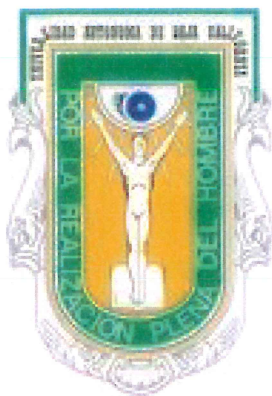


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



ESTRÉS TÉRMICO DURANTE EL DESARROLLO
ONTOGENÉTICO DEL ERIZO MORADO (*Strongylocentrotus*
***purpuratus*)**

TESIS

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

CLAUDIA PATRICIA GONZÁLEZ LOZANO

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. FEBRERO, 2010.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

ESTRÉS TÉRMICO DURANTE EL DESARROLLO
ONTOGENÉTICO DEL ERIZO MORADO (*Strongylocentrotus
purpuratus*)

TESIS

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

MAESTRO EN CIENCIAS

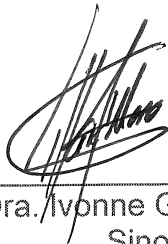
PRESENTA

CLAUDIA PATRICIA GONZÁLEZ LOZANO

Aprobada por:



Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte



Dra. Ivonne Giffard Mena
Sinodal



Dra. Gabriela Montañó Moctezuma
Sinodal

Resumen.

Los ecosistemas en el planeta están siendo afectados por el cambio climático global, éste provoca tanto mortandades como desplazamiento de especies a causa de los incrementos de temperatura. Escenarios de cambio climático en el caso extremo, pueden llegar a causar la pérdida de ecosistemas completos, ya que si una especie se extingue, puede provocar la mortandad de las especies que se alimentan de ella. Por esta razón es necesario documentar los efectos de los cambios de temperatura en diferentes especies. En el ambiente marino, el erizo morado de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*) representa un modelo biológico desde hace más de 100 años y junto con el erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*), constituyen una pesquería importante en Baja California, además de que sirven como alimento a diferentes especies marinas de interés comercial como la langosta. El erizo, habita tanto en el estrato intermareal como en el submareal. Estos estratos poseen características contrastantes; el submareal presenta condiciones de temperatura y humedad constantes, mientras que el intermareal está sujeto a los cambios de marea a lo largo de un día, con lo cual cambian drásticamente sus condiciones de temperatura y desecación. Para evaluar las diferencias en la respuesta al estrés térmico en el erizo morado, se utilizaron dos diseños experimentales; inicialmente, se evaluó la termotolerancia, sometiendo estadios larvarios y adultos a diferentes regímenes térmicos y registrando el porcentaje de supervivencia a diferentes tiempos. Se realizaron comparaciones de la respuesta de organismos del intermareal y del submareal. Asimismo, se analizaron los niveles de ácidos nucleicos mediante un cociente (RNA/DNA); este cociente se ha utilizado como un “proxi” para evaluar el estado fisiológico de los organismos. Los resultados obtenidos indicaron que las larvas

de erizo morado de 6 brazos parecen ser más susceptibles a los cambios de temperatura, por presentar un menor porcentaje de supervivencia, así como un menor cociente RNA/DNA. A su vez, los organismos adultos resultaron menos tolerantes que las larvas. Por último, las larvas de 6 brazos y los adultos que se obtuvieron del intermareal fueron más resistentes al estrés térmico que los del submareal. Lo anterior sugiere, que poblaciones de erizo morado del intermareal, están mejor adaptadas al estrés térmico y por lo tanto sean menos susceptibles a ser desplazadas en escenarios de cambio climático.

**A mi papi, a mi mommy y a Alain (mi esposo) que tanto
los quiero.**

Al Dr. Jorge de la Rosa.

Al Dr. Mario Vargas.

**A mis queridos profesores que me condujeron por este
camino:**

**M. C. Evarista Arellano, Dr. Faustino Camarena, Dr.
Carlos Márquez Becerra, Dr. Alejandro Martínez.**

Agradecimientos:

Al Dr. Eugenio Carpizo por todo el apoyo durante mi maestría, a pesar de estar siempre tan ocupado. A mis sinodales Ivonne y Gaby por su comprensión y sobre todo por sus sugerencias tan precisas y acertadas.

A todos los integrantes del Laboratorio de Biología del Desarrollo, especialmente a la Dra. Tatiana Olivares y a la Biól. Luvia García (muchísimas gracias, me encantó trabajar con ustedes).

Al Laboratorio de Ecología Molecular (todos los que en él laboran).

A mis compañeros de maestría: Dilayaxi, Natalie y Santiago.

A Christian Gilabert, Echánove, Iris, Karina y Lupita Lugo, Marisol Sánchez Magdaleno, Richie y Vale (a pesar de todo...) que tanto me apoyaron durante la realización de mi tesis.

A mis amigos de MEZA: Aldo, Blanquita, Niño y Julieta, Jonathan y Violeta (la Ñoña).

Al Dr. Roberto Martínez Gallardo.

A todos mis amigos de la Asociación de Biólogos de Ensenada (BIOENS) especialmente a Ricardo Eaton, Ana Luisa y Sergio, Isela, Celia, Roberto y Mónica.

A los n fantásticos (ya no son sólo 4): Jorge de la Rosa, Faustino Camarena, Francisco Correa, Yolanda Schramm, Luis Enríquez.

A Mario, a la profe Evarista y al profe Pedro.

Al Dr. Carlos Márquez Becerra por todo su apoyo e impulso para presentar mi proyecto en el congreso de genética (y por las recomendaciones).

Al Dr. Alejandro Martínez.

A la Dra. Nahara Ayala, al Dr. José Delgadillo y al Dr. Gorgonio Ruiz.

Un agradecimiento especial a las secretarias de la FC, FCM e IIO, en especial a Blanca Romero, Angélica y Yolanda.

A Karina y los del aula de cómputo del IIO.

A toda mi familia: mi tierno Papi (warum bist du gegangen?), mi tierna Mommy, Óscar, Alberto, Carlos, Aarón y Diro (Esther). A todos los babys (por recordarme que tengo que estudiar mucho antes de pensar en tener los propios).

A mi querido poso: Alain Gapriel. Gracias por aguantarme y entenderme, sobre todo en estos 2 años de maestría. Ah, y al Nicolás, la Julia y todos los nuestros demás babys.

A mis tíos y primos, especialmente a mis madrinas María y Raquel.

Agradezco profundamente a CONACYT por la beca otorgada.

ÍNDICE DEL TRABAJO

INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA.....	8
RESULTADOS.....	12
DISCUSIONES.....	25
CONCLUSIONES.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30
ANEXO I: ANOVA DE DOS VÍAS.....	35
ANEXO II: PROTOCOLOS.....	60

LISTA DE TABLAS

TABLA I: TERMOTOLERANCIA EN ADULTOS INTERMAREAL.....13

TABLA II: TERMOTOLERANCIA EN ADULTOS SUBMAREAL.....14

TABLA III: COCIENTES RNA/DNA DE ERIZO ADULTO.....15

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESTADIOS LARVARIOS DEL ERIZO DE MAR.....	3
FIGURA 2: CICLO DE VIDA DEL ERIZO DE MAR.....	4
FIGURA 3: SISTEMA DE EVALUACIÓN DE ERIZO ADULTO.....	10
FIGURA 4: COCIENTE RNA/DNA ADULTOS.....	16
FIGURA 5: TERMOTOLERANCIA EN LARVAS DE 6 BRAZOS.....	19
FIGURA 6: TERMOTOLERANCIA EN LARVAS DE 8 BRAZOS.....	20
FIGURA 7: COCIENTE RNA/DNA EN LARVAS DE 4 BRAZOS.....	21
FIGURA 8: COCIENTE RNA/DNA EN LARVAS DE 6 BRAZOS.....	22
FIGURA 9: COCIENTE RNA/DNA EN LARVAS DE 8 BRAZOS.....	23
FIGURA 10: COCIENTE RNA/DNA EN LARVAS COMPETENTE.....	24

INTRODUCCIÓN

El calentamiento global es un fenómeno que tiene como consecuencia un incremento de la temperatura media del planeta, tanto en ambientes terrestres como marinos. En los últimos años éste incremento se ha dado de manera exacerbada debido al efecto antropogénico (Reusch & Wood 2007; Harley et al., 2006; Osovitz & Hofmann 2005; Somero, 2005). Cuando ocurre este tipo de variación, las especies se ven afectadas fisiológicamente, y se ven forzadas a adaptarse a las nuevas condiciones del medio. Cuando una especie no logra adaptarse fisiológicamente debe desplazarse hacia zonas con condiciones de temperatura similares a las que se encontraba originalmente, de lo contrario, los individuos pueden llegar a perecer. De esta forma, algunas especies se desplazan provocando que algunos nichos queden libres y se reestructuren las interacciones entre los organismos (Martínez-Meyer, 2005).

Por otra parte, Somero (2002) documentó que cuando individuos de la misma especie se distribuyen en poblaciones distintas, pueden responder de forma diferente a las variaciones térmicas. Como ejemplo los moluscos del género *Tegula* donde se presentan diferencias en la tasa de crecimiento a lo largo del gradiente vertical desde la zona intermareal hasta el submareal. La población de organismos que vivían en zonas más altas (hacia la costa) crecían más lentamente y los que vivían en zonas más profundas crecían más rápidamente. Esto puede deberse a que los individuos del submareal no están sujetos a las condiciones de estrés térmico natural del intermareal.

La región intermareal resulta ser contrastante en el ambiente marino, ya que diariamente queda expuesta con las mareas bajas. Esto hace que las especies que habitan en esta zona estén sujetas a estrés térmico constante de forma natural. Por el contrario, los individuos que habitan

en el submareal permanecen cubiertos por agua y no se ven afectados por cambios tan amplios de temperatura (Hofmann, 1999).

El erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*) es una especie de equinodermo que habita en las costas de Baja California y vive tanto en la zona del intermareal como en la del submareal rocoso. Esta especie ha servido como modelo en diversas áreas de la biología, como son: la embriología, la evolución y la genética y su desarrollo larvario de 4 a 8 brazos y su ciclo de vida se ejemplifican en las Figuras 1 y 2 respectivamente. De hecho, representa uno de los modelos más estudiados en biología (Smith *et al.*, 2008; Gunaratne *et al.*, 2007; Hart, 2002). En contraste, el erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*), se encuentra en la zona submareal; y aunque es común encontrar reclutas de esta especie en la zona intermareal, los adultos migran al submareal, ya que su morfología no está adaptada a resistir el oleaje y la desecación características del intermareal durante marea baja.

Debido a su mayor tamaño, el erizo rojo ha sido explotado en alto grado en Baja California. Como consecuencia de la sobreexplotación del éste, el erizo morado ha expandido su distribución a la zona submareal en donde compite por espacio y alimento con el erizo rojo, desplazando sus poblaciones en algunas localidades de Baja California. Ambas especies son consumidores primarios, ya que se alimentan de macroalgas, principalmente de *Macrocystis pyrifera* (Palleiro-Nayar *et al.*, 2008; Salgado-Rogel & Palleiro-Nayar, 2008; Ramírez-Félix, 2000).

SEA URCHIN LARVAL STAGES

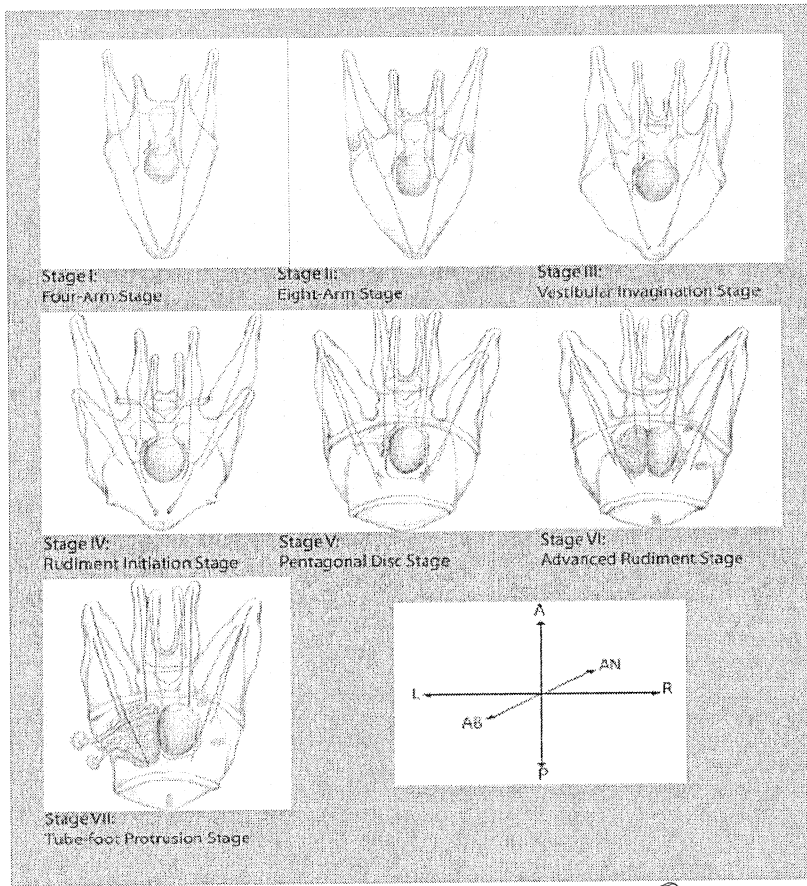


Figura 1. Estadios larvarios del erizo de mar: I. 4 brazos. II. 6 brazos. III-VII. 8 brazos. (Tomado de Smith et al., 2008).

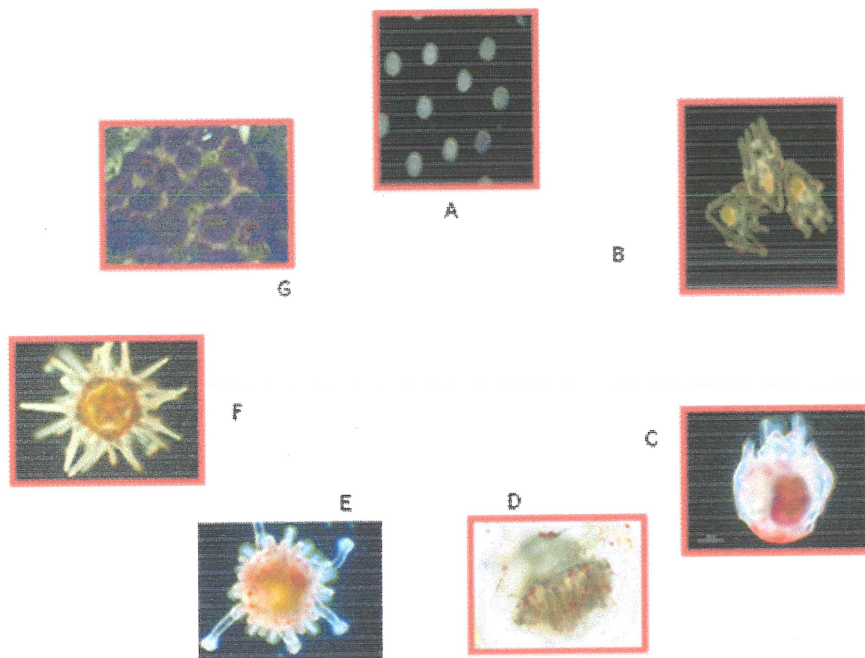


Figura 2. Ciclo de vida del erizo de mar: A) Fertilización. B) Larvas equinopluteus. C) Larvas competentes. D) Rudimento Juvenil evertido. E) Metamorfosis. F) Postlarva. G) Adultos. (Fotografías A y B, L. Díaz Pérez; D y G, E. Carpizo Ituarte y C, D y F G. Amador Cano).

Con las condiciones térmicas que se presentan en el intermareal, la respuesta al estrés térmico es un mecanismo crítico para amortiguar los efectos de las variaciones abruptas de temperatura (Dahlhoff et al., 2007). Existen numerosas técnicas que permiten estudiar la resistencia al estrés térmico en los organismos. Una primera aproximación es valorar la termotolerancia en condiciones extremas de temperatura. Por otra parte, metodologías basadas en la proporción de ácidos nucleicos, han sido ampliamente utilizadas y aplicadas con éxito en organismos marinos (Chícharo et al., 2008).

La termotolerancia es la resistencia de los organismos a cambios de temperatura hasta ciertos límites. Somero (2005) señala que los organismos adaptados a ambientes más cálidos viven más cerca de sus límites de termotolerancia comparado con aquellos de ambientes templados o fríos. Con esto, puede entenderse una temperatura máxima a partir de la cual los

organismos comienzan a perecer. Sin embargo, Terblanche et al. (2007) mencionan que la temperatura de inicio (antes de un enfriamiento o calentamiento), la tasa de cambio de temperatura y la duración de la exposición afectan al límite térmico crítico.

Por otra parte, la hipótesis de variabilidad climática predice que las especies con una mayor extensión de su distribución latitudinal tienen límites fisiológicos más amplios. En moluscos del género *Nucella*, se encontró que las larvas de distribuciones más sureñas resistían temperaturas más altas (teniendo como temperatura letal 33.9 °C) que las de distribuciones más norteñas (cuya temperatura letal correspondió a 30.1 °C (Zippay & Hofmann, 2009). Entender cómo varía la tolerancia al estrés ambiental entre poblaciones, sirve para predecir los efectos del cambio climático en especies localmente adaptadas a su ambiente abiótico (Kuo & Sanford, 2009).

En cuanto a la utilización de la proporción de ácidos nucleicos (ARN/ADN), ésta fue propuesta por primera vez en la década de los 70's como un indicador bioquímico del estado fisiológico y nutricional de los organismos en su ambiente natural, y ha sido aplicado con éxito en los organismos marinos (Chícharo *et al.*, 2008; Berdalet *et al.*, 2005). Este cociente representa una medida indirecta sensible al estrés en corto plazo debido a que la cantidad de ADN en la célula permanece constante, mientras que los niveles de ARN varían con respecto a distintos factores, primordialmente ambientales (Norkko *et al.*, 2005). Por lo tanto, la proporción de ácidos nucleicos resulta una herramienta eficiente para evaluar crecimiento, nutrición y estrés fisiológico (Caldarone *et al.*, 2006; 2005; Gorokhova, *et al.*, 2002). Para realizar una buena interpretación de este parámetro, es importante tomar en cuenta, que existen variaciones en esta proporción, asociadas a la fisiología, condición nutricional y distribución geográfica de los organismos. Al respecto, Satterwhite (2007) menciona que los individuos que se encuentran en

buena condición se caracterizan por tener niveles más altos de esta proporción que organismos en malas condiciones y que han estado sujetos a estrés. Dahlhoff (2004) menciona que esta herramienta proporciona resultados valiosos en organismos marinos, ya que es difícil determinar, de forma precisa, las tasas metabólicas de peces e invertebrados marinos en su medio ambiente.

Seibel et al. (2007) detectaron que las tasas metabólicas de los organismos cambian en gran escala dependiendo de su localización geográfica. Speekman (2005) señala que para adultos hembra del copépodo *Acartia tonsa*, el promedio de los cocientes en individuos alimentados fue de 8.9 ± 0.4 , mientras que para individuos no alimentados fue de 7.9 ± 0.4 . Caldarone et al. (2005) encontraron que en larvas bien alimentadas de *Melanogrammus aeglefinus* el cociente RNA/DNA iba de 2.9 a 4.5, mientras que en larvas en inanición el cociente llegó solamente a 1.4. Satterwhite (2007) menciona que el cociente RNA/DNA obtenido de larvas recién eclosionadas de *Gobiosoma bosc* fue de 8.41 ± 0.22 y que este valor fue disminuyendo desde el primer día hasta el final de los experimentos (8 y 10 días); sin embargo, las larvas con menor densidad de alimento mostraron un menor cociente que aquéllas con la mayor densidad. En las larvas (de entre 4 y 9 días después de la eclosión) del pez *Clupea harengus*, se tiene un rango de 0.2 a 1.3 en peces no alimentados y con alimento, respectivamente (Malzahn et al., 2007). En postlarvas de langostino (*Macrobrachium rosenbergii*), se registraron valores del cociente RNA/DNA de 2.14 ± 0.055 , 1.56 ± 0.119 y 1.18 ± 0.283 para tres diferentes dietas comerciales (Luna et al., 2007). Vinagre et al. (2008) encontraron que para juveniles de *Solea solea* en un hábitat profundo fue de 2.9, mientras que para *S. senegalensis* fue de 4.01 en el mismo hábitat y de 3.50 para un hábitat más superficial.

El objetivo del presente trabajo es comparar la respuesta a cambios de temperatura de las poblaciones de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* del intermareal rocoso, con aquéllas

del submareal. La respuesta es evaluada a partir de estudios de termotolerancia y mediante la cuantificación del cociente RNA/DNA de los ácidos nucleicos de organismos en condiciones de estrés en distintos tratamientos de temperatura y expuestos durante diferentes períodos de tiempo.

METODOLOGÍA

Se realizaron dos salidas de campo al ejido Eréndira, Baja California, México (31° 19' 15.9" LN y 116° 26' 7.9" LW) donde se recolectaron aproximadamente 80 individuos adultos de erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*), 40 del intermareal (zona expuesta durante la marea baja) y 40 del submareal (a partir del nivel más bajo de marea). Los organismos, se colocaron en hieleras que contenían algas y fueron transportados al laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC. Una vez en el laboratorio, se colocaron en tanques de fibra de vidrio, donde permanecieron con circulación de agua de mar y aireación constante hasta su utilización en los experimentos. De cada estrato se tomaron 24 individuos para realizar las pruebas de termotolerancia y cuantificación de ácidos nucleicos. Los individuos restantes se utilizaron para realizar desoves y obtener diferentes estadios larvales con los que se realizaron los experimentos de termotolerancia.

Los desoves se llevaron a cabo utilizando los organismos adultos maduros provenientes de la misma zona (intermareal o submareal). Se tomó sólo una pareja de cada zona para cada desove, se realizó un desove por pareja con 6 parejas por zona. El desove se indujo mediante una inyección de 2 ó 3 mL de KCl (0.53 M) en la cavidad perivisceral, introduciendo la aguja alrededor de la región bucal del erizo. Una vez realizada la fertilización, los cigotos se colocaron en cubetas de 18 L sin aeración, las cuales se mantuvieron semicubiertas con plástico por un periodo de aproximadamente 2 días. Una vez que los embriones alcanzaron el estadio larval de prisma, las larvas fueron cuantificadas y se colocaron en tanques de 45 L con una densidad de 4 larvas por mL y aireación constante. La temperatura del cultivo se mantuvo entre 17 y 20° C, con un promedio de 18°C, durante el tiempo de cultivo de las larvas.

Para los experimentos de termotolerancia en adultos se colocaron 4 tratamientos de temperatura: 13, 20, 26 y 29 °C. Cada tratamiento consistió en introducir 6 erizos, de entre 45 y 65 mm de diámetro de testa, en un recipiente circular, de forma equidistante, con disposición hexagonal (Figura 3a). A cada uno de los 6 erizos de cada recipiente se le colocó una marca para poder ubicar individualmente su desplazamiento. Se monitoreó el comportamiento como “proxi” del estado fisiológico de cada individuo considerando su morfología, grado de movilidad y posición en el tanque, de acuerdo a los criterios descritos por Hernández et al., (2004). Este autor menciona que los individuos ubicados en las paredes del recipiente se encuentran en estado óptimo y éste va disminuyendo hasta que el erizo queda inmóvil y al fondo del recipiente (Ver figura 3b). Se realizaron evaluaciones a 1, 4 y 8 horas de exposición a cada temperatura.

Una vez evaluado el comportamiento de los erizos se tomaron muestras de pies ambulacrales de acuerdo con lo descrito por Osovitz & Hofmann (2005). Se tomaron muestras de 3 individuos por recipiente después de haber estado expuestos durante 1 hora al tratamiento de temperatura correspondiente. Cada muestra de pies ambulacrales se colocó en un tubo de 1.5 mL y se agregaron 100 µl de TRIzol[®] (Invitrogen, C.A., EUA). Posteriormente se maceró el tejido y se procedió con la extracción de RNA y DNA total a partir de la misma muestra, según el protocolo de Invitrogen, con algunas modificaciones (Ver protocolo en Anexo II). La cantidad de RNA y DNA para cada muestra se cuantificó con ayuda del espectrofotómetro Nanodrop[®]. El cociente RNA/DNA a lo largo del texto, esta referido en el caso de las larvas, en relación con X microlitos de larvas concentradas en un tubo Eppendorf y en el caso de adultos en relación a X número de pies ambulacrales.

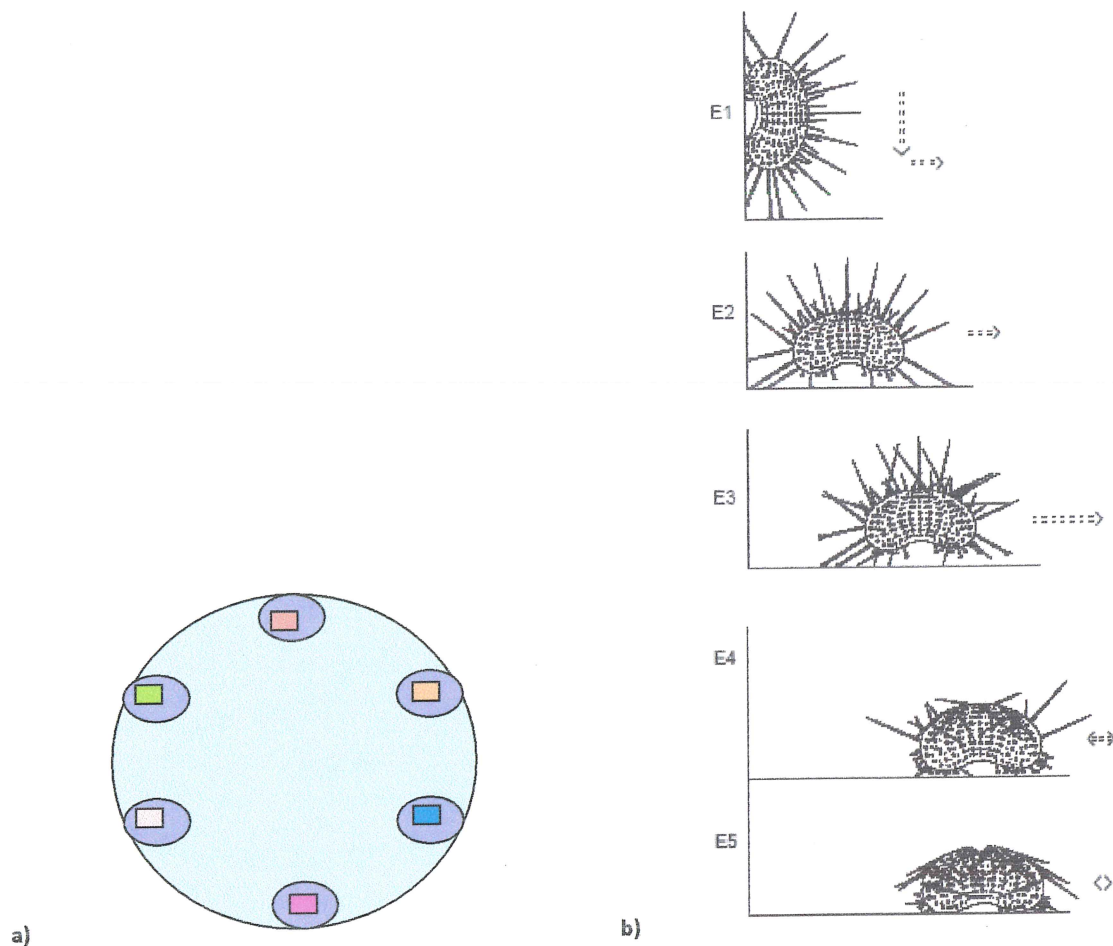


Figura 3. Sistema de evaluación: a) Posicionamiento de los organismos al iniciar el experimento. b) Clasificación de calidad del erizo, a mayor calidad se ubica en las paredes del recipiente, con espinas y pies móviles (E1). A menor calidad llega hasta el punto de inactividad total, al fondo del recipiente y con evidente pérdida de firmeza en la espinas (E5) (Tomado de Hernández et al., 2004).

Para los experimentos de termotolerancia en larvas se monitoreó periódicamente el estadio larvario durante su desarrollo en los tanques de cultivo y se seleccionaron las larvas equinopluteus de seis (13 días de edad a partir de la fertilización) y ocho brazos (19 días). De los cultivos existentes, se tomaron 540 larvas para cada experimento provenientes de adultos del intermareal o del submareal. Cada experimento consistió en 5 tratamientos de temperatura (13, 20, 23, 26 y 29 °C). Se evaluó el porcentaje de supervivencia en cada tratamiento a 1, 3, 6 y 24

horas de ser introducidas las larvas en los recipientes en cada tratamiento y para cada estadio. Los experimentos se realizaron en cajas de poliestireno de 6 pozos, donde se colocaron tres réplicas de cada estrato. A los pozos se les agregaron 5 mL de agua de mar filtrada y esterilizada por medio de UV y en cada réplica se colocaron 30 larvas.

En forma paralela, se realizaron los experimentos para cuantificar el cociente RNA/DNA en los distintos tratamientos de estrés. Estos se realizaron en vasos de plástico (300 mL capacidad), con agua de mar filtrada y esterilizada con luz UV y que contenían hasta la mitad de su capacidad (150 mL). Estos vasos se mantuvieron sumergidos en charolas a 4 temperaturas, con lo que se generaron tratamientos a 13, 20, 26 y 29 °C con 3 réplicas por tratamiento. Las larvas se colocaron en los recipientes a una densidad de 5 larvas por mL. Se estableció un último tratamiento a 4 °C introduciendo la charola con 3 réplicas a un refrigerador para poder evaluar la respuesta de las larvas al estrés por frío en condiciones extremas de temperatura. Después de una hora, se concentraron las larvas tamizándolas con ayuda de una criba con luz de malla de 80 μm y fueron transferidas de cada vaso a un tubo de 600 μL . Posteriormente se centrifugaron a 2000 x g por 5 minutos para remover el sobrenadante de agua. Una vez removida el agua, se añadieron 100 μL de TRIzol[®] a cada tubo y se siguieron los protocolos de extracción de RNA y DNA de acuerdo con el fabricante.

Para el análisis estadístico se realizó inicialmente una prueba de normalidad y homocedasticidad. Los datos pasaron la prueba de homocedasticidad pero no la de normalidad. Para poder trabajar con pruebas paramétricas (ANOVA de dos vías) se realizó una transformación jerárquica (RANK, recomendada para la prueba de ANOVA de dos vías). El ANOVA de dos vías se utilizó para evaluar diferencias significativas entre estrato y temperatura en los diferentes rangos de edad, así como temperatura y edad para ambos estratos por separado.

RESULTADOS

En los experimentos de termotolerancia realizados con individuos adultos detectamos diferencias en la resistencia según la zona de donde provenían los adultos. Los individuos, tanto del intermareal (Tabla I) como del submareal (Tabla II) no presentaron diferencias visibles en su comportamiento en el tratamiento a 13 °C hasta el final del experimento. Todos los individuos presentaban las espinas y los pies ambulacrales muy móviles y se localizaban tanto en las paredes como en el fondo del recipiente. El tratamiento con la temperatura de 20 °C resultó letal para los erizos del submareal después de haber estado expuestos por 8 horas. En contraste, los organismos del intermareal en el mismo tratamiento, presentaron una condición tipo E1 (con espinas y pies ambulacrales muy móviles, en las paredes del recipiente) y E2 (con espinas y pies ambulacrales muy móviles, al fondo del recipiente).

En el caso de los organismos que provenían del submareal, para los tratamientos de 26 °C y 29 °C, los erizos perecieron a la hora 4 y 1 respectivamente. En contraparte, los organismos provenientes del intermareal perecieron a la hora 4 para ambos tratamientos. Asimismo, para los individuos del submareal, se registró el desove del 100% de los organismos en el tratamiento a 26 °C transcurridas 4 horas de iniciado el experimento. A 20 °C, desovaron tres individuos antes de 8 horas y a 29 °C sólo un individuo desovó. En el intermareal, los organismos expuestos a 26 y 29° C desovaron antes de la hora 4 de iniciado el experimento (4 y 6 individuos respectivamente). Estos experimentos, mostraron que existe una diferencia de respuesta al estrés entre los individuos provenientes del submareal e intermareal, ya que sólo los organismos del intermareal sobrevivieron a 20 °C e incluso soportaron las temperaturas de 26 y 29 °C por mayor tiempo que aquéllos del submareal.

Tabla I. Evaluación de erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*) adulto del intermareal a diferentes tiempos de evaluación en los distintos tratamientos de temperatura.

Temperatura \ Tiempo	13°	20°	26°	29°
1h	Muy móviles. Pegados al fondo y a las paredes del recipiente. E1 y E2	Muy móviles. Pegados al fondo y a las paredes del recipiente. E1 y E2	No mueven las espinas. Pies ambulacrales pegados al fondo. E4	No mueven las espinas. Pies ambulacrales pegados al fondo. 1 desovó. E4
4h	Muy móviles. Pegados al fondo y a las paredes del recipiente. E1 y E2	Muy móviles. Pegados al fondo y a las paredes del recipiente. E1 y E2	Todos muertos. 4 desovaron. E5	Todos muertos. Todos desovaron. E5
8h	Muy móviles. Pegados al fondo y a las paredes del recipiente. E1 y E2	Muy móviles. Pegados al fondo y a las paredes del recipiente. E1 y E2		

Tabla II. Evaluación de erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*) adulto del submareal a diferentes tiempos de evaluación en distintos tratamientos de temperatura.

Temperatura \ Tiempo	13°	20°	26°	29°
1h	Muy móviles. Pegados al fondo y a las paredes del recipiente. E1 y E2	No mueven las espinas. Pies ambulacrales pegados al fondo. E4	No mueven las espinas. Pies ambulacrales pegados al fondo. E4	Todos muertos. 1 desovó. E5
4h	Muy móviles. Pegados al fondo y a las paredes del recipiente. E1 y E2	Móviles. 1 pegado en la pared y el resto al fondo del recipiente. E1 y E3	Todos muertos. Todos desovaron. E5	
8h	Muy móviles. Pegados al fondo y a las paredes del recipiente. E1 y E2	Todos muertos. 3 desovaron. E5		

El cociente de RNA/DNA a partir de los experimentos de termotolerancia en adultos (ver Tabla III), no indicó diferencias de respuesta al estrés térmico en los diferentes tratamientos. Sin embargo, sí se presentaron diferencias significativas entre estratos. Los individuos sin estresar de ambos estratos presentaron cocientes bajos; 0.132 ± 0.00172 para el submareal y 0.22 ± 0.108 para el intermareal. En los diferentes tratamientos de temperatura, para los organismos del

submareal, todos los valores fueron menores a 0.5, mientras que para los adultos del intermareal, todos los valores fueron mayores a 0.99. El caso más contrastante fue el tratamiento de 20 °C donde se presentan diferencias significativas más amplias en el cociente entre los individuos del submareal (con un promedio de 0.09 ± 0.007) y los del intermareal (con un promedio de 1.4 ± 0.3) (Figura 4).

Los ensayos de termotolerancia en larvas, mostraron un decremento en la supervivencia a los 26 °C después de un tiempo de exposición de 24 horas. Sin embargo, a los 29 °C, las larvas no resistieron más allá de 3 horas de exposición continua a esa temperatura. En los tratamientos de 16, 20 y 23°C, la supervivencia de las larvas de 6 brazos provenientes de adultos del intermareal, disminuyó al aumentar las horas de exposición; por el contrario, en las larvas del submareal la sobrevivencia no disminuyó bajo los tres tratamientos (16, 20 y 23°C) (Fig. 4). La mayor supervivencia se registró en el tratamiento de 13 °C. Asimismo, en el tratamiento de 23 °C, se encontró un mayor porcentaje de sobrevivientes que a 20 °C. La población de larvas obtenida de progenitores del submareal también mostró mayor supervivencia a 23 °C que a 20 °C, y el tratamiento de 13° C resultó en una mayor mortalidad que los dos anteriores.

Tabla III. Cocientes RNA/DNA obtenidos de erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*) adulto del submareal e intermareal en ausencia y presencia de estrés.

	Submareal (RNA/DNA)	Intermareal (RNA/DNA)
Sin estrés	0.132 ± 0.00172	0.22 ± 0.108
Promedio de tratamientos	<0.5	>0.99
Tratamiento extremo (20 °C)	0.09 ± 0.007 (Estrés)	1.4 ± 0.3 (Buena condición)

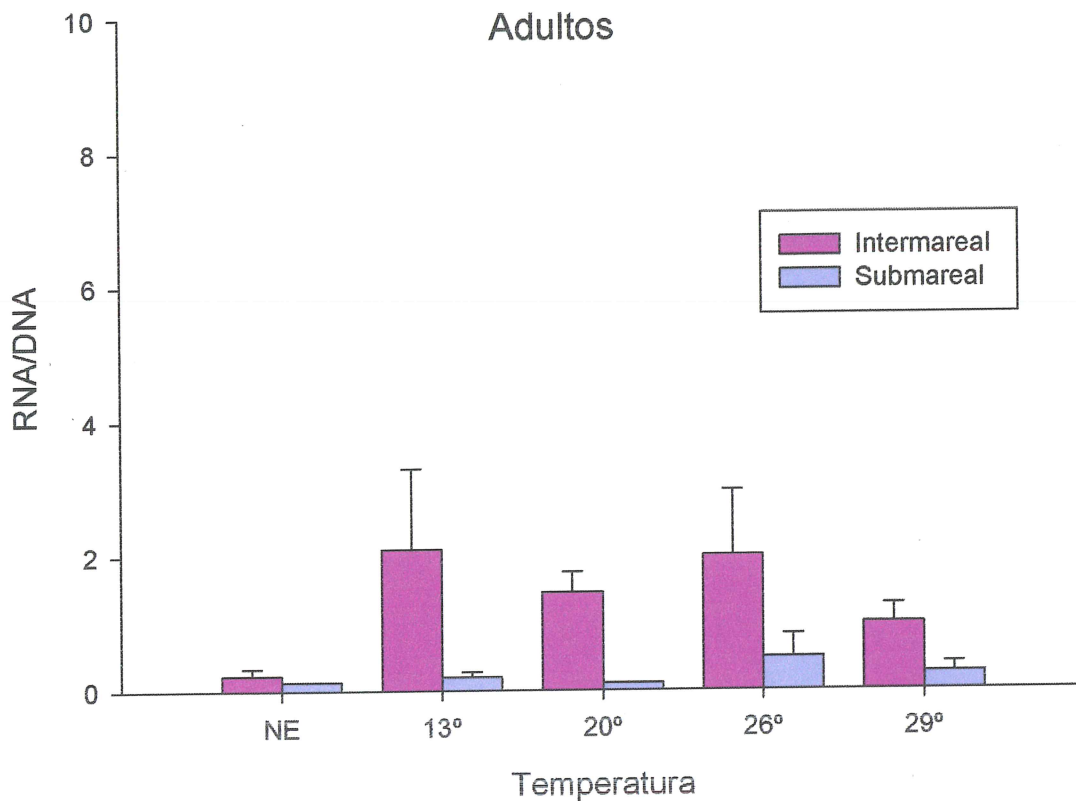


Figura 4. Cociente RNA/DNA obtenido a partir de organismos adultos de erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*) sometidos a diferentes temperaturas (indicadas en cada punto). Cada barra indica la media obtenida a partir de 3 valores, mientras que las líneas verticales representan el error estándar. NE: Sin estresar.

Las larvas de 8 brazos del intermareal presentaron mayor resistencia que el estadio anterior, ya que los tratamientos de 13, 20 y 23 °C tuvieron una supervivencia cercana o igual al 100%. Para los individuos del submareal, la supervivencia en estos tres tratamientos fue muy similar entre ellos (66.6 %) y únicamente se observó una disminución en la supervivencia a las 24 horas en todos los tratamientos (Fig. 6).

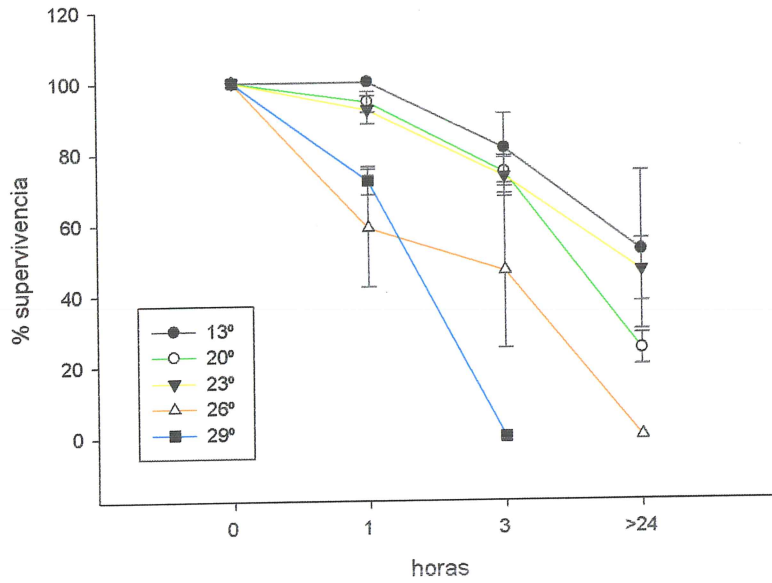
En las larvas de erizo, no se encontraron diferencias significativas en los valores de los cocientes RNA/DNA entre los diferentes tratamientos de temperatura y sólo los individuos de 6

brazos (figura 8) mostraron diferencias significativas entre estratos. Asimismo, este estadio presentó el menor valor de los cocientes RNA/DNA donde los promedios de todos los tratamientos fueron menores a 0.8. Los valores de este cociente para las larvas de 4 brazos fluctuaron entre 0.5 y 6, aunque estas fluctuaciones no produjeron diferencias significativas. Para el caso de las larvas de 8 brazos del intermareal, los valores más altos (0.89 ± 0.708) del cociente RNA/DNA se presentaron en el tratamiento de 13 °C; por el contrario, los valores más bajos (7.2 ± 2.45) se observaron a 20° C (Fig. 9). Todos los demás tratamientos para este estadio mostraron cocientes entre 1 y 4. En las larvas competentes todos los promedios del cociente RNA/DNA fluctuaron entre 1 y 2.53.

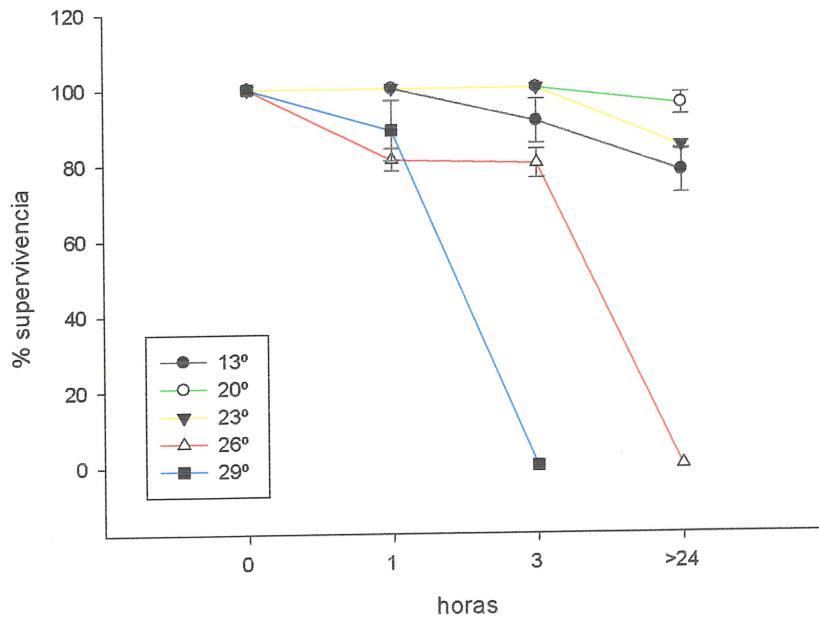
En la evaluación por estrato, para el caso del intermareal, se registraron diferencias significativas en el cociente RNA/DNA entre el estadio de 6 brazos y todos los demás estadios, incluyendo los adultos. Sin embargo, para el submareal el estadio de 6 brazos presentó diferencias significativas con los demás estadios larvarios, pero no con los adultos. De la misma forma, para las larvas obtenidas de erizos provenientes del intermareal, las larvas de 8 brazos (figura 9) no presentaron diferencias significativas con las larvas de 4 brazos (figura 7), larvas competentes (figura 10) y adultos; mientras que en el submareal, mostraron diferencias significativas con todos los estadios, excepto con el estadio de larva competente.

Comparando los resultados de termotolerancia con los resultados moleculares, observamos que para el tratamiento de 20 °C en adultos, se presentó la mayor diferencia de los cocientes. En estos tratamientos, la supervivencia fue diferente a 8 horas entre los tratamientos de adultos provenientes del intermareal y submareal. Los individuos del intermareal sobrevivieron hasta el final del experimento de termotolerancia; en contraste con los organismos del submareal, los cuales no resistieron este período de tiempo. Por el contrario, las larvas de 6

brazos del submareal presentaron una mayor supervivencia, pero una menor proporción de ácidos nucleicos.

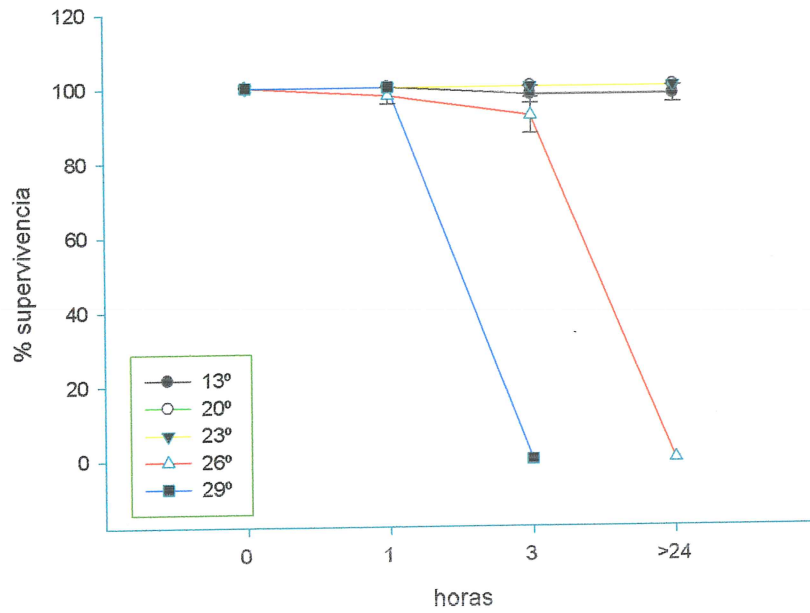


a)

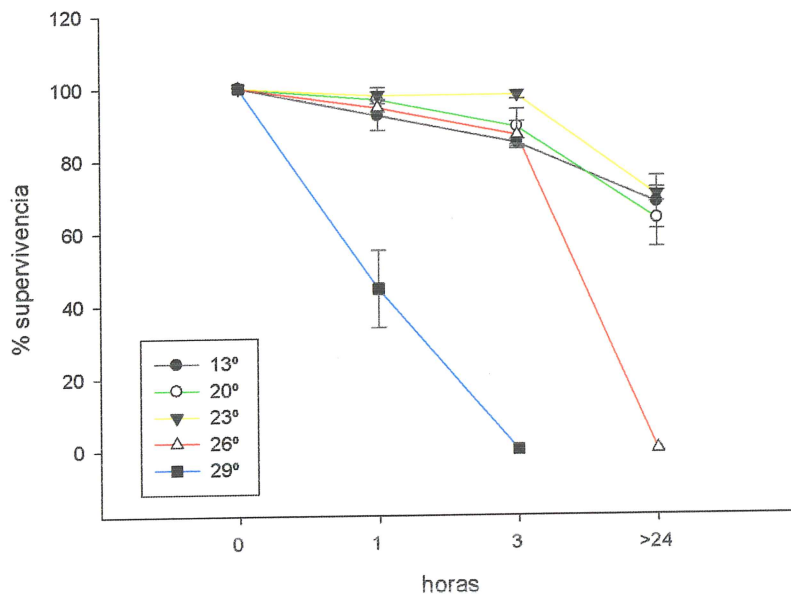


b)

Figura 5. Análisis de termotolerancia en larvas de 6 brazos provenientes de progenitores del intermareal (a) y submareal (b). Se contaron las larvas vivas observadas en diferentes tiempos de exposición a 5 tratamientos independientes de temperatura. Cada punto indica la media obtenida de 3 réplicas y las líneas verticales indican el error estándar. $n=30$. $p<0.05$. Tratamientos mostrados en °C.



a)



b)

Figura 6. Análisis de termotolerancia en larvas de 8 brazos de los estratos intermareal (a) y submareal (b). Se contaron las larvas vivas observadas en diferentes tiempos de exposición a 5 tratamientos independientes de temperatura. Cada punto indica la media obtenida de 3 réplicas y las líneas verticales indican el error estándar. n=30. p<0.05. Tratamientos mostrados en °C.

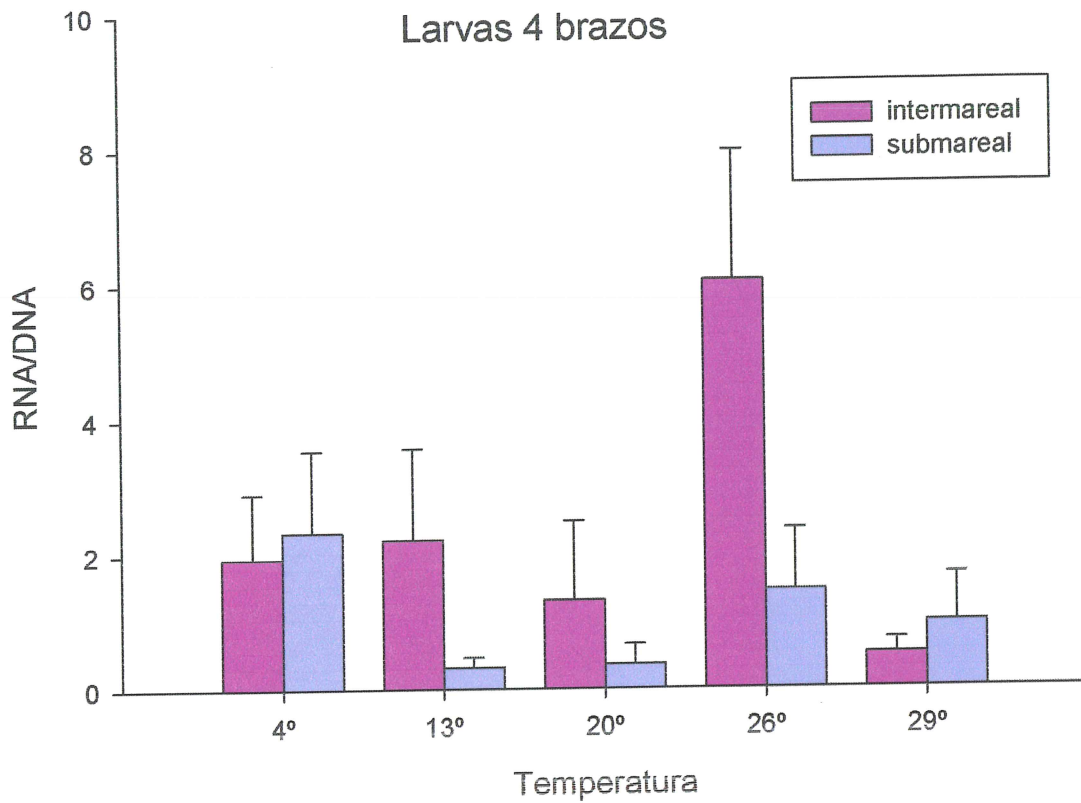


Figura 7. Cociente RNA/DNA obtenido a partir de larvas de 4 brazos de erizo morado de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*) sometidos a diferentes temperaturas (indicadas en cada punto). Cada barra indica la media obtenida a partir de 3 valores, mientras que las líneas verticales representan el error estándar resultante de éstos.

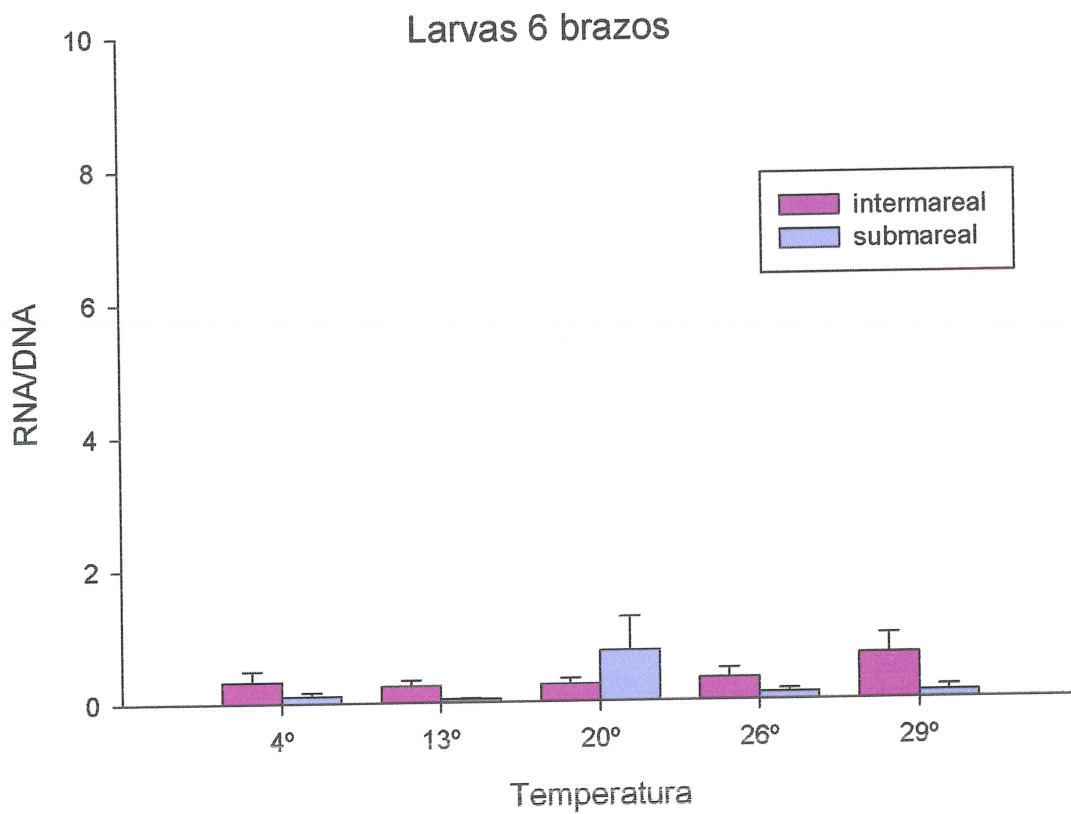


Figura 8. Cociente RNA/DNA obtenido a partir de larvas de 6 brazos de erizo morado de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*) sometidos a diferentes temperaturas (indicadas en cada punto). Cada barra indica la media obtenida a partir de 3 valores, mientras que las líneas verticales representan el error estándar resultante de éstos.

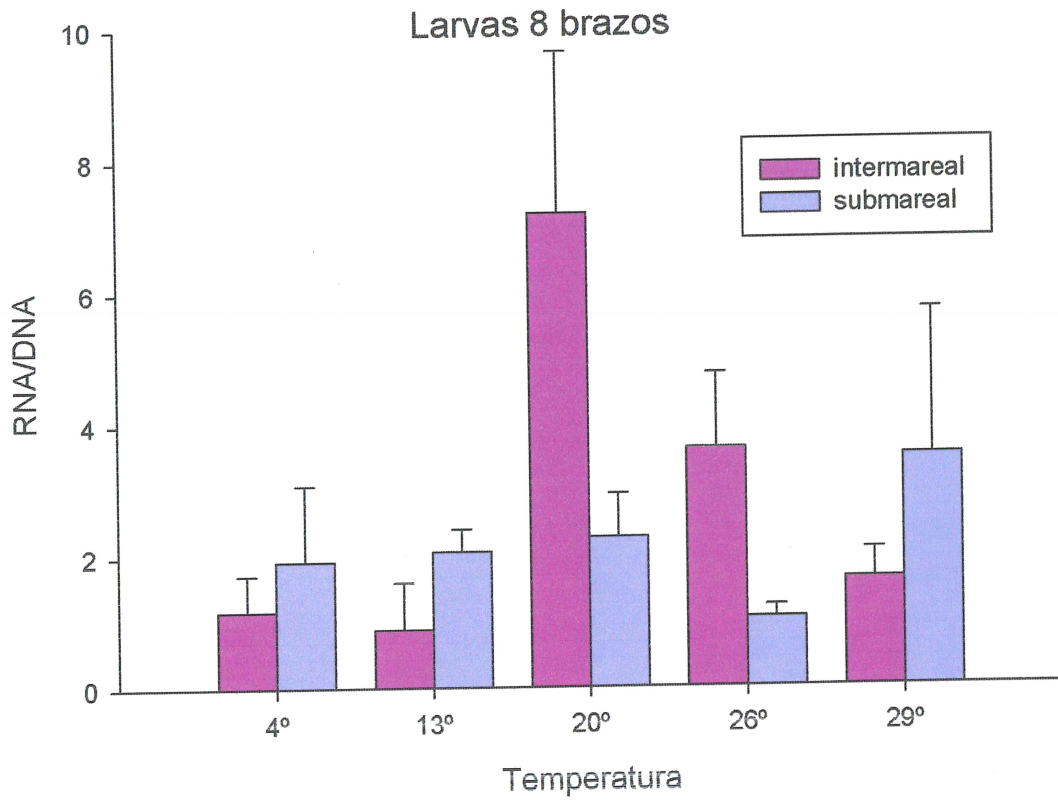


Figura 9. Cociente RNA/DNA obtenido a partir de larvas de 8 brazos de erizo morado de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*) sometidos a diferentes temperaturas (indicadas en cada punto). Cada barra indica la media obtenida a partir de 3 valores, mientras que las líneas verticales representan el error estándar resultante de éstos.

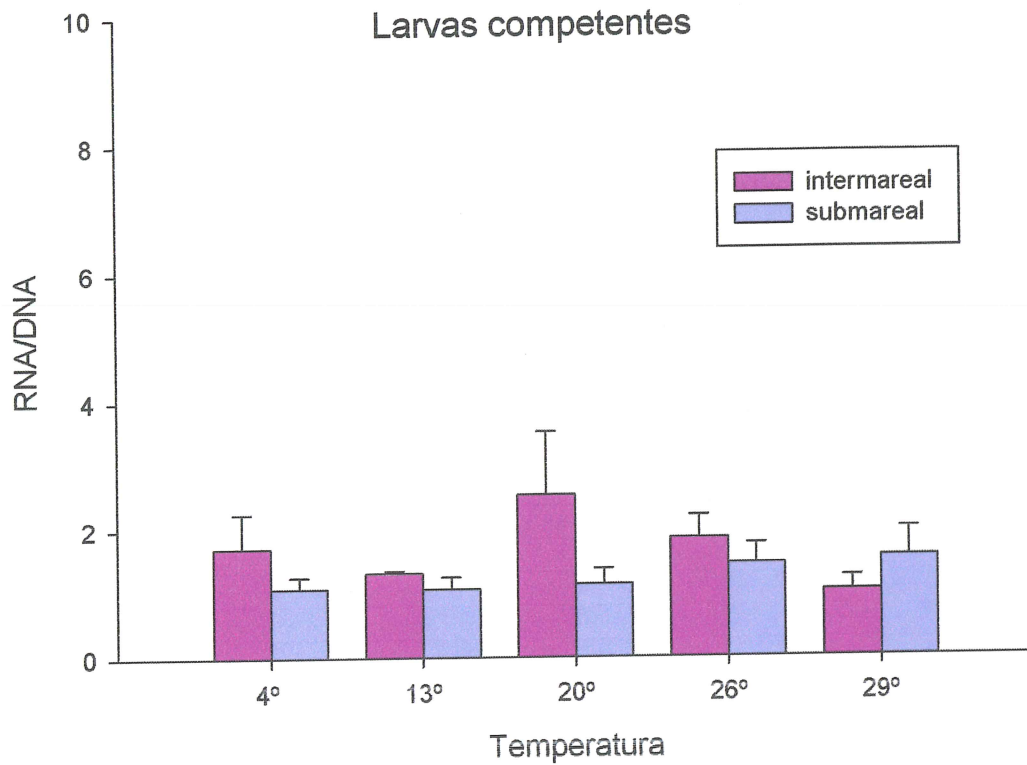


Figura 10. Cociente RNA/DNA obtenido a partir de larvas competentes de erizo morado de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*) sometidos a diferentes temperaturas (indicadas en cada punto). Cada barra indica la media obtenida a partir de 3 valores, mientras que las líneas verticales representan el error estándar resultante de éstos.

DISCUSIÓN

Los resultados de los experimentos de termotolerancia en adultos indicaron una diferencia clara en la respuesta entre los individuos del intermareal y del submareal. Estas diferencias pueden deberse a que los organismos que viven en el intermareal se encuentran expuestos a condiciones de temperatura extremas día a día, por lo cual están mejor adaptados para resistir cambios en la temperatura ambiental. En contraparte, los organismos del submareal permanecen durante toda su vida adulta cubiertos por agua, con variaciones térmicas mucho menores a lo largo del día. Por otra parte, las variaciones de temperatura que se presentan durante el año en el submareal, ocurren de forma gradual, por lo que los erizos del submareal no están adaptados a los cambios abruptos de temperatura. Los erizos que habitan el intermareal están adaptados a condiciones extremas de temperatura, especialmente durante las mareas de verano. Lo anterior confirma lo descrito anteriormente por Somero (2002) respecto a que individuos de la misma especie pueden presentar diferencias en la respuesta al estrés térmico, dependiendo de las condiciones en las que habitan sus poblaciones.

El análisis del cociente RNA/DNA en adultos reveló que responden de manera diferencial dependiendo de las condiciones del estrato en donde habitan, por esto los del intermareal resisten temperaturas de 20 °C, mientras que los del submareal no. El hecho de no presentar diferencias significativas entre temperaturas, en el caso específico del erizo morado (*S. purpuratus*), indica que este cociente se debe emplear con cautela para evaluar el estado fisiológico de los individuos de esta especie y no como un indicador único de estrés térmico. Contrario a lo referido por Norkko et al. (2005), en el caso de *S. purpuratus*, esta herramienta no representó una medida sensible al estrés en corto plazo. Por esto, se sugiere que no sea la única prueba cuando se realicen estudios de estrés, aunque se recomienda para descartar diferencias fisiológicas entre

individuos que puedan favorecer ciertas condiciones. Comparando nuestros valores con los de *Acartia* (Speekman, 2005) y *Solea* (Vinagre et al., 2008), tenemos que los valores de la proporción de ácidos nucleicos en adultos de erizo fueron más variables que los valores obtenidos para las otras dos especies. Esto no indica diferencias en la calidad fisiológica entre especies, pero sí muestra que para una misma especie, pueden encontrarse diferencias en poblaciones que habitan a profundidades diferentes. En ambos casos, las poblaciones más superficiales registraron valores mayores que las poblaciones de mayor profundidad.

En larvas, el análisis de termotolerancia puso en evidencia dos temperaturas letales a diferentes tiempos de exposición, lo cual presupone que existe una temperatura entre 23 y 26 °C a la cual las larvas de erizo de mar no resisten la exposición a esta temperatura por un tiempo prolongado. Las larvas de 6 brazos del intermareal tuvieron una supervivencia menor que las del submareal, lo cual puede darse como consecuencia de diferencias en los procesos fisiológicos. Al mismo tiempo, las larvas del intermareal de 8 brazos tuvieron una mayor resistencia al aumento de temperaturas que las larvas de 6 brazos, ocurriendo lo opuesto para el caso del submareal. De cualquier forma, esto indica que existe alguna condición fisiológica que puede estar afectando a las larvas en esa etapa, ya que se comportaron de manera distinta a lo esperado. Es también curioso que en larvas de 6 brazos del submareal la temperatura de 13 °C tuviera menor índice de supervivencia, después de 24 horas, que los tratamientos de 20 y 23 °C, ya que los erizos son organismos de climas templados-fríos y la época de reproducción corresponde precisamente a las estaciones de otoño e invierno (Tegner, 2001), cuando la temperatura del agua es menor a 20 °C. En contraste, para el estadio de 8 brazos, la población del submareal parece resistir mejor la temperatura de 23 °C que la de 20 °C.

No se encontraron datos previos sobre los cocientes RNA/DNA en especies de erizo. Estos valores son inherentes a cada especie y no dependen de que una especie se encuentre en mejor estado fisiológico que otra, por lo cual no tenemos un punto de referencia precedente con el cual comparar nuestros resultados. Sólo podemos señalar semejanzas que existen con otras especies, por ejemplo, los valores de los cocientes RNA/DNA obtenidos para erizo morado, se asemejan a los rangos de *Melanogrammus aeglefinus* (perteneciente a aguas frías) (Caldarone et al., 2005); de la misma forma, los cocientes obtenidos para *Clupea harengus* (de aguas templadas) y *Macrobrachium rosenbergii* (de distribución tropical) (Malzahn et al., 2007; Luna et al., 2007), también se encontraron en rangos similares a los reportados en este estudio para *S. purpuratus*. Como se puede observar, los valores tampoco dependen de la región térmica en la que habitan. No obstante, con este cociente se puede evaluar el estado fisiológico de los organismos, así como la salud y el estado nutricional. Esto se refleja en los valores encontrados en las larvas de 6 brazos de erizo morado, las cuales posiblemente se encuentran en una condición fisiológica que puede estar originando un cociente menor, es decir, pudiera considerarse que están más estresadas.

Al comparar las larvas con los adultos incluyendo las dos pruebas realizadas, podemos encontrar una menor tolerancia al estrés térmico por parte de los adultos que de las larvas. Esto puede suceder por el hecho de que los adultos se encuentran adaptados a su ambiente, mientras que las larvas aún no han llegado a la etapa de reclutamiento; lo que sugiere que las larvas tienen un amplio rango de tolerancia y una mayor plasticidad fenotípica, condición que les va a permitir adaptarse a un ambiente variable durante su permanencia en la columna de agua y a un nuevo hábitat a partir de su reclutamiento. A su vez, entre las larvas, las del estadio de 6 brazos manifestaron una susceptibilidad mayor a los cambios de temperatura que los otros estadios; en

las larvas de 8 brazos ya se encuentra formado el rudimento, por lo cual es posible que su formación (la cual comienza a partir del estadio de equinopluteus de 6 brazos) esté ocasionando que la demanda metabólica de la larva sea mayor, ya que se encuentra en un periodo de diferenciación celular importante, y por lo tanto se encuentre más susceptible ante los cambios de temperatura que aquellas larvas de estadios anteriores o posteriores. Los resultados de supervivencia obtenidos a partir de los experimentos de termotolerancia y los obtenidos con los cocientes de RNA/DNA son coincidentes, muestran una menor resistencia a los cambios de temperatura por parte de los individuos provenientes del submareal que comparados con los del intermareal (a excepción de la larva de 6 brazos, cuya supervivencia fue mayor en el submareal).

El hecho de que los adultos del intermareal posean una mayor tolerancia a los cambios de temperatura era esperado, ya que se encuentran adaptados a condiciones de continuo estrés térmico, por las fluctuaciones naturales del intermareal, a diferencia de los adultos del submareal, que se encuentran en condiciones más constantes. Sin embargo, la condición encontrada en las larvas que exhibió una mayor resistencia por parte de las larvas del intermareal que las del submareal, indica una mayor plasticidad durante el periodo larvario de resistencia a dichas condiciones extremas de temperatura, por lo cual resulta interesante documentar este proceso durante varias generaciones, y verificar si es una condición que pueda heredarse.

Los resultados de este trabajo revelan que un incremento en la temperatura en los ambientes marinos puede ser fatal para especies de ambos estratos. Específicamente la población de erizo morado (*S. purpuratus*) podría no resistir temperaturas mayores a 23 °C. Sumando los efectos de mortalidad de esta especie con la explotación comercial del erizo rojo (*S. franciscanus*), existe la posibilidad de modificar el estado actual del ecosistema en que estas dos especies habitan, en escenarios de calentamiento global.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos podemos concluir que en los adultos de erizo morado del submareal mostraron una diferencia marcada en la termotolerancia con respecto a los individuos del intermareal, siendo mayor en los primeros que en los últimos.

Los erizos obtenidos del submareal, tuvieron un cociente RNA/DNA menor que los individuos del intermareal, es lo que sugiere diferentes condiciones de estrés.

Las larvas mostraron una mayor termotolerancia que los adultos. Específicamente las larvas del intermareal poseen mayor resistencia a los cambios térmicos que las del submareal. Las larvas de 6 brazos fueron más susceptibles ante las variaciones de temperatura que en el otro estadio estudiado.

La prueba del cociente RNA/DNA sólo sirve para indicar el estado fisiológico de un organismo; en el presente estudio, su eficiencia como indicador de estrés térmico fue menos clara. Esta prueba sí nos ayuda a encontrar una mayor o menor calidad fisiológica de los organismos, lo cual se vio reflejado en la resistencia ante el estrés, pero los valores no cambiaron por causa directa de las condiciones de estrés térmico.

Referencias:

- Berdalet, E., Roldán, C., Olivar, P. (2005) Quantifying RNA and DNA in planktonic organisms with SYBR Green II and nucleases. Part B. Quantification in natural samples. *Scientia Marina*, 69: 17-30.
- Brun, N. T., Bricelj, V. M., MacRae, T. H., Ross, N. W. (2008) Heat shock protein responses in thermally stressed bay scallops, *Argopecten irradians*, and sea scallops, *Placopecten magellanicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 358:151-162.
- Brun, N. T., Bricelj, V. M., MacRae, T. H., Ross, N. W. (2009) Acquisition of thermotolerance in bay scallops, *Argopecten irradians*, via differential induction of heat shock proteins. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 371:77-83.
- Caldarone, E. M. (2005) Estimating growth in haddock larvae *Melanogrammus aeglefinus* from RNA:DNA ratios and water temperature. *Marine Ecology Progress Series*, 293: 241-252.
- Caldarone, E. M., Clemmesen, C. M., Berdalet, E., Miller, T. J., Folkvord, A., Holt, J., Olivar, M. P., Suthers, I. M. (2006) Intercalibration of four spectrofluorometric protocols for measuring RNA/DNA ratios in larval and juvenile fish. *Limnology and Oceanography: Methods*, 4: 153-163.
- Calosi, P., Bilton, D. T., Spicer, J. I., Atfield, A. (2008) Thermal tolerance and geographical range size in the *Agabus brunneus* group of European diving beetles (*Coleoptera: Dytiscidae*). *Journal of Biogeography*, 35: 295-305.
- Cameron, R. A., Schroeter, S. C. (1980) Sea urchin Recruitment: Effect of Substrate Selection on Juvenile Distribution. *Marine Ecology Progress Series*, 2:243-247.

- Chícharo, M. A., Chícharo, L. (2008) RNA:DNA Ratio and Other Nucleic Acid Derived Indices in Marine Ecology. *Int. J. Mol. Sci.*, 9:1453-1471.
- Dahlhoff, E. P. (2004) Biochemical Indicators of Stress and Metabolism: Applications for Marine Ecological Studies. *Annual Review of Physiology*, 66: 183-207.
- Dahlhoff, E. P., Rank, N. E. (2007) The role of stress proteins in responses of a mountane willow leaf beetle to environmental temperature variation. *Journal of Bioscience*, 32: 477-488.
- Feder, M. E., Hofmann, G. E. (1999) Heat shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annu. Rev. Physiol.*, 61: 243-282.
- Gorokhova, E., Kyle, M. (2002) Analsis of nucleic acids in *Daphnia*: development of methods and ontogenic variations in RNA-DNA content. *Journal of Plancton Research*, 24: 511-522.
- Gunaratne, H. J., Moy, G. W., Kinukawa, M., Miyata, S., Mah, S. A., Vacquier, V. D. (2007) The 10 sea urchin receptor for egg jelly proteins (SpREJ) are members of the polycystic kidney disease-I (PKDI) family. *BMC Genomics*, 8:235.
- Harley, C. D. G., Hughes, A. R., Hultgren, K. M., Miner, B. G., Sorte, C. J. B., Thornber, C. S., Rodríguez, L. F., Tomanek, L., Williams, S. I. (2006) The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters*, 9:228-241.
- Hart, M. W. (2002) Life history evolution and comparative developmental biology of echinoderms. *Evolution and Development*, 4: 62-71.

- Hernández, J. C., Brito, A., García, N., Gil-Rodríguez, M. C., Herrera, G., Cruz-Reyes, A., Falcón, J. M. (2006) Spatial and seasonal variation of the gonad index of *Diadema antillarum* (Echinodermata: Echinoidea) in the Canary Islands. *Scientia Marina*, 70: 689-698.
- Hofmann, G. E. (1999) Ecologically Relevant Variation in Induction and Function of Heat Shock Proteins in Marine Organisms. *Amer. Zool.*, 39: 889-900.
- Kuo, E. S. L., Sanford, E. (2009) Geographic variation in the upper thermal limits of an intertidal snail: implications for climate envelope models. *Marine Ecology Progress Series*, 388: 137-146.
- Luna, M., Graziani, C., Villarroel, E., Lemus, M., Lodeiros, C., Salazar, G. (2007) Evaluación de tres dietas con diferente contenido proteico en el cultivo de postlarvas del langostino de río *Macrobrachium rosenbergii*. *Zootecnia Trop.*, 25: 111-121.
- Malzahn, A. M., Arbele, N., Clemmesen, C., Boersma, M. (2007) Nutrient limitation of primary producers affects planktivorous fish condition. *American Society of Limnology and Oceanography*, 52: 2062-2071.
- Martínez-Meyer, E. (2005) Climate change and biodiversity: Some considerations in forecasting shifts in species distributions. *Biodiversity Informatics*, 2:42-55.
- Norkko, J., Norkko, A., Thrush, S. F., Cummings, V. J. (2005) Detecting growth under environmental extremes: Spatial and temporal patterns in nucleic acid ratios in two Antarctic bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 326: 144-156.

- Osovitz, C. J., Hofmann, G. E. (2005) Thermal history-dependent expression of the hsp70 gene in purple sea urchins: Biogeographic patterns and the effect of the temperature acclimation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 327: 134-143.
- Palleiro-Nayar, J. S., Salgado-Rogel, M. L., Montero Aguilar, D. (2008) La pesca del erizo morado, *Strongylocentrotus purpuratus*, y su incremento poblacional en Baja California, México. *Ciencia Pesquera*; 16: 29-35.
- Ramírez-Félix, E. (2000) Análisis de la extracción de erizo rojo de mar (*Strongylocentrotus franciscanus*) según especie clave y conectividad en el área de Santo Tomás a Punta China, Baja California, México. *Ciencia Pesquera*; 14: 19-22.
- Reusch, T. B. H., Wood, T. E. (2007) Molecular ecology of global change. *Molecular Ecology* 16:3976-3992.
- Salgado-Rogel, M.L. & Palleiro-Nayar, J.S. (2008) Disminución de la abundancia del erizo rojo y propuestas para su manejo en Baja California, México. *Ciencia Pesquera*; 16: 37-45.
- Satterwhite, M. C. (2007) RNA:DNA as an indicator of nutritional condition growth in larval naked goby, *Gobiosoma bosc.* Louisiana State University, pp. 53.
- Seibel, B. A., Drazen, J. C. (2007) The rate of metabolism in maine animals: environmental constraints, ecological demands and energetic opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 362: 2061-2078.
- Somero, G. N. (2002) Thermal Physiology and Vertical Zonation of Intertidal Animals: Optima, Limits and Costs of Living. *Integ. and Comp. Biol.* 42:780-789.

- Sømero, G. N. (2005) Linking biogeography to physiology: Evolutionary and acclimatory adjustments of thermal limits. *Frontiers in Zoology*, 2:1.
- Smith, M. M., Cruz, S. L., Cameron, R. A., Urry, L. A. (2008) The Larval Stages of the Sea Urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Journal of Morphology*, 269:713-733.
- Tegner, M. J. (2001) The ecology of *Strongylocentrotus franciscanus* and *Strongylocentrotus purpuratus*. *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology. Developments in aquaculture and fisheries science*, 32: 307-332. Pp. 419.
- Terblanche, J. S., Deere, J. A., Clusella-Trullas, S., Janion, C., Chown, S. L. (2007) Critical thermal limits depend on methodological context. *Proceedings of the Royal Society B*, 274: 2935-2942.
- Vinagre, C., Fonseca, V., Maia, A., Amara, R., Cabral, H. (2008) Habitat specific growth rates and condition indices for the sympatric soles *Solea solea* (Linnaeus, 1758) and *Solea senegalensis* Kaup, 1858, in the Tagus estuary, Portugal, based in otolith daily increments and RNA-DNA ratio. *Journal of Applied Ichthyology*, 24: 163-169.
- Zippay, M. L., Hofmann, G. E. (2010) Physiological tolerances across latitudes: thermal sensitivity of larval marine snails (*Nucella* spp.). *Mar Biol.* DOI 10.1007/s00227-009-1354-3 (www.springerlink.com/content/74pk21k5502867r7/)

ANEXO I. ANOVA de dos vías realizado para los datos de los cocientes RNA/DNA.

Two Way Analysis of Variance

Wednesday, October 28, 2009, 3:55:13 PM

Data source: Data 1 in 4B

Balanced Design

Dependent Variable: rank(col(4))

Normality Test: Passed (P = 0.607)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.880)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Estrato	1	108.300	108.300	1.568	0.225
Temperatura	4	558.667	139.667	2.022	0.130
Estrato x Temperatura	4	199.200	49.800	0.721	0.588
Residual	20	1381.333	69.067		
Total	29	2247.500	77.500		

The difference in the mean values among the different levels of Estrato is not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in Temperatura. There is not a statistically significant difference (P = 0.225).

The difference in the mean values among the different levels of Temperatura is not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in Estrato. There is not a statistically significant difference (P = 0.130).

The effect of different levels of Estrato does not depend on what level of Temperatura is present. There is not a statistically significant interaction between Estrato and Temperatura. (P = 0.588)

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Estrato : 0.104
 Power of performed test with alpha = 0.0500: for Temperatura : 0.259
 Power of performed test with alpha = 0.0500: for Estrato x Temperatura : 0.0500

Least square means for Estrato :

Group	Mean
intermareal	17.400
submareal	13.600

Std Err of LS Mean = 2.146

Least square means for Temperatura :

Group	Mean
4°C	17.167
13°C	14.500
20°C	10.167
26°C	22.833
29°C	12.833

Std Err of LS Mean = 3.393

Least square means for Estrato x Temperatura :

Group	Mean
intermareal x 4°C	15.667

intermareal x 13°C	19.333
intermareal x 20°C	11.667
intermareal x 26°C	27.667
intermareal x 29°C	12.667
submareal x 4°C	18.667
submareal x 13°C	9.667
submareal x 20°C	8.667
submareal x 26°C	18.000
submareal x 29°C	13.000

Std Err of LS Mean = 4.798

Two Way Analysis of Variance Wednesday, October 28, 2009, 3:56:09 PM

Data source: Data 1 in 6B

Balanced Design

Dependent Variable: rank(col(4))

Normality Test: Passed (P = 0.590)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.707)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
ESTRATO	1	456.300	456.300	5.529	0.029
TEMPERATURA	4	39.000	9.750	0.118	0.974
ESTRATO x TEMPERATURA	4	101.533	25.383	0.308	0.869
Residual	20	1650.667	82.533		
Total	29	2247.500	77.500		

The difference in the mean values among the different levels of ESTRATO is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in TEMPERATURA. There is a statistically significant difference (P = 0.029). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The difference in the mean values among the different levels of TEMPERATURA is not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in ESTRATO. There is not a statistically significant difference (P = 0.974).

The effect of different levels of ESTRATO does not depend on what level of TEMPERATURA is present. There is not a statistically significant interaction between ESTRATO and TEMPERATURA. (P = 0.869)

Power of performed test with alpha = 0.0500: for ESTRATO : 0.519

Power of performed test with alpha = 0.0500: for TEMPERATURA : 0.0500

Power of performed test with alpha = 0.0500: for ESTRATO x TEMPERATURA : 0.0500

Least square means for ESTRATO :

Group	Mean
intermareal	19.400
submareal	11.600
Std Err of LS Mean = 2.346	

Least square means for TEMPERATURA :

Group	Mean
4°C	14.667
13°C	16.500
20°C	13.667
26°C	16.167
29°C	16.500
Std Err of LS Mean = 3.709	

Least square means for ESTRATO x TEMPERATURA :

Group	Mean
intermareal x 4°C	19.667
intermareal x 13°C	18.333
intermareal x 20°C	19.333

intermareal x 26°C 21.667
 intermareal x 29°C 18.000
 submareal x 4°C 9.667
 submareal x 13°C 14.667
 submareal x 20°C 8.000
 submareal x 26°C 10.667
 submareal x 29°C 15.000
 Std Err of LS Mean = 5.245

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
 Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor: **ESTRATO**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
intermareal vs. submareal	7.800	2.351	0.0291	0.050	Yes

Data source: Data 1 in 8B

Balanced Design

Dependent Variable: rank(col(4))

Normality Test: Passed (P = 0.755)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.715)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
ESTRATO	1	28.033	28.033	0.324	0.575
TEMPERATURA	4	307.000	76.750	0.888	0.489
ESTRATO x TEMPERATURA	4	184.467	46.117	0.534	0.712
Residual	20	1728.000	86.400		
Total	29	2247.500	77.500		

The difference in the mean values among the different levels of ESTRATO is not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in TEMPERATURA. There is not a statistically significant difference (P = 0.575).

The difference in the mean values among the different levels of TEMPERATURA is not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in ESTRATO. There is not a statistically significant difference (P = 0.489).

The effect of different levels of ESTRATO does not depend on what level of TEMPERATURA is present. There is not a statistically significant interaction between ESTRATO and TEMPERATURA. (P = 0.712)

Power of performed test with alpha = 0.0500: for ESTRATO : 0.0500

Power of performed test with alpha = 0.0500: for TEMPERATURA : 0.0500

Power of performed test with alpha = 0.0500: for ESTRATO x TEMPERATURA : 0.0500

Least square means for ESTRATO :

Group	Mean
intermareal	16.467
submareal	14.533
Std Err of LS Mean = 2.400	

Least square means for TEMPERATURA :

Group	Mean
4°C	11.000
13°C	14.000
20°C	19.167
26°C	14.167
29°C	19.167
Std Err of LS Mean = 3.795	

Least square means for ESTRATO x TEMPERATURA :

Group	Mean
intermareal x 4°C	14.333
intermareal x 13°C	18.000
intermareal x 20°C	17.000

intermareal x 26°C	12.667
intermareal x 29°C	20.333
submareal x 4°C	7.667
submareal x 13°C	10.000
submareal x 20°C	21.333
submareal x 26°C	15.667
submareal x 29°C	18.000

Std Err of LS Mean = 5.367

Two Way Analysis of Variance Wednesday, October 28, 2009, 3:58:19 PM

Data source: Data 1 in LC

Balanced Design

Dependent Variable: rank(col(4))

Normality Test: Passed (P = 0.390)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.925)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
ESTRATO	1	124.033	124.033	1.965	0.176
TEMPERATURA	4	218.667	54.667	0.866	0.501
ESTRATO x TEMPERATURA	4	642.133	160.533	2.543	0.072
Residual	20	1262.667	63.133		
Total	29	2247.500	77.500		

The difference in the mean values among the different levels of ESTRATO is not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in TEMPERATURA. There is not a statistically significant difference (P = 0.176).

The difference in the mean values among the different levels of TEMPERATURA is not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in ESTRATO. There is not a statistically significant difference (P = 0.501).

The effect of different levels of ESTRATO does not depend on what level of TEMPERATURA is present. There is not a statistically significant interaction between ESTRATO and TEMPERATURA. (P = 0.072)

Power of performed test with alpha = 0.0500: for ESTRATO : 0.145
 Power of performed test with alpha = 0.0500: for TEMPERATURA : 0.0500
 Power of performed test with alpha = 0.0500: for ESTRATO x TEMPERATURA : 0.384

Least square means for ESTRATO :

Group	Mean
intermareal	17.533
submareal	13.467

Std Err of LS Mean = 2.052

Least square means for TEMPERATURA :

Group	Mean
4°C	17.167
13°C	19.833
20°C	12.500
26°C	13.167
29°C	14.833

Std Err of LS Mean = 3.244

Least square means for ESTRATO x TEMPERATURA :

Group	Mean
intermareal x 4°C	23.333
intermareal x 13°C	19.667
intermareal x 20°C	12.333

intermareal x 26°C	21.667
intermareal x 29°C	10.667
submareal x 4°C	11.000
submareal x 13°C	20.000
submareal x 20°C	12.667
submareal x 26°C	4.667
submareal x 29°C	19.000

Std Err of LS Mean = 4.587

Two Way Analysis of Variance Wednesday, October 28, 2009, 4:02:03 PM

Data source: Data 1 in ADULTOS

General Linear Model

Dependent Variable: rank(col(4))

Normality Test: Passed (P = 0.574)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.572)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
estrato	1	869.532	869.532	26.176	<0.001
temperatura	4	245.299	61.325	1.846	0.162
estrato x temperatura	4	198.632	49.658	1.495	0.243
Residual	19	631.167	33.219		
Total	28	2030.000	72.500		

The difference in the mean values among the different levels of estrato is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in temperatura. There is a statistically significant difference (P = <0.001). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The difference in the mean values among the different levels of temperatura is not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in estrato. There is not a statistically significant difference (P = 0.162).

The effect of different levels of estrato does not depend on what level of temperatura is present. There is not a statistically significant interaction between estrato and temperatura. (P = 0.243)

Power of performed test with alpha = 0.0500: for estrato : 0.999
 Power of performed test with alpha = 0.0500: for temperatura : 0.216
 Power of performed test with alpha = 0.0500: for estrato x temperatura : 0.140

Least square means for estrato :

Group	Mean	SEM
intermareal	20.333	1.488
submareal	9.300	1.561

Least square means for temperatura :

Group	Mean	SEM
SE	9.583	2.631
13°C	17.667	2.353
20°C	17.167	2.353
26°C	16.500	2.353
29°C	13.167	2.353

Least square means for estrato x temperatura :

Group	Mean	SEM
intermareal x SE	9.667	3.328
intermareal x 13°C	25.000	3.328
intermareal x 20°C	23.000	3.328

intermareal x 26°C	24.333	3.328
intermareal x 29°C	19.667	3.328
submareal x SE	9.500	4.075
submareal x 13°C	10.333	3.328
submareal x 20°C	11.333	3.328
submareal x 26°C	8.667	3.328
submareal x 29°C	6.667	3.328

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor: estrato					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
intermareal vs. submareal	11.033	5.116	0.0000614	0.050	Yes

Two Way Analysis of Variance LARVAS INTERMAREAL

Wednesday, October 28, 2009, 4:08:05 PM

Data source: Data 1 in Notebook 3

Balanced Design

Dependent Variable: rank(col(5))

Normality Test: Passed (P = 0.067)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.501)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
edad	3	5475.933	1825.311	8.068	<0.001
temperatura	4	715.500	178.875	0.791	0.538
edad x temperatura	12	2753.567	229.464	1.014	0.455
Residual	40	9050.000	226.250		
Total	59	17995.000	305.000		

The difference in the mean values among the different levels of edad is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in temperatura. There is a statistically significant difference (P = <0.001). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The difference in the mean values among the different levels of temperatura is not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in edad. There is not a statistically significant difference (P = 0.538).

The effect of different levels of edad does not depend on what level of temperatura is present. There is not a statistically significant interaction between edad and temperatura. (P = 0.455)

Power of performed test with alpha = 0.0500: for edad : 0.976
 Power of performed test with alpha = 0.0500: for temperatura : 0.0500
 Power of performed test with alpha = 0.0500: for edad x temperatura : 0.0534

Least square means for edad :

Group	Mean
4 brazos	32.867
6 brazos	14.333
8 brazos	38.600
larva competente	36.200
Std Err of LS Mean = 3.884	

Least square means for temperatura :

Group	Mean
4°C	30.667
13°C	31.667
20°C	27.167
26°C	36.250
29°C	26.750
Std Err of LS Mean = 4.342	

Least square means for edad x temperatura :

Group	Mean
4 brazos x 4°C	33.333

4 brazos x 13°C	35.667
4 brazos x 20°C	22.333
4 brazos x 26°C	55.333
4 brazos x 29°C	17.667
6 brazos x 4°C	14.000
6 brazos x 13°C	12.667
6 brazos x 20°C	17.667
6 brazos x 26°C	15.667
6 brazos x 29°C	11.667
8 brazos x 4°C	33.667
8 brazos x 13°C	42.000
8 brazos x 20°C	38.333
8 brazos x 26°C	32.000
8 brazos x 29°C	47.000
larva competente x 4°C	41.667
larva competente x 13°C	36.333
larva competente x 20°C	30.333
larva competente x 26°C	42.000
larva competente x 29°C	30.667
Std Err of LS Mean = 8.684	

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor: edad

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
8 brazos vs. 6 brazos	24.267	4.418	0.0000740	0.009	Yes
larva competente vs. 6 brazos	21.867	3.981	0.000281	0.010	Yes
4 brazos vs. 6 brazos	18.533	3.374	0.00165	0.013	Yes
8 brazos vs. 4 brazos	5.733	1.044	0.303	0.017	No
larva competente vs. 4 brazos	3.333	0.607	0.547	0.025	No
8 brazos vs. larva competente	2.400	0.437	0.664	0.050	No

Two Way Analysis of Variance AGAIN THE SAME

Wednesday, October 28, 2009, 4:52:49 PM

Data source: Data 1 in Notebook 3

Balanced Design

Dependent Variable: rank(col(5))

Normality Test: Passed (P = 0.067)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.501)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
edad	3	5475.933	1825.311	8.068	<0.001
temperatura	4	715.500	178.875	0.791	0.538
edad x temperatura	12	2753.567	229.464	1.014	0.455
Residual	40	9050.000	226.250		
Total	59	17995.000	305.000		

The difference in the mean values among the different levels of edad is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in temperatura. There is a statistically significant difference ($P = <0.001$). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The difference in the mean values among the different levels of temperatura is not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in edad. There is not a statistically significant difference ($P = 0.538$).

The effect of different levels of edad does not depend on what level of temperatura is present. There is not a statistically significant interaction between edad and temperatura. ($P = 0.455$)

Power of performed test with $\alpha = 0.0500$: for edad : 0.976

Power of performed test with $\alpha = 0.0500$: for temperatura : 0.0500

Power of performed test with $\alpha = 0.0500$: for edad x temperatura : 0.0534

Least square means for edad :

Group	Mean
4 brazos	32.867
6 brazos	14.333
8 brazos	38.600
larva competente	36.200
Std Err of LS Mean = 3.884	

Least square means for temperatura :

Group	Mean
4°C	30.667
13°C	31.667
20°C	27.167
26°C	36.250
29°C	26.750
Std Err of LS Mean = 4.342	

Least square means for edad x temperatura :

Group	Mean
4 brazos x 4°C	33.333
4 brazos x 13°C	35.667
4 brazos x 20°C	22.333
4 brazos x 26°C	55.333
4 brazos x 29°C	17.667
6 brazos x 4°C	14.000
6 brazos x 13°C	12.667
6 brazos x 20°C	17.667
6 brazos x 26°C	15.667
6 brazos x 29°C	11.667
8 brazos x 4°C	33.667
8 brazos x 13°C	42.000
8 brazos x 20°C	38.333
8 brazos x 26°C	32.000
8 brazos x 29°C	47.000
larva competente x 4°C	41.667
larva competente x 13°C	36.333
larva competente x 20°C	30.333
larva competente x 26°C	42.000
larva competente x 29°C	30.667

Std Err of LS Mean = 8.684

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **edad**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
8 brazos vs. 6 brazos	24.267	4	6.248	<0.001	Yes
8 brazos vs. 4 brazos	5.733	4	1.476	0.725	No
8 brazos vs. larva competente	2.400	4	0.618	0.972	Do Not Test
larva competente vs. 6 brazos	21.867	4	5.630	0.002	Yes
larva competente vs. 4 brazos	3.333	4	0.858	0.929	Do Not Test
4 brazos vs. 6 brazos	18.533	4	4.772	0.009	Yes

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

INTERMAREAL TODOS

Data source: Data 1 in Notebook 4

General Linear Model (No Interactions)

Dependent Variable: rank(col(5))

Normality Test: Passed (P = 0.249)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.601)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
edad	4	9888.721	2472.180	7.499	<0.001
temperatura	5	4084.121	816.824	2.478	0.041
Residual	65	21429.346	329.682		
Total	74	35150.000	475.000		

The difference in the mean values among the different levels of edad is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in temperatura. There is a statistically significant difference (P = <0.001). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The difference in the mean values among the different levels of temperatura is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in edad. There is a statistically significant difference (P = 0.041). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

Power of performed test with alpha = 0.0500: for edad : 0.991
 Power of performed test with alpha = 0.0500: for temperatura : 0.481

Least square means for edad :

Group	Mean	SEM
4 brazos	35.706	5.083
6 brazos	11.440	5.083
8 brazos	43.573	5.083
larva competente	40.573	5.083
adulto	38.135	4.805

Least square means for temperatura :

Group	Mean	SEM
4°C	39.563	5.371
13°C	42.333	4.688
20°C	35.600	4.688
26°C	45.867	4.688
29°C	33.200	4.688
SE	6.750	11.484

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
 Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor: **edad**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
8 brazos vs. 6 brazos	32.133	4.470	0.0000320	0.005	Yes
larva competente vs. 6 brazos	29.133	4.053	0.000137	0.006	Yes
adulto vs. 6 brazos	26.696	3.817	0.000304	0.006	Yes
4 brazos vs. 6 brazos	24.267	3.376	0.00124	0.007	Yes
8 brazos vs. 4 brazos	7.867	1.094	0.278	0.009	No
8 brazos vs. adulto	5.437	0.777	0.440	0.010	No
larva competente vs. 4 brazos	4.867	0.677	0.501	0.013	No
8 brazos vs. larva competente	3.000	0.417	0.678	0.017	No
larva competente vs. adulto	2.437	0.349	0.729	0.025	No
adulto vs. 4 brazos	2.429	0.347	0.729	0.050	No

Comparisons for factor: **temperatura**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
26°C vs. SE	39.117	3.154	0.00244	0.003	Yes
13°C vs. SE	35.583	2.869	0.00555	0.004	No
4°C vs. SE	32.813	2.588	0.0119	0.004	No
20°C vs. SE	28.850	2.326	0.0232	0.004	No
29°C vs. SE	26.450	2.132	0.0368	0.005	No
26°C vs. 29°C	12.667	1.910	0.0605	0.005	No
26°C vs. 20°C	10.267	1.549	0.126	0.006	No
13°C vs. 29°C	9.133	1.378	0.173	0.006	No
13°C vs. 20°C	6.733	1.016	0.314	0.007	No
4°C vs. 29°C	6.363	0.892	0.375	0.009	No
26°C vs. 4°C	6.304	0.884	0.380	0.010	No
4°C vs. 20°C	3.963	0.556	0.580	0.013	No
26°C vs. 13°C	3.533	0.533	0.596	0.017	No
13°C vs. 4°C	2.771	0.389	0.699	0.025	No
20°C vs. 29°C	2.400	0.362	0.719	0.050	No

Two Way Analysis of Variance INTER TODOS

Wednesday, October 28, 2009, 4:54:41 PM

Data source: Data 1 in Notebook 4

General Linear Model (No Interactions)

Dependent Variable: rank(col(5))

Normality Test: Passed (P = 0.249)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.601)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
edad	4	9888.721	2472.180	7.499	<0.001
temperatura	5	4084.121	816.824	2.478	0.041
Residual	65	21429.346	329.682		
Total	74	35150.000	475.000		

The difference in the mean values among the different levels of edad is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in temperatura. There is a statistically significant difference ($P = <0.001$). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The difference in the mean values among the different levels of temperatura is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in edad. There is a statistically significant difference ($P = 0.041$). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

Power of performed test with $\alpha = 0.0500$: for edad : 0.991
 Power of performed test with $\alpha = 0.0500$: for temperatura : 0.481

Least square means for edad :

Group	Mean	SEM
4 brazos	35.706	5.083
6 brazos	11.440	5.083
8 brazos	43.573	5.083
larva competente	40.573	5.083
adulto	38.135	4.805

Least square means for temperatura :

Group	Mean	SEM
4°C	39.563	5.371
13°C	42.333	4.688
20°C	35.600	4.688
26°C	45.867	4.688
29°C	33.200	4.688
SE	6.750	11.484

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: edad

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
8 brazos vs. 6 brazos	32.133	5	6.322	<0.001	Yes
8 brazos vs. 4 brazos	7.867	5	1.548	0.809	No
8 brazos vs. adulto	5.437	5	1.099	0.936	Do Not Test
8 brazos vs. larva competente	3.000	5	0.590	0.994	Do Not Test
larva competente vs. 6 brazos	29.133	5	5.732	0.001	Yes
larva competente vs. 4 brazos	4.867	5	0.958	0.961	Do Not Test
larva competente vs. adulto	2.437	5	0.493	0.997	Do Not Test
adulto vs. 6 brazos	26.696	5	5.398	0.003	Yes
adulto vs. 4 brazos	2.429	5	0.491	0.997	Do Not Test
4 brazos vs. 6 brazos	24.267	5	4.774	0.011	Yes

Comparisons for factor: temperatura

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
26°C vs. SE	39.117	6	4.460	0.028	Yes
26°C vs. 29°C	12.667	6	2.702	0.405	No
26°C vs. 20°C	10.267	6	2.190	0.635	Do Not Test
26°C vs. 4°C	6.304	6	1.251	0.949	Do Not Test
26°C vs. 13°C	3.533	6	0.754	0.995	Do Not Test
13°C vs. SE	35.583	6	4.057	0.059	No

13°C vs. 29°C	9.133	6	1.948	0.740	Do Not Test
13°C vs. 20°C	6.733	6	1.436	0.911	Do Not Test
13°C vs. 4°C	2.771	6	0.550	0.999	Do Not Test
4°C vs. SE	32.813	6	3.660	0.115	Do Not Test
4°C vs. 29°C	6.363	6	1.262	0.947	Do Not Test
4°C vs. 20°C	3.963	6	0.786	0.994	Do Not Test
20°C vs. SE	28.850	6	3.289	0.199	Do Not Test
20°C vs. 29°C	2.400	6	0.512	0.999	Do Not Test
29°C vs. SE	26.450	6	3.016	0.284	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

Two Way Analysis of Variance SUBMAREAL LARVAS Wednesday, October 28, 2009, 4:16:38 PM

Data source: Data 1 in Notebook 5

Balanced Design

Dependent Variable: rank(col(5))

Normality Test: Passed (P = 0.207)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.861)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
edad	3	8665.933	2888.644	18.578	<0.001
temperatura	4	203.667	50.917	0.327	0.858
edad x temperatura	12	2906.067	242.172	1.558	0.144
Residual	40	6219.333	155.483		
Total	59	17995.000	305.000		

The difference in the mean values among the different levels of edad is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in temperatura. There is a statistically significant difference (P = <0.001). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The difference in the mean values among the different levels of temperatura is not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in edad. There is not a statistically significant difference (P = 0.858).

The effect of different levels of edad does not depend on what level of temperatura is present. There is not a statistically significant interaction between edad and temperatura. (P = 0.144)

Power of performed test with alpha = 0.0500: for edad : 1.000
 Power of performed test with alpha = 0.0500: for temperatura : 0.0500
 Power of performed test with alpha = 0.0500: for edad x temperatura : 0.259

Least square means for edad :

Group	Mean
4 brazos	28.200
6 brazos	12.000
8 brazos	43.533
larva competente	38.267
Std Err of LS Mean = 3.220	

Least square means for temperatura :

Group	Mean
4°C	30.250
13°C	29.500
20°C	28.917
26°C	29.750
29°C	34.083
Std Err of LS Mean = 3.600	

Least square means for edad x temperatura :

Group	Mean
4 brazos x 4°C	43.000

4 brazos x 13°C	17.000
4 brazos x 20°C	18.000
4 brazos x 26°C	33.667
4 brazos x 29°C	29.333
6 brazos x 4°C	9.333
6 brazos x 13°C	20.667
6 brazos x 20°C	7.333
6 brazos x 26°C	9.333
6 brazos x 29°C	13.333
8 brazos x 4°C	32.667
8 brazos x 13°C	36.333
8 brazos x 20°C	52.667
8 brazos x 26°C	46.333
8 brazos x 29°C	49.667
larva competente x 4°C	36.000
larva competente x 13°C	44.000
larva competente x 20°C	37.667
larva competente x 26°C	29.667
larva competente x 29°C	44.000
Std Err of LS Mean = 7.199	

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor: edad Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
8 brazos vs. 6 brazos	31.533	6.926	0.0000000238	0.009	Yes
larva competente vs. 6 brazos	26.267	5.769	0.000000999	0.010	Yes
4 brazos vs. 6 brazos	16.200	3.558	0.000980	0.013	Yes
8 brazos vs. 4 brazos	15.333	3.368	0.00169	0.017	Yes
larva competente vs. 4 brazos	10.067	2.211	0.0328	0.025	No
8 brazos vs. larva competente	5.267	1.157	0.254	0.050	No

Two Way Analysis of Variance SUB LARVAS

Wednesday, October 28, 2009, 4:55:55 PM

Data source: Data 1 in Notebook 5

Balanced Design

Dependent Variable: rank(col(5))

Normality Test: Passed (P = 0.207)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.861)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
edad	3	8665.933	2888.644	18.578	<0.001
temperatura	4	203.667	50.917	0.327	0.858
edad x temperatura	12	2906.067	242.172	1.558	0.144
Residual	40	6219.333	155.483		
Total	59	17995.000	305.000		

The difference in the mean values among the different levels of edad is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in temperatura. There is a statistically significant difference ($P = <0.001$). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The difference in the mean values among the different levels of temperatura is not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in edad. There is not a statistically significant difference ($P = 0.858$).

The effect of different levels of edad does not depend on what level of temperatura is present. There is not a statistically significant interaction between edad and temperatura. ($P = 0.144$)

Power of performed test with alpha = 0.0500: for edad : 1.000

Power of performed test with alpha = 0.0500: for temperatura : 0.0500

Power of performed test with alpha = 0.0500: for edad x temperatura : 0.259

Least square means for edad :

Group	Mean
4 brazos	28.200
6 brazos	12.000
8 brazos	43.533
larva competente	38.267
Std Err of LS Mean = 3.220	

Least square means for temperatura :

Group	Mean
4°C	30.250
13°C	29.500
20°C	28.917
26°C	29.750
29°C	34.083
Std Err of LS Mean = 3.600	

Least square means for edad x temperatura :

Group	Mean
4 brazos x 4°C	43.000
4 brazos x 13°C	17.000
4 brazos x 20°C	18.000
4 brazos x 26°C	33.667
4 brazos x 29°C	29.333
6 brazos x 4°C	9.333
6 brazos x 13°C	20.667
6 brazos x 20°C	7.333
6 brazos x 26°C	9.333
6 brazos x 29°C	13.333
8 brazos x 4°C	32.667
8 brazos x 13°C	36.333
8 brazos x 20°C	52.667
8 brazos x 26°C	46.333
8 brazos x 29°C	49.667
larva competente x 4°C	36.000
larva competente x 13°C	44.000
larva competente x 20°C	37.667
larva competente x 26°C	29.667
larva competente x 29°C	44.000
Std Err of LS Mean = 7.199	

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **edad**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
8 brazos vs. 6 brazos	31.533	4	9.794	<0.001	Yes
8 brazos vs. 4 brazos	15.333	4	4.763	0.009	Yes
8 brazos vs. larva competente	5.267	4	1.636	0.657	No
larva competente vs. 6 brazos	26.267	4	8.158	<0.001	Yes
larva competente vs. 4 brazos	10.067	4	3.127	0.138	No
4 brazos vs. 6 brazos	16.200	4	5.032	0.005	Yes

SUBMAREAL TODOS

Data source: Data 1 in 3waytry

General Linear Model (No Interactions)

Dependent Variable: rank(col(5))

Normality Test: Passed (P = 0.131)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.788)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
EDAD	4	18010.237	4502.559	19.272	<0.001
TEMPERATURA	5	148.111	29.622	0.127	0.986
Residual	64	14952.246	233.629		
Total	73	33762.500	462.500		

The difference in the mean values among the different levels of EDAD is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in TEMPERATURA. There is a statistically significant difference (P = <0.001). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The difference in the mean values among the different levels of TEMPERATURA is not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in EDAD. There is not a statistically significant difference (P = 0.986).

Power of performed test with alpha = 0.0500: for EDAD : 1.000
 Power of performed test with alpha = 0.0500: for TEMPERATURA : 0.0500

Least square means for EDAD :

Group	Mean	SEM
4 brazos	38.534	4.403
6 brazos	16.534	4.403
8 brazos	57.067	4.403
larva competente	51.601	4.403
adulto	22.163	4.176

Least square means for TEMPERATURA :

Group	Mean	SEM
4°C	37.162	4.521
13°C	37.533	3.947
20°C	35.667	3.947
26°C	36.400	3.947
29°C	39.800	3.947
SE	36.517	11.506

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
 Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor: **EDAD**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
8 brazos vs. 6 brazos	40.533	6.509	0.000000134	0.005	Yes
8 brazos vs. adulto	34.904	5.752	0.000000268	0.006	Yes
larva competente vs. 6 brazos	35.067	5.631	0.000000428	0.006	Yes
larva competente vs. adulto	29.437	4.851	0.00000822	0.007	Yes
4 brazos vs. 6 brazos	22.000	3.533	0.000769	0.009	Yes
8 brazos vs. 4 brazos	18.533	2.976	0.00411	0.010	Yes
4 brazos vs. adulto	16.371	2.698	0.00892	0.013	Yes
larva competente vs. 4 brazos	13.067	2.098	0.0398	0.017	No
adulto vs. 6 brazos	5.629	0.928	0.357	0.025	No
8 brazos vs. larva competente	5.467	0.878	0.383	0.050	No

Two Way Analysis of Variance SUB TODOS

Wednesday, October 28, 2009, 4:57:27 PM

Data source: Data 1 in 3waytry

General Linear Model (No Interactions)

Dependent Variable: rank(col(5))

Normality Test: Passed (P = 0.131)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.788)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
EDAD	4	18010.237	4502.559	19.272	<0.001
TEMPERATURA	5	148.111	29.622	0.127	0.986
Residual	64	14952.246	233.629		
Total	73	33762.500	462.500		

The difference in the mean values among the different levels of EDAD is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in TEMPERATURA. There is a statistically significant difference (P = <0.001). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The difference in the mean values among the different levels of TEMPERATURA is not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in EDAD. There is not a statistically significant difference (P = 0.986).

Power of performed test with alpha = 0.0500: for EDAD : 1.000

Power of performed test with alpha = 0.0500: for TEMPERATURA : 0.0500

Least square means for EDAD :

Group	Mean	SEM
4 brazos	38.534	4.403
6 brazos	16.534	4.403
8 brazos	57.067	4.403
larva competente	51.601	4.403
adulto	22.163	4.176

Least square means for TEMPERATURA :

Group	Mean	SEM
4°C	37.162	4.521
13°C	37.533	3.947
20°C	35.667	3.947
26°C	36.400	3.947
29°C	39.800	3.947
SE	36.517	11.506

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **EDAD**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
8 brazos vs. 6 brazos	40.533	5	9.205	<0.001	Yes
8 brazos vs. adulto	34.904	5	8.134	<0.001	Yes
8 brazos vs. 4 brazos	18.533	5	4.209	0.032	Yes
8 brazos vs. larva competente	5.467	5	1.242	0.904	No
larva competente vs. 6 brazos	35.067	5	7.964	<0.001	Yes
larva competente vs. adulto	29.437	5	6.860	<0.001	Yes
larva competente vs. 4 brazos	13.067	5	2.968	0.234	No
4 brazos vs. 6 brazos	22.000	5	4.996	0.007	Yes
4 brazos vs. adulto	16.371	5	3.815	0.066	No
adulto vs. 6 brazos	5.629	5	1.312	0.885	No

ANEXO II. Protocolos.

Protocolo de extracción de RNA de Invitrogen (modificado)

Se utilizaron 100 μ L de TRIZOL por cada muestra de 10 mg de tejido. Para almacenar se guardó la muestra a -20°C .

1. Homogeneizar

Se homogeneizó la muestra con ayuda de una pipeta automática, ya que las larvas son muy frágiles y no se ocupaba la ayuda de maceradores.

Posteriormente se añadieron 20 μ L de cloroformo y se agitó en vórtex. Se dejó reposar por 2 minutos y se centrifugó por 15 minutos a 12,000 x g a una temperatura de 4°C .

2. Precipitación de RNA

Se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo, al cual también se le añadieron 50 μ L de isopropanol. Inmediatamente después, se guardó a -20°C por toda la noche. (El remanente se guardó para la extracción de DNA: ver Protocolo de extracción de DNA).

Al día siguiente, se centrifugaron los tubos por 10 min a 12,000 x g a una temperatura de 4°C . (Se debe observar el pellet en el fondo).

3. Lavado de RNA

Se removió el sobrenadante y se agregaron 100 μ L de etanol al 75%. Se centrifugó por 5 min a 7400 x g (a 4°C).

4. Secado

Se removió el sobrenadante y se colocaron abiertos y en posición invertida sobre una gasa estéril para secar.

Una vez secos los pellets, se resuspendieron en 15 μ L de agua inyectable y se almacenaron a -20°C hasta su cuantificación en el espectrofotómetro Nanodrop.

Protocolo de extracción de DNA a partir de TRIZOL de Invitrogen (modificado)

1. Precipitación del DNA

A los tubos con el remanente (del inicio del protocolo anterior), se les añadieron 30 μL de etanol 100% y se guardaron a -20°C por toda la noche.

Al día siguiente se centrifugaron por 5 minutos a 2000 x g a una temperatura de 4°C y se removió el sobrenadante.

2. Lavado del DNA

A cada tubo se le agregaron 100 μL de citrato de sodio 0.1M en etanol 10%. Se dejó reposar por 30 min, mezclando el contenido periódicamente; posteriormente se centrifugó por 5 minutos a 2000 x g a una temperatura de 4°C y se removió el sobrenadante. Se repitió el procedimiento.

Se colocaron 100 μL de etanol al 75% en cada tubo y se dejó reposar por 20 min. Posteriormente se centrifugó por 5 minutos a 2000 x g a una temperatura de 4°C y se removió el sobrenadante.

3. Resuspensión del DNA

Se colocaron los tubos abiertos y en posición invertida sobre una gasa estéril para secar. Una vez secos los pellets, se resuspendieron en 60 μL de NaOH 8mM, se centrifugó por 10 min a 12000 x g y se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo. Estos tubos se almacenaron a -20°C hasta su cuantificación en el espectrofotómetro Nanodrop.