtrada ($0,45 \mu\text{m}$).

A) Larvas de Las Cruces-Quintay.

B) Larvas de Coquimbo.

Se puede observar que el tamaño promedio óptimo para la inducción a metamorfosis fue de 1700 μm . Por otra parte larvas de menor tamaño (1500 μm), no pasaron metamorfosis. De la misma forma larvas de 1400 μm , cultivadas en IFOP-Putemún, inducidas a metamorfosear por el ión potasio, no fueron capaces de pasar a metamorfosis en nuestro laboratorio (datos no publicados). Estos resultados son consistentes con la comunicación de Pinto (1992) quién utilizó más de 600 larvas de "loco", también cultivadas en IFOP-Putemún, no logrando inducir metamorfosis en forma significativa.

ASPECTOS BIOQUÍMICOS DEL DESARROLLO Y METAMORFOSIS EN *Concholepas concholepas*.

Se han estudiado también algunos de los cambios bioquímicos que ocurren durante el desarrollo y metamorfosis de *Concholepas concholepas*. En primer lugar nos referiremos a las formas moleculares de la BuChE y de la AChE. En los primeros días de desarrollo las larvas velíferas poseen una BuChE que está presente en dos formas moleculares (G_4 y G_2 , tetrámero y dímero) (Fig. 7, BuChE V_{0d} y V_{7d}) luego, alrededor de los 20 días, desaparece la forma G_4 (Fig. 7, BuChE V_{20d} y $J_{1,5\text{cm}}$). Por su parte la AChE presenta sólo una forma molecular que apenas penetra en el gel (Fig. 7, AChE V_{0d} ; V_{7d} y V_{20d}). Luego, como consecuencia de la metamorfosis, se induce una forma de mayor movilidad electroforética (Fig. 7, AChE M_{4d}). Este patrón de la AChE se mantiene en juveniles de "loco". La expresión diferencial de esta forma de mayor movilidad electroforética de la AChE, permite definir por primera vez una modificación molecular que acompaña al proceso de metamorfosis en este molusco.

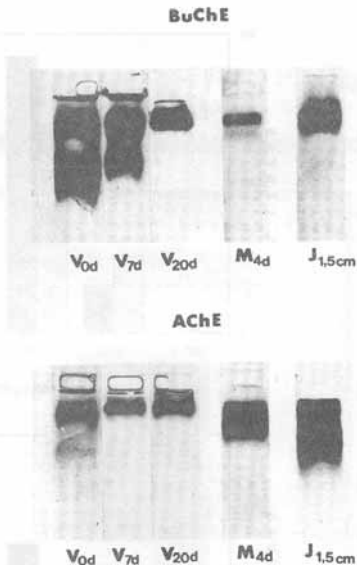


Figura 7. Electroforesis de formas nativas de AChE y BuChE, en el desarrollo de *Concholepas concholepas*.

La electroforesis se realizaron en geles de poliácridamida no-denaturantes y las actividades enzimáticas se visualizaron por tinción histoquímica de los geles.

V_{0d} ; V_{7d} y V_{20d} : larvas velíferas de 0, 7 y 20 días.

M_{4d} : larva post-metamorfoseada de 4 días.

$J_{1,5\text{cm}}$: juvenil de "loco" de 1,5 cm de longitud peristomal.

También se estudiaron los niveles del segundo mensajero intracelular AMPc. Al respecto hemos determinado que existe un incremento en las concentraciones del AMPc a lo largo del desarrollo larval (Fig. 8, inserto). En larvas

planctónicas los niveles de AMPc alcanzan valores de 2300 pmoles AMPc/mg proteínas. En la Fig. 8 se observan los cambios que ocurren en larvas que han metamorfoseado, inducidas por el ión potasio o en forma espontánea. En el caso de la inducción a metamorfosis, utilizando el ión potasio (20 mM final), se produce una disminución muy importante en los niveles del nucleótido (100 pmoles/mg prot.), mientras que en el caso de una larva, colectada en Las Cruces, que completó la metamorfosis en forma espontánea en el laboratorio (junio, 1990) también se observó una disminución del AMPc (150 pmoles/mg prot). En larvas planctónicas inducidas por el ión potasio, pero que no completa-

ron el proceso de metamorfosis (detención del proceso pasada la etapa de deciliación) se observó el mismo resultado. Es interesante destacar que la severa disminución en los niveles de AMPc observados luego de la metamorfosis, podría estar indicando que los mecanismos involucrados en desencadenar el proceso de metamorfosis en el "loco" serían sensibles a una disminución en los niveles de este segundo mensajero celular. Al respecto, en varios invertebrados marinos existe evidencia que en los procesos de asentamiento y metamorfosis, participarían receptores asociados a segundos mensajeros del tipo AMPc (Coon *et al.*, 1985; Baxter & Morse, 1987; Morse, 1990).

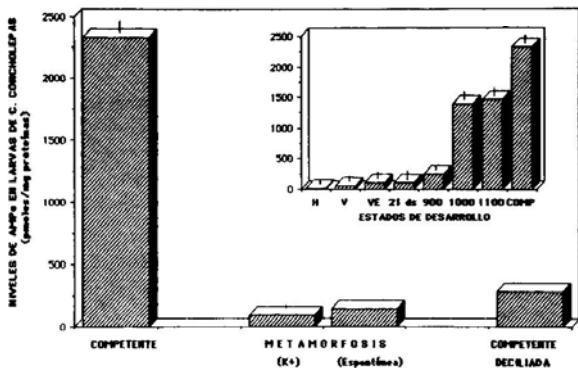


Figura 8. Niveles intracelulares de AMP cíclico durante el desarrollo y la metamorfosis de *Concholepas concholepas*.

Se utilizaron larvas planctónicas, las que fueron inducidas a metamorfosear con el ión potasio (20 mM final). Se presenta también el nivel de AMPc de una larva metamorfoseada en forma espontánea. En el inserto se observan los niveles de AMP cíclico en distintas etapas de desarrollo: huevo (H), veligeras (V), veligeras recién eclosionadas (VE), veligeras de 21 días (21 ds) y larvas de tamaños entre 900 y 1100 µm, así como de larvas planctónicas (COMP). Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM.

En conclusión, en este trabajo hemos demostrado la factibilidad de utilizar el ión potasio como inductor de asentamiento y metamorfosis de larvas planctónicas de "loco". Esto permite contar con una herramienta tecnológica simple para inducir en forma sincrónica el proceso de metamorfosis en larvas de este molusco, y así poder manejar eficientemente una de las etapas limitantes

para el eventual cultivo de este organismo. En el futuro próximo, cuando se solucionen los problemas que impiden disponer por el momento de grandes cantidades de larvas, ya sea cultivadas de tamaño razonable (aproximadamente 1700 μm) o colectadas del plancton, se podrá optimizar el uso del ión potasio a una escala piloto.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no habría sido posible de realizar sin la valiosa ayuda de C. Moreno, L. DiSalvo, W. Stotz, J. Cancino, P. Manríquez, M. Méndez, A. Abarca y J.C. Castilla, quienes nos proporcionaron las larvas planctónicas utilizadas en nuestros experimentos. Agradecemos también a Ariel Pinto, René Vega y Eduardo Bustos de IFOP, por el envío de cápsulas y larvas cultivadas en Putemún, Chiloé. Este trabajo fue financiado por el Proyecto Sectorial Recurso "Loco" de FONDECYT 3502/89 al Dr. N.C. Inestrosa.

LITERATURA CITADA

- Baxter, G. & D.E. Morse (1987) G protein and diacylglycerol regulate metamorphosis of planktonic molluscan larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 1867-1870.
- Castilla, J.C. & J. Jerez (1986) Artisanal fishery and development of a data base for managing the loco *Concholepas concholepas*, resource in Chile. In: G.S. Jamieson and N. Bourne (eds) "North Pacific Workshop on Stock Assessment and Management of Invertebrates". *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.*, **92**: 133-139.
- Coon, S.L. & D.B. Bonar (1985) Induction of settlement and metamorphosis of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* by L-Dopa and catecholamines. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **94**: 212-221.
- DiSalvo, L.H. (1988) Observations on the larval and post-metamorphic life of *Concholepas concholepas* (Bruguier, 1789) in laboratory culture. *The Veliger*, **30**: 358-368.
- Eyster, L.S. & J.A. Pecherik (1987) Attachment of *Mytilus edulis* L larvae on algal and byssal filaments is enhanced by water agitation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **114**: 99-110.
- Gallardo, C. (1979) El ciclo vital del Muricidae *Concholepas concholepas* y consideraciones sobre sus primeras fases de vida en el bentos. *Biol. Pesq.*, **12**: 79-89.
- Gilman, A. (1970) A protein binding assay for adenosine 3':5' cyclic monophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **67**: 305-312.
- González, M., Perelman, A., Fuentes, M.E., Castilla, J.C., Labarca, R., Brandan, E., González, R. & N.C. Inestrosa (1990) Neurotransmitter-related enzyme acetylcholinesterase in juvenils of *Concholepas concholepas* (Mollusca; Gastropoda; Muricidae). *J. Exp. Zool.*, **255**: 1-8.

- Inestrosa, N.C. (1991) Biotecnología en el cultivo de invertebrados marinos. IV Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar, p. 68.
- Inestrosa, N.C., Brandan, E. y R. González (1990) Desarrollo de biotecnología para el cultivo de los moluscos: el caso de *Concholepas*. En: "Cultivo de Moluscos en América Latina". pp. 47-60 (Hernández, A. Ed.) CIID-Canadá.
- Inestrosa, N.C., Campos, E.O. y M. González (1992a) Inducción de metamorfosis en larvas de *Concholepas concholepas* por el ión potasio. Boletín Red Acuicultura 6: 16-19.
- Inestrosa, N.C., González, M., Cantillana, P., Moreno, C., DiSalvo, L., Castilla, J.C., Cancino, J., Méndez, M. y E.O., Campos (1992b) Metamorfosis de *Concholepas concholepas* ("loco"). XII Jornadas de Ciencias del Mar, p. 69.
- Karnovsky, M.J. & L. Roots (1964) A direct-coloring thiocholine method for cholinesterases. J. Histochem. Cytochem., 12: 219-222.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & R.S. Randall (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.
- Morse, D.E. (1990) Recent progress in larval settlement and metamorphosis: closing the gaps between molecular biology and ecology. Bull. Mar. Sci., 46: 465-483.
- Nell, J.A. & J.E. Holliday (1986) Effects of potassium and copper on the settling rate of Sydney rock oyster (*Saccostrea commercialis*) larvae. Aquaculture, 58: 263-267.
- Pechenik, J.A. & W.D. Heyman (1987) Using KCl to determine size at competence for larvae of the marine gastropod *Crepidula fornicata* (L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 112: 27-38.
- Pinto, E.A. (1992) Avances en el cultivo de larvas de *Concholepas concholepas* (Bruguiere 1789). XII Jornadas de Ciencias del Mar, p. 85.
- Ramorino, J. (1979) Conocimiento científico actual sobre reproducción y desarrollo de *Concholepas concholepas* (Mollusca; Gastropoda; Muricidae). Biol. Pesq., 12: 59-70.
- Rodríguez, S., Ojeda P. & N.C. Inestrosa (1992) Inductores químicos del asentamiento de invertebrados marinos bentónicos: importancia y necesidad de su estudio en Chile. Rev. Chil. Hist. Nat., 65: 297-310.
- Todd, C.D., Bentley M.G. & J.N. Havenhand (1991) Larval metamorphosis of the opisthobranch mollusc *Adalaria proxima* (Gastropoda; Nudibranchia): the effects of choline and elevated potassium ion concentration. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 71: 53-72.
- Yool, A.J., Grau, S.M., Hadfield, M.G., Jensen, R.A., Markell D.A. & D.E. Morse (1986) Excess potassium induces larval metamorphosis in four marine invertebrate species. Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.) 170: 255-266.