

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**FERTILIZACIÓN, DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVAL DEL
ERIZO NEGRO DE MAR *Arbacia stellata*
EXPUESTO A UN AMPLIO RANGO TÉRMICO**

T E S I S

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA

PRESENTA

DANIEL GONZÁLEZ SUÁREZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. ENERO, 2022

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA**

**FERTILIZACIÓN, DESARROLLO EMBRIONARIO Y
LARVAL DEL ERIZO NEGRO DE MAR
Arbacia stellata EXPUESTO A UN AMPLIO RANGO TÉRMICO**

T E S I S

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

DANIEL GONZÁLEZ SUÁREZ

Aprobada por:



Dr. Eugenio de J. Carpizo Ituarte
Director de tesis



Dr. José Martín Hernández Ayón
Sinodal



Dr. Zaúl García Esquivel
Sinodal

Agradecimientos

Mi familia se ha lucido impresionantemente con el apoyo durante este proceso académico. No únicamente con esta etapa de maestría, sino desde siempre. El agradecimiento a mis papás y a mis hermanos no se logra describir únicamente en texto, pero inicio esta sección intentando expresar que, sin ellos, el camino sería sumamente diferente y agradezco todos los días por tener esta familia.

Agradezco a Rosa y Ramón, quienes me recibieron en su familia desde que puse mi primer paso en Ensenada e incondicionalmente me brindaron todo. Su apoyo durante mis dos años en México fue inmesurable y el vínculo que formamos estará para siempre. Eternas gracias.

Extiendo un cálido agradecimiento a Eugenio y a Marce por su cariño y atención. Siempre pude contar con su apoyo, incluso dentro de las condiciones difíciles que vivimos. Su mentoría – no solo académica sino también vocacional – me ha nutrido como persona y como profesional. Eugenio, siempre voy a agradecer tu confianza para cumplir con este trabajo.

Mis amigos de maestría merecen aquí un espacio. La motivación y el apoyo que nos dimos en este proceso fue también crucial para terminar esta etapa. Siempre espero lo mejor para ustedes en sus caminos.

A la distancia, mis amistades también significaron una fuente de emociones que me ayudaba a disfrutar de mis días mexicanos. Donde esté, sé que siempre puedo contar con tantas personas que procuran mi bienestar.

Este proyecto no tendría tal calidad si no fuera por la intervención del Dr. José Martín Hernández-Ayón y del Dr. Zaúl García-Esquivel. Agradezco el valioso tiempo invertido en la revisión, corrección y en las sugerencias para que este escrito me permita obtener mi grado de maestría. También agradezco al MSc. Marco González, técnico del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (EcoDel), por su continuo apoyo en el laboratorio y durante los experimentos.

México, tanto institucionalmente como a través de su población, me recibió cálidamente en su tierra y me ofreció una oportunidad única. A todos los ~128.97 millones de mexicanos, gracias. Su calidez es inmensa y característica; me sentí en hogar lejos del mío.

A la Red Iberoamericana de Equinodermos, agradezco propiciar los espacios que nos permiten interactuar entre diferentes países e instituciones, facilitando compartir aprendizajes y experiencias tanto académicas como personales.

Recién formada, la Red Mexicana de Equinodermos (REMEQ) también merece un espacio en esta sección. Hay muchos nombres que puedo incluir en este espacio, pero quiero agradecer especialmente a la Dra. Alejandra Martínez Melo por su constante divulgación de literatura científica en el grupo de Facebook.

Este proyecto se llevó a cabo gracias al financiamiento del CONACYT mediante la beca de maestría con número de CVU 998478 que me fue otorgada y fue realizada en el Laboratorio de Ecología y Biología de Desarrollo (EcoDel) del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, a cargo del Dr. Eugenio de J. Carpizo Ituarte y donde recibí todas las facilidades y asesorías para ejecutar mi investigación. Agradezco también a la UABC, al IIO y a la FCM por su apoyo en mi formación. Fue un auténtico honor formar parte de esta institución.

Índice del trabajo

Miembros del jurado.....	I
Agradecimientos.....	II
Índice.....	IV
Índice de tablas.....	VI
Índice de figuras.....	VII
Índice de anexos.....	IX
Abreviaturas.....	XI
Resumen	XII
1.Introducción.....	1
1.1. Antecedentes.....	4
1.2. Planteamiento del problema.....	6
1.3. Objetivos.....	7
1.3.1. Objetivo general.....	7
1.3.2. Objetivos específicos.....	7-8
2. Métodos.....	8
2.1 Éxito de Fertilización.....	9
2.2 Desarrollo embrionario.....	14
2.3 Desarrollo larval.....	20
3. Resultados.....	26
3.1 Éxito de Fertilización.....	26
3.2 Desarrollo embrionario.....	36

3.3 Desarrollo larval.....	42
4. Discusión.....	55
4.1 Éxito de Fertilización.....	55
4.2 Desarrollo embrionario.....	60
4.3 Desarrollo larval.....	63
5. Conclusiones.....	70
6. Literatura citada.....	71
7. Anexos.....	89

Índice de tablas

Tabla I	Promedios de temperatura obtenidos para los tratamientos en los experimentos de éxito de fertilización.....	28
Tabla II	Densidad de espermatozoides para cada experimento de fertilización.....	29
Tabla III	Promedios de temperatura obtenidos para los tratamientos en el experimento de desarrollo embrionario.....	38
Tabla IV	Promedios de temperatura obtenidos para los tratamientos en experimento de desarrollo larval.....	44

Índice de figuras

Figura 1	Esquema del experimento de éxito de fertilización de <i>Arbacia stellata</i> . A. Diseño experimental. B. Representación de diluciones seriadas. C. Contenido de cada tubo de ensayo.....	12
Figura 2	Esquema del diseño experimental (A) y de la toma de muestras (B) para el experimento de desarrollo embrionario de <i>Arbacia stellata</i>	16
Figura 3	Estadios de desarrollo embrionario de <i>Arbacia stellata</i>	18
Figura 4	Ejemplos de malformaciones en embriones.....	19
Figura 5	Esquema del diseño experimental (A) y de la toma de muestras (B) para el experimento de desarrollo larval de <i>Arbacia stellata</i> ..	23
Figura 6	Estadios de desarrollo larval de <i>Arbacia stellata</i>	24
Figura 7	Mediciones morfológicas para cada larva.....	25
Figura 8	Mediciones de temperatura durante los experimentos de éxito de fertilización.	27
Figura 9	Promedios de porcentaje de fertilización en el experimento 1.a para cada dilución de cada tratamiento.....	30
Figura 10	Promedios de porcentaje de fertilización en el experimento 1.b para cada dilución de cada tratamiento.....	32
Figura 11	Promedios de porcentaje de fertilización en el experimento 1.c para cada dilución de cada tratamiento.....	34
Figura 12	Mediciones de temperatura durante el experimento de desarrollo embrionario	37
Figura 13	Proporción de estadios embrionarios en cada tratamiento durante el experimento.....	39
Figura 14	Promedios de porcentajes de anomalías en la embriogénesis de <i>Arbacia stellata</i> para los tratamientos de temperatura.....	41
Figura 15	Mediciones de temperatura de los sistemas de baños maría para los tratamientos de cultivos larvales.....	43

Figura 16	Promedio de sobrevivencia de larvas para los tratamientos experimentales....	45
Figura 17	Promedio de densidad de larvas para cada día durante el experimento de desarrollo larval.....	46
Figura 18	Proporción de estadios larvales en cada tratamiento durante el experimento..	47
Figura 19	Diagrama de cajas para mediciones de longitud total durante el experimento de desarrollo larval.....	49
Figura 20	Diagrama de cajas para mediciones de longitud media del cuerpo durante el experimento de desarrollo larval.....	50
Figura 21	Diagrama de cajas para mediciones de longitud post oral durante el experimento de desarrollo larval.....	51
Figura 22	Diagrama de cajas para mediciones de proporción de longitudes post oral y media del cuerpo durante el experimento de desarrollo larval.....	52
Figura 23	Diagrama de cajas para mediciones transformadas por logaritmo de base 10 del estómago durante el experimento de desarrollo larval.....	54

Índice de Anexos

Anexo A	Resultados de la prueba general de PerMANOVA de dos vías en el experimento de fertilización 1.a.....	84
Anexo B	Resultados de las pruebas por pares de dilución de PerMANOVA en el experimento de fertilización 1.a.....	90
Anexo C	Resultados de la prueba general de PerMANOVA de dos vías en el experimento de fertilización 1.b.....	91
Anexo D	Resultados de las pruebas por pares de dilución de PerMANOVA en el experimento de fertilización 1.b.....	92
Anexo E	Resultados de la prueba general de PerMANOVA de dos vías en el experimento de fertilización 1.c.....	93
Anexo F	Resultados de las pruebas por pares de dilución de PerMANOVA en el experimento de fertilización 1.c.....	94
Anexo G	Resultados de las pruebas por pares de temperatura del ANOSIM en el experimento de desarrollo embrionario.....	95
Anexo H	Resultados de las pruebas por pares de horas del ANOSIM en el experimento de desarrollo embrionario.....	96
Anexo I	Resultados de la prueba general de PerMANOVA de dos vías en el análisis de anormalidades en la embriogénesis.....	97
Anexo J	Resultados de las pruebas por pares de PerMANOVA en el análisis de anormalidades en la embriogénesis.....	97
Anexo K	Resultados de la prueba general de PerMANOVA de densidades en el experimento de desarrollo larval.....	99
Anexo L	Resultados de las pruebas por pares de días del ANOSIM en el experimento de desarrollo larval.....	100

Anexo M	Resultados de las pruebas por pares de días del ANOSIM en el experimento de desarrollo larval.....	100
Anexo N	Resultados de la prueba general de PerMANOVA de longitud total en el experimento de desarrollo larval.....	102
Anexo O	Resultados de las pruebas por pares del PerMANOVA de longitud total en el experimento de desarrollo larval.....	102
Anexo P	Resultados de la prueba general de PerMANOVA de longitud media del cuerpo en el experimento de desarrollo larval.....	104
Anexo Q	Resultados de las pruebas por pares del PerMANOVA de longitud media del cuerpo en el experimento de desarrollo larval.....	104
Anexo R	Resultados de la prueba general de PerMANOVA de longitud post oral en el experimento de desarrollo larval.....	106
Anexo S	Resultados de las pruebas por pares del PerMANOVA de longitud post oral en el experimento de desarrollo larval.....	106
Anexo T	Resultados de la prueba general de PerMANOVA de proporción LPO:LMC en el experimento de desarrollo larval.....	108
Anexo U	Resultados de las pruebas por pares del PerMANOVA de la proporción LPO:LMC en el experimento de desarrollo larval.....	108
Anexo V	Resultados de la prueba general de PerMANOVA del volumen del estómago en el experimento de desarrollo larval.....	110
Anexo W	Resultados de las pruebas por pares del PerMANOVA del volumen del estómago en el experimento de desarrollo larval.....	111

Lista de abreviaturas

AMF	Agua Marina Filtrada
ANOSIM	Análisis de similitud, por sus siglas en inglés
D1, D2, D3, D4, D5	Dilución 1, 2, 3, 4 y 5.
EcoDel	Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo
FCM	Facultad de Ciencias Marinas
hpf	Horas post fertilización
IIO	Instituto de Investigaciones Oceanológicas
LMC	Longitud media del cuerpo
LPO	Longitud post oral
LT	Longitud total
PerMANOVA	Análisis permutacional multivariado de varianza, por sus siglas en inglés
PFA	Paraformaldehído
UABC	Universidad Autónoma de Baja California
VE	Volumen del Estómago

RESUMEN

La mayoría de invertebrados marinos, como los erizos de mar, realizan desoves masivos de gametos en la columna de agua, por lo que los espermatozoides y óvulos se exponen a las condiciones ambientales antes y durante la fecundación, así como los desarrollos embrionario y larval. Dependiendo del tiempo en que desoven y de la duración del desarrollo, las especies pueden experimentar diferentes condiciones oceanográficas. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue describir el rango de tolerancia térmica de *Arbacia stellata* experimenta en su límite norte de distribución, en temperaturas desde 10 a 26 °C, en la fertilización y en los desarrollos embrionario y larval. Para lo anterior, se realizaron tres experimentos diferentes para estudiar la termotolerancia en tres etapas de la historia de vida del erizo, y que incluyeron la fertilización y los desarrollos embrionario y larval. Los resultados demostraron, que en situaciones de limitación de espermatozoides durante la fertilización y cuando hay calentamiento fuera del rango térmico de tolerancia de la especie, el éxito de fertilización disminuyó. Para que aumente el éxito de fertilización en el medio, la reproducción debe ser sincrónica. En cuanto al desarrollo embrionario, las temperaturas altas supusieron un aumento en las tasas de desarrollo, pero también se presentaron más anomalías durante la embriogénesis. En el tratamiento de 10 °C, también existieron altas proporciones de anomalía y las tasas de desarrollo fueron más lentas, lo que implica que este tratamiento es especialmente perjudicial para el desarrollo embrionario. El desarrollo larval se vio afectado en cuanto a tasas de desarrollo, morfometría y mortalidad por las temperaturas extremas del rango térmico, siendo la temperatura más fría la más perjudicial en la mortalidad para las larvas, mientras que las tasas de desarrollo y las mediciones morfométricas fueron más altas. Este primer estudio sobre los efectos en las primeras etapas de la historia de vida de *A. stellata* ofrece información novedosa e importante para comprender su termotolerancia en condiciones de laboratorio, pero también permite entender posibles respuestas

de la especie ante un rango de condiciones oceanográficas asociadas al intervalo de temperatura estudiado, con implicaciones en posibles expansiones de hábitat hacia el norte con la presencia de eventos de calentamiento que se han incrementado en la zona.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de invertebrados marinos, como los erizos de mar, realizan desoves masivos de gametos en la columna de agua, lo que significa que los espermatozoides y óvulos se exponen a las condiciones ambientales cuando se busca la fecundación (Smith et al., 2019); lo anterior también se aplica a las etapas tempranas de desarrollo como los embriones y las larvas. Ante condiciones adversas como cambios extremos en temperatura, los gametos y las etapas tempranas de desarrollo pueden ser más vulnerables (Byrne & Hernández, 2020; Smith et al., 2019). En caso de existir efectos adversos severos sobre cohortes larvales, la dinámica poblacional de una especie puede variar drásticamente (Eckman, 1996; Uthicke et al., 2009)

La temperatura es posiblemente el factor más determinante en la historia de vida de los invertebrados marinos, tanto en sus etapas tempranas como adultas (Byrne & Przeslawski, 2013). Actualmente, existe una tendencia al aumento de la temperatura promedio global en el océano (Hoegh-Guldberg et al., 2018), por lo cual resulta fundamental comprender sus efectos sobre la fertilización y las etapas tempranas de desarrollo de los equinoideos. Al ser ectotermos, su fisiología se ve afectada por la variabilidad de la temperatura en el medio (Díaz et al., 2017). Estos cambios dirigen la distribución espacial de los organismos tanto en su etapa adulta como larval (Byrne & Hernández, 2020), además de ser

uno de los factores ambientales más importantes para el control y rendimiento óptimo de procesos fisiológicos (Byrne & Przeslawski, 2013).

Conforme van sucediendo los cambios ontogénicos en el desarrollo de los erizos, sus reservas energéticas aumentan a partir de que comienzan a alimentarse y sus mecanismos fisiológicos de recuperación y tolerancia a condiciones adversas son más eficientes (Pandori & Sorte, 2019). De este modo, se espera que las etapas más tempranas, así como los gametos, sean las más susceptibles a cambios en el medio. Los efectos sobre las etapas tempranas también puede repercutir en estadios posteriores, por ejemplo, retrasos en la metamorfosis de erizos del género *Echinometra* tuvieron efectos no solo en la mortalidad sino también en la tasa de crecimiento de juveniles (Pechenik, 2018).

Una de las respuestas ante el calentamiento es que la larva plúteo de los erizos presenta una respuesta de plasticidad fenotípica. Esto se define como la expresión de varios fenotipos en la progenie de un mismo genotipo (Reusch, 2013) y la elongación de brazos y disminución del tamaño del estómago ante variaciones en la disponibilidad de alimento son un ejemplo de esta plasticidad (Herrera, 1998). Esto funciona como un amortiguamiento ante condiciones adversas (Mak & Chan, 2018).

Respecto a la especie objetivo, el erizo negro de mar *Arbacia stellata*, su rango de distribución se reporta desde Perú hasta Baja California, habitando desde la zona intermareal hasta los diez metros de profundidad (Lessios et al., 2011). En

los últimos veinte años, esta especie ha alcanzado mayores latitudes sobre su distribución geográfica, llegando hasta el condado de Orange en California, Estados Unidos. Esto se relacionó con la presencia de dos anomalías de aumento de temperatura del mar, El Niño Oscilación del Sur durante el periodo de 1997-1998 (Engle & Richards, 2001) y la anomalía oceanográfica “The Blob”, que sucedió en el océano Pacífico durante el periodo 2013-2015 (Cavole et al., 2016). Las especies del género *Arbacia* son termófilas en su etapa adulta (Díaz et al., 2017; Pérez-Portela et al., 2019), lo cual puede explicar por qué *A. stellata* ha sido encontrada en latitudes de clima templado cuando se presentan estas anomalías de temperatura.

El presente trabajo, aporta conocimiento sobre respuestas en fertilización y desarrollo embrionario y larval ante un amplio rango térmico, considerando temperaturas extremas y habituales en su hábitat. Los experimentos realizados demuestran cómo la temperatura puede afectar el éxito de fertilización, la tasa de desarrollo y las anomalías durante el desarrollo embrionario y la tasa de desarrollo, el crecimiento y la mortalidad en los estadios larvales de *Arbacia stellata*.

ANTECEDENTES

Respecto a otros estudios realizados con especies del género *Arbacia* y estresores ambientales, la mayoría de ellos han tomado a *A. lixula* como especie objetivo. Recientemente, Foo y colaboradores (2020) estudiaron las respuestas de la especie en condiciones ambientales en una fuente hidrotermal y en condiciones experimentales. En laboratorio, las larvas crecieron con brazos más pequeños, mientras que en el medio se presentaron tamaños más grandes de brazos, contrario a lo esperado por los autores. Las condiciones ambientales del medio, posiblemente la disponibilidad de alimento inferida por el aumento de clorofila, pudieron facilitar este crecimiento, por lo cual resulta importante considerar que los estudios en laboratorio ofrecen respuestas fisiológicas diferentes ante condiciones naturales específicas.

En otro estudio con *A. lixula* en las islas Canarias, se investigaron los efectos en conjunto de la temperatura y la acidificación sobre la fecundación y el desarrollo larval (García et al., 2018). El éxito de fecundación fue menor para tratamientos bajos de pH (7.4), así como de temperatura (19 °C). Aun, esto se vio únicamente en los tratamientos de bajo pH combinado con los de menor temperatura. En cuanto a las divisiones celulares, se presentó un retraso en todos los tratamientos con menores valores de pH. Para el desarrollo larval, el mejor rendimiento se presentó en los tratamientos con mayor valor de temperatura, sin importar el nivel de pH; esto puede sugerir que no solo la etapa adulta es termófila, sino que se mantiene durante el ciclo de vida.

Por otra parte, en una población de *A. lixula* en el Mediterráneo, se estudiaron los efectos combinados de temperatura y acidificación (Visconti et al., 2017). Un resultado similar al mencionado anteriormente se obtuvo para las larvas de esta población. El rango térmico óptimo es bastante amplio y permite inferir que esta especie es termófila. Los posibles efectos negativos de la acidificación se vieron amortiguados por las temperaturas a las que se expusieron las larvas.

Respecto a *Arbacia stellata*, Díaz y colaboradores (2017) describieron valores preferidos de temperatura por adultos de Baja California, al exponerlos a tratamientos de 16, 19, 22 y 25 °C. Demostraron que la aclimatación aumentó significativamente desde 16 hasta 22.8 °C y que el consumo de oxígeno también aumentó con la temperatura.

Para una población de *A. stellata* establecida en Baja California, México, se ha estudiado el ciclo reproductivo, descrito como semicontinuo y con desoves parciales durante el año (Díaz-Martínez et al., 2019). Debido a que desovan con menor intensidad durante primavera, los autores sugieren que las poblaciones de *A. stellata* en Baja California se han adaptado a evitar desovar durante primavera, cuando el pH del ambiente puede ser de ~7.8.

Planteamiento del problema

Aunque existan cambios globales en cuanto a la temperatura, es importante considerar que las especies están conformadas por poblaciones y que estas experimentan diferentes condiciones por cada región o incluso localidad (Przeslawski et al., 2015; Wernberg et al., 2012). Por tanto, se deben estudiar rangos de estresores que se presenten en la región de donde provienen los organismos (Boyd et al., 2018), no siendo recomendable utilizar valores globales para estudios regionales.

La amplia extensión de *Arbacia stellata* implica que las poblaciones de esta especie experimentan un gran rango de temperaturas, reportado por Oliva Méndez (2018). Para invertebrados marinos, las etapas tempranas de desarrollo, que incluyen los embriones y las larvas, son las más vulnerables ante cambios en los estresores ambientales (Byrne, 2011; Byrne & Przeslawski, 2013; Pörtner, 2008), por lo cual resulta de interés ecológico estudiar cuáles son los efectos de estos estresores ambientales sobre estas.

Al conocer las condiciones ambientales de los reproductores que se usarán para este estudio, es posible estudiar cuál es el rango óptimo de esta especie y cuáles valores de los estresores pueden impedir o favorecer que *A. stellata* amplíe su distribución hacia el norte.

Considerando estos factores ambientales, se establece la siguiente pregunta: ¿cuál es el efecto de temperaturas extremas, tanto altas como bajas, sobre la

fecundación y el desarrollo embrionario y larval de *Arbacia stellata* en Baja California? Esta especie ha ampliado su distribución límite al norte y, por tanto, resulta importante conocer cuáles son los valores de estos estresores ambientales que impiden una más rápida colonización de latitudes más altas.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Describir el efecto de la temperatura en la fertilización y en las etapas tempranas de desarrollo de *Arbacia stellata* expuestas a un rango local y regional, como contribución para entender mejor las posibles condiciones ambientales que favorecen su expansión de rango hacia el norte.

Objetivos específicos:

Evaluar el éxito de fertilización en diferentes densidades de espermatozoides en un rango térmico de 10 a 26 °C.

Analizar las diferencias en proporción de estadios de desarrollo embrionario y de anomalías en la embriogénesis a temperaturas desde 10 hasta 26 °C.

Cuantificar el crecimiento morfométrico y los cambios en densidad de las etapas larvales en tratamientos de temperatura en un rango de 10 a 26 °C.

HIPÓTESIS

En general, las temperaturas menores a 18 °C serán más perjudiciales que las altas para las etapas tempranas de desarrollo de *Arbacia stellata*.

- Los gametos de *A. stellata* sometidos a los tratamientos de menor temperatura tendrán menor éxito de fecundación.
- Los embriones expuestos a los tratamientos de temperatura más bajos tardarán mucho más tiempo que los que experimenten temperaturas mayores a 18 °C.
- Las larvas cultivadas a menores temperaturas presentarán menores valores de mediciones morfométricas como la longitud total, longitud post oral, longitud media del cuerpo y volumen del estómago.

MÉTODOS

Para responder a la pregunta central de investigación, “¿cuál es el efecto de temperaturas extremas, tanto altas como bajas, sobre la fecundación y el desarrollo embrionario y larval de *Arbacia stellata* en Baja California?”, se estableció un rango de temperaturas basado en los resultados obtenidos por Oliva-Méndez (2018) en que describe una serie de tiempo de temperaturas desde

el 2009 al 2014 y cuyos valores extremos son 10 °C y 24 °C. Así, se determinó un rango de 10 °C a 26 °C, considerando que la mayor parte del año, las temperaturas fluctúan entre 12 y 18 °C sin considerar anomalías de calentamiento.

Éxito de fertilización

Para la realización de este experimento se utilizó un cruce aleatorio de un macho y una hembra, con diámetro mayor a 3.5 mm, para cada una de las repeticiones. El experimento consistió en tres repeticiones. El primer experimento se realizó el 27 de marzo del 2021, mientras que el segundo y el tercero se realizaron simultáneamente el 6 de abril del 2021.

Reproductores, desove de adultos y recolecta de gametos

Se recolectaron 36 erizos adultos provenientes de Campo Kennedy (31.70°N, 116.68°O), Baja California, México y obtenidos el 18 de marzo del 2021; la temperatura del agua en el sitio de recolección a 11 m de profundidad fue de 11 °C a las 10:00 AM. Los organismos se mantuvieron en tanques del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (EcoDel) del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), con agua marina a ~16 °C en la mañana, con variaciones diurnas, y fueron alimentados *ad libitum* con macroalgas, primordialmente *Macrocystis pyrifera*.

El desove de organismos se realizó siguiendo los pasos descritos por Strathmann (1987), procedimiento utilizado regularmente en EcoDel. Se inyectaron 2 mL de KCl 0.53 M a través de la membrana peristomial, inyectando la solución directamente en las gónadas. La contracción muscular promovió la expulsión de los gametos a través de los poros genitales, con lo cual se hizo posible identificar el sexo del organismo.

Las hembras desovaron huevos de color rojo oscuro, mientras que los espermatozoides de los machos fueron de color blanco. Los erizos desovados fueron separados según su sexo; los huevos se colocaron en un vaso de precipitado de 1 L mientras que los espermatozoides se recolectaron utilizando una micropipeta para depositarlos en un tubo de centrifuga. A diferencia del procedimiento de Strathmann (1987), los espermatozoides no se enfriaron puesto que pruebas preliminares demostraron una disminución en el éxito de fertilización al reducir su temperatura con refrigeración.

Diseño experimental

Para mantener las temperaturas del experimento, se estableció un sistema de baño maría para cada tratamiento. El rango térmico fue 10, 14, 18, 22 y 26 °C, y cada uno se monitoreó manualmente con un termómetro digital, colocándolo dentro de un tubo de ensayo con 10 mL de AMF. La temperatura en los primeros dos tratamientos (10 y 14 °C) se mantuvo con un sistema de recirculación con enfriadores Cyclone de Aqua Logic de 621 W con controlador digital de

temperatura NEMA 4X de Agua Logic, mientras los restantes tres tratamientos se ajustaron con termostatos sumergibles ViaAqua de 300 W.

Las réplicas de cada tratamiento consistieron en tubos de ensayo con capacidad de 10 mL colocados en gradillas dentro del sistema de baño maría (Figura 1.A). Para iniciar el experimento, primero, se añadieron 4 mL de AMF a 16 °C a cada tubo de ensayo para que alcanzara la temperatura objetivo de cada tratamiento. Luego, las diluciones seriadas se realizaron tomando 200 µL de la solución de espermatozoides directamente del poro genital del macho y añadiéndolo a un tubo de centrífuga de 20 mL con 19,8 mL de AMF. Esta fue la dilución inicial (D1), a partir de ella, se diluyó en series de 1:10 para las siguientes cuatro diluciones utilizadas en el experimento (D2 a D5) (Figura 1.B). Por último, al tubo de ensayo se añadieron 5 mL de huevos sin fertilizar (Figura 1.C).

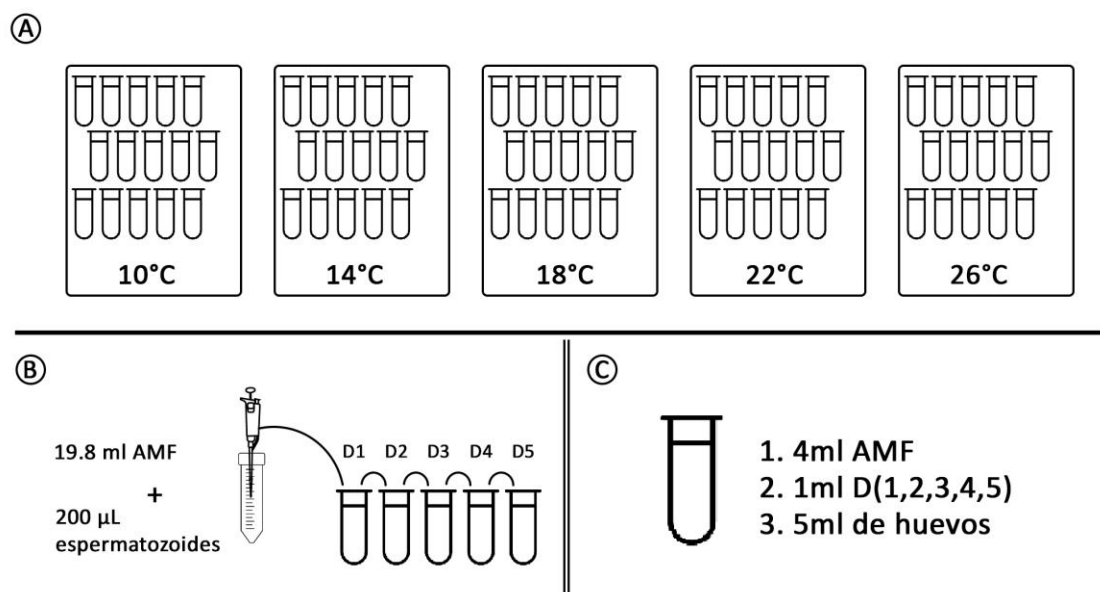


Figura 1. Esquema del experimento de éxito de fertilización de *Arbacia stellata*. A. se expone el diseño experimental en donde cada tubo representa una réplica. B. Representación de diluciones seriadas. C. Contenido de cada tubo de ensayo.

Con una cámara de Neubauer, se realizó el conteo de espermatozoides en D3; con base en ese conteo, se infieren las densidades para el resto de diluciones. Luego de tener las diluciones iniciales (D1-D5), se procedió a añadir 1mL de cada uno a cada tubo de ensayo de acuerdo con la dilución correspondiente. Inicialmente, las gradillas de 26 y de 10 °C se colocaron en los tratamientos de 22 y 14 °C respectivamente, para acondicionar los espermatozoides a la temperatura sin ocasionar un golpe térmico. Se dejaron por diez minutos y luego se pasaron a sus respectivos sistemas de baño maría.

La densidad de huevos se ajustó a 80 huevos mL⁻¹ y se colocaron en cinco vasos de precipitado, uno para cada tratamiento. Los huevos se aclimataron de la misma manera que las gradillas con AMF y espermatozoides. Para iniciar la

fertilización, se añadieron 5 mL de huevos a los tubos de ensayo y al pasar 30 minutos, se añadió paraformaldehído (PFA) al 2 % para fijar las muestras.

Cada tubo de ensayo contuvo 4 mL de AMF, 1 mL de la dilución respectiva de espermatozoides y 5 mL de huevos, añadidos en ese orden. Antes y después del experimento, se hizo una prueba de fertilización con los gametos para determinar su viabilidad. En ambas pruebas, se presentó un éxito de fertilización mayor al 90 %.

El éxito de fertilización se evaluó contando un total de 150 huevos y, de estos, contabilizando la cantidad que presentaba una membrana de fertilización o una división celular. Se obtuvo un puntaje calculando la cantidad de huevos fertilizados dividido entre 150 huevos contados. Las muestras se evaluaron con la ayuda de un microscopio compuesto (AxioSkop Mot 2, Carl Zeiss) y se fotografiaron con una cámara incorporada al mismo (AxioCam ICc5, Carl Zeiss).

Análisis estadístico

Debido a que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad, se procedió a realizar una prueba no paramétrica, un análisis multivariado permutacional de varianza (PerMANOVA). La distribución de los datos fue normal de acuerdo con la prueba de Shapiro-Wilk, pero los datos no presentaron homocedasticidad de acuerdo con la prueba de Levene.

Los puntajes se ordenaron en una matriz de disimilaridad con distancias euclidianas y se analizaron con un PerMANOVA, con un modelo de dos factores fijos: los tratamientos y las diluciones, ambos con cinco niveles. Los resultados significativos se evaluaron con pruebas por pares *a posteriori* por permutaciones (Anderson, 2001), utilizando 4999 permutaciones para el análisis.

En caso de no existir suficientes permutaciones únicas para obtener un valor confiable, se utilizó el método de extracciones aleatorias de Monte Carlo para calcular un valor de p a partir de la distribución asintótica de permutación. El análisis estadístico se realizó con el programa PRIMER 6 & PERMANOVA (v6.1.12 & v1.0.2) (Clarke & Gorley, 2006), mientras que la visualización de datos se realizó en R (v. 4.1.1) con el paquete *ggplot2* (Wickham, 2016).

Desarrollo embrionario

Reproductores, desove y recolecta de gametos

Los adultos utilizados para este experimento provinieron del mismo lote traído de Campo Kennedy y fueron mantenidos en EcoDel para el experimento de fertilización. Estos presentaron un diámetro de testa mayor a 3.5 cm. La temperatura del agua en los tanques se mantuvo a ~16 °C en la mañana, con variaciones diurnas. El experimento se realizó el 22 de marzo del 2021.

El desove de organismos se realizó con la misma metodología mencionada en el experimento de fertilización, solo que en esta ocasión, en lugar de ser un cruce de un único macho y hembra, se mezclaron los gametos de tres machos y de tres hembras, escogidos aleatoriamente. De manera preliminar, se realizó una fertilización con las mezclas de gametos y se corroboró que existiera un éxito de fertilización superior al 90 %. La fertilización se realizó añadiendo la mezcla de espermatozoides en cantidades pequeñas (~ 1 mL), asegurando que alrededor de los huevos hubiera entre 10 y 20 cabezas de espermatozoides, y con esto evitar la polispermia.

Transferencia a tratamientos y diseño experimental

Posteriormente, los embriones fueron transferidos a frascos estériles de 100 mL en una densidad de 12 embriones mL⁻¹. Los embriones sometidos a 26 y 10 °C se aclimataron inicialmente en los sistemas de 22 y 14 °C durante quince minutos y luego se trasladaron a sus respectivos tratamientos. La temperatura en los primeros dos tratamientos (10 y 14 °C) se mantuvo con un sistema de recirculación con enfriador Cyclone de Aqua Logic de 621 W con controlador digital de temperatura NEMA 4X de Aqua Logic, mientras que los tres restantes tratamientos se ajustaron con termostatos sumergibles ViaAqua de 300 W.

Se tomó una muestra de cada frasco al finalizar la transferencia para corroborar que existiera membrana de fertilización y/o etapa de desarrollo inicial. El éxito de fertilización fue superior al 97 % en todos los frascos.

Los organismos se mantuvieron en los frascos sumergidos en un sistema de baño maría para cada temperatura (Figura 2.A). Esta se monitoreó manualmente con un termómetro digital durante el experimento. Para la toma de muestras, se agitó el agua de manera homogénea y se utilizó una pipeta para extraer 6 mL. Se colocaron en una caja Petri y se les añadió PFA al 2 % para fijar la muestra. Esto se realizó en ocho momentos diferentes: 2, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas post fertilización (hpf). Los embriones se observaron en un microscopio compuesto (AxioSkop Mot 2, Carl Zeiss) y se fotografiaron una con cámara incorporada al mismo (AxioCam ICc5, Carl Zeiss) (Figura 2.B).

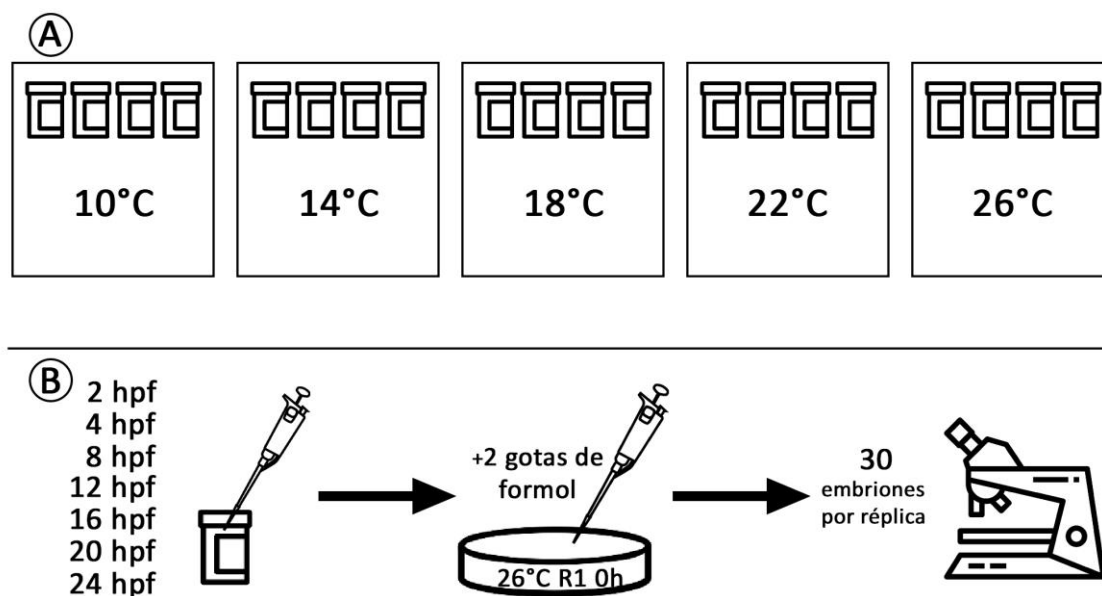


Figura 2. Esquema del diseño experimental, en donde cada frasco representa una réplica (A) y de la toma de muestras (B) para analizar el desarrollo embrionario de *Arbacia stellata*.

Clasificación de estadios embrionarios

Para cada hora y cada tratamiento, se categorizaron los estadios de los embriones de acuerdo con sus divisiones celulares, presencia de cilios, formación de arquenterón y aparición de brazos. Se establecieron doce grupos para categorizar los estadios: huevo fertilizado (Figura 3.A), etapa de 2 células (Figura 3.B), de 4 células (Figura 3.C), de 8 células (Figura 3.D), de 16 células (Figura 3.E), de 28 células (Figura 3.F), de 56 y 112 células (Figura 3.G), blástula (Figura 3.H), blástula eclosionada (Figura 3.I), gástrula (Figura 3.J), prisma (Figura 3.K) y larva de dos brazos incipientes (Figura 3.L). El estadio de 56 y 112 células incluye todas las etapas posteriores al desarrollo de 28 células, pero antes de la blástula. Se incluyeron en este grupo por la dificultad de determinar diferencias antes de iniciar la etapa de blástula.

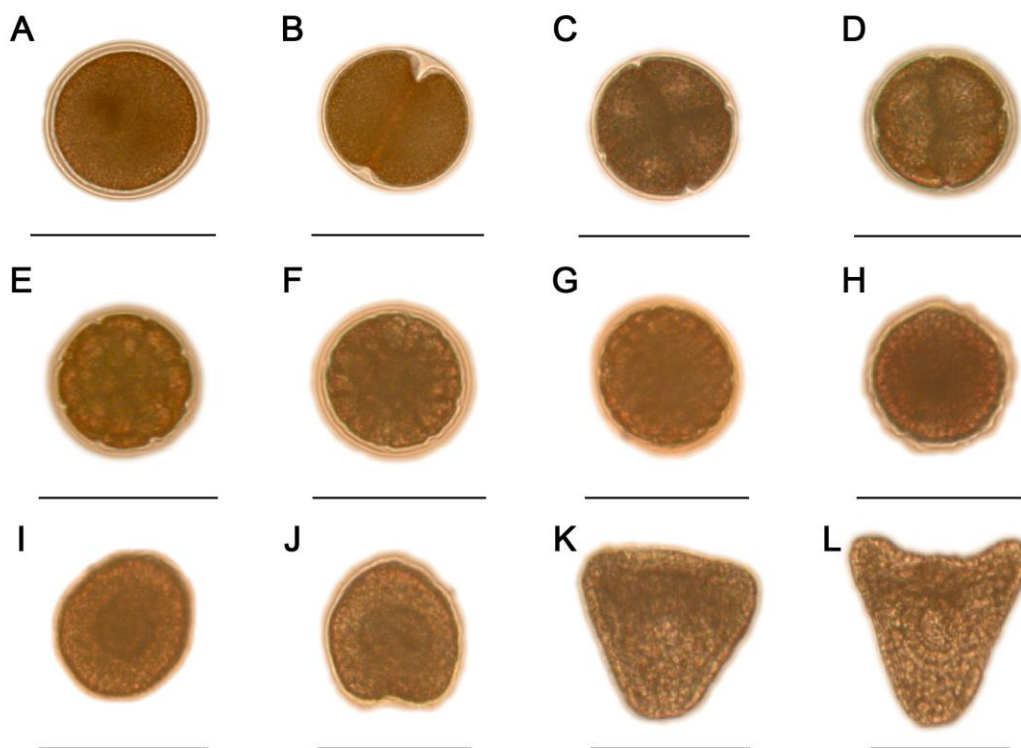


Figura 3. Estadios de desarrollo embrionario de *Arbacia stellata*. Cada barra de escala equivale a 100 μm . (A) Huevo fertilizado. (B) Etapa de dos células. (C) Etapa de cuatro células. (D) Etapa de ocho células. (E) Etapa de 16 células. (F) Etapa de 28 células. (G) Etapa de 56 & 112 células. (H) Blástula. (I) Blástula eclosionada).

Anormalidades en embriogénesis

De la muestra tomada para cuantificar los estadios embrionarios, se analizó la proporción de embriones anormales, contando cuántos presentaron anomalías en las divisiones celulares o en la morfología general, en un total de 30 individuos de cada réplica. Las malformaciones durante la embriogénesis se describieron como divisiones celulares irregulares, produciendo blastómeros de diferentes

tamaños (en la misma división celular), mitosis incompleta para uno o más blastómeros, o ausencia de estómago en la larva (Figura 4).

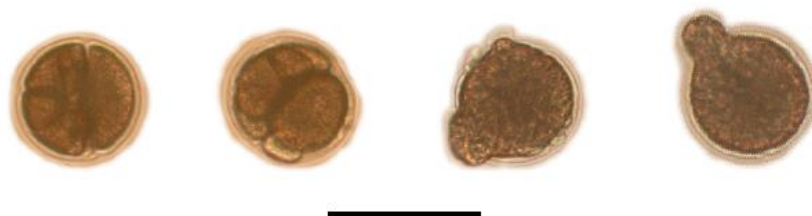


Figura 4. Ejemplos de malformaciones en embriones. La barra de escala equivale a 100 μm .

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la clasificación de estadios se ordenaron en una matriz de disimilaridad de Bray-Curtis y se analizaron mediante un análisis de similitud (ANOSIM, por sus siglas en inglés) de acuerdo con el tratamiento y el tiempo, para determinar si existieron diferencias entre los grupos. Se utilizaron 4999 permutaciones para este análisis.

Los porcentajes de anormalidades se ordenaron en una matriz de disimilaridad con distancias euclidianas y se analizaron con un PerMANOVA. Se estableció un modelo de dos factores fijos: los tratamientos y el tiempo, el primero con cinco niveles y el segundo con CUÁNTOS. Los resultados significativos se evaluaron con pruebas por pares *a posteriori* por permutaciones (Anderson, 2001), utilizando 4999 permutaciones para el análisis. En caso de no existir suficientes permutaciones únicas para obtener un valor confiable, se utilizó el método de

extracciones aleatorias de Monte Carlo para calcular un valor de p a partir de la distribución asintótica de permutación.

Las pruebas ANOSIM y PermANOVA se realizaron con el programa PRIMER 6 & PERMANOVA (v6.1.12 & v1.0.2) (Clarke & Gorley, 2006), mientras que la visualización de datos se realizó en R (v4.1.1) con el paquete *ggplot2* (Wickham, 2016).

Desarrollo larval

Reproductores, desove y recolecta de gametos

Se capturaron 20 reproductores mayores a 3.5 cm de diámetro de testa en Arbolitos (31.70°N, 116.68°O), Baja California, México, el 2 de septiembre del 2020. Los organismos fueron transportados a EcoDel en donde se mantuvieron en tanques de agua marina en EcoDel a ~20 °C hasta ser utilizados. Durante este periodo se alimentaron *ad libitum* con macroalgas, primordialmente *Macrocystis pyrifera*.

El desove se realizó el 10 de septiembre del 2020, utilizando un cruce de cinco hembras y tres machos, escogidos al azar. Se hizo el procedimiento descrito por Strathmann (1987), utilizado regularmente en EcoDel y los organismos se separaron de acuerdo con su sexo, de la forma en que se ha descrito en párrafos

anteriores para el experimento anterior. Posteriormente, se recolectaron sus gametos.

Una vez recolectados los gametos, los huevos de las hembras se mezclaron en un vaso de 1 L mientras que los espermatozoides de los machos fueron vertidos en un vaso de precipitado con AMF. De este, se tomaron cantidades pequeñas (~1 mL) para añadir a la mezcla de huevos, tomando muestras para contar aproximadamente, cuántas cabezas de espermatozoides rodeaban cada huevo; se dejó de añadir mezcla hasta que se observó entre 10 y 20 cabezas de espermatozoide rodeaban cada huevo, lo anterior con el fin de evitar polispermia. El éxito de fertilización fue superior a 90 % y los embriones se transfirieron a dos contenedores de 20 L.

Transferencia a tratamientos y mantenimiento de cultivo

El cultivo permaneció por 23 h a ~23 °C. En el momento de su transferencia, los organismos se encontraban, en su mayoría, en etapa de larva plúteo de dos brazos. La densidad inicial del cultivo de larvas fue 6 larvas mL⁻¹.

Las larvas se transfirieron a 15 matraces. Todos ellos se llenaron previamente con AMF a la misma temperatura (22.2 °C) y se colocaron en los sistemas de baño maría para cada tratamiento de temperatura. En este experimento, las temperaturas de 10 y 14 °C se mantuvieron estables con un sistema de recirculación con enfriadores Cyclone de Aqua Logic de 621 W con controlador digital de temperatura NEMA 4X de Aqua Logic y, para las de 22 y 26 °C, se

utilizaron termostatos sumergibles ViaAqua de 300 W. El tratamiento de 18 °C se mantuvo, aprovechando la temperatura mantenida en el cuarto experimental mediante el uso de un sistema de aire acondicionado global de 2 toneladas de capacidad. Dos horas después de la transferencia, los cinco tratamientos alcanzaron las temperaturas objetivo. En la Figura 5.A, se ilustra el diseño experimental. Las mediciones de temperatura se tomaron con un registrador automático de datos (HOBO® “Pendant temp/light”).

A partir de la transferencia a los tratamientos, las larvas fueron alimentadas todos los días con la microalga *Rhodomonas* sp. en densidad de 10,000 células mL⁻¹. Cada día se realizó recambio de agua, alternando los días de recambio parcial y total.

Diseño experimental

El experimento inició al día siguiente de la transferencia de los embriones para dejar un periodo de ~24 horas de aclimatación. A partir del día 1, se tomaron muestras cada dos días, antes de realizar los recambios totales. Se tomaron 10 mL por cada réplica (matraz) y se fijaron con PFA al 2 % en cajas Petri para realizar un conteo y fotografiar (Figura 5.B). La densidad de larvas se estimó mediante un promedio del conteo de las réplicas de acuerdo con el tratamiento. La sobrevivencia se calculó contabilizando las larvas presentes en el matraz al final del experimento o cuando fue necesario finalizar el tratamiento debido a la baja densidad de larvas debido a una alta mortalidad. Las larvas se observaron

en el microscopio (AxioSkop Mot 2, Carl Zeiss) y se fotografiaron con una cámara incorporada al mismo (AxioCam ICc5, Carl Zeiss).

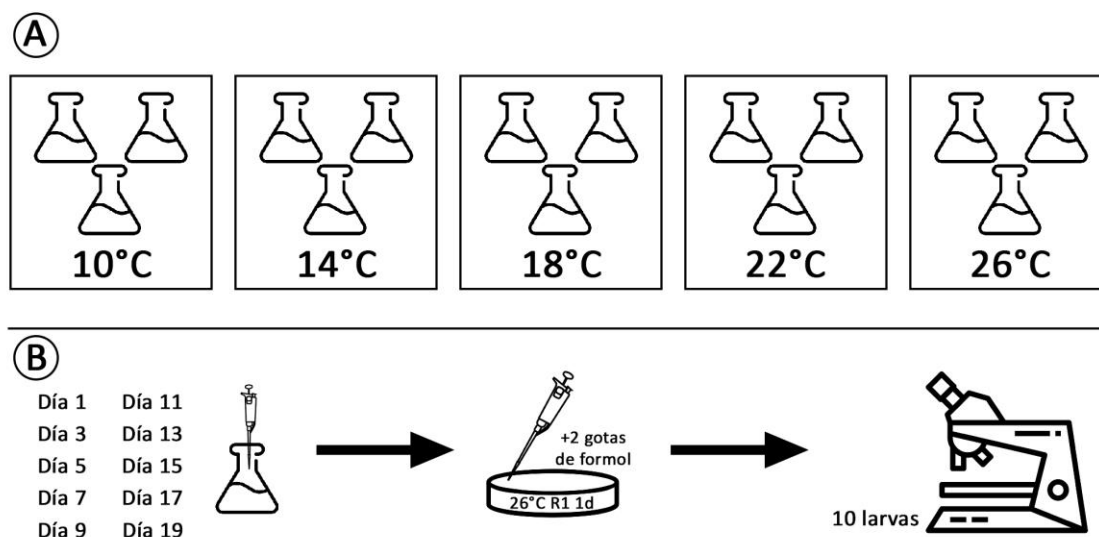


Figura 5. Esquema del diseño experimental, donde cada matraz representa una réplica (A) y de la toma de muestras (B) para el experimento de desarrollo larval de *Arbacia stellata*.

Clasificación de estadios larvales

Los estadios larvales se clasificaron en siete categorías de acuerdo con las siguientes características morfológicas: aparición de nuevos pares de brazos y del rudimento, así como reabsorción de brazos (Figura 6). Los grupos fueron larva de dos brazos (Figura 6.A), larva de cuatro brazos (Figura 6.B), larva de seis brazos (Figura 6.C), larva de ocho brazos (Figura 6.D), larva de 10 brazos (Figura 6.E), competente (Figura 6.F) y metamórfica (Figura 6.G). La Figura 6.H representa una postlarva de *Arbacia stellata*.

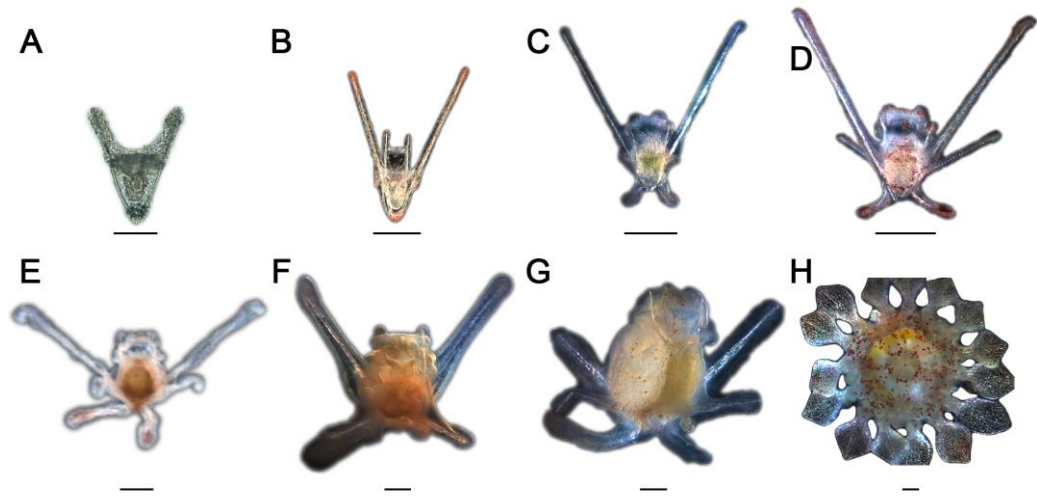


Figura 6. Estadios de desarrollo larval de *Arbacia stellata*. Las barras de escala equivalen a 100 μm . (A) Larva de dos brazos. (B) Larva de cuatro brazos. (C) Larva de seis brazos. (D) Larva de ocho brazos. (E) Larva de 10 brazos. (F) Larva competente. (G) Larva metamórfica. (H) Postlarva.

Mediciones morfométricas

Se establecieron cuatro mediciones para las larvas, tomando longitud total (LT), longitud post oral (LPO), longitud media del cuerpo (LMC) y dos mediciones del diámetro del estómago (Figura 7). Posteriormente, se calculó una proporción de entre LPO y LMC como índice de plasticidad fenotípica, en que a mayor valor, existe posibilidad de que las larvas presenten esta plasticidad en busca de alimento. Por último, se utilizaron los diámetros para estimar el volumen del estómago (VE) mediante la siguiente fórmula:

$$VE = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{(VE1 + VE2)}{4} \right)^3 \quad (1)$$

donde VE1 y VE2 corresponden a mediciones del diámetro del estómago y VE equivale al volumen del estómago.

Antes de medir las longitudes en las imágenes, se fotografió una escala microscópica para referenciar el tamaño en cada imagen de acuerdo con el objetivo utilizado para cada fotografía. Posteriormente, se calcularon las longitudes con el programa Fiji de ImageJ (v.1.53k) (Schindelin et al., 2012).

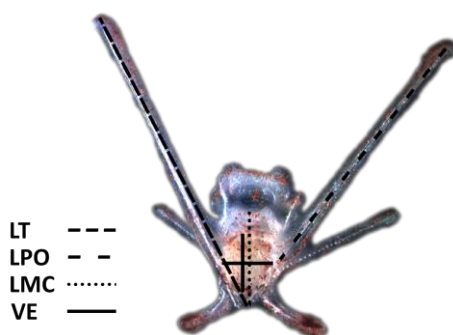


Figura 7. Mediciones morfológicas para cada larva. LT: Longitud total; LPO: Longitud Post Oral; LMC: Longitud Media del Cuerpo; VE: Volumen del Estómago.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con pruebas no paramétricas porque los datos no cumplieron con los supuestos para proceder con pruebas paramétricas. La distribución de los datos fue normal de acuerdo con la prueba de Shapiro-Wilk pero los datos no presentaron homocedasticidad de acuerdo con la prueba de Levene.

Para la clasificación de estadios larvales, se organizaron los datos en una matriz de disimilaridad de Bray-Curtis y se realizó un ANOSIM de acuerdo con el tiempo y con la temperatura, para determinar si existió diferencia entre los grupos. Las variables morfométricas se evaluaron mediante un PerMANOVA para cada una (LT, LPO, LMC, proporción LPO:LMC, VE) con dos factores fijos: el tiempo con diez niveles y la temperatura con cuatro, excluyendo el tratamiento de temperatura más bajo. Las diferencias significativas fueron analizadas con pruebas *a posteriori* (Anderson, 2001) para determinar cuáles niveles mostraron diferencias. El análisis estadístico se realizó con el programa PRIMER 6 & PERMANOVA (v6.1.12 & v1.0.2) (Clarke & Gorley, 2006), mientras que la visualización de datos se realizó en R con el paquete *ggplot2* (Wickham, 2016).

RESULTADOS

Éxito de fertilización

Temperaturas experimentales

Las temperaturas durante el experimento se mantuvieron estables y dentro del rango establecido para cada tratamiento experimental (Figura 8). La mayor variación se obtuvo en los tratamientos de temperaturas altas. Los promedios y desviaciones estándar se detallan en la tabla I.

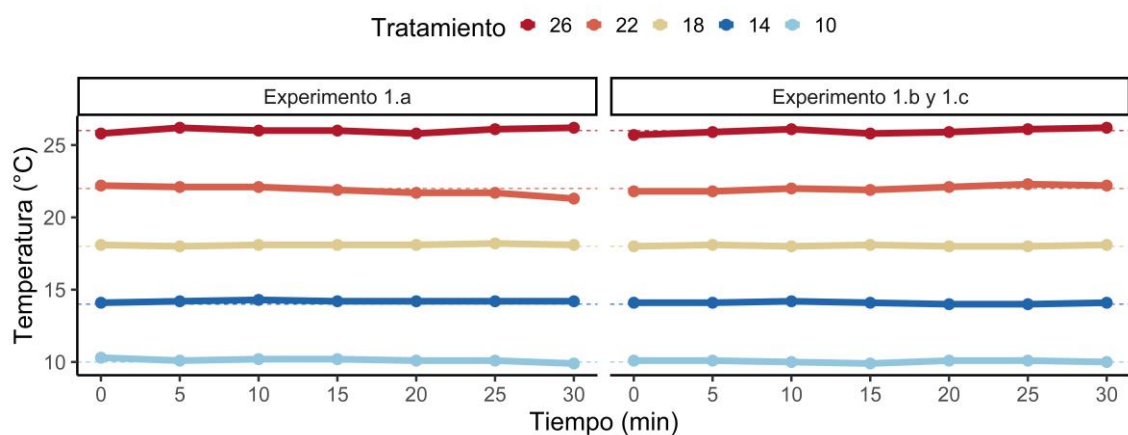


Figura 8. Mediciones de temperatura durante los experimentos de éxito de fertilización. Las líneas punteadas señalan el valor objetivo para cada tratamiento.

Los promedios de temperatura obtenidos se ajustaron a los valores objetivos. Las variabilidades en los experimentos fueron inferiores a 0.26 °C, con un valor mínimo de 0.06 °C (Tabla I).

Tabla I. Promedios de temperatura obtenidos para los tratamientos en los experimentos de éxito de fertilización. DE: Desviación estándar.

Temperatura objetivo (°C)	Promedio $\pm$ DE (°C)	
	Experimento 1.a	Experimentos 1.b y 1.c
10	10.0 $\pm$ 0.12	10.0 $\pm$ 0.10
14	14.2 $\pm$ 0.08	14.1 $\pm$ 0.07
18	18.1 $\pm$ 0.06	18.1 $\pm$ 0.05
22	21.9 $\pm$ 0.26	22.0 $\pm$ 0.20
26	26.0 $\pm$ 0.16	26.0 $\pm$ 0.20

Densidad inicial de espermatozoides

En el experimento 1.a, se presentó la menor densidad de espermatozoides en relación con los tres experimentos, pero las diluciones seriadas presentaron una proporción similar en relación con los experimentos (Tabla I). Las densidades en los experimentos 1.a y 1.c fueron más cercanas entre sí que con el experimento 1.b. La diferencia entre los valores iniciales del experimento 1.a y 1.b representa el 72 % (6.6×10^6 espermatozoides mL^{-1}) de la densidad obtenida para el 1.a, mientras que la diferencia entre el 1.b y 1.c representa el 50 % (5.3×10^6 espermatozoides mL^{-1}) de su valor inicial.

Tabla II. Densidad de espermatozoides para cada experimento de fertilización. Las unidades equivalen a células mL^{-1} y cada uno se añadió a réplicas junto con 400 huevos.

Dilución y proporción de huevos:espermatozoides	Experimento 1.a	Experimento 1.b	Experimento 1.c
1. 1:100,000	9.15×10^7	15.8×10^7	10.5×10^7
2. 1:10,000	9.15×10^6	15.8×10^6	10.5×10^6
3. 1:1000	9.15×10^5	15.8×10^5	10.5×10^5
4. 1:100	9.15×10^4	15.8×10^4	10.5×10^4
5. 1:10	9.15×10^3	15.8×10^3	10.5×10^3

Experimento 1.a

El mayor éxito de fertilización se dio en los tratamiento de 26 °C y 14 °C, al alcanzar ambos un promedio de 98.44 % (± 1.39 % y ± 0.38 % de desviación estándar, respectivamente) en la primera dilución (Figura 9). Todos los tratamientos tuvieron un éxito mayor a 95 % en la primera dilución, superando el resultado de las pruebas de viabilidad antes y después del experimento, con valor de 90 %.

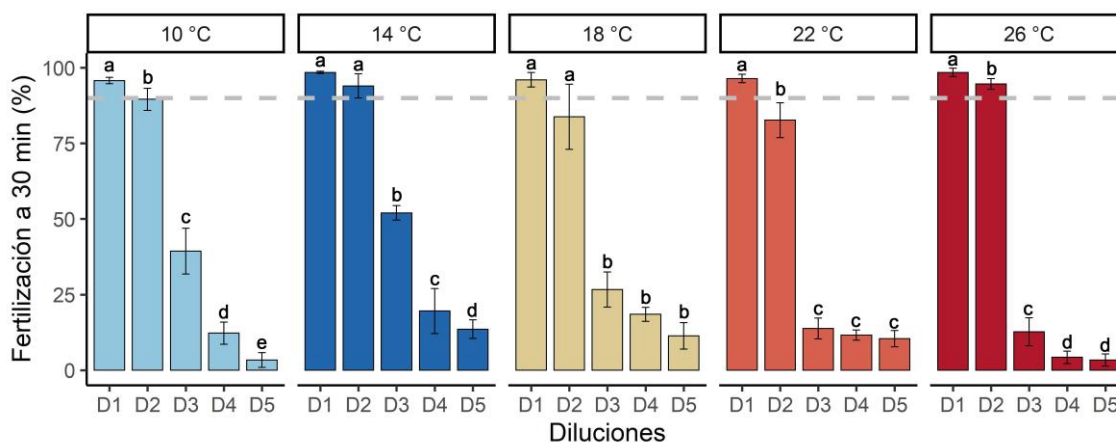


Figura 9. Promedios del porcentaje de fertilización en el experimento 1.a para cada dilución de cada tratamiento. Las barras representan desviación estándar, la línea punteada indica el éxito de fertilización a 90% antes y después del experimento y, para cada tratamiento, las letras diferentes indican diferencias significativas entre las diluciones.

A partir de la tercera dilución y para todos los tratamientos, existió una marcada disminución en el porcentaje de fertilización. Especialmente, de D3 a D4, el tratamiento de 26 °C pasó de un éxito del $94.67 \pm 1.76 \%$ a $12.67 \pm 4.61 \%$. En los tratamientos de temperatura más baja, 14 °C y 10 °C, la disminución fue menor en esta dilución, la cual fue de $52 \pm 2.4 \%$ y $39.33 \pm 7.57 \%$ respectivamente.

De D4 a D5, el éxito de fertilización en el tratamiento de 10 °C empeoró, alcanzando el porcentaje más bajo, junto con el tratamiento de 26 °C en la dilución 5, ambos con 3.33% ($\pm 2.40 \%$ y $\pm 2 \%$, respectivamente). A pesar de presentar un alto éxito en la dilución inicial, las diluciones más bajas para los tratamientos extremos presentaron porcentajes muy bajos de fertilización.

En la prueba general del PerMANOVA, se demostró que tanto los tratamientos (pseudo-F: 8.90, valor de $p < 0.05$) y las diluciones (pseudo-F: 376.68, valor de $p < 0.05$), así como su interacción (pseudo-F: 3.78, valor de $p < 0.05$), tuvieron diferencias significativas en los porcentajes de fertilización. La tabla completa de resultados se presenta en el anexo A.

Las pruebas por pares (Anexo B) demostraron que las diferencias significativas no se dieron en todos los tratamientos cuando se compararon D1 y D2, pero sí existió diferencia entre D2 y D3 para cada temperatura, en respuesta a la disminución en el porcentaje de fertilización. Respecto a D3 y D4, no hubo diferencias significativas en los tratamientos de 18 y 22 °C, mientras que D4 y D5 fueron significativamente diferentes únicamente en el tratamiento de 10 °C. Para las demás combinaciones de diluciones (por ejemplo, D1-D4 o D2-D5) en todos los tratamientos, se presentaron diferencias significativas, pero se resaltan especialmente las comparaciones secuenciales.

Experimento 1.b

Los porcentajes de fertilización para D1 fueron altos y similares entre sí (Figura 10). A 14 °C, se alcanzó un éxito de fertilización de 97.78 ± 1.68 %, seguido por el tratamiento de 22 °C con 97.56 ± 0.77 %. El tratamiento de 18 °C presentó un éxito de 96.44 ± 1.02 % y para el de 26 °C, se reportó un 95.11 ± 1.39 %. Particularmente, el tratamiento de 10 °C presentó un promedio de fertilización

muy bajo ($84 \pm 3.33 \%$), que también fue más bajo que el resto de promedios para D2 de los demás tratamientos.

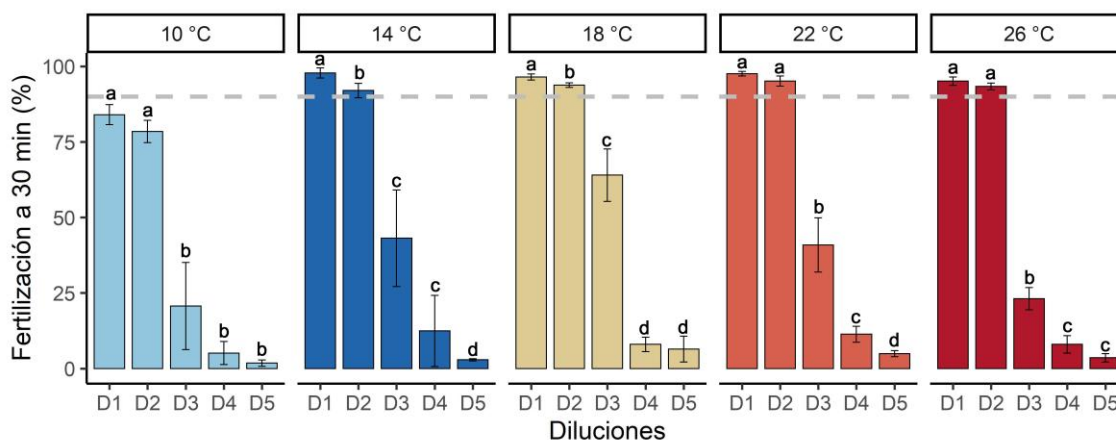


Figura 10. Promedios de porcentaje de fertilización en el experimento 1.b para cada dilución de cada tratamiento. Las barras representan desviación estándar, la línea punteada indica el éxito de fertilización a 90% antes y después del experimento y, para cada tratamiento, las letras diferentes indican diferencias significativas entre las diluciones.

El promedio de D2 para 22 °C ($95.11 \pm 1.68 \%$) fue igual o superior a los promedios de D1 para 26 y 10 °C, que corresponden a los tratamientos extremos del rango de temperatura. Al igual que con D1, los promedios de D2 fueron altos para todos los tratamientos ($> 92 \%$) excepto a 10 °C. Así, para D1 y D2 de todos los tratamientos excepto de 10 °C, los porcentajes de fertilización superaron en las pruebas de viabilidad (90 %), el valor obtenido antes y después del experimento.

Los tratamientos extremos, 10 y 26 °C, tuvieron los porcentajes más bajos de fertilización en la D3 ($20.67 \pm 14.44 \%$ y $23.11 \pm 3.67 \%$, respectivamente).

Especialmente, el tratamiento de 26 °C presentó una disminución considerable del 70.22 % (de 93.33 % a 23.11 %). La menor disminución de D2 a D3 se obtuvo a 18 °C, que también obtuvo el porcentaje de fertilización más alto en D3 (64 ± 8.7 %). Este promedio de fertilización a D3 fue el único en superar el éxito de 50 % en los tres experimentos.

Los porcentajes de fertilización en D4 fueron bajos (< 12.5 %) para todos los tratamientos, especialmente en el de 10 °C (5.11 ± 3.79 %). El más alto se obtuvo a 14 °C y fue de 12.44 ± 11.78 %, con una alta variabilidad. En D5, todos los porcentajes fueron bajos, inferiores al 6.5 % de éxito. El porcentaje más bajo fue de 1.78 ± 1.02 %, perteneciente al tratamiento extremo de 10 °C.

La prueba general de PerMANOVA presentó significancia en las diferencias de factores temperatura (pseudo-F: 15.865, valor de $p < 0.05$) y dilución (pseudo-F: 806.23, valor de $p < 0.05$). Las diferencias entre la interacción de estos factores también fue significativa (pseudo-F: 15.865, valor de $p < 0.05$). La tabla completa de resultados se puede consultar en el anexo C.

Las pruebas por pares demostraron diferencias significativas entre D1 y D2 únicamente para los tratamientos de 14 y 18 °C. Para todos los tratamientos, el contraste entre D2 y D3 fue significativo, lo cual resalta la susceptibilidad de los gametos de este cruce a la proporción huevos y espermatozoides de 1:1,000. Entre D3 y D4, únicamente no se presentaron diferencias entre los tratamientos 10 y 14 °C; D3 presentó las variabilidades más altas de los tres experimentos en

todos los tratamientos excepto en el de 26 °C. La diferencia significativa entre D4 y D5 se tuvo solo en el tratamiento de 22 °C. En el anexo D se encuentran los resultados de las pruebas por pares.

Experimento 1.c

Para todas las diluciones, el tratamiento de 10 °C presentó los promedios más bajos de fertilización (Figura 11). El éxito de fertilización en la primera dilución superó el 90 % para los demás tratamientos, con el porcentaje más alto en la temperatura de 26 °C (96 ± 3.06 %). En D2, el mayor éxito se encontró en el tratamiento de 18 °C (86 ± 2.4 %).

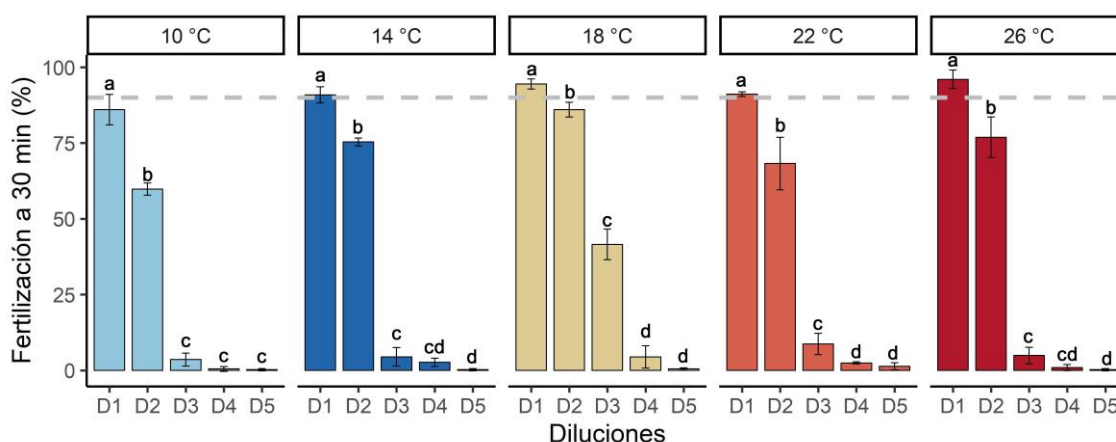


Figura 11. Promedios de porcentaje de fertilización en el experimento 1.c para cada dilución de cada tratamiento. Las barras representan desviación estándar, la línea punteada indica el éxito de fertilización a 90% antes y después del experimento y, para cada tratamiento, las letras diferentes indican diferencias significativas entre las diluciones.

Para D3, el porcentaje de fertilización fue más alto en el tratamiento de 18 °C, pero la disminución de D2 a D3 fue muy drástica para los otros tratamientos. El

tratamiento de 26 °C pasó de un éxito del 76.89 % a 4.89 % y el de 22 °C pasó de 68.22 % a 8.67 %. Esto significó reducciones del 72 % y 59.56 % respectivamente. A 14 °C, el éxito disminuyó de 75.33 % a 4.44 %, resultando en una amplia diferencia de 70.89 %. El promedio más bajo de éxito se obtuvo en el tratamiento de 10 °C, al pasar de 59.78 % a 3.56 %. Excluyendo el promedio de D3 para 18 °C, los demás tratamientos no superaron el 9 % de éxito de fertilización.

Los promedios tanto de D4 y D5 para todos los tratamientos fueron inferiores a 5%. En D5, solo el tratamiento de 22 °C superó el éxito de 1 % (1.33 ± 1.15 %). El resto estuvo en un rango de 0.44 % y 0.22 %. Los promedios de fertilización para D4 y D5 obtenidos en este experimento fueron los más bajos de los tres experimentos realizados.

Para la prueba general de PerMANOVA (anexo E), tanto la temperatura (pseudo-F: 47.086, valor de $p < 0.05$) como la dilución (pseudo-F: 2729, valor de $p < 0.05$) tuvieron un efecto significativo sobre las diferencias entre los tratamientos. La interacción entre estos factores (pseudo-F:16.1, valor de $p < 0.05$) también lo fue, por lo cual se procedió a realizar las pruebas por pares *a posteriori*.

Para todos los tratamientos, existió diferencia significativa entre la primera y segunda dilución, así como entre la segunda y tercera. D3 y D4 tuvieron diferencia significativa únicamente en los tratamientos de 18 y 22 °C, mientras que D4 y F5 fueron significativamente diferentes únicamente en el tratamiento de

14 °C. Los promedios de fertilización a partir de D3 fueron muy bajos, por lo que existen pocas diferencias por pares para los tratamientos en las diluciones finales. Los resultados se pueden revisar en el anexo F.

Experimentos 1.a, 1.b y 1.c

En general, los gametos de cada cruce presentaron respuestas diferentes ante los factores a los que fueron expuestos. Aun, todos demostraron una considerable disminución al pasar de D2 a D3.

Los porcentajes de fertilización más altos se presentaron en el experimento 1.a, que tuvo la densidad inicial de espermatozoides más baja de los tres experimentos. En el experimento 1.c se obtuvieron los promedios de fertilización más bajos, mientras que la densidad inicial de espermatozoides fue de 10.5×10^7 células m^{-1} , similar a la densidad del experimento 1.a. Para los tres experimentos, las densidades iniciales de espermatozoides más altas no indicaron un mayor éxito de fertilización.

Desarrollo embrionario

Temperaturas experimentales

Las temperaturas durante el experimento de desarrollo embrionario se mantuvieron estables para todos los tratamientos, excepto a 26 °C en que se

presentaron algunas elevaciones y tuvo el mayor valor de variación (Figura 12). A pesar de todo, la totalidad de los tratamientos estuvieron dentro del rango de temperatura objetivo.

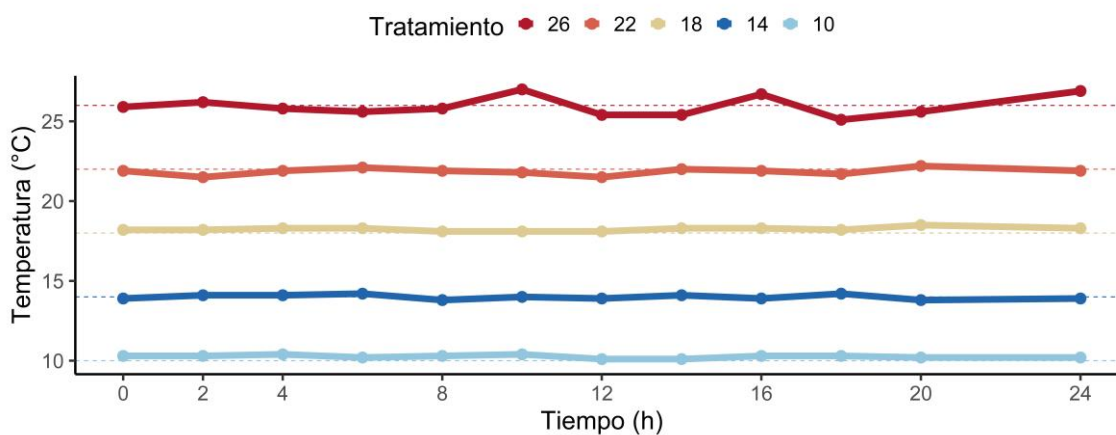


Figura 12. Mediciones de temperatura durante el experimento de desarrollo embrionario. Las líneas punteadas señalan el valor objetivo para cada tratamiento.

El tratamiento con temperatura más alta presentó la mayor variabilidad ($0.62\text{ }^{\circ}\text{C}$) y el valor fue más alto del objetivo, pero al considerar intervalos de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se mantiene dentro de un rango aceptable (Tabla III).

Tabla III. Promedios de temperatura obtenidos para los tratamientos en el experimento de desarrollo embrionario. DE: Desviación estándar.

Temperatura objetivo (°C)	Promedio $\pm$ DE (°C)
10	10.3 $\pm$ 0.10
14	14.0 $\pm$ 0.14
18	18.2 $\pm$ 0.12
22	21.9 $\pm$ 0.21
26	26.7 $\pm$ 0.62

Proporción de estadios embrionarios

En los tratamientos entre 14 y 26 °C, se presentaron la mayoría de estadios embrionarios descritos (Figura 13). En el tratamiento de 10 °C, también se presentaron más de la mitad de estas etapas, pero la embriogénesis no alcanzó la etapa de blástula al final del experimento, 24 hpf. La tasa de desarrollo fue mucho más lenta que para el resto de las temperaturas experimentadas.

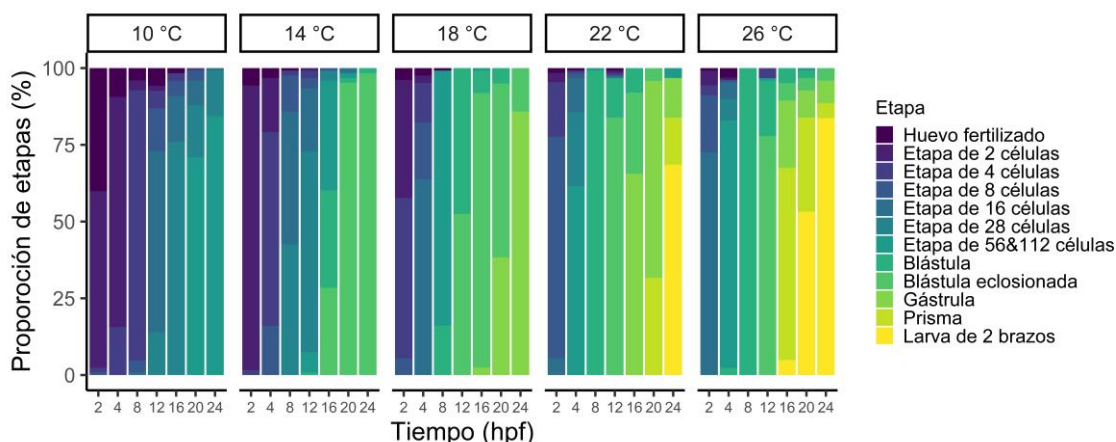


Figura 13. Proporción de estadios embrionarios en cada tratamiento durante el experimento.

En el tratamiento de 10 °C, a las 2 hpf, se presentó 57 % de individuos en etapa de dos células y solo 1.6 % estuvo en etapa de 4 células. A las 24 hpf, el 84 % de individuos llegó al estadio denominado como 56 y 112 células. Ningún embrión analizado en este tratamiento alcanzó la etapa de blástula.

A 14 °C, la etapa más avanzada fue la blástula eclosionada. A las 20 y 24 hpf, más del 90 % de organismos alcanzó la etapa de blástula eclosionada. En estas cuatro horas de diferencia, existió un leve aumento en el porcentaje de estadio en blástula.

Entre las 12 y 20 hpf, la mayoría de embriones a 18 °C se mantuvo en estadio de blástula eclosionada, especialmente entre 16 y 24 hpf en que más del 80 % estuvo en esta etapa. A las 24 hpf, el estadio más avanzado fue la gástrula. Transcurrido este periodo, el 85 % de organismos evaluados alcanzó la gastrulación.

Las etapas de desarrollo embrionario más avanzadas se encontraron en los tratamientos de 22 y 26 °C, presentando hasta larva de dos brazos. Para la temperatura más alta, este estadio se alcanzó a las 16 horas, mientras que hasta las 24 horas, el 69% de individuos a 22 °C se desarrolló hasta este estadio. Ninguno de los demás tratamientos presentó larvas de dos brazos durante el experimento.

Al evaluar el efecto de la temperatura en el ANOSIM de dos vías, se obtuvo un valor de R de 0.948 con un valor de significancia de 0.02% (o un valor de p de 0.0002). Esto indica que tuvo un efecto significativo en las proporciones de estadios embrionarios, mostrando que los grupos fueron diferentes para todos los tratamientos.

Las pruebas por pares (Anexo G) señalan una notoria diferencia entre todos los tratamientos. El caso de más similitud se presentó al comparar los tratamientos de 22 y 26 °C ($R = 0.614$); aunque el valor obtenido fue alto, fue el más bajo obtenido en las pruebas. Los demás pares de tratamientos presentaron valores de R superiores a 0.95, señalando que la composición de los grupos es muy diferente entre cada tratamiento.

El análisis con el tiempo como factor también señaló diferencias significativas dentro y entre los estadios embrionarios de los tratamientos ($R = 0.97$, $p < 0.5\%$), con un alto valor de diferencia. Las pruebas por pares (Anexo H) señalaron una

mayor similitud al comparar las 20 y 24 hpf. Para el resto de comparaciones por pares, los resultados señalaron considerables diferencias ($R > 0.95$).

Anormalidades en embriogénesis

Para cada hora, las temperaturas 10 y 26 °C presentaron los promedios más altos de anomalías, especialmente en la más alta (Figura 14). En este tratamiento, a las 20 y 24 hpf, el 41.67 y 42.5 % de embriones analizados presentaron anomalías. En el resto de tratamientos, los porcentajes no sobrepasaron el 13.5 %. Entre 14, 18 y 22 °C, los porcentajes fueron similares, pero la menor proporción de anomalías se encontró a 18 °C, sin superar 6.67 % durante el experimento.

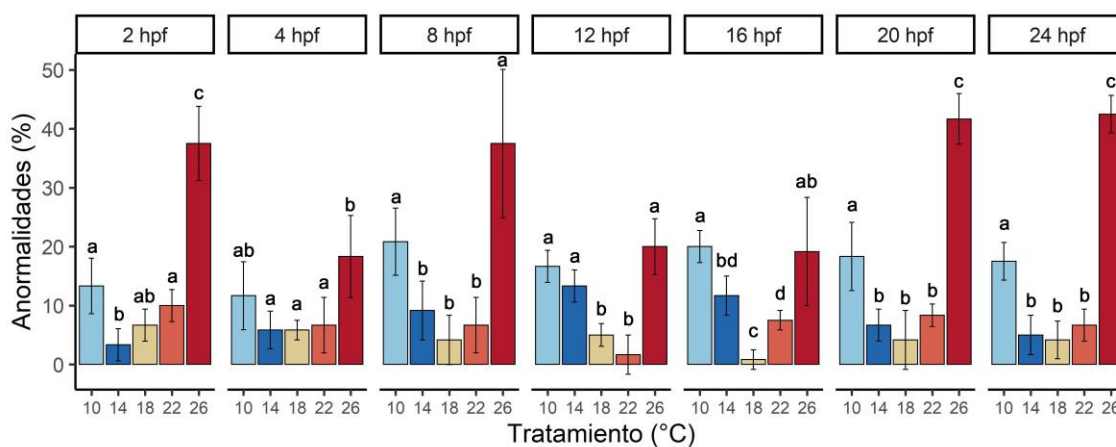


Figura 14. Promedios de porcentajes de anomalías en la embriogénesis de *Arbacia stellata* para los tratamientos de temperatura. Las barras indican desviación estándar. Para cada hora, las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos para cada hora.

El efecto de la temperatura (pseudo-F = 154.62, valor de $p < 0.05$) y del tiempo (pseudo-F = 5.48, valor de $p < 0.05$) fueron significativos, así como su interacción

(pseudo-F = 6.06, valor de $p < 0.05$), sobre la cantidad de malformaciones en la embriogénesis (pseudo-F = 60,584, valor de $p < 0.05$). Los resultados de la prueba general de PerMANOVA se pueden encontrar en el Anexo I.

El tratamiento de 26 °C presentó diferencias significativas al compararse con la mayoría de las temperaturas durante el experimento. En cuatro de las siete horas evaluadas, no presentó diferencias significativas con el otro tratamiento extremo, 10 °C. Comparado con el tratamiento de 14 °C, también hubo resultados similares, puesto que en tres de las siete horas, tampoco existieron diferencias significativas. Para el resto de tratamientos en todo el experimento, sí existieron diferencias significativas.

En las comparaciones entre 14, 18 y 22 °C, la mayoría no presentó diferencias significativas, especialmente a 4, 8, 20 y 24 hpf. Solo a 16 hpf, los tratamientos fueron diferentes entre sí. En las demás horas, al menos dos de los tres tratamientos no fueron significativamente diferentes. Los resultados están disponibles en el Anexo J.

Desarrollo larval

Temperaturas experimentales

Los tratamientos con temperatura más altas fueron los que presentaron mayor variabilidad durante el experimento (Figura 15). El promedio obtenido en estos

tratamientos fue más alto que el valor inicial establecido, pero se mantuvo dentro del rango objetivo para cada tratamiento. Las variaciones diurnas de temperatura se reflejan en los tratamientos de 18, 14 y 10 °C (Figura 14).

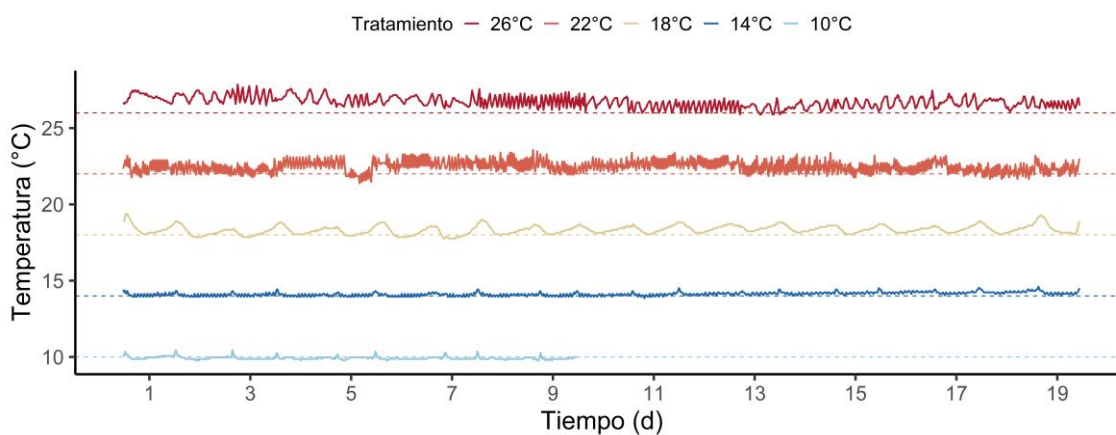


Figura 15. Mediciones de temperatura de los sistemas de baños maría para los tratamientos de cultivos larvales. Las líneas punteadas señalan el valor objetivo para cada tratamiento.

En la tabla IV, se señalan los promedios y desviaciones estándar obtenidos durante el experimento. La desviación estándar más alta se presentó en el tratamiento de 10 °C, con 0.97 °C de variabilidad.

Tabla IV. Promedios de temperatura obtenidos para los tratamientos en el experimento de desarrollo larval. DE: Desviación estándar.

Temperatura objetivo (°C)	Promedio $\pm$ DE (°C)
10	9.92 $\pm$ 0.97
14	14.1 $\pm$ 0.12
18	18.3 $\pm$ 0.28
22	22.5 $\pm$ 0.41
26	26.7 $\pm$ 0.36

Sobrevivencia y densidad de larvas

Al final del experimento, la sobrevivencia de larvas fue mayor para el tratamiento de 18 °C (Figura 16). Existió muy alta mortalidad a 10 °C (> 99 %), por lo que este tratamiento se excluyó del análisis estadístico. Para las otras temperaturas, la sobrevivencia fue similar. A 14 y 22 °C, sobrevivieron 14.15 y 15.12 % de larvas, mientras que 10.38 % sobrevivieron a 26 °C.

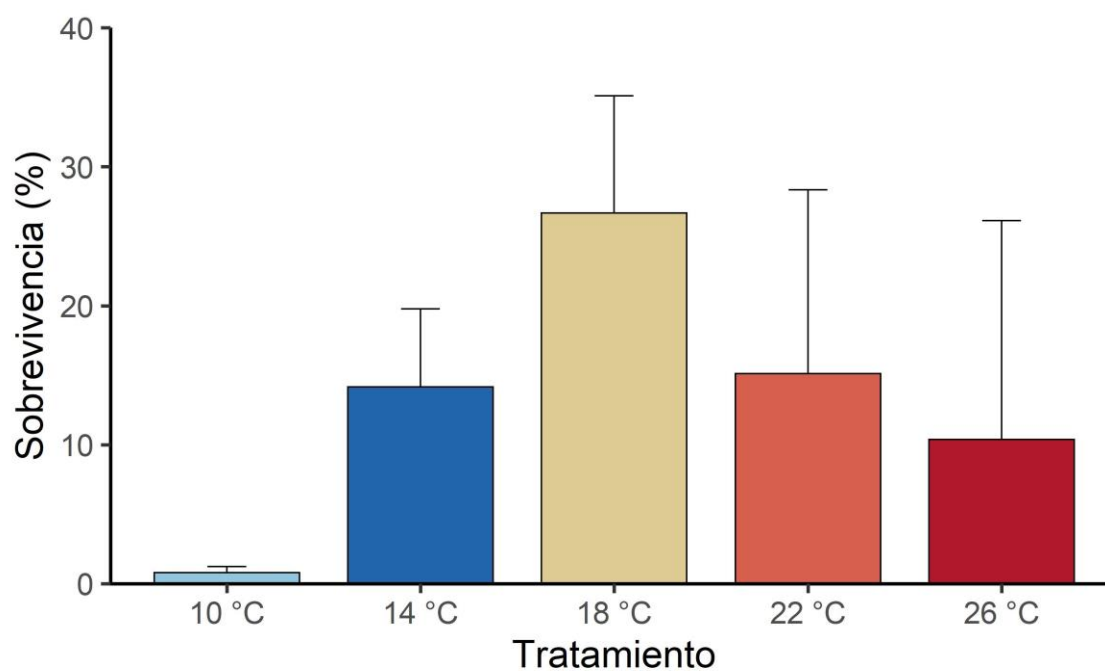


Figura 16. Promedio de sobrevivencia de larvas para los tratamientos experimentales. Las barras representan la desviación estándar.

Después del primer día de iniciado el experimento, se registró una alta mortalidad, especialmente en el tratamiento a 10 °C. Posteriormente, los tratamientos presentaron disminuciones similares en la densidad, con variaciones altas a 22 y 26 °C (Figura 17).

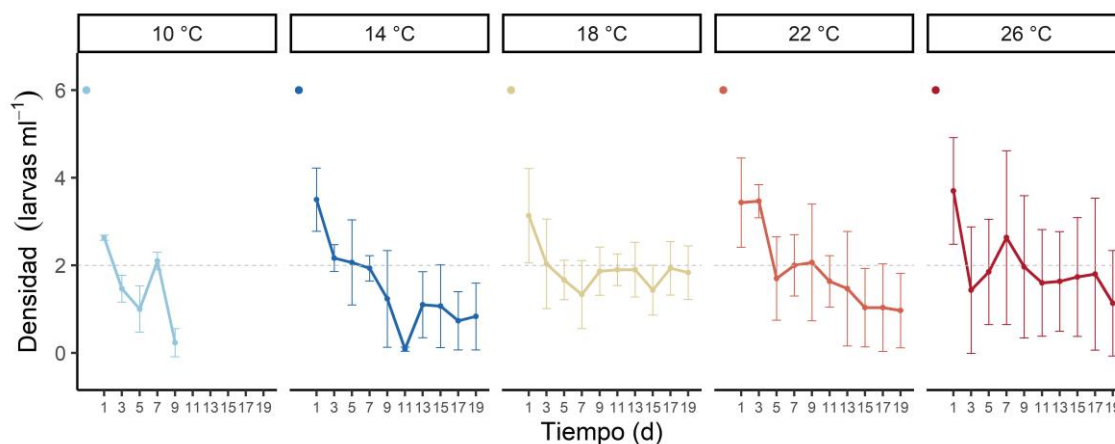


Figura 17. Promedio de densidad de larvas para cada día durante el experimento de desarrollo larval. Las barras representan desviación estándar. El punto señala la densidad inicial de 6 larvas mL⁻¹.

Mediante el PerMANOVA, se encontró que solo el tiempo fue significativo (pseudo-F = 4.44, valor de P < 0.05). Por tanto, la temperatura (pseudo-F = 0.84, valor de P = 0.48) y la interacción entre el tiempo y el tratamiento (pseudo-F = 0.57 valor de P = 0.95) no influyeron sobre las densidades larvales durante el experimento. Los resultados completos se muestran en el Anexo K.

Proporción de estadios larvales

Los estadios más avanzados se alcanzaron más rápido en los cultivos de temperatura más alta. En todos los tratamientos excepto a 14 °C, las larvas alcanzaron el estadio competente (Figura 18).

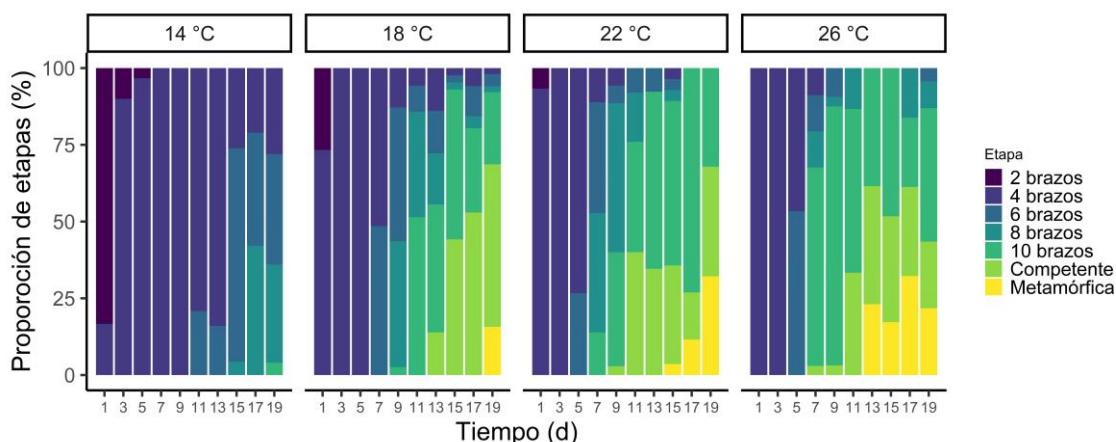


Figura 18. Proporción de estadios larvales en cada tratamiento durante el experimento.

A 14 °C, la etapa de 4 brazos predominó sobre las demás estadios desde 3 días a 13 días. Ninguna de las larvas analizadas para este tratamiento mostró características de competencia, como la formación del rudimento. La etapa más avanzada fue la de 10 brazos a 19 días, con 4 % de larvas alcanzando este estadio de desarrollo.

En los tratamientos de 18, 22 y 26 °C, se presentaron todos los estadios larvales, alcanzando la etapa metamórfica. En el tratamiento de 26 °C y a los 14 días, se observaron las primeras larvas metamorfoseadas, pero solo siete larvas lograron llegar a esta etapa en el experimento y únicamente a esta temperatura.

El ANOSIM evidenció diferencias significativas entre los grupos, tanto en temperatura ($R = 0.60$; nivel de significancia = 0.02%) como en tiempo ($R = 0.70$; nivel de significancia = 0.02%). Las diferencias fueron moderadamente altas, pero no lo suficientemente fuertes como para señalar que todos los grupos fueran diferentes entre sí.

Al estudiar las comparaciones por pares (Anexo L), los tratamientos a las temperaturas de 22 y 26 °C no presentaron diferencias significativas, pero los demás pares de tratamientos sí fueron significativamente diferentes. La menor disimilitud se presentó en los tratamientos de 18 y 22 °C ($R = 0.49$), lo cual indica que son Las diferencias significativas que presentaron mayor traslape se dieron en los tratamientos de 18 y 22 °C.

Respecto a las comparaciones por pares durante los días del experimento (Anexo M), entre 11 y 19 días hubo solo una diferencia significativa (11 y 17 días), indicando que la estructura de estadios larvales entre los tratamientos fue similar en este periodo de tiempo.

Mediciones morfométricas

Durante el experimento, las mediciones de longitud total (LT) alcanzaron mayores valores para las temperaturas de 18 y 26 °C (Figura 19). En los tratamientos de 22 y 26 °C, fue evidente una distribución de datos en forma de campana. Primero hay crecimiento y luego las mediciones decrecen. A 18 °C se presentó una tendencia similar, pero menos evidente.

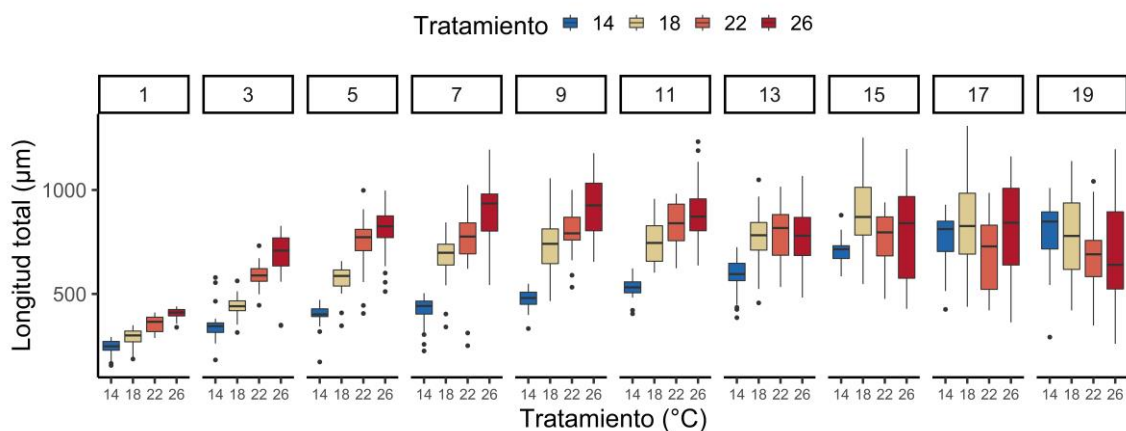


Figura 19. Diagrama de cajas para mediciones de longitud total durante el experimento de desarrollo larval. La parte inferior de la caja señala el percentil 25, la línea en el centro señala la mediana, la parte superior de la caja señala el percentil 75 y las líneas representan el $1.5 \times$ rango intercuartil inferior y superior. Los valores mayores o menores a esos son sobresalientes y están representados por los puntos negros.

Tanto la temperatura como el tiempo tuvieron un efecto sobre el crecimiento en LT de las larvas (respectivamente, pseudo-F = 151.98, valor de $p < 0.05$; pseudo-F = , valor de $p < 0.05$). La interacción entre estos factores también fue significativa (pseudo-F = 12.214, valor de $p < 0.05$). Los resultados completos de la prueba se presentan en el Anexo N.

Las pruebas por pares demostraron diferencias significativas entre todos los tratamientos de 1 a 11 días, con excepción de los tratamientos 22 y 26 °C a 5 y 11 días. Posteriormente, no existió un patrón definido sobre las diferencias. A 17 días, solo se encontró diferencia significativa entre 18 y 22 °C, mientras que a 19 días, no hubo diferencias entre todos los tratamientos. En el anexo O, se encuentran los resultados de todas las pruebas por pares.

Para la longitud media del cuerpo (LMC), las mediciones con valores mayores se registraron en el tratamiento de temperatura más alta (Figura 20). El crecimiento para todos los tratamientos fue lineal.

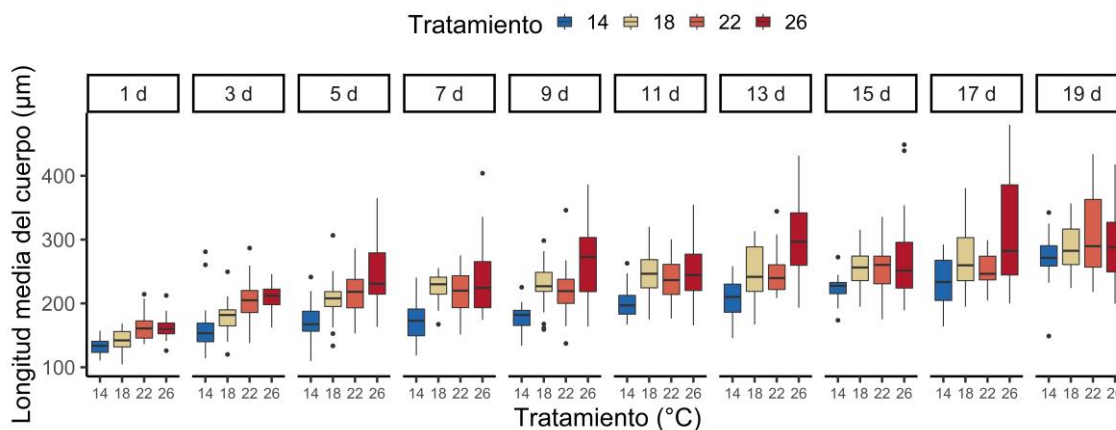


Figura 20. Diagrama de cajas para mediciones de longitud media del cuerpo durante el experimento de desarrollo larval. La parte inferior de la caja señala el percentil 25, la línea en el centro señala la mediana, la parte superior de la caja señala el percentil 75 y las líneas representan el $1.5 \times$ rango intercuartil inferior y superior. Los valores mayores o menores a esos son sobresalientes y están representados por los puntos negros.

Los resultados del PerMANOVA demostraron que tanto la temperatura como el tiempo tuvieron un efecto sobre el crecimiento (respectivamente, pseudo-F = 96.269, valor de $p < 0.05$; pseudo-F = 104.42, valor de $p < 0.05$), así como la interacción de estos factores (pseudo-F = 2.7373, valor de $p < 0.05$). En el Anexo P se encuentran los resultados completos de la prueba.

En las pruebas por pares (Anexo Q), se evidenció que los tratamientos sí presentaron diferencias significativas en los días 1, 3 y 5, excepto 22 °C que no presentó diferencias en los días 1 y 3 al compararse con el tratamiento de 26 °C,

ni con 18 °C en el día 5. En el caso de 14 y 18 °C, únicamente en el día 17 las diferencias no fueron significativas. Para los tratamientos de 18 y 22 °C, desde el día 9 hasta el 19, las diferencias no fueron significativas.

Respecto a la LPO, el crecimiento de 14 °C durante el experimento fue lineal, pero los demás tratamientos mostraron un crecimiento y decremento a partir de cierto día, específico para cada temperatura (Figura 21). A partir del día 9, el tratamiento de 26 °C presentó valores más bajos, similares a los presentados en el día 5. A partir del día 11, el de 22 °C presentó una tendencia similar, así como el de 18 °C a partir del día 15.

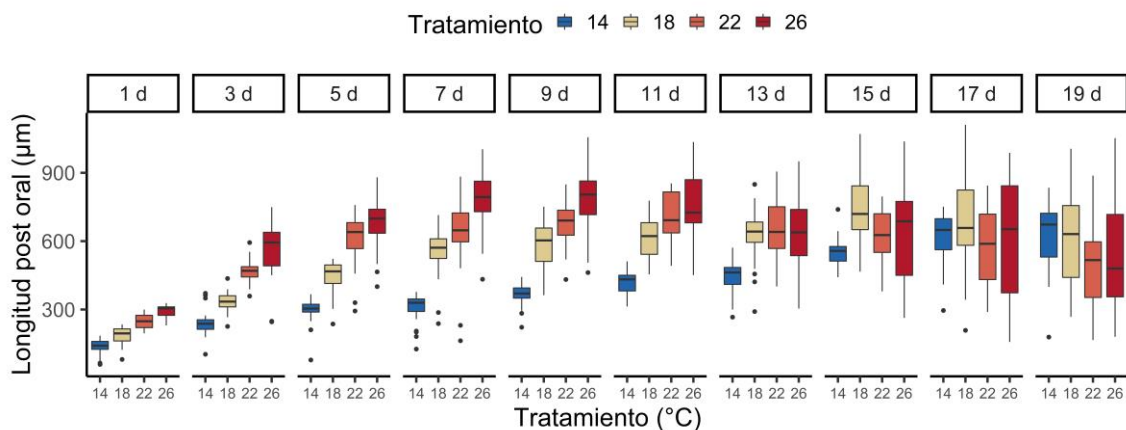


Figura 21. Diagrama de cajas para mediciones de longitud post oral durante el experimento de desarrollo larval. La parte inferior de la caja señala el percentil 25, la línea en el centro señala la mediana, la parte superior de la caja señala el percentil 75 y las líneas representan el $1.5 \times$ rango intercuartil inferior y superior. Los valores mayores o menores a esos son sobresalientes y están representados por los puntos negros en la figura.

En la prueba principal del PerMANOVA (Anexo R), se determinó que tanto el tratamiento como el tiempo y interacción entre estos factores, tuvieron un efecto significativo sobre la LPO, (pseudo-F = 143.79, valor de $p < 0.05$; pseudo-F = 121.55, valor de $p < 0.05$; pseudo-F = 12.338, valor de $p < 0.05$).

Las pruebas por pares (Anexo S) resultaron en diferencias significativas entre todos los tratamientos desde el día 1 hasta el 9. En los días 17 y 19, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

Las mediciones de la proporción LPO:LMC en los tratamientos de 18, 22 y 26 °C presentó una curva de campana con el tiempo (Figura 22). A 14 °C, las mediciones presentaron una tendencia lineal. Los valores más altos de esta proporción se obtuvieron en el tratamiento de 26 °C.

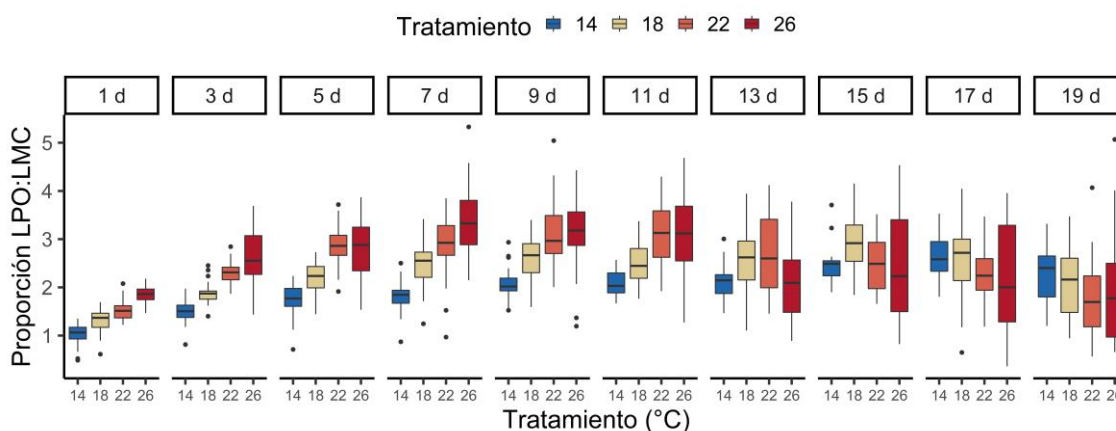


Figura 22. Diagrama de cajas para mediciones de proporción de longitudes post oral y media del cuerpo durante el experimento de desarrollo larval. La parte inferior de la caja señala el percentil 25, la línea en el centro señala la mediana, la parte superior de la caja señala el percentil 75 y las líneas representan el $1.5 \times$ rango intercuartil inferior y superior. Los valores mayores o menores a esos son sobresalientes y están representados por los puntos negros en la figura.

Respecto a los resultados del PerMANOVA, la temperatura (pseudo-F = 48.125, valor de $p < 0.05$), el tiempo (pseudo-F = 49.612, valor de $p < 0.05$) y la interacción entre estos factores (pseudo-F = 8.1, valor de $p < 0.05$) tuvieron un efecto significativo en la proporción LPO:LMC (Anexo T).

Las pruebas por pares demostraron diferencias significativas entre todos los tratamientos desde el día 1 hasta el 11, excepto entre 22 y 26 °C en los días 5, 9 y 11 (Anexo U). Desde el día 13 hasta el 19, las diferencias significativas entre los tratamientos disminuyeron. En el caso del día 17, las diferencias no fueron significativamente diferentes entre los tratamientos, mientras que en el día 19, únicamente los tratamiento de 14 y 22 °C presentaron significancia en sus diferencias.

El volumen del estómago presentó un crecimiento lineal durante el experimento en todos los tratamientos (Figura 23). Los valores más altos obtenidos durante el experimento pertenecieron al tratamiento de temperatura más alta.

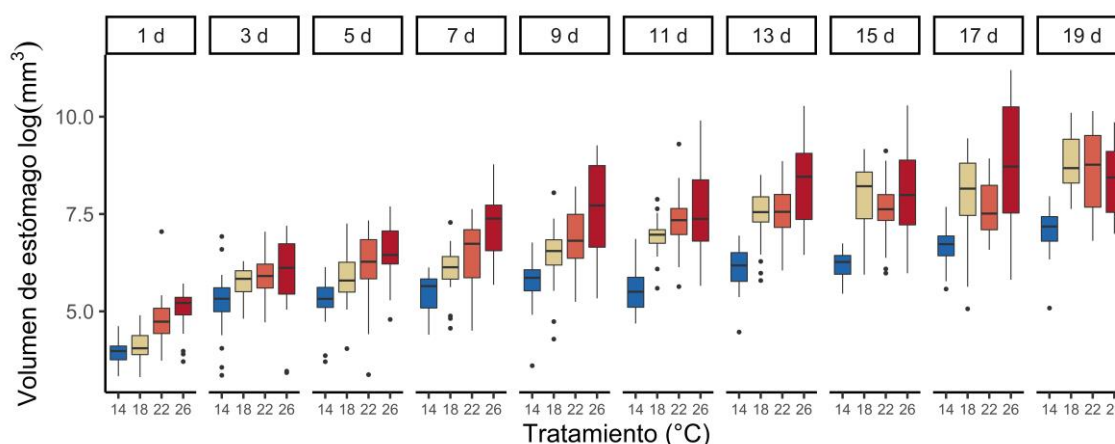


Figura 23. Diagrama de cajas para mediciones transformadas por logaritmo de base 10 del estómago durante el experimento de desarrollo larval. La parte inferior de la caja señala el percentil 25, la línea en el centro señala la mediana, la parte superior de la caja señala el percentil 75 y las líneas representan el $1.5 \times$ rango intercuartil inferior y superior. Los valores mayores o menores a esos son sobresalientes y están representados por los puntos negros en la figura.

Los resultados del PerMANOVA evidenciaron un efecto significativo de la temperatura (pseudo-F = 46.044, valor de $p < 0.05$), el tiempo (pseudo-F = 30.805, valor de $p < 0.05$) y su interacción (pseudo-F = 7.3705, valor de $p < 0.05$) sobre el desarrollo del VE (Anexo V).

En las pruebas por pares (Anexo W), el tratamiento de 22 °C no presentó diferencias con 26 °C en los días 1, 3 y 5; en el día 3, tampoco las presentó al compararse con esta temperatura ni con 18 °C. Las comparaciones de 14 °C con el resto de tratamientos presentó diferencias significativas en todos los días.

En general, respecto a las mediciones de morfométricas, los valores de VE como LMC presentaron un crecimiento lineal, mientras que las demás variables

presentan una distribución de campana en el crecimiento. Durante este experimento y a 14 °C, esto no fue evidente para las larvas.

DISCUSIÓN

El presente estudio es el primero en que se exploran las respuestas de tolerancia térmica de *Arbacia stellata*, durante la fertilización, embriogénesis y desarrollo larval, estudiando posibles implicaciones biogeográficas en la expansión de su hábitat. Nuestros resultados señalan una preferencia por las temperaturas de 18 y 22 °C, que no son ajenas al rango térmico que experimentan a lo largo del año pero se acercan a la parte más caliente de la termotolerancia de la especie, lo que indica que es una especie termófila (Pérez-Portela et al., 2020).

Éxito de fertilización

Las diluciones con mayor densidad de espermatozoides presentaron mayor éxito de fertilización, lo que coincide con resultados de experimentos similares (Byrne, Soars, Selvakumaraswamy, et al., 2010; Lenz et al., 2019; Levitan et al., 1991; Sherman et al., 2015). Se necesita una alta proporción de huevos y espermatozoides para alcanzar alto éxito de fertilización (Vogel et al., 1982), aunque esto sucede en condiciones experimentales y no necesariamente como ocurre en la columna de agua en el mar.

En este experimento, no se evaluó la polispermia, que es cuando más de un espermatozoide fertiliza un huevo. Independientemente de la temperatura, algunos cigotos de las diluciones con mayor cantidad de espermatozoides podrían haber presentado polispermia, lo cual afectaría el desarrollo y terminaría en la muerte del embrión (Kosman & Levitan, 2014; Levitan et al., 2007).

El factor más importante en la fertilización es el reconocimiento de gametos mediante el sistema receptor de la proteína *bindin* de espermatozoide y huevo (Levitan & Ferrell, 2006; Palumbi, 1999, 2009; Zigler et al., 2005), descrito por Vacquier y Moy (1977). Debido a esto, altas proporciones de espermatozoides y huevos permiten que haya más posibilidad de fertilización por la compatibilidad de gametos, aunque puede existir cierta selectibilidad que varía de acuerdo con condiciones de limitación o abundancia de espermatozoides (Sherman et al., 2015; Zigler et al., 2008).

En el medio, es fundamental considerar los factores biológicos y ambientales que afectan la tasa de fertilización. El éxito de fertilización está relacionado también con la densidad poblacional que desova, con la sincronía de desove y la cercanía entre machos y hembras, así como con la viscosidad del agua y turbulencia (Levitan & Petersen, 1995).

Cuando no existe limitación de espermatozoides, el éxito de fertilización no parece verse afectado por la temperatura. A partir de D3, existió una preferencia por 18 °C en dos de los tres experimentos, reflejado en mayores promedios en el

éxito de fertilización. Una especie puede presentar un rango amplio de temperatura para fertilización (Byrne, Soars, Ho, et al., 2010), pero este también se puede ver afectado por la disponibilidad de espermatozoides en la columna de agua (Sherman et al., 2015).

Los estresores ambientales también tienen efectos precigóticos en la fertilización. El huevo sin fertilizar puede presentar mecanismos que le confieran protección ante la temperatura, como las chaperonas o de choque térmico (Byrne, 2012; Hamdoun & Epel, 2007), mientras que el consumo de oxígeno de espermatozoides es más alto en densidades bajas que en altas, por efectos del dióxido de carbono producto de la respiración en el medio (Chia & Blickell, 1983).

Los gametos de diferentes especies pueden demostrar tolerancia ante diferentes rangos de temperaturas. Por ejemplo, los gametos de *Tripneustes gratilla* y *Echinometra mathaei* presentaron tolerancia a bajas y altas temperaturas, respectivamente (Rahman et al., 2009). Para *Echinometra lucunter*, Sewell y Young (1999) reportan que el rango térmico en que existió éxito de fertilización fue amplio, de 12 a 37 °C con preferencia a temperaturas sobre 15 °C, mientras que Andronikov (1975) menciona que *Strongylocentrotus droebachiensis* posee espermatozoides que prefieren temperaturas bajas. Mita y colaboradores (1984) demostraron que dos especies de erizo de mar pueden tener diferencias en cuanto a la extensión del rango térmico. En *Anthocardis crassispina* y *Hemicentrotus pulcherrimus*, se describieron rangos de 15 a 30 °C y de 0 a 30 °C, respectivamente.

Hasta cierto punto, la temperatura puede facilitar la fertilización por cambios físicos en el medio y biológicos en los gametos. En temperaturas altas, disminuye la viscosidad del agua, lo cual facilita el movimiento de espermatozoides. Además, el calentamiento promueve el metabolismo, la reacción acrosómica y la velocidad de espermatozoides (Byrne, 2011, 2012), pero se puede especular que una combinación de altas densidades y temperaturas óptimas pueden provocar un ambiente que permita la polispermia, debido a que esta se da por la incapacidad del huevo de generar barreras a la velocidad requerida para evitar la fecundación por más de un espermatozoide (Levitan et al., 2007). Styan (1998) menciona que la importancia de evitar polispermia puede ser igual que la de contar con suficiente disponibilidad de gametos para la fertilización.

En los experimentos realizados por Rahman y colaboradores (2009), la viabilidad de los espermatozoides fue más baja en las temperaturas más altas. En cuanto a temperaturas bajas, es posible que los cambios en las propiedades físicas del agua y en el metabolismo de los espermatozoides hayan sido perjudiciales y repercutieran en tasas de fertilización bajas en el tratamiento de 10 °C.

En el experimento realizado en el presente proyecto, existieron diferencias en el éxito fertilización entre los pares progenitores, similar a los resultados reportados por Smith y colaboradores (2019) para los erizos de mar *Lytechinus pictus* y *Heliocidaris erythrogramma*, por Sherman y colaboradores (2015) para el mejillón *Mytilus galloprovincialis* y Foo y colaboradores (2014) para el erizo de mar *Pseudoboletia indiana*. Estas diferencias pueden explicarse por la

interacción entre huevos y espermatozoides y al reconocimiento de la proteína *bindin* (Levitan & Ferrell, 2006; Palumbi, 1999, 2009; Vacquier & Moy, 1977; Zigler et al., 2005).

Los efectos adversos de los estresores ambientales pueden verse disminuidos por el aumento en la disponibilidad de genotipos diferentes de los gametos, que permiten a los huevos seleccionar espermatozoides que presenten mejor compatibilidad (Byrne & Przeslawski, 2013). Esto se basó en experimentos realizados con cruces de varios machos y hembras resultaron mostrar mayor resiliencia ante las variaciones ambientales (Byrne, 2012; Byrne & Przeslawski, 2013).

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente investigación, la interacción entre temperatura y densidades de espermatozoides fue notoria a partir de D3. En las densidades más altas de espermatozoides, las diferencias en temperaturas no implicaron una tasa de fertilización baja, pero a partir de D3, los promedios de fertilización se vieron afectados por la temperatura, mostrando una preferencia por 22 °C en el experimento 1.a y por 18 °C en los otros dos experimentos.

En el caso de *Lytechinus variegatus*, Lenz y colaboradores (2019) encontraron que la temperatura tuvo un efecto negativo en la fertilización en densidades bajas de espermatozoides, mientras que Mejía Gutiérrez y colaboradores (2019) encontraron una disminución significativa en el éxito de fertilización de *Toxopneustes roseus* al aumentar la temperatura 4 °C.

Para comprender mejor la respuesta de esta población de *Arbacia stellata* en su límite norte de distribución, es necesario aplicar más experimentos en que se evalúen los efectos de la temperatura sobre los factores precigóticos: gametos, su metabolismo, sus estructuras celulares y sus respuestas moleculares ante diferentes estresores.

Desarrollo embrionario

Proporción de estadios embrionarios

Los embriones cultivados en temperaturas más altas alcanzaron etapas avanzadas en menor tiempo, mientras que el desarrollo tardó más para los tratamientos de 14 y 10 °C. Lo anterior concuerda con lo esperado, ya que se sabe la temperatura tiene un fuerte efecto en la fisiología general de los organismos, incluyendo el desarrollo embrionario, de modo las altas temperaturas resultan en tiempos de desarrollo más cortos (Hoegh-Guldberg & Pearse, 1995; Reitzel et al., 2004; Yamada & Mihashi, 1998).

Otros equinoideos han presentado tiempos de desarrollo más cortos a altas temperaturas, incluso en regiones polares. Durante un estudio sobre el desarrollo embrionario de *Sterechinus neumayeri*, se cultivaron embriones en dos tratamientos y los resultados demostraron que los individuos cultivados en tratamientos de temperatura más alta (de -0.5 a 0.5 °C) alcanzaron la etapa de prisma en un menor tiempo (Bosch et al., 1987). Por su parte, en un estudio

posterior, Ericson y colaboradores (2012) encontraron efectos negativos en el desarrollo de esta misma especie, pero en tratamientos de 1.5 y 3 °C, posiblemente fuera del rango térmico de tolerancia de la especie.

En el estudio realizado por Díaz-Martínez (2019) con *Arbacia stellata*, se presentó una tasa de desarrollo similar a la de los tratamientos de 22 y 26°C realizados en el presente estudio. Para *A. lixula*, García y colaboradores (2018) demostraron que el desarrollo alcanzó estadios más cercanos a las etapas finales de la embriogénesis en los tratamientos de temperatura más alta, mientras que en estudios sobre *A. dufresnii*, se describió el mismo comportamiento en la tasa de desarrollo, en que se alcanzaron etapas más avanzadas en el tratamiento de temperatura más alta (Fernández et al., 2021).

Anormalidades en embriogénesis

Con los resultados obtenidos en esta investigación sobre las proporciones de estadios embrionarios en el desarrollo, se entendería que la embriogénesis se ve beneficiada por las temperaturas alta. Sin embargo, al analizar las anomalías presentes en los tratamientos, se demostró un efecto significativo de la temperatura, tanto alta como baja, sobre la embriogénesis.

De acuerdo a Byrne y colaboradores (2009), el aumento en la temperatura tuvo un efecto en la cantidad de anomalías durante el desarrollo embrionario de *Heliocidaris erythrogramma*. Por su parte, el calamar común *Loligo vulgaris* también presentó mayor proporción de anomalías en su desarrollo al ser

expuesto únicamente a temperaturas altas (Rosa et al., 2012) y también a temperaturas altas y variación de pH (Rosa et al., 2014).

En una investigación realizada por Lamare y colaboradores (2014), *Acanthaster planci* presentó anormalidades en la embriogénesis debido a la temperatura, pero también en temperaturas bajas y altas, fuera de su rango de tolerancia térmica. Lo mismo se encontró para *Arachnoides placenta* y de *Centrostephanus rodgersii* por parte de Hardy y colaboradores (2014). Las anormalidades no están relacionadas únicamente con el calentamiento, sino con la disminución en temperatura, lo que coincide con lo demostrado en el experimento realizado para el experimento de desarrollo embrionario del presente estudio.

Los mecanismos fisiológicos que resultan en divisiones celulares incompletas, en blastómeros de diferentes tamaños y en demás anormalidades solo pueden ser especulados para este estudio. Se recomienda continuar con una línea de investigación que busque respuestas sobre cómo la temperatura contribuye a que aumenten las anormalidades. El aumento de anormalidades fuera del rango de tolerancia térmica representa un límite para la colonización de la especie, puesto que el reclutamiento se ve disminuido.

Desarrollo larval

Sobrevivencia

Durante el desarrollo larval, la sobrevivencia fue baja en ambas extremas del rango térmico estudiado. La alta mortalidad observada en el tratamiento de 10 °C se puede atribuir a la falta de alimentación, puesto que la microalga con la que se alimentó a las larvas durante el experimento, se encontró en los fondos de los matraces de cultivo. Posiblemente, la especie de *Rhodomonas* que se utilizó para alimentar a las larvas, también presentó alta mortalidad ante las temperaturas bajas.

Aun, las larvas sobrevivieron durante cinco días del experimento. Esto se puede explicar por el periodo de alimentación endógena que tienen las larvas, que es un lapso de tiempo en que la larva planctotrófica puede subsistir con fuentes internas (de origen maternal) de nutrición (Byrne et al., 2008; McEdward, 1997; Reitzel et al., 2005), además de la posible ingestión de pequeñas cantidades de *Rhodomonas* durante el tiempo que permaneció en la columna de agua del recipiente de cultivo. De este modo, es posible que las larvas hayan tenido suficiente recursos energéticos, tanto endógenos como exógenos, para sobrevivir hasta ese momento.

En experimentos con organismos sometidos a rangos térmicos, seis especies demostraron alta mortalidad en las temperaturas más altas (Byrne et al., 2018), lo cual coincide con las mortalidades de 26 y 22 °C en este experimento,

especialmente a 26 °C. En el caso de *Arbacia lixula*, Wangensteen y colaboradores (2013) demostraron que un aumento de 16 a 19 °C fue significativamente positivo en la sobrevivencia, similar a lo encontrado para la misma especie por Privitera y colaboradores (2011).

Proporción de estadios larvales

Al igual que con el desarrollo embrionario, las etapas de desarrollo larval se vieron influenciadas por la temperatura; los cultivos en temperaturas más altas tardan menos en alcanzar etapas más avanzadas (Hardy et al., 2014; Privitera et al., 2011; Wangensteen et al., 2013). Es importante considerar que la alimentación también tiene un papel fundamental en el desarrollo de larvas planctotróficas (Herrera et al., 1996; Hoegh-Guldberg & Pearse, 1995), pero todos los tratamientos y réplicas se alimentaron con la misma microalga y en abundancia, sin limitaciones.

Para *A. stellata*, Díaz-Martínez (2019) reportó que el estadio de larva competente se alcanzó a los 19 días a 20 °C, aunque existieron variaciones de temperatura de hasta casi 4 °C durante el cultivo. Esto contrasta con los resultados obtenidos en este experimento para los diferentes tratamientos, puesto que en los tratamientos de 18, 22 y 26 °C, esta etapa se alcanzó a los 14, 10 y 8 días después de la fertilización respectivamente. Existen dos condiciones que pueden generar este contraste: la variación en la temperatura y la alimentación. En el experimento realizado para la presente investigación, se alimentó con el doble de

la cantidad de microalgas, lo cual pudo haber influenciado el desarrollo (Herrera et al., 1996; Hoegh-Guldberg & Pearse, 1995).

La importancia de terminar el periodo larval en corto tiempo radica en que el reclutamiento de juveniles para una población puede depender de la sobrevivencia de larvas que se asienten en un sustrato y alcancen la metamorfosis. En caso de verse reducidos los cohortes larvales, la eventual población se podría ver severamente afectada, con efectos sobre conectividad genética y demografía poblacional (Eckman, 1996; Uthicke et al., 2009).

En las etapas larvales de invertebrados marinos, la temperatura y la duración en la columna de agua presentan una alta correlación, siendo que a mayor temperatura, existen periodos más cortos (O'Connor et al., 2007; Reitzel et al., 2004; Thorson, 1950), siempre que exista disponibilidad de alimento para suplir las necesidades metabólicas (Hoegh-Guldberg & Pearse, 1995; Perricone & Collin, 2019). De este modo, puede resultar beneficioso estar menos tiempo en la columna de agua, puesto que para una larva planctotrófica, un periodo extenso aumenta las posibilidades de ser depredada (Love & Strathmann, 2018; O'Connor et al., 2007), además de que la disponibilidad de alimento es limitada (Metaxas, 2020).

El aumento de temperatura y, consecuentemente, la proporción de estadios más cercanos a la metamorfosis, pueden favorecer a las larvas de *A. stellata* para alcanzar un estadio competente y estar menos tiempo en la columna de agua.

Sin embargo, esta situación no se puede evaluar sin considerar los efectos encontrados de la temperatura en la sobrevivencia, mencionado anteriormente.

Mediciones morfométricas

El análisis de variables morfométricas demostró que la temperatura tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento. Los tratamientos de 18, 22 y 26 °C presentaron tamaños mayores, acompañados de desarrollos más acelerados.

En *Lytechinus variegatus*, la temperatura no tuvo un efecto significativo en variables morfométricas (Lenz et al., 2019), mientras que en *A. lixula*, los cambios en temperatura sí tuvieron un considerable efecto en el crecimiento (Wangensteen et al., 2013). Cohen-Rengifo y colaboradores (2013) encontraron que larvas de *Paracentrotus lividus* expuestas a 22.5 °C tuvieron un crecimiento mayor en las variables morfométricas que los tratamientos a 19 y 20.5 °C. En un corto rango, la temperatura resultó ser beneficiosa para los cultivos más calientes.

En el tratamiento de 26 °C y a los 15 días después de la fertilización, ocurrió la primera metamorfosis, pero solo siete larvas de todas las réplicas lograron llegar a esta etapa en el experimento. El número reducido de larvas que se metamorfosearon en el tratamiento de 26 °C observado en el presente estudio, es posible que responda a la falta de un sustrato adecuado que estimulara el asentamiento y la metamorfosis para otras larvas. En el experimento de Privitera y colaboradores (2011), *A. lixula* presentó una notable selectibilidad de sustrato

para alcanzar la metamorfosis, resultando en un éxito del 100% en larvas expuestas a la roca como sustrato para el asentamiento.

Tanto el VE como la LMC tuvieron un crecimiento lineal, mientras que las demás variables presentaron una distribución de campana en el crecimiento durante el experimento. Estas dos mediciones están en el cuerpo y se tomaron en donde está el rudimento juvenil, que funciona como el precursor de la postlarva que se formará. Por tanto, el crecimiento no disminuye, sino que se comporta de manera lineal. Respecto a las otras variables, el crecimiento presentó una distribución de campana, en que existe un crecimiento hasta cierto punto y luego las larvas decrecen. A 14 °C, no se vio este crecimiento porque el desarrollo fue más lento, por temperaturas bajas.

En un estudio realizado con *Tripneustes depressus* elaborado por Sonnenholzner-Varas y colaboradores (2018), el crecimiento de LT y de LMC presentó forma de campana, pero para *A. lixula*, el crecimiento fue lineal (Wangensteen et al., 2013). Para *Heliocidaris erythrogramma*, Soars y colaboradores (2009) exponen tendencias de crecimiento similares a las del presente estudio, con la diferencia de que no hay una disminución pero sí parecen alcanzar un punto donde no crecen más. En un estudio con *Tetrapyrgus niger*, también existió una distribución de campana en el crecimiento (Fuentes & Barros, 2000).

Respecto a la proporción de LPO:LMC, los valores más altos se presentaron en la temperatura más alta experimentada durante el presente estudio, estos valores eran de esperarse en larvas en las que existe un desfase entre crecimiento y consumo de energía (Herrera, 1998; Herrera et al., 1996). Lo anterior se expresa como plasticidad fenotípica y se reconoce en larvas que presentan estómagos más pequeños y brazos post orales más largos, con el fin de poder adquirir más alimento (McAlister & Miner, 2018; McEdward & Miner, 2007).

Lo anterior es una estrategia de riesgo, puesto que destinar energía al crecimiento de brazos implica una reducción en la capacidad de almacenar más alimento en el estómago, pero le permite aumentar la posibilidad de capturar alimento en condiciones de limitación (McAlister, 2007).

Implicaciones del calentamiento global en la población de *Arbacia stellata*

Los picos de desove más fuertes de *Arbacia stellata* se presentan durante el verano, otoño e inicios de invierno (Díaz-Martínez et al., 2019), coincidiendo con lo reportado por Harvey (1956) para *Arbacia punctulata*. Durante el verano, las temperaturas tienden a estar entre 18 y 20 °C sin anomalías de calentamiento (Oliva Méndez, 2018). Esto permite mantener poblaciones estables en la zona, pero no colonizar latitudes más altas. Si persistieran los eventos de calentamiento anormal, es posible que existan cambios en la

fenología, lo que significa que las fechas de desove podrían cambiar (Bhaud et al., 1995; Chan et al., 2018).

Andronikov (1975) propuso que la distribución geográfica de una especie está limitada por su rango térmico de desarrollo. Sewell y Young (1999) demostraron que los rangos de tolerancia térmica de una especie pueden ser más extensos que los que experimente en el medio e indicaron que posiblemente otros factores puedan estar limitando la distribución.

En caso de alcanzar termotolerancia a temperaturas más frías, se puede hipotetizar que *A. stellata* podría asentarse y reproducirse exitosamente en California, suponiendo que la temperatura sea el único factor limitante, y que exista disponibilidad de alimento y de hábitat adecuado para el asentamiento. Si en el medio no existe disponibilidad de alimento como microalgas, es decir, fuentes exógenas de energía durante la etapa planctotrófica de *Arbacia stellata*, es posible que un cohorte de larvas no pueda asentarse, alcanzar la metamorfosis y colonizar un nuevo territorio al norte de su límite de distribución. *Arbacia stellata* ha alcanzado territorios más lejanos a su límite latitudinal norte, pero ha sucedido con relación a eventos de calentamiento (Burcham & Caruso, 2015; Gianguzza, 2020).

CONCLUSIONES

Este primer estudio sobre los efectos en las primeras etapas de la historia de vida de *Arbacia stellata* ofrece información novedosa e importante para comprender su termotolerancia.

La fertilización en erizos de mar está determinada por la selectividad de gametos cuando se consideran pocos reproductores. Con los resultados obtenidos en esta investigación, es posible deducir que el éxito de fertilización se podría ver mejorado con altas densidades de espermatozoides y temperaturas no superiores a 22 °C.

Los estadios embrionarios y larvales alcanzaron etapas más avanzadas en las temperaturas más altas, pero esto coincidió con respuestas perjudiciales como mayor tasa de anormalidades y mayor mortalidad, respectivamente. La termotolerancia del erizo negro de mar *Arbacia stellata* se puede determinar dentro del rango de 14 a 22 °C.

Con la información obtenida mediante esta investigación, se observó un efecto perjudicial de las temperaturas frías en el desarrollo de *A. stellata*, lo cual sería un factor limitante para que sobrepase su límite de distribución latitudinal al norte.

Para optimizar el cultivo de *A. stellata*, se recomienda evaluar sus respuestas fisiológicas y morfológicas dentro de un rango con intervalos de temperatura más cortos, específicamente dentro de los 14 y 22 °C. Esta especie encuentra su

límite norte de distribución en Baja California, lo cual implica que las condiciones en que vive le permiten crecer y reproducirse, pero no son óptimas para ampliar su distribución a latitudes más altas al norte, excepto cuando existen eventos de calentamiento.

LITERATURA CITADA

Anderson, M. J. (2001). Permutation tests for univariate or multivariate analysis of variance and regression. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58(3), 626–639. <https://doi.org/10.1139/f01-004>

Andronikov, V. B. (1975). Heat resistance of gametes of marine invertebrates in relation to temperature conditions under which the species exist. *Marine Biology*, 30(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/BF00393747>

Bhaud, M., Cha, J. H., Duchêne, J. C., & Nozais, C. (1995). Influence of temperature on the marine fauna: What can be expected from a climatic change. *Journal of Thermal Biology*, 20(1–2), 91–104. [https://doi.org/10.1016/0306-4565\(94\)00031-D](https://doi.org/10.1016/0306-4565(94)00031-D)

Bosch, I., Beauchamp, K. A., Steele, M. E., & Pearse, J. S. (1987). Development, metamorphosis and seasonal abundance of embryos and larvae of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. *The Biological Bulletin*, 173(1), 126–135. <https://doi.org/10.2307/1541867>

- Boyd, P. W., Collins, S., Dupont, S., Fabricius, K., Gattuso, J. P., Havenhand, J., Hutchins, D. A., Riebesell, U., Rintoul, M. S., Vichi, M., Biswas, H., Ciotti, A., Gao, K., Gehlen, M., Hurd, C. L., Kurihara, H., McGraw, C. M., Navarro, J. M., Nilsson, G. E., ... Pörtner, H.-O. (2018). Experimental strategies to assess the biological ramifications of multiple drivers of global ocean change—A review. In *Global Change Biology* (Vol. 24, Issue 6, pp. 2239–2261). <https://doi.org/10.1111/gcb.14102>
- Burcham, D., & Caruso, N. L. (2015). Abundance, size, and occurrence of *Arbacia stellata* in Orange County, California. *California Fish and Game*, 101(3), 184–187.
- Byrne, M. (2011). Impact of ocean warming and ocean acidification on marine invertebrate life history stages: vulnerabilities and potential for persistence in a changing ocean. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 49, 1–42. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.10.00>
- Byrne, M. (2012). Global change ecotoxicology: Identification of early life history bottlenecks in marine invertebrates, variable species responses and variable experimental approaches. *Marine Environmental Research*, 76, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.10.004>
- Byrne, M., & Hernández, J. C. (2020). Sea urchins in a high CO₂ world: Impacts of climate warming and ocean acidification across life history stages. In *Sea Urchins: Biology and Ecology* (pp. 281–297). <https://doi.org/10.1016/B978->

0-12-819570-3.00016-0

- Byrne, M., Ho, M. A., Selvakumaraswamy, P., Nguyen, H. D., Dworjanyn, S. A., & Davis, A. R. (2009). Temperature, but not pH, compromises sea urchin fertilization and early development under near-future climate change scenarios. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1663), 1883–1888. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1935>
- Byrne, M., & Przeslawski, R. (2013). Multistressor impacts of warming and acidification of the ocean on marine invertebrates' life histories. *Integrative and Comparative Biology*, 53(4), 582–596. <https://doi.org/10.1093/icb/ict049>
- Byrne, M., Ross, P. M., Dworjanyn, S. A., & Parker, L. (2018). Larval ecology in the face of changing climate—impacts of ocean warming and ocean acidification. In T. J. Carrier, A. M. Reitzel, & A. Heyland (Eds.), *Evolutionary Ecology of Marine Invertebrate Larvae* (pp. 251–272). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198786962.003.0017>
- Byrne, M., Sewell, M. A., & Prowse, T. A. A. (2008). Nutritional ecology of sea urchin larvae: influence of endogenous and exogenous nutrition on echinopluteal growth and phenotypic plasticity in *Tripneustes gratilla*. *Functional Ecology*, 22, 643–648. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01427.x>
- Byrne, M., Soars, N., Ho, M. A., Wong, E., McElroy, D., Selvakumaraswamy, P.,

Dworjanyn, S. A., & Davis, A. R. (2010). Fertilization in a suite of coastal marine invertebrates from SE Australia is robust to near-future ocean warming and acidification. *Marine Biology*, 157(9), 2061–2069.
<https://doi.org/10.1007/s00227-010-1474-9>

Byrne, M., Soars, N., Selvakumaraswamy, P., Dworjanyn, S. A., & Davis, A. R. (2010). Sea urchin fertilization in a warm, acidified and high pCO₂ ocean across a range of sperm densities. *Marine Environmental Research*, 69(4), 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.10.014>

Cavole, L. M., Demko, A. M., Diner, R. E., Giddings, A., Koester, I., Pagniello, C. M. L. S., Paulsen, M. L., Ramirez-Valdez, A., Schwenck, S. M., Yen, N. K., Zill, M. E., & Franks, P. J. S. (2016). Biological impacts of the 2013–2015 warm-water anomaly in the northeast Pacific: Winners, Losers, and the Future. *Oceanography*, 29(2), 273–285.
<https://doi.org/10.5670/oceanog.2016.32>

Chan, K. Y. K., Sewell, M. A., Byrne, M., & Watson, J. (2018). Revisiting the larval dispersal black box in the Anthropocene. *ICES Journal of Marine Science*, 75(6), 1841–1848. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsy097>

Chia, F.-S., & Blickell, L. R. (1983). Echinodermata. In K. G. Adiyodi & R. G. Adiyodi (Eds.), *Reproductive Biology of Invertebrates, Volume II: Spermatogenesis and Sperm Function* (pp. 545–619). Wiley & Sons, Ltd.

- Clarke, K. R., & Gorley, R. N. (2006). PRIMER v6: User Manual/Tutorial. In *PRIMER-E, Plymouth* (No. 6; p. 192). PRIMER-E Ltd.
- Cohen-Rengifo, M., García, E., Hernández, C. A., Hernández, J. C., & Clemente, S. (2013). Global warming and ocean acidification affect fertilization and early development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Cahiers de Biologie Marine*, 54(4), 667–675.
- Díaz-Martínez, J. P. (2019). *Biología reproductiva, desarrollo larvario y efecto de la acidificación del mar en el éxito de la fertilización y en los primeros estadios embrionarios de Arbacia stellata (Blainville, 1825; ?Gmelin) (Echinodermata: Echinoidea)*. [Tesis doctoral sin public. Universidad del Mar.
- Díaz-Martínez, J. P., Carpizo-Ituarte, E. D. J., & Benítez-Villalobos, F. (2019). Reproductive patterns of the black starry sea urchin *Arbacia stellata* in Punta Banda, Baja California, Mexico. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 99(06), 1379–1391.
<https://doi.org/10.1017/S0025315419000316>
- Díaz, F., Re, A. D., Galindo-Sanchez, C. E., Carpizo-Ituarte, E., Perez-Carrasco, L., González, M., Licea, A., Sanchez, A., & Rosas, C. (2017). Preferred temperature, critical thermal maximum, and metabolic response of the black sea urchin *Arbacia stellata* (Blainville, 1825; Gmelin, 1791). *Journal of Shellfish Research*, 36(1), 219–225. <https://doi.org/10.2983/035.036.0124>

- Eckman, J. E. (1996). Closing the larval loop: Linking larval ecology to the population dynamics of marine benthic invertebrates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 200(1–2), 207–237.
[https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(96\)02644-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(96)02644-5)
- Engle, J. M., & Richards, D. V. (2001). New and unusual marine invertebrates discovered at the California Channel Islands during the 1997-1998 El Niño. *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences*, 100(3), 186–198.
- Ericson, J. A., Ho, M. A., Miskelly, A., King, C. K., Virtue, P., Tilbrook, B., & Byrne, M. (2012). Combined effects of two ocean change stressors, warming and acidification, on fertilization and early development of the Antarctic echinoid *Sterechinus neumayeri*. *Polar Biology*, 35(7), 1027–1034. <https://doi.org/10.1007/s00300-011-1150-7>
- Fernández, J. P., Chaar, F. B., Epherra, L., González-Aravena, J. M., & Rubilar, T. (2021). Embryonic and larval development is conditioned by water temperature and maternal origin of eggs in the sea urchin *Arbacia dufresnii* (Echinodermata: Echinoidea). *Revista de Biología Tropical*, 69(March), 452–463. <https://doi.org/10.15517/rbt.v69iSuppl.1.46384>
- Foo, S. A., Dworjanyn, S. A., Khatkar, M. S., Poore, A. G. B., & Byrne, M. (2014). Increased temperature, but not acidification, enhances fertilization and development in a tropical urchin: Potential for adaptation to a tropicalized eastern Australia. *Evolutionary Applications*, 7(10), 1226–1237.

<https://doi.org/10.1111/eva.12218>

Foo, S. A., Kowek, D. A., Munari, M., Gambi, M. C., Byrne, M., & Caldeira, K. (2020). Responses of sea urchin larvae to field and laboratory acidification. *Science of the Total Environment*, 723(March), 138003. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138003>

Fuentes, I., & Barros, C. (2000). Larval development and metamorphosis of cultured *Tetrapygus niger* (Echinodermata Echinoidea): An uncommon form of echinoplutei. *Invertebrate Reproduction and Development*, 37(3), 201–209. <https://doi.org/10.1080/07924259.2000.9652420>

García, E., Hernández, J. C., & Clemente, S. (2018). Robustness of larval development of intertidal sea urchin species to simulated ocean warming and acidification. *Marine Environmental Research*, 139(March), 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.04.011>

Gianguzza, P. (2020). *Arbacia* (pp. 419–429). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819570-3.00024-X>

Hamdoun, A., & Epel, D. (2007). Embryo stability and vulnerability in an always changing world. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(6), 1745–1750. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610108104>

Hardy, N. A., Lamare, M., Uthicke, S., Wolfe, K., Doo, S., Dworjanyn, S., & Byrne, M. (2014). Thermal tolerance of early development in tropical and

temperate sea urchins: Inferences for the tropicalization of eastern Australia. *Marine Biology*, 161(2), 395–409. <https://doi.org/10.1007/s00227-013-2344-z>

Harvey, E. B. (1956). *The American Arbacia and other sea urchins*. Princeton University Press.

Herrera, J. C. (1998). *Nutritional strategies in echinoplutei (Tesis doctoral)*. University of Florida.

Herrera, J. C., McWeeney, S. K., & McEdward, L. R. (1996). Diversity of energetic strategies among echinoid larvae and the transition from feeding to nonfeeding development. *Oceanologica Acta*, 19(3–4), 313–321.

Hoegh-Guldberg, O., Jacob, D., Taylor, M., Bindi, M., Brown, S., Camilloni, I., Diedhiou, A., Djalante, R., Ebi, K. L., Engelbrecht, F., Guiot, J., Hijioka, Y., Mehrotra, S., Payne, A., Seneviratne, S. I., Thomas, A., Warren, R., & Zhou, G. (2018). Impacts of 1.5°C of Global Warming on Natural and Human Systems. In V. Masson-Delmotte, P. Zhai, H.-O. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P. R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, J. B. R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M. I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor, & T. Waterfield (Eds.), *Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat*

of climate change, (pp. 1–138).

- Hoegh-Guldberg, O., & Pearce, J. S. (1995). Temperature, Food Availability, and the Development of Marine Invertebrate Larvae. *American Zoologist*, 35(4), 415–425.
- Kosman, E. T., & Levitan, D. R. (2014). Sperm competition and the evolution of gametic compatibility in externally fertilizing taxa. *Molecular Human Reproduction*, 20(12), 1190–1197. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau069>
- Lamare, M., Pecorino, D., Hardy, N., Liddy, M., Byrne, M., & Uthicke, S. (2014). The thermal tolerance of crown-of-thorns (*Acanthaster planci*) embryos and bipinnaria larvae: Implications for spatial and temporal variation in adult populations. *Coral Reefs*, 33(1), 207–219. <https://doi.org/10.1007/s00338-013-1112-3>
- Lenz, B., Fogarty, N. D., & Figueiredo, J. (2019). Effects of ocean warming and acidification on fertilization success and early larval development in the green sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Marine Pollution Bulletin*, 141(August 2018), 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.02.018>
- Lessios, H. A., Lockhart, S., Collin, R., Sotil, G., Sanchez-Jerez, P., Zigler, K. S., Perez, A. F., Garrido, M. J., Geyer, L. B., Bernardi, G., Vacquier, V. D., Haroun, R., & Kessing, B. D. (2011). Phylogeography and binding evolution in *Arbacia*, a sea urchin genus with an unusual distribution. *Molecular*

Ecology, 21(1), 130–144. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05303.x>

Levitan, D. R., & Ferrell, D. L. (2006). Selection on gamete recognition proteins depends on sex, density, and genotype frequency. *Science*, 312(5771), 267–269. <https://doi.org/10.1126/science.1122183>

Levitan, D. R., & Petersen, C. (1995). Sperm limitation in the sea. *Trends in Ecology & Evolution*, 10(6), 228–231. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)89071-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)89071-0)

Levitan, D. R., Sewell, M. A., & Chia, F. S. (1991). Kinetics of Fertilization in the Sea Urchin *Strongylocentrotus franciscanus* : Interaction of Gamete Dilution, Age, and Contact Time. *The Biological Bulletin*, 181(3), 371–378. <https://doi.org/10.2307/1542357>

Levitan, D. R., TerHorst, C. P., & Fogarty, N. D. (2007). The risk of polyspermy in three congeneric sea urchins and its implications for gametic incompatibility and reproductive isolation. *Evolution*, 61(8), 2007–2014. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00150.x>

Love, A. C., & Strathmann, R. R. (2018). Marine invertebrate larvae: Model life histories for development, ecology, and evolution. In T. J. Carrier, A. M. Reitzel, & A. Heyland (Eds.), *Evolutionary Ecology of Marine Invertebrate Larvae* (pp. 306–321). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198786962.003.0021>

- Mak, K. K.-Y., & Chan, K. Y. K. (2018). Interactive effects of temperature and salinity on early life stages of the sea urchin *Heliocidaris crassispina*. *Marine Biology*, 165(3), 57. <https://doi.org/10.1007/s00227-018-3312-4>
- McAlister, J. S. (2007). Egg size and the evolution of phenotypic plasticity in larvae of the echinoid genus *Strongylocentrotus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 352, 306–316. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.08.009>
- McAlister, J. S., & Miner, B. G. (2018). Phenotypic plasticity of feeding structures in marine invertebrate larvae. In T. J. Carrier, A. M. Reitzel, & A. Heyland (Eds.), *Evolutionary Ecology of Marine Invertebrate Larvae* (pp. 103–123). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198786962.003.0008>
- McEdward, L. R. (1997). Reproductive Strategies of Marine Benthic Invertebrates Revisited: Facultative Feeding by Planktotrophic Larvae. *The American Naturalist*, 150(1), 48–72.
- McEdward, L. R., & Miner, B. G. (2007). Echinoid Larval Ecology. In *Edible Sea Urchins: Biology* (Issue 5, pp. 71–94). [papers3://publication/uuid/8E1A60AD-F11A-4CF1-9621-3D81534ED694](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8811-1_5)
- Mejía-Gutiérrez, L. M., Benítez-Villalobos, F., & Díaz-Martínez, J. P. (2019). Effect of temperature increase on fertilization, embryonic development and

larval survival of the sea urchin *Toxopneustes roseus* in the Mexican south Pacific. *Journal of Thermal Biology*, 83(April), 157–164.

<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.05.011>

Metaxas, A. (2020). Larval ecology of echinoids. In *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (4th ed., Vol. 43). Elsevier B.V.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819570-3.00006-8>

Mita, M., Hino, A., & Yasumasu, I. (1984). Effect of temperature on interaction between eggs and spermatozoa of sea urchin. *The Biological Bulletin*, 166(1), 68–77. <https://doi.org/10.2307/1541431>

O'Connor, M. I., Bruno, J. F., Gaines, S. D., Halpern, B. S., Lester, S. E., Kinlan, B. P., & Weiss, J. M. (2007). Temperature control of larval dispersal and implications for marine ecology, evolution, and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(4).

Oliva Méndez, N. L. (2018). *Estudio de la dinámica del sistema del dióxido de carbono al norte de Baja California. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Baja California.*

Palumbi, S. R. (1999). All males are not created equal: Fertility differences depend on gamete recognition polymorphisms in sea urchins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), 12632–12637. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12632>

- Palumbi, S. R. (2009). Speciation and the evolution of gamete recognition genes: Pattern and process. *Heredity*, 102(1), 66–76.
<https://doi.org/10.1038/hdy.2008.104>
- Pandori, L. L. M., & Sorte, C. J. B. (2019). The weakest link: sensitivity to climate extremes across life stages of marine invertebrates. *Oikos*, 128(5), 621–629. <https://doi.org/10.1111/oik.05886>
- Pechenik, J. A. (2018). Latent effects: Surprising consequences of embryonic and larval experience on life after metamorphosis. In T. J. Carrier, A. M. Reitzel, & A. Heyland (Eds.), *Evolutionary Ecology of Marine Invertebrate Larvae* (pp. 208–225). Oxford University Press.
<https://doi.org/10.1093/oso/9780198786962.003.0014>
- Pérez-Portela, R., Riesgo, A., Wangensteen, O. S., Palacín, C., & Turon, X. (2020). Enjoying the warming Mediterranean: Transcriptomic responses to temperature changes of a thermophilous keystone species in benthic communities. *Molecular Ecology*, 29(17), 3299–3315.
<https://doi.org/10.1111/mec.15564>
- Pérez-Portela, R., Wangensteen, O. S., Garcia-Cisneros, A., Valero-Jiménez, C., Palacín, C., & Turon, X. (2019). Spatio-temporal patterns of genetic variation in *Arbacia lixula*, a thermophilous sea urchin in expansion in the Mediterranean. *Heredity*, 122(2), 244–259. <https://doi.org/10.1038/s41437-018-0098-6>

- Perricone, V., & Collin, R. (2019). Larvae of Caribbean Echinoids Have Small Warming Tolerances for Chronic Stress in Panama. *The Biological Bulletin*, 236(2), 115–129. <https://doi.org/10.1086/701666>
- Pörtner, H.-O. (2008). Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: A physiologist's view. *Marine Ecology Progress Series*, 373(DECEMBER 2008), 203–217. <https://doi.org/10.3354/meps07768>
- Privitera, D., Noli, M., Falugi, C., & Chiantore, M. (2011). Benthic assemblages and temperature effects on *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* larvae and settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407(1), 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.06.030>
- Przeslawski, R., Byrne, M., & Mellin, C. (2015). A review and meta-analysis of the effects of multiple abiotic stressors on marine embryos and larvae. *Global Change Biology*, 21(6), 2122–2140. <https://doi.org/10.1111/gcb.12833>
- Rahman, M. S., Tsuchiya, M., & Uehara, T. (2009). Effects of temperature on gamete longevity and fertilization success in two sea urchin species, *Echinometra mathaei* and *Tripneustes gratilla*. *Zoological Science*, 26(1), 1–8. <https://doi.org/10.2108/zsj.26.1>
- Reitzel, A. M., Miles, C. M., Heyland, A., Cowart, J. D., & McEdward, L. R. (2005). The contribution of the facultative feeding period to echinoid larval

development and size at metamorphosis: a comparative approach. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 317, 189–201.

<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.11.018>

Reitzel, A. M., Miner, B. G., & McEdward, L. R. (2004). Relationships between spawning date and larval development time for benthic marine invertebrates: A modeling approach. *Marine Ecology Progress Series*, 280, 13–23. <https://doi.org/10.3354/meps280013>

Reusch, T. B. H. (2013). Climate change in the oceans: Evolutionary versus phenotypically plastic responses of marine animals and plants. *Evolutionary Applications*, 7(1). <https://doi.org/10.1111/eva.12109>

Rosa, R., Pimentel, M. S., Boavida-Portugal, J., Teixeira, T., Trübenbach, K., & Diniz, M. (2012). Ocean warming enhances malformations, premature hatching, metabolic suppression and oxidative stress in the early life stages of a keystone squid. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038282>

Rosa, R., Trubenbach, K., Pimentel, M. S., Boavida-Portugal, J., Faleiro, F., Baptista, M., Dionisio, G., Calado, R., Portner, H. O., & Repolho, T. (2014). Differential impacts of ocean acidification and warming on winter and summer progeny of a coastal squid (*Loligo vulgaris*). *Journal of Experimental Biology*, 217(4), 518–525. <https://doi.org/10.1242/jeb.096081>

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/NMETH.2019>
- Sewell, M. A., & Young, C. M. (1999). Temperature limits to fertilization and early development in the tropical sea urchin *Echinometra lucunter*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 236(2), 291–305. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(98\)00210-X](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(98)00210-X)
- Sherman, C. D. H., Ab Rahim, E. S., Olsson, M., & Careau, V. (2015). The more pieces, the better the puzzle: Sperm concentration increases gametic compatibility. *Ecology and Evolution*, 5(19), 4354–4364. <https://doi.org/10.1002/ece3.1684>
- Smith, K. E., Byrne, M., Deaker, D., Hird, C. M., Nielson, C., Wilson-McNeal, A., & Lewis, C. (2019). Sea urchin reproductive performance in a changing ocean: Poor males improve while good males worsen in response to ocean acidification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1907). <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0785>
- Soars, N., Prowse, T. A. A., & Byrne, M. (2009). Overview of phenotypic plasticity in echinoid larvae, “*Echinopluteus transversus*” type vs. typical echinoplutei. *Marine Ecology Progress Series*, 383, 113–125.

<https://doi.org/10.3354/meps07848>

Sonnenholzner-Varas, J. I., Tournon, N., & Orrala, M. M. P. (2018). Breeding, larval development, and growth of juveniles of the edible sea urchin *Triploneustes depressus*: A new target species for aquaculture in Ecuador. *Aquaculture*, 496(July), 134–145.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.019>

Strathmann, M. F. (1987). *Reproduction and Development of Marine Invertebrates of the Northern Pacific Coast*. University of Washington Press.

Styan, C. A. (1998). Polyspermy, egg size, and the fertilization kinetics of free-spawning marine invertebrates. *American Naturalist*, 152(2), 290–297.

<https://doi.org/10.1086/286168>

Thorson, G. (1950). Reproductive and larval ecology of invertebrates. *Biological Reviews*, 25(1), 1–45. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1950.tb00585.x>

Uthicke, S., Schaffelke, B., & Byrne, M. (2009). A boom–bust phylum? Ecological and evolutionary consequences of density variations in echinoderms. *Ecological Monographs*, 79(1), 3–24.

<https://doi.org/10.1890/07-2136.1>

Vacquier, V. D., & Moy, G. W. (1977). Isolation of bindin: The protein responsible for adhesion of sperm to sea urchin eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(6),

2456–2460. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.6.2456>

- Visconti, G., Gianguzza, F., Butera, E., Costa, V., Vizzini, S., Byrne, M., & Gianguzza, P. (2017). Morphological response of the larvae of *Arbacia lixula* to near-future ocean warming and acidification. *ICES Journal of Marine Science*, 74(4), 1180–1190. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsx037>
- Vogel, H., Czihak, G., Chang, P., & Wolf, W. (1982). Fertilization Kinetics of Sea Urchin Eggs. *Mathematical Biosciences*, 58, 189–216.
- Wangensteen, O. S., Dupont, S., Casties, I., Turon, X., & Palacín, C. (2013). Some like it hot: Temperature and pH modulate larval development and settlement of the sea urchin *Arbacia lixula*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 449, 304–311.
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.10.007>
- Wernberg, T., Smale, D. A., & Thomsen, M. S. (2012). A decade of climate change experiments on marine organisms: Procedures, patterns and problems. *Global Change Biology*, 18(5), 1491–1498.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2012.02656.x>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Yamada, K., & Mihashi, K. (1998). Temperature-independent period immediately after fertilization in sea urchin eggs. *Biological Bulletin*, 195(2), 107–111.

<https://doi.org/10.2307/1542817>

Zigler, K. S., Lessios, H. A., & Raff, R. A. (2008). Egg energetics, fertilization kinetics, and population structure in echinoids with facultatively feeding larvae. *Biological Bulletin*, 215(2), 191–199.

<https://doi.org/10.2307/25470700>

Zigler, K. S., McCartney, M. A., Levitan, D. R., & Lessios, H. A. (2005). Sea urchin binding divergence predicts gamete compatibility. *Evolution*, 59(11), 2399–2404. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2005.tb00949.x>

ANEXOS

Éxito de Fertilización

Anexo A. Resultados de la prueba general de PerMANOVA de dos vías para el experimento de fertilización 1.a.

Fuente	gl	SC	MC	Pseudo-F	P(perm)
Tratamiento	4	0.16219	0.04055	22.545	0.0002
Dilución	4	10.831	2.7077	1505.5	0.0002
Tratamiento × Dilución	16	0.29209	0.01826	10.15	0.0002
Residuales	50	0.089926	0.0018		
Total	74	11.375			

gl: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; MC: media cuadrática; P(perm): valor de p calculado con permutaciones. En negrita se resaltan los valores significativos.

Anexo B. Resultados de las pruebas por pares de dilución de PerMANOVA para el experimento de fertilización 1.a.

Tratamiento	Diluciones	t	P(perm)	PU	P(MC)
10 °C	1 - 2	2.8284	0.0976	9	0.049
	1 - 3	12.796	0.1016	9	0.0002
	1 - 4	37.982	0.104	10	0.0002
	1 - 5	61.336	0.1052	9	0.0002
	2 - 3	10.337	0.1012	10	0.0002
	2 - 4	25.795	0.1016	8	0.0002
	2 - 5	34.03	0.0992	9	0.0002
	3 - 4	5.5802	0.1016	10	0.0058
	3 - 5	7.8489	0.1006	10	0.0014
	4 - 5	3.5082	0.1044	9	0.0228
14 °C	1 - 2	1.9157	0.2024	5	0.1256
	1 - 3	33.046	0.0974	7	0.0002
	1 - 4	18.357	0.0914	7	0.0002
	1 - 5	47.381	0.094	5	0.0002
	2 - 3	15.588	0.1022	10	0.0002
	2 - 4	15.275	0.095	10	0.0004
	2 - 5	27.602	0.1014	7	0.0002
	3 - 4	7.1929	0.099	10	0.0012
	3 - 5	17.046	0.1036	7	0.0002
	4 - 5	1.2916	0.402	6	0.2646
18 °C	1 - 2	1.9172	0.1018	7	0.1326
	1 - 3	19.094	0.1022	9	0.0002
	1 - 4	40.033	0.1004	9	0.0002
	1 - 5	29.395	0.0988	9	0.0002
	2 - 3	8.0787	0.103	7	0.0012
	2 - 4	10.261	0.102	7	0.0004
	2 - 5	10.789	0.1016	7	0.001
	3 - 4	2.2729	0.0994	10	0.08
	3 - 5	3.6519	0.1004	10	0.0222
	4 - 5	2.4837	0.1954	7	0.0666
22 °C	1 - 2	4.0189	0.1032	6	0.0164
	1 - 3	38.784	0.1068	9	0.0002
	1 - 4	67.529	0.0976	9	0.0002
	1 - 5	49.149	0.108	9	0.0002
	2 - 3	17.78	0.1062	7	0.0002
	2 - 4	20.486	0.0976	7	0.0004
	2 - 5	19.634	0.0986	7	0.0002

26 °C	3 - 4	1.0102	0.5072	6	0.3828
	3 - 5	1.3258	0.3042	6	0.2558
	4 - 5	0.60634	0.7946	4	0.5788
	1 - 2	2.9155	0.0984	7	0.0416
	1 - 3	30.806	0.095	7	0.0002
	1 - 4	66.218	0.0984	9	0.0002
	1 - 5	67.673	0.1024	8	0.0002
	2 - 3	28.727	0.098	7	0.0002
	2 - 4	58.143	0.1028	9	0.0002
	2 - 5	59.323	0.0972	10	0.0002
	3 - 4	2.8975	0.1068	7	0.043
	3 - 5	3.2118	0.0926	7	0.0328
	4 - 5	0.53936	0.6904	7	0.6316

t: valor de la prueba t; P(Perm): valor de p con permutaciones; PU: permutaciones únicas; P(MC): valor de P obtenido con el método de extracciones aleatorias Monte Carlo. En negrita se resaltan valores significativos.

Anexo C. Resultados de la prueba general de PerMANOVA de dos vías para el experimento de fertilización 1.b.

Fuente	gl	SC	MC	Pseudo-F	P(perm)
Temperatura	4	0.22131	0.055327	15.865	0.0002
Dilución	4	11.247	2.8117	806.23	0.0002
Temperatura × Dilución	16	0.25901	0.016188	4.6419	0.0004
Residuales	50	0.17437	0.003487		
Total	74	11.901			

gl: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; MC: media cuadrática; P(perm): valor de p calculado con permutaciones. En negrita se resaltan valores significativos.

Anexo D. Resultados de las pruebas por pares de dilución de PerMANOVA para el experimento de fertilización 1.b.

Temperatura	Diluciones	t	P(perm)	PU	P(MC)
10 °C	1 - 2	1.9404	0.2082	8	0.1302
	1 - 3	7.4032	0.0964	10	0.0024
	1 - 4	27.068	0.1006	10	0.0002
	1 - 5	40.86	0.0912	10	0.0002
	2 - 3	6.7177	0.094	10	0.0018
	2 - 4	24.068	0.1006	9	0.0002
	2 - 5	34.85	0.097	10	0.0002
	3 - 4	1.805	0.103	10	0.1458
	3 - 5	2.2604	0.095	9	0.0782
	4 - 5	1.4709	0.298	6	0.2194
14 °C	1 - 2	3.414	0.0988	8	0.028
	1 - 3	5.8839	0.107	10	0.0048
	1 - 4	12.419	0.0934	9	0.0006
	1 - 5	95.48	0.1006	7	0.0002
	2 - 3	5.2322	0.103	10	0.007
	2 - 4	11.459	0.0968	10	0.0004
	2 - 5	63.404	0.0944	7	0.0002
	3 - 4	2.6727	0.1	9	0.0598
	3 - 5	4.3517	0.1012	7	0.0124
	4 - 5	1.404	0.0922	7	0.231
18 °C	1 - 2	3.6181	0.0988	6	0.0214
	1 - 3	6.4398	0.097	9	0.004
	1 - 4	58.682	0.0988	9	0.0002
	1 - 5	35.385	0.0966	9	0.0002
	2 - 3	5.9278	0.0978	7	0.0036
	2 - 4	58.864	0.104	6	0.0002
	2 - 5	34.737	0.104	6	0.0002
	3 - 4	10.785	0.0914	10	0.0006
	3 - 5	10.311	0.1004	10	0.001
	4 - 5	0.5483	0.601	9	0.5962
22 °C	1 - 2	2.2937	0.2078	4	0.0836
	1 - 3	10.923	0.1006	7	0.0002
	1 - 4	53.806	0.107	7	0.0002
	1 - 5	125.73	0.1076	6	0.0002
	2 - 3	10.311	0.1036	10	0.0004
	2 - 4	46.058	0.0958	10	0.0002
	2 - 5	79.623	0.1036	8	0.0002

26 °C	3 - 4	5.4802	0.1002	8	0.0064
	3 - 5	6.9203	0.096	10	0.002
	4 - 5	3.9104	0.0952	9	0.0154
	1 - 2	1.7056	0.3126	4	0.1598
	1 - 3	31.771	0.0956	9	0.0002
	1 - 4	46.853	0.1044	9	0.0002
	1 - 5	80.8	0.1026	7	0.0002
	2 - 3	31.6	0.0974	7	0.0002
	2 - 4	47.267	0.0966	7	0.0002
	2 - 5	86.133	0.0936	6	0.0002
	3 - 4	5.5896	0.1052	9	0.005
	3 - 5	8.6291	0.1052	9	0.0006
	4 - 5	2.3905	0.1014	8	0.077

t: valor de la prueba t; P(Perm): valor de p con permutaciones; PU: permutaciones únicas; P(MC): valor de P obtenido con el método de extracciones aleatorias Monte Carlo. En negrita se resaltan valores significativos.

Anexo E. Resultados de la prueba general de PerMANOVA de dos vías para el experimento de fertilización 1.c.

Fuente	gl	SC	MC	Pseudo-F	P(perm)
Temperatura	4	0.19252	0.04813	47.086	0.0002
Dilución	4	11.16	2.7899	2729.4	0.0002
Temperatura × Dilución	16	0.26322	0.01645	16.094	0.0002
Residuales	50	0.05111	0.00102		
Total	74	11.667			

gl: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; MC: media cuadrática; P(perm): valor de p calculado con permutaciones. En negrita se resaltan valores significativos.

Anexo F. Resultados de las pruebas por pares de PerMANOVA para el experimento de fertilización 1.c.

Temperatura	Diluciones	t	P(perm)	PU	P(MC)
10 °C	1 - 2	8.3648	0.098	9	0.0024
	1 - 3	26.103	0.097	9	0.0002
	1 - 4	29.103	0.1016	7	0.0002
	1 - 5	29.432	0.0954	7	0.0002
	2 - 3	32.938	0.105	9	0.0002
	2 - 4	47.199	0.102	6	0.0002
	2 - 5	49.766	0.0946	7	0.0002
	3 - 4	2.3664	0.0982	7	0.0756
	3 - 5	2.6517	0.0988	6	0.0538
	4 - 5	0.44721	1	2	0.685
14 °C	1 - 2	8.9626	0.0942	7	0.0016
	1 - 3	36.594	0.1078	5	0.0002
	1 - 4	50.831	0.102	7	0.0002
	1 - 5	57.7	0.097	5	0.0002
	2 - 3	36.592	0.0952	7	0.0002
	2 - 4	66.749	0.0984	6	0.0002
	2 - 5	93.744	0.1072	7	0.0002
	3 - 4	0.91766	0.7006	3	0.403
	3 - 5	2.3567	0.097	5	0.0774
	4 - 5	3.0509	0.0992	6	0.0412
18 °C	1 - 2	4.9896	0.0992	8	0.0094
	1 - 3	17.221	0.1	9	0.0002
	1 - 4	38.615	0.0992	10	0.0002
	1 - 5	94.586	0.1004	7	0.0002
	2 - 3	13.769	0.0982	9	0.0002
	2 - 4	32.188	0.1012	10	0.0002
	2 - 5	60.874	0.1014	7	0.0002
	3 - 4	10.298	0.1056	10	0.0008
	3 - 5	14.065	0.1	7	0.0002
	4 - 5	1.8766	0.0998	6	0.1346
22 °C	1 - 2	4.5387	0.1012	7	0.0122
	1 - 3	39.549	0.0988	6	0.0002
	1 - 4	178.44	0.102	5	0.0002
	1 - 5	112.05	0.0926	5	0.0002
	2 - 3	10.987	0.1064	10	0.0006
	2 - 4	13.081	0.1054	7	0.0002
	2 - 5	13.2	0.0956	7	0.0002

26 °C	3 - 4	3.037	0.1036	7	0.0394
	3 - 5	3.4219	0.104	6	0.0268
	4 - 5	1.5811	0.3822	3	0.1896
	1 - 2	4.5076	0.1052	10	0.0116
	1 - 3	38.741	0.1028	9	0.0002
	1 - 4	51.176	0.0992	10	0.0002
	1 - 5	53.875	0.1	7	0.0002
	2 - 3	17.319	0.0992	10	0.0002
	2 - 4	19.488	0.0996	10	0.0004
	2 - 5	19.853	0.1036	7	0.0002
	3 - 4	2.4046	0.2048	7	0.0746
	3 - 5	2.9698	0.1028	6	0.0414
	4 - 5	1.07	0.2968	5	0.3428

t: valor de la prueba t; P(Perm): valor de p con permutaciones; PU: permutaciones únicas; P(MC): valor de P obtenido con el método de extracciones aleatorias Monte Carlo. En negrita se resaltan valores significativos.

Desarrollo embrionario

Anexo G. Resultados de las pruebas por pares de temperatura del ANOSIM para el experimento de desarrollo embrionario.

Temperatura	Valor de R	Nivel de significancia (%)
26 °C - 22 °C	0.614	0.02
26 °C - 18 °C	0.959	0.02
26 °C - 14 °C	1	0.02
26 °C - 10 °C	1	0.02
22 °C - 18 °C	0.967	0.02
22 °C - 14 °C	1	0.02
22 °C - 10 °C	1	0.02
18 °C - 14 °C	1	0.02
18 °C - 10 °C	1	0.02

14 °C - 10 °C	0.998	0.02
---------------	-------	-------------

En negrita se resaltan valores significativos.

Anexo H. Resultados de las pruebas por pares de horas del ANOSIM para el experimento de desarrollo embrionario.

Tiempo (hpf)	Valor de R	Nivel de significancia (%)
2 - 4	0.973	0.02
2 - 8	1	0.02
2 - 12	1	0.02
2 - 16	1	0.02
2 - 20	1	0.02
2 - 24	1	0.02
4 - 8	1	0.02
4 - 12	1	0.02
4 - 16	1	0.02
4 - 20	1	0.02
4 - 24	1	0.02
8 - 12	0.948	0.02
8 - 16	1	0.02
8 - 20	1	0.02
8 - 24	1	0.02
12 - 16	1	0.02
12 - 20	1	0.02
12 - 24	1	0.02
16 - 20	1	0.02

16 - 24	1	0.02
20 - 24	0.63	0.02

En negrita se resaltan valores significativos.

Anexo I. Resultados de la prueba general de PerMANOVA de dos vías para el análisis de anomalías en la embriogénesis.

Fuente	gl	SC	MC	Pseudo-F	P(perm)
Temperatura	4	14520	3630	154.62	0.0002
Tiempo	6	772.46	128.74	5.4836	0.0002
Temperatura × Tiempo	24	3413	142.21	6.0572	0.0002
Residuales	105	2465.2	23.478		
Total	139	21171			

gl: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; MC: media cuadrática; P(perm): valor de p calculado con permutaciones. En negrita se resaltan valores significativos.

Anexo J. Resultados de las pruebas por pares de PerMANOVA para el análisis de anomalías en la embriogénesis.

Tiempo	Temperaturas	t	P(perm)	PU	P(MC)
2 hpf	26 °C - 22 °C	80.019	0.0286	16	0.0002
	26 °C - 18 °C	89.697	0.024	15	0.0004
	26 °C - 14 °C	99.399	0.025	15	0.0006
	26 °C - 10 °C	61.344	0.0284	12	0.0008
	22 °C - 18 °C	1.732	0.2852	5	0.134
	22 °C - 14 °C	34.653	0.0586	8	0.0134
	22 °C - 10 °C	12.256	0.288	8	0.2724
	18 °C - 14 °C	1.732	0.2956	6	0.135
	18 °C - 10 °C	24.495	0.1142	9	0.0506
	14 °C - 10 °C	36.747	0.0606	10	0.0114
4 hpf	26 °C - 22 °C	2.782	0.0654	13	0.0348

	26 °C - 18 °C	35.024	0.028	11	0.0138
	26 °C - 14 °C	32.732	0.0532	10	0.0166
	26 °C - 10 °C	14.772	0.3112	7	0.1854
	22 °C - 18 °C	0.33204	1	4	0.7558
	22 °C - 14 °C	0.29245	1	6	0.7796
	22 °C - 10 °C	13.424	0.2306	9	0.2296
	18 °C - 14 °C	1.33E-03	1	4	0.9998
	18 °C - 10 °C	19.412	0.1206	6	0.0994
	14 °C - 10 °C	17.689	0.1932	7	0.1254
	26 °C - 22 °C	45.894	0.0296	15	0.004
8 hpf	26 °C - 18 °C	50.263	0.0272	14	0.0038
	26 °C - 14 °C	41.854	0.0262	15	0.0068
	26 °C - 10 °C	24.136	0.1156	13	0.0514
	22 °C - 18 °C	0.79237	0.603	6	0.4606
	22 °C - 14 °C	0.72769	0.7482	5	0.4942
	22 °C - 10 °C	38.328	0.055	13	0.0086
	18 °C - 14 °C	15.324	0.2172	8	0.1784
	18 °C - 10 °C	47.131	0.0312	12	0.0036
	14 °C - 10 °C	30.795	0.0896	11	0.0184
	26 °C - 22 °C	63.488	0.031	10	0.0014
12 hpf	26 °C - 18 °C	58.894	0.03	13	0.0014
	26 °C - 14 °C	24.486	0.12	8	0.0532
	26 °C - 10 °C	12.235	0.4008	8	0.2784
	22 °C - 18 °C	17.303	0.2356	5	0.1366
	22 °C - 14 °C	5.419	0.0278	10	0.0014
	22 °C - 10 °C	69.682	0.0242	10	0.0004
	18 °C - 14 °C	4.995	0.0324	10	0.0016
	18 °C - 10 °C	6.994	0.0278	10	0.0008
	14 °C - 10 °C	1.732	0.2972	6	0.1356
	26 °C - 22 °C	25.003	0.0624	9	0.046
16 hpf	26 °C - 18 °C	39.301	0.0268	10	0.0094
	26 °C - 14 °C	15.361	0.2706	8	0.1796
	26 °C - 10 °C	0.17441	0.9428	9	0.8694
	22 °C - 18 °C	56.646	0.0284	6	0.001
	22 °C - 14 °C	22.361	0.1362	4	0.067
	22 °C - 10 °C	78.392	0.0316	7	0.0002
	18 °C - 14 °C	58.187	0.0284	7	0.0004
	18 °C - 10 °C	12.023	0.0284	7	0.0002
	14 °C - 10 °C	38.773	0.03	9	0.0084
	26 °C - 22 °C	14.145	0.0324	12	0.0002
20 hpf	26 °C - 18 °C	11.369	0.03	16	0.0002

24 hpf	26 °C - 14 °C	13.747	0.0272	15	0.0002
	26 °C - 10 °C	64.795	0.0286	19	0.0006
	22 °C - 18 °C	15.558	0.332	5	0.1612
	22 °C - 14 °C	10.005	0.6254	4	0.3632
	22 °C - 10 °C	32.857	0.0308	10	0.0152
	18 °C - 14 °C	0.87815	0.5778	6	0.4252
	18 °C - 10 °C	37.091	0.027	11	0.0118
	14 °C - 10 °C	36.547	0.0288	12	0.0104
	26 °C - 22 °C	17.079	0.0286	12	0.0002
	26 °C - 18 °C	16.978	0.0274	13	0.0002
	26 °C - 14 °C	16.245	0.0302	9	0.0002
	26 °C - 10 °C	11.075	0.0298	12	0.0002
	22 °C - 18 °C	11.914	0.486	5	0.2722
	22 °C - 14 °C	0.77353	0.7242	4	0.4664
	22 °C - 10 °C	51.633	0.029	11	0.0032
	18 °C - 14 °C	0.36163	1	3	0.7196
	18 °C - 10 °C	59.053	0.0292	11	0.0012
	14 °C - 10 °C	54.142	0.026	9	0.0012

t: valor de la prueba t; P(Perm): valor de p con permutaciones; PU: permutaciones únicas; P(MC): valor de P obtenido con el método de extracciones aleatorias Monte Carlo. En negrita se resaltan valores significativos.

Desarrollo larval

Anexo K. Resultados de la prueba general de PerMANOVA de densidades para el experimento de desarrollo larval.

Fuente	gl	SC	MC	Pseudo-F	P(perm)
Temperatura	3	234.48	78.158	0.84054	0.4784
Tiempo	9	3713.4	412.6	4.4372	0.0002
Temperatura × Tiempo	27	1423.8	52.733	0.56711	0.9446
Residuales	73	6788	92.986		
Total	112	12181			

gl: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; MC: media cuadrática; P(perm): valor de p calculado con permutaciones. En negrita se resaltan valores significativos.

Anexo L. Resultados de las pruebas por pares de temperaturas del ANOSIM para el experimento de desarrollo larval.

Temperatura	Valor de R	Nivel de significancia (%)
26 °C - 22 °C	0.184	4.3
26 °C - 18 °C	0.629	0.02
26 °C - 14 °C	0.849	0.02
22 °C - 18 °C	0.486	0.02
22 °C - 14 °C	0.784	0.02
18 °C - 14 °C	0.736	0.02

En negrita se resaltan valores significativos.

Anexo M. Resultados de las pruebas por pares de días del ANOSIM para el experimento de desarrollo larval.

Tiempo (días)	Valor de R	Nivel de significancia (%)
1 - 3	0.542	0.5
1 - 5	0.81	0.08
1 - 7	0.889	0.02
1 - 9	0.981	0.02
1 - 11	1	0.02
1 - 13	1	0.04
1 - 15	1	0.04
1 - 17	1	0.02
1 - 19	1	0.04
3 - 5	0.19	8.9
3 - 7	0.653	0.08
3 - 9	0.75	0.1
3 - 11	0.884	0.04
3 - 13	0.767	0.04

3 - 15	1	0.02
3 - 17	1	0.02
3 - 19	1	0.04
5 - 7	0.593	0.1
5 - 9	0.731	0.2
5 - 11	0.894	0.02
5 - 13	0.772	0.02
5 - 15	1	0.04
5 - 17	1	0.02
5 - 19	0.945	0.06
7 - 9	0.269	4.5
7 - 11	0.641	0.08
7 - 13	0.636	0.1
7 - 15	0.844	0.08
7 - 17	0.9	0.06
7 - 19	0.797	0.1
9 - 11	0.469	0.5
9 - 13	0.479	0.4
9 - 15	0.689	0.1
9 - 17	0.856	0.04
9 - 19	0.705	0.1
11 - 13	0	41.9
11 - 15	0.49	1.8
11 - 17	0.743	0.2
11 - 19	0.642	0.8
13 - 15	0.221	15.1
13 - 17	0.374	3.8
13 - 19	0.47	2.8
15 - 17	0.1	27.7
15 - 19	0.19	16.4
17 - 19	0.148	23.7

En negrita se resaltan valores significativos.

Anexo N. Resultados de la prueba general de PerMANOVA de longitud total para el experimento de desarrollo larval.

Fuente	gl	SC	MC	Pseudo-F	P(perm)
Temperatura	3	7893500	2631200	151.98	0.0002
Tiempo	9	21517000	2390800	138.09	0.0002
Temperatura × Tiempo	27	5709300	211460	12.214	0.0002
Residuales	1033	17884000	17313		
Total	1072	56273000			

gl: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; MC: media cuadrática; P(perm): valor de p calculado con permutaciones. En negrita se resaltan valores significativos.

Anexo O. Resultados de las pruebas por pares del PerMANOVA de longitud total para el experimento de desarrollo larval.

Tiempo	Tratamientos	t	P(perm)
1 días	26 °C - 22 °C	5.7949	0.0002
	26 °C - 18 °C	12.184	0.0002
	26 °C - 14 °C	19.074	0.0002
	22 °C - 18 °C	6.1953	0.0002
	22 °C - 14 °C	11.589	0.0002
	18 °C - 14 °C	4.5236	0.0002
3 días	26 °C - 22 °C	3.0992	0.0028
	26 °C - 18 °C	8.9669	0.0002
	26 °C - 14 °C	11.051	0.0002
	22 °C - 18 °C	10.753	0.0002
	22 °C - 14 °C	13.841	0.0002
	18 °C - 14 °C	5.8194	0.0002
5 días	26 °C - 22 °C	1.9935	0.0528
	26 °C - 18 °C	9.5392	0.0002
	26 °C - 14 °C	17.281	0.0002
	22 °C - 18 °C	6.5634	0.0002
	22 °C - 14 °C	13.616	0.0002
	18 °C - 14 °C	10.787	0.0002
7 días	26 °C - 22 °C	3.9881	0.0006

	26 °C - 18 °C	6.9249	0.0002
	26 °C - 14 °C	16.51	0.0002
	22 °C - 18 °C	2.051	0.0448
	22 °C - 14 °C	10.457	0.0002
	18 °C - 14 °C	11.185	0.0002
9 días	26 °C - 22 °C	4.2684	0.0004
	26 °C - 18 °C	5.8169	0.0002
	26 °C - 14 °C	13.574	0.0002
	22 °C - 18 °C	2.3404	0.0208
	22 °C - 14 °C	14.069	0.0002
	18 °C - 14 °C	9.124	0.0002
11 días	26 °C - 22 °C	1.522	0.135
	26 °C - 18 °C	4.0726	0.0002
	26 °C - 14 °C	10.036	0.0002
	22 °C - 18 °C	2.7492	0.0092
	22 °C - 14 °C	11.744	0.0002
	18 °C - 14 °C	9.1853	0.0002
13 días	26 °C - 22 °C	0.14199	0.8882
	26 °C - 18 °C	6.59E-02	0.9428
	26 °C - 14 °C	5.4245	0.0002
	22 °C - 18 °C	0.21745	0.8294
	22 °C - 14 °C	5.4188	0.0004
	18 °C - 14 °C	5.9323	0.0002
15 días	26 °C - 22 °C	0.40205	0.6974
	26 °C - 18 °C	1.9022	0.0602
	26 °C - 14 °C	1.7195	0.0902
	22 °C - 18 °C	2.6515	0.0142
	22 °C - 14 °C	2.0327	0.0492
	18 °C - 14 °C	4.5497	0.0002
17 días	26 °C - 22 °C	1.6943	0.102
	26 °C - 18 °C	0.12202	0.9014
	26 °C - 14 °C	0.95493	0.3408
	22 °C - 18 °C	2.055	0.0458
	22 °C - 14 °C	0.97604	0.3408
	18 °C - 14 °C	1.2365	0.2284
19 días	26 °C - 22 °C	0.32912	0.7414
	26 °C - 18 °C	0.85062	0.3924
	26 °C - 14 °C	1.1936	0.2384
	22 °C - 18 °C	1.469	0.1514
	22 °C - 14 °C	2.0116	0.0502
	18 °C - 14 °C	0.5319	0.5816

t: valor de la prueba t; P(Perm): valor de p con permutaciones. En negrita se resaltan los valores significativos.

Anexo P. Resultados de la prueba general de PerMANOVA de longitud media del cuerpo para el experimento de desarrollo larval.

Fuente	gl	SC	MC	Pseudo-F	P(perm)
Tratamiento	3	464870	154960	96.269	0.0002
Tiempo	9	1512700	168070	104.42	0.0002
Tratamiento × Tiempo	27	118690	4406	2.7373	0.0002
Residuales	1033	1662700	1609.6		
Total	1072	3890000			

gl: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; MC: media cuadrática; P(perm): valor de p calculado con permutaciones. En negrita se resaltan valores significativos.

Anexo Q. Resultados de las pruebas por pares del PerMANOVA de longitud media del cuerpo para el experimento de desarrollo larval.

Día	Tratamientos	t	P(perm)
1 días	26 °C - 22 °C	0.22831	0.8228
	26 °C - 18 °C	4.5884	0.0002
	26 °C - 14 °C	7.8818	0.0002
	22 °C - 18 °C	4.1881	0.0002
	22 °C - 14 °C	6.9075	0.0002
	18 °C - 14 °C	2.9292	0.0046
3 días	26 °C - 22 °C	0.38713	0.6998
	26 °C - 18 °C	4.3235	0.0002
	26 °C - 14 °C	5.3678	0.0002
	22 °C - 18 °C	3.7802	0.0004
	22 °C - 14 °C	5.3342	0.0002
	18 °C - 14 °C	2.445	0.0166
5 días	26 °C - 22 °C	2.7749	0.0076

	26 °C - 18 °C	3.4626	0.001
	26 °C - 14 °C	6.5565	0.0002
	22 °C - 18 °C	0.84637	0.4046
	22 °C - 14 °C	5.1151	0.0002
	18 °C - 14 °C	4.4689	0.0002
7 días	26 °C - 22 °C	1.7715	0.085
	26 °C - 18 °C	1.3142	0.1994
	26 °C - 14 °C	6.1404	0.0002
	22 °C - 18 °C	0.91195	0.3714
	22 °C - 14 °C	6.4081	0.0002
9 días	18 °C - 14 °C	8.7843	0.0002
	26 °C - 22 °C	3.4136	0.0012
	26 °C - 18 °C	3.1872	0.003
	26 °C - 14 °C	7.0704	0.0002
	22 °C - 18 °C	0.52467	0.6008
	22 °C - 14 °C	4.9502	0.0002
	18 °C - 14 °C	6.3518	0.0002
11 días	26 °C - 22 °C	1.0754	0.2948
	26 °C - 18 °C	0.37026	0.7118
	26 °C - 14 °C	4.2875	0.0004
	22 °C - 18 °C	1.0829	0.296
	22 °C - 14 °C	4.248	0.0008
	18 °C - 14 °C	5.9224	0.0002
13 días	26 °C - 22 °C	3.55	0.0012
	26 °C - 18 °C	3.8878	0.0002
	26 °C - 14 °C	6.7358	0.0002
	22 °C - 18 °C	0.18477	0.8524
	22 °C - 14 °C	3.9719	0.0008
	18 °C - 14 °C	4.2397	0.0004
15 días	26 °C - 22 °C	1.0377	0.3058
	26 °C - 18 °C	1.2711	0.2108
	26 °C - 14 °C	2.9822	0.003
	22 °C - 18 °C	3.68E-03	0.996
	22 °C - 14 °C	3.147	0.0024
	18 °C - 14 °C	3.8531	0.0008
17 días	26 °C - 22 °C	2.9845	0.0044
	26 °C - 18 °C	2.3392	0.024
	26 °C - 14 °C	3.6971	0.0006
	22 °C - 18 °C	1.5626	0.125
	22 °C - 14 °C	1.7527	0.0922
	18 °C - 14 °C	2.8937	0.005

19 días	26 °C - 22 °C	0.56824	0.5656
	26 °C - 18 °C	0.20374	0.8386
	26 °C - 14 °C	1.2965	0.2054
	22 °C - 18 °C	0.98819	0.3284
	22 °C - 14 °C	2.0136	0.0492
	18 °C - 14 °C	1.6093	0.1158

t: valor de la prueba t; P(Perm): valor de p con permutaciones. En negrita se resaltan los valores significativos.

Anexo R. Resultados de la prueba general de PerMANOVA de longitud post oral para el experimento de desarrollo larval.

Fuente	gl	SC	MC	Pseudo-F	P(perm)
Temperatura	3	6953800	2317900	143.79	0.0002
Tiempo	9	17634000	1959400	121.55	0.0002
Temperatura × Tiempo	27	5370000	198890	12.338	0.0002
Residuales	1033	16652000	16120		
Total	1072	49404000			

gl: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; MC: media cuadrática; P(perm): valor de p calculado con permutaciones. En negrita se resaltan valores significativos.

Anexo S. Resultados de las pruebas por pares del PerMANOVA de longitud post oral para el experimento de desarrollo larval.

Día	Tratamientos	t	P(perm)
1 días	26 °C - 22 °C	6.211	0.0002
	26 °C - 18 °C	12.572	0.0002
	26 °C - 14 °C	19.854	0.0002
	22 °C - 18 °C	6.6564	0.0002
	22 °C - 14 °C	13.018	0.0002
	18 °C - 14 °C	5.3623	0.0002
3 días	26 °C - 22 °C	3.0883	0.0038

	26 °C - 18 °C	8.6602	0.0002
	26 °C - 14 °C	11.765	0.0002
	22 °C - 18 °C	11.66	0.0002
	22 °C - 14 °C	17.495	0.0002
	18 °C - 14 °C	7.9888	0.0002
5 días	26 °C - 22 °C	2.272	0.024
	26 °C - 18 °C	9.6933	0.0002
	26 °C - 14 °C	17.048	0.0002
	22 °C - 18 °C	6.8382	0.0002
	22 °C - 14 °C	13.915	0.0002
7 días	18 °C - 14 °C	9.6736	0.0002
	26 °C - 22 °C	4.1274	0.0004
	26 °C - 18 °C	7.7029	0.0002
	26 °C - 14 °C	18.422	0.0002
	22 °C - 18 °C	2.3633	0.0204
9 días	22 °C - 14 °C	10.863	0.0002
	18 °C - 14 °C	11.37	0.0002
	26 °C - 22 °C	3.8416	0.0006
	26 °C - 18 °C	6.7737	0.0002
	26 °C - 14 °C	14.092	0.0002
11 días	22 °C - 18 °C	3.6382	0.0004
	22 °C - 14 °C	14.108	0.0002
	18 °C - 14 °C	10.043	0.0002
	26 °C - 22 °C	1.1273	0.2618
	26 °C - 18 °C	4.3661	0.0004
13 días	26 °C - 14 °C	9.9778	0.0002
	22 °C - 18 °C	3.4328	0.002
	22 °C - 14 °C	11.179	0.0002
	18 °C - 14 °C	9.1503	0.0002
	26 °C - 22 °C	0.58621	0.5586
15 días	26 °C - 18 °C	0.30371	0.768
	26 °C - 14 °C	5.2856	0.0002
	22 °C - 18 °C	0.40502	0.701
	22 °C - 14 °C	6.0098	0.0002
	18 °C - 14 °C	6.9442	0.0002
	26 °C - 22 °C	0.26413	0.79
	26 °C - 18 °C	2.1206	0.0366
	26 °C - 14 °C	1.7057	0.0916
	22 °C - 18 °C	2.9733	0.0044
	22 °C - 14 °C	2.3674	0.0212
	18 °C - 14 °C	5.3891	0.0002

17 días	26 °C - 22 °C	0.53441	0.5954
	26 °C - 18 °C	0.90116	0.3814
	26 °C - 14 °C	9.02E-04	1
	22 °C - 18 °C	1.6681	0.1074
	22 °C - 14 °C	0.74309	0.4774
	18 °C - 14 °C	1.0859	0.2874
19 días	26 °C - 22 °C	0.37431	0.7182
	26 °C - 18 °C	0.79575	0.4286
	26 °C - 14 °C	1.096	0.2768
	22 °C - 18 °C	1.4539	0.15
	22 °C - 14 °C	1.8884	0.0658
	18 °C - 14 °C	0.4985	0.6204

t: valor de la prueba t; P(Perm): valor de p con permutaciones. En negrita se resaltan los valores significativos.

Anexo T. Resultados de la prueba general de PerMANOVA de proporción LPO:LMC para el experimento de desarrollo larval.

Fuente	gl	SC	MC	Pseudo-F	P(perm)
Temperatura	3	52.177	17.392	48.125	0.0002
Tiempo	9	161.37	17.93	49.612	0.0002
Temperatura × Tiempo	27	73.044	2.9276	8.1006	0.0002
Residuales	1033	373.33	0.3614		
Total	1072	692.15			

gl: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; MC: media cuadrática; P(perm): valor de p calculado con permutaciones. En negrita se resaltan valores significativos.

Anexo U. Resultados de las pruebas por pares del PerMANOVA de la proporción LPO:LMC para el experimento de desarrollo larval.

Día	Tratamientos	t	P(perm)
1 días	26 °C - 22 °C	5.6818	0.0002

	26 °C - 18 °C	9.8242	0.0002
	26 °C - 14 °C	15.682	0.0002
	22 °C - 18 °C	3.8898	0.0002
	22 °C - 14 °C	8.9283	0.0002
	18 °C - 14 °C	4.8057	0.0002
3 días	26 °C - 22 °C	2.6328	0.0104
	26 °C - 18 °C	6.3379	0.0002
	26 °C - 14 °C	9.3879	0.0002
	22 °C - 18 °C	7.4554	0.0002
	22 °C - 14 °C	13.888	0.0002
	18 °C - 14 °C	7.2194	0.0002
5 días	26 °C - 22 °C	0.32533	0.7516
	26 °C - 18 °C	4.9331	0.0002
	26 °C - 14 °C	8.6747	0.0002
	22 °C - 18 °C	6.7651	0.0002
	22 °C - 14 °C	11.725	0.0002
	18 °C - 14 °C	5.2471	0.0002
7 días	26 °C - 22 °C	2.7226	0.0072
	26 °C - 18 °C	5.9234	0.0002
	26 °C - 14 °C	10.872	0.0002
	22 °C - 18 °C	3.0234	0.0036
	22 °C - 14 °C	8.2343	0.0002
	18 °C - 14 °C	6.5685	0.0002
9 días	26 °C - 22 °C	4.24E-03	0.996
	26 °C - 18 °C	3.2733	0.0018
	26 °C - 14 °C	6.2199	0.0002
	22 °C - 18 °C	3.3616	0.0018
	22 °C - 14 °C	6.4069	0.0002
	18 °C - 14 °C	4.8776	0.0002
11 días	26 °C - 22 °C	0.24877	0.7966
	26 °C - 18 °C	3.6954	0.001
	26 °C - 14 °C	5.6477	0.0002
	22 °C - 18 °C	3.6057	0.0008
	22 °C - 14 °C	6.0225	0.0002
	18 °C - 14 °C	4.0807	0.0004
13 días	26 °C - 22 °C	2.2955	0.024
	26 °C - 18 °C	2.3806	0.017
	26 °C - 14 °C	0.19307	0.8544
	22 °C - 18 °C	0.44806	0.643
	22 °C - 14 °C	3.1655	0.0034
	18 °C - 14 °C	3.3616	0.0016

15 días	26 °C - 22 °C	1.19E-03	1
	26 °C - 18 °C	1.831	0.0736
	26 °C - 14 °C	0.11064	0.9102
	22 °C - 18 °C	2.4446	0.0188
	22 °C - 14 °C	0.17839	0.8538
	18 °C - 14 °C	2.9761	0.0048
17 días	26 °C - 22 °C	0.30387	0.7668
	26 °C - 18 °C	1.3102	0.1876
	26 °C - 14 °C	1.5734	0.1262
	22 °C - 18 °C	1.2059	0.2424
	22 °C - 14 °C	1.9566	0.0552
	18 °C - 14 °C	0.49211	0.6236
19 días	26 °C - 22 °C	0.5477	0.6002
	26 °C - 18 °C	0.30432	0.7736
	26 °C - 14 °C	0.94635	0.3534
	22 °C - 18 °C	1.2492	0.2236
	22 °C - 14 °C	2.0636	0.0468
	18 °C - 14 °C	1.174	0.248

t: valor de la prueba t; P(Perm): valor de p con permutaciones. En negrita se resaltan los valores significativos.

Anexo V. Resultados de la prueba general de PerMANOVA del volumen del estómago para el experimento de desarrollo larval.

Fuente	gl	SC	MC	Pseudo-F	P(perm)
Temperatura	3	2.17×10^9	7.23×10^8	46.044	0.0002
Tiempo	9	4.35×10^9	4.84×10^8	30.805	0.0002
Temperatura × Tiempo	27	3.12×10^9	1.16×10^8	7.3705	0.0002
Residuales	1033	1.62×10^{10}	1.57×10^7		
Total	1072	2.64×10^{10}			

gl: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; MC: media cuadrática; P(perm): valor de p calculado con permutaciones. En negrita se resaltan valores significativos.

Anexo W. Resultados de las pruebas por pares del PerMANOVA del volumen del estómago para el experimento de desarrollo larval.

Día	Tratamientos	t	P(perm)
1 días	26 °C - 22 °C	0.58673	0.753
	26 °C - 18 °C	8.26	0.0002
	26 °C - 14 °C	9.4884	0.0002
	22 °C - 18 °C	2.3882	0.0002
	22 °C - 14 °C	2.7217	0.0002
	18 °C - 14 °C	2.0811	0.0388
3 días	26 °C - 22 °C	1.4622	0.149
	26 °C - 18 °C	2.7852	0.0064
	26 °C - 14 °C	3.5377	0.0006
	22 °C - 18 °C	1.8681	0.0632
	22 °C - 14 °C	3.252	0.0016
	18 °C - 14 °C	2.2941	0.0258
5 días	26 °C - 22 °C	1.7153	0.1018
	26 °C - 18 °C	4.0274	0.0002
	26 °C - 14 °C	6.2386	0.0002
	22 °C - 18 °C	2.6984	0.01
	22 °C - 14 °C	5.6366	0.0002
	18 °C - 14 °C	3.5543	0.0006
7 días	26 °C - 22 °C	3.4999	0.0008
	26 °C - 18 °C	5.1628	0.0002
	26 °C - 14 °C	6.2223	0.0002
	22 °C - 18 °C	3.0767	0.0024
	22 °C - 14 °C	5.5756	0.0002
	18 °C - 14 °C	4.3597	0.0002
9 días	26 °C - 22 °C	3.6527	0.0008
	26 °C - 18 °C	4.4651	0.0002
	26 °C - 14 °C	4.4392	0.0002
	22 °C - 18 °C	2.3781	0.02
	22 °C - 14 °C	4.4837	0.0002
	18 °C - 14 °C	3.5585	0.0002
11 días	26 °C - 22 °C	1.5564	0.1344
	26 °C - 18 °C	3.1824	0.0004
	26 °C - 14 °C	3.4607	0.0004
	22 °C - 18 °C	2.4782	0.0026
	22 °C - 14 °C	3.8983	0.0002
	18 °C - 14 °C	7.6187	0.0002
13 días	26 °C - 22 °C	2.5508	0.0114

	26 °C - 18 °C	3.436	0.0002
	26 °C - 14 °C	4.1096	0.0002
	22 °C - 18 °C	0.90165	0.3728
	22 °C - 14 °C	5.1001	0.0002
	18 °C - 14 °C	6.725	0.0002
15 días	26 °C - 22 °C	1.8435	0.0708
	26 °C - 18 °C	1.4953	0.1472
	26 °C - 14 °C	3.3353	0.0006
	22 °C - 18 °C	1.4958	0.1372
	22 °C - 14 °C	4.424	0.0002
	18 °C - 14 °C	6.282	0.0002
17 días	26 °C - 22 °C	3.0264	0.0018
	26 °C - 18 °C	3.1962	0.0008
	26 °C - 14 °C	3.3986	0.0008
	22 °C - 18 °C	1.7617	0.0868
	22 °C - 14 °C	3.5517	0.0004
	18 °C - 14 °C	4.1059	0.0002
19 días	26 °C - 22 °C	1.1117	0.2706
	26 °C - 18 °C	0.7752	0.4422
	26 °C - 14 °C	4.1217	0.0002
	22 °C - 18 °C	0.59197	0.5646
	22 °C - 14 °C	4.4661	0.0002
	18 °C - 14 °C	5.192	0.0002

t: valor de la prueba t; P(Perm): valor de p calculado con permutaciones. En negrita se resaltan los valores significativos.