



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas  
Mención Ecología

**COMPLEJIDAD DE LOS EFECTOS NO LETALES DE  
DEPREDADORES Y SU TRANSMISIÓN EN TRAMAS  
TRÓFICAS: EXPERIMENTOS EN TERRENO Y  
LABORATORIO CON ORGANISMOS INTERMAREALES**

Por

**TATIANA MANZUR CASTILLO**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas mención Ecología

Dirigida por:

Dr. Sergio A. Navarrete Campos

Mayo 2013

## Agradecimientos

---

Quiero comenzar agradeciendo a mi familia, amigos, Eciminianos y Changos quienes me brindaron su incondicional apoyo durante el largo proceso que significó la realización de esta tesis. En especial doy las gracias a mi mamá Cristina Castillo, a mi hermana Iciar Manzur y a mí esposo José Pantoja, quienes con su alegría, amor y paciencia estuvieron siempre dándome aliento. Gracias a Bernardo Broitman por toda la ayuda que me brindó durante los últimos dos años, ayuda que hizo posible la finalización de esta tesis. Gracias también a Felipe Soto por toda la ayuda, apoyo y risas en la realización del segundo capítulo. Gracias también a mis compañeros del doctorado por los buenos momentos y ayuda en especial a Paula Pappalardo, Ana Borthagaray y a mi amiga Francisca Boher.

Agradezco también a la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT), al Centro de Estudios Avanzados en Ecología y Biodiversidad (CASEB), al Departamento de Ecología de la Pontificia Universidad Católica de Chile, a la Dirección de Postgrado de la Pontificia Universidad Católica de Chile y al Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas (CEAZA), fuentes de financiamiento que permitieron mi formación doctoral y la realización de esta tesis.

Gracias a Sergio Navarrete, director de esta tesis, por todo lo que pude aprender a su alero, tanto durante el tiempo que trabajé como ayudante de investigación como durante el tiempo del doctorado. Agradezco también a los profesores integrantes de la comisión y en especial al Dr. Martín Thiel por su exhaustiva revisión del tercer capítulo, la cual mejoró sustancialmente el manuscrito.

## Contenido

---

<b>Resumen general</b> .....	6
<b>Abstract</b> .....	9
<b>Marco teórico general</b> .....	11
<b>Literatura Citada</b> .....	16
<b>CAPÍTULO 1: Scales of detection and escape of the sea urchin <i>Tetrapygus niger</i> in interactions with the predatory sun star <i>Heliaster helianthus</i></b> .....	21
<b>Abstract</b> .....	22
<b>Introduction</b> .....	22
<b>Methods</b> .....	23
<i>Escape response in the field</i> .....	23
<i>Predator detection by prey</i> .....	26
<i>Detection distance</i> .....	27
<i>Data analysis</i> .....	28
<b>Results</b> .....	29
<i>Escape response in the field</i> .....	29
<i>Predator detection by prey</i> .....	30
<i>Detection distance</i> .....	30
<b>Discussion</b> .....	31
<b>Acknowledgments</b> .....	35
<b>References</b> .....	36
<b>Tables</b> .....	42
<b>Figures</b> .....	44

<b>CAPÍTULO 2: Efecto del tiempo y del espacio sobre la conducta del erizo negro, <i>Tetrapygus niger</i>, frente a su depredador <i>Heliaster helianthus</i></b> .....	46
<b>Resumen</b> .....	47
<b>Introducción</b> .....	48
<b>Materiales y Métodos</b> .....	51
<i>Cambio en la distribución de erizos frente a la presencia de soles en terreno</i> .....	52
<i>Efectos no letales en laboratorio a dos escalas de confinamiento</i> .....	52
<i>Transmisión de efectos no letales a las algas</i> .....	55
<i>Análisis de datos</i> .....	55
Cambio en la distribución de erizos frente a la presencia de soles en terreno.....	55
Efectos no letales en laboratorio a dos escalas de confinamiento.....	56
<i>Respuesta conductual de corto plazo</i> .....	56
<i>Respuesta conductual de largo plazo</i> .....	57
Transmisión de efectos no letales a las algas.....	59
<b>Resultados</b> .....	60
<i>Cambio en la distribución de erizos frente a la presencia de soles en terreno</i> .....	60
<i>Efectos no letales en laboratorio a dos escalas de confinamiento</i> .....	60
Respuesta conductual de corto plazo.....	60
Respuesta conductual de largo plazo.....	62
Transmisión de efectos no letales a las algas.....	64
<b>Discusión</b> .....	65
<b>Referencias</b> .....	73
<b>Tablas</b> .....	82
<b>Figuras</b> .....	88
<b>Material Suplementario</b> .....	98

<b>CAPÍTULO 3: Behavioral and physiological responses of limpet prey to a seastar predator and their transmission to basal trophic levels.....</b>	106
<b>Summary .....</b>	107
<b>Introduction .....</b>	108
<b>Materials and Methods .....</b>	111
<i>Non-Lethal effects of Heliaster on Fissurella and TMII on macroalgae.....</i>	111
<i>Prey Metabolic Rate under Risk of Predation.....</i>	114
<b>Data Analysis.....</b>	115
<b>Results .....</b>	118
<i>Non-lethal effects of Heliaster on Fissurella and TMII.....</i>	118
<i>Prey Metabolic Rate under Risk of Predation .....</i>	121
<b>Discussion.....</b>	122
<b>Acknowledgments .....</b>	127
<b>References .....</b>	128
<b>Tables .....</b>	137
<b>Figures .....</b>	140
<b>Supplementary Material .....</b>	144
<b>Conclusión General .....</b>	147

## Resumen General

---

Las interacciones depredador-presa han sido ampliamente reconocidas como un factor crítico en la dinámica de sistemas ecológicos, reconocimiento que se ha basado primordialmente en el aspecto letal de la depredación (i.e. cuantas presas son consumidas por el depredador). Sin embargo, en todos los sistemas naturales los depredadores también pueden afectar la demografía, distribución y evolución de las especies presa a través de los costos de las respuestas antidepredatorias desplegadas para reducir su susceptibilidad a la depredación, respuestas que se entienden como “efectos no letales” de los depredadores (ENL). Además de influir fuertemente sobre la dinámica de las poblaciones presa, los ENL de los depredadores pueden también propagarse a través de la trama trófica como efectos indirectos mediados por rasgo (EIMR), afectando la estructura, diversidad y las dinámicas de comunidades completas.

El escape activo es una de las respuestas antidepredatorias ampliamente reportadas en diversos taxa marinos. Para que un escape sea exitoso, las presas deben ser capaces de detectar y evaluar el riesgo de depredación idealmente antes de un contacto físico, utilizando señales o información provenientes del depredador o del medio ambiente. La distancia a la que una presa reacciona a la presencia de su depredador (distancia de detección), la extensión espacial y la duración de la respuesta de escape, junto con las tasas de encuentro entre depredador y presa son determinantes de la escala espacio-temporal del ENL del depredador en un sistema y de la importancia ecológica que dicho efecto tendrá a escalas o niveles de organización mayores (e.g. poblacional). No obstante, la aproximación metodológica que han empleado la mayoría de los trabajos que estudian ENL y su transmisión a otros niveles tróficos raramente ha considerado en forma explícita o implícita la escala ‘natural’ de las interacciones, lo que podría redundar en la problemática de extrapolar los resultados de manipulaciones experimentales a lo que ocurre efectivamente en la naturaleza.

Por otro lado, la expresión de respuestas antidepredatorias supone un costo para las presas que puede manifestarse como una reducción en sobrevivencia, crecimiento o reproducción y, por lo

tanto, es esperable que estas respuestas sean rápidas, flexibles (reversibles), específicas y conmensurables con el nivel de riesgo real, minimizando dichos costos. Sin embargo, pocos son los estudios que han cuantificado directamente los costos de estas respuestas y cómo estos pueden influenciar la magnitud y dirección de los efectos indirectos de los carnívoros sobre el nivel trófico basal transmitidos mediante cambios conductuales de los herbívoros.

En esta tesis estudiamos los ENL de un depredador y su transmisión en tramas tróficas utilizando como sistema de estudio una trama trófica de tres niveles en el intermareal rocoso. Mediante combinación de manipulaciones experimentales en terreno y laboratorio se investigaron los ENL del depredador asteroideo *Heliaster helianthus* sobre rasgos de dos consumidores intermedios, el equinoideo *Tetrapyrgus niger* y el gastrópodo *Fissurella limbata*, así como la potencial transmisión de dichos efectos a algas (*Ulva* sp.) en el nivel trófico basal. El estudio evaluó la escala espacial y temporal en que ocurren estas interacciones, el efecto de estas escalas sobre la interpretación de manipulaciones experimentales, y los costos energéticos que conllevan estas respuestas para las presas. Se demostró que *T. niger* detecta a *Heliaster* a través de señales químicas difundidas en el agua hasta distancias de 50 cm y que la distancia recorrida en un escape es de alrededor de 40 cm. Es esperable entonces que el efecto del riesgo de depredación sea variable espacialmente. Manipulaciones experimentales de laboratorio demostraron que las respuestas dependen fuertemente del tiempo de exposición al riesgo y del tamaño del acuario en que se realizan las manipulaciones. Aunque se observaron algunos cambios de corto plazo en el forrajeo de los erizos en presencia de *Heliaster*, no se evidenció transmisión del ENL sobre *Ulva* sp.

Finalmente, se demostró que en presencia del depredador, *F. limbata* aumentó rápidamente el consumo de oxígeno, las tasas de movimiento y las distancias recorridas, pero al contrario de muchos estudios anteriores en otros sistemas, *F. limbata* tendió a aumentar su actividad de forrajeo. En conjunto, los resultados sugieren que la respuesta antidepredatoria de esta presa es energéticamente costosa y que podría compensarse con un mayor consumo de algas. En general, mi estudio ilustra la importancia de cuantificar las escalas espacio-temporales de los ENL y la

complejidad de cuantificar su transmisión a otros niveles tróficos en manipulaciones experimentales.



## Abstract

---

Predator-prey interactions have been amply recognized as a critical factor in the dynamics of ecological systems, recognition that has been primarily build on the “lethal” aspect of predation (i.e. how many preys are consumed by predators). Nevertheless, in all natural systems predators can also affect the demography, behavior and the distribution of prey species through the induction of anti-predator responses, which can be understood as “non lethal” predator effects (NLE).

Beside the strong influence that non lethal effects can have on the dynamics, distribution and evolution of prey populations, this risk effects can propagate through the food web in the form of trait mediated indirect effects, affecting the structure, diversity and the dynamics of whole communities.

Active escape is one anti-predator response amply reported in a variety of marine taxa. For an escape to be successful prey must be capable of detecting and asses the predation risk ideally before reaching physical contact with the predator, using cues or information gathered from de predator or the environment. The distance at which prey reacts to predator presence (detection distance), the spatial extension and the duration of the escape response, along with the encounter rates between predator and prey are determinants of the spatio-temporal scale of the non lethal predator effect in a given system and also of the ecological relevance that this effect could have at larger scales or organization levels (e.g population). However, the methodological approximation that has been used in the majority of the studies that investigate non lethal predator effects and its transmission to other trophic levels seldom have considered explicitly or implicitly the “natural” scale of predator-prey interactions, which can lead to a critical issue when extrapolating the results of experimental manipulations to what really happening in nature.

On the other hand, the expression of anti-predator responses imply a cost for prey that can be manifested as a reduction in survivorship, growth or reproduction and, therefore, is evolutionarily expected that this responses should be rapid, flexible (reversible), specific and commensurable with the actual level of risk, minimizing those costs. Nevertheless, there are only few studies that have

quantified directly the costs of these responses and how they can strongly influence the magnitude and the direction of the indirect effects of carnivores on basal trophic levels through behavioral changes of herbivores.

In this thesis I address the study of non lethal effects of predators and its transmission in food webs using as study system a three levels food web in the rocky intertidal zone. Through a combination of field and laboratory experimental manipulations I investigate the non lethal effects of the sea star predator *Heliaster helianthus* on the traits of two intermediate consumers the echinoid *Tetrapygus niger* and the gastropod *Fissurella limbata*, as well as the potential transmission of those effects to algae (*Ulva* sp.) in the basal trophic levels. This study evaluated the spatial and temporal scales in which these interactions occurs, the effect of this scales on the interpretation of experimental manipulation and the energetic cost that this responses imply for the prey.

I demonstrated that, *T. niger* detects *H. helianthus* through chemical cues released by the predator in the water up to a distance of 50 cm, and that the traveled distance in an escape is about 40 cm. Then, it is expected that the effect of the risk of predation will be spatially variable.

Experimental manipulations in the laboratory demonstrated that the responses of the sea urchins strongly depend on the time of risk exposure and on the experimental tank size in which manipulations are performed. Although some short term changes in urchins foraging were observed in *Heliaster* presence, transmission of predator's non lethal effect to *Ulva sp* was not evidenced.

Finally, it was demonstrated that in the presence of the predator, *F. limbata* rapidly increased oxygen consumption, movement rates and the distances traveled, but contrary to many former studies in other systems, *F. limbata* tended to increase its foraging activity. En conjunction, these results suggests that the anti-predator response of this prey is energetically costly, and that it could be compensated with higher algae consumption. In general, my study illustrate the importance of quantifying the spatio-temporal scales of NLE of predators and the complexity of quantifying its transmission to other trophic levels in experimental manipulations.

## Marco Teórico General

---

Las interacciones depredador-presa han sido ampliamente reconocidas como un factor crítico en la dinámica de sistemas ecológicos, pero la gran mayoría de los estudios empíricos, especialmente aquellos de terreno, así como gran parte del desarrollo teórico acerca del efecto de los depredadores se concentra en el número de individuos presa que es consumido, es decir el efecto letal de la depredación (Sih *et al.* 1985). Sin embargo, es ampliamente reconocido que en todos los sistemas naturales los depredadores también pueden afectar la demografía, comportamiento y distribución de las especies presa a través de inducir respuestas antidepredatorias, las que son exhibidas por las presas para reducir su susceptibilidad a la depredación. En general estas respuestas se conocen como “efectos no letales” de los depredadores (Miner *et al.* 2005; Creel & Christianson 2008; Lima & Dill 1990).

Estudios experimentales han demostrado que en algunas situaciones los efectos no letales de los depredadores sobre las poblaciones presa e incluso sobre las comunidades en que están insertos, pueden ser equivalentes o incluso más “fuertes” (i.e. de mayor intensidad) que los efectos letales (Trussell *et al.* 2004; Trussell *et al.* 2006a; Trussell *et al.* 2006b; Matassa 2010). Aunque estas comparaciones posiblemente son metodológica y conceptualmente cuestionables, lo cierto es que los efectos no letales son muy importantes porque frecuentemente inducen respuestas inmediatas y rápidas, pueden afectar simultáneamente a un gran número de individuos presa y pueden estar presentes durante toda la vida de la presa (Lima 1998; Turner & Montgomery 2003; Werner & Peacor 2006). Por lo tanto, es importante dilucidar la naturaleza, magnitud y la variabilidad de los efectos no letales de los depredadores sobre sus presas y dado que ambos efectos (letales y no letales) tienen propiedades diferentes, es crítico entender sus mecanismos de transmisión con el objeto de predecir como interactuarán y cuando y donde serán importantes.

Las respuestas al riesgo de depredación pueden ser morfológicas (e.g. cambio en el grosor de la concha en caracoles, forma y posición de la abertura en cirripedios, producción de bisco en

mitílicos, Appleton & Palmer 1988; Lively 1986; Caro & Castilla 2004; Caro *et al.* 2008), fisiológicas (e.g. mayor tasa de respiración en peces y lapas; Barreto *et al.* 2003; Hawkins *et al.* 2004, Manzur *et al. in review*), y/o conductuales (e.g. respuesta de escape activo de gastrópodos, bivalvos, chitones, equinodermos y otros, Espoz & Castilla 2000; Escobar & Navarrete 2011; Trussell *et al.* 2006a; Urriago *et al.* 2011). La expresión de estas respuestas supone un costo sobre los individuos presa que puede manifestarse como una reducción en la sobrevivencia, crecimiento o reproducción (Lima 1998, Peckarsky *et al.* 1993, Pangle *et al.* 2007) y, por lo tanto, evolutivamente es esperable que estas respuestas sean rápidas, flexibles (reversibles), específicas (bajo error de reconocimiento) y conmensurables con el nivel de riesgo real, para así minimizar dichos costos (Hagen *et al.* 2002, Van Buskirk & Arioli 2002; Turner & Montgomery 2003).

Los efectos no letales de los depredadores además de influir fuertemente sobre la dinámica, distribución y evolución de las poblaciones presa, pueden también propagarse a través de la trama trófica como efectos indirectos mediados por rasgo (EIMR), afectando la estructura, diversidad y las dinámicas de comunidades completas (revisiones por Werner & Peacor 2003, Preisser *et al.* 2005; Miner *et al.* 2005). EIMR se originan cuando cambios en la especie iniciadora de un efecto (e.g. depredador carnívoro) resultan en cambios en una especie receptora (e.g. planta), como consecuencia de la variación de algún (os) rasgo (s) asociado a una especie intermediaria (e.g. herbívoro), transmisora del efecto (Abrams *et al.* 1995). En la última década estas interacciones han recibido mucha atención, resultando en un rápido incremento en el número de estudios experimentales, desarrollados primordialmente en laboratorio, que intentan documentar y cuantificar EIMR (ver revisiones de Kats and Dill, 1998; Wisenden, 2000). Estos estudios evidencian, de manera general, que en tramas tróficas de tres niveles cuando la respuesta no letal implica la disminución en la habilidad, eficiencia y forma del forrajeo, los efectos no letales pueden rápidamente propagarse y afectar la abundancia o tasas de crecimiento de niveles tróficos inferiores (Kéfi *et al.* 2012).

El escape activo es una de las respuestas al riesgo de depredación ampliamente reportadas en diversos taxa marinos (Dayton *et al.* 1977; Escobar & Navarrete 2011; Espoz & Castilla 2000; Jacobsen & Stabell 2004; Mann & Wright 1984; Phillips 1978; Schmitt 1981). Para que un escape sea exitoso, las presas deben ser capaces de detectar y evaluar el riesgo de depredación idealmente antes de un contacto físico, utilizando señales o información provenientes del depredador o del medio ambiente. La distancia a la que una presa reacciona a la presencia de su depredador (distancia de percepción), la extensión espacial y la duración de la respuesta de escape son determinantes de la escala espacio-temporal del efecto no letal del depredador en un sistema (Turner & Montgomery, 2003; Smee *et al.*, 2008). Así, las distancias de escape y detección junto con las tasas de encuentro entre depredador y presa son centrales para evaluar la importancia ecológica de los efectos no letales a escalas o niveles de organización mayores (e.g. poblacional). No obstante, la aproximación metodológica que han empleado la mayoría de los trabajos que estudian efectos no letales y su transmisión a otros niveles tróficos raramente ha considerado en forma explícita o implícita la escala 'natural' de las interacciones (Bernstein *et al.* 1981; Trussell *et al.* 2003; Byrnes *et al.* 2006; Freeman 2006; Matassa 2010). Por cierto, la inmensa mayoría de los estudios desarrollados en laboratorio o en sistemas de mesocosmos usualmente han maximizado la señal del depredador, sometiendo a la presa en forma continua ("press") a esta señal y restringiendo a veces en forma muy drástica, la escala espacial de movimiento de depredadores y presas. No hay dudas de que estos trabajos en laboratorio son iluminadores en cuanto a la comprensión de los mecanismos involucrados en las respuestas al riesgo de depredación. Pero tampoco caben dudas de que tienen un poder limitado al momento de extrapolar resultados a lo que ocurre realmente en la naturaleza y, por ello, aún estamos lejos de poder comparar, de manera sensible e iluminadora, los efectos letales y no-letales en cualquier sistema depredador-presa.

En esta tesis se plantea abordar el estudio de efectos no letales de depredadores y su transmisión en tramas tróficas empleando como sistema de estudio tramas tróficas de tres niveles en la zona intermareal rocosa. Mediante una combinación de manipulaciones experimentales en

terreno y laboratorio se intentó entender cómo operan los efectos no letales en el contexto natural y ahondar en los mecanismos detrás de esta forma de interacción entre depredador y presa. En primera instancia se caracterizó el efecto no letal del sol de mar *Heliaster helianthus* sobre una de sus presas comunes (Navarrete & Manzur 2008), el erizo negro, *Tetrapygyus niger*. Aunque la población del sol de mar se extiende al submareal somero, la mayor parte se ubica en la zona intermareal media y baja (Navarrete & Manzur 2008). La inspiración para estos estudios se enfoca entonces en la zona de transición entre el intermareal bajo, donde se encuentran densidades relativamente altas de soles de mar, y el submareal muy somero (< 1 m de profundidad), en donde se encuentran agregaciones de erizos. En el primer capítulo de la tesis se evaluó en terreno y laboratorio si el erizo es capaz de detectar específicamente a este depredador antes de establecer un contacto físico, por ejemplo a través de usar señales químicas liberadas por el sol de mar y luego se evaluó cuáles son las escalas espaciales de la detección (medida en laboratorio) y del escape de los individuos (terreno y laboratorio). Una vez demostrada la especificidad de la respuesta, la capacidad de los erizos de detectar al depredador usando señales químicas y la magnitud de las escalas de detección y de escape, se realizó un experimento (Capítulo 2) de laboratorio para evaluar cómo varía la respuesta de escape de acuerdo a la escala espacial de confinamiento (tamaño de acuario) y a través del tiempo (respuestas rápidas de minutos y respuestas lentas de varios días). Además del efecto no-letal se cuantificó su potencial transmisión a niveles basales en una trama trófica, agregando al sistema de estudio el alga verde *Ulva* sp. como recurso de *Tetrapygyus niger*. Puesto que una de las conclusiones de estos estudios fue que un aspecto importante de la respuesta de escape de erizos a soles de mar es el cambio de hábitat (profundización en el submareal somero) en vez de cambios importantes en consumo *in situ*, en el Capítulo 3 se examinó la complejidad de las respuestas no letales en una trama trófica en donde la especie presa coexiste con el depredador en forma más permanente (i.e. sin cambio de hábitat). En este caso se seleccionó el sistema conformado por el mismo sol de mar, *Heliaster helianthus* y se evaluó su efecto sobre el molusco herbívoro, “lapa”, *Fissurella limbata*. La especificidad de la respuesta de *F. limbata* a *Heliaster* ya

ha sido demostrada en terreno (Escobar & Navarrete 2011) y por ello nos concentramos en evaluar aspectos fisiológicos y conductuales asociados a dicha respuesta para así comprender cómo y en qué dirección se transmiten estos efectos (indirectamente) a la base de una trama trófica de tres niveles.

Los resultados de esta tesis permiten ahondar en la comprensión de la importancia de los efectos no-letales de los depredadores en sistemas ecológicos. En particular, ilustran la enorme importancia de caracterizar las escalas espacio-temporales de las respuestas de escape y el efecto de la decisión arbitraria acerca de la escala de confinamiento sobre la magnitud y direccionalidad de los resultados observados en el nivel trófico intermedio y basal. Además, los resultados muestran que los costos energéticos asociados al stress mismo producido por el depredador, así como a la respuesta de escape, pueden inducir una mayor, en vez de menor, tasa de consumo de la especie basal por parte de herbívoros. Un resultado que contrasta con la gran mayoría de los estudios publicados y también de la mayoría de los modelos teóricos. En resumen, la tesis pone especial énfasis en la influencia, pero también la complejidad de los efectos no letales sobre las poblaciones presa y la comunidad en general, sugiriendo que en muchos casos pueden tener un carácter más bien local, y que debemos entender todavía mucho mejor la importancia que tienen los costos de las respuestas antidepredatorias y cómo estos son compensados por los individuos. Todavía estamos muy lejos de poder generalizar sobre las escalas espacio-temporales a las cuales se manifiestan los efectos no letales y las manipulaciones experimentales deben idealmente considerar distintas escalas de confinamiento, especialmente si se quiere evaluar su transmisión a través de la trama trófica.

## Literatura Citada

Abrams, P.A. (1995) Implications of dynamically variable traits for identifying, classifying and measuring direct and indirect effects in ecological communities. *American Naturalist* 146(1): 112-134.

Appleton, R.D. & Palmer, A.R. (1988) Waterborne stimuli released by predatory crabs and damaged prey induce more predator-resistant shells in marine gastropods. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 85:4387-4391.

Barreto, R.E., Luchiari A.C. & Marcondes, A.L. (2003) Ventilatory frequency indicates visual recognition of an allopatric predator in naive Nile tilapia. *Behavioural Processes*, 60: 235–239.

Bernstein, B.B., Williams, B.E. & Mann, K.H. (1981) The role of behavioral responses to predators in modifying urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*) destructive grazing and seasonal foraging patterns. *Marine Biology* 63:39-49.

Byrnes, J., Stachowicz, J.J., Hultgren, K.M., Hughes, A.R., Olyarnik, S.V. & Thornber, C.S. (2006) Predator diversity strengthens trophic cascades in kelp forests by modifying herbivore behavior. *Ecology Letters* 9(1): 61-71.

Caro, A.U. & Castilla, J.C. (2004) Predator-inducible defences and local intrapopulation variability of the intertidal mussel *Semimytilus algosus* in central Chile. *Marine Ecology Progress Series* 276:115-123.

Caro, A.U., Escobar, J., Bozinovic, F., Navarrete, S.A. & Castilla, J.C. (2008) Phenotypic variability in byssus thread production of intertidal mussels induced by predators with different feeding strategies. *Marine Ecology Progress Series* 372:127-134.

Creel, S. & Christianson, D. (2008) Relationships between direct predation and risk effects. *Trends in Ecology and Evolution* 23: 194-201.



- Dayton, P.K., Rosenthal, R.J., Mahen, L.C. & Antezana, T. (1977) Population structure and foraging biology of the predaceous Chilean asteroid *Meyenaster gelatinosus* and the escape response of its prey. *Marine Biology* 39: 361–370.
- Escobar, J.B. & Navarrete, S.A. (2011) Risk recognition and variability in escape responses among intertidal molluscan grazers to the sunstar *Heliaster helianthus*. *Marine Ecology Progress Series* 421: 151-161.
- Espoz, C. & Castilla, J.C. (2000) Escape responses of four Chilean intertidal limpets to sea stars. *Marine Biology* 137:887-892.
- Freeman, A. (2006) Size-dependent trait-mediated indirect interactions among sea urchin herbivores. *Behavioral Ecology*, 17: 182–187.
- Hagen, N.T., Anderson, A. & Stabell, O.B. (2002) Alarm response of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, induced by chemical labeled durophagous predators and simulated acts of predation. *Marine Biology* 140: 365–374.
- Hawkins, L.A., Armstrong J.D. & Magurran A.E. (2004) Predator-induced hyperventilation in wild and hatchery Atlantic salmon fry. *Journal of Fish Biology*, 65, 88–100.
- Jacobsen, H.P., & Stabell, O.B. (2004). Antipredator behaviour mediated by chemical cues: the role of conspecific alarm signalling and predator labelling in the avoidance response of a marine gastropod. *OIKOS* 104: 43–50.
- Kats, L.B. & Dill, L.M. (1998) The scent of death: chemosensory assessment of predation risk by prey animals. *Ecoscience*, 5, 361–394.
- Kéfi, S., Berlow, E.L., Wieters, E.A., Navarrete, S.A., Petchey, O.L., Boit, A., Joppa, L.N., Lafferty, K.D., Williams, R.J., Martinez, N.D., Menge, B.A., Blanchette, C.A., Iles, A.C. &

Brose, U. (2012) More than a meal... integrating non-feeding interactions into food webs. *Ecology Letters*, 15, 291-300.

Lima, S.L. (1998) Non lethal effects in the ecology of predator- prey interactions. *BioScience* 48: 25-34.

Lima, S.L. & Dill, L.M. (1990) Behavioral decisions made under risk of predation: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology* 68: 619-640.

Lively, C.M. (1986) Predator-Induced shell dimorphism in the acorn barnacle *Chthamalus anisopoma*. *Evolution* 40(2):232-242.

Mann, K.H., Wright, J.L.C. (1984). Responses of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* (O. F. Müller) to water-borne stimuli from potential predators and potential food algae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 79: 233-244.

Matassa, C.M. (2010) Purple sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus* reduce grazing rates in response to risk cues from the spiny lobster *Panulirus interruptus*. *Marine Ecology Progress Series*, 400, 283-288.

Miner, B.G., Sultan, S.E., Morgan, S.G., Padilla, D.K. & Relyea, R.A. (2005) Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution*: 20, 685-692.

Navarrete, S.A., Manzur, T. (2008) Individual- and population-level responses of a keystone predator to geographic variation in prey. *Ecology* 89: 2005-2018.

Pangle, K.L., Peacor, S.D. & Johannsson, O.E. (2007) Large nonlethal effects of an invasive invertebrate predator on zooplankton population growth rate. *Ecology* 88: 402- 412.

Peckarsky, B.L., Cowan, C.A., Penton, M.A. & Anderson, C. (1993) Sublethal consequences of streamdwelling predatory stoneflies on mayfly growth and fecundity. *Ecology* 74: 1836-1846.

- Phillips, D.W. (1978). Chemical Mediation of Invertebrate Defensive Behaviors and the Ability to Distinguish Between Foraging and Inactive Predators. *Marine Biology* 49: 237–243.
- Preisser, E.L., Bolnick, D.I. & Benard, M.F. (2005) Scared to death? The effects of intimidation and consumption in predator–prey interactions. *Ecology*, 86, 501–509.
- Schmitt, R.J. (1981). Contrasting anti-predator defenses of sympatric marine gastropods (Family Trochidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 54, 251–263.
- Sih, A., Crowley, P., McPeck, M., Petranka, J., & Strohmeier, K. (1985) Predation, Competition, and Prey Communities: A Review of Field Experiments. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 269-311.
- Smee, D.L., Ferner, M.C. & Weissburg, M.J. (2008) Alteration of sensory abilities regulates the spatial scale of nonlethal predator effects. *Oecologia* 156: 399–409.
- Trussell, G.C., Ewanchuk, P.J. & Bertness, M.D. (2003) Trait-mediated effects in rocky intertidal food chains: predator risk cues alter prey feeding rates. *Ecology*, 84, 629-640.
- Trussell, G.C., Ewanchuk, P.J. & Bertness, M.D. & Silliman, B.R. (2004) Trophic cascades in rocky shore tide pools: distinguishing lethal and nonlethal effects. *Oecologia* 139: 427–432.
- Trussell, G.C., Ewanchuk, P.J. & Matassa, C.M. (2006b) Habitat effects on the relative importance of trait- and density-mediated indirect interactions. *Ecology Letters*, 9, 1245–1252.
- Trussell, G.C., Ewanchuk, P.J. & Matassa, C.M. (2006a) The fear of being eaten reduces energy transfer in a simple food chain. *Ecology*, 87, 2979-2984.
- Turner, A.M. & Montgomery S.L. (2003) Spatial and temporal scales of predator avoidance: Experiments with fish and snails. *Ecology* 84(3): 616–622.

Urriago, J.D., Himmelman, J.H. & Gaymer, C.F. (2011) Responses of the black sea urchin *Tetrapygus niger* to its sea-star predators *Heliaster helianthus* and *Meyenaster gelatinosus* under field conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 399: 17–24.

Van Buskirk, J., & Arioli, M. (2002) Dosage response of an induced defense: How sensitive are tadpoles to predation risk? *Ecology* 83:1580–1585.

Werner, E.E. & Peacor, S.D. (2003) A review of trait-mediated indirect interactions in ecological communities. *Ecology*, 84, 1083-1100.

Wisenden, B.D. (2000) Olfactory assessment of predation risk in the aquatic environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 355: 1205–1208.

## CAPÍTULO 1

---

### **Scales of detection and escape of the sea urchin *Tetrapygus niger* in interactions with the predatory sun star *Heliaster helianthus*.**

Tatiana Manzur<sup>a, b, \*</sup> & Sergio A. Navarrete<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Estación Costera de Investigaciones Marinas & Center for Advanced Studies in Ecology and Biodiversity, Pontificia Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile.

<sup>b</sup> Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas (CEAZA), Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Larrondo 1281, Coquimbo, Chile.

Corresponding Author e-mail: tmanzur@bio.puc.cl

Keywords: Non lethal predator effects, escape, detection, spatial scale

## **Abstract**

Predators can simultaneously have lethal (consumption) and non lethal (modification of traits) effects on their prey. Prey escape or fleeing from potential predators is a common form of a non-lethal predator effect. The efficiency of this response depends on the prey's ability to detect and correctly identify its predator far enough to increase the probability of successful escape, yet short enough to allow it to allocate time to other activities (e.g. foraging). In this study, we characterized the non lethal effect of the sun star *Heliaster helianthus* on the black sea urchin *Tetrapygus niger* by assessing the nature of predator detection and the spatial scale involved both in predator detection and in the escape response. Through field and laboratory experiments we demonstrate that *T. niger* detects chemical cues released by *H. helianthus*. In the laboratory, these chemical signals can be detected at distances of up to about 50 cm. In the field, the distance traveled by urchins when escaping, after recognition of the predation risk, was also restricted to about 40 cm. Thus, considering the sizes of the predator and prey, the spatial scale of both detection and escape is comparatively small suggesting that non lethal effects of *H. helianthus* (e.g. how it modifies the behavior of *T. niger*) should be important at local spatial scales and highly variable at the landscape scale.

## **1. Introduction**

In natural systems predators can simultaneously have lethal (consumption) and non lethal (modification of traits) effects on their prey, which in many cases can indirectly affect the community (e.g. trait-mediated trophic cascades; Turner and Mitchellback, 1990; Abrams et al., 1996; Schmitz, 1997). Experimental studies have shown that in some situations, the non-lethal effects of predators on natural communities can be as strong or even stronger than the lethal effects on the prey species (Trussell, 2004; Trussell et al., 2006 a; Trussell et al., 2006b; Matassa, 2010). Non lethal effects are important because they frequently lead to immediate and fast responses, they

can simultaneously affect a large number of individuals and can have an effect throughout the lifespan of the prey (Lima, 1998a; Turner and Montgomery, 2003; Werner and Peacor, 2006). Therefore, there is a need to elucidate the nature, magnitude and variability of non lethal predator effects on prey, as well as lethal effects.

The mechanisms that reduce predation risk are usually costly for prey in that they can reduce survival, foraging or reproduction (Lima and Dill, 1990; Lima, 1998b). Therefore, the prey responses should be rapid, flexible (reversible) and specific (low recognition error) to minimize these costs (Hagen et al., 2002). Among these flexible responses, reduction in activity, use of refugia, avoidance and escape have been documented (Kats and Dill, 1998; Wisenden, 2000). Active escape, in which prey flee to get out of reach of potential predators or to seek a refuge is widespread among many marine taxa (Dayton et al., 1977; Phillips, 1978; Schmitt, 1981; Mann, 1984; Espoz and Castilla, 2000; Jacobsen and Stabell, 2004; Escobar and Navarrete, 2011). Successful escape requires prey to accurately assess predation risk using visual, mechanical or chemical “cues” released by either predators or injured con or heterospecifics (Kats and Dill, 1998), in a way that allows the prey to anticipate and increase the chances of surviving an attack. The sensory mode and physical environment affects information transfer between predator and prey and strongly affects detection distance (Sih, 1997, Smee et al., 2010). Therefore, understanding of non lethal predator effects requires that the types of detection cues be identified.

The distance over which preys react to predators (perception distance) and the spatial extension and duration of the escape responses will largely determine the spatio-temporal scale of non-lethal predator effects in the system (Turner and Montgomery, 2003; Smee et al., 2008). This two components, predator detection and escape distances, along with predator-prey encounter rates, will affect the ecological importance of the non lethal effects of predators at larger spatial scales. Yet, most studies have only characterized prey escape responses in the laboratory, usually maximizing the predator signal and physically restricting the spatial scale of animals’ movement, and only a few have estimated the scale of predator perception by the prey and the escape distances under field

conditions (see Turner and Montgomery, 2003; Smee et al., 2008, Urriago et al., 2011). Here, we show that a sea urchin prey can detect predatory sunstars at a distance by using chemical cues. We determined how specific is the response, measured the distance required for predator detection by the sea urchin and the distance of the escape response once the predator is detected.

Along the coast of central Chile, the black sea urchin, *Tetrapygyus niger* [Molina, 1782] (hereafter *Tetrapygyus*) is the most abundant echinoid in shallow subtidal environments down to about 40 m deep, but aggregations of this species are also common and abundant in intertidal pools, channels and the low intertidal zone of wave exposed and semi-exposed shores (Santelices, 1980; 1990; Stotz and Pérez 1990; Vásquez and Bushman, 1997). *Tetrapygyus* feed on most benthic algal species and small invertebrates (e.g. barnacles, limpets), thereby freeing primary space on rocky substrata (Contreras and Castilla, 1987; Camus et al., 2008, Stotz 1992). In subtidal habitats, *Tetrapygyus* is consumed mostly by the asteroid species *Meyenaster gelatinosus* [Meyen, 1834] and *Heliaster helianthus* [Lamarck, 1816] (Dayton et al., 1977; Gaymer & Himmelman 2008), and occasionally by fish (Rodríguez and Ojeda 1998). In the wave exposed intertidal zone, from where *M. gelatinosus* is absent, the sun star *Heliaster helianthus* (hereafter *Heliaster*) is by far the most important predator of *Tetrapygyus* (Castilla 1981, Castilla and Paine, 1987), although birds can also occasionally consume individuals found in shallow tidepools and channels (S. A. Navarrete pers. obs.). In a recent publication, Urriago et al. (2011), demonstrated through field manipulations in shallow subtidal areas (ca. 3 m deep) that adult individuals of *Tetrapygyus* respond rapidly to direct contact (simulated attacks) with *Heliaster* and *Meyenaster*. They further showed that a large fraction of urchin individuals (>80%) can detect the presence of these asteroid predators at close distances (< 20 cm), before physical contact, and that the escape response to *Heliaster* decays more rapidly with distance than to *Meyenaster*.

Our own observations and field manipulations of *Heliaster* in rocky intertidal shores in central Chile have shown that the experimental removal or natural absence of this sun star leads to a rapid increase in the abundance of black sea urchins on the low shore, at the interface of the subtidal-



intertidal zones (S.A. Navarrete unpublished data). These changes could be produced by decreased urchin mortality due to *Heliaster* (density effects), but the rapid response suggest that a non-lethal predator effect restricts the vertical incursion of urchins to the low intertidal shore during high tides. It is therefore of interest to further assessing the nature of this apparent non-lethal interaction.

The main goals of our study were to characterize the non lethal effects of *Heliaster* on *Tetrapygyus*, using laboratory and field experiments to specifically assess whether *Tetrapygyus* detects *Heliaster* using chemical cues released by the sun star and which are the spatial scales of detection and escape.

## 2. Methods

Laboratory experiments were carried out at the Estación Costera de Investigaciones Marinas located in Las Cruces (33°30' S, 71°30' W), central Chile, between 2009 and 2010. The *Tetrapygyus* and *Heliaster* individuals were collected from the low intertidal and shallow subtidal shore near the laboratory. Urchins and sun stars were maintained in separate 100 l running seawater tanks (for no longer than 4 days), and were food deprived for 24 to 48 h prior to trials. Fieldwork to assess the duration and distance of escape responses was conducted by free-diving in large channels that were relatively protected from direct wave action (to the south of the laboratory), but still subjected to high surf swash and currents.

### 2.1. Escape Response in the field

We ran field experiments at the interface intertidal-subtidal zone to determine the responses of an undisturbed *Tetrapygyus* (individuals that were not moving and that were not near a sea star) exposed to three manipulations, (1) direct contact with *Heliaster* (17.4 to 24.0 cm), by placing 2-3 of the sun star arms on top on the side of an urchin for up to 180 s, (2) direct contact (same procedure than with *Heliaster* but with one arm) with the sea star *Stichaster striatus* (13.0 to 18.7

cm), which does not prey on black sea urchins, and (3) direct contact with a plastic tube, a control for the effect of mechanical contact (see Escobar and Navarrete, 2011). Our preliminary observations, suggested that aggregated urchins might respond different than isolated individuals to predatory risks and, therefore, we tested the above assays including single and aggregated urchins into our experimental design. Under the turbulent conditions typically encountered at the transition between the intertidal and the shallow subtidal zones, it was not possible to unequivocally identify a sea urchin response when a sun star were placed a distance away and therefore all field assays were conducted only considering direct contact with the asteroids and mechanical control. To ensure independence of observations, each assay was performed with 15 different prey individuals (ranging between 3.0 and 8.0 cm in diameter) found in aggregations and 15 more individuals in isolation, all located tens of meters from each other. Predator individuals were used once. Once a sea urchin was chosen for the experiment, it was randomly assigned to one of the three treatments. In each assay, we quantified whether and when the urchin reacted (lifting and movement of spines and/ or elongation and movement of podia) within 6 min of contact, the total distance traveled and the total time until the urchin stopped moving. After this, we measured the size of the sea-urchin and expressed the distance traveled in units of body length (distance traveled/individual body length), to reduce possible variation due to size.

## 2.2. Predator Detection by Prey

To determine whether the urchin could detect water-borne chemical cues of the predator, we performed laboratory assays in which individual urchins were exposed to *Heliaster* exudates in a rectangular plastic tank (0.20 x 1.40 x 0.10 m) supplied with running sea water. The urchin was placed at the outlet (downstream) of the tank and the treatment solutions were added 1 m upstream from urchins. Three solutions were tested: 1) 7 ml of *Heliaster* exudates mixed with 3 ml of the dye methylene blue ('*Heliaster*' treatment). The dye allowed us to observe the displacement of the exudates in the tank. 2) 7 ml of raw seawater mixed with 3 ml of methylene blue ('Methylene'

treatment). This treatment allowed us to determine whether the dye had an effect on the behavior of the urchin and 3) 10 ml of raw seawater ('Control' treatment), to allow us to determine whether the addition of a solution alone affected the urchin. Since this experiment was designed only to determine that chemical cues were in some way involved in the process of predator detection, we arbitrarily decided to use these cue concentrations. *Heliaster* exudates were prepared by immersing a single individual (24.0 to 29.0 cm in diameter) for 3 h in an 8 l tank with filtered (45  $\mu$ m) seawater.

Each assay was performed with a different sea urchin and the urchin's behavior was observed for 5 min after the addition of the treatment solution. Prior to each assay, the urchin was allowed to acclimate in the experimental tank for 5 to 10 min, but it was discarded if it continued moving after this time. The occurrence and type of urchin behavioral response indicating predator detection (elongation and movement of podia, lifting and movement of spines, and displacement) and the time to respond were registered continuously following the addition of the treatment solution. A total of 10 adult individuals ( $7.4 \pm 0.1$  cm in diameter) were tested for each treatment. Between trials, the experimental tank was washed with ethanol (70%), thoroughly scrubbed and rinsed with fresh water and then with filtered sea water.

### 2.3. *Detection distance*

To estimate at which distance the urchin can detect the sun star, we ran laboratory trials in which urchins (6.2 to 8.6 cm in diameter) were placed at different distances, 0-10, 10-40 and 40-70 cm, from sun stars (19.0 to 26.0 cm), both under still (no flow) and flowing water conditions ('flow' of 1 l/min). One urchin was tested at a time and in each trial the sun star was placed upstream of the urchin. We further ran a control treatment in which we recorded the behavior of the urchin in the absence of a sun star. Ten trials were run for each treatment (distance and flow conditions). Replicate trials of each distance and flow condition treatments were performed with different, randomly chosen urchin and sun star. Urchins were placed in the experimental 40 l (0.20 x 1.50 x 0.13m) tanks for a 5-10 min acclimation period before placing the sun star in the tank, and the

urchin's responses were observed for a period of 5 min. Sun stars were tethered with a string to the tank wall to prevent them from attacking the urchin. The number of reacting urchins (displaying the behaviors described above), the time to respond (detection time) and the exact distance of the urchin from the sun star at the time of first response were measured.

#### 2.4. Data Analysis

To evaluate if black sea urchins were capable of detecting water-borne chemical cues from the predator, we compared the frequency (%) of response between "Control", "Methylene" and *Heliaster* treatments using the Log likelihood Chi-square test ( $G^2$ ) in a contingency table (Sokal and Rohlf, 1981).

To evaluate how detection changes with distance to predator, we compared the frequencies of responding urchins among distance ranges and between flowing and still water using log-linear modeling, a generalized linear model extension of contingency tables (Agresti, 1996). In addition, to determine the critical predator-prey distance at which the probability of detection of the predator decreased to near zero, we used logistic regression between the binary response variable (whether urchins responded or not) and the measured distance between predator and prey. Since there were no differences in detection frequency between flowing and still sea water (see Results), the logistic regression was performed on pooled data for this treatment to increase degrees of freedom.

Differences in detection times among different distance ranges and sea water flows were assessed first with a two-way factorial analysis of variance (ANOVA), with distance ranges and still/flow water as fixed factors. Again, no main effect of flow or its interaction with distance were significant at  $\alpha=0.05$  (Flow:  $F_{1,3}= 0.37$ ,  $P=0.5441$ ; Flow x Distance,  $F_{3,71}= 0.63$ ,  $P= 0.5978$ ), or using a the more conservative significance level of  $\alpha=0.25$  suggested by Winer et al. (1991). Therefore, we pooled data from the two flow conditions and conducted a one-way ANOVA to compare distances.

The frequencies at which urchins responded and escaped to the stimulus in the field were compared among the different treatments and between levels of aggregation using log-linear modeling. The reaction time and the standardized displacement distances were analyzed separately with a two-way factorial ANOVA, with treatment and aggregation as fixed factors. Data were square root transformed to improve homoscedasticity and normality.

### 3. Results

#### 3.1. Escape Response in the field

In field trials, all (100%) urchins that were touched with *Heliaster* initiated an escape response within 8 s of contact, regardless of whether they were alone or in aggregations (Fig. 1a, b). The reaction time was significantly faster in the *Heliaster* than in the other two treatments and there was no interaction with aggregation level (Table 1a). In contrast, when urchins were stimulated with a plastic tube (control) or with *Stichaster* fewer than 50% of the individuals responded (Fig 1a). Although there appeared to be a difference in the proportion of individuals responding when they were alone compared to being in aggregations (Fig. 1a), the log-linear analysis showed only a significant effect of treatment and no interaction between treatment and aggregation level (Table 2a). Since lack of interaction between these factors might have been driven by the absence of variation in responses in the *Heliaster* treatment (central bars in Fig. 1a), we further contrasted the prey responses between control and *Stichaster* (eliminating the *Heliaster* treatment), correcting probabilities for multiple testing with the Bonferroni adjustment. In this case, the log linear analysis showed no significant differences between the control and *Stichaster* treatments, but a higher proportion of urchins responding when single than when in aggregations (Table 2b).

The maximum distance moved by an urchin escaping from the predator stimulus did not exceed 45 cm. Sea urchins traveled longer distances when stimulated by *Heliaster* than with *Stichaster* or the plastic tube (Control) the other two treatments (Fig. 1c), and the distance traveled varied significantly depending on whether the individuals were single or aggregated (Table 1b). In general

and across treatments, single individuals traveled longer distances than individuals in aggregations (Table 1). In addition, urchins spent more time escaping when stimulated by *Heliaster* (128.9 s  $\pm$ 11.7) than in other two treatments (Control: 37.6 s  $\pm$ 11.1; *Stichaster*: 35.5 s  $\pm$ 12.5), and, across treatments, this time was greater when individuals were single (42.9 s  $\pm$ 8.6) than when they were in aggregations (91.7 s  $\pm$ 13.0).

### 3.2. Predator Detection by Prey

In laboratory experiments to evaluate the nature of predator detection, the higher frequency of individuals that modified their behavior in the *Heliaster* treatment than in the other treatments (Fig.2, Log likelihood Chi-square Test;  $G^2=17.369$ ,  $df= 2$ ,  $p= 0.0002$ ) indicated that the black sea urchin was capable of detecting chemical signals that *Heliaster* released into the sea water. Frequency of response was similar between the water only and the water with methylene treatments.

### 3.3. Detection distance

In experimental trials, to determine responses at different distances from the predator, we observed that when no predators were added, only a small percentage (< 20%) of urchins displayed a response akin to predator detection (elongating and moving podia and or lifting and moving spines and/or displacement) within the 5 min observation window (Fig. 3). The average detection time of this treatment group was nearly 5 min (Fig. 3b). In contrast, when a predator was added at distances between 0 and 10 cm, all (100%) sea urchins responded within 30 seconds and when the predator was placed between 10 and 40 cm away, over 90% of urchins reacted, although the reaction time increased to more than 120 s (Fig. 3). Placing the predator at distances between 40 and 70 cm from the prey elicited a response in less than 35% of the prey and the time to react was similar to that in the control treatment (Fig. 3). Thus, predator-prey distance had significant effects

on the number of urchins responding (Table 3) and on detection time (One Way ANOVA pooling flow and still water,  $F_{3, 75} = 46.145$ ,  $P = 0.0001$ ).

Finally, the logistic regression applied to the data on detection distances showed that the probability of detection decreased rapidly after a distance of 54 cm, reaching near zero probability of detection at about 70 cm (Fig 4,  $R^2 = 0.6131$ ,  $P = 0.0001$ ).

#### 4. Discussion

In this study we demonstrated that under field conditions encountered at the interface between intertidal and subtidal zones, the sea urchin *Tetrapygus niger* can recognize and quickly escape from simulated attacks by the sun star *Heliaster helianthus*. The linear distance (displacement) of the escape response varied depending on whether urchins were in isolation or in aggregations, but it did not surpass 50 cm. Through laboratory manipulations, we demonstrate that urchins can detect water-borne predator cues and that the detection distance takes place in a few tens of centimeters.

As previously shown for a number of other sea urchin species (Tegner and Levin, 1983; Mann et al., 1984; Scheibling and Hamm, 1991; Hagen et al., 2002), *Tetrapygus* uses water-borne chemical cues to detect its predator prior to physical contact, and actively responds with an escape response initially involving extending and opening its globiferous pedicellariae and raising spines. The same mechanism of chemical predator recognition has been attributed to the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* when it detects the sea star *Pycnopodia helianthoides* at a distance (Phillips, 1978). In the case of *Tetrapygus niger*, Rodriguez and Ojeda (1998) in the laboratory and Urriago et al. (2011) in the field demonstrated that urchins can respond to predation threats imposed by seastars (*Meyenaster gelatinosus* and *Heliaster helianthus*) before physical contact takes place, suggesting again the capacity to detect water-borne cues.

Several studies have reported stronger responses of urchins when there is detection of a predator that has been feeding on conspecifics (Parker and Shulman, 1986; Hagen et al., 2002). Since intertidal *Heliaster* feed mostly on mussels, limpets and only occasionally on urchins (Navarrete

and Manzur, 2008), and our focus was on characterizing the scale of the predator-induced response by urchins found in the subtidal-intertidal interface to the mostly intertidal *Heliaster*, we did not include a treatment of starfish feeding on conspecifics in this study. Results show that *Tetrapygus* recognize and display a clear response to the presence of waterborne cues of *Heliaster*, even though the sun stars had been starved for at least 24 h prior to assays. Moreover, additional laboratory experiments (Manzur, unpublished data) showed that feeding and non-feeding (on urchins) *Heliaster* have the same effect on urchin behavior and feeding rates. Recognition of waterborne cues from starved predators have also been observed for *S. droebrachiensis*, which reduces its foraging rate in the presence starved *P. helianthoides* (Freeman, 2006) and from starved echinivorous *Cancer borealis* (McKay and Heck, 2008). Thus, while further experiments are needed to evaluate whether the magnitude of the urchin response varies with predator's diet and general foraging activity, it seems that *Tetrapygus* and other urchin species can react to the mere presence of a predator.

We conducted laboratory trials under still and flowing water conditions to evaluate potential effects on urchin behavior. These two conditions are not meant to reproduce the complex turbulent environment and high flows that can be encountered in wave exposed intertidal shores (Denny, 1988). The physical environment is expected to largely influence both prey and predator perception, and therefore, the environmental context must be considered when attempting to predict the spatio-temporal scale of non-lethal responses and the extent of the indirect effects of predators in natural systems (Powers and Kittinger, 2002; Smee et al., 2008, Smee et al., 2010). As expected, in this laboratory study detection was less likely (fewer prey individuals respond) with increasing distance from the predator (Fig 2a) and it occurred faster at shorter distances (10-20 cm, Fig 3b). Similar results were obtained by Urriago et al. (2011) in the field at about 2-10 m deep in the shallow subtidal zone of Bahia Cisnes, northern Chile. In those field trials, Urriago et al. (2011) determined that *Tetrapygus* can detect *Heliaster* up to 30 cm away, a shorter distance than the about 50 cm estimated from our laboratory studies under controlled conditions. We believe that these differences



are probably related to the local turbulence and currents encountered the days of the field trials, which were undoubtedly more complex than those recreated in our laboratory trials. Evidence from other predator-prey systems suggest that turbulence and increased water velocity diminishes the probability of predator detection by prey (Smee and Weisburg, 2006), or prey detection by predators (Weisburg and Zimer-Faust, 1993), coincident with the observed difference between ours and Urriago et al. (2011) study. But there is also evidence that suggest that hydrodynamic effects on prey detection distance vary with the strength or quality of the predator chemical cue under different physical conditions (Smee and Weisburg, 2006), and/or on the risk that prey assign to a particular predator under particular environmental conditions. Further advances in this predator-prey system can be possible only through the combination of laboratory experiments and field observations under a wide range of environmental conditions because, on the one hand, although further experiments under controlled flow can shed light on predator and prey perception, we can not reproduce in the laboratory realistic levels of turbulence and wave forces typical of the intertidal-subtidal interface. On the other hand, these same conditions restrict field observations to comparatively mild environments such as bays and subtidal areas (e.g. Urriago et al. 2011).

The behavior of urchins to the predator at distances beyond 40-50 cm (See Results: *Detection Distance*; Fig. 3a), was similar to that observed in the control treatment without a predator. This suggests that there is some error in attributing behavioral responses to predator detection in these assays. But even with a determination error of about 20% (proportion of urchins displaying ‘detection behavior’ in the controls), the detection frequency at shorter distances was significantly higher. Thus, urchins do not appear to be able to detect *Heliaster* at distances greater than about 50 cm. Urriago et al. (2011) found an even shorter detecting distance of 30 cm to *Heliaster*, but a detection distance of 50 cm to the presence of *Meyenaster gelatinosus*. It is unclear whether 50 cm distance reflects an absolute limitation in the urchin’s sensory abilities to detect any predator or in the strength or quality of the chemical signal of asteroid predators. Perhaps these short distances are sufficient to allow the urchin to use a successful escape from these relatively slow moving

predators. This hypothesis should be evaluated by making field observations of successful and unsuccessful predator attacks.

In our study, whether *Tetrapygyus* was isolated or in aggregation did not change the proportion of individuals responding or their reaction time, but it did reduce the distance traveled while escaping (Fig. 1). This suggests that the time needed by urchins to recognize a threat depends on the type (identity) of stimulus and the physical environment, and that once a predation threat has been recognized, the aggregation changes sea urchin perception of risk (i.e. aggregated individuals might perceive lower risk levels when within an aggregation than when alone). This explanation is in line with the increased “erroneous” responses of individuals to either the mechanical control or the non-predatory sun star observed when they were alone than when they were within an aggregation.

After an escape response was initiated, the distance traveled was within the scale of few centimeters, and the longest distance traveled did not exceeded 45 cm. Thus the spatial scale of escape response is comparatively small and generally corresponds to the critical detection distance. Thus the black sea urchin detects *Heliaster* and moves away to a distance at which predator signal is no longer perceived, meaning that for *Tetrapygyus* a predator- prey distance of about 50 cm seems to be perceived as sufficient to prevent predation by *Heliaster*. Whether such distance is indeed effective in limiting predation must be evaluated in the field since it is difficult to reproduce the physical characteristics of the natural environment in the laboratory. In any case, these distances seem rather small considering the sizes of the predator and prey (as compared to other systems) and suggest that either the risk of predation is low (e.g. urchin moves fast enough that there is no great risk), which seems at odds with our field observations, or the costs of the response is high for the urchins.

How intermediate consumers evaluate and respond to predation risk is important not only for the evolution of the system, but also because these foraging decisions contribute to the strength and prevalence of indirect predator effects (Large and Smee, 2010). Sea urchins are important herbivores, capable of structuring low intertidal and shallow subtidal habitats (Santelices, 1990;

Stotz, 1992) and, therefore, the non consumptive effects of its predators can have large impact on the low shore community. Our results show that *Tetrapygius* displays fast escape responses to *Heliaster* and that it is capable of detecting chemical cues released by the predator at distances up to about 50 cm under laboratory conditions. We also show that both detection and escape responses are restricted to comparatively small spatial scales (40 – 50 cm). Thus, possible indirect effects on the community, transmitted through behavioral modification, could be important at small spatial scales and must be highly variable at larger spatial scales, especially considering that *Heliaster* is a relatively sedentary species (Barahona and Navarrete, 2010). Therefore, consideration of spatial scale of non lethal predator effects, ideally under field conditions, must be considered when addressing the importance of behaviorally mediated indirect interactions in the community context.

### **Acknowledgments**

We thank Alba Canyelles, José Pantoja, Frauke Broer, Anna Dörgens, Alba Medrano and María Jesús Ovalle for invaluable assistance in the field and laboratory. Also, TM thanks Nelson Valdivia for valuable comments on early versions of the manuscript. Professor J. Himmelman and an anonymous reviewer provided invaluable comments and suggestion to improve this manuscript. This paper is in partial fulfillment to the Ph.D. degree of TM and it was possible thanks to a scholarship by Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT) and the support of an Andrew Mellon Foundation grant to SAN. Additional funding for this study comes from FONDAP-Fondecyt 15001-0001 and Fondecyt #1070335 grants to SAN, which we deeply appreciate.

## References

- Abrams, P.A., Menge, B.A., Mittelbach, G.G., Spiller, D.A., Yodzis, P., 1996. The role of indirect effects in food webs. In: Polis, G., Winemiller, K.O. (Eds.), *Food Webs: Integration of Patterns and Dynamics*. Chapman & Hall, New York, pp. 371-395.
- Agresti, A., 1996. *An Introduction to Categorical Data Analysis* John Wiley and Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, 357 pp.
- Barahona, M., Navarrete S.A., 2010. Movement patterns of the seastar *Heliaster helianthus* in central Chile: relationship with environmental conditions and prey availability. *Marine Biology* 157, 647–661
- Camus P.A. 2008. Diversidad, distribución y abundancia de especies en ensambles intermareales rocosos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43, 615-627.
- Castilla, J.C. ,1981. Perspectivas de investigación en estructura y dinámica de comunidades intermareales rocosas de Chile central. II. Depredadores de alto nivel trófico. *Medio Ambiente (Chile)* 5, 190–215.
- Castilla, J.C., Paine, R.T., 1987. Predation and community organization on Eastern Pacific, temperate zone, rocky intertidal shores. *Revista Chilena de Historia Natural* 60, 131-151.
- Contreras, S., Castilla, J.C., 1987. Feeding behavior and morphological adaptations in two sympatric sea urchin species in central Chile. *Marine Ecology Progress Series* 38, 217-224.
- Dayton, P.K., Rosenthal, R.J., Mahen, L.C., Antezana, T., 1977. Population structure and foraging biology of the predaceous Chilean asteroid *Meyenaster gelatinosus* and the escape response of its prey. *Marine Biology* 39, 361-370.
- Denny, M.W., 1988. *Biology and the Mechanics of the Wave-Swept Environment*. Princeton University Press. 329 pp.

Duggins D.O. 1983. Starfish predation and the creation of mosaic patterns in a kelp-dominated community. *Ecology* 64(6), 1610-1619.

Escobar, J.B., Navarrete, S.A., 2011. Risk recognition and variability in escape responses among intertidal molluscan grazers to the sunstar *Heliaster helianthus*. *Marine Ecology Progress Series*, doi: 10.3354/meps08883.

Espoz, C., Castilla, J.C., 2000. Escape responses of four intertidal limpets to seastars. *Marine Biology* 137, 887-892.

Freeman, A., 2006. Size-dependent trait-mediated indirect interactions among sea urchin herbivores. *Behavioral Ecology* 17, 182–187.

Gaymer, C.F., Himmelman, J.H., 2008. A keystone predatory sea star in the intertidal zone is controlled by a higher-order predatory sea star in the subtidal zone. *Marine Ecology-Progress Series* 370, 143-153.

Hagen, N.T., Anderson, A., Stabell, O.B., 2002. Alarm response of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, induced by chemical labeled durophagous predators and simulated acts of predation. *Marine Biology* 140, 365–374.

Jacobsen, H.P., Stabell, O.B., 2004. Antipredator behaviour mediated by chemical cues: the role of conspecific alarm signalling and predator labelling in the avoidance response of a marine gastropod. *OIKOS* 104, 43-50.

Kats, L.B., Dill, L.M., 1998. The scent of death: chemosensory assessment of predation risk by prey animals. *Ecoscience* 5, 361–394.

Large, S.I., Smee D.L., 2010. Type and nature of cues used by *Nucella lapillus* to evaluate predation risk. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 396 (2010), 10–17.

Lima, S.L., 1998a. Nonlethal effects in the ecology of predator- prey interactions. *BioScience* 48, 25-34.

Lima, S.L., 1998b. Stress and decision making under the risk of predation: recent developments from behavioral, reproductive, and ecological perspectives. *Advances in the Study of Behavior* 28, 215–290.

Lima, S.L., Dill, L.M., 1990. Behavioral decisions made under risk of predation: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology* 68, 619–640.

Mann, K.H., J.L.C, W., 1984. Responses of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* (O. F. Müller) to water-borne stimuli from potential predators and potential food algae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 79, 233-244.

Matassa, C.M., 2010. Purple sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus* reduce grazing rates in response to risk cues from the spiny lobster *Panulirus interruptus*. *Marine Ecology Progress Series* 400, 283–288.

McKay K.M., Heck K.L. Jr., 2008. Presence of the Jonah crab *Cancer borealis* significantly reduces kelp consumption by the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Marine Ecology Progress Series* 356, 295–298.

Navarrete, S.A., Castilla, J.C., 2003. Experimental determination of predation intensity in an intertidal predator guild: dominant versus subordinate prey. *Oikos* 100, 251-262.

Navarrete, S.A., Manzur, T., 2008. Individual- and population-level responses of a keystone predator to geographic variation in prey *Ecology* 89, 2005-2018.

Parker, D.A., Shulman, M.J., 1986. Avoiding predation: alarm responses of Caribbean sea urchins to simulated predation on conspecific and heterospecific sea urchins. *Marine Biology* 93, 201– 208.

Phillips, D.W., 1978. Chemical Mediation of Invertebrate Defensive Behaviors and the Ability to Distinguish Between Foraging and Inactive Predators. *Marine Biology* 49, 237-243.

Powers, S.P., Kittinger J.N., 2002. Hydrodynamic mediation of predator– prey interactions: differential patterns of prey susceptibility and predator success explained by variation in water flow. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 273, 171–187.

Rodríguez, S.R., Ojeda, F.P., 1998. Behavioral responses of the sea urchin *Tetrapygus niger* to predators and food. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 31, 21-37.

Rodríguez, S.R., Ojeda, F.P., 1993. Distribution patterns of *Tetrapygus niger* (Echinodermata: Echinoidea) off the central Chilean coast. *Marine Ecology Progress Series* 101, 157-162.

Santelices, B., 1980. Muestreo cuantitativo de comunidades intermareales de Chile central. *Archivos de Biología y Medicina Experimental* 13, 413-424.

Santelices, B., 1990. Patterns of organization of intertidal and shallow subtidal vegetation in wave exposed habitats of central Chile. *Hydrobiologia* 192, 35-57.

Scheibling, R.E., Hamm, J., 1991. Interactions between sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*) and their predators in field and laboratory experiments. *Marine Biology* 110, 105–116.

Schmitt, R.J., 1981. Contrasting anti-predator defenses of sympatric marine gastropods (Family Trochidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 54, 251-263.

Schmitz, O.J., Beckerman, A.P., O'Brien, K.M., 1997. Behaviorally mediated trophic cascades: effects of predation risk on food web interactions. *Ecology* 78, 1388–1399.

Sih, A., 1997. To hide or not to hide? Refuge use in a fluctuating environment. *Trends in Ecology and Evolution* 12, 375-376.

- Smee, D.L., Weissburg, M.J., 2006. Clamming up: environmental forces diminish the perceptive ability of bivalve prey. *Ecology* 87, 1587–1598.
- Smee, D.L., Ferner, M.C., Weissburg, M.J., 2008. Alteration of sensory abilities regulates the spatial scale of nonlethal predator effects *Oecologia* 156, 399-409.
- Smee, D.L., Ferner, M.C., Weissburg, M.J., 2010. Hydrodynamic sensory stressors produce nonlinear predation patterns. *Ecology* 91, 1391–1400.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1981. *Biometry*. W.H. Freeman & Co., New York, 859 pp.
- Stotz, W., Pérez, E., 1990. ¿Son los fondos blanqueados desiertos o áreas sobreexplotadas? Décima Jornada de Ciencias del Mar. Santiago, 28-30 Mayo 1990.
- Stotz, W., González S.A., López, C., 1992, Repoblación experimental del erizo rojo *Loxechinus albus* (Molina) en la costa expuesta del centro-norte de Chile: Efectos del erizo negro *Tetrapygus niger* (Molina) sobre el establecimiento y crecimiento de los juveniles. *Investigaciones Pesqueras (Chile)* 37, 107-117.
- Tegner, M.J., Levin, L.A., 1983. Spiny lobsters and sea urchins: analysis of a predator–prey interaction. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 73, 125–150.
- Trussell, G.C., Bertness, M.D., Silliman B.R., 2004. Trophic cascades in rocky shore tide pools: distinguishing lethal and nonlethal effects. *Oecologia* 139, 427-432.
- Trussell, G.C., Ewanchuk, P., Matassa, C., 2006a. The fear of being eaten reduces energy transfer in a simple food chain. *Ecology* 87, 2979–2984.
- Trussell, G.C., Ewanchuk P.J., Matassa C.M., 2006b. Habitat effects on the relative importance of trait- and density mediated indirect interactions. *Ecology Letters* 9, 1245–1252.



- Turner, A., Mittelbach, G., 1990. Predator avoidance and community structure: interactions among piscivores, planktivores, and plankton. *Ecology* 71, 2241–2254.
- Turner, A.M., Montgomery, S.L., 2003. Spatial and temporal scales of predator avoidance: experiments with fish and snails. *Ecology* 84, 616-622.
- Vásquez, J.A., Buschmann, A.H., 1997. Herbivore-kelp interactions in Chilean subtidal communities: a review. *Revista Chilena de Historia Natural* 70, 41–52.
- Viviani C.A. (1978) Predación interspecífica, canibalismo y autotomía como mecanismo de escape en las especies de Asteroidea (Equinodermata) en el litoral del norte grande de Chile, Vol. Laboratorio de Ecología Marina, Universidad del Norte, Chile.
- Weissburg, M.J., Zimmer-Faust, R.K., 1993. Life and death in moving fluids: Hydrodynamic Effects on Chemosensory-Mediated Predation. *Ecology* 74, 1428-1443.
- Werner, E.E., Peacor, S.D., 2006. Lethal and Nonlethal predator effects on an herbivore guild mediated by system productivity. *Ecology* 87, 347-361.
- Winer, B.J., Brown, D.R., Michels, K.M., 1991. *Statistical principals in experimental design*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: McGraw-Hill.
- Wisenden, B.D., 2000. Olfactory assessment of predation risk in the aquatic environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 355, 1205–1208.

## Tables

**Table 1.** Two-way ANOVA for a) reaction time and b) standardized displacement for sea urchin individuals under different stimulus treatment and aggregation level. Bold face indicates significance at  $\alpha=0.05$ .

Source	DF	MS	F Ratio	P
<b>a) Reaction Time</b>				
Treatment	2	10,400	3,535	<b>0,0335</b>
Aggregation	1	3,512	1,194	0,2776
Treatment x Aggregation	2	0,442	0,150	0,8608
Error	85	2,942		
<b>b) Standardized Displacement</b>				
Treatment	2	13,090	43,071	<b>&lt;0.0001</b>
Aggregation	1	5,834	19,198	<b>&lt;0.0001</b>
Treatment x Aggregation	2	0,068	0,224	0,7999
Error	85	0,304		

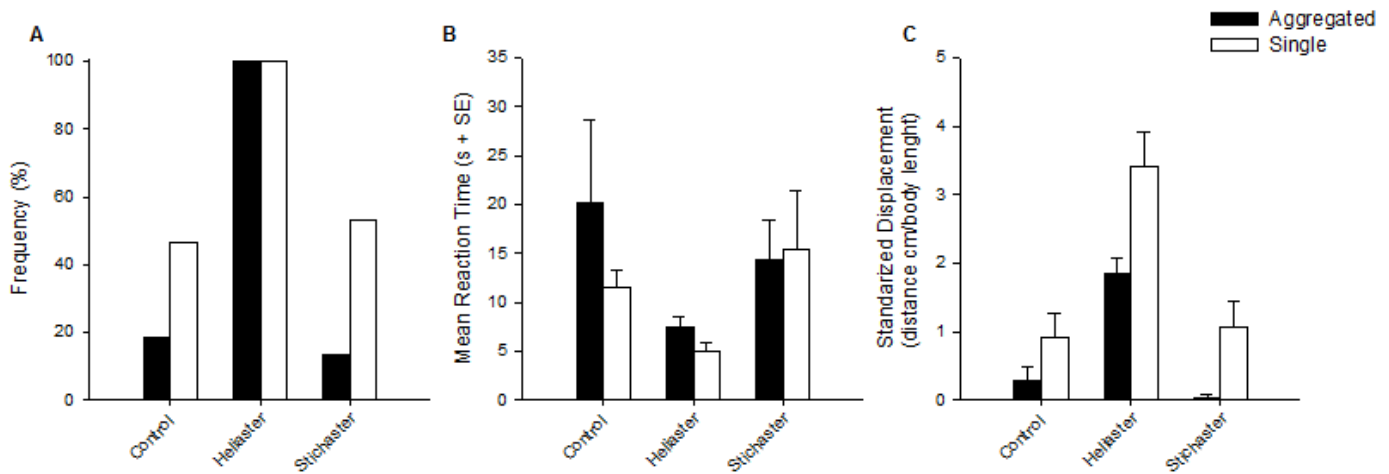
**Table 2.** Log linear analysis of the two-way contingency table for a) frequency of escape under the three considered treatments (*Heliaster*, Control y *Stichaster*) and for the two levels of aggregation (Aggregated, Single) and b) the same analysis but just considering Control and *Stichaster* treatments (see results for a detailed explanation). Bold face indicates significance at the Bonferroni corrected probability of  $\alpha'=0.0167$ .

Source	G <sup>2</sup>	DF	P
<b>a)</b>			
Treatment	48.850	2	<b>0.0001</b>
Aggregation	0.0001	1	0.9933
Treatment x Aggregation	0.300	2	0.8606
<b>b)</b>			
Treatment	0.013	1	0.9106
Aggregation	8.289	1	<b>0.004</b>
Treatment x Aggregation	0.300	1	0.5837

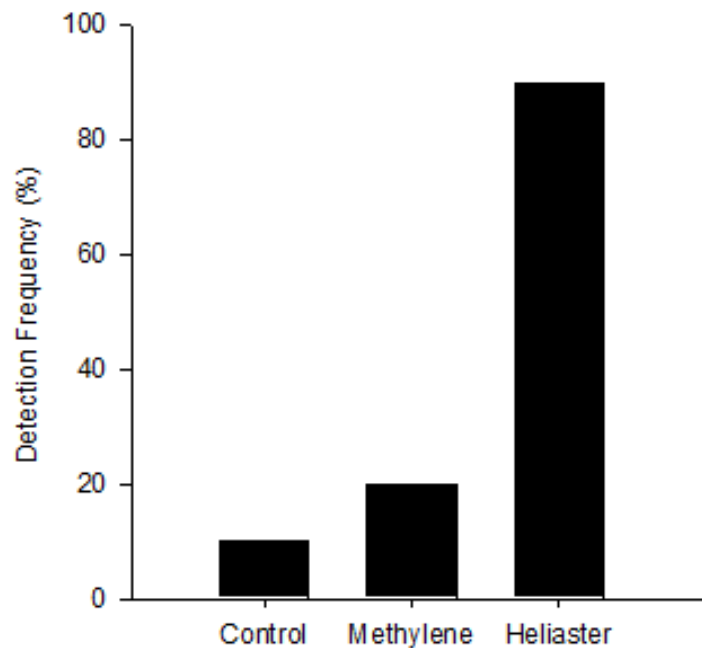
**Table 3.** Log linear analysis of the two-way contingency table for the four predator-prey distance ranges and for the two levels of sea water flow (Flow and Still Water (No Flow)) that behaviorally responds to predator presence. Bold face indicates significance at  $\alpha= 0.05$ .

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>G<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
Distance Range	3	56.143	<b>0.0001</b>
Flow	1	0.000	0.9932
Distance Range x Flow	3	5.272	0.1529

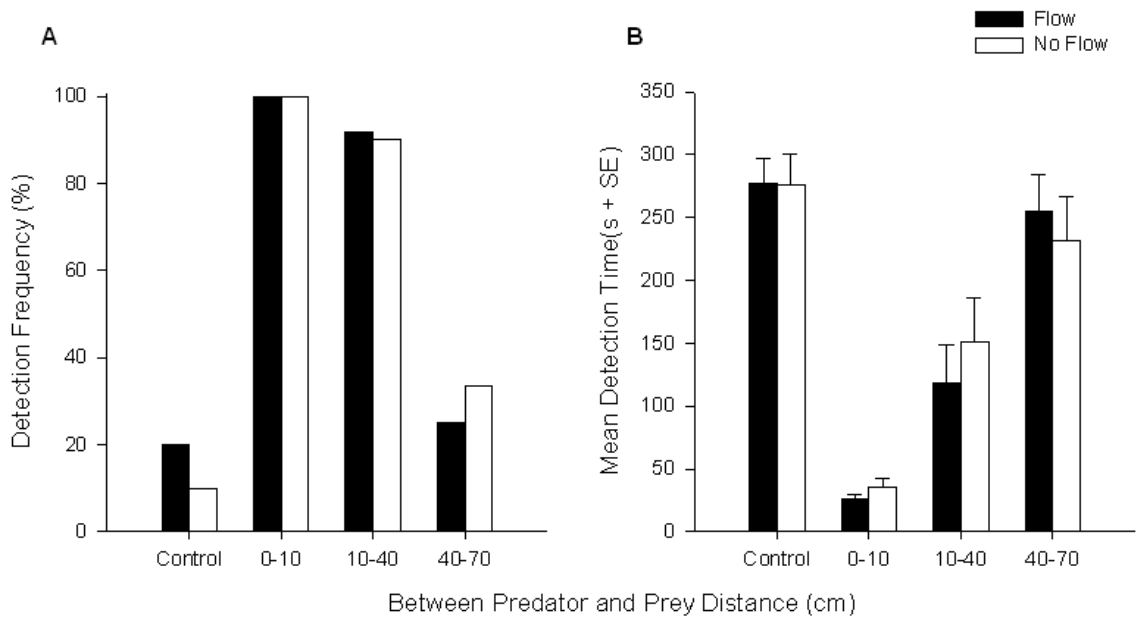
## Figures



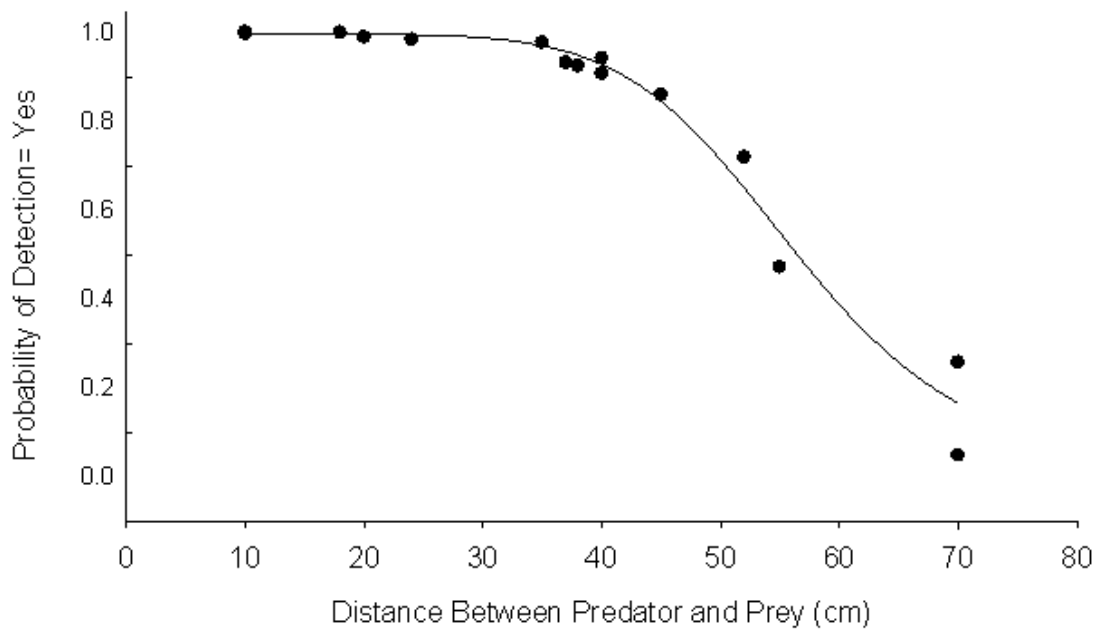
**Figure 1.** a) Frequency of escape, b) Mean reaction time and c) Mean standardized displacement distance (distance in cm/ body length +SE) by *Tetrapygis niger* under field conditions for grouped and single individuals for different treatments. Control: plastic tube; *Heliaster*: predator; *Stichaster*: non predatory sea star.



**Figure 2.** Frequency of chemical predator detection by *Tetrapygis niger* under laboratory conditions. C: control, PC: procedure control, *Heliaster*: predator chemical cues.



**Figure 3.** a) Frequency of predator detection and b) Mean detection time (s +SE) of predator presence by *Tetrapygyus niger* under laboratory conditions, for different between predator and prey distance ranges and different sea water flow velocities.



**Figure 4.** Logistic regression for the probability of detection at different distances between predator and prey in *Tetrapygyus niger*.

## CAPÍTULO 2

---

**Efecto del tiempo y del espacio sobre la conducta del erizo negro, *Tetrapygus niger*, frente a su depredador *Heliaster helianthus*.**

Tatiana Manzur y Sergio A. Navarrete

## Resumen

Los depredadores afectan la demografía y distribución de sus presas tanto a través de su consumo directo (efecto letal) cómo a través de los costos de las respuestas antidepredatorias desplegadas para reducir susceptibilidad a la depredación (efectos no letales). Dichas respuestas pueden manifestarse en cambios en la conducta de las especies presa, los que a su vez pueden afectar la forma y fuerza con que dichas presas interactúan con otras especies (e.g. recursos, competidores, entre otros). Así, las consecuencias de efectos no letales de los depredadores podrían afectar interacciones a nivel comunitario, transmitiéndose de manera indirecta a través de la trama trófica como efectos indirectos mediados por rasgo. Dado el costo que involucran para las presas, las respuestas antidepredatorias deben ser conmensurables con el nivel de riesgo percibido y, por lo tanto, su expresión y magnitud debe depender, entre otros factores, de la proximidad entre depredador y presa, de la distancia a la cual la presa es capaz de detectar al depredador y de la extensión espacial y la duración (persistencia temporal) de la respuesta antidepredatoria. De este modo, la escala espacial y temporal sobre la cual operan los efectos no letales de los depredadores pueden ser determinantes de su importancia ecológica tanto a nivel poblacional como comunitario y, por lo tanto, para entender el rol de efectos no letales de los depredadores en sistemas ecológicos, la escala espacial y temporal a la cual los depredadores inducen cambios en rasgos de sus presas debe ser evaluada. En este estudio, a través de experimentos en laboratorio, se investigó el efecto del riesgo de depredación por el asteroideo *Heliaster helianthus* sobre la conducta del erizo herbívoro *Tetrapygus niger*, evaluando cómo la importancia y magnitud del efecto no letal del depredador puede variar con la escala espacial a la cual dicho efecto es cuantificado y con el tiempo de exposición al riesgo de depredación. Adicionalmente, se estudió el efecto no letal de *Heliaster* sobre la interacción erizo-alga, evaluando si la respuesta antidepredatoria se transmite indirectamente en efectos positivos o negativos sobre el alga verde *Ulva sp.*

## Introducción

Los depredadores afectan la demografía y distribución de las especies presa tanto a través de consumo directo (efecto letal) como a través de inducir respuestas antidepredatorias en las presas (efectos no letales), las que tienden a reducir su susceptibilidad a la depredación, son fenotípicamente plásticas, e implican algún costo en los individuos (Miner et al. 2005; Creel & Christianson 2008; Lima & Dill 1990). Respuestas antidepredatorias fenotípicamente plásticas comunes en organismos marinos bentónicos incluyen cambios en morfología (e.g. cambio en el grosor de la concha en caracoles, forma y posición de la abertura en cirripedios, producción de biso en mitílidos (Appleton & Palmer 1988; Lively 1986; Caro & Castilla 2004; Caro *et al.* 2008), la fisiología (e.g. mayor tasa de respiración en peces y lapas (Barreto *et al.* 2003; Hawkins *et al.* 2004, Manzur *et al.* 2013), o la conducta (e.g. respuesta de escape activo de gastrópodos, bivalvos, chitones, equinodermos y otros, Espoz & Castilla 2000; Escobar & Navarrete 2011; Trussell *et al.* 2006; Urriago *et al.* 2011). Dado que las consecuencias de los efectos no letales de los depredadores sobre individuos presa pueden no solamente alterar la demografía de las poblaciones presa (e.g. Aranguiz-Acuña *et al.* 2011), sino también la de otros niveles tróficos en la comunidad, en la última década ha habido un fuerte incremento en estudios experimentales, primordialmente en laboratorio, que intentan documentar y cuantificar estos efectos indirectos mediados por cambios en rasgos (EIMR). Estos estudios han establecido la importancia de los EIMR sobre una variedad de procesos evolutivos y ecológicos a nivel comunitario y ecosistémico (Turner & Mittelbach 1990; Abrams *et al.* 1996; Schmitz *et al.* 1997; Agrawal *et al.* 1999; Preisser *et al.* 2005; Trussell & Smith 2000; Trussell *et al.* 2003; 2004; 2006; Matassa 2010; Hawlena & Schimtz 2010; Dee et al. 2012). En general, cuando la respuesta no letal implica la disminución en la habilidad y eficiencia de forrajeo, los efectos no letales pueden rápidamente propagarse y afectar la abundancia o tasas de crecimiento de niveles tróficos inferiores (Lima & Dill 1990; Lima 1998; Kéfi *et al.* 2012).

Dado que los efectos no letales de la depredación implican costos (disminución en reproducción y/o crecimiento) para las presas, las respuestas antidepredatorias fenotípicamente



plásticas deben ser rápidas, flexibles (reversibles) y específicas (bajo error de reconocimiento) para minimizar dicho costo (Hagen *et al.* 2002). De hecho, diversos estudios han demostrado que las especies presa son capaces de exhibir respuestas antidepredatorias que son commensurables con el nivel de riesgo percibido (Turner 1997; Van Buskirk & Arioli 2002; Turner & Montgomery 2003). Estas características, inherentes a las respuestas no letales, también implican que debe existir una escala espacial y temporal acotada y comparativamente limitada sobre la cual la respuesta se desarrolla, i.e. la expresión y la magnitud de la respuesta de la presa debe depender críticamente de la proximidad y frecuencia de encuentro entre depredador y presa, de la distancia a la cual la presa es capaz de detectar al depredador (que puede variar con las condiciones ambientales; Smee *et al.* 2008) y de la extensión espacial y la duración (persistencia temporal) de la respuesta antidepredatoria. Así, la escala espacial y temporal sobre la cual operan los efectos no letales de los depredadores serán determinantes de su importancia ecológica tanto a nivel poblacional como comunitario (Turner & Montgomery 2003). Si los efectos no letales decaen rápidamente en tiempo y espacio probablemente serán menos importantes a niveles de organización mayores (i.e. comunidad, ecosistema) que si persisten largamente o si se propagan extensamente en el espacio (Turner & Montgomery 2003). En gran parte son estas características de las respuestas no-letales las que dificultan su incorporación en modelos más complejos de interacciones entre especies (ver Kéfi *et al.* 2012), a la vez que complejizan la interpretación de la mayoría de los resultados de laboratorio, en donde depredador y presa son sujetos a escalas de confinamiento y duración de los encuentros bastante arbitrarios, y que sin lugar a dudas, alteran la magnitud y posiblemente la naturaleza de la respuesta no letal y el consecuente EIMR.

Debido a dificultades logísticas, pocos estudios han tratado de abordar estos problemas de escala en el diseño de experimentos de laboratorio que intentan evaluar respuestas no letales y EIMR (pero ver Manzur & Navarrete 2011; Urriago *et al.* 2011; Smee *et al.* 2008; Turner & Montgomery 2003 y una revisión por Dodson *et al.* 1994). En uno de estos pocos estudios, Turner & Montgomery (2003) cuantificaron empíricamente la dependencia entre la magnitud de la respuesta

antidepredatoria (cambio en el uso de hábitat) del caracol pulmonado *Physa acuta* y la escala de separación espacial (distancia entre depredador y presa) y temporal (tiempo o “edad” de señales químicas del depredador en el agua) con respecto al pez depredador *Lepomis gibbosus*.

Espacialmente, la respuesta conductual de *Physa* a *Lepomis* dependió de su proximidad; a una distancia de 0,4 m el uso de refugio fue de 88%, disminuyendo a menos de la mitad (40%) a una distancia de 6,4 m. Con respecto a la dependencia temporal de la respuesta, la adición de agua con señales químicas frescas del depredador (agua expuesta al depredador durante 2 horas antes del inicio del experimento) indujo en *Physa* un aumento en el uso de refugio de 38%, mientras que la adición de agua “envejecida” (agua expuesta al depredador durante 2 horas y reservada por 96 h antes de ser aplicada) indujo un aumento de sólo 7%. Es claro entonces que para poder interpretar el rol de efectos no letales en sistemas ecológicos complejos, la escala espacial y temporal a la cual los depredadores inducen cambios en rasgos de sus presas debe ser evaluada.

En este estudio trabajamos en laboratorio con un sistema depredador-presa para el cual se conocen las distancias de percepción del depredador por parte de la presa y de la respuesta de escape. A través de experimentos de laboratorio monitoreados en forma intensiva por 10 días y desarrollados en dos escalas de confinamiento distintas, intentamos caracterizar la magnitud y naturaleza de la respuesta antidepredatoria y de un posible EIMR.

El sistema de estudio seleccionado es el conformado por el erizo negro *Tetrapygyus niger* [Molina, 1782], especie omnívora que consume algas y algunos invertebrados (Contreras & Castilla 1987; Camus 2008; Stotz *et al.* 1992) y un depredador tope, el sol de mar *Heliaster helianthus*. Para evaluar la magnitud y dirección de un potencial EIMR, usamos el alga verde *Ulva* spp, que es rápidamente consumida por *Tetrapygyus niger* (Contreras & Castilla 1987; Rodríguez 2003; Navarrete y Camus 2008). El erizo negro es el equinoideo más abundante en el ambiente submareal somero aunque también es común observarlo en numerosas agregaciones en pozas intermareales, canales y en la zona intermareal baja de costas expuestas y semi-expuestas a lo largo de la costa de Chile (Santelices 1980; 1990; Stotz *et al.* 1992; Vásquez & Buschmann 1997). El sol de mar

*Heliaster helianthus* es el depredador más importante de *T. niger* en la zona intermareal (Castilla 1981; Castilla & Paine 1987) y uno de los más comunes en el sub mareal somero (Urriago *et al.* 2011).

Estudios en terreno y de laboratorio han demostrado que *T. niger* responde rápidamente y en forma específica a la presencia de *Heliaster*, tanto escapando activamente al contacto directo (ataques simulados de pocos segundos), lo que resulta en desplazamientos de alrededor de 45 cm antes de volver al estado de reposo (Manzur & Navarrete 2011), como detectando la presencia de este depredador en pocos minutos a distancias de hasta 20 cm en terreno y 50 cm bajo condiciones de laboratorio (Urriago *et al.* 2011; Manzur & Navarrete 2011, respectivamente). Considerando estos antecedentes experimentales de terreno y laboratorio que demuestran la rápida respuesta de escape de los erizos, es esperable que la presencia de *Heliaster* cambie la fuerza de interacción entre *Tetrapygyus* y sus recursos (EIMR) afectando la abundancia o distribución de algas en el submareal y la interfase intermareal-submareal, tal como se ha demostrado en otras otras especies de erizos (e.g. Duggins 1983; Freeman 2006; Hereu 2005). En este estudio investigamos cómo la magnitud y naturaleza de la respuesta de escape de *Tetrapygyus* varía con la escala espacial a la cual dicho efecto es cuantificado y con el tiempo de exposición al riesgo de depredación. Adicionalmente, cuantificamos la transmisión del efecto no letal de *Heliaster* sobre la interacción erizo-alga.

## **Materiales y Métodos**

Este estudio fue llevado a cabo en la Estación Costera de Investigaciones Marinas (ECIM) localizada en Las Cruces (33°30'S, 71°30'W), Chile central, entre Agosto y Octubre de 2010. Individuos adultos de *Heliaster helianthus* (diámetro máximo entre 20,2 y 24,2 cm) y de *Tetrapygyus niger* (diámetro máximo entre 6.47 y 7.72 cm) fueron recolectados desde la zona baja del intermareal rocoso en un sector aledaño a ECIM y transportados al laboratorio.

## **1. Cambio en la distribución de erizos frente a la presencia de soles en terreno**

Para cuantificar la existencia de un cambio en el uso de hábitat por parte de *Tetrapyrgus niger* en ausencia de *Heliaster helianthus*, en Junio 2011, se realizó un muestreo de erizos en un área experimental de la zona intermareal de Las Cruces, en donde se ha desarrollado una remoción manual de soles de mar en áreas experimentales replicadas desde el año 2007 con el objetivo de cuantificar cambios en la comunidad bentónica intermareal. Observaciones realizadas en este experimento de largo plazo son las que inspiraron este estudio y estudios anteriores (Manzur & Navarrete 2011). El experimento se desarrolla en una zona rocosa expuesta al oleaje con abundantes canalones y pozones abiertos al mar y comprende plots de alrededor de 6,5 m<sup>2</sup> (n=4), en donde la densidad de *Heliaster* se mantiene cercana a cero mediante remoción manual de los individuos que re-invasen cada 15 días, y otros de similar tamaño considerados controles (n=4), en los cuales se mantiene la densidad natural de *Heliaster*. Detalles de este experimento serán presentados en otra publicación. En este estudio se realizó un muestreo para cuantificar, mediante buceo apnea, la densidad de erizos justo en la zona de interfase entre el intermareal y el submareal. Para ello, en cada plot se definieron dos niveles de profundidad en función de la distancia con respecto al nivel más bajo de marea, el cual fue marcado en terreno con tubos de PVC® anclados a la roca. El primer nivel correspondió a una banda que va desde el nivel de referencia hasta -0.5 m de profundidad y el segundo correspondió a la banda entre -0.5 y -1.0 m bajo el nivel de mínima marea y alrededor de toda el área experimental. Así, en cada plot, se registró el número de erizos presentes en cada una de dichas bandas.

## **2. Efectos no letales en laboratorio a dos escalas de confinamiento**

En el laboratorio, se diseñó un experimento para evaluar la existencia de efectos no letales de *H. helianthus* sobre el forrajeo (número de eventos y duración del forrajeo) y sobre el patrón de actividad (movimiento) de individuos de *T. niger* a dos escalas espaciales de confinamiento (i.e. pequeña y grande). Los resultados fueron analizados separadamente para las primeras horas del

experimento (respuesta de corto plazo) y para tres diferentes periodos hasta el final del experimento a los 12 días (respuesta de largo plazo). Conjuntamente se evaluó el efecto de los erizos sobre cambios en biomasa del alga verde *Ulva sp.*, especie comúnmente consumida por *T. niger* en la zona intermareal (Navarrete & Camus 2008).

Las dos escalas espaciales de confinamiento en que se desarrolló el experimento, correspondieron a acuarios experimentales replicados de 29 l (escala pequeña) y de 130,5 l (escala grande). En ambos casos los acuarios fueron divididos en dos secciones por una malla de plástico de 3 cm<sup>2</sup> de abertura que permitió el libre flujo de agua a través del acuario. La entrada del agua de mar a los acuarios se localizó en la sección del depredador y la salida en la sección de la presa, asegurando el flujo desde el depredador al erizo objetivo. En una de las secciones se puso un individuo de *Tetrapyguis* y/o un trasplante de alga hecho con plantas frescas de *Ulva sp.* adheridas con pegamento a la superficie de una placa de acrílico de 14 x 14 cm. En la otra sección se aplicó uno de los tratamientos de riesgo de depredación, asignado aleatoriamente a cada acuario. Los cinco tratamientos de riesgo de depredación incluyeron: 1) Depredador no letal en ayuno (+Hnl), en el que se incluyó un individuo de *Heliaster* en una de las secciones del acuario separado del erizo objetivo por la malla de plástico impidiendo ataques, pero permitiendo el libre flujo de señales químicas en el agua. El depredador no fue alimentado durante el experimento. 2) Depredador no letal alimentado (+Hnle), tratamiento igual al interior, pero en este caso un individuo de *T. niger* fue introducido en la sección del depredador. Así *Heliaster* podía perseguir, atacar y consumir este erizo, pero no el erizo objetivo. Los erizos depredados fueron remplazados con nuevos individuos. Este tratamiento permitió evaluar el efecto de la depredación sobre conespecíficos en la conducta del erizo objetivo. 3) Depredador “letal” (+Hl), en el cual el depredador fue ubicado en el acuario en la misma sección del erizo objetivo. Con este tratamiento no se intentó evaluar efectos de consumo del sol de mar sobre *T. niger*, sino que reproducir la respuesta de escape activo tras una persecución, simulando lo que se observa en terreno (Manzur & Navarrete 2011). De ocurrir ataques con resultado de muerte, el erizo muerto fue remplazado por otro individuo. 4) Control sin

depredador (-H), con el cual se contrastó la conducta de los erizos con respecto a los otros tratamientos. Además de estos cuatro tratamientos de riesgo de depredación, se consideró 5) Control sin erizo ni depredador (-H-E) y sólo con el trasplante de *Ulva sp.* en acuarios de 20 l, para controlar los cambios autogénicos (crecimiento, degradación) en la biomasa de algas y poder evaluar los potenciales efectos de efluentes, ya sean del depredador o de la presa (e.g. Peterson & Renaud 1989; Weidner *et al.* 2004), sobre el crecimiento de algas. Este tratamiento no se incluyó en los acuarios grandes ya que no se observaron efectos significativos (ver Resultados). Pero en todos los acuarios, chicos y grandes, se controló por cambios autogénicos en la biomasa de algas, incluyendo un trasplante de algas (8 x 8 cm) adherido a una de las paredes del acuario pero protegido por una caja de la malla de plástico gruesa (apertura 1 cm<sup>2</sup>), impidiendo que los erizos se alimentaran del alga. Todas las algas empleadas en los trasplantes fueron recolectadas en terreno dos días antes de inicio del experimento, inmediatamente pegadas a las placas de acrílico y mantenidas en agua de mar circulante y aireación continua. Todos los trasplantes fueron pesados en una balanza de precisión el mismo día en que se inicio el experimento. Antes de ser pesados y para remover el exceso de agua, los trasplantes fueron centrifugados en una centrifuga para ensaladas por aproximadamente 30s. Antes de iniciar los experimentos, tanto los erizos como los soles de mar fueron mantenidos durante 7 días en ayuno en acuarios separados de 100 l con agua de mar circulante y aireación para aclimatación y estandarizar el nivel de hambre entre los individuos experimentales, y disminuir además las diferencias debidas a distintas dietas en el ambiente natural.

Los experimentos fueron mantenidos durante 12 días, luego de los cuales tanto los erizos como los soles de mar fueron retirados y devueltos a la zona del intermareal desde donde fueron removidos. El registro de la conducta de los erizos fue realizado mediante grabación continua con cámaras web ubicadas arriba de cada acuario experimental y conectadas a computadores, usando un software que permite realizar grabación de múltiples cámaras simultáneamente (Active WebCam v.10.1®). Durante la noche, se usaron luces infrarrojas sobre los acuarios para facilitar el registro con las cámaras. El análisis de los videos fue realizado por un mismo observador y consistió en el

registro del tiempo que los erizos estuvieron en reposo y en movimiento en cada acuario durante el día y la noche. Adicionalmente, en el análisis de videos, se cuantificó la conducta de forrajeo de los erizos, durante el día y la noche, de dos maneras distintas: a) se cuantificó el tiempo en que un erizo fue observado sobre el trasplante de algas y b) el número de veces distintas (eventos) que un erizo fue observado comiendo. Ambas medidas se consideraron proxies de la conducta de forrajeo debido a que por la posición de las cámaras fue difícil determinar con certeza si el erizo estaba efectivamente comiendo del alga durante todo el tiempo que se encontró sobre el trasplante. Al considerar el número de eventos, se disminuye esta potencial sobreestimación del tiempo alimentándose.

### **3. Transmisión de efectos no letales a las algas**

La transmisión de los efectos no letales de *Heliaster* a las algas, a través de cambios en la conducta de forrajeo de erizos, fue evaluada estimándose la biomasa consumida de *Ulva sp.* en los trasplantes, pesando las algas con una precisión de 0,01g (siguiendo el mismo procedimiento de centrifugado descrito anteriormente) al final del experimento y sustrayendo el peso inicial.

## **4. Análisis de datos**

### **4.1. Cambio en la distribución de erizos frente a la presencia de soles en terreno**

Para evaluar si existen cambios significativo en el uso de hábitat (migración desde el submareal hacia el intermareal bajo) por parte de *Tetrapygus niger* en ausencia del depredador *Heliaster helianthus* se comparó la densidad de erizos (individuos/m<sup>2</sup>) entre plots Control y Exclusión de *Heliaster* para las bandas de profundidad entre 0 (marca de referencia en el intermareal bajo) y 0,5 m y la banda entre 0,5 y 1 m, con un ANOVA de dos vías con Depredador y 'Profundidad' como factores fijos. Los datos fueron transformados a logaritmos para cumplir con los supuestos de homocedasticidad y normalidad.

### **4.2. Efectos no letales en laboratorio a dos escalas de confinamiento**

#### 4.2.1. Respuesta conductual de corto plazo

El análisis de los resultados del experimento se dividió entre respuestas rápidas o de corto plazo que pueden ocurrir a los minutos u horas luego de la percepción de un riesgo de depredación (similar a las respuestas observadas anteriormente en terreno y laboratorio, ver Manzur & Navarrete 2011), y respuestas de más largo plazo (días) que permiten además evaluar efectos transmitidos a las algas. Las respuestas de corto plazo se evaluaron en bloques consecutivos de tiempo de 30 minutos cada uno, desde iniciado el experimento y hasta completar dos horas (0-30, 30-40, 60-90 y 90-120 min), usando las observaciones de las dos primeras horas de grabación del primer día del experimento y durante oscuridad. En cada uno de estos bloques de tiempo y en cada réplica del experimento, en los dos tamaños de acuario, se cuantificó el tiempo que los erizos pasaron en reposo y en movimiento (activos sin comer), así como la duración y número de eventos de forrajeo. La duración de forrajeo y el tiempo en movimiento se analizaron como el total de minutos en que un individuo fue observado en movimiento o forrajeando en cada uno de los bloques de 30 minutos.

El tiempo en movimiento también se expresó como la proporción de tiempo en movimiento con respecto al tiempo total en que el individuo no se encontraba comiendo (movimiento + reposo), de manera que esta proporción de tiempo en movimiento es independiente del tiempo de forrajeo. Puesto que los 4 bloques de tiempo constituyen medidas repetidas sobre las mismas unidades experimentales, el análisis de tiempo en movimiento de *Tetrapygyus* se realizó con un MR-ANDEVA, factorial de dos-vías de medidas repetidas, incluyendo los 3 primeros bloques de tiempo ( $t=3$ ), considerando el tratamiento riesgo de depredación como factor fijo con cuatro niveles (+Hl, +Hnl, +Hnle o -H) y tamaño de acuario como factor fijo con dos niveles (pequeño o grande). No fue posible incluir el último bloque de tiempo en este análisis (90-120 min) debido a la total ausencia de movimiento en dos tratamientos de depredador en los acuarios pequeños (ver Resultados). Se utilizó la corrección de Greenhouse-Geisser para ajustar las probabilidades cuando los datos no cumplieron con el supuesto de esfericidad requerido para MR-ANDEVA (Crowder & Hand 1990; Von Ende



1993). El análisis de medidas repetidas fue seguido de ANDEVA de dos vías separadas para cada bloque de tiempo para observar las tendencias temporales.

La duración de los eventos de alimentación sobre las algas, así como el número de eventos de forrajeo no pudieron ser analizados con MR-ANDEVA por la ausencia total de forrajeo en los acuarios grandes (ver Resultados). Los análisis estadísticos de forrajeo se restringieron entonces a los acuarios pequeños. Además, en los acuarios pequeños ningún erizo en el tratamiento sin depredador (-H) fue observado comiendo (ver Resultados), por lo que dicho tratamiento fue diferente a todos los demás y no fue incluido en las comparaciones estadísticas. Por lo anterior, el análisis estadístico de tiempo y eventos de forrajeo consistió en ANDEVA de una vía separados para cada bloque de tiempo, considerando riesgo de depredación como factor fijo con tres niveles (+Hnl, +Hl, +Hnle). En todos los casos se analizaron los datos crudos dado que cumplían con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

En el caso de existir diferencias significativas entre los tres niveles de riesgo de depredación y de no existir interacciones significativas, se usaron contrastes planeados ortogonales para evaluar: a) diferencias entre el tratamiento con depredador “letal” (+Hl) y los dos tratamientos con depredador no letal (+Hnl y +Hnle), y b) diferencias entre el tratamiento con depredador no alimentado (+Hnl) y el tratamiento con depredador alimentándose de conoespecíficos (+Hnle).

#### **4.2.2. Respuesta conductual de largo plazo**

Para evaluar la respuesta conductual de más largo plazo en individuos de *Tetrapygyus* expuestos en forma crónica a los tratamientos de riesgo de depredación, se calculó el tiempo en movimiento y el tiempo total de los eventos de forrajeo del total de tiempo de grabación de cada día (% del total de tiempo), así como el número de eventos de forrajeo observados cada día desde el segundo día de experimento y hasta el final a los 12 días. Además, las observaciones se clasificaron según horas luz (entre 7:00 y 18:30 horas) y horas oscuridad (entre 18:31 y las 6:59 horas). La estandarización por el número de minutos de grabación efectiva registradas cada día se

uso para eliminar pequeñas diferencias en el largo de los registros, producidas por fallas en el registro digital, baja calidad de la imagen, o fallas en las cámaras web. Previo al análisis estadístico, se examinó la variabilidad en el movimiento y forrajeo a través de los días. Este análisis visual mostró tendencias temporales marcadas en la escala de 12 horas (día versus noche) y tendencias temporales más sutiles a una escala temporal de aproximadamente 3-4 días (ver Resultados). Dada la baja replicación del experimento ( $n=3$ ), debida a restricciones logísticas (imposibilidad de realizar monitoreos continuos por 12 días en un número mayor de unidades experimentales), que impide analizar todas las observaciones como medidas repetidas, y a la falta de independencia entre observaciones día y noche, se decidió analizar separadamente las respuestas observadas en el día y la noche y agregar las observaciones en 3 bloques de tiempo de 4 días: 1-4, 5-8 y 9-11 días. El tiempo en movimiento se analizó como el total del tiempo en que individuos fueron observados en movimiento del total de minutos registrados cada día, y además cómo la proporción de tiempo en que un erizo fue observado moviéndose del total del tiempo en movimiento y reposo, separándolo del tiempo de forrajeo. Análisis de varianza de medidas repetidas de dos vías, considerando los tres bloques de tiempo ( $t=3$ ) fueron usados para analizar los tiempos en movimiento bajo el tratamiento de riesgo de depredación (factor fijo con 4 niveles) y tamaño de acuario (factor fijo con 2 niveles). Para identificar tendencias temporales, el análisis fue seguido de ANDEVA de dos vías separados para cada bloque de tiempo. El tiempo total de forrajeo (del total de tiempo registrado) y el número de eventos de forrajeo durante el día se analizó con MR-ANDEVA de una vía debido a la ausencia de forrajeo en algunas combinaciones de tamaño de acuario y riesgo de depredación (ver Resultados). En el caso de la duración y el número de eventos de forrajeo durante la noche, el análisis consideró los dos factores (Tamaño de acuario y Riesgo de Depredación). Adicionalmente, durante horas de luz, ningún erizo comió en los acuarios grandes bajo el tratamiento +HI, por lo que se realizaron análisis de ANDEVA de una vía considerando acuarios pequeños (ver Resultados). En general los datos crudos presentaron distribuciones aproximadamente normales y homogeneidad de varianzas entre grupos. En caso de heteroscedasticidad, se usó una transformación a raíz cuarta para

estabilizar las varianzas. En ambos análisis se consideraron los mismos contrastes planeados en caso de significancia del factor riesgo de depredación, pero además el primer contraste fue para evaluar diferencias entre los tres tratamientos con depredador y el control sin depredador (-H).

#### **4.3. Transmisión de efectos no letales a las algas**

Antes de la evaluación del efecto de tratamientos (tamaño de acuario y riesgo de depredación) sobre el crecimiento de *Ulva sp.* y debido a pequeñas diferencias inevitables en la biomasa inicial de algas entre réplicas, examinamos si la tasa de producción/pérdida de alga estaba relacionada con la biomasa inicial de los trasplantes. Para ello, se realizó una regresión lineal entre la diferencia del peso húmedo del alga (biomasa inicial menos la final) y la biomasa inicial, encontrándose sólo una débil relación negativa entre ambas variables (ver Resultados), por lo que decidimos que la simple diferencia entre la biomasa final e inicial es un buen estimador del cambio en biomasa de algas.

Para determinar si los efluentes liberados tanto por los soles de mar como por los erizos (e.g. nutrientes en forma de Ión Amonio) afectaron la tasa de crecimiento del alga, se comparó mediante un ANDEVA de una vía el cambio en la biomasa de algas observada en los trasplantes protegidos de la herbivoría al interior de cada acuario experimental (expresado como  $CU_{\text{SinHerbivoría}} = [\text{biomasa final} - \text{biomasa inicial}] / \text{días} / \text{área}$ , en  $\text{g} \cdot \text{día}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) y la tasa de crecimiento de *Ulva sp.* medida en el tratamiento control sin depredador sin herbívoro (-H-E). En caso de significancia, mediante contrastes planeados se puso a prueba si: a) la combinación de efluentes de soles de mar y erizos afectó el crecimiento de *Ulva sp.* (Tratamientos +Hnl, +Hnle, +Hl versus -H-E) y b) el efluente de erizos por sí solo difirió del control sin efluentes (-H versus -H-E).

Para evaluar el efecto de los tratamientos de depredador y tamaño de acuario sobre la biomasa de algas, se calculó el crecimiento del alga por unidad de área en trasplantes expuestos a herbivoría por los erizos en cada réplica ( $CU_{\text{ConHerbívoro}}$ ) sustrayendo la tasa de crecimiento de *Ulva sp.* por unidad de área observada en los trasplantes protegidos de la herbivoría ( $CU_{\text{SH}}$ ). De esta

manera, los cambios en la tasa de crecimiento entre tratamientos de depredador son atribuibles solo al consumo por los erizos. Dado que no se encontró un efecto de los efluentes del depredador o del herbívoro sobre la tasa de crecimiento de *Ulva sp.* (ver Resultados), para comparar entre tratamientos se realizó un ANDEVA de dos vías con tamaño de acuarios (pequeños, grandes) y depredador (+Hnl, +Hnle, +HI, -HI), seguido por los mismos contrastes planeados descritos anteriormente para los efectos de depredador.

## **Resultados**

### **1. Cambio en la distribución de erizos frente a la presencia de soles en terreno**

La densidad de erizos en los plots control, en los cuales *Heliaster* estaba presente, fue significativamente menor que en los plots de exclusión, pero especialmente en la parte más superficial (primera banda) del submareal (Fig. 1, ANOVA 2 vías, Interacción Depredador x Profundidad:  $F= 8,962$ ,  $GL= 1, 12$ ,  $P= 0,0112$ ). El efecto principal de depredador también fue significativo (Depredador:  $F= 9,243$ ,  $GL= 1, 12$   $P= 0,0103$ ) pero no así el efecto de profundidad.

### **2. Efectos no letales en laboratorio a dos escalas de confinamiento**

#### **2.1. Respuesta conductual de corto plazo**

En el corto plazo (primeras dos horas), el tiempo en movimiento de *Tetrapygyus niger* fluctuó entre 0 y más del 80% del total del tiempo de observaciones (sin considerar tiempo alimentándose) y varió entre los distintos tratamientos de riesgo de depredación y entre los dos tamaños de acuario (Fig. 2). El porcentaje de tiempo que los erizos fueron observados en movimiento fue mayor en los tres tratamientos con depredador que en el tratamiento sin depredador (-HI) durante los primeros 60 minutos del experimento, pero este efecto se observó solamente en los acuarios pequeños (Fig 2, paneles superiores). Transcurridos 60 minutos, el movimiento de los erizos en ausencia de soles de mar (-H) aumentó, llegando a niveles comparables a los observados en los otros tratamientos mientras que hacia el final del tiempo, los erizos en algunos tratamientos con soles no se movieron

(Fig. 2). En los acuarios grandes no se observaron diferencias consistentes entre los tratamientos (Fig. 2, paneles inferiores).

El tiempo en movimiento fue significativamente menor en acuarios pequeños que en acuarios grandes a través del tiempo, pero no se observó un efecto significativo de la presencia del depredador o de la interacción entre ambos factores (Apéndice, Fig. S1, Tabla 1). Promediando a través de los tratamientos, no se observó un efecto significativo del tiempo o de la interacción con los factores tamaño de acuario y riesgo depredación (Tabla 1).

Analizando en mayor detalle los cambios temporales, los análisis dentro de bloques de tiempo (i.e. cada 30 min) mostraron que el tiempo en movimiento tendió a ser más alto en acuarios grandes que en acuarios pequeños, siendo en algunos casos hasta 6 veces mayor, sin embargo, dicha diferencia sólo fue significativa en los primeros 60 minutos del experimento (Fig. 2; Material Suplementario S1; ANOVA 2 vías sobre tiempo en movimiento expresado en segundos, Tamaño de Acuario  $_{0-30 \text{ min}}$ :  $F= 7,6090$ ,  $GL= 1,16$ ,  $P= 0,014$  y Tamaño de Acuario  $_{30-60 \text{ min}}$ :  $F= 12,4776$ ,  $GL= 1,16$ ,  $P= 0,0028$ ). Pasada una hora, dicha diferencia en la actividad entre acuarios pequeños y grandes se pierde y entre los 90 y 120 minutos la diferencia reaparece pero la comparación no es posible por la ausencia de movimiento en dos de los tratamientos de depredador (+Hl, +Hnl) en acuarios pequeños (Fig.2, Tabla 2). El tiempo en movimiento de *T. niger* no mostró ningún cambio temporal significativo en el efecto del tratamiento del riesgo a depredación a ningún tamaño de acuario (i.e. Factor Depredador no significativo para todos los bloques de tiempo; Tabla 2).

El tiempo comiendo y el número de eventos de forrajeo de los erizos fue marcadamente distinto a los distintos tamaños de acuario i.e. en los acuarios grandes no ocurrió ningún evento de forrajeo durante las dos primeras horas del experimento mientras que en los acuarios pequeños comieron desde el inicio (Fig. 3). Considerando solamente los acuarios pequeños, en dos de los cuatro periodos de tiempo analizados, los erizos no comieron en ausencia de depredador (-H; Fig. 3). En los dos periodos en que sí se observaron eventos de forrajeo (primer y último bloques

temporales), la duración y número de eventos de forrajeo fue menor en ausencia del depredador (-H; Fig. 3), pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 2).

## **2.2. Respuesta conductual de largo plazo**

En general, la respuesta conductual de los erizos mostró tendencias temporales muy marcadas en la escala diaria (“ciclos día-noche”) y sutiles en la escala de 3-4 días a lo largo de los 11 días de experimento. Aunque la magnitud de los ciclos diarios varió entre los distintos tratamientos de riesgo a depredación, se observó mayor actividad durante horas de oscuridad que durante horas luz (tanto en el tiempo en movimiento como en la duración y el número de eventos de forrajeo, independientemente del tamaño del acuario (Material Suplementario S2-S7). Con respecto a las tendencias temporales en función del tamaño del acuario, el tiempo en movimiento tendió a disminuir en los acuarios grandes y a aumentar en los acuarios pequeños (S2 y S3), especialmente en horas de oscuridad, dando cuenta de una posible interacción entre la escala espacial y temporal a la cual es evaluada esta respuesta conductual del erizo negro. A diferencia de lo observado con el tiempo de movimiento, el tiempo comiendo (S4 y S5) y el número de eventos de forrajeo (S6 y S7) no mostraron tendencias de largo plazo, ni tampoco diferencias en las tendencias temporales en función de la escala espacial, pero sí un marcado ciclo día-noche con mayor forrajeo durante la noche. El análisis visual de las series de tiempo para las distintas variables consideradas, sugiere la existencia de cambios en el nivel de actividad cada ca. cuatro días, patrón que si bien varía en función de la variable analizada, es consistente a través de tamaños de acuario y tratamientos de depredador (S2- S7). Por lo tanto, el análisis a continuación se basó en comparaciones separadas para observaciones durante horas luz y horas oscuridad y agrupando en “bloques” temporales de cuatro días.

Durante horas de luz, los erizos en acuarios pequeños pasaron menor tiempo en movimiento que en acuarios grandes (Fig. 4) y este efecto varió a través del tiempo (Tabla 3, Intra-sujetos). Promediando a través de los tres períodos de tiempo, se observó un efecto consistente del tamaño de

acuuario, pero no se observó un efecto significativo del tratamiento de riesgo a depredación o de la interacción entre ambos factores (Tabla 3, Inter-sujetos). Examinando tratamientos dentro de cada bloque temporal, no se observó ningún efecto significativo de la presencia del depredador sobre el tiempo en movimiento pero sí un claro efecto del tamaño de acuarios, siendo significativamente mayor en acuarios grandes que en acuarios pequeños durante todo el tiempo que duró el experimento (Fig. 4, Tabla 4).

En el caso de la proporción de tiempo comiendo (Fig. 5) y el número de eventos de forrajeo (Fig. 6) durante el día, se observó un mayor número de eventos y de mayor duración en acuarios pequeños que grandes. A su vez, en los acuarios pequeños se observó una tendencia hacia una mayor actividad de forrajeo en presencia que en ausencia del depredador. Sin embargo, el análisis dentro de bloques temporales donde fueron posibles las comparaciones (ver Materiales y Métodos) no mostró efectos significativos ni del tamaño del acuario ni del tratamiento de riesgo a depredación (Tabla 4).

Durante horas de oscuridad, el tiempo en movimiento de los erizos fue significativamente mayor en acuarios grandes que pequeños pero el efecto fue distinto en los distintos tratamientos de riesgo a depredación y también varió a través del tiempo (Fig. 7; Tabla 5 Intra-sujetos), sugiriendo que esta respuesta conductual del erizo frente a su depredador es dependiente del tiempo de exposición al riesgo y de la distancia entre depredador y presa (Tabla 5). En los dos primeros bloques temporales, el tiempo en movimiento fue significativamente mayor en acuarios grandes que en acuarios pequeños pero no fue diferente entre tamaños de acuarios durante los últimos tres días del experimento (Fig. 7; Tabla 6). En los primeros cuatro días del experimento, se observó una interacción significativa entre el tamaño de acuario y el tratamiento de depredador (Fig. 7; Tabla 6), debido a que los erizos en el tratamiento control (-H) se movieron durante más tiempo en acuarios pequeños pero desplegaron la conducta opuesta en acuarios grandes. Esta interacción no fue significativa en los periodos sucesivos.

En el caso de la proporción de tiempo comiendo (Fig. 8) y el número de eventos de forrajeo (Fig. 9) durante la noche, no se observaron diferencias debidas a la presencia del depredador ni tampoco tendencias o cambios marcados en el tiempo (Tabla 5). Dentro de bloques temporales, sólo se analizó el efecto del tratamiento depredador (ver Materiales y Métodos), sin encontrarse un efecto significativo de dicho factor sobre la conducta de forrajeo de *T. niger* (Tabla 6). Con respecto a la escala espacial, aún cuando el análisis no es posible, es claro que los erizos en acuarios pequeños se alimentaron más veces y por tiempos más prolongados que los erizos en acuarios grandes (Fig. 8 y 9).

### 3. Transmisión de efectos no letales a las algas

Durante el curso del experimento, los cambios en la biomasa del alga *Ulva sp.* se relacionaron débilmente con la biomasa inicial del trasplante ( $r^2= 0,209$ ; Información suplementaria S8) y, por lo tanto, la simple diferencia en biomasa (Delta Biomasa) se consideró como un buen estimador del crecimiento del alga. En los trasplantes protegidos de la herbivoría, el cambio observado en la biomasa de algas ( $CU_{SH}$ ) no fue distinto del cambio observado en el tratamiento control (-H-E), lo que demuestra que los efluentes liberados al medio por los erizos y los soles de mar no tuvieron un efecto significativo sobre el crecimiento de las algas (ANDEVA de una vía;  $F= 0,5626$ ;  $GL= 4,22$ ;  $P= 0,6922$ ). En general, el consumo de algas de los erizos ( $CU_{CH}$ ) fue bajo, no superando los  $0,003$  g/día/cm<sup>2</sup> (Fig. 10).

La tasa de forrajeo de erizos mostró diferencias significativas entre los distintos tamaños de acuario, i.e. los erizos consumieron una mayor cantidad de biomasa de algas en acuarios pequeños que grandes (Fig. 10; ANDEVA dos vías; Tamaño de acuario:  $F= 9,6324$ ;  $GL= 1, 16$ ;  $P= 0,0068$ ), lo que coincide con la tendencia hacia un mayor número de eventos de forrajeo y de mayor duración en acuarios pequeños (ver arriba), sobre todo durante horas de oscuridad. No se observó un efecto consistente del tratamiento de riesgo a depredación al contrastar el consumo de algas de erizos en presencia y ausencia de *Heliaster* a través de los dos tamaños de acuario (ANDEVA dos



vías; Depredador:  $F= 0,371$ ;  $GL= 3, 16$ ;  $P= 0,7749$ ), pero si se observó un efecto significativo de la interacción entre tamaño de acuario y depredador (ANDEVA dos vías; Tamaño de acuario x Depredador:  $F=3,636$ ;  $GL= 3, 16$ ;  $P= 0,0358$ ). Esta interacción se explica por la fuerte diferencia en el consumo de algas por los erizos en los tratamientos con depredador letal (+HI) y control sin depredador (-HI) entre acuarios pequeños y grandes (Fig. 10). Los erizos en acuarios pequeños, en ambos tratamiento de depredador, mostraron los mayores consumos de *Ulva sp.*, pero en acuarios grandes no se observó consumo sino, por el contrario, las algas mostraron un cambio positivo en biomasa, que indicaría crecimiento.

## Discusión

La respuesta conductual del erizo negro *Tetraygus niger* a la presencia del depredador *Heliaster helianthus* fue altamente variable tanto temporalmente como a través de las dos escalas espaciales representadas por los dos tamaños de acuario. En general, los erizos se movieron más y forrajearon menos en los acuarios grandes y, en los acuarios pequeños, los erizos pasaron más tiempo forrajearo en tratamientos con riesgo a depredación que en controles sin depredador. Pero ni las respuestas de corto plazo (primeras dos horas) ni las de largo plazo (11 días), en cualquiera de los tamaños de acuario, fueron siempre significativas o consistentes en dirección a través del tiempo (minutos o días) y de los distintos tratamientos de riesgo a depredación. Estos resultados resaltan la complejidad de las respuestas antidepredatorias, la importancia de la escala espacio-temporal sobre la cual se desarrollan dichas respuestas, y los enormes desafíos logísticos que impone dicha complejidad a la hora de extrapolar resultados de laboratorio a condiciones naturales. Ciertamente, estos resultados llaman la atención sobre la fuerte influencia que puede tener el diseño e implementación de las manipulaciones experimentales sobre nuestra evaluación de efectos no letales, especialmente cuando desconocemos si las escalas espaciales y temporales empleadas son adecuadas para evaluar el real impacto ecológico de los efectos no letales de los depredadores (Lima 1998).

Las diferencias observadas entre los tamaños de acuario en que se evaluó la respuesta conductual del erizo negro fueron evidentes desde el inicio del experimento, tanto en términos del tiempo en que los erizos se desplazaron en los acuarios (movimiento), como en la conducta de forrajeo (duración y número de eventos de forrajeo). En el corto plazo, i.e. las primeras dos horas luego de iniciado el experimento, los erizos en acuarios pequeños se movieron menos que en acuarios grandes, pero además forrajearon desde iniciado el experimento lo que contrastó fuertemente con la conducta desplegada por los erizos en acuarios grandes bajo los mismos tratamientos. En estos últimos, los erizos se movieron más y literalmente no se observaron nunca consumiendo las algas en cualquiera de los tratamientos. Estas diferencias en la actividad de los erizos entre tamaños de acuario persistieron, aunque en menor magnitud, al examinar las respuestas de más largo plazo (días). Puesto que las diferencias afectaron a todos los tratamientos i.e. con o sin depredador (aunque en distinta magnitud, ver abajo), resulta claro que el tamaño mismo de la unidad experimental afecta la conducta de los erizos, no solamente alterando el desplazamiento que probablemente se realiza para explorar la arena, sino también la tasa de forrajeo. Esto último, el incremento en el tiempo y número de eventos de forrajeo en acuarios pequeños en comparación a los grandes, podría producirse aún sin alteración del movimiento, como simple consecuencia de las mayores tasas de encuentro entre erizos y algas. En cualquier caso, los resultados apuntan al sesgo que puede introducir en los resultados el tamaño de las unidades experimentales, un aspecto que ha sido frecuentemente mencionado en estudios de comportamiento animal (Orians & Wittenberger 1991, Englund 1997, Cooper *et al.* 1998, Fernandes *et al.* 1999), pero que rara vez se ha tenido en cuenta en la literatura de efectos no letales de depredadores.

El efecto de la presencia del depredador, bajo los distintos tratamientos considerados en el experimento, también varió entre los acuarios grandes y pequeños. En el corto plazo, los erizos en acuarios pequeños tendieron a moverse más en los tratamientos en que *Heliaster* se encontraba presente desde iniciado el experimento y hasta transcurridos los primeros 90 minutos, lo que concuerda con la rápida respuesta de escape activo observada en terreno (Manzur & Navarrete

2011), sin embargo, los erizos en acuarios grandes, que mostraron un alto y persistente nivel de actividad, parecen no responder a la presencia del depredador en este periodo de tiempo. Aunque en varios casos los efectos no-letales no fueron estadísticamente significativos, cuando si lo fueron, el patrón y magnitud de las diferencias dependió del tamaño de acuario. Estos resultados ilustran que, no solamente pueden observarse alteraciones en el comportamiento de los erizos producto del tamaño del confinamiento impuesto por el acuario, sino que la respuesta de estos individuos a señales químicas (presencia) del depredador puede variar cualitativamente al cambiar el tamaño del confinamiento. Es posible que en un ambiente pequeño las señales de la presencia del depredador, en este caso *Heliaster*, difundan más rápidamente y pueden ser percibidas por la presa en todo el espacio disponible posiblemente llegando a niveles de saturación de la señal, o bien impidiendo la posibilidad de detectar claramente direccionalidad de la señal. Así mismo, es probable que en el ambiente de mayor tamaño, donde las señales de la presencia del depredador difunden más lentamente o simplemente no llegan a todo el espacio disponible, pueda establecerse un paisaje de señales de riesgo con zonas en donde la presencia del depredador no pueda ser percibida. Sin embargo, también es posible que, a niveles similares de señal del depredador entre diferentes tamaños de acuario, la respuesta de la presa (erizo) sea distinta simplemente debido al mayor confinamiento. En nuestro estudio no es posible descartar ninguna de estas posibilidades y cualquiera de éstas puede ayudar a explicar las marcadas diferencias en la respuesta al riesgo de depredación entre tamaños de acuario, especialmente en las primeras horas del experimento. Nuevamente, los resultados llaman a poner mayor atención a los tamaños de confinamiento utilizados al evaluar respuestas no letales de depredadores sobre presas móviles.

En términos temporales, la respuesta de escape al depredador también mostró variabilidad tanto en el corto (minutos) como en el largo plazo (días). En la respuesta a corto plazo dentro de las dos primeras horas del experimento y a ambas escalas de tamaño de acuario, se observaron cambios en la conducta de los erizos bajo distintos niveles de riesgo de depredación. Por ejemplo, en los acuarios pequeños, los erizos se movieron más en presencia del depredador que en su

ausencia durante los primeros 60 minutos, pero hacia el final de las dos horas, dejaron de moverse por completo en varios de los tratamientos con presencia de depredador y se movieron más en su ausencia. Estos resultados complejizan fuertemente la interpretación de la respuesta antidepredatoria que en terreno ocurre de forma casi instantánea en este sistema depredador-presa (Manzur & Navarrete 2011). La duración de la exposición a la señal del depredador puede tener fuertes efectos sobre la respuesta de la presa (e.g. Finelli *et al.* 2000, Kimbro 2012,) y en este sistema resulta difícil determinar cuál es el patrón temporal ‘natural’ de exposición a la señal del depredador. En el largo plazo (i.e. escala temporal de días) la respuesta conductual de *Tetrapygus niger* también fue variable. En este caso, a diferencia de lo observado al menos durante los primeros 90 minutos del experimento, no se evidencia un efecto consistente claro de la presencia del depredador sobre la tasa de movimiento de *Tetrapygus*, y solamente se observan efectos sobre forrajeo. Lo que más destacó en la respuesta a largo plazo fue la clara interacción entre el tamaño de acuario y el tiempo transcurrido (entre los bloques de 4 días). Los erizos en acuarios pequeños tendieron a aumentar su nivel de actividad hacia el final del experimento observándose el patrón opuesto en los acuarios grandes. Es posible que el grado de habituación a la presencia del depredador varíe con el tamaño de acuario. Pero en forma más general, es posible que los ciclos naturales de actividad en erizos, así como los observados en muchos otros invertebrados marinos (Naylor 2005, Aguilera & Navarrete 2011) se vean alterados en forma diferencial por el tamaño de acuario y su interacción con riesgo a depredación. Ciertamente, nuestros resultados muestran que, aparte del ciclo día-noche de actividad, que fue relativamente consistente entre los tamaños de acuario (mayor actividad nocturna), los patrones temporales en escala de días no fueron enteramente coherentes entre acuarios y tratamientos (Figs. S2, S3). Un análisis más detallado de series de tiempo no es posible debido a la corta duración de estas series y al bajo número de réplicas, pero amerita mayores estudios. Muy poco hay en la literatura acerca de la interacción entre el patrón de exposición temporal de riesgo a depredación y los ciclos naturales de actividad en las presas.

Uno de los resultados más interesantes observados en los acuarios pequeños, en donde se observó forrajeo desde el inicio del experimento, fue que los erizos forrajearon más (tanto en duración como en número de eventos de forrajeo) en presencia que en ausencia del depredador. La mayor probabilidad de encuentro con el depredador y con el trasplante de recursos en los acuarios pequeños debido a las mayores tasas de movimiento en presencia que en ausencia del depredador podrían explicar el mayor forrajeo bajo riesgo de depredación. También es posible que la respuesta de escape (mayor movimiento), junto con el stress mismo que puede provocar la presencia del depredador resulten en un mayor uso de reservas energéticas por parte de la presa (Steiner & Van Buskirk, 2009, Manzur *et al.* 2013), lo que puede ser compensado con un mayor consumo de recursos (algas) con el fin de satisfacer los requerimientos energéticos necesarios para sostener una mayor actividad (Manzur *et al.* 2013). Pero en general se espera que este mayor consumo de recursos, en este caso forrajeo sobre las algas para compensar gastos energéticos, ocurra con algún desfase de tiempo con respecto a la respuesta de escape. En el caso de *Tetrapygius* el patrón de mayor tasa de forrajeo se observó desde los primeros 30 minutos de experimento, pero es mucho más marcado al analizar las respuestas después de transcurridos varios días de experimento y a esta escala de tiempo, la respuesta también se observa, con mayor variabilidad entre tratamientos, en los acuarios grandes (ver Fig. 6). Es posible entonces que los dos procesos, mayores tasas de encuentro y compensación de gasto energético inducido por la presencia del depredador *Heliaster*, jueguen un rol en las mayores tasas de forrajeo de erizos sobre las algas y que su importancia relativa varíe a través del tiempo.

Con respecto a la transmisión del efecto no letal de *Heliaster* sobre el erizo negro hasta el nivel basal (representado por el alga *Ulva sp.*), también se observaron diferencias en función del tamaño de confinamiento, con los erizos en acuarios pequeños consumiendo una mayor cantidad de alga que los erizos en acuarios grandes. Al mismo tiempo, el consumo de algas por los erizos en acuarios grandes y pequeños fue distinto bajo las mismas condiciones de riesgo de depredación, teniendo en algunos de los tratamientos con depredador (i.e. +HI) un efecto positivo (aumento en la

biomasa de *Ulva* sp.) a la escala espacial grande y el efecto contrario (disminución de la biomasa de *Ulva* sp.) a la escala pequeña. Considerando en conjunto todos los resultados, es probable que si bien existe una respuesta de escape activo a la presencia del depredador y que, al menos en el corto plazo, se evidencian algunas diferencias en la conducta de los erizos en presencia de *Heliaster*, estos efectos no sean lo suficientemente grandes como para que se transmitan a los recursos de *T. niger* a través de modificar la fuerza de interacción *in situ* entre el erizo negro y *Ulva* sp. Por fuerza de interacción *in situ* nos referimos a la situación en la cual la presa, en este caso los erizos, y el recurso basal, en este caso el alga, están confinados a interactuar en un espacio delimitado. Distinta es la situación cuando la respuesta de escape conlleva un cambio de hábitat por parte de la presa. Este de hecho puede ser el caso más común en el sistema *Heliaster-Tetrapygyus* estudiado aquí. Aunque la población de *Heliaster* también se extiende al submareal somero (Castilla *et al.* 2013), las mayores abundancias se observan en la zona intermareal. Las rápidas y cortas respuestas de escape de los erizos observadas en terreno (Manzur & Navarrete 2011), si ocurren con suficiente frecuencia, pueden producir un desplazamiento de los erizos a zonas un poco menos profundas justo en la transición intermareal-submareal. Esta interacción explica bien el patrón de densidad de erizos observado en terreno y documentado en la Figura 1. Nuestros experimentos no consideraron la posibilidad de desplazamiento a un hábitat diferente y futuros estudios deberían entonces incluir esta posibilidad en el diseño experimental.

Los cambios temporales y las diferencias inducidas por la escala de confinamiento en la conducta del erizo negro resaltan la importancia de conocer la naturaleza y la escala espacio-temporal de los efectos no letales de los depredadores sobre sus presas antes de extrapolar su relevancia ecológica tanto sobre poblaciones presa, como sobre la transmisión de dichos efectos a otros niveles tróficos (EIMR). Es crítico también conocer el patrón temporal de las señales del depredador al cual están expuestas las presas (frecuencia con que los erizos efectivamente perciben a los soles en terreno), las persecuciones por parte del depredador (frecuencia con que los soles realmente atacan y persiguen a los erizos en terreno), junto con la escala espacial y duración del

escape y de la percepción de señales del depredador por parte de la presa (Smee *et al.* 2008, Turner & Montgomery 2003).

Una de las principales limitaciones para evaluar la fuerza y dirección de los EIMR de los carnívoros sobre los niveles tróficos basales es la corta duración (días a unas pocas semanas) y pequeña escala espacial (unos pocos m<sup>2</sup>) de la mayoría de los experimentos que han evaluado este tipo de respuestas (Lima, 1998; Sih, Ziemba & Harding 2000). Estas restricciones son usualmente impuestas por limitaciones logísticas y también por la necesidad de observar y cuantificar respuestas conductuales rápidas a la vez que mantener un mínimo nivel de realismo en las interacciones recreadas en el laboratorio (e.g. persistencia temporal de las señales de depredadores). Sin embargo, en un tiempo muy corto de medición cabe la posibilidad de que los efectos de las respuestas antidepredatorias sean sobreestimados, y que medidos sobre tiempos más prolongados su magnitud pueda atenuarse disminuyendo el efecto total y cambiando la fuerza o incluso la dirección de un posible efecto indirecto sobre niveles tróficos basales. Por ejemplo, Trussell *et al.* (2006), realizaron experimentos de 36 días de duración con una trama trófica intermareal de 3 niveles (la jaiba depredadora *Carcinus maenas*, el caracol gastrópodo depredador *Nucella lapillus* y el cirripedio *Semibalanus balanoides* como el recurso basal), revelando que el riesgo de depredación conduce a efectos indirectos positivos en “hábitats riesgosos”, pero en “hábitats seguros” a efectos indirectos negativos. Ellos especularon que si el experimento hubiese durado un mayor periodo de tiempo, la fuerte disminución de los recursos en los hábitats seguros debiese haber inducido que los caracoles comenzaran a forrajear en el hábitat riesgoso para evitar la inanición, disminuyendo la fuerza del EIMR. Aunque es un experimento muy bien diseñado para evaluar dichas respuestas y cambios en uso de hábitat, el experimento por necesidad sometió a los caracoles a la señal persistente de depredador por ese largo periodo de tiempo y en una escala espacial reducida (25 x 15 x 5 cm ó 0,63 l). Es difícil inferir a partir de estos resultados lo que realmente ocurre en la naturaleza en donde los caracoles probablemente están expuestos a señales del depredador

temporalmente variables (Sih, Ziemba & Harding 2000) y a escalas espaciales mucho mayores, que pueden alterar la conducta de las presas, como lo observado en nuestros experimentos.

En resumen, aunque en terreno y también laboratorio es fácil demostrar la existencia de una rápida respuesta de los erizos a la presencia (señal química) de *Heliaster*, nuestros resultados de laboratorio muestran que la respuesta antidepredatoria es compleja, que depende fuertemente de la escala espacial en que se evalúa, que varía temporalmente a escalas de minutos y de días, y que estos efectos no se transmiten a niveles tróficos basales en forma consistente. Futuros estudios en terreno abordando las preguntas de este trabajo pueden brindar un mejor entendimiento de la transmisión del efecto no letal de *H. helianthus* a niveles tróficos basales a través de cambios en la conducta de *T. niger* a las escalas en que depredador y presa interactúan en la naturaleza.

Finalmente, nuestros resultados llaman fuertemente la atención acerca del cuidado que se debe tener con la escala espacial y temporal de los experimentos cuando se está examinando la conducta de presas en presencia de depredadores ya que nuestra interpretación de los resultados podría estar reflejando el efecto de decisiones arbitrarias acerca del diseño e implementación de experimentos obscureciendo o simplemente no reflejando lo que realmente ocurriría en la naturaleza.



## Referencias

- Abrams, P.A. (1995) Implications of dynamically variable traits for identifying, classifying and measuring direct and indirect effects in ecological communities. *The American Naturalist* 146(1): 112-134.
- Agrawal, A.A., Laforsch, C. & Tollrian, R. (1999) Transgenerational induction of defences in plants and animals. *Nature* 401: 60–63.
- Aguilera, M.A. & Navarrete, S.A. (2011) Distribution and activity patterns in an intertidal grazer assemblage: influence of temporal and spatial organization on interspecific associations. *Marine Ecology Progress Series* 431: 119–136.
- Appleton, R.D. & Palmer, A.R. (1988) Waterborne stimuli released by predatory crabs and damaged prey induce more predator-resistant shells in marine gastropods. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 85:4387-4391.
- Aránguiz-Acuña, A., Ramos-Jiliberto, R. & Bustamante, R.O. (2011) Experimental evidence that induced defenses promote coexistence of zooplanktonic populations. *Journal of Plankton Research* 33(3): 469–477.
- Barreto, R.E., Luchiari A.C. & Marcondes, A.L. (2003) Ventilatory frequency indicates visual recognition of an allopatric predator in naive *Nile tilapia*. *Behavioural Processes* 60: 235–239.
- Camus, P.A. (2008) Diversidad, distribución y abundancia de especies en ensamblajes intermareales rocosos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43(3): 615-627.

- Caro, A.U. & Castilla, J.C. (2004) Predator-inducible defences and local intrapopulation variability of the intertidal mussel *Semimytilus algosus* in central Chile. *Marine Ecology Progress Series* 276:115-123.
- Caro, A.U., Escobar, J., Bozinovic, F., Navarrete, S.A. & Castilla, J.C. (2008) Phenotypic variability in byssus thread production of intertidal mussels induced by predators with different feeding strategies. *Marine Ecology Progress Series* 372:127-134.
- Castilla, J.C. (1981) Perspectivas de investigación en estructura y dinámica de comunidades intermareales rocosas de Chile central. II. Depredadores de alto nivel trófico. *Medio Ambiente (Chile)* 5: 190–215.
- Castilla, J.C. & Paine, R.T. (1987) Predation and community organization on Eastern Pacific, temperate zone, rocky intertidal shores. *Revista Chilena de Historia Natural* 60: 131–151.
- Castilla, J.C., Navarrete, S.A., Manzur, T. & Barahona, M. (2013). Chapter 18: *Heliaster helianthus* in *Starfish: Biology and Ecology of the Asteroidea*. Edited by J. Lawrence, The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Contreras, S. & Castilla, J.C. (1987) Feeding behavior and morphological adaptations in two sympatric sea urchin species in central Chile. *Marine Ecology Progress Series* 38: 217-224.
- Cooper, S.D. Diehl, S., Kratz, K. & Sarnelle, O. (1998) Implications of scale for patterns and processes in stream ecology. *Australian Journal of Ecology* 23: 27-40.

- Creel, S. & Christianson, D. (2008) Relationships between direct predation and risk effects. *Trends in Ecology and Evolution* 23: 194-201.
- Crowder, M.J. & Hand, D.J. (1990) *Analysis of Repeated Measures*, vol. 41. CRC publisher.
- Dee, L.E., Witman, J.D. & Brandt M. (2012) Refugia and top-down control of the pencil urchin *Eucidaris galapagensis* in the Galápagos Marine Reserve. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 416–417: 135–143.
- Dodson, S. I., Crowl, T.A, Peckarsky, B. L., Kats, L. B., Covich, A. P. & Culp. J. M. (1994) Non-visual communication in freshwater benthos: an overview. *Journal of the North American Benthological Society* 13:268–282.
- Duggins, D.O. (1983) Starfish predation and the creation of mosaic patterns in a kelp-dominated community. *Ecology* 64(6): 1610-1619.
- Englund, G. (1997) Importance of spatial scale and prey movements in predator caging experiments. *Ecology* 78 (8): 2316-2325.
- Escobar, J.B. & Navarrete, S.A. (2011) Risk recognition and variability in escape responses among intertidal molluscan grazers to the sunstar *Heliaster helianthus*. *Marine Ecology Progress Series* 421: 151-161.
- Espez, C. & Castilla, J.C. (2000) Escape responses of four Chilean intertidal limpets to sea stars. *Marine Biology* 137:887-892.

- Fernandes, T.F., Huxham, M. & Piper, S.R. (1999) Predator caging experiments: a test of the importance of scale. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 241: 137–154.
- Finelli, C.M., Pentcheff, N. D., Zimmer, R.K., & Wethey, D.S. (2000) Physical constraints on ecological processes: a field test of odor-mediated foraging. *Ecology* 81(3): 784–797.
- Freeman, A. (2006) Size-dependent trait-mediated indirect interactions among sea urchin herbivores. *Behavioral Ecology* 17: 182–187.
- Hagen, N.T., Anderson, A. & Stabell, O.B. (2002) Alarm response of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, induced by chemical labeled durophagous predators and simulated acts of predation. *Marine Biology* 140: 365–374.
- Hawkins, L.A., Armstrong J.D. & Magurran A.E. (2004) Predator-induced hyperventilation in wild and hatchery Atlantic salmon fry. *Journal of Fish Biology* 65: 88–100.
- Hawlena, D. & Schmitz, O.J. (2010) Herbivore physiological response to predation risk and implications for ecosystem nutrient dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(35): 15503-15507.
- Hereu, B (2005) Movement patterns of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in a marine reserve and an unprotected area in the NW Mediterranean. *Marine Ecology* 26: 54 - 62.
- Kéfi, S., Berlow, E.L., Wieters, E.A., Navarrete, S.A., Petchey, O.L., Wood, S.A., Boit, A., Joppa, L.N., Lafferty, K.D., Williams, R.J., Martinez, N.D., Menge, B.A., Blanchette,

C.A., Iles, A.C. & Brose, U. (2012) More than a meal... integrating non-feeding interactions into food webs. *Ecology Letters* 15: 291-300.

Kimbro, D.L. (2012) Tidal regime dictates the cascading consumptive and non consumptive effects of multiple predators on a marsh plant. *Ecology* 93(2):334 - 44.

Lima, S.L. & Dill, L.M. (1990) Behavioral decisions made under risk of predation: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology* 68: 619 - 640.

Lima, S.L. (1998) Non lethal effects in the ecology of predator- prey interactions. *BioScience* 48: 25–34.

Lively, C.M. (1986) Predator-Induced shell dimorphism in the acorn barnacle *Chthamalus anisopoma*. *Evolution* 40(2):232-242.

Manzur, T. & Navarrete, S.A. (2011) Scales of detection and escape of the sea urchin *Tetrapygus niger* in interactions with the predatory sun star *Heliaster helianthus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 407: 302–308.

Manzur, T., Vidal, F., Pantoja, J.F., Fernández, M. & Navarrete, S.A. (2013) Behavioral and physiological responses of limpet prey to a seastar predator and their transmission to basal trophic levels. *Journal of Animal Ecology*, in review.

Matassa, C.M. (2010) Purple sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus* reduce grazing rates in response to risk cues from the spiny lobster *Panulirus interruptus*. *Marine Ecology Progress Series* 400: 283–288.

- Miner, B.G., Sultan, S.E., Morgan, S.G., Padilla, D.K. & Relyea, R.A. (2005) Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 685-692.
- Navarrete, A.H., Camus, P.A. & Opazo, L.F. (2008) Variación ambiental y patrones dietarios del erizo negro *Tetrapygus niger* en costas intermareales rocosas del norte de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 81: 305-319.
- Naylor, E. (2005) Chronobiology: implications for marine resource exploitation and management. *Scientia Marina* 69(1): 157-167.
- Orians, G.H. & Wittenberger, J.F. (1991) Spatial and temporal scales in habitat selection. *The American Naturalist* 137: S29- S49.
- Peterson, C. & Renaud, E. (1989) Analysis of Feeding Preference Experiments. *Oecologia* 80: 82-86.
- Preisser, E.L., Bolnick, D.I. & Benard, M.F. (2005) Scared to death? The effects of intimidation and consumption in predator– prey interactions. *Ecology* 86: 501–509.
- Rodríguez, S.R. (2003). Consumption of drift kelp by intertidal populations of the sea urchin *Tetrapygus niger* on the central Chilean coast: possible consequences at different ecological levels. *Marine Ecology Progress Series* 251: 141–151.
- Santelices, B. (1980) Muestreo cuantitativo de comunidades intermareales de Chile central. *Archivos de Biología y Medicina Experimental* 13: 413-424.

- Santelices, B. (1990) Patterns of organization of intertidal and shallow subtidal vegetation in wave exposed habitats of central Chile. *Hydrobiologia* 192: 35-57.
- Schmitz, O.J., Beckerman, A.P. & O'Brien, K.M. (1997) Behaviorally mediated trophic cascades: effects of predation risk on food web interactions. *Ecology* 78: 1388–1399.
- Sih, A., Ziemba, R. & Harding, K.C. (2000) New insights on how temporal variation in predation risk shapes prey behaviour. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 3 – 4.
- Smee, D.L., Ferner, M.C. & Weissburg, M.J. (2008) Alteration of sensory abilities regulates the spatial scale of nonlethal predator effects. *Oecologia* 156: 399–409.
- Steiner, U.K. & Van Buskirk, J. (2009) Predator-Induced Changes in Metabolism Cannot Explain the Growth/Predation Risk Tradeoff. *PLoS ONE*, Doi:10.1371/journal.pone.0006160
- Stotz, W., González S.A. & López, C. (1992) Repoblación experimental del erizo rojo *Loxechinus albus* (Molina) en la costa expuesta del centro-norte de Chile: Efectos del erizo negro *Tetrapygus niger* (Molina) sobre el establecimiento y crecimiento de los juveniles. *Investigaciones Pesqueras (Chile)* 37: 107-117.
- Trussell, G.C. & Smith, L.D. (2000) Induced defenses in response to an invading crab predator: an explanation of historical and geographic phenotypic change. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 97: 2123-2127.
- Trussell, G.C., Ewanchuk, P.J. & Bertness, M.D. (2003) Trait-mediated effects in rocky intertidal food chains: predator risk cues alter prey feeding rates. *Ecology* 84: 629-640.

Trussell, G.C., Ewanchuk, P.J., Bertness, M.D. & Silliman, B.R. (2004) Trophic cascades in rocky shore tide pools: distinguishing lethal and nonlethal effects. *Oecologia* 139: 427–432.

Trussell, G.C., Ewanchuk, P.J. & Matassa, C.M. (2006) Habitat effects on the relative importance of trait- and density-mediated indirect interactions. *Ecology Letters* 9: 1245–1252.

Turner, A. & Mittelbach, G. (1990) Predator avoidance and community structure: interactions among piscivores, planktivores, and plankton. *Ecology* 71: 2241–2254.

Turner, A. M. (1997) Contrasting short-term and long-term effects of predation risk on consumer habitat use and resources. *Behavioral Ecology* 8:120–125.

Turner, A.M. & Montgomery S.L. (2003) Spatial and temporal scales of predator avoidance: Experiments with fish and snails. *Ecology* 84(3): 616–622.

Urriago, J.D., Himmelman, J.H. & Gaymer, C.F. (2011) Responses of the black sea urchin *Tetrapygus niger* to its sea-star predators *Heliaster helianthus* and *Meyenaster gelatinosus* under field conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 399: 17–24.

Van Buskirk, J., & Arioli, M. (2002) Dosage response of an induced defense: How sensitive are tadpoles to predation risk? *Ecology* 83:1580–1585.

Vásquez, J.A. & Buschmann, A.H. (1997). Herbivore-kelp interactions in Chilean subtidal communities: a review. *Revista Chilena de Historia Natural* 70: 41–52.



Von Ende, C.N. (1993) Repeated Measures Analysis: growth and other time dependent measures. In: Schneider, S.M., Gurevitch, J. (Eds.), Design and analysis of ecological experiments. Chapman & Hall, New York, pp. 113–137.

Weidner, K., Lages, B.G., A. P. da Gama, B., Molis, M., Wahl, M. & Pereira, R.C. (2004) Effect of mesograzers and nutrient levels on induction of defenses in several Brazilian macroalgae. Marine Ecology Progress Series 283: 113–125.

## Tablas

**Tabla 1.** Resumen de ANDEVA univariado de medidas repetidas (RMandeva) considerando como factores inter-sujeto al tamaño de acuario y el tratamiento de depredador y como factor intra-sujeto al tiempo (4 bloques de 30 min), en la respuesta conductual de corto plazo para la proporción de tiempo en movimiento de *Tetrapygnus niger*. En la tabla se señalan los valores del estadístico F, los grados de libertad (GL) y el valor de probabilidad asociado (P). Los valores resaltados en negrita son significativos a un  $\alpha= 0,05$ .

<b>Proporción de Tiempo en Movimiento</b>				
<b>Inter Sujetos</b>				
<b>Fuente de Variación</b>	<b>F</b>	<b>GL</b>	<b>P</b>	
Tamaño de acuario	7,1880	1, 16	<b>0,0164</b>	
Depredador	0,6856	3, 16	0,5738	
Tamaño de acuario x Depredador	0,1726	3, 16	0,9134	
<b>Intra Sujetos</b>				
<b>Fuente de Variación</b>	<b>Epsilon G-G</b>	<b>F</b>	<b>GL</b>	<b>P</b>
Tiempo	0,6794	0,0073	1,36, 21, 74	0,9703
Tiempo x Tamaño de acuario	0,6794	1,4952	1,36, 21, 74	0,2423
Tiempo x Depredador	0,6794	1,3155	4,08, 21,74	0,2955
Tiempo x Tamaño de acuario x Depredador	0,6794	1,2736	4,08, 21,74	0,3108

**Tabla 2.** Resumen de ANDEVAS de dos vías con los factores fijos tamaño de acuario y depredador sobre a) la proporción de tiempo en movimiento y ANDEVAS de una vía con Depredador como factor fijo para b) la proporción de tiempo comiendo y c) el número de eventos de forrajeo de *Tetrapygnus niger* en la respuesta conductual de corto plazo (dentro de bloques temporales cada 30 min). En la tabla se detallan los valores de probabilidad asociados a cada comparación para los distintos bloques temporales. Los valores en negrita indican significancia con el valor de  $\alpha= 0,05$ .

<b>Fuente de Variación</b>	<b>0-30 min</b>	<b>30- 60 min</b>	<b>60-90 min</b>	<b>90-120 min</b>
<b>a) Proporción de Tiempo en Movimiento</b>				
Tamaño de acuario	<b>0,0140</b>	<b>0,0028</b>	0,4413	0,9600
Depredador	0,9132	0,0539	0,6532	-
Tamaño de acuario x Depredador	0,8761	0,0713	0,9978	-
<b>b) Proporción de Tiempo Comiendo</b>				
Depredador	0,8811	0,7690	0,7642	0,6191
<b>c) Número de Eventos de Forrajeo</b>				
Depredador	0,9314	0,7290	1,0000	0,8018

**Tabla 3.** Resumen de ANDEVA univariado de medidas repetidas (RMandeva) considerando como factores inter-sujeto al tamaño de acuario y el tratamiento de depredador y como factor intra-sujeto al tiempo (bloques de ca. 4 días), en la respuesta conductual de largo plazo durante horas de luz para la proporción de tiempo en movimiento de *Tetrapygus niger*. En la tabla se señalan los valores del estadístico “F”, los grados de libertad (GL) y el valor de probabilidad (P) asociado. Los valores resaltados en negrita son significativos a un  $\alpha= 0,05$ .

<b>Proporción de Tiempo en Movimiento</b>				
<b>Inter Sujetos</b>				
<b>Fuente de Variación</b>	<b>F</b>	<b>GL</b>	<b>P</b>	
Tamaño de acuario	22,8534	1,16	<b>0,0002</b>	
Depredador	0,5377	3,16	0,6632	
Tamaño de acuario x Depredador	0,6748	3,16	0,5800	
<b>Intra Sujetos</b>				
<b>Fuente de Variación</b>	<b>Epsilon Univar Unadj</b>	<b>F</b>	<b>GL</b>	<b>P</b>
Tiempo	1	0,3143	2,32	0,7326
Tiempo x Tamaño de acuario	1	3,9028	2,32	<b>0,0304</b>
Tiempo x Depredador	1	0,4938	6,32	0,8081
Tiempo x Tamaño de acuario x Depredador	1	6,00	6,32	0,7505

**Tabla 4.** Resumen de ANDEVAS de dos vías con los factores fijos tamaño de acuario y depredador sobre a) la proporción de tiempo en movimiento, b) la proporción de tiempo comiendo y c) el número de eventos de forrajeo de *Tetrapygnus niger* en la respuesta conductual de largo plazo (dentro de bloques temporales cada ca. cuatro días) durante el día (luz). En la tabla se detallan los valores de probabilidad asociados a cada comparación para los distintos bloques temporales. Los valores en negrita indican significancia con un valor de  $\alpha= 0,05$ . El guión indica exclusión de la comparación en el análisis.

<b>Fuente de Variación</b>	<b>1 - 4 días</b>	<b>5 - 8 días</b>	<b>9-11 días</b>
<b>a) Proporción de Tiempo en Movimiento</b>			
Tamaño de acuario	<b>0,0004</b>	<b>0,000025</b>	<b>0,0280</b>
Depredador	0,4977	0,611000	0,8220
Tamaño de acuario x Depredador	0,4702	0,543000	0,6400
<b>b) Proporción de Tiempo Comiendo</b>			
Tamaño de acuario	-	0,7670	-
Depredador	0,2120	0,3440	-
Tamaño de acuario x Depredador	-	0,7690	-
<b>c) Número de Eventos de Forrajeo</b>			
Tamaño de acuario	-	0,4090	-
Depredador	0,4180	0,3830	-
Tamaño de acuario x Depredador	-	0,9800	-

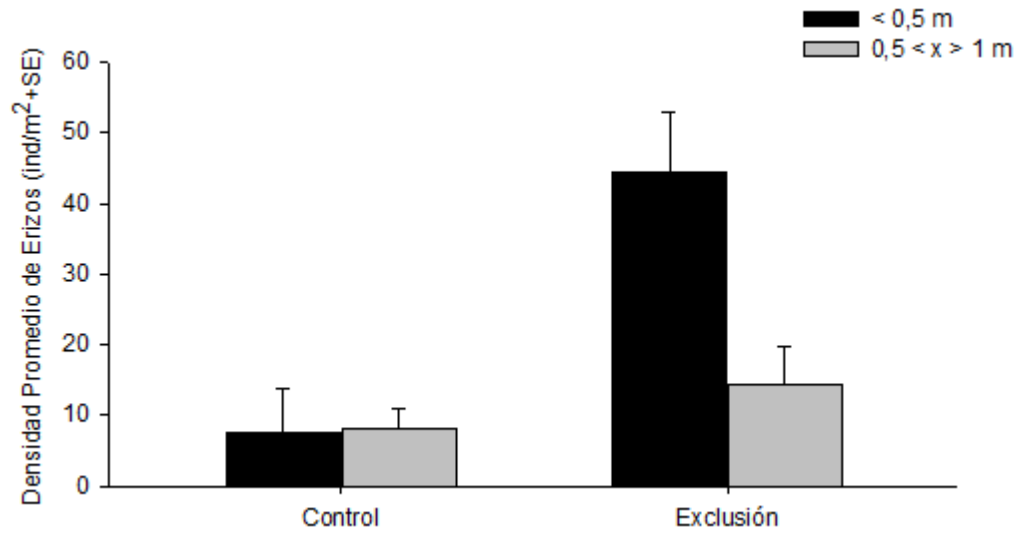
**Tabla 5.** Resumen de RMANDEVA univariado considerando como factores inter-sujeto al tamaño de acuario y el tratamiento de riesgo de depredación y como factor intra-sujeto al tiempo (bloques de ca. 4 días) en la respuesta conductual de largo plazo durante horas de oscuridad para la proporción de tiempo en movimiento de *Tetrapygus niger*. Para b) la proporción de tiempo comiendo y c) el número de eventos de forrajeo el diseño solo consideró el factor inter-sujeto “Depredador”. En la tabla se señalan los valores del estadístico “F” para los análisis inter e intra-sujeto y además para el análisis intra-sujeto se entrega el valor del estadístico Epsilon no ajustado (Epsilon Univar Unadj) y de Epsilon con la corrección Greenhouse- Geisser (Epsilon G-G), en el caso de no cumplir con el supuesto de esféricidad. Además se reportan los grados de libertad (GL) y el valor de probabilidad (P) asociado. Los valores resaltados en negrita son significativos a un  $\alpha=0,05$ .

<b>a) Proporción de Tiempo en Movimiento</b>				
<b>Inter Sujetos</b>				
<b>Fuente de Variación</b>	<b>F</b>	<b>GL</b>	<b>P</b>	
Tamaño de acuario	53,1556	1,16	<b>0,0001</b>	
Depredador	0,2677	3,16	0,8477	
Tamaño de acuario x Depredador	3,0839	3,16	0,0572	
<b>Intra Sujetos</b>				
<b>Fuente de Variación</b>	<b>Epsilon Univar Unadj</b>	<b>F</b>	<b>GL</b>	<b>P</b>
Tiempo	1	3,1134	2,32	0,0581
Tiempo x Tamaño de acuario	1	7,2977	2,32	<b>0,0024</b>
Tiempo x Depredador	1	1,4084	6,32	0,2419
Tiempo x Tamaño de acuario x Depredador	1	2,9813	6,32	<b>0,0199</b>
<b>b) Proporción de Tiempo Comiendo</b>				
<b>Inter Sujetos</b>				
<b>Fuente de Variación</b>	<b>F</b>	<b>GL</b>	<b>P</b>	
Depredador	0,4348	3, 8	0,7341	
<b>Intra Sujetos</b>				
<b>Fuente de Variación</b>	<b>Epsilon Univar Unadj</b>	<b>F</b>	<b>GL</b>	<b>P</b>
Tiempo	1	2,579	2, 16	0,9061
Tiempo x Depredador	1	2,4241	6, 16	0,2747
<b>c) Número de Eventos de Forrajeo</b>				
<b>Inter Sujetos</b>				
<b>Fuente de Variación</b>	<b>F</b>	<b>GL</b>	<b>P</b>	
Depredador	0,7669	3, 8	0,7431	
<b>Intra Sujetos</b>				
<b>Fuente de Variación</b>	<b>Epsilon Univar Unadj</b>	<b>F</b>	<b>GL</b>	<b>P</b>
Tiempo	1	0,0993	2, 16	0,9061
Tiempo x Depredador	1	1,3985	6, 16	0,2747

**Tabla 6.** Resumen de ANDEVAS de dos vías con los factores fijos tamaño de acuario y depredador sobre a) la proporción de tiempo en movimiento y ANDEVAS de una vía con Depredador como factor fijo para b) la proporción de tiempo comiendo y c) el número de eventos de forrajeo de *Tetrapygnus niger* en la respuesta conductual de corto plazo (dentro de bloques temporales cada ca. 4 días) durante la noche (oscuridad). En la tabla se detallan los valores de probabilidad asociados a cada comparación para los distintos bloques temporales. Los valores en negrita indican significancia con el valor de  $\alpha= 0,05$ .

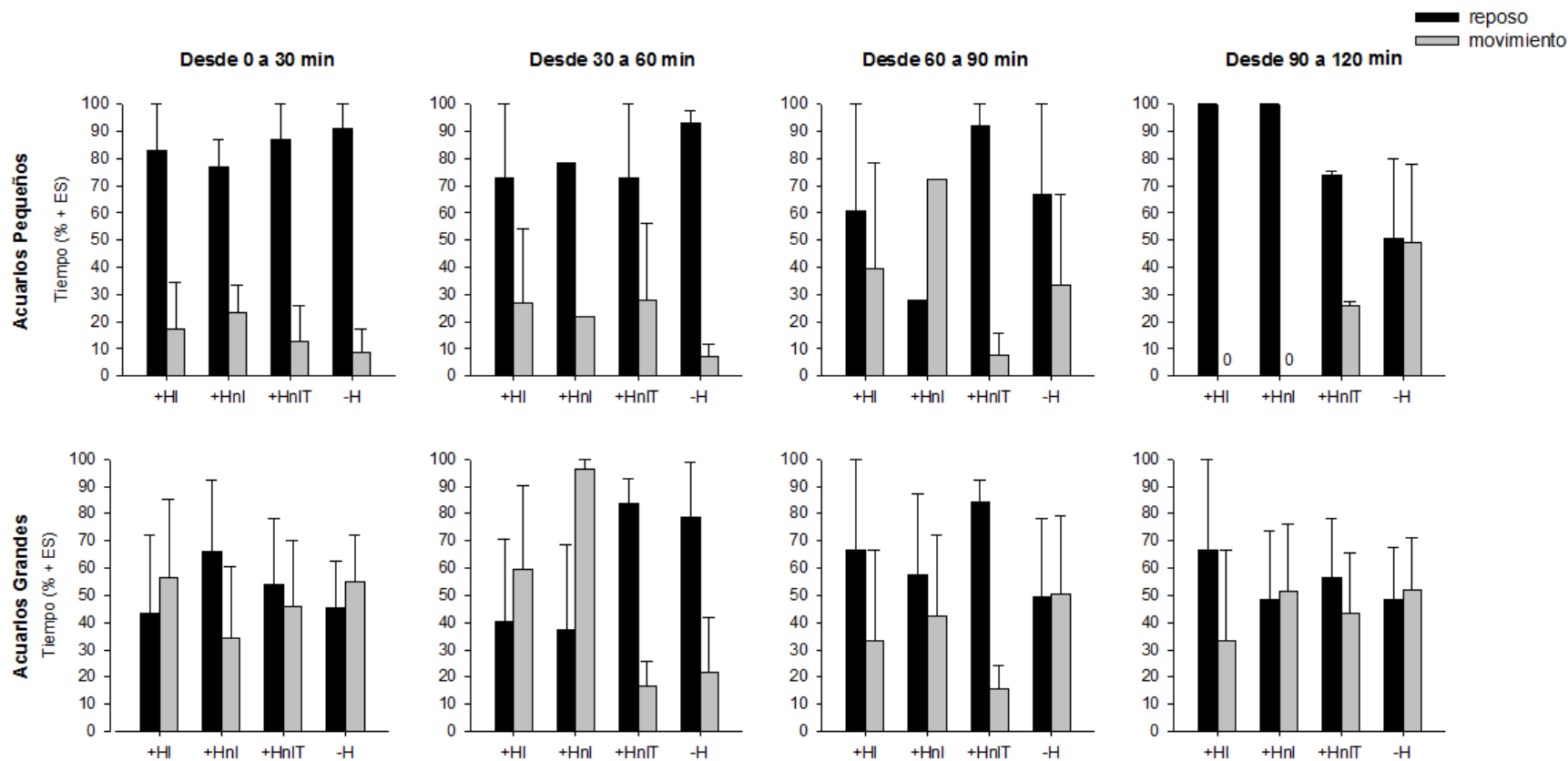
<b>Fuente de Variación</b>	<b>1 - 4 días</b>	<b>5 - 8 días</b>	<b>9-11 días</b>
<b>a) Proporción de Tiempo en Movimiento</b>			
Tamaño de acuario	<b>2,06E-06</b>	<b>0,00002</b>	0,5300
Depredador	0,61817	0,3340	0,3350
Tamaño de acuario x Depredador	<b>0,00339</b>	0,3900	0,8130
<b>b) Proporción de Tiempo Comiendo</b>			
Depredador	0,3690	0,6660	0,4820
<b>c) Número de Eventos de Forrajeo</b>			
Depredador	0,3410	0,8110	0,4070

## Figuras

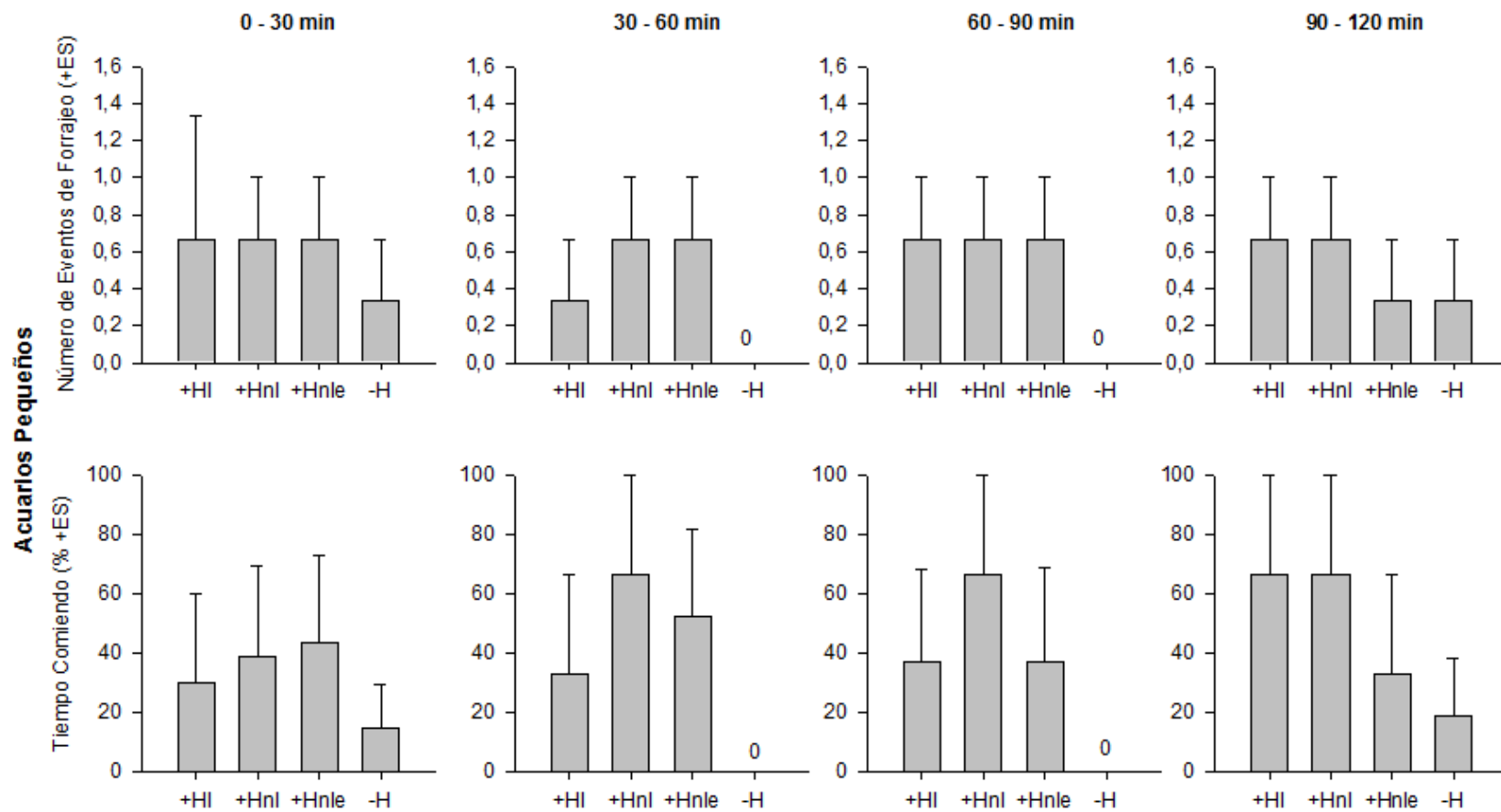


**Figura 1.** Densidad promedio de *Tetrapygus niger* (ind/m<sup>2</sup> + ES) en los plots control (densidad natural de *Heliaster helianthus*) y exclusión (remoción de *H. helianthus*) en terreno, para las bandas de profundidad de hasta 0.5 (barras en negro) y desde 0.5 a 1 m (barras en gris).

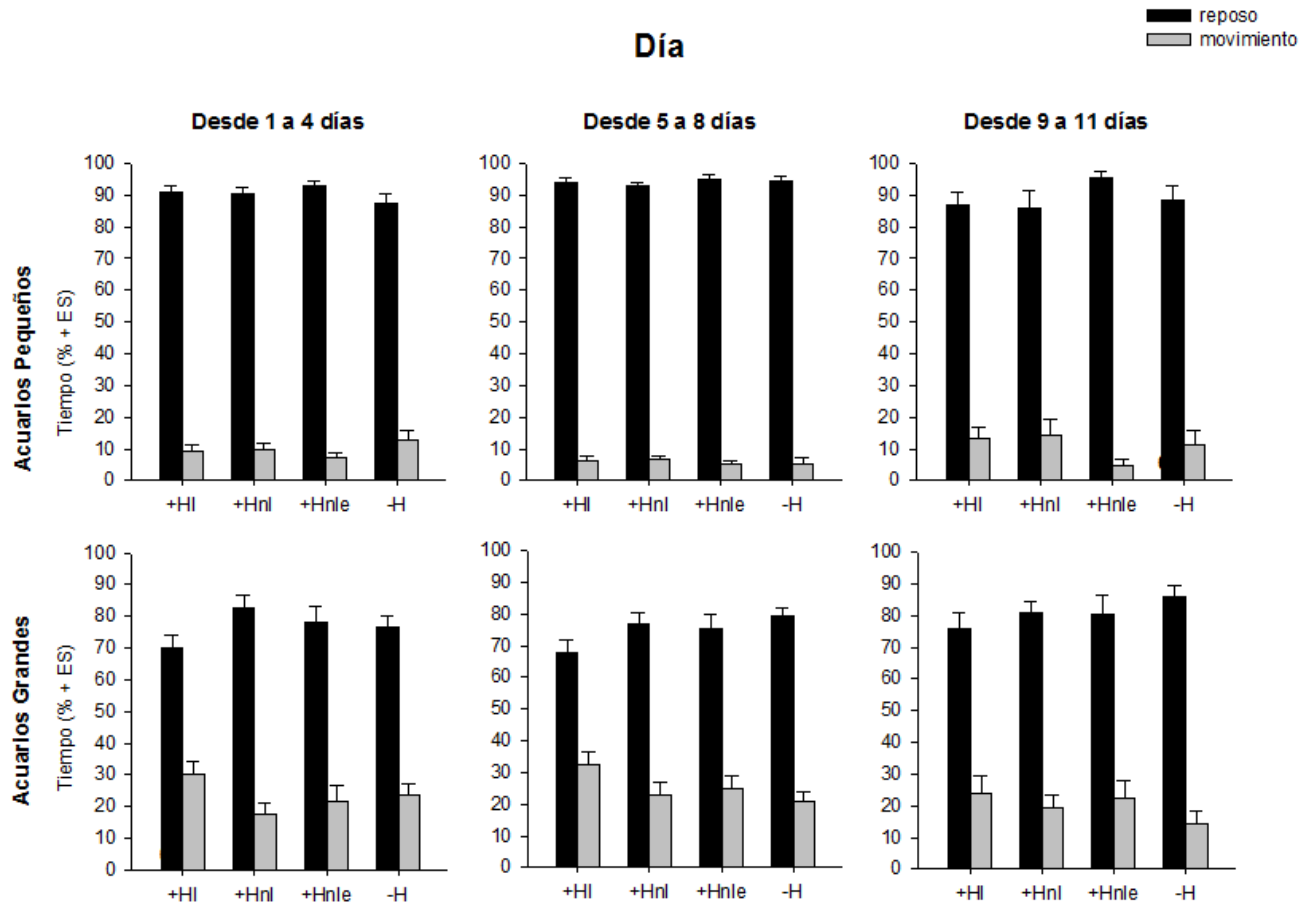




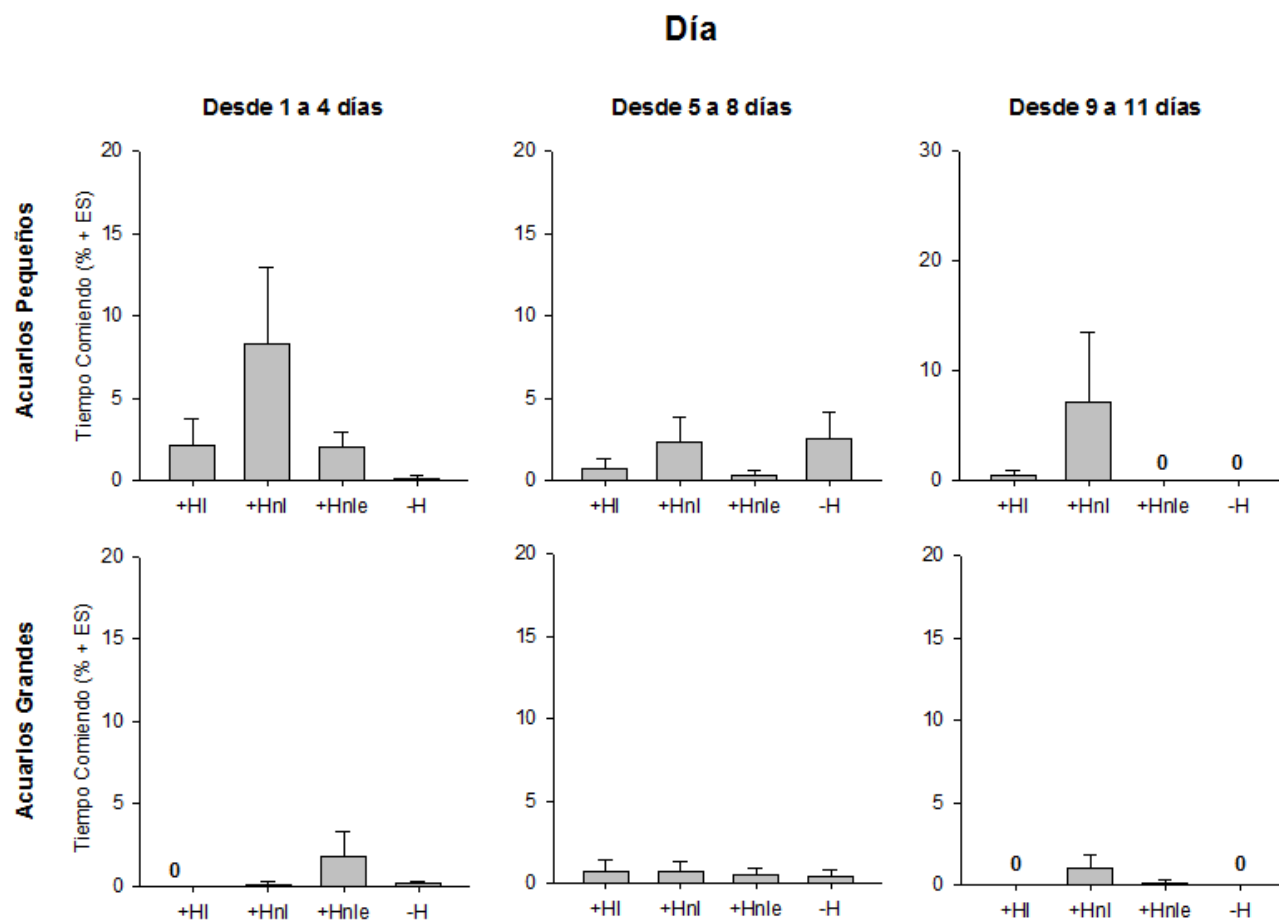
**Figura 2.** Tiempos de reposo (barras en negro) y movimiento (barras en gris) de *Tetrapygus niger* expuestos a los tratamientos +HI: *Heliaster* “letal”, +Hnl: *Heliaster* no letal no alimentado, +Hnlle: *Heliaster* no letal comiendo conespecificos y -H: Control sin *Heliaster*, en acuarios pequeños (paneles superiores) y acuarios grandes (paneles inferiores) para los bloques temporales de 0 -30, 30-60, 60-90 y 90-120 minutos. Las barras de error corresponden al error estándar sobre la media.



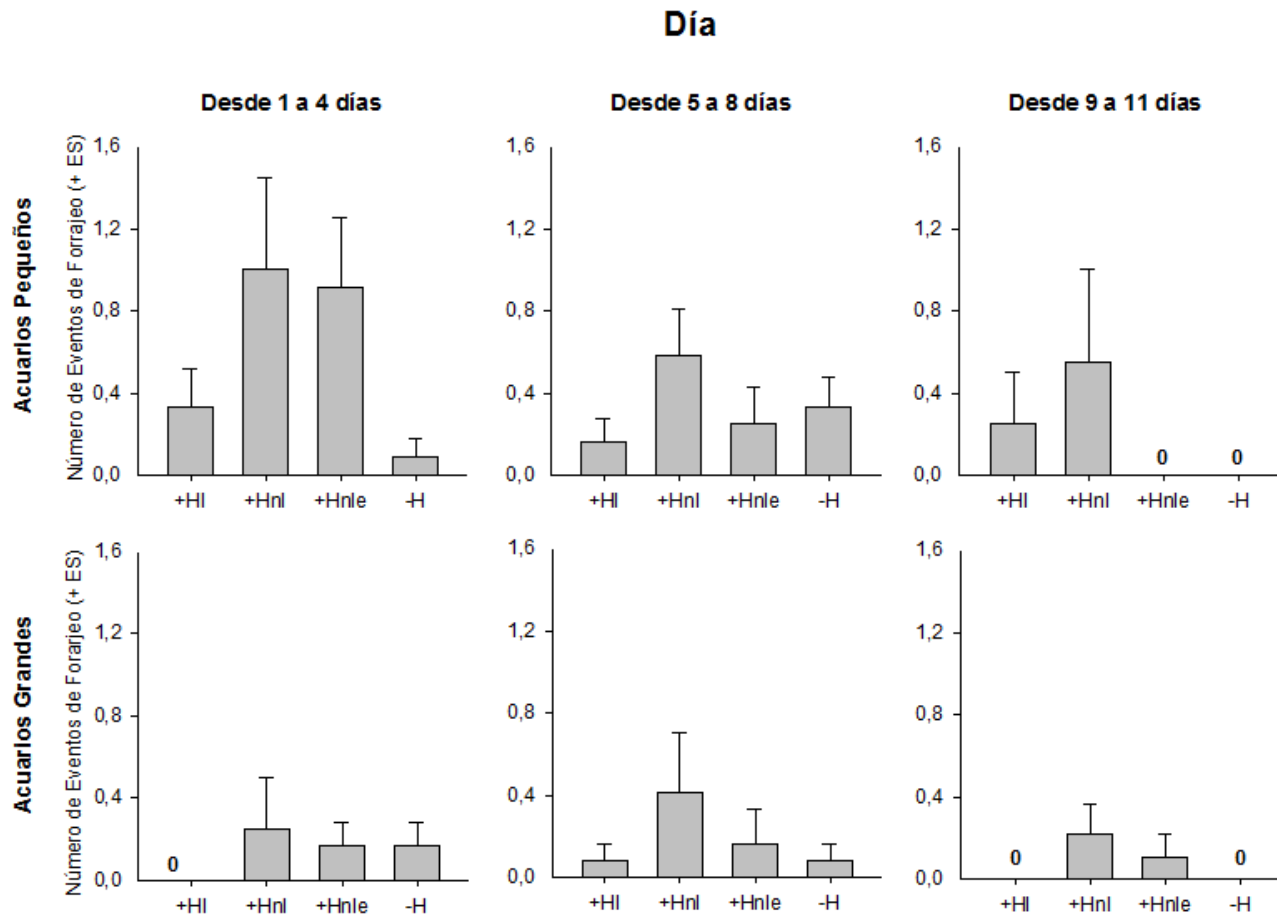
**Figura 3.** Número (paneles superiores) y duración (% del total de tiempo total por día; paneles inferiores) de eventos de forrajeo por parte de *Tetrapyus niger* expuestos a los tratamientos +HI: *Heliaster* “letal”, +Hnl: *Heliaster* no letal no alimentado, +Hnle: *Heliaster* no letal comiendo conespecificos y -H: Control sin *Heliaster*, en los acuarios pequeños para los bloques temporales de 0 -30, 30-60, 60-90 y 90-120 minutos. Las barras de error corresponden al error estándar sobre la media.



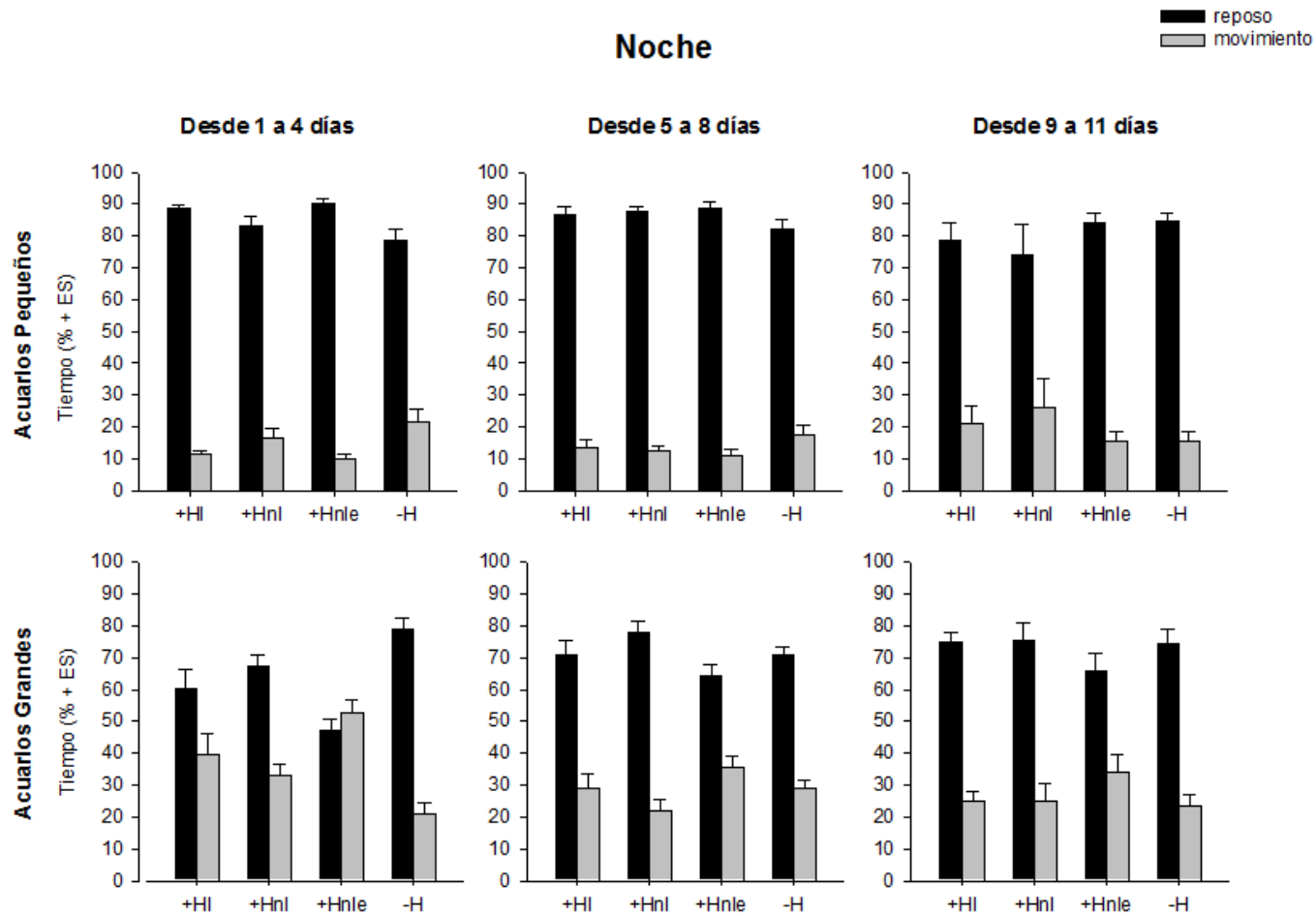
**Figura 4.** Tiempos de reposo (barras en negro) y movimiento (barras en gris) de *Tetrapygus niger* expuestos a los tratamientos +HI: *Heliaster* “letal”, +Hnl: *Heliaster* no letal no alimentado, +Hnle: *Heliaster* no letal comiendo conespecificos y -SH: Control sin *Heliaster*, durante horas de Luz en acuarios pequeños (paneles superiores) y acuarios grandes (paneles inferiores) para los bloques temporales de 1-4, 5-8, 9-11 días. Las barras de error corresponden al error estándar sobre la media.



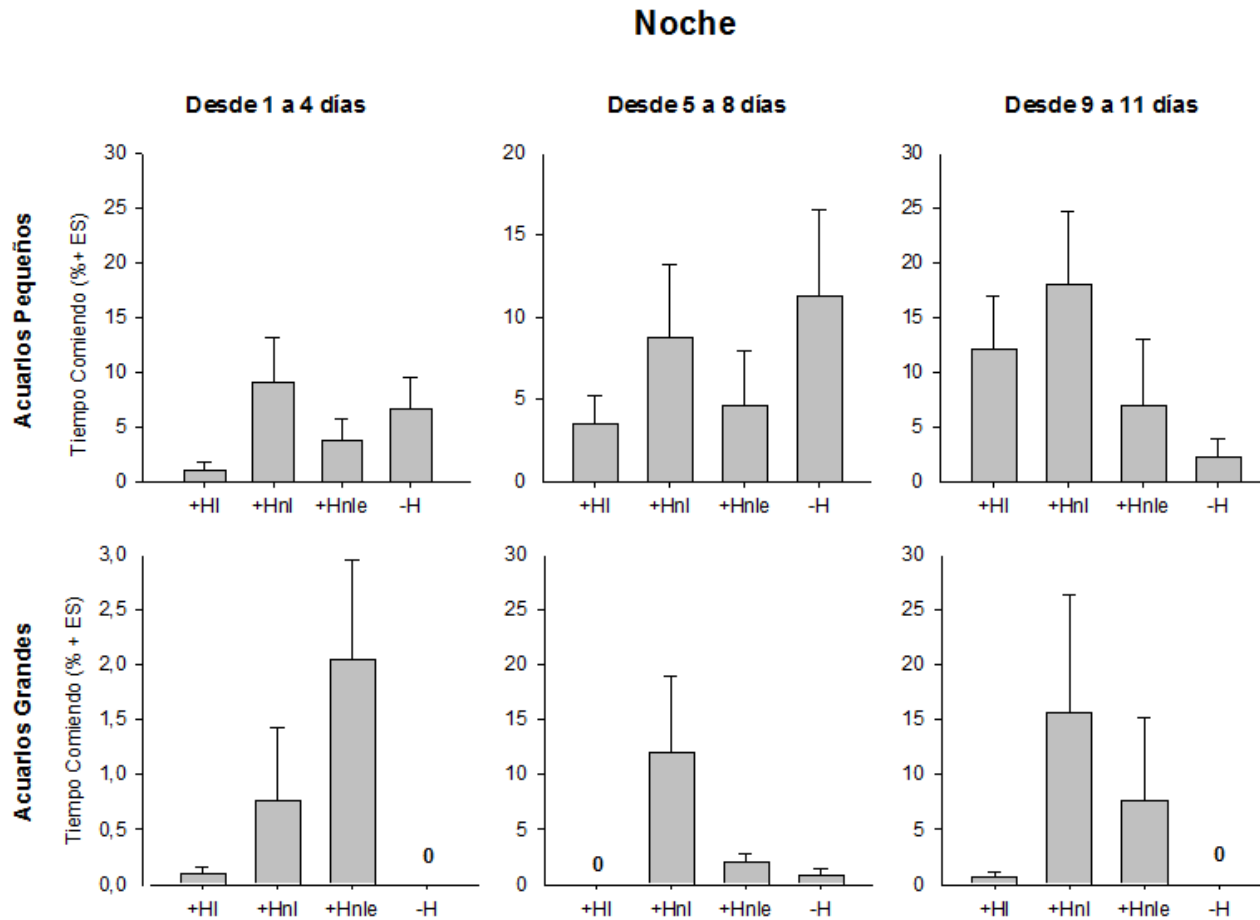
**Figura 5.** Duración de eventos de forrajeo (% del total de tiempo total por día) por parte de *Tetrapygnus niger* expuestos a los tratamientos +HI: *Heliaster* “letal”, +Hnl: *Heliaster* no letal no alimentado, +Hnle: *Heliaster* no letal comiendo conespecificos y –SH: Control sin *Heliaster*, durante horas de Luz en los acuarios pequeños (paneles superiores) y grandes (paneles inferiores) para los bloques temporales de 1-4, 5-8, 9-11 días. Las barras de error corresponden al error estándar sobre la media.



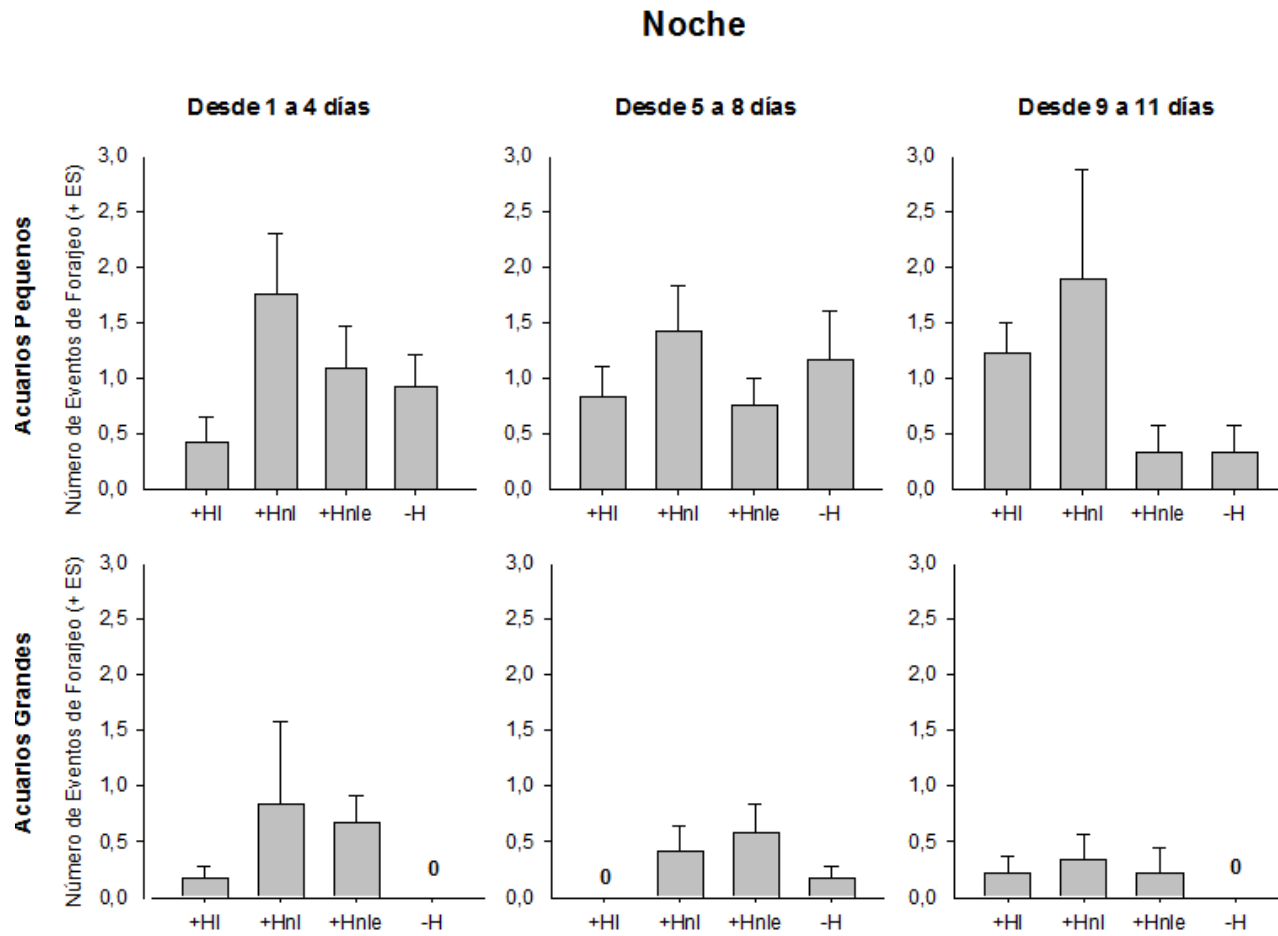
**Figura 6.** Número de eventos de forrajeo por parte de *Tetrapygus niger* expuestos a los tratamientos +HI: *Heliaster* “letal”, +Hnl: *Heliaster* no letal no alimentado, +Hnle: *Heliaster* no letal comiendo conespecificos y -SH: Control sin *Heliaster*, durante horas de Luz en los acuarios pequeños para los bloques temporales de 1-4, 5-8, 9-11 días. Las barras de error corresponden al error estándar sobre la media.



**Figura 7.** Tiempos de reposo (barras en negro) y movimiento (barras en gris) de *Tetrapygus niger* expuestos a los tratamientos +HI: *Heliaster* “letal”, +Hnl: *Heliaster* no letal no alimentado, +Hnle: *Heliaster* no letal comiendo conespecificos y -SH: Control sin *Heliaster*, durante horas de Oscuridad en acuarios pequeños (paneles superiores) y acuarios grandes (paneles inferiores) para los bloques temporales de 1-4, 5-8, 9-11 días. Las barras de error corresponden al error estándar sobre la media.

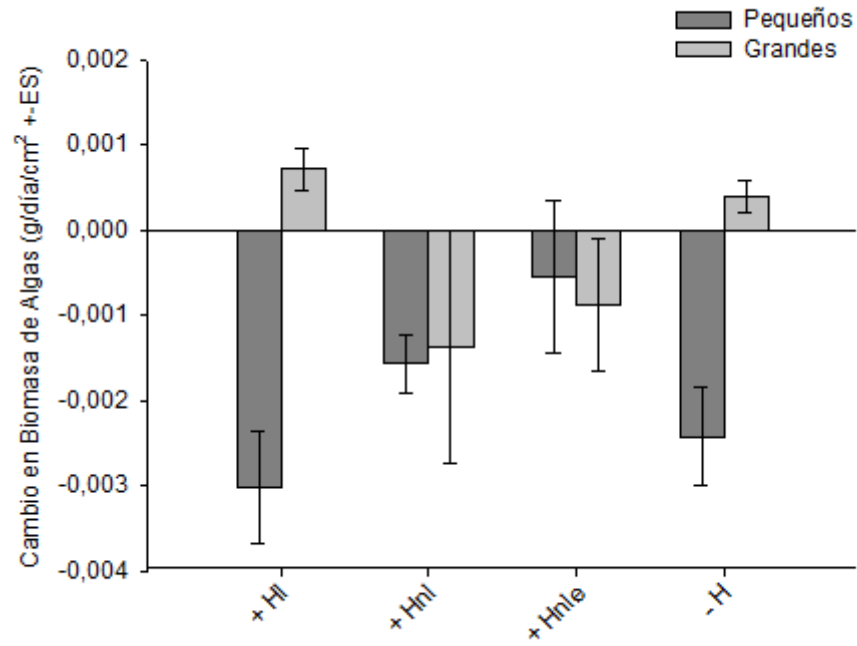


**Figura 8.** Número de eventos de forrajeo por parte de *Tetrapygus niger* expuestos a los tratamientos +HI: *Heliaster* “letal”, +Hnl: *Heliaster* no letal no alimentado, +Hnle: *Heliaster* no letal comiendo conespecificos y -SH: Control sin *Heliaster*, durante horas de Oscuridad en los acuarios pequeños para los bloques temporales de 1-4, 5-8, 9-11 días. Las barras de error corresponden al error estándar sobre la media.



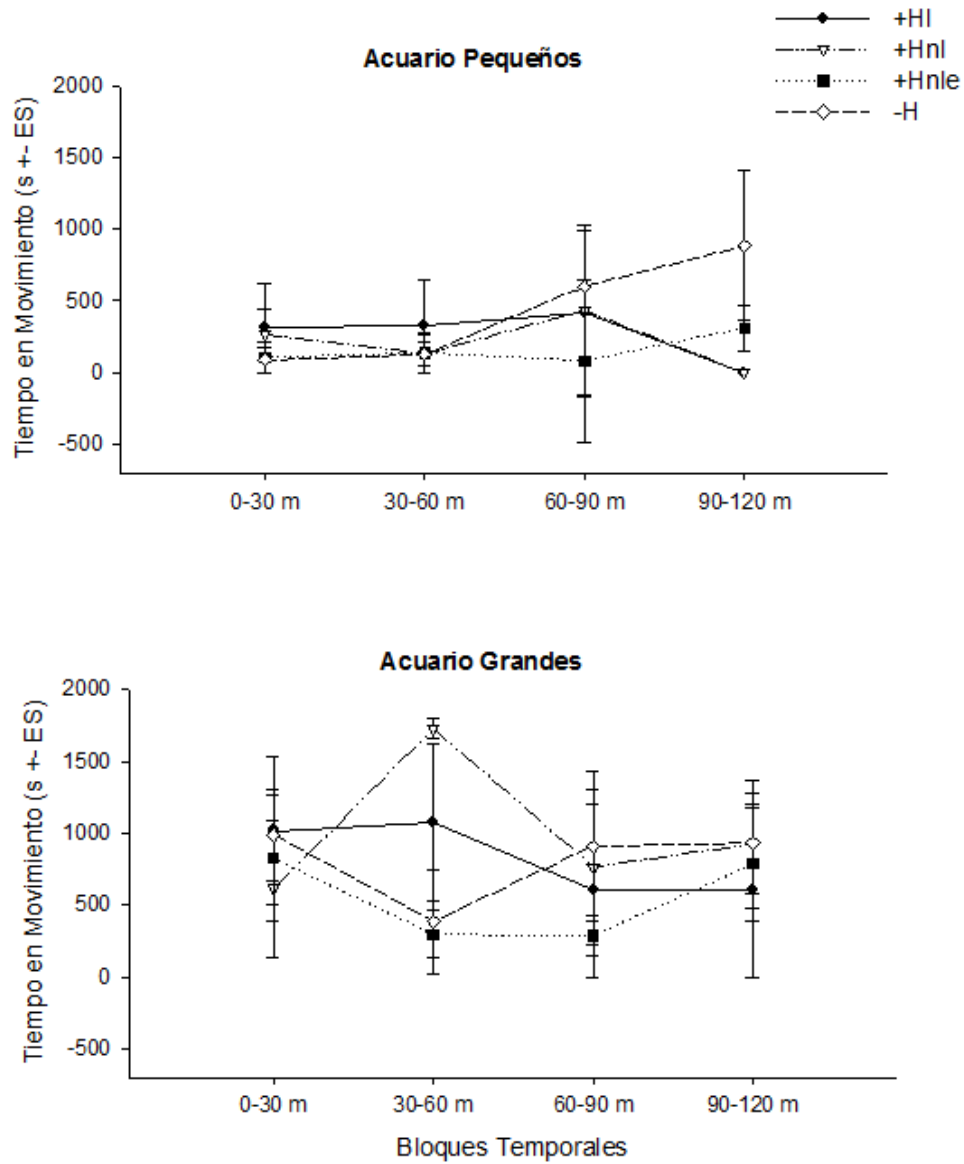
**Figura 9.** Duración de eventos de forrajeo (% del total de tiempo total por día) por parte de *Tetrapygnus niger* expuestos a los tratamientos +HI: *Heliaster* “letal”, +Hnl: *Heliaster* no letal no alimentado, +Hnle: *Heliaster* no letal comiendo conespecificos y -SH: Control sin *Heliaster*, durante horas de Oscuridad en los acuarios pequeños (paneles superiores) y grandes (paneles inferiores) para los bloques temporales de 1-4, 5-8, 9-11 días. Las barras de error corresponden al error estándar sobre la media.



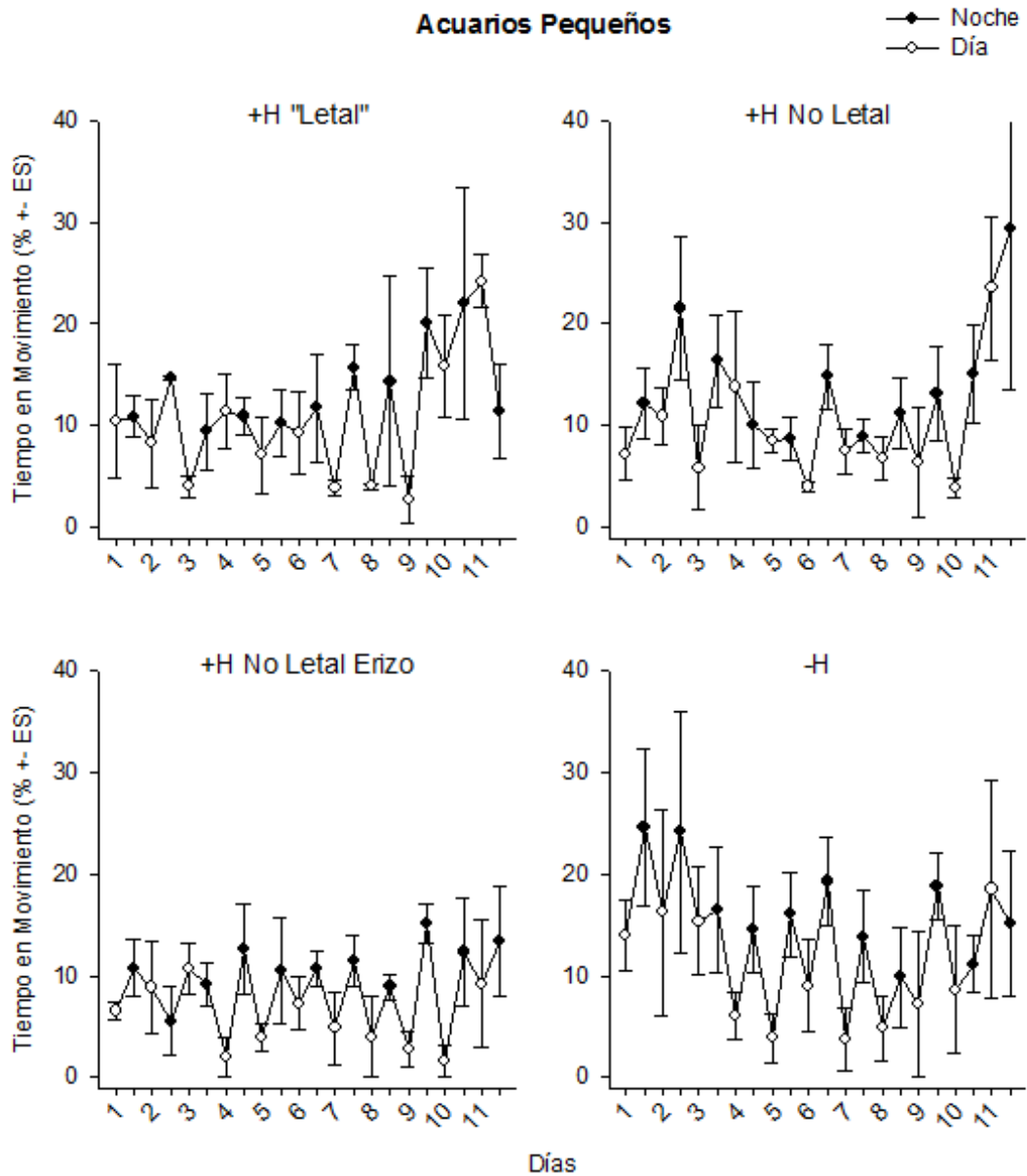


**Figura 10.** Cambio en biomasa de algas ( $\text{g/day/cm}^2 \pm \text{ES}$ ) corregido por cambios autogénicos (ver Materiales y Métodos para más detalle) bajos los tratamientos experimentales de depredador +Hl: *Heliaster* “letal”, +Hnl: *Heliaster* no letal no alimentado, +Hnle: *Heliaster* no letal comiendo conoespecificos y -H: Control sin *Heliaster*.

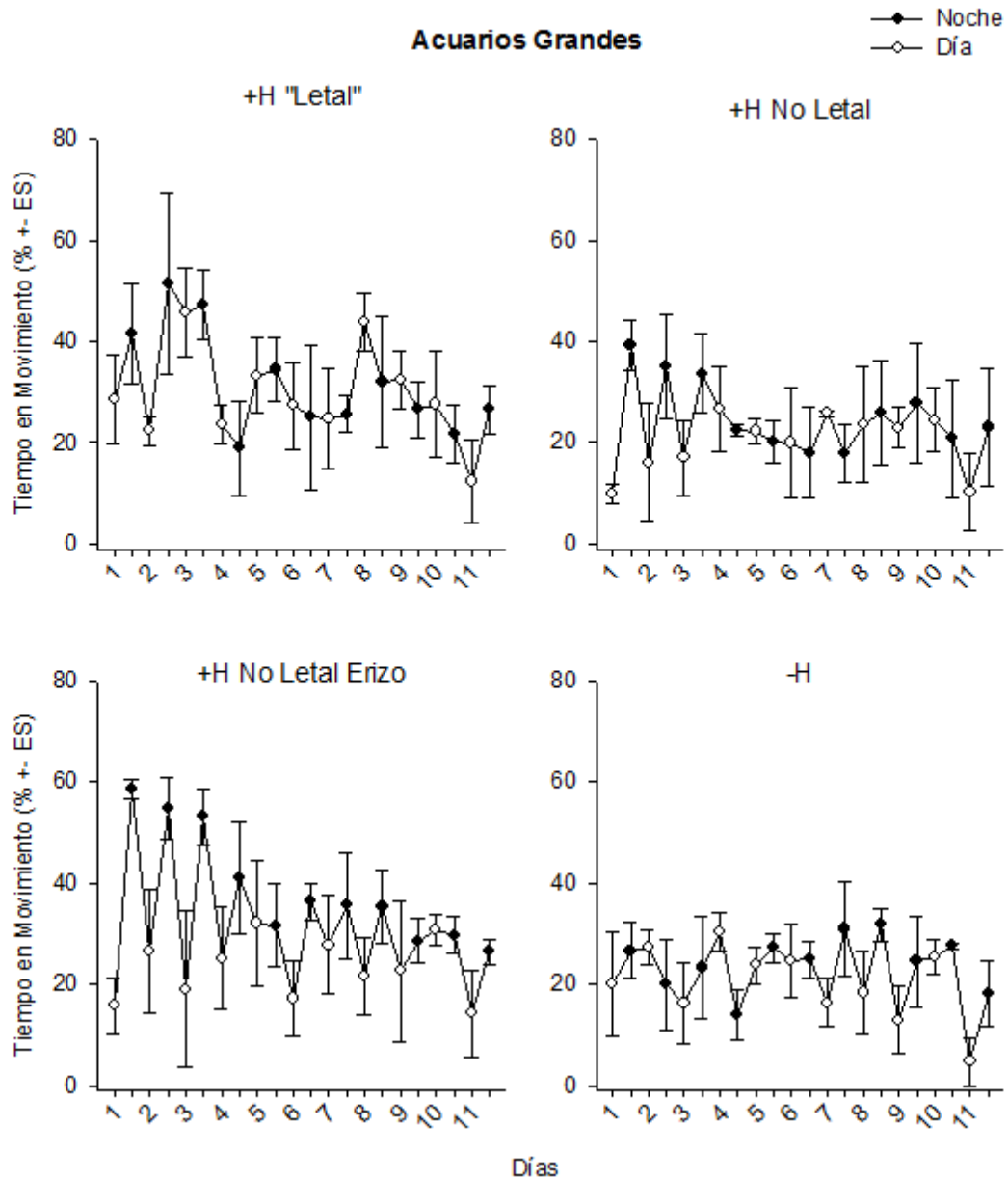
## Material Suplementario



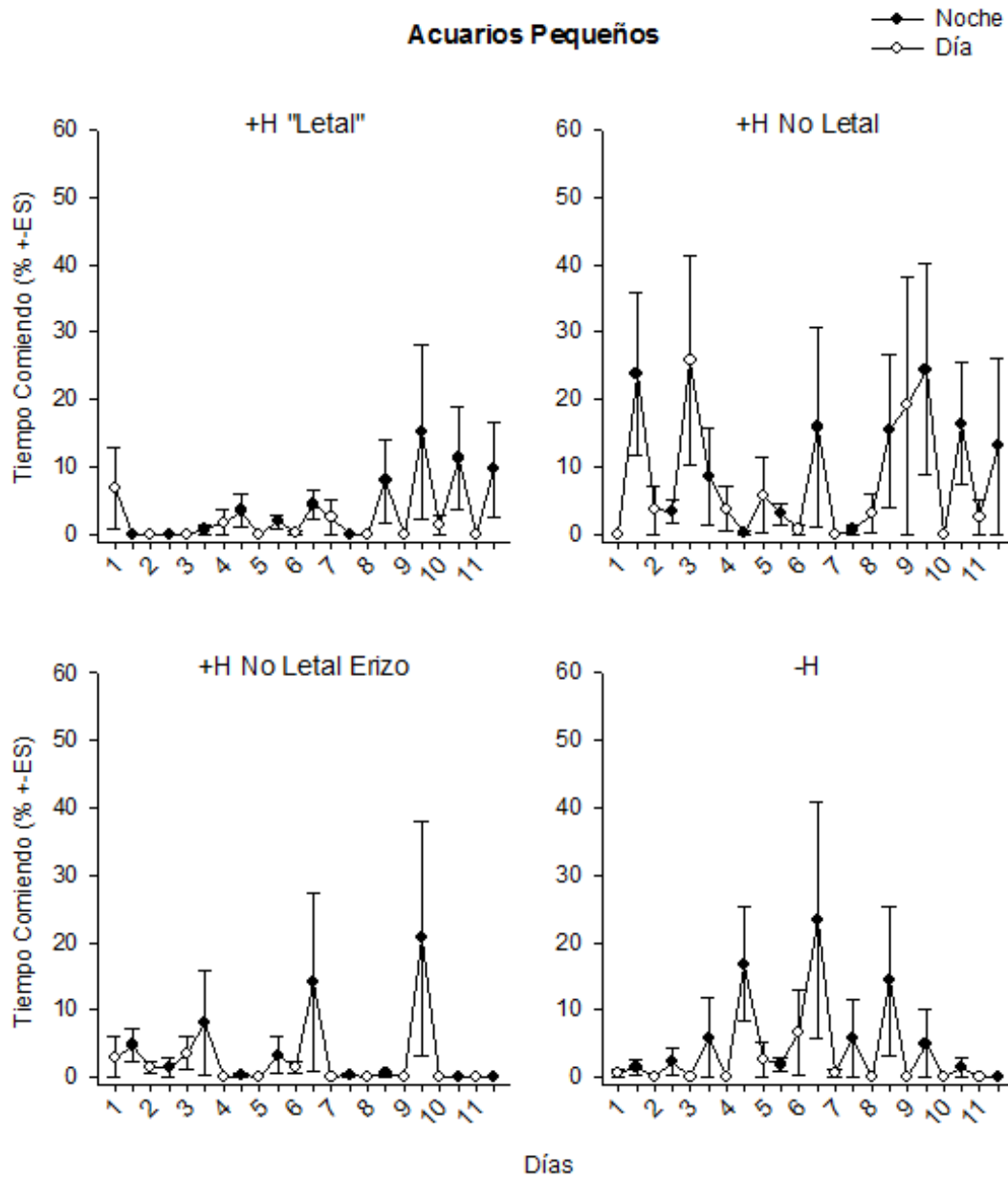
**S1.** Variación temporal de la proporción de tiempo en movimiento ( $\pm$ ES) para los erizos expuestos a *Heliaster* letal (+HI), *Heliaster* no letal no alimentado (+Hnl), c) *Heliaster* no letal comiendo conespecificos (+Hnle) y Control sin *Heliaster* (-H) en los cuatro bloques temporales considerados en la respuesta de corto plazo de *T. niger*.



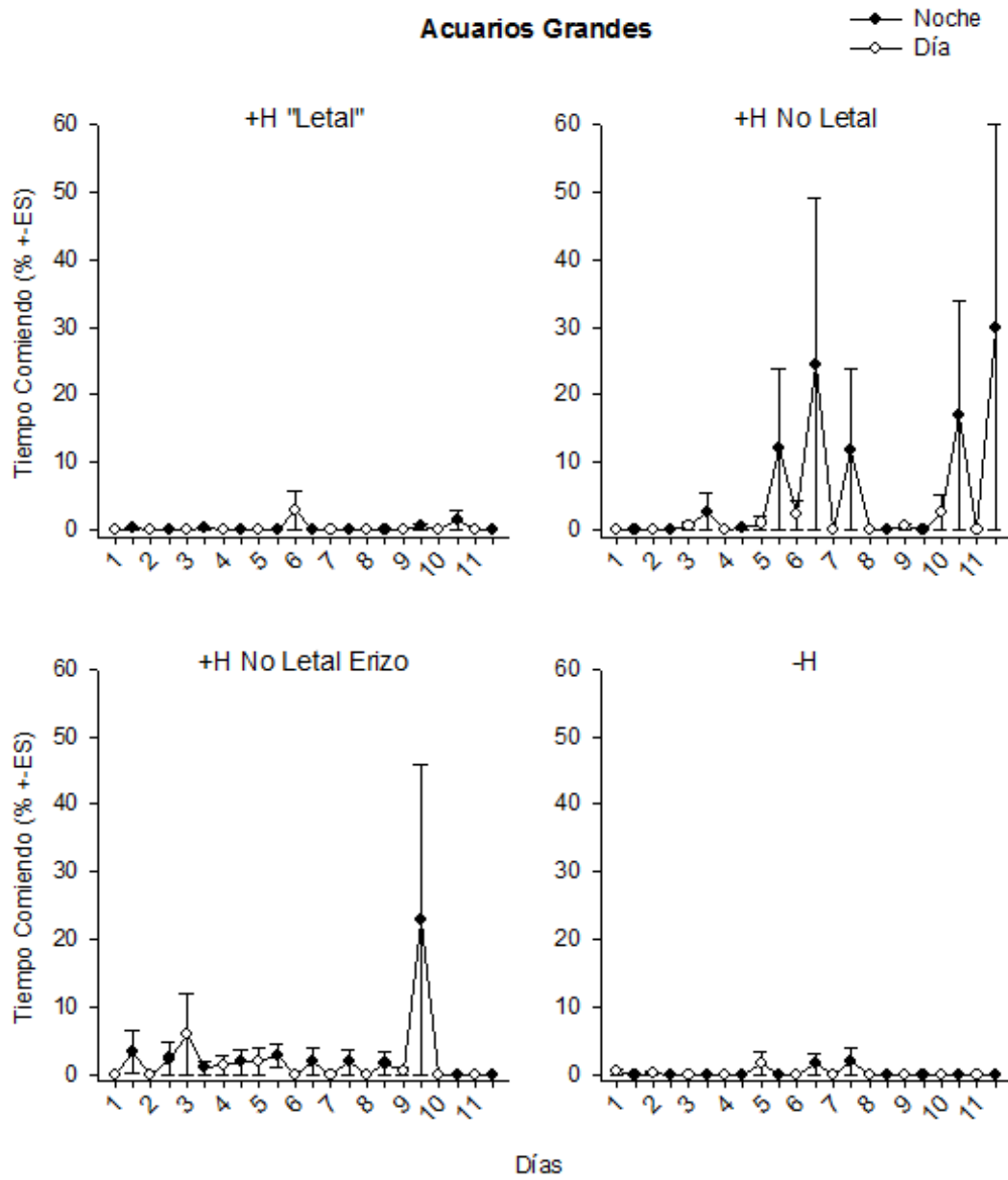
**S2.** Variación temporal de la proporción diaria de tiempo en movimiento ( $\pm$ ES) para los erizos expuestos a *Heliaster* letal (+Hl), *Heliaster* no letal no alimentado (+Hnl), c) *Heliaster* no letal comiendo conespecíficos (+Hnle) y Control sin *Heliaster* (-H) durante el día (puntos blancos) y la noche (puntos negros) en acuarios pequeños.



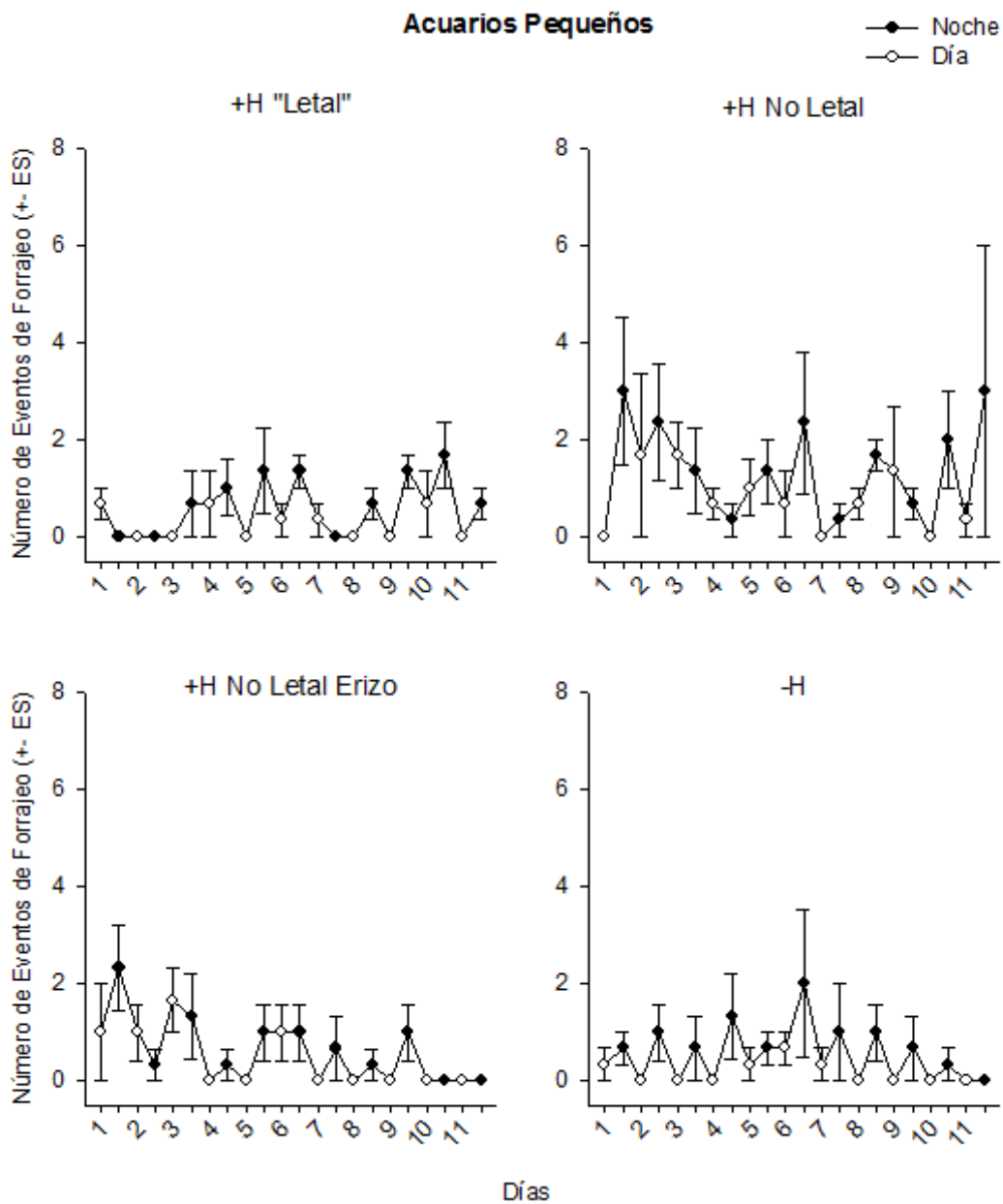
**S3.** Variación temporal de la proporción diaria de tiempo en movimiento ( $\pm$ ES) para los erizos expuestos a *Heliaster* letal (+Hl), *Heliaster* no letal no alimentado (+Hnl), c) *Heliaster* no letal comiendo conespecíficos (+Hnle) y Control sin *Heliaster* (-H) durante el día (puntos blancos) y la noche (puntos negros) en acuarios grandes.



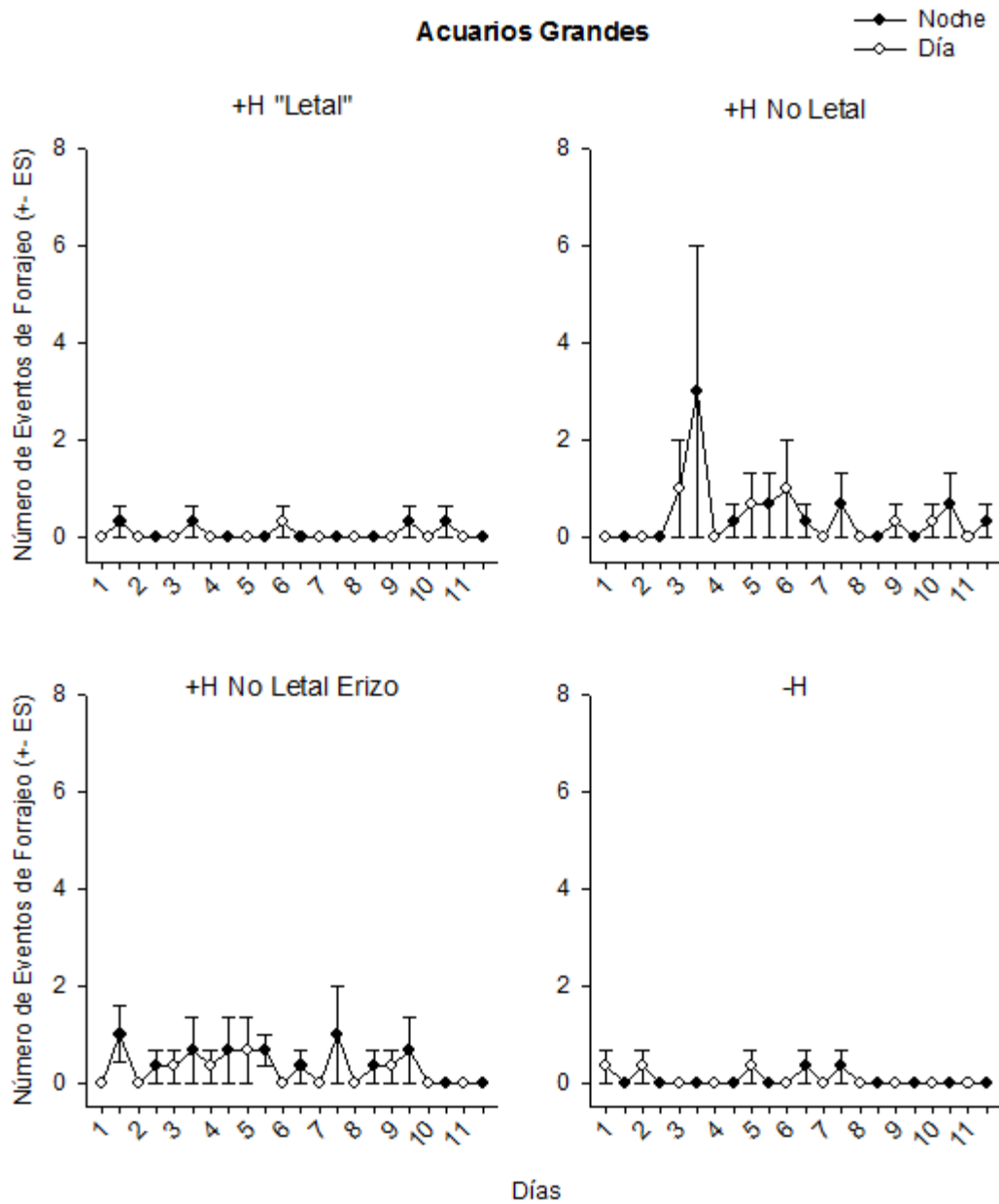
**S4.** Variación temporal de la proporción diaria de tiempo comiendo ( $\pm$ ES) para los erizos expuestos a *Heliaster* letal (+Hl), *Heliaster* no letal no alimentado (+Hnl), c) *Heliaster* no letal comiendo conespecificos (+Hnle) y Control sin *Heliaster* (-H) durante el día (puntos blancos) y la noche (puntos negros) en acuarios pequeños.



**S5.** Variación temporal de la proporción diaria de tiempo comiendo ( $\pm$ ES) para los erizos expuestos a *Heliaster* letal (+Hl), *Heliaster* no letal no alimentado (+Hnl), c) *Heliaster* no letal comiendo conespecificos (+Hnle) y Control sin *Heliaster* (-H) durante el día (puntos blancos) y la noche (puntos negros) en acuarios grandes.



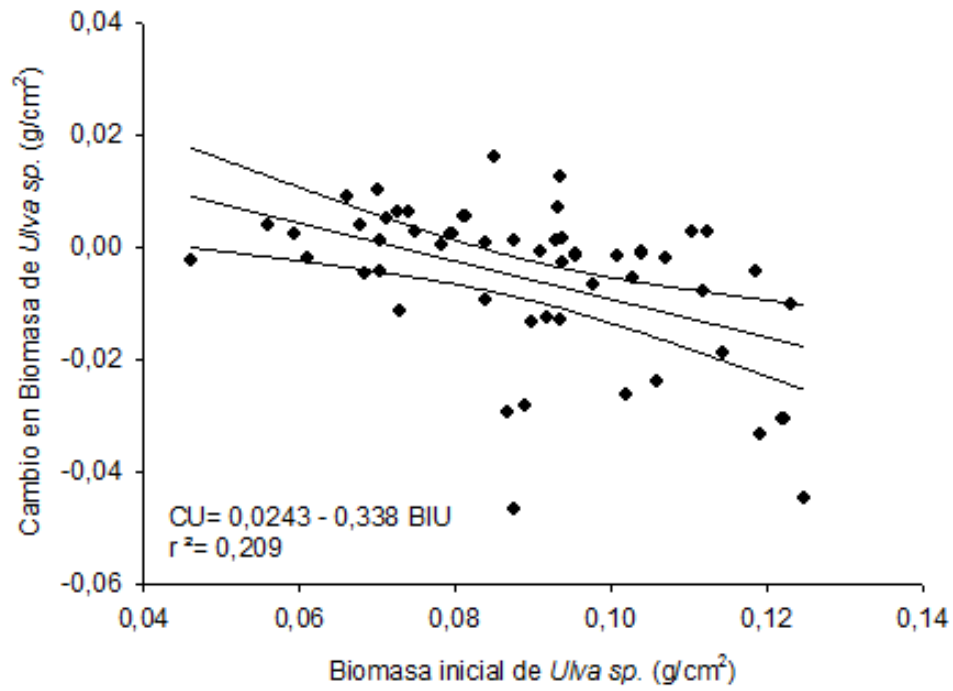
**S6.** Variación temporal del número diarios de eventos de forrajeo ( $\pm$ ES) para los erizos expuestos a *Heliaster* letal (+Hl), *Heliaster* no letal no alimentado (+Hnl), c) *Heliaster* no letal comiendo conespecificos (+Hnle) y Control sin *Heliaster* (-H) durante el día (puntos blancos) y la noche (puntos negros) en acuarios pequeños.



**S7.** Variación temporal del número diarios de eventos de forrajeo ( $\pm$ ES) para los erizos expuestos a *Heliaster* letal (+Hl), *Heliaster* no letal no alimentado (+Hnl), c) *Heliaster* no letal comiendo conespecificos (+Hnle) y Control sin *Heliaster* (-H) durante el día (puntos blancos) y la noche (puntos negros) en acuarios grandes.



### Cambio en Biomasa de Ulva sobre Biomasa Inicial



**S8.** Análisis de regresión lineal (con Intervalos de Confianza al 95%) de la diferencia entre la biomasa inicial y final de *Ulva sp.* (Cambio en Biomasa) sobre la biomasa inicial en los transplantes.

### **Behavioral and physiological responses of limpet prey to a seastar predator and their transmission to basal trophic levels.**

Tatiana Manzur<sup>\*ab</sup>, Francisco Vidal<sup>b</sup>, José F. Pantoja<sup>c</sup>, Miriam Fernández<sup>b</sup>, Sergio A. Navarrete<sup>b</sup>

a Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas (CEAZA), Universidad Católica del Norte,  
Larrondo 1281, Coquimbo, Chile.

b Estación Costera de Investigaciones Marinas and Center for Marine Conservation, Pontificia  
Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile.

c Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Larrondo 1281, Coquimbo, Chile.

Corresponding Author e-mail: [tmanzur@bio.puc.cl](mailto:tmanzur@bio.puc.cl)

## Summary

1. Empirical studies in tri-trophic food webs indicate that non-lethal effects of predators on prey can indirectly affect lower trophic levels and entire communities, a phenomenon named Trait Mediated Indirect Interactions (TMII). Different types of anti-predator responses, their energetic costs and spatio-temporal scales can lead to different effects on the prey population, affecting both the direction and the magnitude of TMII.
2. We investigated behavioral and physiological responses of an herbivorous limpet, *Fissurella limbata*, to a common seastar predator, *Heliaster helianthus*, and evaluated whether the escape response of the limpets translated into positive or negative effects on green algae, *Ulva* sp.
3. Our experimental results show that the sole presence of *Heliaster* chemical cues leads to an immediate (hours) increase in oxygen consumption by *F. limbata*. Moreover, over a 9 day experiment, *Heliaster* presence led to increased movement and distance traveled by limpets, especially when the seastars were allowed to pursue the prey within the tanks. In contrast to most other tri-trophic systems investigated, where intermediate consumers display escape responses, *Fissurella* seemed to increase feeding in the presence of the predator, potentially leading to negative effects of carnivores on lower trophic levels. Increased foraging can be visualized as a way to compensate for the elevated energetic costs (stress, movement) induced by the predators.
4. We suggest that the negative behavior-mediated indirect effects of predators on basal species, by increasing energy expenditure of the middle trophic level could emerge because of the cost associated with the anti-predator response over the temporal and spatial scales in which non-lethal effects develop in nature.

Keywords: behavior, energetic cost, non-lethal predator effects, oxygen consumption, trait mediated indirect effects.

## Introduction

Predators impact prey species simultaneously by consumptive (lethal) and non-consumptive (non-lethal) effects. Non-lethal predator effects occur when prey survives an encounter by modifying some trait, such as morphology, behavior or physiology following the detection of a predator through visual, tactile or any other sensory apparatus (Werner & Peacor 2003; Miner et al. 2005; Peckarsky et al. 2008). A growing body of empirical studies has established that these interactions can have from very short to life-long effects on the physiological performance of individuals, on the dynamics and distribution of the prey population, the evolution of the predator-prey system, and on the structure, diversity and dynamics of entire communities through the propagation of trait-mediated indirect interactions, TMII (Turner & Mittelbach 1990; Schmitz, Beckerman & O'Brien 1997; Trussell, Ewanchuk & Matassa 2006a; Matassa 2010; Madin et al. 2010 a; Aránguiz-Acuña, Ramos-Jiliberto & Bustamante 2011a; and see Abrams 1987; 1996; 2000; Preisser, Bolnick & Benard 2005; Miner et al. 2005, for reviews). Despite their recognized importance, incorporating trait-prey responses into a synthetic conceptual framework has proven exceedingly difficult and most efforts deal with specific types of responses (e.g. Abrams 1987; Ramos-Jiliberto, Frodden & Aránguiz-Acuña 2007; Ramos-Jiliberto et al. 2008; Arditi, Michalski & Hirzel 2005; Krivan 2007; Peacor et al. 2012).

Prey responses are complex and usually involve biochemical, physiological, metabolic and behavioral pathways. Furthermore, a prey response develops across a range of spatio-temporal scales following the predator encounter/perception. The most common non-lethal effects reported are rapid changes in prey behavior that usually entail reduced activity and foraging, increased use of refugia and active escape (Kats & Dill 1998; Dee, Witman & Brandt 2012). These behavioral responses can lead to very different effects on prey population and on lower trophic levels. For example, decreased overall prey activity induced by a predator does not necessarily cause a decrease in their food consumption. In this case, it is unclear which direction the indirect effect would be or whether there would be a TMII altogether (McPeck 2004; Steiner 2007). Empirical studies frequently report a positive TMII of predators on the abundance of primary producers

whenever the predators decrease overall activity of the prey, suggesting that in most systems lower activity entails reduced feeding as well (Werner & Anholt 1993; Trussell, Ewanchuk & Bertness 2002; 2003; Dee, Witman & Brandt 2012). Reduced feeding usually comes at the cost of reduced survival, growth or reproduction, but few studies have examined these longer-term consequences on prey and the effects on TMII over time (Lima 1998; Lima & Dill 1990; Aránguiz-Acuña et al. 2011b). When prey response to predation risk entails an active escape from the predator, there is always an immediate, if transient, reduction in consumption of lower trophic level species and, therefore, at sufficiently small spatio-temporal scales a positive TMII is always expected. But if the energy expenditure during the active escape is compensated at a later time by increased prey consumption (e.g. instead of reductions in individual growth or reproduction), then the net TMII on lower trophic levels might be negative instead of positive (e.g. Skaloudova et al. 2007). Indeed, if escape responses are costly, then possible outcomes from non-lethal interactions can be counter-intuitive, leading to an increase in food consumption or perhaps changes in herbivore dietary preferences.

High energy demands of behavioral responses to the presence of predators can be associated with an increase in metabolic rate (Angilletta et al. 2003; Steiner & Van Buskirk, 2009). Higher heart beat rates, increased ventilation, high respiration rates and increased expression of heat-shock proteins (HSP) are physiological and biochemical responses that have been reported for mussels (Rovero, Hughes & Chelazzi 1999), fishes (Barreto, Luchiari & Marcondes 2003; Hawkins, Armstrong & Magurran 2004) and water fleas (Pauwels, Stoks & De Meester 2005) when exposed to predators. These physiological responses have been interpreted as mechanisms to compensate for the stress generated by increased risk of mortality, or to cope with the increased energy demand involved in the response itself (Rovero, Hughes & Chelazzi 1999; Pauwels, Stoks & De Meester 2005).

In summary, examining non-lethal effects of predators on prey dynamics and their propagation through the food web, through behavioral and physiological prey responses over extended temporal and spatial scales can offer greater insights into the nature of the interaction and

provide a mechanistic basis for a much needed conceptual syntheses. To advance in this direction, in this study we evaluate the physiological and behavioral effects of a seastar predator on a large keyhole limpet. Both rocky shore intertidal species are conspicuous consumers and the limpet in particular is reported to have strong effects on algal assemblages (Oliva & Castilla 1986, Aguilera & Navarrete 2012) allowing us to evaluate whether such TMII effects of the seastar on the limpet translate to lower trophic levels of the intertidal food web.

The keyhole limpet *Fissurella limbata* (Sowerby) is a large (average 8 cm shell length) grazer species, common in the low rocky shore along southern Peru and most of Chile, from about 10°S to 42°S (Oliva & Castilla 1992). *Fissurella limbata* has an ample diet, feeding on periphyton, ephemeral green algae, corticated algae and small stages of intertidal invertebrates (Camus, Daroch & Opazo 2008; Aguilera & Navarrete 2011; Aguilera & Navarrete 2012a). Due to its large size and long foraging excursions, this species can play an important ecological role in the dynamic of algal assemblages, modifying community landscape on the lower shore (Oliva & Castilla 1986, Aguilera & Navarrete 2012a). Coexisting with *F. limbata* in the mid and low rocky shore is the sun star, *Heliaster helianthus* (Lamarck), the most conspicuous and ecologically important intertidal seastar in the SE Pacific (Castilla & Paine 1987; Tokeshi 1989). Although *F. limbata* is found at low frequencies in *H. helianthus* diet, mostly at sites where the abundance of sessile prey (primarily mussels but also barnacles) is low (Navarrete & Manzur 2008; Barahona & Navarrete 2010), seastars commonly attack all fissurellid species and other mobile grazers (scurrid limpets, chitons, urchins) they encounter while foraging at high or low tides (Navarrete & Manzur 2008; Manzur & Navarrete 2011). Sometimes these interactions result in prolonged pursuits of the prey that may last for 30-40 minutes and may or not be successful (personal observations). Experimental studies in the field have shown that *F. limbata* exhibits a species-specific recognition of *H. helianthus*, and upon physical contact limpets display a rapid (< 10 seconds) and active escape response, in which individuals can travel up to 40 cm (5-6 times their body length) before resting (Escobar & Navarrete 2011), suggesting a considerable energy expenditure by *Fissurella* following a predator threat.

Considering the active escape response of *Fissurella* to *Heliaster* and the important ecological role that the limpet plays on the lower shore macroalgal, we conducted experiments to evaluate the behavioral and physiological responses of the prey to the presence of the predator. We examined whether such responses cascaded down to produce a positive indirect effect on highly palatable macroalgae, as demonstrated in other marine rocky shores. Furthermore, we evaluated whether these responses caused changes in the activity time budget, foraging behavior and distances traveled by the limpets a correlate of energy expenditure during the response, and whether predator presence induced an increase in oxygen consumption rates beyond the costs associated with the active escape.

### **Materials and methods**

Experiments were carried out in Las Cruces (33°30'S, 71°30'W), central Chile, at the Estación Costera de Investigaciones Marinas (ECIM), between April and May of 2011. All animals and algae used in laboratory trials were collected from the low intertidal shore near the laboratory, outside the local marine reserve.

### **Non-Lethal effects of *Heliaster* on *Fissurella* and TMII on macroalgae**

We designed a laboratory experiment to evaluate whether the predator *Heliaster helianthus* had non-lethal effects on foraging activity, time allocation (resting, moving) and overall displacement (distance travelled) of the keyhole limpet *Fissurella limbata*. In addition, the experiment examined whether non-lethal effects on this grazer species translated into measurable effects on the green alga *Ulva* sp., a common resource for keyhole limpets (Aguilera & Navarrete 2012a).

The experiment was conducted in replicated 24 l tanks with a cement bottom plate provided with a crevice to offer a refuge for the limpet prey during simulated low tides. In the field, limpets rest inside crevices during daytime low tides, which apparently reduces temperature and desiccation

stress (Aguilera & Navarrete 2011; Aguilera & Navarrete 2012b). To further reduce temperature stress and maximize the time individuals could forage, we conducted the experiment under an opaque roof that protected animals from direct solar radiation but maintained the natural daylight cycle.

Tanks were divided in two sections by a coarse plastic mesh that allowed free flow of water through the tank. A semidiurnal tidal regime was simulated during acclimation and throughout the experiment by emptying or filling the tanks every 6 hours, beginning the experiment with the corresponding natural tide for that time. In this manner, four environmental conditions were recreated in the experiment (diurnal and nocturnal, high and low tides). In the section of the tank with the crevice we included a single adult limpet (shell length 7.1- 9.0 cm) and an algal transplant made with fresh *Ulva* sp. glued to a 10 x 10 cm acrylic plate. In the other tank section we applied the predator treatment when corresponded (see below). The water inlet of the tanks was located in the predator section and the outlet in the limpet section, ensuring water flow from the predator to the target limpet.

To control for algal autogenic changes in biomass and since limpet and predator exudates could affect algal growth (Peterson & Renaud 1989; Weidner *et al.* 2004), we also included an algal transplant (5 x 5 cm) on a side wall of the tank protected inside a coarse mesh box that impeded limpet grazing. Algae for all transplants were collected in the field two days before the experiment, immediately attached to previously weighed acrylic plates and maintained in running sea water until experiment began. Right before the experiment started, algal transplants (algae firmly attached to the acrylic plate) were spun in a salad spinner for approximately 30s to remove excess water and weighed in a precision scale. Limpets and predators were maintained food deprived, in separate 100 l running seawater tanks for seven days before starting the experiment to allow animals to acclimate and to standardize hunger level among individuals.

The experiment consisted of five predator treatments: 1) Non-lethal non-feeding predator (+Hnl), in which we placed one *Heliaster* individual in one of the tank sections separated from the



target limpet by the plastic mesh to prevent attacks, but allowing free flow of waterborne chemical cues. The predator was not fed for the duration of the experiment. 2) Non-lethal feeding predator (+Hnlf), which was the same as above, but in this case a second individual of *F. limbata* was introduced to the predator section of the tank. The *Heliaster* predator could then pursue, attack and consume the limpet. Eaten limpets were replaced with new ones. This allowed us to evaluate the effect of conspecifics predation on the behavior of the target limpet. 3) “Lethal” *Heliaster* treatment (+HI), in which the predator was placed within the limpet section of the tank. This treatment was not intended to evaluate consumptive effects of *Heliaster* on the limpet, but to reproduce the limpet escape behavior observed in the field, which in many cases involves long displacements after physical contact with the predator (Escobar & Navarrete 2011) and active persecution by the predator. If the attacks resulted in limpet death, the limpet was replaced with a new individual. 4) Control without predator (-H), which allowed us to contrast limpet behavior against the other treatments. Besides these four predator treatments that were used in statistical comparisons of direct and indirect effects of predators, we included: 5) a control treatment without limpet or predator (-H-L), which accounted for autogenic changes in algal biomass and allowed us to evaluate potential effects of effluents from prey or predator on algal growth (see details below). All treatments were replicated 4 times and the experiment was run for 9 days, when limpets and predators were removed and all algal transplants were weighed using the same procedure described above. All animals that were alive at the end of the experiment were returned to the field.

Continuous recording (24 hours per day of the experiment) of limpet and predator behavior were obtained with web cameras located above each tank. At night, infrared recording was aided by adding a dimmed red light above the tanks. Cameras were connected to computers using Active WebCam v.10.1® which allows for simultaneous continuous recording. Analysis of the video recordings was performed manually by one observer and consisted in recording the time in which limpets were moving or resting, and the distance traveled by limpets during day and nighttime each day. To be conservative and accurate, we considered that a limpet was moving when it actually

changed its position and when it displayed a rotating movement to either side of the shell (a behavior displayed by *F. limbata* when escaping from *Heliaster* in the field, Escobar & Navarrete 2010). All other behaviors (e.g. lifting of the shell from the substratum, movement of the head or extension of the cephalic tentacles, etc.) were registered as resting. Active feeding could not be unequivocally determined from the aerial view provided by cameras so we could not estimate foraging time from video analysis. Therefore, during the experiment we conducted direct observations of limpets feeding behavior. During the first five days of the experiment, the frequency of this direct observations was every six hours (8:00, 14:00, 20:00 and 2:00) but for the last four days, and because of the low number of feeding events, we increased the frequency of monitoring to every hour from 14:00 to 8:00 the next day, totalizing 86 observations for each limpet during the 9 days of the experiment. Out of these 86 observations we quantifying the number of times each limpet was observed feeding (1) or not (0). These discrete direct observations did not provide estimates of the length of time of feeding events.

### **Prey Metabolic Rate under Risk of Predation**

To test whether the risk of predation by *Heliaster* affected the basal metabolic rate of *Fissurella limbata*, we measured oxygen consumption of keyhole limpets in the presence (+Exudate) and absence (-Exudate: Control) of waterborne chemical cues of this predator. To this end, limpets (shell length 5.5-7.7 cm) were collected in the field, their shells were thoroughly cleaned and then individuals were maintained food deprived in 40 l running seawater tanks to acclimate at 15°C for 48 h. After acclimation, an individual limpet was randomly chosen and placed on an acrylic plate inside a 500 ml closed circuit metabolic chamber filled with oxygen-saturated pure filtered seawater (0.45 µm) or with filtered exudates of *Heliaster*. Chambers were placed inside a temperature-regulated bath at 15°C. Since *Heliaster* cues elicit escape responses in *Fissurella* (Escobar & Navarrete 2011), oxygen consumption can increase not only by alteration of basal metabolic rate, but also as a result of increased movement and energy expenditure. To

separate these two effects, we measured oxygen consumption of limpets that were either allowed to move freely within the chamber or tied down to an acrylic plate using cable ties that impeded movement and then subjected to predator exudates or pure sea water. Four replicates were conducted for each treatment combination. To reduce manipulation stress, limpets were placed (tied or untied) on the plate for 30 to 40 minutes before introducing them into the metabolic chambers. Additionally, since keyhole limpets are nocturnal (Aguilera & Navarrete 2011), we conducted separate day and night time measurements. Exudates of *Heliaster* were obtained by immersing four individuals (24.0 to 29.0 cm in diameter) in 40 l tanks with filtered (1 $\mu$ m) seawater for 48 h. Water with exudates was then filtered to 0.45  $\mu$ m to eliminate residues that could interfere with oxygen measures. Blanks for oxygen consumption or drift in the metabolic chambers were run for each measurement of limpet oxygen consumption, by measuring consumption rate inside the chamber immediately before the incorporation of each limpet during a 10 minutes period. These values were then subtracted from calculations. Oxygen measurements were conducted using a fiber optic oxygen meter Fibox 3 (PreSens®) that was calibrated at 0 % and 100 % of air saturation (using sea water saturated with nitrogen and air respectively) before measurements began. Oxygen depletion was limited to a maximum of 40% air saturation within the chambers. The experiment was then terminated and limpets were sacrificed, dissected to separate flesh from shells and placed in a drying oven at 80°C for 48 h to obtain individual dry weight (flesh dry weight + shell dry weight). We calculated limpet metabolic rate as  $\mu$ mol of oxygen consumed per unit of time (minutes) and per gram of body mass (Brante *et al.* 2003).

### **Data Analysis**

To evaluate whether limpet activity varied significantly between day and night time, between high and low tide, and among the different treatments, we calculated the frequency of individual limpets observed moving and the total time limpets moved each day under the different conditions. Frequency of individuals moving was averaged across the 9 days duration of the

experiment for each environmental condition and treatment and compared using log-linear modeling, a generalized linear model extension of contingency tables (Agresti 1996). Daily activity time was expressed as the total time a given limpet moved in the experimental arena divided by the total time recorded for that experimental tank each day. Before statistical analysis we plotted daily activity times against day of experiment for each individual replicate to determine whether there was a trend for limpets' daily activity to change during the course of the experiment. Since there were no apparent 'long-term trends' or drift in individual movement (see Results), we calculated the daily time activity of each individual throughout the experiment. These data were log-transformed to conform to variance homogeneity assumptions and analyzed using a three-way ANOVA with daytime (night or day), tide (high or low) and predator treatment (four treatments) as fixed factors. In case of significant differences among treatments and absence of interactions, orthogonal planned contrasts tested: a) whether the three treatments with *Heliaster* differed from the control without predator (-H), b) whether the "Lethal" predator treatment (+Hl) differed from the two non-lethal predator treatments (+Hnl and +Hnlf), and c) whether there was a difference between the non-lethal predator feeding on limpets (+Hnlf) from the non-lethal predator not feeding (+Hnl).

Similarly, the total distance traveled by an individual (in cm), measured from videos with the aid of a 3 x 3 cm grid, was calculated for each day of the experiment and then plotted against time to look for trends during the course of the experiment. In the absence of time trends (see Results), the daily average distance traveled by each individual throughout the experiment was calculated and analyzed with a three-way ANOVA as described above for activity times. The same planned contrasts were applied in case of significance. Although distances traveled are not independent from the time individuals are observed moving, we believe they test sufficiently different aspects of limpet behavior and therefore we did not correct significance levels.

Direct observations of feeding individuals (number of feeding events) were expressed as the total number of times (events) an individual was observed feeding on the algal transplant throughout the experiment. The same number of direct observations was made for all individuals in

the experiment. Since no limpets were observed feeding under any of the environmental conditions in the -H predator treatment (see Results) we dropped this treatment from statistical comparisons. Moreover, since in the other predator treatments the limpets did not feed under some environmental conditions (see Results) we pooled feeding observations for each individual across all daylight and tide combinations and compared predator treatments using the Log likelihood Chi-square test ( $\chi^2$ ) in a contingency table (Sokal & Rohlf 1981).

Before statistical comparisons of treatment effects on algal growth and because of inevitable small differences in initial algal biomass among replicates, we examined whether the rate of algal production/loss was related to initial biomass of the transplants by regressing the difference in algal wet weight (final minus initial biomass) against initial biomass. Since no trend was apparent (see Results), the simple difference between final and initial biomass was considered a good estimate of algal net growth/loss. To determine whether the effluents released by the predator and/or limpet (e.g. nutrients in the form of ammonium) had effects on algal biomass change rate (ABC), we compared, with a one way ANOVA, the change in algal biomass (expressed as  $ABC_{NG} = (\text{final biomass} - \text{initial biomass})/\text{days/area}$ , in  $\text{g day}^{-1} \text{cm}^{-2}$ ) observed in the transplants protected from grazing deployed inside each aquarium and the ABC rate measured in the no predator no limpet control treatment (-H-L). In case of significance, the following planned contrasts tested: a) whether the combination of sun star and limpet effluents affected algal growth (treatments +Hnl, +Hnlf, +HI against -H-L) and b) whether limpet effluents alone differed from control without effluents (-H versus -H-L).

To evaluate the effect of predator treatments on algal biomass, we calculated algal biomass change per unit area of the transplants exposed to limpet grazing in each replicate ( $ABC_G$ ) and subtracted the algal biomass change rate per unit area observed in the transplants protected from grazing ( $ABC_{NG}$ ). In this manner, differences in ABC rate among predator treatments could be solely attributable to limpet consumption. A one-way ANOVA was then used to compare the four predator treatments, followed by the same planned contrasts described above for the effects on daily

activity time. Note that since we found no effects of predator or limpet effluents on ABC rates (see Results), another way to test the hypothesis of predator effects on algal biomass change is by using uncorrected biomass change rates observed in the transplants exposed to grazing and compare the four predator treatments and the control treatment with no predator and no limpet (-H-L). We preferred the test described above because of the more precise control of autogenic algal changes in each replicate.

Significance of treatment effects on limpet metabolic rates were assessed with a three-way ANOVA with *Heliaster* exudates (present or not), limpet mobility (tied or free to move) and daytime (day or night) as orthogonal fixed factors. Raw data were used for analysis because they conformed to normality and variance homogeneity assumptions.

## Results

### Non-lethal effects of *Heliaster* on *Fissurella* and TMII on macroalgae

The daily frequency of keyhole limpets observed moving varied significantly among predator treatments, but the effect depended on tidal condition (Fig. 1A, Table 1, significant Treatment x Tide interaction). In the presence of a lethal *Heliaster* (+Hl), the majority of limpets were observed moving during nighttime high tides (88 %), the highest of all predator treatments and environmental conditions, which contrasted sharply with the frequency of moving individuals under the same environmental condition but in the -H treatment (50 %). A high proportion of limpets (69.4 %) were observed moving during daytime high tides when in the presence of a lethal *Heliaster*, while in all other predator treatments most of the limpets tended to move more at night (Fig. 1A). Moreover, in the presence of “lethal” *Heliaster* or non-lethal *Heliaster* but with conspecific keyhole limpet prey (+Hnlf), the frequency of limpets moving was higher at high than at low tide, but this was not the case in the other treatments (Fig. 1A). In general, more individuals moved in experimental treatments in which *Heliaster* was present (between 52 and 62 % in +H treatments) than when it was absent (42 % in the -H treatment, Table 1, significant predator

Treatment effect), and during high tides (58 %) than low tides (42 %), but these main effects must be interpreted with caution due to the significant interaction. Also more limpets moved during dark hours (53 %) than daytime (47 %), a pattern that was consistent across the other treatments (Fig. 1A, Table 1).

We found no apparent long-term trends or ‘drift’ (i.e. signs of habituation) in individual behavior (total time moving and distance travelled per day) throughout the duration of the experiment in the different predator and environmental condition treatments (Figs. S1, S2, Supporting information). Visual inspection of the temporal pattern of the proportion of time limpets moved and also of the travelled distance by limpets per day suggest a more consistent day-night variability in the presence of “lethal” *Heliaster* (+HI) than in the other treatments (Figs. S1, S2, Supporting information), but this was not consistent throughout the experiment. Therefore, for the following analyses we averaged responses of replicate individuals throughout the duration of the experiment.

On average, the total time individuals were observed moving did not exceed 171 min per day, which corresponded to about 12 % of the total recorded time and thus, resting time represented more than 80 % of individual limpet activity budget. Daily average activity of individual limpets showed that *F. limbata* spends more time moving during high tides, irrespective of day time (Fig. 1B; Table 2a), except for the limpets in the absence of *H. helianthus* (-H) during nighttime, which tended to move slightly more during low tide. The presence of *Heliaster* increased daily average activity of the keyhole limpet as compared with treatments without predators (Fig. 1B), but ANOVA analysis (Table 2a) showed that this difference was only marginally significant ( $P=0.053$ ).

The maximum distance traveled in one day by a keyhole limpet reached 2.88 m and the average varied significantly among treatments. Daily average distance traveled was not different between day and night times, but significantly higher during high tides than at low tides (Fig. 1C, Table 2b). The presence of *Heliaster* significantly increased the daily distance traveled by *F.*

*limbata* in comparison to the control condition without predator (-H; Fig. 1C; Table 2b; Planned Contrasts). Moreover, the daily distance traveled by keyhole limpets in the lethal *Heliaster* treatment (+Hl) was more than twice as much than in the treatments with non-lethal *Heliaster* (+Hnl and +Hnlf) although the difference was not significant due to large variability among replicates (Table 2b; Planned Contrasts,  $P=0.065$ ). No differences in distance travelled were observed between *Heliaster* feeding or not feeding on conspecific prey.

Although feeding behavior of the limpets was infrequent during the experiment (on average three foraging events per capita out of the 86 observations made for each limpet, representing a 3.5% of the total observations), it occurred only in the presence of a lethal or non-lethal *Heliaster* and never in the absence of the predator (Fig. 2). Moreover, feeding by limpets was only observed during night high tides. Analysis with pooled feeding observations for each individual across all daylight and tide combinations among predator treatments (see data analysis for details) showed that feeding was significantly higher in keyhole limpets exposed to *Heliaster* physical contact than in the presence of a non-lethal *Heliaster* (Insert Fig 2; Log likelihood Chi-square Test;  $\chi^2=18,812$ ,  $df=2$ ,  $P=0.0001$ ).

During the course of the experiment, algal biomass changes ( $ABC_{NG}$ ) were not related to initial biomass of the transplant (Fig. S3, Supporting information) and therefore the linear estimate, was considered a good estimate of algal growth. The change in algal biomass observed within the transplants protected from grazing ( $ABC_{NG}$ ) was not different from the control treatment (-H-L), suggesting that effluents released by predator and limpets had no effect on algal growth (One Way ANOVA;  $F=1.612$ ;  $df=4, 14$ ;  $P=0.226$ ). Overall, algal biomass consumption by limpets (quantified by  $ABC_G$ ) under the different predator treatments was markedly low and highly variable among replicates (see error bars Fig. 3), with a maximum decrease of ca.  $0.001 \text{ g day}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ . In concordance with differences in limpet foraging behavior, algal biomass change was higher in the presence of *Heliaster* (Fig. 3), suggesting an increase in algal consumption by the keyhole limpets



under increased predation risk, but due to high variability among replicates, these differences were not significant (One Way ANOVA;  $F= 0.008$ ;  $df= 3, 11$ ;  $P= 0.971$ ).

### **Prey Metabolic Rate under Risk of Predation**

The stress induced by the presence of *Heliaster* chemical cues resulted in an increase in oxygen consumption by limpets compared to the control condition without exudates (Fig. 4; Table 3). Although oxygen consumption was higher when limpets were free to move than when they were tied down, this difference was not statistically significant. Similarly, although oxygen consumption tended to be higher at night than during daytime measurements (Fig. 4), these differences were not statistically significant (Table 3).

## Discussion

In this study, non-lethal effects of the presence of the seastar predator *Heliaster helianthus* strongly modified the keyhole limpet *Fissurella limbata* behavior and physiology, in terms of an increased movement activity, feeding on algae, and oxygen consumption.

The presence of cues from *Heliaster* caused an increase in limpet activity, regardless of whether the seastars were feeding or not on conspecific limpets, suggesting that for *Fissurella limbata*, *Heliaster* represents a strong threat, as demonstrated by Escobar & Navarrete (2011), and that the benefit of actively escaping exceeds the costs that this response could have. Additionally, the absence of differences between the behavioral response elicited by a non-lethal predator feeding on conspecifics or a predator not feeding at all suggest that predator risk cues are considerably more important to trigger prey responses (Trussell & Nicklin 2002).

We here evaluated two types of direct costs, a rapid physiological response expressed as increased oxygen consumption associated directly to the stress induced by the perception of a predator, and the escape response itself. The escape response took two forms in the experiment: a) increased movement activity following perception of predator cues in the non-lethal predator treatments, and b) the active escape from a pursuing seastar in the lethal predator treatment. The stress induced by the perception of a predator has been previously reported for different invertebrate and vertebrate prey species, demonstrating that non-lethal effects of predation can frequently and drastically influence prey physiology (McPeck, Grace & Richardson 2001; Kagawa & Mugiya 2002; Rovero, Hughes & Chelazzi 1999, Pauwels, Stoks & De Meester 2005). These non-lethal effects on prey physiology can be an instantaneous and reversible stress response (Steiner & Van Burskirk 2009), or have long-lasting consequences (Boonstra, Krebs & Stenseth 1998). For example, Steiner & Van Burskirk (2009) found that tadpoles immediately increased oxygen consumption in the presence of predatory dragonfly larvae, consistent with a ‘‘fight-or-flight’’ response. But over longer time, after three weeks of predator exposure, tadpoles lowered oxygen consumption, reducing the cost of the predator defense on growth and, therefore, the authors argue

that metabolic costs alone might not explain the tradeoff between growth and predator avoidance (Steiner & Van Burskirk 2009). However, it is unclear whether such a long-term continuous exposure to predator cues, which are necessary to produce decreased oxygen consumption, do occur under natural conditions. On the other hand, Boonstra, Krebs & Stenseth (1998) found that predator-induced stress affected several physiological parameters of hares (e.g. hormone levels, body condition), which lead to reduced reproduction following population decline, helping explain the delayed recovery of hare populations after predation pressure weakens. In our study, measurements of limpet oxygen consumption lasted only few hours. We did not assess the temporal variation of this physiological response, so we cannot unequivocally evaluate its contribution to the total cost of antipredator response of keyhole limpets. But since *F. limbata* did not show signs of habituation and continued to spend more time moving and displacing under predation risk, we expect that increased respiratory costs were maintained during the duration of the experiment. Separating this aspect of the response from the additional costs associated with locomotion (active metabolic rate) would be difficult, however. Like many other intertidal mollusk species, limpets spend most of the time (>80%) resting and exhibit bursts of movement and foraging activity (see also Aguilera & Navarrete 2011). The costs of locomotion could be high, particularly in the wave-exposed environment where animals have to avoid dislodgment. Our experiment was not specifically designed to evaluate these costs because movement was confined to the small metabolic chambers. Yet ‘untied’ limpets consumed more oxygen (although non-significantly so) than ‘tied’ limpets which were prevented to move, suggesting a cost of locomotion. Further studies are needed to evaluate the direct costs of locomotion during foraging or ‘regular’ movement, as well as the costs during a fast escape response.

The nocturnal habits of the keyhole limpets were not as clear in our experimental setting as they had been reported before (Aguilera & Navarrete 2011). The difference could be partly related to the fact that we conducted the experiment under an opaque roof that diminished environmental stress (high temperature, desiccation), but could have interfered with the keyhole limpet perception

of the natural daylight cycle. Nevertheless, the presence of a lethal predator resulted, for instance, in a higher proportion of individuals moving during daytime high tides compared to any other treatment condition (Fig 1), which probably significantly increased the indirect costs of the escape response (e.g. probability of dislodgment or predation by other visual predators). Future experiments should therefore be conducted under more realistic scenarios of environmental stress (e.g. Aguilera & Navarrete 2012b), so that both the direct and indirect costs (e.g. desiccation outside refuges) of escape responses could be better assessed.

In contrast to most published accounts in which carnivore predators are shown to negatively affect herbivore feeding, our results showed that the proximity of *Heliaster helianthus* induces increased feeding frequency by *Fissurella limbata* on palatable green algae, despite the evident and significant escape responses displayed by limpets when in the presence of the predator. The slightly increased feeding frequency shown by limpets after perception of the predator can be explained as a way to compensate for the increased movement activity, which leads to higher energy demands, and by the measured increase in physiological costs (oxygen consumption) caused by the stress induced by the sole presence of *Heliaster*. As expected, increased limpet feeding activity seemed to translate into higher losses of green algal biomass when limpets were under the risk of predation than when they were free of any predator cues. Nevertheless, the differences in *Ulva* sp. biomass loss among treatments were not statistically significant. This probably was due to the comparatively low consumption of algal biomass by individual limpets, and the large among-replicate variability observed, which is probably produced by differences in water retention that resulted in highly variable estimations of *Ulva* sp. biomass. Thus, taken together, our results suggest that changes in limpet behavior will cause a negative TMII over longer periods of time.

Experimental studies have shown that behavior displayed by intermediate consumers (e.g. herbivores, smaller carnivores) to reduce the risk of predation, such as active escape responses or extensive use of refuges, commonly causes reduced feeding, which in turn results in positive effects of carnivores on primary producers, i.e. positive TMIs, mimicking density-mediated indirect

effects (DMIIs), but usually over short time scales (Trussell *et al.* 2006a; Trussell, Ewanchuk & Matassa 2006b; Freeman 2006; McKay & Heck 2008; Matassa 2010 and see revisions by Werner & Peacor 2003 and by Schmitz, Krivan & Ovadia 2004). Negative TMIIIs have also been documented, but usually as a result of habitat shifts, which leads to increased consumption of prey by the intermediate consumer within refuges or predator-free habitats (e.g. Trussell *et al.* 2006a; Dee, Witman & Brandt 2012). Our experiments showed that the presence of the *Heliaster* predator, either in the form of water-borne exudates or when allowed physical contact with the limpet prey (lethal predator treatment), led to increased movement (total distance traveled) and increased feeding on green algae. In fact, limpets without the presence of predator cues (controls) did not feed at all during the course of the experiment. Thus, even though differences in algal biomass loss were not statistically significant, the increased number of feeding events by limpets implies that the TMII of *Heliaster* on *Ulva* sp. would not be positive, as in most trait mediated trophic cascades.

Increased feeding of intermediate consumers in the presence of top predators, i.e. negative TMII could be more common than they appear to be when one examines the literature. First, studies reporting habitat shifts of intermediate consumers focus on spatial variation of effects on lower trophic levels, but overall effects across habitats are rarely evaluated. For example, in a pond system, Bernot & Turner (2001) studied the effect of different predators, sunfish and crayfish, in mediating the grazing effects of the freshwater snail *Physa integra* on its periphyton resources. They found that in the presence of either predator *Physa* individuals shift habitat use, spending more time in refuges (which were different areas depending on predator identity). This led to increased periphyton standing crop just outside the refuges and to increased resource depletion inside refuges, while overall periphyton standing crop was lower in the predator treatments than in controls without predator. This suggests that in the presence of predators, the net effect of *Physa* on periphyton could be the same in sign (negative) and strength as in predator absence, but changing spatially where grazing pressure is exerted. Thus, habitat shifts or changes in refuge utilization, common antipredator responses, might often mediate an overall negative instead of positive indirect

interaction when examined at the community or even at the landscape (Grabowski & Kimbro 2005; Dee, Witman & Brandt 2012).

Second, negative effects of top carnivores on basal trophic levels, which do not involve habitat shifts have also been described before, but were usually attributed to transient behavioral effects. For instance, increased predation risk either by introduction of a caged predatory mite (*Phytoseiulus persimilis*) or by the predator cues, led to an increase walking activity and plant damage inflicted by the two-spotted spider mites *Tetranychus urticae* (Skaloudova *et al.* 2007). Authors attributed increased activity of spider mite to the fact that their behavioral observations lasted only 10 minutes, and speculated that over a longer time the effect of predatory cues should be attenuated and that increased locomotion activity should then diminish the time individuals spend feeding and resting (see also Oku *et al.* 2004). In contrast, in our 9 days experiment, keyhole limpets did not show signs of habituation to *Heliaster* presence (Figs. S1, S2, Supporting information). Increased activity under high predation risk lasted throughout the experiment, as reflected in travelled distance, possibly generating a high energy demand that individuals must cope with by increased feeding. We speculate that if individuals do not increase feeding they might not meet their energy needs and individual growth and/or reproduction could be compromised. This general result and interpretation are in agreement with the ‘risk allocation hypothesis’ proposed by Lima & Bednekoff (1999), which incorporates temporal variation (intermittency) in predation risk. This hypothesis predicts that as high risk situations (predator encounters or perception) become common or frequent, safe periods become rare and therefore prey must forage intensely to compensate for the lost feeding time. We suggest that prey must not only compensate for the lost feeding time, but also for the energetic costs caused by the physiological and behavioral (movement) response displayed after each predator encounter/perception, and that these effects are an integral part of predator-prey coexistence rather than a transient behavioral response.

The importance of non lethal effects in generating indirect community-wide effects has been amply demonstrated in different ecosystems and it is widely accepted as an important force in

structure of ecological networks (Werner & Peacor 2003; Schmitz, Krivan & Ovadia 2004; Kefi *et al.* 2012). But demonstrating their ecological importance and even the direction of these effects under natural condition and over ecological timescales remains challenging. We show that in the rocky shore, a seastar can elicit rapid physiological and behavioral responses in keyhole limpets, increasing individuals' energetic costs, which they appear to compensate by increasing the frequency of feeding on palatable algae, leading to a probable negative TMII of the carnivore predator on primary producers. Such non lethal effects of top carnivores that indirectly cascade into negative effects on basal trophic levels might be much more widespread in natural systems than they appear.

### **Acknowledgments**

TM thanks friends at ECIM as well as Bernardo Broitman and ChangoLab for their invaluable support during the course of this study. We thank Dr. Martin Thiel and Lucas Eastman for valuable comments and suggestions that improved this manuscript. This paper is in partial fulfillment to the Ph.D. degree of TM and it was possible thanks to a scholarship by Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT). Financial support for this study was provided by Fondecyt grants 107335, 1120158.

## References

Abrams, P. A. (1987) Indirect interactions between species that share a predator: varieties of indirect effects. pp. 38-54 in "Predation: direct and indirect impacts on aquatic communities" W. C. Kerfoot and A. Sih eds. University Press of New England. Dartmouth, N. H.

Abrams, P.A., Menge, B.A., Mittelbach, G.G., Spiller, D.A., Yodzis, P. (1996) The role of indirect effects in food webs. In: Polis, G., Winemiller, K.O. (Eds.), *Food Webs: Integration of Patterns and Dynamics*. Chapman and Hall, New York, pp. 371–395.

Abrams, P. A. (2000) The evolution of predator-prey systems: theory and evidence. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 31, 79-105.

Aguilera, M.A. & Navarrete, S.A. (2011) Distribution and activity patterns in an intertidal grazer assemblage: influence of temporal and spatial organization on interspecific associations. *Marine Ecology Progress Series*, 431, 119–136.

Aguilera, M. A. & Navarrete, S.A. (2012a) Functional identity and functional structure change through succession in a rocky intertidal marine herbivore assemblage *Ecology*, 93, 75–89.

Aguilera, M. A. & Navarrete, S. A. (2012b) Interspecific competition for shelters in territorial and gregarious intertidal grazers: consequences for individual behaviour. *PLoS ONE*, 7(9), e46205.  
doi:10.1371/journal.pone.0046205

Agresti, A. (1996) *An Introduction to Categorical Data Analysis*. John Wiley and Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, p. 357.



Angilletta, M.J., Wilson, R.S., Navas, C.A. & James, R.S. (2003) Tradeoffs and the evolution of thermal reaction norms. *Trends in Ecology and Evolution*, 18, 234–240.

Aránguiz-Acuña, A., Ramos-Jiliberto, R. & Bustamante, R.O. (2011a) Experimental evidence that induced defenses promote coexistence of zooplanktonic populations. *Journal of Plankton Research*, 33(3), 469–477.

Aránguiz-Acuña, A., Ramos-Jiliberto, R. & Bustamante, R.O. (2011b) Experimental assessment of interaction costs of inducible defenses in plankton. *Journal of Plankton Research*, 33(9), 1445–1454.

Arditi, R., Michalski, J. & Hirzel, A.H. (2005) Rheagogies: Modelling non-trophic effects in food webs. *Ecological Complexity*, 2, 249–258.

Barahona, M. & Navarrete, S.A. (2010) Movement patterns of the seastar *Heliaster helianthus* in central Chile: relationship with environmental conditions and prey availability. *Marine Biology*, 157, 647–661.

Barreto, R.E., Luchiari A.C. & Marcondes, A.L. (2003) Ventilatory frequency indicates visual recognition of an allopatric predator in naive Nile tilapia. *Behavioural Processes*, 60, 235–239.

Bernot, R.J. & Turner, A.M. (2001) Predator identity and trait-mediated indirect effects in a littoral food web. *Oecologia*, 129, 139–146.

- Boonstra, R., Krebs, C.J. & Stenseth, N. Chr. (1998) Population cycles in small mammals: the problem of explaining the low phase. *Ecology*, 79, 1479–1488.
- Brante, A., Fernández, M., Eckerle, L., Mark, F., Pörtner, H-O. & Arntz, W. (2003) Reproductive investment in the crab *Cancer setosus* along a latitudinal cline: egg production, embryo losses and embryo ventilation. *Marine Ecology Progress Series*, 251, 221–232.
- Camus, P.A., Daroch, K. & Opazo, F. (2008) Potential for omnivory and apparent intraguild predation in rocky intertidal herbivore assemblages from northern Chile. *Marine Ecology Progress Series*, 361, 35–45.
- Castilla, J.C. & Paine, R.T. (1987) Predation and community organization on Eastern Pacific, temperate zone, rocky intertidal shores. *Revista Chilena de Historia Natural*, 60, 131–151.
- Dee, L.E., Witman, J.D. & Brandt M. (2012) Refugia and top-down control of the pencil urchin *Eucidaris galapagensis* in the Galápagos Marine Reserve. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 416–417, 135–143.
- Escobar, J.B. & Navarrete, S.A. (2011) Risk recognition and variability in escape responses among intertidal molluscan grazers to the sunstar *Heliaster helianthus*. *Marine Ecology Progress Series*, 421, 151-161.
- Freeman, A. (2006) Size-dependent trait-mediated indirect interactions among sea urchin herbivores. *Behavioral Ecology*, 17, 182–187.

Grabowski, J.H. & Kimbro, D.L. (2005) Predator-avoidance behavior extends trophic cascades to refuge habitats. *Ecology*, 86, 1312–1319.

Hawkins, L.A., Armstrong J.D. & Magurran A.E. (2004) Predator-induced hyperventilation in wild and hatchery Atlantic salmon fry. *Journal of Fish Biology*, 65, 88–100.

Kats, L.B. & Dill, L.M. (1998) The scent of death: chemosensory assessment of predation risk by prey animals. *Ecoscience*, 5, 361–394.

Kagawa, N. & Mugiya, Y. (2002) Brain Hsp70 mRNA expression is linked with plasma cortisol levels in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a potential predator. *Zoological Science*, 19, 735–740.

Kéfi, S., Berlow, E.L., Wieters, E.A., Navarrete, S.A., Petchey, O.L., Boit, A., Joppa, L.N., Lafferty, K.D., Williams, R.J., Martinez, N.D., Menge, B.A., Blanchette, C.A., Iles, A.C. & Brose, U. (2012) More than a meal... integrating non-feeding interactions into food webs. *Ecology Letters*, 15, 291–300.

Krivan, V. (2007) The Lotka–Volterra predator–prey model with foraging–predation risk trade-offs. *The American Naturalist*, 170, 771–782.

Lima, S.L. (1998) Nonlethal effects in the ecology of predator–prey interactions. *BioScience*, 48, 25–34.

Lima S.L. & Bednekoff, P.A. (1999) Temporal variation in danger drives antipredator behavior: the predation risk allocation hypothesis. *The American Naturalist*, 153, 649–659.

- Lima, S.L. & Dill, L.M. (1990) Behavioral decisions made under risk of predation: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology*, 68, 619–640.
- Madin, E.M.P., Gaines, S.D., Madin, J.S. & Warner, R.R. (2010a) Fishing indirectly structures macroalgal assemblages by altering herbivore behavior. *The American Naturalist*, 176(6), 785-801.
- Manzur, T., & Navarrete, S.A. (2011) Scales of detection and escape of the sea urchin *Tetrapygus niger* in interactions with the predatory sun star *Heliaster helianthus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407, 302–308.
- Matassa, C.M. (2010) Purple sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus* reduce grazing rates in response to risk cues from the spiny lobster *Panulirus interruptus*. *Marine Ecology Progress Series*, 400, 283–288.
- McKay, K.M. & Heck Jr., K.L. (2008) Presence of the Jonah crab *Cancer borealis* significantly reduces kelp consumption by the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Marine Ecology Progress Series*, 356, 295–298.
- McPeck, M. A., Grace, M. & Richardson, J.L.M. (2001) Physiological and behavioral responses to predators shape the growth/predation risk trade-off in damselflies. *Ecology*, 82, 1535–1545.
- McPeck, M.A. (2004) The growth/predation risk trade-off: So what is the mechanism? *The American Naturalist*, 163, E88–E111.
- Miner, B.G., Sultan, S.E., Morgan, S.G., Padilla, D.K. & Relyea, R.A. (2005) Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution*, 20, 685-692.

Navarrete, S.A. & Manzur, T. (2008) Individual- and population-level responses of a keystone predator to geographic variation in prey. *Ecology*, 89, 2005-2018.

Oku, K., Yano, S. & Takafuji, A. (2004) Nonlethal indirect effects of a native predatory mite, *Amblyseius womersleyi* Schicha (Acari: Phytoseiidae), on the phytophagous mite *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acari: Tetranychidae). *Journal of Ethology*, 22, 1090 - 1112.

Oliva, D. & Castilla, J. C. (1986) The effects of human exclusion on the population structure of key-hole limpets *Fissurella crassa* and *F. limbata* on the coast of central Chile. *Marine Ecology*, 7, 201-217.

Oliva, D. & Castilla, J.C. (1992) Guía para el reconocimiento y morfometría de diez especies del género *Fissurella* Bruguière 1789 (Mollusca Gastropoda) comunes en las pesquerías y conchales indígenas de Chile Central y Sur. *Gayana Zoológica*, 56, 77-108.

Pauwels, K., Stoks, R. & De Meester, L. (2005) Coping with predator stress: interclonal differences in induction of heat-shock proteins in the water flea *Daphnia magna*. *Journal of Evolutionary Biology*, 18, 867–872.

Peacor, S.D., Peckarsky, B.L., Trussell, G.C. & Vonesh, J.R. (2012) Costs of predator-induced phenotypic plasticity: a graphical model for predicting the contribution of nonconsumptive and consumptive effects of predators on prey. *Oecologia*, DOI 10.1007/s00442-012-2394-9.

Peckarsky, B.L., Abrams, P.A., Bolnick, D.I., Dill, L.M., Grabowski, J.H., Luttbeg, B., Orrock, J.L., Peacor, S.D., Preisser, E.L., Schmitz, O.J. & Trussell, G.C. (2008) Revisiting the classics:

considering non consumptive effects in textbook examples of predator-prey interactions. *Ecology*, 89, 2416-2425.

Peterson, C. & Renaud, E. (1989) Analysis of Feeding Preference Experiments. *Oecologia*, 80, 82-86.

Preisser, E.L., Bolnick, D.I. & Benard, M.F. (2005) Scared to death? The effects of intimidation and consumption in predator–prey interactions. *Ecology*, 86, 501–509.

Ramos-Jiliberto, R., Frodden, E. & Aránguiz-Acuña, A. (2007) Pre-encounter versus post-encounter inducible defenses in predator–prey model systems. *Ecological Modelling*, 200, 99–108.

Ramos-Jiliberto, R., Mena-Lorca, J., Flores, J.D. & Morales-Álvarez, M. (2008) Role of inducible defenses in the stability of a tritrophic system. *Ecological Complexity*, 5, 183 – 192.

Rovero, F., Hughes, R.N. & Chelazzi, C. (1999) Cardiac and behavioural responses of mussels to risk of predation by dogwhelks. *Animal Behaviour*, 58, 707–714.

Schmitz, O.J., Beckerman, A.P. & O'Brien, K.M. (1997) Behaviorally mediated trophic cascades: effects of predation risk on food web interactions. *Ecology*, 78, 1388–1399.

Schmitz, O. J., Krivan, V. & Ovadia, O. (2004) Trophic cascades: the primacy of trait-mediated indirect interactions. *Ecology Letters*, 7, 153-163.

Skaloudova, B., Zemek, R. & Krivan, V. (2007) The effect of predation risk on an acarine system. *Animal Behaviour*, 74, 813-821.

Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1981. *Biometry*. W.H. Freeman & Co., New York. 859 pp.

Steiner, U.K. (2007) Linking antipredator behaviour, ingestion, gut evacuation and costs of predator-induced responses in tadpoles. *Animal Behaviour*, 74, 1473–1479.

Steiner, U.K. & Van Buskirk, J. (2009) Predator-Induced Changes in Metabolism Cannot Explain the Growth/Predation Risk Tradeoff. *PLoS ONE*, Doi:10.1371/journal.pone.0006160

Tokeshi, M. (1989) Feeding ecology of a size-structured predator population, the South American sun-star *Heliaster helianthus*. *Marine Biology*, 100, 495–505.

Trussell, G.C., Ewanchuk, P.J. & Bertness, M.D. (2002) Field evidence of trait-mediated indirect interactions in a rocky intertidal food web. *Ecology Letters*, 5, 241–245.

Trussell, G. C. & Nicklin, M.O. (2002) Cue sensitivity, inducible defense, and trade-offs in a marine snail. *Ecology*, 83, 1635–1647.

Trussell, G.C., Ewanchuk, P.J. & Bertness, M.D. (2003) Trait-mediated effects in rocky intertidal food chains: predator risk cues alter prey feeding rates. *Ecology*, 84, 629-640.

Trussell, G.C., Ewanchuk, P.J. & Matassa, C.M. (2006a) The fear of being eaten reduces energy transfer in a simple food chain. *Ecology*, 87, 2979-2984.

Trussell, G.C., Ewanchuk, P.J. & Matassa, C.M. (2006b) Habitat effects on the relative importance of trait- and density-mediated indirect interactions. *Ecology Letters*, 9, 1245–1252.

Turner, A. & Mittelbach, G. (1990) Predator avoidance and community structure: interactions among piscivores, planktivores, and plankton. *Ecology*, 71, 2241–2254.

Weidner, K., Lages, B.G., A. P. da Gama, B., Molis, M., Wahl, M. & Pereira, R.C. (2004) Effect of mesograzers and nutrient levels on induction of defenses in several Brazilian macroalgae. *Marine Ecology Progress Series*, 283, 113–125.

Werner, E.E. & Anholt, B.R. (1993) Ecological consequences of the trade-off between growth and mortality-rates mediated by foraging activity. *The American Naturalist*, 142, 242–272.

Werner, E.E. & Peacor, S.D. (2003) A review of trait-mediated indirect interactions in ecological communities. *Ecology*, 84, 1083-1100.



## Tables

**Table 1.** Log linear analysis of the three-way contingency table for the frequency of individuals observed moving during day and night, ('Daytime'), at high and low tides ('Tide') and under the four different predator treatments (Treatment: "Lethal" *Heliaster* (+Hl), Non-lethal non feeding *Heliaster* (+Hnl), Non-lethal feeding *Heliaster* (+Hnlf) and Control without *Heliaster* predator (-H)). Bold face indicates significance at  $\alpha=0.05$ .

Source	$\chi^2$	df	P
DayTime	7.708	1	0.006
Tide	8.292	1	0.004
Treatment	12.975	3	0.005
DayTime x Tide	1.343	1	0.246
DayTime x Treatment	1.608	3	0.658
Tide x Treatment	11.331	3	0.010
Daytime x Tide x Treatment	1.809	3	0.613

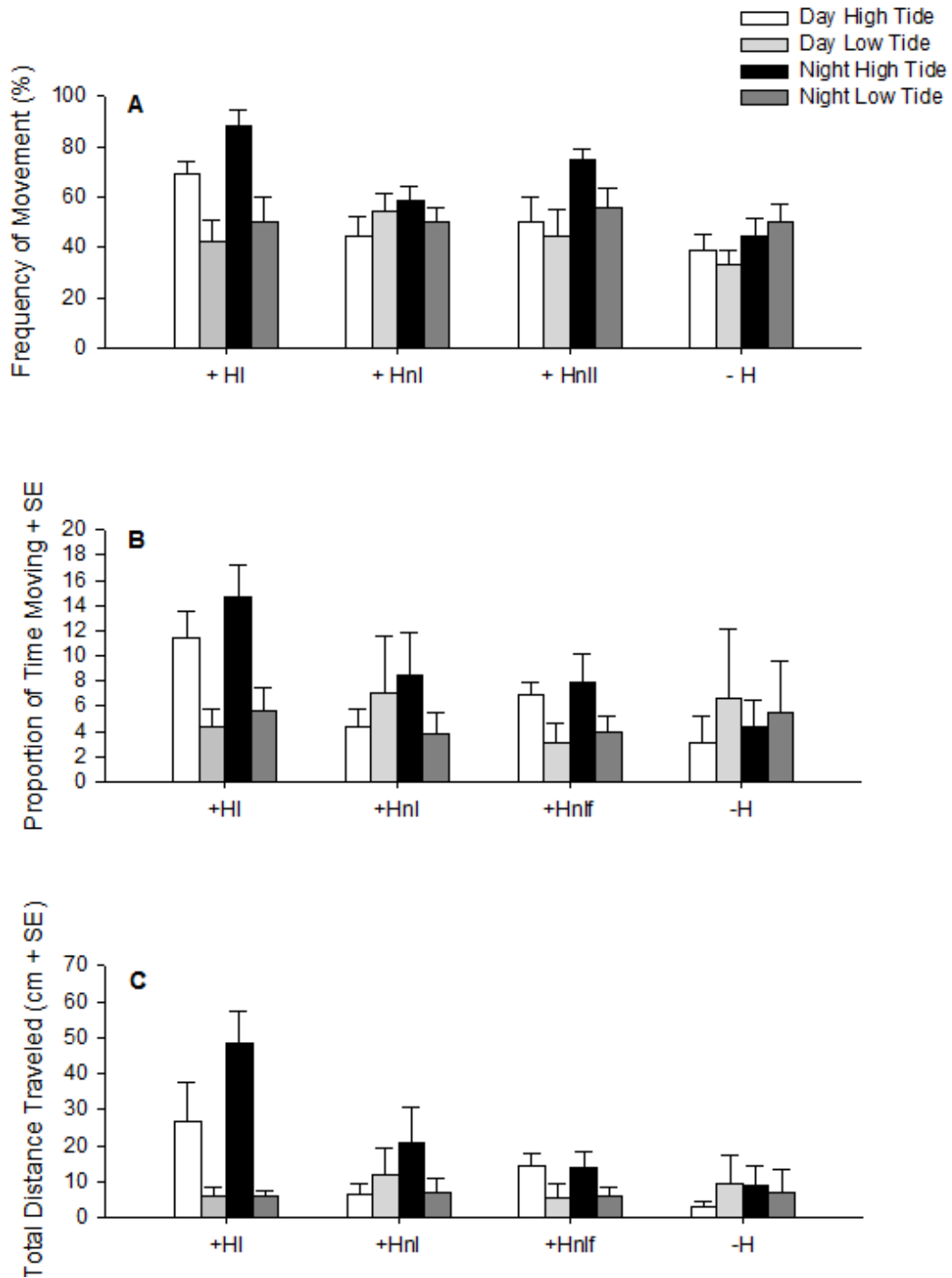
**Table 2.** Three-way ANOVA for a) Proportion of time moving and b) Total distance traveled by *Fissurella limbata*. Factors Daytime (night, day), Tide (high, low) and Predator Treatment (“Lethal” *Heliaster* (+Hl), Non-lethal non feeding *Heliaster* (+Hnl), Non-lethal feeding *Heliaster* (+Hnlf) and Control without *Heliaster* predator (-H)) were considered fixed. Orthogonal planned contrasts comparing levels of predator treatment are also presented. Bold face indicates significance at  $\alpha=0.05$ .

Source	df	MS	F Ratio	P
<b>a) Proportion of Time Moving</b>				
DayTime	1	0.582	0.851	0.361
Tide	1	3.902	5.716	0.021
Treatment	3	1.874	2.742	0.053
DayTime x Tide	1	0.061	0.089	0.767
DayTime x Treatment	3	0.015	0.021	0.996
Tide x Treatment	3	0.821	1.200	0.320
DayTime x Tide x Treatment	3	0.09	0.135	0.939
Error	48	0.684		
<b>b) Total Distance Traveled</b>				
DayTime	1	1.580	1.569	0.216
Tide	1	11.414	11.337	0.002
Treatment	3	12.387	4.101	0.011
DayTime x Tide	1	0.958	0.952	0.334
DayTime x Treatment	3	6.327	2.095	0.113
Tide x Treatment	3	0.239	0.079	0.971
DayTime x Tide x Treatment	3	1.372	0.454	0.716
Error	48	1.007		
<b>b) Orthogonal Planned Contrast</b>				
Treatments with <i>Heliaster</i> vs Control without predator	1	8.769	8.711	0.005
“Lethal” predator treatment vs Non-lethal predator treatments	1	3.603	3.579	0.065
Non-lethal predator feeding on limpets vs Non-lethal predator not feeding	1	0.014	0.014	0.905

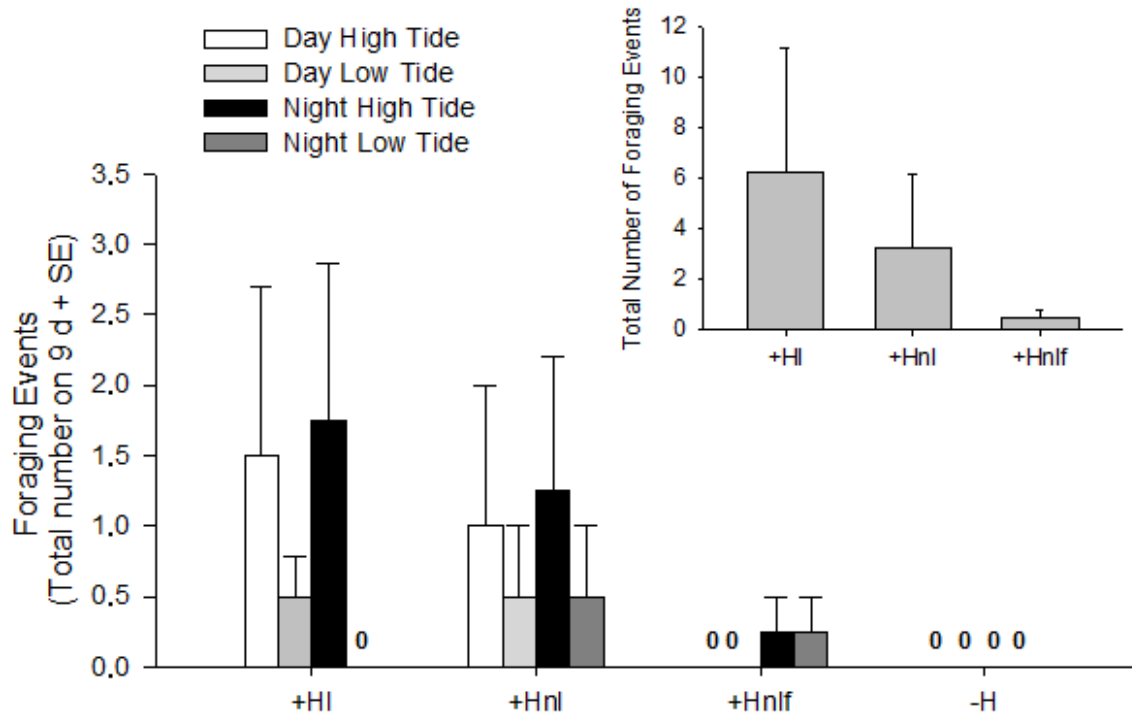
**Table 3.** Three-way ANOVA for oxygen consumption for *Fissurella limbata* with Limpet mobility (tied or untied), *Heliaster* Exudate (+Exudate or –Exudate) and Daytime (day or night time) as fixed factors. Bold face indicates significance at  $\alpha=0.05$ .

Sources of Variation	DF	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Limpet Mobility	1	4.204E-06	3.562	0.071
<i>Heliaster</i> Exudate	1	9.206E-06	7.799	0.010
Daytime	1	2.895E-06	2.452	0.130
Limpet Mobility x <i>Heliaster</i> Exudate	1	2.717E-07	0.230	0.636
<i>Heliaster</i> Exudate x Daytime	1	1.417E-07	0.120	0.732
Daytime x Limpet Mobility	1	3.811E-10	0.0003	0.986
Limpet Mobility x Daytime x <i>Heliaster</i> Exudate	1	1.373E-06	1.163	0.292
Error	24	2.800E-05		

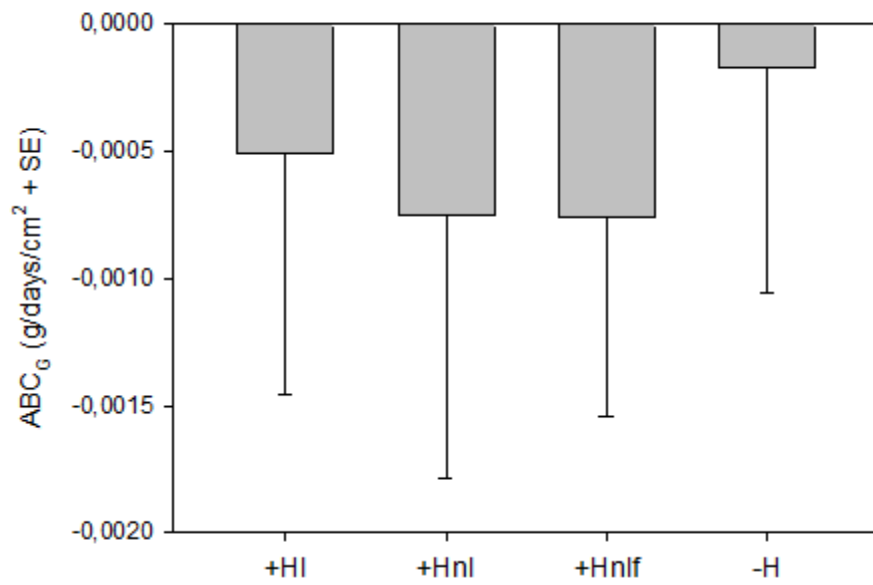
Figures



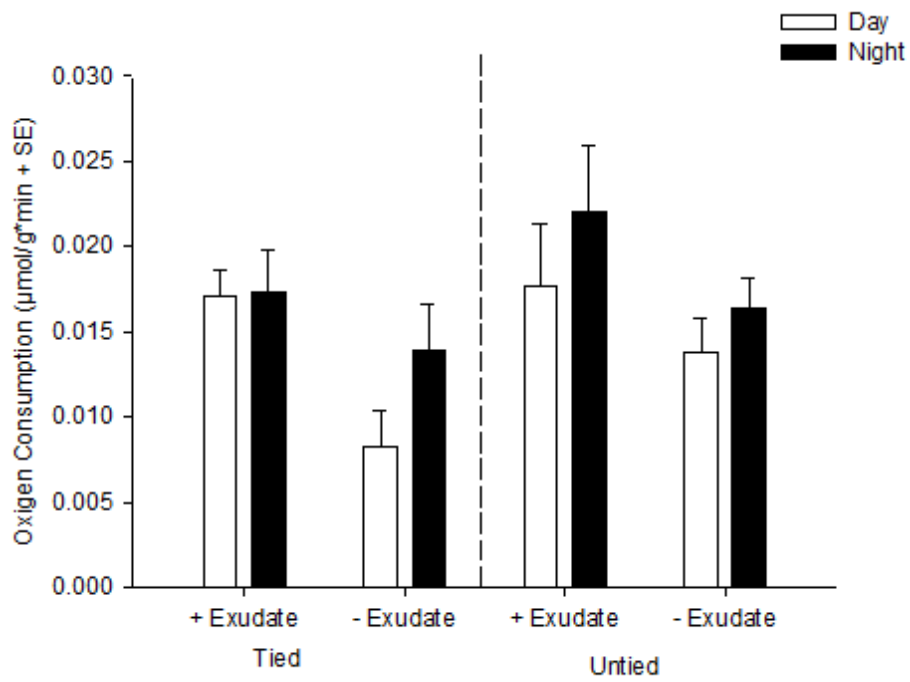
**Figure 1.** A) Frequency of movement B) Daily proportion of time moving (+SE) and C) Total distance traveled per day (cm + SE) for *Fissurella limbata* subjected to either a “Lethal” *Heliaster* (+HI), a Non-lethal non feeding *Heliaster* (+Hnl), a Non-lethal feeding *Heliaster* (+Hnlf) and a control without *Heliaster* predator (-H) during day and night time and for low and high tides.



**Figure 2.** Total number of foraging events (+ SE) performed by *Fissurella limbata* under different risk treatments during day and night times and insert the total number of foraging events performed by *F. limbata* (+SE) pooling all daylight and tidal conditions for the predator treatments: “Lethal” *Heliaster* (+HI), Non-lethal non-feeding *Heliaster* (+Hnl), and Non-lethal feeding *Heliaster* feeding (+Hnlf).

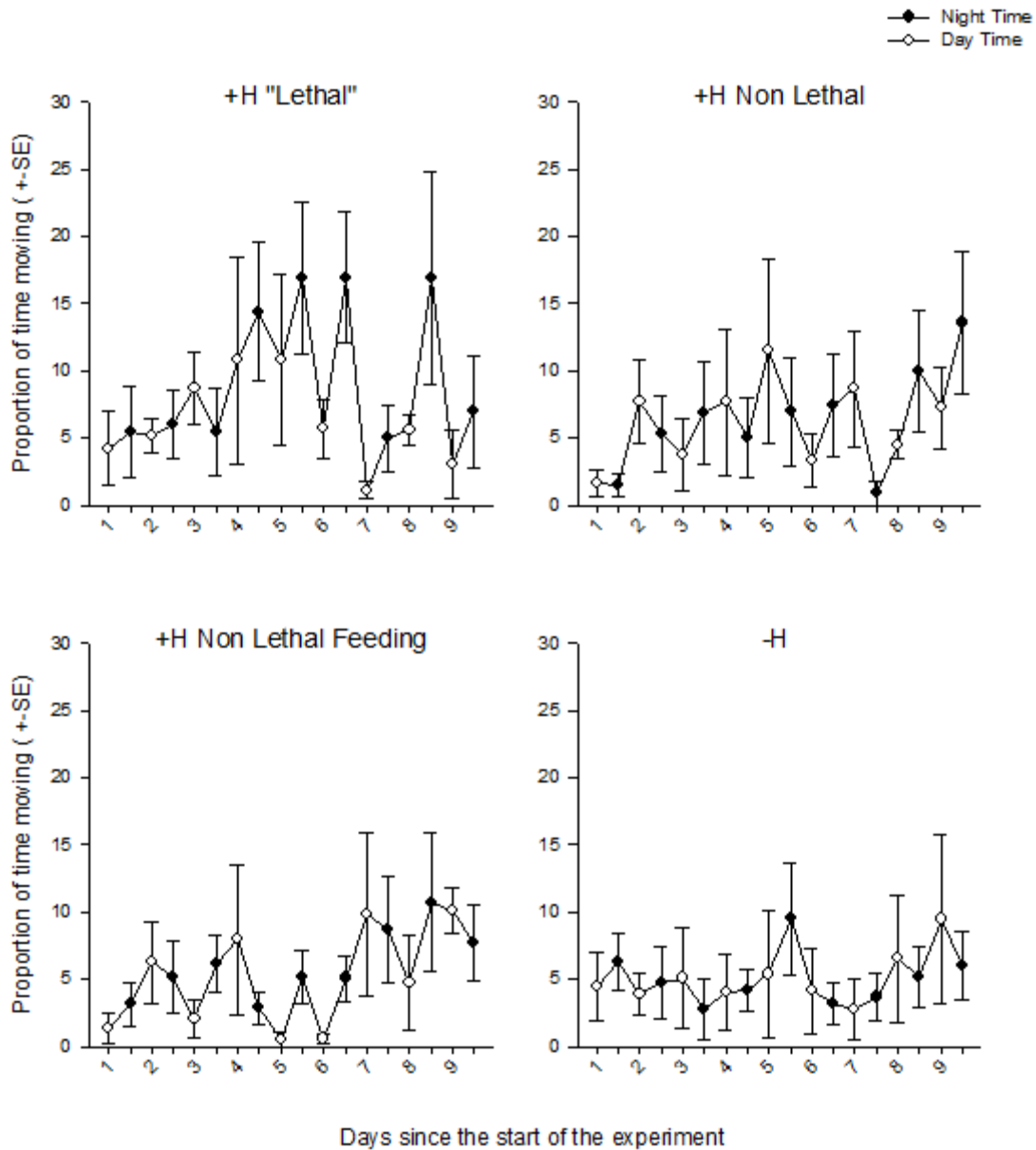


**Figure 3.** Algal Biomass Change (g/day/cm<sup>2</sup> + SE) corrected for autogenic changes (see materials and methods for further details) subjected to either a “Lethal” *Heliaster* (+HI), a Non-lethal non-feeding *Heliaster* (+HNI), a Non-lethal feeding *Heliaster* and a control without *Heliaster* predator (-H).



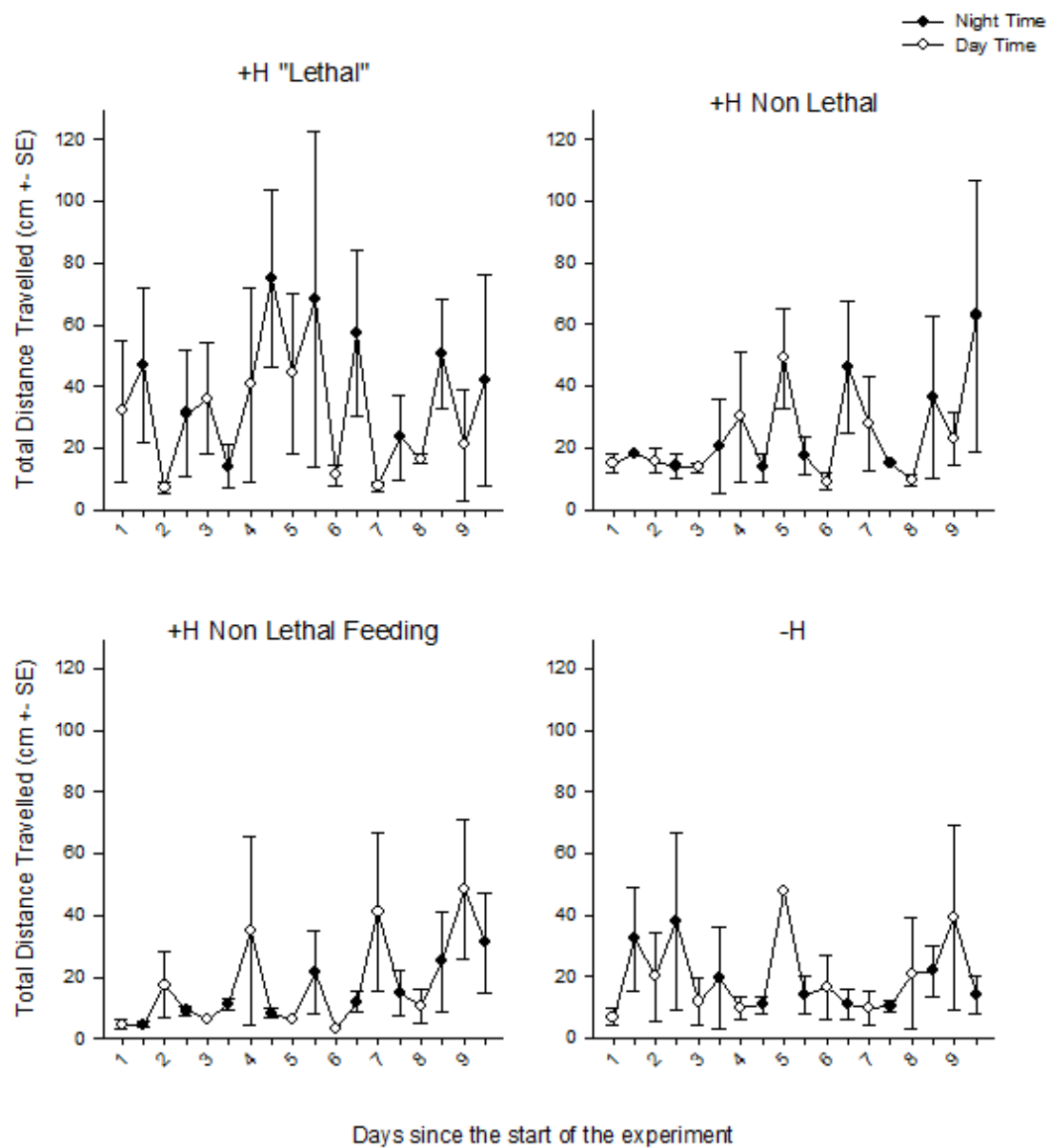
**Figure 4.** Oxygen consumption ( $\mu\text{mol/g} \cdot \text{min} + \text{SE}$ ) for *Fissurella limbata* in the presence (+Exudate) and absence (-Exudate) of *Heliaster* waterborne chemical cues, for day (white bars) and night (black bars) time and for tied and untied limpets.

## Supplementary Information

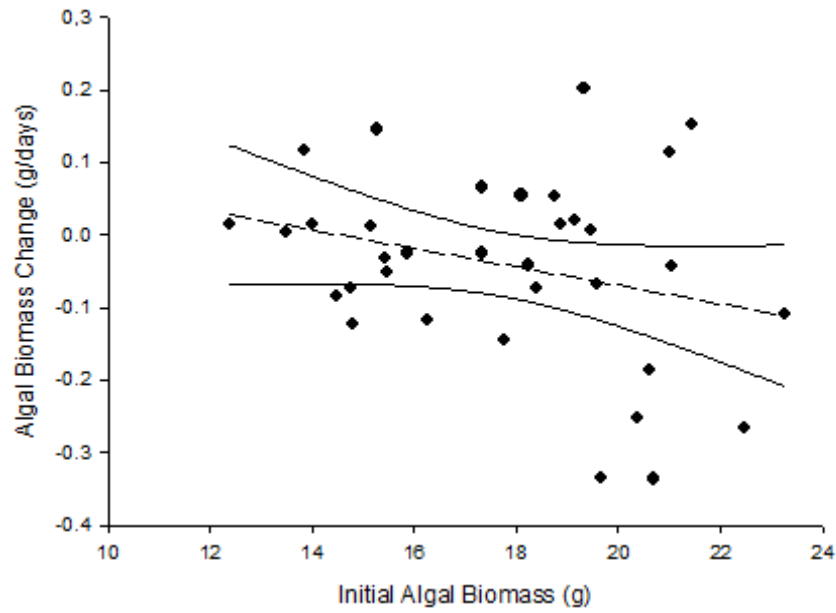


**S1.** Temporal variation in the daily proportion of time moving ( $\pm$ SE) for limpets exposed to a) “Lethal” *Heliaster* (+Hl), b) Non-lethal non-feeding *Heliaster* (+Hnl), c) Non-lethal feeding *Heliaster* (+Hnlf) and d) control without *Heliaster* (-H) during day (white dots) and night time (black dots).





**S2.** Temporal variation in the daily displacement (cm  $\pm$ SE) of limpets exposed to a) “Lethal” *Heliaster* (+Hl), b) Non-lethal non-feeding *Heliaster* (+Hnl), c) Non-lethal feeding *Heliaster* (+Hnlf) and d) control without *Heliaster* (-H) during day (white dots) and night time (black dots).



**S3.** Linear regression analysis (with 95% CI) of algal biomass change (ABC) on the initial biomass of *Ulva sp.* transplants.

## Conclusión General

---

En esta tesis se planteó investigar los efectos no letales de un depredador *Heliaster helianthus* sobre rasgos de dos especies de herbívoros el equinoideo *Tetrapygyus niger* y el gastrópodo *Fissurella limbata*, así como la potencial transmisión de dichos efectos a niveles tróficos basales en tramas tróficas marinas, estudiando también cómo son afectados por la escala espacial y temporal a la cual son cuantificados y los costos energéticos que conllevan para las presas. La información permite un acercamiento a la importancia de dichos efectos en los sistemas ecológicos, es decir cuando salimos del espacio acotado de nuestras manipulaciones experimentales y tratamos de llevarlos a nuestra comprensión del sistema natural.

En el primer capítulo demostramos que el equinoideo *Tetrapygyus niger* es capaz de detectar a distancia y de manera específica a su depredador asteroideo *Heliaster helianthus* a través de señales químicas disueltas en el agua. Determinamos que la distancia de detección y la respuesta de escape son equivalentes y del orden de 50 cm y que, por lo tanto, considerando los tamaños corporales del depredador y de la presa, la escala espacial tanto de la detección como del escape son comparativamente pequeñas, sugiriendo que los efectos no letales de *H. helianthus* debieran ser importantes a la escala espacial local y altamente variables a la escala del paisaje. Si estos encuentros son suficientemente frecuentes, y dado que la interacción ocurre en la interface intermareal-submareal somero, *Heliaster* podría llevar a un desplazamiento (profundización) de los erizos en la escala de centímetros a muy pocos metros, justo en esta zona de transición.

En el segundo capítulo determinamos que la respuesta conductual de *Tetrapygyus niger* a la presencia *Heliaster* es compleja, que depende fuertemente de la escala espacial en que se evalúa, que varía temporalmente a escalas de minutos y de días, y que estos efectos no se transmiten a niveles tróficos basales en forma consistente. Resultados que resaltan la complejidad de las respuestas antidepredatorias, la importancia de la escala espacio-temporal sobre la cual se

desarrollan dichas respuestas, y los enormes desafíos logísticos que impone dicha complejidad a la hora de extrapolar resultados de laboratorio a condiciones naturales.

En el tercer capítulo mostramos que el stress inducido por la sola presencia de señales químicas de *Heliaster helianthus* llevó a un aumento inmediato (horas) de la tasa de consumo de O<sub>2</sub> en la lapa *Fissurella limbata* y, que sobre una escala temporal mayor (9 días), la presencia de *Heliaster* llevó a un aumento en el tiempo en movimiento y la distancia recorrida por las lapas, especialmente cuando los depredadores tuvieron la posibilidad de perseguir a la presa dentro de los acuarios experimentales. Demostramos también, que en contraste con la mayoría de los sistemas tróficos de tres niveles investigados, en los cuales el consumidor intermedio exhibe respuestas de escape, *Fissurella* parece aumentar su tasa de alimentación sobre algas en presencia del depredador, al parecer para compensar el aumento en el costo fisiológico y energético que impone la respuesta de escape. Así, los depredadores tope pueden tener efectos indirectos negativos sobre el nivel trófico basal.

En síntesis, en esta tesis se demostró que en ambos sistemas estudiados la percepción del depredador por parte de la presa depende de información en la forma de señales químicas del depredador tomadas desde el ambiente a una cierta distancia (i.e del orden de centímetros). Además, se demostró que ambas presas presentan una respuesta de escape activo frente a la presencia del depredador, pero que la magnitud de los efectos no letales que induce un mismo depredador es diferente entre los herbívoros presa, siendo mayor en la lapa que en el erizo, lo que podría ser producto de un grado de coexistencia local más permanente entre el sol y la lapa que entre el sol y el erizo negro. Diferencia que a su vez podría estar determinando que efectivamente ocurra transmisión *in situ* de los efectos no letales de *Heliaster* en la trama trófica con la lapa en la zona intermareal baja. A diferencia de lo que ocurre entre el sol y el erizo negro que coexisten de forma más bien transiente en la zona de transición entre el intermareal bajo y el submareal somero, por lo que la interacción puede traducirse en cambios en la distribución de los erizos sin que necesariamente ocurra transmisión a niveles basales. Por otra parte, mostramos también cómo los

costos de las respuestas antidepredatorias pueden determinar que la transmisión indirecta de efectos no letales afecte negativamente sobre el nivel trófico basal, cómo se observó en la trama trófica con *Fissurella limbata* planteando un escenario distinto al comúnmente reportado en la literatura como resultado de efectos indirectos mediados por rasgo. Finalmente, mostramos la importancia de considerar las escalas espaciales y temporales apropiadas para evaluar adecuadamente el real impacto ecológico de los efectos no letales de depredadores, considerando que nuestras decisiones arbitrarias acerca del diseño e implementación de experimentos podrían oscurecer o simplemente no reflejar lo que realmente ocurriría con esta forma de interacción entre depredador y presa en la naturaleza.