UNIVERSIDAD DEL MAR

campus Puerto Ángel



Caracterización temprana y efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario y supervivencia larval de dos especies de *Spirobranchus* Blainville, 1818 (Polychaeta: Serpulidae) de la costa central de Oaxaca

TESIS

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias: Ecología Marina

Presenta

Biól. Mar. Juan Pablo Sánchez Ovando

Director de tesis

Dr. José Rolando Bastida Zavala

Co-director de tesis

Dr. Francisco Benítez Villalobos

Puerto Ángel, Oaxaca, México, enero de 2021

Dedicatoria

A mi madre, Paulina, por el amor y el apoyo incondicional que siempre me ha dado

A mis hermanos, Gerardo, Paula, Cielo y María, por todas las aventuras que vivimos juntos durante nuestra infancia

Para todas las personas que me acompañaron y que compartieron su cariño y felicidad conmigo durante este proceso

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por apoyarme con la beca de manutención para realizar mis estudios de maestría.

A mi director de tesis, el Dr. J. Rolando Bastida-Zavala, por permitirme trabajar una vez más a su lado, por compartir sus experiencias y buenos consejos.

A mi co-director de tesis, el Dr. Francisco Benítez-Villalobos, por aceptar ser parte de este trabajo, por el tiempo, la dedicación y por los conocimientos que me brindó durante esta etapa.

A mis revisores, la Dra. María del Socorro García-Madrigal, a la Dra. María del Carmen Alejo-Plata y al Dr. Pedro Cervantes-Hernández, gracias por las críticas, el tiempo invertido y las valiosas correcciones hechas a este documento.

A mi casa de estudios, la UMAR, así como a los profesores que me guiaron por el camino del conocimiento durante estos años.

Al Dr. Pedro Cervantes-Hernández, por compartir sus conocimientos sobre las Redes Neuronales, las cuales fueron de gran utilidad para este trabajo.

A todas las buenas personas que han formado parte del equipo de trabajo del laboratorio de Ecología del Desarrollo, Malu, Karen, Isa, Uri, Walter, Mago, Peni.

A Nadxieli y Tom, por compartir grandes momentos y por el cariño que nos llegamos a tener.

A la señora Lilia (una segunda madre para mí) por todo el amor y cariño que siempre me brindó y por abrirme las puertas de su casa. A la señora Eva por esas buenas pláticas y risas que me alegraron momentos amargos.

A Melany ♥ que ha llegado a ser alguien muy especial e importante en mi vida, por el amor y la felicidad que me ha dado en este tiempo.

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Antecedentes	6
Efecto de la temperatura en la reproducción de serpúlidos	7
Desarrollo temprano en Spirobranchus	9
Justificación 1	1
Hipótesis 1	2
Objetivos 1	2
General1	2
Específicos 1	2
Material y métodos 1	3
Área de estudio1	3
Recolecta de organismos 1	4
Trabajo de laboratorio 1	7
Diseño experimental 1	7
Inducción al desove y obtención de óvulos1	8
Caracterización morfológica del desarrollo temprano (fecundación-larva)1	9
Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario 2	20
Efecto de la temperatura en la supervivencia larval2	22
Análisis de datos 2	23
Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario2	23
Efecto de la temperatura en la supervivencia larval2	26
Resultados 2	27
Caracterización morfológica del desarrollo temprano (fecundación-larva) de Spirobranchus incrassatus	27
Caracterización morfológica del desarrollo temprano (fecundación-larva) de Spirobranchus cf. corniculatus	35
Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario de Spirobranchus incrassatus	1
Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario de Spirobranchus cf. corniculatus 5	50
Efecto de la temperatura en la supervivencia larval de Spirobranchus incrassatus	30
Efecto de la temperatura en la supervivencia larval de Spirobranchus cf. corniculatus	51
Discusión	62
Conclusiones	'0
Referencias	'1

Contenido

Resumen

Spirobranchus es un género de serpúlidos que se distribuye en aguas someras tropicales y subtropicales, cuyas especies no sólo son importantes por la elevada abundancia y riqueza morfológica que presentan, sino que también ocupan un lugar relevante en las redes tróficas al ser uno de los principales grupos de invertebrados sésiles suspensívoros que contribuyen al reciclaje de nutrientes y mantienen la salud del ecosistema béntico. La temperatura es un factor importante para el desarrollo y distribución de invertebrados marinos y en los últimos años varios estudios han confirmado un incremento en la temperatura promedio de los mares tropicales. Así, el principal objetivo de este trabajo fue caracterizar el desarrollo temprano (fecundación-larva) de dos especies de Spirobranchus (S. incrassatus y S. cf. corniculatus) de la costa central de Oaxaca y evaluar el efecto del incremento de la temperatura en el desarrollo embrionario y supervivencia larval en ambas especies. Los ejemplares se recolectaron en las bahías de Puerto Ángel y Estacahuite. Los embriones y larvas fueron sometidos a cuatro temperaturas, considerando 28°C como la temperatura control, 30 y 32°C representan el incremento de la temperatura promedio previsto por el Panel Intergubernamental del Cambio Climático para la región en el 2100 y 34°C corresponde a un escenario extremo. Spirobranchus incrassatus se desarrolló correctamente desde la fecundación hasta la formación de la larva trocófora en 12 h y fue caracterizada hasta una larva avanzada (nectoqueta) en proceso de metamorfosis de 24 días, mientras que S. cf. corniculatus se desarrolló en 14 h y se caracterizó hasta una trocófora temprana de ocho días. Las temperaturas de 28 y 30°C fueron las óptimas para el adecuado desarrollo embrionario, pero sólo para S. cf. corniculatus, la probabilidad de que los embriones se desarrollen correctamente fue mayor a 28°C; mientras que 32°C fue el límite letal superior y 34°C fue una temperatura letal. A partir de la temperatura de 30°C, el desarrollo en ambas especies fue más rápido. En S. incrassatus y S. cf. corniculatus hubo diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia larval en todas las combinaciones de temperatura. Para S. incrassatus el porcentaje más alto de supervivencia de larvas (94.2%) ocurrió a 30°C y el menor porcentaje de supervivencia (23.5%) se observó a 34°C; mientras que para S. cf. corniculatus el porcentaje más alto de supervivencia larval (90.7%) ocurrió a 28°C y el porcentaje más bajo (19.8%) a 34°C.

Palabras clave: Desarrollo temprano, embriones, Pacífico oriental, tolerancia térmica, trocófora.

Abstract

Spirobranchus is a genus of serpulids distributed in shallow tropical and subtropical waters, whose species are not only important for their high abundance and morphological richness, but also occupy an important place in the trophic networks, being one of the main sessile filter-feeder invertebrates that contribute to nutrient recycling and maintain the health of the benthic ecosystem. Temperature is an important factor for the development and distribution of marine invertebrates and in recent years several studies have confirmed an increase in the average temperature of tropical seas. Thus, the main objective of this work was to characterize the early development (fertilization-larva) of two species of Spirobranchus (S. incrassatus and S. cf. corniculatus) on the central coast of Oaxaca and to evaluate the effect of temperature increasing on embryonic development and larval survival in both species. The specimens were collected from Puerto Ángel and Estacahuite Bays. The embryos and larvae were subjected to four temperatures, considering 28°C as the control temperature, 30 and 32°C represent the estimated average increase of temperature predicted by the Intergovernmental Panel on Climate Change for the region in 2100 and 34°C corresponds to an extreme scenario. Spirobranchus incrassatus developed correctly from fertilization to trochophore larva formation in 12 h and was characterized until the appearance of an advanced larva (nectochaeta) of 24 days ongoing metamorphosis, while S. cf. corniculatus developed in 14 h and was characterized until an early trochophore of eight days. The temperatures of 28 and 30°C were optimal for the correct embryonic development, but only for S. cf. corniculatus, the probability that the embryos develop correctly is highest at 28°C; whereas 32°C was the upper lethal limit and 34°C was a lethal temperature. From the temperature of 30°C, development in both species was faster. In S. incrassatus and S. cf. corniculatus there were significant differences in the percentage of larval survival in all temperature combinations. For S. incrassatus the highest percentage of larval survival (94.2%) occurred at 30°C, and the lowest percentage of survival (23.5%) was observed at 34°C; while for S. cf. corniculatus the highest percentage of larval survival (90.7%) occurred at 28°C and the lowest percentage (19.8%) was recorded at 34°C.

Keywords: Embryos, early development, Eastern Pacific, thermal tolerance, trochophore.

Introducción

Los serpúlidos son gusanos marinos que se caracterizan por construir tubos de carbonato de calcio y por presentar una membrana torácica (ten Hove 1984). También portan una corona branquial y opérculo en la región anterior del cuerpo, seguido de dos regiones más, el tórax y el abdomen (Bastida-Zavala 2009).

Dentro de los serpúlidos resalta el género *Spirobranchus* Blainville, 1818 con una riqueza de 36 especies a nivel mundial, las cuales se distribuyen en aguas someras tropicales y subtropicales (Perry *et al.* 2018, Read & Fauchald 2018). Además, dentro de este género se encuentran las especies más grandes y longevas de la familia, pueden llegar a vivir entre 10 y 40 años (Nishi & Nishihira 1996). Los *Spirobranchus* tienen un opérculo que consiste en una placa calcárea que puede ser plana, cónica, o ligeramente cóncava y lisa o con espinas (ten Hove 1984).

Por otro lado, se ha documentado que algunas especies de *Spirobranchus* pueden ser gonocóricas o hermafroditas (Gaikwad 1988 *In:* Kupriyanova *et al.* 2001, Marsden 1992) y aquellas que llevan a cabo la reproducción sexual liberan los gametos en la columna de agua (Hörstadius 1923, Crisp 1977, Smith 1984, Herbert-Wilson 1991).

Durante el desarrollo temprano, los organismos pasan por diferentes etapas, las cuales abarcan el inicio de la fecundación y la división celular, seguidas de la aparición de una blástula y una gástrula. Los *Spirobranchus*, como todos los poliquetos, presentan en el cigoto una división holoblástica con patrón espiral (Brusca 1980, Smith 1984, Kupriyanova *et al.* 2001, Xie *et al.* 2005, Arenas-Mena & Li 2014).

Los *Spirobranchus* presentan un desarrollo indirecto, es decir, pasan por un estadio larval antes de dar lugar al desarrollo de un nuevo individuo. La típica larva trocófora planctotrófica suele presentar forma romboide, con diferentes bandas y penachos de cilios. La trocófora temprana tiene un penacho ciliar en la región apical y justo arriba de la boca incluye una banda de cilios llamada prototroca. Esta última divide el cuerpo de la trocófora en una región anterior (episfera) y una

región posterior (hiposfera). Por debajo de la boca se encuentra otra banda ciliada conocida como metatroca; ventralmente posee una banda ciliar llamada neurotroca y es común que también posea un penacho perianal de cilios llamado telotroca (Fig. 1A-B) (Schroeder & Hermans 1975, Smith 1984, Bleidorn *et al.* 2015).



Figura 1. Morfología de la larva trocófora en diferentes etapas. A-B) larva trocófora temprana de 18 y 24 h, respectivamente, vista lateral; C) larva metatrocófora, vista ventral; D) larva nectoqueta, vista ventral. Abreviaturas: a= ano; bo= boca; ca= cilios apicales; ep= episfera; es= estómago; hi= hiposfera; i= intestino; mt= metatroca; n= neurotroca; oc= ocelo; ocd= ocelo derecho; oci= ocelo izquierdo; p= prototroca; se1, se2 y se3= setígero 1, 2 y 3; va= vesícula anal. Figuras modificadas de Smith (1984).

En algunas especies se ha descrito que la larva trocófora temprana continúa con su desarrollo para dar lugar a una larva más desarrollada conocida como metatrocófora (Fig. 1C). Después de 6-14 días el diámetro de las larvas metatrocóforas no aumenta y comienzan a desarrollarse en un último estadio conocido como nectoqueta, el cual consiste en larvas que presentan un cuerpo segmentado con tres pares de setas (Fig. 1D) (Smith 1984).

En el Pacífico oriental tropical se distribuyen cuatro especies de *Spirobranchus*: *S. incrassatus* Krøyer [*in*] Mörch, 1863, *S. minutus* Rioja, 1941, *S. spinosus* Moore, 1923, y *S.* cf. *corniculatus* (*sensu* Sánchez-Ovando 2019), de las cuales todas, excepto *S. spinosus*, se pueden encontrar en el Pacífico sur de México (Bastida-Zavala 2008, Sánchez-Ovando 2019), pero sólo *S. incrassatus* y *S.* cf. *corniculatus* (never consideradas en este trabajo por ser las de mayor talla (0.8-5 cm y 1.5-11.8 cm, respectivamente) y por lo tanto facilitan su manipulación.

Spirobranchus incrassatus se distribuye desde el sur del golfo de California hasta Colombia e islas Galápagos (Keppel *et al.* 2019); mientras que *S. cf. corniculatus* se distribuye desde Baja California hasta Oaxaca (Bastida-Zavala 2008). Ambas especies se ubican en localidades donde la temperatura superficial del mar varía entre 25 y 30°C, con un promedio de 28.5°C (Misra *et al.* 2016).

Por otro lado, la temperatura promedio de los sitios en los cuales se distribuyen y desarrollan varias especies tropicales de serpúlidos podría cambiar para el año 2100, debido a que la tendencia actual es el incremento de la temperatura a causa de las actividades antropogénicas, como la tala incontrolada de árboles, la urbanización, el aumento de la población humana, el uso exagerado de sustancias contaminantes y emisiones de gases de efecto invernadero (Lorente *et al.* 2004). Se prevé que la temperatura global aumentará de 1.8°C a 4°C sobre el promedio actual y para finales del siglo se predice que la temperatura promedio de los mares tropicales incrementará hasta 4.8°C por encima de la actual (IPCC 2007, 2014).

En invertebrados marinos la temperatura es un factor clave durante los primeros estadios del desarrollo, cuando son más vulnerables. Un incremento en

la temperatura puede provocar anormalidades en el desarrollo embrionario y larvario; por ejemplo, en invertebrados sésiles se ha descrito que las larvas presentan malformaciones, o no se llegan a asentar, o puede ocurrir su muerte (Thorson 1950, Rupp 1973, Crisp 1977). Aunque en algunas ocasiones el incremento de la temperatura no llega a ser letal (Rahman *et al.* 2009). Los serpúlidos no son la excepción de todos estos efectos, debido a que son invertebrados sésiles.

En los serpúlidos se sabe muy poco sobre el efecto que puede tener la variación alta de la temperatura en los gametos, así como en el desarrollo embrionario y larvario. Los pocos estudios realizados hasta el momento han demostrado que, a temperaturas inferiores o superiores a la normal, en la que se desarrollan las poblaciones adultas, suceden efectos negativos (Vuillemin 1958, Leone 1970, Crisp 1977) y rara vez efectos positivos (Gee 1967), o incluso puede que no ocurra algún efecto. Esto último demuestra la aparente capacidad de tolerancia de algunas especies a las variaciones importantes de temperatura, como es el caso de *Hydroides elegans* (Haswell, 1883) (Qiu & Qian 1997, 1998).

Antecedentes

En el Pacífico mexicano sólo hay tres trabajos hasta la fecha en los que se ha evaluado el efecto de la temperatura. En el primero, Díaz-Pérez & Carpizo-Ituarte (2011) realizaron experimentos con larvas de *S. purpuratus* de Punta Baja y Bajamar, Baja California y encontraron que el límite de la tolerancia térmica en las larvas es a 27°C, temperatura en la que durante 24 h de exposición se producen efectos letales resultando en 100% de mortalidad; mientras que, en larvas expuestas durante 2 h a 31°C, se producen efectos letales con el 100% de mortalidad.

Para el Pacífico sur de México, Mejía-Gutiérrez *et al.* (2019) experimentaron con gametos, embriones y larvas del erizo rosa *Toxopneustes roseus* (A. Agassiz, 1863) de la bahía de Estacahuite, Oaxaca. Los autores encontraron que a 28 y 30°C la fecundación, el desarrollo embrionario y la supervivencia larval no fueron

afectados de manera significativa; en tanto que en el desarrollo embrionario a 32°C hubo efectos letales (100% de mortalidad) en las mórulas, blástulas, gástrulas, prismas y larvas equinopluteus. En el experimento de supervivencia larval, el porcentaje más alto de larvas vivas (94%) ocurrió a 30°C, seguido de la temperatura de 28°C (81.4%) y el porcentaje más bajo (69.5%) se registró a 32°C.

Asimismo, Rodríguez-Medellín (2019) realizó experimentos con gametos, embriones y larvas del erizo irregular *Rhyncholampas pacificus* (A. Agassiz, 1863) de playa Panteón, bahía de Puerto Ángel, Oaxaca. Los resultados mostraron que la fecundación fue exitosa en todas las temperaturas, siendo el proceso con mayor tolerancia al incremento de la temperatura. En el desarrollo embrionario no existieron diferencias significativas en el efecto de las temperaturas de 28 y 30°C; mientras que el desarrollo fue inestable a 32°C y a 34°C fue inhibido, siendo este el proceso más sensible al incremento de la temperatura. Se evidenciaron diferencias significativas en el porcentaje de larvas vivas expuestas a 28 y 32°C, 28 y 34°C y entre 30 y 34°C, con una alta mortalidad a 34°C.

Efecto de la temperatura en la reproducción de serpúlidos

Vuillemin (1958) indicó que el tiempo de desarrollo larvario de un serpúlido exótico en Europa, *Ficopomatus enigmaticus* (Fauvel, 1923), aumenta conforme decrece la temperatura, tardando siete horas a 30°C y 15 h a 20°C.

Gee (1967) recolectó ejemplares de *Spirorbis (Spirorbis) rupestris* (Gee & Knight-Jones, 1962) en West Angle Bay, Reino Unido y observó que a temperaturas bajas (5°C) la maduración de los gametos es lenta; mientras que a temperaturas altas (10, 15 y 20°C) la maduración es más rápida.

Leone (1970) evaluó el efecto de la temperatura (10, 16, 22, 26 y 30°C) en la maduración de ejemplares de *Hydroides dianthus* (Verrill, 1873) y encontró que a temperaturas altas (26 y 30°C) la producción de gametos y el número de ejemplares maduros disminuye.

Gray (1976) indicó que las larvas de cuatro días de los ejemplares de *Serpula columbiana* Johnson, 1901 (en el trabajo identificada como *S. vermicularis* Linnaeus, 1767) recolectados en la isla San Juan, Washington, son más resistentes a la reducción de la salinidad y bajas temperaturas que las gástrulas y las larvas de un día post-fecundación.

Qiu & Qian (1997) experimentaron con larvas de *Hydroides elegans* y observaron que la disminución de la salinidad (35 a 15%) generó que pocas larvas se asentaran; mientras que el aumento de la concentración de fitoplancton (0 a 10^6 células/ml) puede contribuir a la formación de picos de asentamiento. Asimismo, indicaron que la temperatura (15, 20, 25 y 30°C) no parece ser un factor limitante tanto para el desarrollo temprano como para el asentamiento de esta especie.

Un año después, Qiu & Qian (1998) demostraron que la temperatura (15-30°C) no es un factor limitante en la supervivencia de juveniles de *H. elegans*; mientras que la baja salinidad (15 y 20%) si lo es, generando a los ocho días un 100% de mortalidad a 15% de salinidad y un 30% de mortalidad a 20% de salinidad. Adicionalmente, apoyaron la idea de que las etapas tempranas del desarrollo son las más sensibles al estrés ambiental, en comparación con los jóvenes y adultos tardíos y que los jóvenes sólo son más vulnerables al comienzo de la vida béntica.

Hydroides elegans es una especie modelo que ha sido utilizada en más de una ocasión para caracterizar el típico desarrollo indirecto de los serpúlidos. Carpizo-Ituarte & Hadfield (1998) estimularon la metamorfosis en larvas de *H. elegans* recolectados en Pearl Harbor, Hawái. La metamorfosis ocurrió rápidamente (cinco días) después de la inducción por biopelículas marinas, en comparación con inductores artificiales (Cs⁺, K⁺) en los que la metamorfosis fue más lenta. Cabe mencionar que las larvas las obtuvieron 48 h después de la fecundación a una temperatura ambiente, entre 24 y 26°C.

Kupriyanova *et al.* (2001) realizaron una compilación de la información existente sobre el desarrollo ontogénico de los serpúlidos, indicando que los ovocitos de estos poliquetos tienen un intervalo de tamaño de 40 a 200 µm.

8

Arenas-Mena & Li (2014) estudiaron y caracterizaron el desarrollo de la larva trocófora de *H. elegans*, encontrando que es el típico serpúlido con desarrollo indirecto y división celular en espiral. Además, describen e ilustran una división de 64 blastómeros, la blástula, la gástrula y la formación de la larva trocófora.

Desarrollo temprano en Spirobranchus

En sólo ocho especies de *Spirobranchus* se ha descrito alguna parte del desarrollo embrionario y larvario, y de acuerdo con la información que existe hasta el momento, el diámetro de los ovocitos de estas especies varía entre 60 y 120 µm.

Hörstadius (1923) experimentó por primera vez con *Spirobranchus*, él dio a conocer que los ovocitos de *S. triqueter* (Linnaeus, 1758) son planos de 80 µm de diámetro y que el pH es determinante para que se lleve a cabo su maduración. Además, indicó que la especie se reproduce de junio a agosto y que los machos se pueden distinguir de las hembras por la coloración del abdomen, blanco-grisáceo y rojo brillante, respectivamente. En esta misma especie Segrove (1941) caracterizó el desarrollo completo de las larvas y Groepler (1984) describió el desarrollo desde las divisiones mitóticas hasta la formación de la larva trocófora temprana.

Allen (1957) estudió el desarrollo de varios poliquetos en La Parguera, Puerto Rico, entre ellos el de *S. giganteus* (Pallas, 1766) y encontró ejemplares maduros desde marzo a octubre. Asimismo, describió a los ovocitos con forma esférica y con diámetros de entre 80 y 85 µm.

Dos décadas después, Crisp (1977) realizó el primer trabajo en el que se estudió el efecto de la temperatura en el desarrollo y asentamiento larvario. Durante abril recolectó ejemplares maduros de *S. kraussii* (Baird, 1865) (muy posiblemente *S. sinuspersicus* Pazoki, Rahimian, Struck, Katouzian & Kupriyanova, 2020) en Kuwait y observó que a 15 y 20°C los cigotos no alcanzaron la etapa de larva trocófora; mientras que a 23-27°C las larvas se desarrollaron y asentaron correctamente entre una y tres semanas. A 30°C el

9

desarrollo fue aún más rápido, las larvas se desarrollaron, pero no lograron asentarse.

Para *S. polycerus* (Schmarda, 1981), Lewis (1960) observó ovocitos de 120 µm de diámetro; mientras que Marsden (1960, 1992), para la misma especie, encontró ovocitos de 60 µm de diámetro y mencionó que las larvas se desarrollan en 28 h a una temperatura aproximadamente de 21°C y que la fecundación cruzada entre una especie hermafrodita simultánea, *S. polycerus sensu stricto*, y una especie gonocórica, *S. polycerus* var. *augeneri* (ahora *S. augeneri* ten Hove, 1970) es imposible. Lacalli (1977, 1981), recolectó ejemplares de *S. polycerus* en Silver Sands, Barbados y encontró ovocitos de 65 µm de diámetro e indicó que en los meses de invierno la actividad reproductiva de esta especie es baja, encontrando pocos ejemplares maduros, en comparación con el resto del año y que las larvas se desarrollan correctamente en 24 h a 26-27°C.

Castric-Fey (1984) observó bajo condiciones de laboratorio que el periodo de desarrollo larval de *S. lamarcki* (Quatrefages, 1866) es de tres semanas a 18°C, pero puede variar de dos meses a principios de primavera a 8-15 días a principios de verano y 20 días a finales de verano, en el sur de Bretaña. Asimismo, McDougall *et al.* (2006) indicó para la misma especie, que las larvas se desarrollan a 19°C, obteniendo metatrocóforas en un lapso de 9-16 días.

Smith (1984) recolectó ejemplares de *S. corniculatus* (Grube, 1862) en Australia y obtuvo exitosamente larvas a 28 y 30° C después de 12 h post-fecundación, las cuales se asentaron en un periodo de 11-12 días. Encontró ejemplares maduros entre octubre y enero, e indicó que los ovocitos tienen en promedio un diámetro de 80 µm.

Selim *et al.* (2005) describieron que los ejemplares de *S. tetraceros* (Schmarda, 1861) recolectados en Alejandría, Egipto, tienen un amplio periodo de desove, iniciando a finales de mayo hasta octubre, e indicaron que los ovocitos de esta especie alcanzan un diámetro máximo de 78 µm.

Justificación

Tanto *Spirobranchus incrassatus* como *S.* cf. *corniculatus* forman parte de la familia Serpulidae, una de las más importantes entre los poliquetos gracias a su alta riqueza específica (500-600 especies) (Bastida-Zavala 2009), debido a esto y al hecho de constituir uno de los principales grupos de invertebrados sésiles suspensívoros, ocupan un lugar importante en las redes tróficas, contribuyendo con el reciclaje de los nutrientes y manteniendo la salud del ecosistema béntico (Bastida-Zavala *et al.* 2017).

Otra importancia ecológica de estas dos especies de *Spirobranchus*, es que pueden encontrar asociadas con algunas especies de corales hermatípicos, como sucede en la Gran Barrera Arrecifal de Australia con otras especies de este género, en donde se ha descrito que la relación entre las especies de *Spirobranchus* y los corales masivos es de tipo mutualista, de tal forma que les brindan protección, alimento y salud (de Vantier *et al.* 1986). También se pueden encontrar asociadas a sustratos rocosos cercanos a la boca de lagunas costeras (Sánchez-Ovando 2019), a raíces de mangle y a sustratos antropogénicos como pilotes de muelles (Bastida-Zavala 2008, Bastida-Zavala *et al.* 2017).

La mayor parte de la investigación sobre la ontogenia de los serpúlidos se ha llevado a cabo con las especies del Caribe y del Indo-Pacífico occidental y se ha enfocado principalmente en el desarrollo y asentamiento larval. Sin embargo, aunque la reproducción, desarrollo y asentamiento de algunas especies estén bien estudiados, falta información de la mayoría de las especies de *Spirobranchus*, en particular de las del Pacífico oriental tropical y mucho menos hay trabajos en los que se evalúe el efecto del incremento de la temperatura.

En el Pacífico sur de México, específicamente para la costa oaxaqueña, *S. incrassatus* y *S.* cf. *corniculatus* son las especies más grandes y fáciles de encontrar (Gómez *et al.* 1997, Bastida-Zavala 2008), por lo que son idóneas para desarrollar trabajos sobre su reproducción.

Finalmente, debido a que los escenarios a futuro indican un incremento en la temperatura de los océanos, es importante realizar estudios que abarquen las etapas del desarrollo embrionario y larval, para así conocer los posibles efectos y respuestas que puedan presentar las especies de invertebrados del bentos, de lo cual dependerá que sus poblaciones se mantengan o no en los ecosistemas en los que se desarrollan.

Hipótesis

- El proceso de fecundación hasta la formación de la larva de *Spirobranchus incrassatus* y *S.* cf. *corniculatus* se completará en un lapso de 12-28 horas.
- El desarrollo embrionario como la supervivencia de las larvas de S. incrassatus y S. cf. corniculatus ocurrirá de manera óptima entre 28 y 30°C y un incremento en la temperatura por encima de ese intervalo producirá efectos negativos en la calidad y viabilidad de embriones, blástulas, gástrulas y larvas trocóforas.

Objetivos

General

Evaluar el efecto del incremento de la temperatura en el desarrollo embrionario y supervivencia larval de dos especies de *Spirobranchus* de la costa central de Oaxaca.

Específicos

- Caracterizar morfológicamente el desarrollo temprano (fecundación-larva) de Spirobranchus incrassatus y S. cf. corniculatus.
- Evaluar el efecto de cuatro tratamientos de temperatura (28, 30, 32 y 34°C) en el desarrollo embrionario de *S. incrassatus* y *S.* cf. *corniculatus*.
- Evaluar el efecto de cuatro tratamientos de temperatura (28, 30, 32 y 34°C) en la supervivencia de las larvas de *S. incrassatus* y *S.* cf. *corniculatus*.

Material y métodos

Área de estudio

Los ejemplares de *S. incrassatus* y *S.* cf. *corniculatus* fueron recolectados en dos localidades de la costa central de Oaxaca, México: en los pilotes del muelle de la bahía de Puerto Ángel y en fondos rocosos de la bahía de Estacahuite (Figs. 2, 3A-B).



Figura 2. Ubicación geográfica de la bahía de Puerto Ángel (A) y de la bahía de Estacahuite (B).

Tanto la bahía de Puerto Ángel como la de Estacahuite se ubican en el margen occidental del golfo de Tehuantepec, región que se caracteriza por presentar un régimen de marea mixto predominantemente semidiurno, con oleaje moderado. El fondo está compuesto por arena y formaciones rocosas y coralinas.

El golfo de Tehuantepec está expuesto a vientos intermitentes provenientes del norte, llamados "Tehuanos", los cuales duran tres o cuatro días, alcanzando velocidades mayores a 10 m/s (Barton *et al.* 1993). El clima que caracteriza a la región es de tipo cálido-subhúmedo (Aw) (García 1973), aunque se presentan dos épocas climáticas bien diferenciadas que corresponden a un periodo de meses lluviosos (mayo-octubre) y un periodo de meses de secas (noviembre-abril).

La temperatura superficial promedio del mar en el golfo de Tehuantepec es 28.5°C ya que se encuentra dentro de la alberca de agua cálida del hemisferio occidental (Wang & Enfield 2001, Misra *et al.* 2016). Durante los "Tehuanos" la temperatura en el centro del golfo baja hasta los 16°C y en los alrededores sube hasta los 30°C (Lavín *et al.* 1992). En el invierno la temperatura superficial del mar varía entre 26 y 27°C y durante verano llega hasta 29.5°C (Wilkinson *et al.* 2009).

Recolecta de organismos

Los ejemplares se recolectaron durante el año 2019 con el uso de esnórquel y buceo autónomo con equipo SCUBA. Se llevaron a cabo un total de 11 salidas al campo, siete al muelle de Puerto Ángel y cuatro a la bahía de Estacahuite, iniciando desde mayo hasta diciembre. En julio no se salió a recolectar debido a que en este mes se presentó una lluvia intensa que provocó oleaje fuerte que impidió la entrada al mar. Los detalles de las recolectas se pueden encontrar en la Tabla 1.

Con ayuda de cincel y martillo se desprendieron los tubos de los pilares del muelle y de las rocas y se colocaron en frascos con agua marina. Los ejemplares se transportaron al Laboratorio de Ecología del Desarrollo (ECODES) de la Universidad del Mar, *campus* Puerto Ángel (Fig. 3C) y a cada ejemplar se le

observó el opérculo para determinar de qué especie se trataba (Bastida-Zavala 2009).



Figura 3. A) Muelle de la bahía de Puerto Ángel con un acercamiento de los pilotes; B) vista panorámica de la bahía de Estacahuite; C) fachada del laboratorio de Ecología del Desarrollo (UMAR); D-E) vista superior y frontal de baños María (Mod. Grant W14), respectivamente.

Tabla 1. Información de las recolectas realizadas. PA= muelle de Puerto Ángel; ES= bahía de Estacahuite; ND= No disponible; *Si*= *S. incrassatus*; *Sc*= *S.* cf. corniculatus.

Fecha	Localidad	# de ejemplares recolectados por especie	Nota
Mayo 3, 2019	PA	<i>Si</i> = 10; <i>Sc</i> = 0	Los ejemplares ya habían desovado cuando se llegó al laboratorio.
Junio 27, 2019	PA	<i>Si</i> = ND; <i>Sc</i> = ND	Los ejemplares desovaron, pero se obtuvieron pocos ovocitos.
Julio 8, 2019	PA	-	Se fue al sitio de recolecta, pero no se pudo recolectar por lluvia intensa.
Agosto 20, 2019	PA	<i>Si</i> = 5; <i>Sc</i> = 0	Se hizo la caracterización del desarrollo temprano de <i>Si</i> .
Agosto 29, 2019	ES	<i>Si</i> = 0; <i>Sc</i> = 15	Ejemplares dañados durante la recolecta. No desovaron.
Agosto 30, 2019	PA	<i>Si</i> = 41; <i>Sc</i> = 0	Se hizo el primer experimento de temperatura en los embriones de <i>Si</i> .
Septiembre 12, 2019	ES	<i>Si</i> = 0; <i>Sc</i> = ND	Los ejemplares no desovaron.
Octubre 23, 2019	PA	<i>Si</i> = 65; <i>Sc</i> = 7	-Se hizo el segundo experimento de temperatura en los embriones de <i>Si</i> . -Se hizo la caracterización de <i>Sc</i> .
Noviembre 7, 2019	ES	<i>Si</i> = 0; <i>Sc</i> = 46	Se hizo el primer experimento de temperatura en los embriones y en las larvas de <i>Sc</i> .
Noviembre 21, 2019	ES	<i>Si</i> = 0; <i>Sc</i> = 22	Se hizo el segundo experimento de temperatura en los embriones y en las larvas de <i>Sc</i> .
Diciembre 4, 2019	PA	<i>Si</i> = 113; <i>Sc</i> = 5	Se hicieron los dos experimentos de temperatura en las larvas de <i>Si</i> .

Trabajo de laboratorio

Diseño experimental

Se utilizaron cuatro baños María (Grant W14), se llenaron con 10 I de agua destilada y se programaron a cuatro temperaturas (28, 30, 32 y 34°C) (Fig. 3E). La temperatura de 28°C se consideró como la temperatura control, debido a que corresponde a la temperatura promedio del mar en la cual se desarrollan y habitan las poblaciones de *S. incrassatus* y *S.* cf. *corniculatus* en el área de estudio; 30 y 32°C son las temperaturas que se tienen en cuenta como el aumento de la temperatura promedio previsto por el IPCC para la región en el 2100; y 34°C corresponde a un escenario extremo.

Con la finalidad de evitar fluctuaciones en las temperaturas establecidas de cada baño María, los cuatro equipos se mantuvieron dentro del laboratorio de Ecología del Desarrollo con el aire acondicionado encendido permanentemente, logrando así una temperatura ambiente del laboratorio de aproximadamente 20°C.

El agua de mar empleada en los experimentos se filtró de forma mecánica con filtros de 5 y 1 μ m y fue irradiada con luz UV, con la finalidad de reducir la aparición de microorganismos como protozoarios y bacterias. Dentro de cada baño María se colocaron dos vasos de precipitados de 500 ml y una piseta, se llenaron con 300 ml de agua de mar filtrada (AMF) y fueron sellados (Fig. 3D).

Todo el procedimiento anterior se realizó un día antes de iniciar el experimento para que la temperatura fuera estable en cada baño María y para que los gametos siempre se encontraran en agua con la temperatura de cada tratamiento. Para evaluar la respuesta poblacional a los tratamientos de temperatura propuestos, el experimento se llevó a cabo dos veces, en distintas fechas y con una mezcla de gametos provenientes de diferentes progenitores ("pool"), esto último para reducir la variación experimental (Evans & Marshall 2005). Los experimentos fueron nombrados experimento 1 (E1) y experimento 2 (E2).

Inducción al desove y obtención de óvulos

Previamente a la inducción al desove, los tubos de los *Spirobranchus* se limpiaron con ayuda de un pincel y AMF, de tal forma que se eliminaran los epibiontes y restos de materia orgánica que se encontraban adheridos a estos (Fig. 4A-B).

Al no existir dimorfismo sexual aparente en los *Spirobranchus*, se provocó un estrés mecánico fragmentando los tubos con pinzas con el propósito de inducir a la liberación de los gametos y así poder diferenciar entre machos y hembras (Leone 1970, Strathmann 1987). Cuando ocurrió el desove, las hembras fueron colocadas en recipientes de cristal con AMF para recolectar los ovocitos; mientras que los machos fueron colocados en recipientes sin AMF para obtener el esperma "seco" (Fig. 4A-E).



Figura 4. Ejemplares de Spirobranchus desovando. A) tubo y ovocitos de S. incrassatus; B) esperma de S. incrassatus; C) esperma seco recolectado;
D) ovocitos de S. cf. corniculatus; E) esperma de S. cf. corniculatus. Abreviaturas: ov= ovocitos; spe= esperma; tu= tubo.

Para evaluar la viabilidad de los gametos, se tomó una alícuota de ovocitos y se colocó en un portaobjetos para ser observado al microscopio, esto permitió observar si la vesícula germinal estaba presente o ausente (presente= ovocito inmaduro, ausente= ovocito maduro) y si eran esféricos o presentan algún tipo de anormalidad en la forma. Asimismo, se comprobó que los espermatozoides presentaran motilidad acelerada al agregarles una gota de agua marina filtrada.

Después de inducir al desove y evaluar la viabilidad de los gametos, se comprobó la fecundación exitosa. En un vaso de precipitados de 50 ml con AMF se colocó una muestra de ovocitos y se le agregó una muestra del esperma "seco". Después de 20-30 min se tomó una muestra, la cual fue observada al microscopio y se hizo un conteo de la proporción de óvulos. Cuando el porcentaje de fecundación fue alto (al menos 80%) se comenzó con las etapas experimentales.

Una vez obtenidos los gametos y después de haber comprobado la viabilidad de estos, se llevó a cabo la prueba de fecundación *in vitro* para la obtención de los óvulos empleados en los experimentos. Este proceso consistió en colocar los ovocitos en un recipiente de 2.4 l con AMF y se le agregó 1 ml de esperma "seco", se homogenizó y se dejó reposar por 15-30 min, después se tomó una muestra para ser observada al microscopio y verificar si la membrana de fecundación estaba presente. Una vez visible la membrana de fecundación, los óvulos se colocaron en un tamiz de 55 µm de luz de malla y se lavaron con la finalidad de eliminar el exceso de esperma. Los óvulos limpios se concentraron en un recipiente de 2.4 l con AMF.

Caracterización morfológica del desarrollo temprano (fecundación-larva)

La caracterización del desarrollo embrionario se basó en los óvulos obtenidos a una temperatura de 28°C, debido a que es la temperatura promedio del mar en el área de estudio. Los tiempos considerados para observar y caracterizar todos los estadios fueron los siguientes: después de 15-30 minutos de haberse llevado la fecundación *in vitro* se tomó una muestra para ser observada bajo el microscopio

óptico y saber si la fecundación fue exitosa, indicada por la aparición de cuerpos polares y de la membrana de fecundación. Posteriormente, se tomaron muestras cada 30 minutos para observar todas las divisiones mitóticas hasta obtener mórulas con 32 o 64 blastómeros y blástulas. Luego las observaciones se realizaron entre nueve y 12 horas post-fecundación hasta obtener gástrulas y finalmente se realizaron cada 12 y 14 horas post-fecundación hasta encontrar larvas trocóforas tempranas.

Se describieron detalladamente tanto los ovocitos como cada uno de los estadios del desarrollo: fecundación, división, blástula, gástrula y larva trocófora temprana. Debido a que las larvas trocóforas tempranas continuaron desarrollándose, también se incluyó la descripción de los estadios posteriores a estas. Cabe mencionar que no se incluyó una descripción de los espermatozoides debido a su diminuto tamaño, la coloración translúcida y la alta motilidad que presentaban, lo que dificultó su observación a detalle.

Con el software de análisis de imágenes ImageJ 1.52q se midió el diámetro de los embriones, el diámetro a la altura de la prototroca de las larvas, largo de la episfera y largo de la hiposfera, así como la longitud total (desde la parte apical de la episfera hasta la parte distal de la hiposfera). Todas las mediciones se representan como la media y desviación estándar (±).

Las observaciones se realizaron con ayuda de microscopía estereoscópica (Carl Zeiss Stemi SV6) y compuesta (Carl Zeiss Scope. A1; Carl Zeiss Primo Star; Olympus CX21). Se llevó un registro fotográfico con ayuda de una cámara digital Canon EOS REBEL T5i de 18 megapíxeles y una cámara AxioCam ERc 5s. Para la edición de las figuras se utilizó el software Photoshop CS6 y Helicon Focus 7.

Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario

Del recipiente de 2.4 I se colocaron muestras de manera aleatoria en cuatro vasos de precipitados de 300 ml, uno para cada tratamiento de temperatura correspondiente (28, 30, 32 y 34°C). A partir de que los óvulos se colocaron en cada tratamiento de temperatura, se comenzó a registrar el tiempo transcurrido.

Para obtener la densidad adecuada de óvulos en cada temperatura (20 óvulos/ml), se homogenizó la muestra y se tomaron 100 μ L (= 0.1 ml) con una micropipeta y fueron colocados en un portaobjetos excavado para ser observado en el microscopio y contabilizar el número de óvulos. El procedimiento anterior se repitió como mínimo cuatro veces para así finalmente obtener un promedio de óvulos en 100 μ L. Una vez obtenida la cantidad promedio de óvulos, mediante una regla de tres se estimó el volumen requerido para tener 6,000 óvulos en cada vaso con 300 ml de muestra, se desechó el volumen excedente y se rellenó con el AMF de la temperatura correspondiente.

En cada tratamiento de temperatura se colocaron 18 viales con 15 ml de la muestra correspondiente a cada uno (Fig. 5A-D). Cada cuatro horas (4, 8, 12, 16, 20 y 24 h) se extrajeron tres viales por cada temperatura hasta completar 24 h. El contenido de cada vial se fijó con 1 ml de formol concentrado (37%) y con ayuda de una cámara de conteo celular (en este caso una cámara de Sedgewick Rafter) se contabilizaron 100 embriones de cada vial, identificando el estadio y registrando el porcentaje de cada uno (embriones anormales, mórulas, blástulas, gástrulas o larvas trocóforas, entre otros).



Figura 5. A-D) diseño experimental para evaluar el efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario, con 18 viales en cada tratamiento de temperatura.

Efecto de la temperatura en la supervivencia larval

El resto de los embriones del recipiente de 2.4 I se dejó a temperatura ambiente (28°C) para que continuaran con el desarrollo hasta que se formaran las larvas trocóforas. Durante ese tiempo, el contenido del recipiente se lavó periódicamente, para eliminar la proliferación de protozoarios o bacterias. Una vez que los embriones alcanzaron el estadio de larva, éstas se repartieron en cuatro vasos de precipitados con 300 ml y la suspensión fue tamizada para que se quedaran sólo las larvas, las cuales se colocaron en cada uno de los vasos de precipitados que se encontraban en los baños María. A partir de que las larvas se colocaron en cada temperatura se comenzó con el registro del tiempo transcurrido.

Con los vasos dentro de los baños María se realizó el conteo para obtener 15 larvas/ml en cada muestra (4,500 larvas en 300 ml). En cada tratamiento de temperatura se colocaron tres viales nuevos, en los cuales se depositaron 15 ml de la muestra correspondiente (Fig. 6A-D). Después de 24 h se retiraron los viales y con ayuda de una cámara de conteo Bogorov se contabilizaron 100 larvas de cada vial, identificando y registrando el porcentaje de larvas trocóforas vivas y muertas.



Figura 6. A-D) diseño experimental para evaluar el efecto de la temperatura en la supervivencia larval, con tres viales en cada tratamiento de temperatura.

Análisis de datos

Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario

Para evaluar el efecto del incremento de la temperatura en el desarrollo embrionario con el conteo de los embriones se construyeron matrices que contenían el porcentaje de los embriones de cada estadio encontrados en cada tiempo de muestreo (4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas) y en cada una de las temperaturas (28, 30, 32 y 34°C). Cabe mencionar que la matriz de datos del experimento 1 (E1) y del experimento 2 (E2) se integró sólo en una matriz, nombrada "matriz original de porcentajes", para posteriormente analizarla con las técnicas propuestas.

Con la matriz anterior se obtuvo el promedio del porcentaje de embriones de cada estadio encontrado en cada uno de los tiempos de muestreo. Con esta matriz de promedios se realizaron gráficos de barras en Excel para cada temperatura y así observar el efecto en el porcentaje de embriones conforme transcurre el tiempo.

Asimismo, la "matriz original de porcentajes" fue analizada con el análisis de Escalamiento Multidimensional No Métrico (nMDS) y el Análisis de Similitud (ANOSIM). Para estas dos técnicas los datos fueron tratados en el programa estadístico PRIMER 7 (Clarke & Gorley 2015). Antes de emplearlas se evaluó mediante una prueba de Box & Cox (1964) la necesidad de transformar los datos con la corrección apropiada (b= 0, no transformar; b= 0.5, transformar con raíz cuadrada; b= 0.75, transformar con doble raíz cuadrada; b= 1, transformar con logaritmo) para disminuir la varianza. En este trabajo la corrección que se aplicó a la matriz de datos de ambas especies fue doble raíz cuadrada (b= 0.73). Posteriormente, se construyó una matriz de similitud, aplicando el índice de similitud de Bray Curtis (Sorensen cuantitativo) y el ordenamiento de los datos fue de "tipo Q". Una vez obtenida la matriz de similitud se empleó el nMDS y el ANOSIM.

Con el nMDS y utilizando un valor de 1,000 iteraciones se obtuvo un gráfico 2D en el cual se visualizó la formación de grupos debido a las posibles similitudes entre los porcentajes de los estadios en cada temperatura. Para evaluar la confiabilidad de la representación gráfica se utilizó un nivel de estrés (Tabla 2).

Nivel de estrés	Confiabilidad
Estrés < 0.1	Excelente
0.1 < Estrés <0.2	Útil
0.2 < Estrés < 0.3	Dudosa
Estrés > 0.3	Mala

Tabla 2. Valores del nivel de estrés para evaluar la correcta representación gráfica obtenida mediante el nMDS.

El ANOSIM se utilizó para detectar diferencias significativas en la similitud del porcentaje de embriones de cada estadio entre las temperaturas. Para ello se empleó un valor de 9,999 permutaciones (Clarke & Green 1988). En la técnica se obtiene un valor de R (valores cercanos a uno indican que la similitud de los porcentajes de los estadios dentro de las temperaturas es más similar entre sí; valores cercanos a 0 indican que la similitud de los porcentajes de los estadios es la misma entre y dentro de las temperaturas). También incluye un nivel de significancia p; si p <0.05 se rechaza Ho, indicando que si hay diferencias significativas en la similitud de los porcentajes de los estadios entre las temperaturas.

Con la "matriz original de porcentajes" se obtuvo el promedio de cada estadio encontrado en cada uno de los tiempos de muestreo, pero esta vez conservando los registros del E1 y E2. Posteriormente, con esta nueva matriz, que se llamó matriz "P", se implementó un modelo de Clasificación por Redes Neuronales (CRN) (Haykin 1999) con el software STATISTICA[©] versión 7.0. Para un grupo de resultados por desplegar (clasificación lineal, clasificación lineal multicapa y clasificación radial) se decidió usar el segundo tipo de resultado para resolver el efecto del incremento de la temperatura (28, 30, 32 y 34°C) sobre cinco estadios del desarrollo embrionario de *S. incrassatus* y *S.* cf. *corniculatus*, en

términos del porcentaje observado de embriones anormales (%EA), mórulas (%M), blástulas (%B), gástrulas (%G) y larvas trocóforas (%LT). Estas últimas, en el modelo CRN multicapa fueron la información de entrada y bajo el efecto del incremento de la temperatura se reestimaron los porcentajes (Fig. 7A-B).

Tanto para *S. incrassatus* como para *S.* cf. *corniculatus* el modelo de CRN multicapa se constituyó por *i* ecuaciones lineales (en los espacios sinápticos) y por *i* ecuaciones "no lineales" (en las capas de activación). Las funciones sinápticas y de activación fueron elegidas por el software STATISTICA[©] versión 7.0.

Los modelos de CRN multicapas fueron implementados con tres capas de activación. Un modelo lineal [P(1) = ai + bi·(ri)] fue utilizado para activar la primer capa de activación. Entre la primer capa y la segunda, se utilizó un modelo lineal como señal sináptica [S(1) = ci + di·P(1)] y, para activar la segunda capa de activación se empleó un modelo hiperbólico [P(2) = $\exp^{(S1)} + \exp^{-(S1)} / \exp^{(S1)} - \exp^{(S1)}$]. Entre la segunda capa y la tercer capa, un modelo lineal [S(2) = ei + fi·P(2)] se empleó como señal sináptica y para activar la tercer capa, se utilizó un modelo softmax [P(3) = $\exp^{(S2)} / \Sigma \exp^{(S1)}$]. Finalmente, con esta última capa se calcularon los registros probabilísticos clasificados, para cada temperatura utilizada, denominados P(%EA), P(%M), P(%B), P(%G) y P(%LT).



Figura 7. Diagramas de los modelos de Clasificación por Redes Neuronales multicapas (CRN). A) diagrama del modelo de CRN multicapa implementado para el desarrollo embrionario de *S. incrassatus*; B) diagrama del modelo de CRN multicapa para el desarrollo embrionario de *S. cf. corniculatus*.

Con un Análisis de Correspondencia (AC) se evaluó la posible correspondencia entre los estadios y los tratamientos de temperatura. Para ello, se estructuró una matriz de contingencias denominada "estadios de desarrollo" o matriz "Ed". La matriz "Ed" constó de cinco renglones (*i*) correspondientes a los estadios de desarrollo: embriones anormales (EA), mórulas (M), blástulas (B), gástrulas (G), larvas trocóforas (LT); así como de cuatro columnas (*j*) que correspondieron a las temperaturas: 28, 30, 32 y 34°C. La interacción fue *i*, *j*.

El resultado del AC se evaluó con base al valor del índice de inercia total (IT= Eigen-valor 1 + Eigen-valor 2), cuyos valores cercanos a cero indican que el análisis es confiable y valores cercanos a 1 indican que el AC no es confiable y a una magnitud de correspondencia, que se utilizó para estimar el "estadio de desarrollo" que se asignó a cada temperatura. Además, se empleó un gráfico perceptual de correspondencia (Hair *et al.* 1999) y para interpretarlo se consideró específicamente para el eje X, el signo y la magnitud del valor de la correspondencia, de manera que ésta fue "baja" para valores de correspondencia negativos, "media" para valores cercanos a cero y "alta" para valores positivos mayores a cero. Esto último se implementó para explicar en términos de "afectación" como el incremento de la temperatura afectó a cinco de los estadios embrionarios de *S. incrassatus* y *S.* cf. *corniculatus*. El AC se implementó mediante el software STATISTICA[®] versión 7.0.

Efecto de la temperatura en la supervivencia larval

Para evaluar el efecto del incremento de la temperatura en la supervivencia de las larvas, se construyeron matrices que contenían el porcentaje de estas encontradas en cada una de las temperaturas. Cabe mencionar que la matriz de datos del experimento 1 (E1) y del experimento 2 (E2) se integró sólo en una matriz, nombrada "matriz original del porcentaje de larvas".

Debido a que las variables que componen a la "matriz original del porcentaje de larvas" en ambas especies no cumplieron con el supuesto de normalidad, se empleó un análisis de la varianza basado en permutaciones (PERMANOVA, por sus siglas en inglés) en el PRIMER 7. Con este análisis se evaluó la supervivencia larval de las dos especies de *Spirobranchus*, tanto en las diferentes temperaturas probadas como en los dos experimentos realizados en cada una. Para ello se estableció el siguiente juego de hipótesis:

- Ho: No hay diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia de las larvas expuestas a las diferentes temperaturas.
- Ha: Si hay diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia de las larvas expuestas a las diferentes temperaturas.

Con el PERMANOVA se obtuvo el valor de la Pseudo-F y valores de probabilidad (p). Si p ≤0.05 se acepta Ha, si p >0.05 se acepta Ho).

Resultados

Caracterización morfológica del desarrollo temprano (fecundación-larva) de Spirobranchus incrassatus

Ovocitos

Isolécitos, con poco vitelo distribuido uniformemente. Ovocitos maduros de coloración naranja al observarlos directamente y de color café bajo el microscopio. Esféricos, con un diámetro de 67.63 \pm 3.67 µm y envueltos por una membrana reticulada de 4.29 \pm 0.58 µm (Fig. 8A). Ovocitos inmaduros translúcidos o ligeramente cafés, con forma irregular, más pequeños, con una vesícula germinal en el centro y con diferente grado de desarrollo (Fig. 8B).

Fecundación

Después de 15 minutos de unir *in vitro* los ovocitos y los espermatozoides se observaron óvulos con cuerpos polares; 10 minutos después inició la elevación de la membrana de fecundación y se completó en 10 minutos, cundo ya tenía un

grosor de 13.85 \pm 0.44 μ m (Fig. 8C-D). El tiempo en el que se llevó a cabo todo este proceso y los subsecuentes se resume en la Tabla 3.

División

De tipo holoblástica igual con patrón espiral. Diámetro del embrión similar durante todo este proceso (Fig. 9A-F). Una hora post-fecundación, se observó la primera división celular junto con un cuerpo polar y un espacio previtelino (Fig. 9A), el cual se hizo cada vez más pequeño conforme ocurrían las divisiones. Las divisiones subsecuentes se llevaron a cabo cada 30 minutos.



Figura 8. Ovocitos y elevación de la membrana de fecundación en *Spirobranchus incrassatus*. A) ovocito maduro; B) ovocitos inmaduros en proceso de vitelogénesis con diferente grado de desarrollo; C-D) óvulos, elevación de la membrana de fecundación. Abreviaturas: m= membrana reticulada; mf= membrana de fecundación; ovvi= ovocito en vitelogénesis inicial; ovvm= ovocito en vitelogénesis media; vg= vesícula germinal.

Blástula

Transcurridas cinco horas y 30 minutos post-fecundación se observaron blástulas tempranas no nadadoras, con un blastocele poco desarrollado y ciliadas (Fig. 9G). A las siete horas y 30 minutos se formaron blástulas nadadoras, con un blastocele completamente formado y ciliadas (Fig. 9H), con un cilio más largo que el resto. Al igual que en la división, el diámetro fue similar durante todo este estadio.

Tabla 3. Tiempo aproximado en el que apareció cada uno de los estadios del desarrollo temprano de *Spirobranchus incrassatus* en condiciones de laboratorio a 28°C.

Estadio del desarrollo	Tiempo transcurrido después de llevar a cabo la fecundación <i>in vitro</i>
Aparición de cuerpos polares	15 minutos
Inicio de la elevación de la membrana de fecundación	25 minutos
Elevación completa de la membrana de fecundación	35 minutos
Primera división celular (2 blastómeros)	1 hora
2da división celular (4 blastómeros)	1 hora y 30 minutos
3ra división celular (8 blastómeros)	2 horas
4ta división celular (16 blastómeros)	2 horas y 30 minutos
5ta división celular (32 blastómeros)	3 horas
6ta división celular (64 blastómeros)	3 horas y 30 minutos
Blástula temprana (no nadadora)	5 horas y 30 minutos
Blástula nadadora	7 horas y 30 minutos
Gástrula	9 horas y 30 minutos
Larva trocófora temprana	12 horas

Gástrula

Se observaron a las nueve horas y 30 minutos post-fecundación. Embrión ligeramente más largo (64.21 ±0.75 μ m) que ancho (61.64 ±2.05 μ m); capa engrosada de células del polo vegetal migró hacia adentro para iniciar el proceso de invaginación, blastoporo y el arquénteron visibles (Fig. 9I); cilios presentes con un cilio apical en el polo animal.



Figura 9. Desarrollo embrionario de Spirobranchus incrassatus. A) primera división; B) segunda división; C) tercera división; D) cuarta división; E) quinta división; F) sexta división (mórula); G) blástula temprana; H) blástula nadadora; I) gástrula. Abreviaturas: ar= arquénteron; bl= blastocele; bp= blastoporo; bla= blastómero; ci= cilios; cp= cuerpo polar; ec= ectodermo; en= endodermo; esp= espacio previtelino.

Larva trocófora temprana

Se observaron a las 12 horas post-fecundación. Cuerpo con forma romboide, con un penacho de cilios apicales y la prototroca, a la altura de esta el diámetro era 70.26 ±4.61 µm y dividía el cuerpo en dos regiones: la episfera y la hiposfera, de 42.21 ±2.49 µm y 32.47 ±0.66 µm de largo, respectivamente. Largo total desde la

parte apical de la episfera hasta la parte distal de la hiposfera de 78.29 \pm 0.9 μ m. Internamente se observó la boca y el estómago (Fig. 10A). Membrana reticulada de los ovocitos se mantiene para dar lugar a una cutícula que cubre el cuerpo de la larva.



Figura 10. Larvas de Spirobranchus incrassatus. A) trocófora temprana; B-C) trocófora temprana de cuatro días; D) trocófora temprana de seis días; E) metatrocófora de ocho días. Abreviaturas: a= ano; bo= boca; ca= cilios apicales; cu= cutícula; ep= episfera; es= estómago; hi= hiposfera; i= intestino; mt= metatroca; n= neurotroca; p= prototroca; pa= papilas; oc= ocelo; va= vesícula anal.

Después de cuatro días, el diámetro de la larva a la altura de la prototroca era 148.28 \pm 1.77 µm y el largo total era 137.37 \pm 3.72 µm. Se observó un ocelo en el lóbulo derecho, una banda ciliar por debajo de la boca (la metatroca) y otra más en la región ventral (la neurotroca) y una vesícula anal. Evidente diferenciación

entre el estómago y el intestino, este último terminando en el ano (Fig. 10B-C). Interior de la boca, estómago, intestino y periferia del ano con pequeños cilios. En larvas de seis días, las estructuras ya mencionadas fueron más fáciles de distinguir (Fig. 10D); superficie de la episfera cubierta por pequeñas proyecciones similares a cilios. Trocóforas tempranas muy activas con desplazamiento rápido.

Larva metatrocófora

Observadas después de ocho días (Fig. 10E), con un segundo ocelo en el lóbulo izquierdo. Diámetro a la altura de la prototroca de 183.31 \pm 1.08 µm y en la periferia se notaban pequeñas papilas. Cuerpo de 253.53 \pm 8.69 µm de largo, casi el doble que el de las larvas tempranas de cuatro días.

Larva nectoqueta

Se observaron a los 12 días (Fig. 11A-B). Región de la episfera diferenciada en una cabeza, con un par de ocelos adicionales adyacentes a los dos ya presentes, con cuatro ocelos en total, cerca de estos se apreciaban pequeños cilios. Hiposfera más larga que la episfera (190.06 ±8.02 μ m y 108.91 ±12.22 μ m, respectivamente), dividida en tres segmentos, con un par de setas a los lados de cada uno, con un total de 12 setas. Diámetro a la altura de la prototroca de 222.49 ±3.97 μ m, largo total del cuerpo de 297.17 ±16.83 μ m. Zona en donde se encuentra la vesícula anal de pigmentación rojiza. Nectoquetas cada vez menos activas, con desplazamiento lento, con un movimiento gradual hacia el fondo y hacia arriba.

Metamorfosis

Inició a los 18 días, larvas con una longitud del cuerpo de 301.26 ±15.72 µm. Cabeza con forma espatulada, con una constricción que la dividía de la región posterior. Por debajo de la constricción era notoria la membrana torácica. La pigmentación en donde se encuentra la vesícula anal era rojiza-oscura (Fig. 12A-
B). Actividad de las larvas muy reducida, con nado lento en el fondo del recipiente en el que se encontraban.

En larvas de 19 días la longitud del cuerpo disminuyó a 246.21 \pm 1.13 µm, debido a que la región de la cabeza empezó a reducir su tamaño. En ambos lados de la cabeza se desarrollaron rudimentos branquiales; cuerpo ligeramente más ancho, vesícula anal se redujo hasta desaparecer. El estómago empezó a crecer e inició a colocarse en el centro del cuerpo (Fig. 12C).



Figura 11. Desarrollo larvario de *Spirobranchus incrassatus*. A-B) larva nectoqueta de 12 días. Abreviaturas: ca= cilios apicales; es= estómago; i= intestino; mt= metatroca; oc= ocelo; p= prototroca; se= setígeros.

En larvas de 21 días la longitud del cuerpo era 217.45 \pm 2.87 µm. Cabeza reducida completamente, con un total de seis rudimentos branquiales ciliados, tres a cada lado. El collar ya iniciaba a desarrollarse, cuerpo de la larva ligeramente

cilíndrico (Fig. 12D). En larvas de 24 días, la longitud del cuerpo era 268.26 \pm 11.03 µm, incluyendo los rudimentos branquiales, estos últimos junto con el collar se encontraban más desarrollados, cuerpo completamente cilíndrico; y portaban un par de uncinos a los lados de los últimos dos setígeros (Fig. 12E).



Figura 12. Larvas de Spirobranchus incrassatus en proceso de metamorfosis. A-B) larvas de 18 días iniciando la metamorfosis; C) larva de 19 días; D) larva de 21 días; E) larva de 24 días. Abreviaturas: br= rudimentos branquiales; br1, br2 y br3= rudimento branquial 1, 2 y 3; col= collar; es= estómago; met= membrana torácica; se1, se2 y se3= setígero 1, 2 y 3; un= uncinos; va= vesícula anal.

Caracterización morfológica del desarrollo temprano (fecundación-larva) de Spirobranchus cf. corniculatus

Ovocitos

Isolécitos, con poco vitelo distribuido uniformemente. Ovocitos maduros de coloración naranja al observarlos directamente y color café bajo el microscopio. Esféricos, 72.31 ±1.17 µm de diámetro, envueltos por una membrana reticulada de 3.11 ±0.27 µm (Fig. 13A). Ovocitos inmaduros café-opacos, con forma irregular, con una vesícula germinal en el centro y con diferente grado de desarrollo (Fig. 13B).

Fecundación

Después de 15 minutos de colocar juntos a los gametos se observaron óvulos con cuerpos polares (Fig. 13C); cinco minutos después inició la elevación de la membrana de fecundación y se completó en 10 minutos, cuando ya tenía un grosor de 17.88 \pm 0.87 µm (Fig. 13D). El tiempo en el que se llevó a cabo todo este proceso y los subsecuentes se resume en la Tabla 4.

División

De tipo holoblástica igual con patrón espiral. Diámetro del embrión consistente durante todo este proceso (Fig. 14A-F). Una hora post-fecundación, se observó la primera división celular y un espacio previtelino (Fig. 14A), el cual se fue haciendo cada vez más pequeño conforme ocurrían las divisiones. Las divisiones subsecuentes se llevaron a cabo cada 30 minutos, con excepción de la segunda.

Blástula

Transcurridas cinco horas y 30 minutos post-fecundación se observaron blástulas tempranas no nadadoras, con un blastocele poco desarrollado y ciliadas (Fig.

14G). A las seis horas y 30 minutos había blástulas nadadoras, con un blastocele completamente formado y ciliadas (Fig. 14H), con un cilio más largo que el resto. Al igual que en la división, el diámetro fue similar durante este estadio.



Figura 13. Ovocitos y elevación de la membrana de fecundación en *Spirobranchus* cf. *corniculatus*. A) ovocito maduro; B) ovocitos inmaduros en proceso de vitelogénesis media; C-D) óvulos, mostrando cuerpos polares y la membrana de fecundación. Abreviaturas: cp= cuerpo polar; m= membrana reticulada; mf= membrana de fecundación; vg= vesícula germinal.

Gástrula

Se observaron a las ocho horas post-fecundación. Embrión ligeramente más largo (72.54 \pm 1.54 μ m) que ancho (71.70 \pm 1.57 μ m); capa engrosada de células del polo vegetal migró hacia adentro para iniciar el proceso de invaginación, blastoporo y arquénteron visibles; cilios presentes con un cilio apical en el polo animal (Fig. 14I).



Figura 14. Desarrollo embrionario de Spirobranchus cf. corniculatus. A) primera división; B) segunda división; C) tercera división; D) cuarta división; E) quinta división; F) sexta división (mórula); G) blástula temprana; H) blástula nadadora; I) gástrula. Abreviaturas: ar= arquénteron; bl= blastocele; bp= blastoporo; bla= blastómero; ca= cilios apicales; ci= cilios; ec= ectodermo; en= endodermo; esp= espacio previtelino.

Tabla 4. Tiempo aproximado en el que apareció cada uno de los estadios del desarrollo temprano de *Spirobranchus* cf. *corniculatus* en condiciones de laboratorio a 28°C.

Estadio del desarrollo	Tiempo transcurrido después de llevar a cabo la fecundación <i>in vitr</i> o	
Aparición de cuerpos polares	15 minutos	
Inicio de la elevación de la membrana de fecundación	20 minutos	
Elevación completa de la membrana de fecundación	30 minutos	
Primera división celular (2 blastómeros)	1 hora	
2da división celular (4 blastómeros)	2 horas y 30 minutos	
3ra división celular (8 blastómeros)	3 horas	
4ta división celular (16 blastómeros)	3 horas y 30 minutos	
5ta división celular (32 blastómeros)	4 horas	
6ta división celular (64 blastómeros)	4 horas y 30 minutos	
Blástula temprana (no nadadora)	5 horas y 30 minutos	
Blástula nadadora	6 horas y 30 minutos	
Gástrula	8 horas	
Larva trocófora temprana	14 horas	

Larva trocófora temprana

Se observaron a las 14 horas post-fecundación (Fig. 15A). Cuerpo con forma romboide, sólo se observó un penacho de cilios apicales y la prototroca, a la altura de esta el diámetro era 94.99 ±2.13 µm y dividía el cuerpo en dos regiones: la episfera y la hiposfera, de 60.04 ±5.65 µm y 33.43 ±4.09 µm de largo, respectivamente. Largo total desde la parte apical de la episfera hasta la parte distal de la hiposfera de 92.75 ±0.94 µm. Internamente se observó la boca y el estómago. La membrana reticulada de los ovocitos se mantiene para dar lugar a una cutícula que cubre el cuerpo de la larva.

En larvas de cuatro días el diámetro a la altura de la prototroca era 151.23 $\pm 2.39 \mu$ m, largo total de 157.40 $\pm 7.68 \mu$ m (Fig. 15B), con un ocelo en el lóbulo derecho, una banda ciliar por debajo de la boca (la metatroca) y otra más en la región ventral (la neurotroca) y una vesícula anal. Evidente diferenciación entre el estómago e intestino, este último terminando en el ano (Fig. 16A). Interior de la

boca, estómago, intestino y periferia del ano con pequeños cilios. Estas estructuras fueron más fáciles de distinguir en larvas de seis días (Figs. 15C, 16B).



Figura 15. Larvas trocóforas tempranas de *Spirobranchus* cf. *corniculatus*. A) larva de 14 h; B-D) larvas de cuatro, seis y ocho días, respectivamente, vista superior. Abreviaturas: bo= boca; cu= cutícula; ep= episfera; es= estómago; hi= hiposfera; oc= ocelo; p= prototroca; pa= papilas.

Después de ocho días, las larvas aún eran trocóforas tempranas (Figs. 15D, 16C-D), diámetro a la altura de la prototroca de 202.90 \pm 3.72 µm y en la periferia se notaban pequeñas papilas (Fig. 15D). Largo total del cuerpo de 226.63 \pm 6.28 µm. Trocóforas muy activas con desplazamiento rápido.



Figura 16. Larvas trocóforas tempranas de *Spirobranchus* cf. *corniculatus*. A-B) trocófora de cuatro y seis días, respectivamente; C-D) trocófora de ocho días. Abreviaturas: a= ano; bo= boca; ca= cilios apicales; cu= cutícula; es= estómago; i= intestino; mt= metatroca; n= neurotroca; oc= ocelo; p= prototroca; va= vesícula anal.

Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario de *Spirobranchus incrassatus*

En *Spirobranchus incrassatus* el porcentaje de los diferentes estadios embrionarios se ve afectado negativamente y el tiempo de aparición de algunos de estos se hace cada vez más corto conforme transcurren las horas y aumenta la temperatura. Tomando en cuenta sólo aquellos estadios que son mayores al 50%, se puede observar cuales son los que predominan.

En la temperatura de 28°C, a las cuatro horas predominaron los embriones en sexta división (mórulas) (91%), a las ocho horas las blástulas (75%) y de las 12 (82%) hasta las 24 h (94%) predominaron las larvas trocóforas (Tabla 5). Por otro lado, a las 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h se encontraron embriones anormales, representando el 4% para los primeros dos tiempos de muestreo y el 2% para el resto (Fig. 17).

En la temperatura de 30°C, en las primeras cuatro horas predominaron los embriones en sexta división (mórulas) (91%) y desde las ocho (80%) hasta las 24 h (95%) predominaron las larvas trocóforas (Tabla 5). Además, a las 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h, se encontraron embriones anormales, representando el 3, 2, 2, 2, 1 y 1%, respectivamente (Fig. 17).

Tiempo	Temperatura/Estadio alcanzado			
Post-fecundación	28°C	30°C	32°C	34°C
4 h	6ta división (mórula)	6ta división (mórula)	Blástula	Blástula
8 h	Blástula	Trocófora	Trocófora	Trocófora
12 h	Trocófora	Trocófora	Trocófora	Embrión anormal
16 h	Trocófora	Trocófora	Trocófora	Embrión anormal
20 h	Trocófora	Trocófora	Trocófora	Embrión anormal
24 h	Trocófora	Trocófora	Trocófora	Embrión anormal

Tabla 5. Estadios del desarrollo embrionario de *S. incrassatus* predominantes (> 50%) en las temperaturas de 28-34°C a través del tiempo.



Óvulo fecundado = 1ra división = 2da división = 3ra división = Embrión anormal = 6ta división (Mórula) = Blástula = Gástrula = Larva trocófora

Figura 17. Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario de *S. incrassatus*. Gráficos de barras correspondientes a las temperaturas de 28, 30, 32 y 34°C, respectivamente, indicando el porcentaje de los estadios presentes (promedio ±DE) en cada tiempo de muestreo.

En la temperatura de 32°C, a las cuatro horas predominaron las blástulas (74%) y al igual que a 30°C desde las ocho (77%) hasta las 24 h (54%) predominaron las larvas trocóforas (Tabla 5). Además, a las 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas, se encontraron embriones anormales, representando el 21, 20, 23, 32, 32 y 36%, respectivamente (Fig. 17).

En la temperatura de 34°C, durante las primeras cuatro horas predominaron las blástulas (66%). A las ocho horas predominaron las larvas trocóforas con el 50%, pero a las 12, 16, 20 y 24 h el porcentaje de estas empezó a disminuir, contando sólo con el 39, 35, 31 y 24%, respectivamente; por el contrario, el porcentaje de embriones anormales empezó a incrementar en todos los tiempos de muestreo. Durante las primeras cuatro horas el porcentaje de embriones anormales fue 35% y para las 24 h predominaron con un 72% (Fig. 17, Tabla 5).

Cabe mencionar que todos los embriones anormales observados en las cuatro temperaturas se caracterizaron por no lograr dividirse completamente (Fig. 18A), presentar divisiones irregulares, con blastómeros de diferentes tamaños (Fig. 18B-C) y por tener la membrana reticulada rota (Fig. 18D).

En el gráfico en 2D generado por el Análisis de Escalamiento Multidimensional No Métrico (nMDS) se pueden observar los datos de cada muestra simbolizados por las temperaturas (28, 30, 32 y 34°C). Las muestras se agruparon de acuerdo con la temperatura correspondiente, formando así cuatro agrupaciones, aunque en algunos casos unas muestras de 28 y 30°C se traslapan, situación que se repite entre pocas muestras de 32 y 34°C. El valor del nivel de estrés obtenido fue alto (0.07), lo cual le confiere una excelente confiabilidad a la representación gráfica observada (Fig. 19).

Existen diferencias significativas en los porcentajes de los estadios entre las temperaturas (ANOSIM: R= 0.406, p <0.05). Las pruebas pareadas indicaron que en todas las combinaciones de temperaturas los porcentajes de los estadios presentan diferencias significativas (28 y 30°C: R= 0.123, p= 0.0006; 28 y 32°C: R= 0.362, p= 0.0001; 28 y 34°C: R= 0.479, p= 0.0001; 30 y 32°C: R= 0.559, p= 0.0001; 30 y 34°C: R= 0.603, p= 0.0001; 32 y 34°C: R= 0.328, p= 0.0001). En

43

cuanto a la comparación entre experimentos (E1 y E2) no hay diferencias significativas (ANOSIM: R= -0.015, p= 0.812).



Figura 18. Embriones anormales de S. *incrassatus* observados durante los tratamientos de temperatura (28, 30, 32 y 34°C). A) embrión que no se dividió completamente; B-C) embriones con divisiones irregulares y blastómeros con diferentes tamaños; D) embrión con la membrana reticulada rota.



Figura 19. Análisis de Escalamiento Multidimensional No Métrico (nMDS) en 2D, obtenido con una transformación de doble raíz cuadrada y aplicando el índice de Bray Curtis, para los datos obtenidos sobre el efecto de la temperatura en *S. incrassatus*. Las muestras forman cuatro agrupaciones, cada una correspondiente a las cuatro temperaturas (28, 30, 32 y 34°C).

Con el modelo de CRN multicapa se obtuvo que la tendencia de la probabilidad del porcentaje de embriones anormales (P(%EA)) fue descendente de 1 a 20% entre 28 y 30°C. La tendencia de la P(%EA) registró un domo con un máximo de 20 a 45% en 32°C; hacia los extremos izquierdo y derecho del domo, la P(%EA) es ascendente y descendente, respectivamente. La tendencia de la P(%EA) fue ascendente de 20 a 75% en 34°C (Fig. 20). El porcentaje de embriones anormales de *S. incrassatus* incrementa significativamente a 34°C.



Figura 20. Tendencia de la probabilidad del porcentaje de embriones anormales de *S. incrassatus* a 28, 30, 32 y 34°C.

La tendencia de la probabilidad del porcentaje de mórulas (P(%M)) fue ascendente de 1 a 90% entre 28 y 30°C, pero la probabilidad de encontrar mórulas es mayor (0.6) a 30°C. La tendencia de la P(%M) fue descendente de 1 a 45% en 32°C. A la temperatura de 34°C no se observó una tendencia de la P(%M), debido a que el registro del porcentaje de este estadio tiende a cero, es decir, hay poca probabilidad de que a 34°C se encuentren mórulas (Fig. 21). El porcentaje de mórulas de *S. incrassatus* incrementa significativamente a 30°C.



Figura 21. Tendencia de la probabilidad del porcentaje de mórulas de S. incrassatus a 28, 30, 32 y 34°C.

La tendencia de la probabilidad del porcentaje de blástulas (P(%B)) fue ascendente de 1 a 80% en 28°C. La tendencia de la P(%B) fue descendente de 1 a 80% entre 30 y 32°C. A la temperatura de 34°C no se observó una tendencia de la P(%B), debido a que el registro del porcentaje de este estadio tiende a cero, es decir, hay poca probabilidad de que a 34°C se encuentren blástulas (Fig. 22). El porcentaje de blástulas de *S. incrassatus* incrementa significativamente a 28°C.



Figura 22. Tendencia de la probabilidad del porcentaje de blástulas de S. incrassatus a 28, 30, 32 y 34°C.

La tendencia de la probabilidad del porcentaje de gástrulas (P(%G)) fue ascendente de 1 a 4.5% en 28°C. La tendencia de la P(%G) fue descendente de 1 a 4.5% entre 30 y 32°C, pero la probabilidad de encontrar gástrulas es mayor (0.57) a 32°C. A la temperatura de 34°C no se observó una tendencia de la P(%G), debido a que el registro del porcentaje de este estadio tiende a cero, es decir, hay poca probabilidad de que a 34°C se encuentren gástrulas (Fig. 23). El porcentaje de gástrulas de *S. incrassatus* incrementa significativamente a 28°C.



Figura 23. Tendencia de la probabilidad del porcentaje de gástrulas de S. incrassatus a 28, 30, 32 y 34°C.

La tendencia de la probabilidad del porcentaje de larvas trocóforas (P(%LT)) fue ascendente de 10 a 95% entre 28 y 30°C, pero la probabilidad de encontrar larvas trocóforas es mayor (0.54) a 30°C. La tendencia de la P(%LT) fue descendente de 1 a 95% en 32°C. La tendencia de la P(%LT) fue descendente de 1 a 35%, con una baja probabilidad (0.1) de encontrar larvas trocóforas (Fig. 24). El porcentaje de larvas trocóforas de *S. incrassatus* incrementa significativamente a 30°C.



Figura 24. Tendencia de la probabilidad del porcentaje de larvas trocóforas de S. incrassatus a 28, 30, 32 y 34°C.

Con el Análisis de Correspondencia se obtuvo la representación espacial de la matriz de contingencias "Ed" y se indica en la Figura 25. Para esta última, las estadísticas por correspondencia fueron las siguientes: índice de inercia total (IT)= 0.37, se acepta Ha [Chi^2_c = 156.64 > $Chi^2_{0.05}$ = 21.02 (gl= 12), p <0.05]. Los valores de correspondencia se indican en la Tabla 6.



Figura 25. Gráfico perceptual de la matriz de correspondencia para *S. incrassatus*. Las temperaturas están representadas con cuadros negros y el porcentaje de los estadios de mórulas (M), blástulas (B), gástrulas (G), larvas trocóforas (LT) y embriones anormales (EA), con círculos.

Todas las temperaturas analizadas mostraron tener un efecto sobre los porcentajes de embriones anormales (EA), mórulas (M), blástulas (B), gástrulas (G) y larvas trocóforas (LT) de *S. incrassatus* (Fig. 25). Los embriones desde mórulas hasta larvas trocóforas se desarrollaron correctamente entre 28 y 30°C, siendo estas dos temperaturas las óptimas para que se lleve a cabo un desarrollo correcto.

Tabla 6. Valores de correspondencia entre las temperaturas y los estadios embrionarios seleccionados para *S. incrassatus*. Las magnitudes en negro indican la mayor correspondencia y las magnitudes en rojo indican la menor correspondencia.

	28°C	30°C	32°C	34°C
EA	-16.96900	-18.74705	1.30485	52.78537
М	9.63622	8.51293	-8.21775	-9.80511
В	1.31271	-8.15112	1.30497	0.31605
G	0.19874	-0.14041	0.03635	-0.06792
LT	0.40581	7.26919	0.00460	-11.44984

A 32°C las M, B, G y LT estuvieron presentes, pero en menor porcentaje y además se comenzó a registrar un incremento en el porcentaje de EA, por lo que a esta temperatura se encontró el límite letal superior para todos estos estadios. La temperatura de 34°C fue una temperatura letal, en la que decrece significativamente el porcentaje de M, B, G y LT, e incrementa significativamente el porcentaje de EA.

Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario de *Spirobranchus* cf. *corniculatus*

En *Spirobranchus* cf. *corniculatus* el porcentaje de los diferentes estadios embrionarios también se ve afectado conforme transcurren las horas y aumenta la temperatura y el tiempo de aparición de las larvas trocóforas se hizo cada vez más corto. Tomando en cuenta sólo aquellos estadios que son mayores al 50%, se puede observar cuales son los que predominan.

En la temperatura de 28°C, a las cuatro horas predominaron los embriones en quinta división (80%), a las ocho horas las blástulas (83%), a las 12 h las gástrulas (85%) y de las 16 (88%) hasta las 24 h (95%) predominaron las larvas trocóforas (Tabla 7). Por otro lado, a las 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h se observaron embriones anormales, representado el 4, 3, 2, 3, 4 y 1%, respectivamente (Fig. 26).

En la temperatura de 30°C, en las primeras cuatro horas predominaron los embriones en sexta división (mórulas) (65%), a las ocho horas las blástulas (67%), a las 12 h las gástrulas (66%) y de las 16 (85%) hasta las 24 h (91%) predominaron las larvas trocóforas (Tabla 7). Además, a las 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h se observaron embriones anormales, representado el 8, 6, 6, 6, 6, 6 y 5%, respectivamente. Cabe mencionar que a esta temperatura las larvas aparecieron desde las 12 h, representando un 17% (Fig. 26).

En la temperatura de 32°C, a las cuatro horas predominaron los embriones en sexta división (mórulas) (61%) y desde las cuatro hasta las 24 h el porcentaje de embriones anormales incrementó, predominando desde las 8, 12, 16, 20 y 24 h con el 57, 61, 62, 68 y 68%, respectivamente (Tabla 7). Las larvas aparecieron desde las ocho horas, representado un 6%, para las 12, 16, 20 y 24 h el porcentaje fue de 29, 35, 26 y 24%, respectivamente (Fig. 26).

A 34°C, a las 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h predominaron los embriones anormales, representado el 65, 67, 70, 73, 78 y 82%, respectivamente (Tabla 7). Al igual que a 32°C las larvas aparecieron desde las ocho horas, pero en menor porcentaje, representado un 4%, para las 12, 16, 20 y 24 h el porcentaje de estas fue 25, 22, 18 y 14%, respectivamente (Fig. 26).

Los embriones anormales en esta especie estuvieron presentes en todos los tiempos de muestreo y en todas las temperaturas. Estos embriones anormales se caracterizaron principalmente por presentar divisiones irregulares, con blastómeros de diferentes tamaños y por tener la membrana reticulada rota (Fig. 27).

En el gráfico en 2D generado por el Análisis de Escalamiento Multidimensional No Métrico (nMDS) se pueden observar los datos de cada muestra simbolizados por las temperaturas. Para esta especie, en el gráfico no se observa una agrupación clara de las muestras por cada una de las temperaturas, notándose así que estas se encuentran dispersas y traslapándose con muestras

51

de otras temperaturas, tal como sucede entre muestras de 28 y 30°C y 32 y 34°C. Aunque las muestras no se agruparon por temperatura, el nivel de estrés fue de 0.09, lo cual le confiere una excelente confiabilidad a la agrupación que se formó con el nMDS (Fig. 28).



Figura 27. Embriones anormales de S. cf. corniculatus observados durante los tratamientos de temperatura (28, 30, 32 y 34°C). A-C) embriones que no se dividieron completamente, presentando blastómeros de diferentes tamaños;
 D) embrión con la membrana reticulada rota.



Óvulo fecundado = 5ta división = Embrión anormal = 6ta división (Mórula) = Blástula = Gástrula = Larva trocófora

Figura 26. Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario de *S.* cf. *corniculatus*. Gráficos de barras correspondientes a las temperaturas de 28, 30, 32 y 34°C, respectivamente, indicando el porcentaje de los estadios presentes (promedio ±DE) en cada tiempo de muestreo.

Tiempo	Temperatura/Estadio alcanzado			
Post- fecundación	28°C	30°C	32°C	34°C
4 h	5ta división	6ta división (mórula)	6ta división (mórula)	Embrión anormal
8 h	Blástula	Blástula	Embrión anormal	Embrión anormal
12 h	Gástrula	Gástrula	Embrión anormal	Embrión anormal
16 h	Trocófora	Trocófora	Embrión anormal	Embrión anormal
20 h	Trocófora	Trocófora	Embrión anormal	Embrión anormal
24 h	Trocófora	Trocófora	Embrión anormal	Embrión anormal

Tabla 7. Estadios del desarrollo embrionario de *S.* cf. *corniculatus* predominantes (> 50%) en las temperaturas de 28-34°C a través del tiempo.

En esta especie también existieron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de los estadios entre las temperaturas (ANOSIM: R= 0.189, p <0.05). Las pruebas pareadas indicaron que en todas las combinaciones de temperaturas los porcentajes de los estadios presentan diferencias significativas (28 y 30°C: R= 0.079, p= 0.017; 28 y 32°C: R= 0.257, p= 0.0001; 28 y 34°C: R= 0.254, p= 0.0001; 30 y 32°C: R= 0.23, p= 0.0001; 30 y 34°C: R= 0.286, p= 0.0001; 32 y 34°C: R= 0.074, p= 0.006). En cuanto a la comparación entre experimentos (E1 y E2) no hay diferencias significativas (ANOSIM: R= -0.036, p= 0.999).



Figura 28. Análisis de Escalamiento Multidimensional No Métrico (nMDS) en 2D, obtenido con una transformación de doble raíz cuadrada y aplicando el índice de Bray Curtis, para los datos obtenidos del efecto de la temperatura en *S.* cf. *corniculatus*.

Con el modelo de CRN multicapa se obtuvo que la tendencia de la probabilidad del porcentaje de embriones anormales (P(%EA)) fue descendente de 1 a 65% entre 28 y 30°C. La tendencia de la P(%EA) registró un domo con un máximo de 45 a 70% en 32°C; hacia los extremos izquierdo y derecho, la P(%EA) es ascendente y descendente, respectivamente. La tendencia de la P(%EA) fue ascendente de 50 a 80% (Fig. 29). El porcentaje de embriones anormales de *S*. cf. *corniculatus* incrementa significativamente a 34°C.



Figura 29. Tendencia de la probabilidad del porcentaje de embriones anormales de S. cf. *corniculatus* a 28, 30, 32 y 34°C.

La tendencia de la probabilidad del porcentaje de mórulas (P(%M)) registró un pequeño domo con un máximo de 15 a 35% en 28°C; hacia los extremos izquierdo y derecho, la P(%M) es ascendente y descendente, respectivamente. La tendencia de la P(%M) fue ascendente de 1 a 65% en 30°C. La tendencia de la P(%M) fue descendente de 1 a 55% en 32°C. A 34°C el registro del porcentaje de mórulas tiende a cero, es decir, hay poca probabilidad de que a 34°C se encuentren mórulas (Fig. 30). El porcentaje de mórulas de *S.* cf. corniculatus incrementa significativamente a 30°C.



Figura 30. Tendencia de la probabilidad del porcentaje de mórulas de *S.* cf. *corniculatus* a 28, 30, 32 y 34°C.

La tendencia de la probabilidad del porcentaje de blástulas (P(%B)) fue ascendente de 1 a 85% entre 28 y 30°C, pero la probabilidad de encontrar blástulas es mayor (0.65) a 28°C. La tendencia de la P(%B) fue descendente de 1 a 85% a 32°C. A 34°C el registro del porcentaje de blástulas tiende a cero, es decir, hay poca probabilidad de que a 34°C se encuentren blástulas (Fig. 31). Se concluye que el porcentaje de blástulas de *S*. cf. *corniculatus* incrementa significativamente a 28°C.



Figura 31. Tendencia de la probabilidad del porcentaje de blástulas de *S.* cf. *corniculatus* a 28, 30, 32 y 34°C.

La tendencia de la probabilidad del porcentaje de gástrulas (P(%G)) fue ascendente de 1 a 85% entre 28 y 30°C, pero la probabilidad de encontrar gástrulas es mayor (0.54) a 28°C. La tendencia de la P(%G) fue descendente de 1 a 85% en 32°C. A 34°C el registro del porcentaje de gástrulas tiende a cero, es decir, hay poca probabilidad de que a 34°C se encuentren gástrulas (Fig. 32). El porcentaje de gástrulas de *S.* cf. *corniculatus* incrementa significativamente a 28°C.



Figura 32. Tendencia de la probabilidad del porcentaje de gástrulas de *S.* cf. *corniculatus* a 28, 30, 32 y 34°C.

La tendencia de la probabilidad del porcentaje de larvas trocóforas (P(%LT)) fue ascendente de 1 a 90% entre 28 y 30°C, pero la probabilidad de encontrar larvas trocóforas es mayor (0.55) a 28°C. La tendencia de la P(%LT) fue descendente de 1 a 90% en 32°C. A 34°C el registro del porcentaje de larvas trocóforas tiende a cero, es decir, hay poca probabilidad de que a 34°C se encuentren larvas trocóforas (Fig. 33). El porcentaje de larvas trocóforas de S. cf. *corniculatus* incrementa significativamente a 28°C.



Figura 33. Tendencia de la probabilidad del porcentaje de larvas trocóforas de *S.* cf. *corniculatus* a 28, 30, 32 y 34°C.

Con el Análisis de Correspondencia se obtuvo la representación gráfica de la matriz de contingencias "Ed" (Fig. 34). Para esta última, las estadísticas por correspondencia fueron las siguientes: índice de inercia total (IT)= 0.44, se acepta Ha [Chi_c^2 = 167.95 > $Chi_{0.05}^2$ = 21.02 (gl=12), p <0.05]. Los valores de correspondencia se indican en la Tabla 8.



Figura 34. Gráfico perceptual de la matriz de correspondencia para *S.* cf. *corniculatus*. Las temperaturas están representadas con cuadros negros y el porcentaje de los estadios de mórulas (M), blástulas (B), gástrulas (G), larvas trocóforas (LT) y embriones anormales (EA), con círculos.

Tabla 8. Valores de correspondencia entre las temperaturas y los estadios embrionarios seleccionados para *S.* cf. *corniculatus*. Las magnitudes en negro indican la mayor correspondencia y las magnitudes en rojo indican la menor correspondencia.

	28°C	30°C	32°C	34°C
EA	-26.22344	-23.83847	12.76229	35.83069
М	-0.19694	4.42092	0.70431	-6.19529
В	4.13440	0.57331	-3.47718	-0.59498
G	5.08981	2.87184	-2.56978	-4.66637
LT	10.37034	7.08925	-5.09195	-11.25024

Todas las temperaturas analizadas mostraron tener un efecto sobre los porcentajes de embriones anormales (EA), mórulas (M), blástulas (B), gástrulas (G) y larvas trocóforas (LT) de *S*. cf. *corniculatus* (Fig. 34). Los embriones desde mórulas hasta larvas trocóforas se desarrollaron correctamente entre 28 y 30°C, siendo estas dos temperaturas las óptimas, en las que el porcentaje de estos estadios es alto, pero la probabilidad de que se desarrollen correctamente es mayor a 28°C, es decir, hay mayor probabilidad de que a 28°C los embriones de *S*. cf. *corniculatus* se desarrollen correctamente.

A 32°C las M, B, G y LT estuvieron presentes, pero en menor porcentaje, además se comenzó a registrar un incremento en el porcentaje de EA, por lo que a esta temperatura se encontró el límite letal superior para todos estos estadios. La temperatura de 34°C fue una temperatura letal, en la que es más evidente tanto el decremento significativo del porcentaje de M, B, G y LT, como el incremento significativo del porcentaje de EA.

Efecto de la temperatura en la supervivencia larval de *Spirobranchus incrassatus*

Al momento de ingresar las larvas a los tratamientos de temperatura, estas se encontraban en el estadio de trocóforas tempranas, mismo estadio en el que se encontraron después de haber sido expuestas a estas temperaturas durante 24 h. La temperatura en la cual se observó el mayor porcentaje de supervivencia larval fue a 30°C, con un promedio de 94.2% (máximo 97, mínimo 91), seguida de la temperatura de 28°C, con 88.5% (máximo 94, mínimo 80), continuando con la temperatura de 32°C con 59.8% (máximo 69, mínimo 50) y en la que se registró el menor porcentaje promedio de supervivencia fue la temperatura de 34°C, con el 23.5% (máximo 29, mínimo 19).

La comparación entre experimentos (E1 y E2) indicó que no hay diferencias significativas en los porcentajes de supervivencia larval (PERMANOVA: Pseudo-F= 0.89, p= 0.416 >0.05, se acepta Ho); mientras que entre temperaturas si hubo diferencias significativas (PERMANOVA: Pseudo-F= 213.53, p= 0.0001 <0.05, se acepta Ha). Las pruebas pareadas indicaron que en todas las combinaciones de temperatura hay diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia larval (28°C, 30°C: p= 0.05 ≤0.05; 28°C, 32°C: p= 0.0027 <0.05; 28°C, 34°C: p= 0.0018 <0.05; 30°C, 32°C: p= 0.0029 <0.05; 30°C, 34°C: p= 0.0023 <0.05; 32°C, 34°C: p= 0.0023 <0.05).

Efecto de la temperatura en la supervivencia larval de *Spirobranchus* cf. *corniculatus*

Cuando se ingresó el cultivo de larvas a los tratamientos de temperatura se encontraban en el estadio de trocóforas tempranas, mismo estadio en el que se encontraron después de haber sido expuestas a estas temperaturas durante 24 h. Durante la observación, además de las larvas vivas y muertas, se notaron algunas larvas que presentaban anormalidades.

Las larvas vivas normales presentaban las mismas características que las trocóforas tempranas ya descritas anteriormente en el apartado correspondiente; mientras que las larvas anormales se caracterizaban por presentar un cuerpo irregular, con mal formaciones en las bandas ciliares, principalmente en los cilios que conforman la prototroca, lo cual provocaba que no se desplazaran correctamente, sólo girando así sobre su propio eje.

Por otro lado, la temperatura en la cual se observó el mayor porcentaje de supervivencia larval fue a 28°C, con un promedio de 90.7% (máximo 96, mínimo 85), seguida de la temperatura de 30°C, con 71.3% (máximo 74, mínimo 69), continuando con la temperatura de 32°C, con 54.2% (máximo 63, mínimo 47) y en la que se registró el menor promedio de larvas vivas fue la temperatura de 34°C, con el 19.8% (máximo 26, mínimo 15).

La comparación entre experimentos (E1 y E2) indicó que no hay diferencias significativas en los porcentajes de supervivencia larval (PERMANOVA: Pseudo-F= 2.06, p= 0.1406 >0.05, se acepta Ho); mientras que entre temperaturas si hubo diferencias significativas (PERMANOVA: Pseudo-F= 181.29, p= 0.0001 <0.05, se acepta Ha). Las pruebas pareadas indicaron que en todas las combinaciones de temperatura hay diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia larval (28°C, 30°C: p= 0.0026 <0.05; 28°C, 32°C: p= 0.0031 <0.05; 28°C, 34°C: p= 0.0027 <0.05; 30°C, 32°C: p= 0.0033 <0.05; 30°C, 34°C: p= 0.002 <0.05; 32°C, 34°C: p= 0.0028 <0.05).

Discusión

Caracterización morfológica

En pocos trabajos se ha caracterizado el desarrollo temprano de algunas especies del género *Spirobranchus* (Segrove 1941, Groepler 1984, Smith 1984). En cuanto a la información disponible sobre el tiempo que dura el desarrollo, desde la fecundación hasta la aparición de la larva trocófora temprana, se ha visto que este suele variar entre las especies. Marsden (1960) encontró para *S. polycerus*, en el Caribe, que el tiempo de desarrollo es de 28 h; mientras que, en Australia, Smith (1984) mencionó que el tiempo de desarrollo para *S. corniculatus* es de 12 h. En el presente trabajo se encontró que *S. incrassatus* se desarrolla a las 12 h y *S. cf. corniculatus* lo hace en 14 h, notándose así que el tiempo de desarrollo de ambas especies se encuentra en el intervalo mencionado en la primera hipótesis planteada, por lo que esta fue aceptada.

Por otro lado, Kupriyanova *et al.* (2001) mencionaron que en algunos géneros de serpúlidos como *Ficopomatus*, *Galeolaria*, *Hydroides* y *Spirobranchus* los procesos del desarrollo temprano son muy similares, es decir, los embriones pasan por divisiones mitóticas con patrón en espiral, la formación de una blástula con su blastocele y una gástrula con su blastoporo y arquénteron. Aquí coincidimos con lo anterior, debido a que durante el desarrollo de *S. incrassatus* y *S.* cf. *corniculatus* sólo se diferenciaron por el tamaño que presentaron los ovocitos maduros y los embriones. En *S. incrassatus* el diámetro promedio de los ovocitos maduros (67.63 ±3.67 µm) y el tamaño de las gástrulas (largo 64.21 ±0.75 µm, ancho 61.64 ±2.05 µm) fue menor que el de los ovocitos maduros (72.31 ±1.17 µm) y las gástrulas (largo 72.54 ±1.54 µm, ancho 71.70 ±1.57 µm) de *S. cf. corniculatus*.

De acuerdo con la literatura consultada, el diámetro de los ovocitos de las especies de *Spirobranchus* varía entre 60 y 120 µm (Lewis 1960, Crisp 1977). De este modo, el diámetro de los ovocitos maduros de *S. incrassatus* y *S.* cf. *corniculatus* queda dentro de ese intervalo.

Spirobranchus incrassatus, especie distribuida en el Pacífico oriental tropical, anteriormente había sido confundida taxonómicamente por varios autores con *S. giganteus*, distribuida en el Atlántico occidental tropical, pero estudios han demostrado que hay deferencias morfológicas entre ambas especies (Bastida-Zavala 2008); asimismo, en *S. giganteus*, de acuerdo con Allen (1957) sólo se conoce que los ejemplares maduros se encuentran entre marzo y octubre, que los ovocitos maduros miden entre 80 y 85 µm de diámetro y que observó larvas trocóforas, pero no dio más detalles del desarrollo embrionario ni del larvario y mucho menos incluyó figuras de estos procesos. Como ya se mencionó en párrafos anteriores, el diámetro de los ovocitos maduros de *S. incrassatus* es menor (67.63 ±3.67 µm) que el observado por Allen (1957) para *S. giganteus*.

Por otra parte, S. cf. *corniculatus* se distribuye a lo largo del Pacífico mexicano (Bastida-Zavala 2008); mientras que la especie nominal, S. *corniculatus*, tiene una amplia distribución en el Indo Pacífico occidental. Anteriormente, S.

63

corniculatus era considerada un complejo de especies, conteniendo a *S. corniculatus sensu stricto*, *S. gaymardi* (Quatrefages, 1866) y a *S. cruciger* (Grube, 1862), pero Willette *et al.* (2015), mediante un análisis molecular, indicaron que las tres especies del complejo eran en realidad una sola especie con ligeras variaciones en el opérculo. Asimismo, Sánchez-Ovando (2019) indicó que a nivel morfológico no existen grandes diferencias entre *S. cf. corniculatus* y *S. corniculatus*. Con este trabajo se evidenció que, al comparar los ovocitos, el tiempo de desarrollo y algunas características de las larvas, tampoco existen grandes diferencias.

Por lo anterior, la hipótesis es que las larvas de S. corniculatus de las poblaciones del Pacífico central llegaron hasta el Pacífico mexicano y se asentaron exitosamente, tal como ha sucedido con otros invertebrados cuyo origen está en el Pacífico occidental. Tal es el caso de la estrella de mar corona de espinas, Acanthaster planci (Linnaeus, 1758) (Nishida & Lucas 1988), así como del coral Pocillopora damicornis (Linnaeus, 1758) (Glynn & Ault 2000), cuya presencia en el Pacífico oriental tropical se explica por la amplia duración (hasta 100 días) de sus larvas teleplánicas en la columna de agua, así como por la ventaja que tienen en su dispersión gracias a la contracorriente norecuatorial, que alcanza mayores velocidades cuando suceden eventos oceanográficos como El Niño (Glynn & Ault 2000). Basado en esta evidencia, podría ser posible que S. corniculatus haya llegado hasta el Pacífico oriental tropical por su larva trocófora planctotrófica, que de acuerdo con Smith (1984) bajo condiciones controladas de laboratorio se asientan entre 11 y 12 días. Cabe señalar que el tiempo de duración de las larvas puede variar incluso meses si no encuentran el sustrato adecuado. Además, el desarrollo embrionario de S. cf. corniculatus y la morfología de la larva es muy similar con la población de Australia. Esta hipótesis tendría que comprobarse con estudios de ADN entre las diferentes poblaciones, así como evaluar la duración viable de la larva de este serpúlido en la columna de agua.

Smith (1984) encontró que los ovocitos maduros de *S. corniculatus* tienen un diámetro promedio de 80 µm y la membrana reticulada mide 4 µm, la primera división celular ocurrió después de 1 h, encontró blástulas nadadoras a las 4 h y gástrulas a las 6 h, pero no dio más detalles de este último estadio. Las larvas trocóforas tempranas las observó después de 12 h y a las 18 h tenían un diámetro de 100 μ m a la altura de la prototroca. En el presente estudio se encontró que en *S. cf. corniculatus* los ovocitos tienen un diámetro promedio de 72.31 ±1.17 μ m con una membrana reticulada de 3.11 ±0.27 μ m, la primera división celular ocurrió después de 1 h, las blástulas nadadoras se desarrollaron a las seis horas y 30 minutos y las gástrulas a las ocho horas. Las trocóforas tempranas se desarrollaron a las 14 h y tenían un diámetro de 94.99 ±2.13 μ m a la altura de la prototroca (Tabla 9). Por lo tanto, estas características no son suficientes para poder indicar que *S. corniculatus* y *S. cf. corniculatus* son diferentes especies, ya que incluso dentro de un mismo cultivo de embriones y larvas el tiempo de desarrollo y el tamaño de éstos puede variar.

Es importante mencionar que a nivel de familia los serpúlidos se reproducen más o menos continuamente durante una estación reproductiva prolongada (Kupriyanova *et al.* 2001). Allen (1957) indicó que el periodo reproductivo de *S. giganteus* en Puerto Rico duró desde marzo hasta octubre; Lewis (1960) y Marsden (1960) han observado que el desove de *S. polycerus* en las Antillas sucede durante verano, desde mayo a finales de julio; Smith (1984) encontró en Australia ejemplares maduros de *S. corniculatus* entre octubre y enero, durante el verano del hemisferio sur. En el presente trabajo, durante las recolectas la mayor cantidad de ejemplares maduros de *S. incrassatus* se encontró de agosto a diciembre, aunque hubo algunos ejemplares maduros desde mayo; mientras que para *S.* cf. *corniculatus* se encontraron ejemplares maduros de octubre a diciembre. Lo anterior proporciona una idea general de la posible periodicidad en la reproducción de ambas especies; sin embargo, se requieren estudios enfocados particularmente en el seguimiento y caracterización del desarrollo gametogénico para conocer con exactitud la temporada reproductiva de ambas especies.

Efecto de la temperatura

Algunos autores han documentado que el tiempo de desarrollo de los serpúlidos no sólo varía entre especies, sino que también puede variar para una misma especie; frecuentemente se ha visto que se debe a un incremento en la temperatura, lo cual provoca que el desarrollo se acelere (Vuillemin 1958, Marsden 1960, Lacalli 1977, 1981, Crisp 1977, Castric-Fey 1984). En otras especies de serpúlidos como *H. elegans*, el incremento de la temperatura (15, 20, 25 y 30°C) pareciera no ser un factor limitante para que ocurra correctamente el desarrollo temprano (Qiu & Qian 1997, 1988).

 Tabla 9. Información sobre aspectos reproductivos de S. corniculatus y S. cf. corniculatus.

Especie	<i>S. corniculatus</i> (ver Smith 1984)	<i>S.</i> cf. corniculatus (presente trabajo)
Temporada reproducción	Octubre-Enero	Octubre-Diciembre
Tipo de reproducción	Gonocórica	Gonocórica
Tamaño promedio del óvulo maduro (µm)	80	72.31 ±1.17
Tamaño de la membrana reticulada del óvulo (µm)	4	3.11 ±0.27
Temperatura (°C) utilizada para el desarrollo en laboratorio	29-30	28, 30, 32 y 34
Tiempo de la primera división	1 hora	1 hora
Tiempo de desarrollo de la blástula	4 horas	5 horas y 30 min
Tiempo de desarrollo de la gástrula	6 horas	8 horas
Tiempo de desarrollo de la trocófora temprana	12 horas	14 horas
Tiempo de desarrollo de la metatrocófora	3-4 días	-
Tiempo de desarrollo de la nectoqueta	6 días	-
Tiempo para el asentamiento	11-12 días	-

En este trabajo se notó que al incrementar la temperatura (a partir de los 30°C) el desarrollo fue más rápido en ambas especies de *Spirobranchus* estudiadas. A 28°C, *S. incrassatus* se desarrolló hasta larva trocófora temprana en 12 h y a 30, 32 y 34°C la trocófora temprana se desarrolló en ocho horas; en el

caso de *S.* cf. *corniculatus*, la trocófora temprana se desarrolló en 14 h a 28°C, a 30°C se desarrolló en 12 h y a 32 y 34°C esta larva se desarrolló en ocho horas.

En ambas especies de *Spirobranchus* el incremento de la temperatura también afectó el porcentaje y la calidad de los embriones. Los embriones se desarrollaron hasta el estadio larvario en las cuatro temperaturas, pero el porcentaje de las larvas empezó a disminuir a partir de los 32°C y el porcentaje de embriones anormales empezó a incrementar. A la temperatura de 34°C la disminución del porcentaje de larvas, así como el incremento del porcentaje de embriones anormales fue aún más evidente (Figs. 17, 26). Además, la tendencia de la disminución del porcentaje de larvas que se observó durante el experimento del supervivencia larval. Por lo cual, se notó que a 28 y 30°C tanto el desarrollo embrionario como la supervivencia de las larvas ocurrió de manera óptima; mientras que a 32 y 34°C se encontraron efectos negativos en estos procesos, aceptándose así la segunda hipótesis de trabajo planteada.

En especies de otros géneros de serpúlidos se ha encontrado que el incremento de la temperatura produce afectos positivos, acelerando la maduración de los gametos (Gee 1967), pero también se ha documentado que se pueden producir efectos negativos, disminuyendo así el número de ejemplares maduros (Leone 1970). También hay casos en los que el incremento de la temperatura no ocasionó ningún efecto, con lo que se demostró que el incremento de la temperatura no es un factor limitante para el desarrollo temprano ni para el asentamiento larvario en esas especies (Qiu & Qian 1997, 1998). Los resultados del presente trabajo del incremento de la temperatura encajan con aquellos en los que se han evidenciado efectos negativos.

De manera más local se han realizado estudios en los que el incremento de la temperatura produce efectos negativos, pero han sido con erizos de mar. Díaz-Pérez & Carpizo-Ituarte (2011) encontraron que las larvas de *Strongylocentrotus purpuratus* expuestas durante 24 h a 27°C y durante dos horas a 31°C presentaron un 100% de mortalidad. En el presente trabajo, las larvas de *S*. *incrassatus* y S. cf. *corniculatus* que fueron expuestas durante 24 h a la temperatura más alta (34°C), sólo tuvieron una mortalidad promedio del 76.5% y 80.2%, respectivamente.

Las temperaturas óptimas para el desarrollo embrionario y para la supervivencia larval de *S. incrassatus* y *S.* cf. *corniculatus* fueron 28 y 30°C, lo cual fue consistente con lo encontrado por Mejía-Gutiérrez *et al.* (2019) para el erizo rosa *Toxopneustes roseus*; sin embargo, no coincidió con lo encontrado a 32°C porque mientras los *Spirobranchus* obtuvieron un porcentaje promedio de embriones anormales sólo del 27% y 58%, respectivamente, en el erizo fue del 100%.

Asimismo, Rodríguez-Medellín (2019) también coincidió con que 28 y 30°C son temperaturas óptimas para el desarrollo del erizo irregular *Rhyncholampas pacificus*, en el cual a 34°C hubo una supervivencia larval sólo del 6.4%; mientras que en *S. incrassatus* y *S.* cf. *corniculatus* el porcentaje de supervivencia larval fue más alto, 23.5% y 19.8%, respectivamente.

El que las temperaturas de 28 y 30°C hayan resultado las óptimas para el correcto desarrollo de las dos especies de *Spirobranchus* se podría explicar en términos del hábitat en el que se encuentran, es decir, las poblaciones muestreadas de ambas especies habitan en zonas en donde la temperatura promedio del mar es de 28.5°C (Misra *et al.* 2016) y durante el verano se llegan a registrar temperaturas de hasta 29.5°C (Wilkinson *et al.* 2009). Asimismo, durante eventos ENSO la temperatura se incrementa hasta 1.8°C por encima del promedio histórico (López-Pérez *et al.* 2016). En resumen, es evidente que las poblaciones de estos dos serpúlidos están adaptadas a este intervalo de temperatura. Sin embargo, sólo para *S.* cf. *corniculatus* la probabilidad de que sus embriones se desarrollen correctamente fue mayor a 28°C, muy posiblemente debido a las condiciones en las que habitan las formas adultas.

Todo esto indica que *S. incrassatus* es la especie con mayor tolerancia al aumento de la temperatura. Los ejemplares de *S. incrassatus* que se obtuvieron durante las recolectas en los pilares del muelle, provienen de una población que

68
se encuentra sometida a un estrés constante debido al oleaje y régimen de mareas de la región. Las olas golpean constantemente los pilares del muelle y por lo tanto también los tubos y durante la marea baja, los tubos de esta especie están fuera del agua. Por el contrario, la población estudiada de *S.* cf. *corniculatus* fue recolectada de áreas rocosas más profundas (5-6 m), un hábitat donde no se encuentran bajo mucho estrés.

El IPCC (2007, 2014) indicó que para el 2100 la temperatura promedio de los mares tropicales, incluyendo la zona de estudio, podría alcanzar los 30 o 32°C. Los resultados que se obtuvieron aquí indican que las poblaciones estudiadas de *S. incrassatus* y *S.* cf. *corniculatus*, en un escenario de una temperatura promedio de 30°C, se mantendrían en la zona sin ningún inconveniente y podrían continuar reproduciéndose correctamente.

Para el escenario de una temperatura promedio de 32°C, los resultados de este experimento en laboratorio indican que *S*. cf. *corniculatus* sería la especie más afectada durante las etapas del desarrollo embrionario debido al alto porcentaje de embriones anormales registrados. Aun así, para ambas especies se obtuvo el límite letal superior a 32°C, es decir, se notaría que a esta temperatura la tendencia sería un incremento de embriones anormales y una diminución en la supervivencia de larvas, pero el porcentaje de larvas vivas que se obtuvo en ambos casos fue mayor a 50% y menor a 60%. Se ha documentado que otras especies de serpúlidos como *Neodexiospira* cf. *brasiliensis* en Japón, se pueden reproducir durante el verano a temperaturas tan altas como 32°C (Abe 1943), por lo cual se puede pensar que las dos especies de *Spirobranchus* estudiadas aquí, podrían continuar persistiendo en la región durante el escenario de una temperatura promedio de 32°C.

A parte de los escenarios indicados por el IPCC, aquí se planteó el peor escenario con un incremento promedio de la temperatura de hasta 34°C. Los resultados que se obtuvieron indicaron que 34°C fue una temperatura letal, ya que hubo una evidente disminución de larvas y un aumento significativo de embriones anormales. A esta temperatura muy probablemente las poblaciones de ambas

especies no podrían persistir en sus hábitats. Aunque en el trabajo de Stranges *et al.* (2019) llevado a cabo con corales, se planteó que para el año 2050, en algunas especies de corales del Pacífico oriental tropical se podría modificar su distribución latitudinal ante el evidente incremento de la temperatura y la acidificación oceánica, viéndose desplazadas hacia latitudes templadas-frías.

La permanencia de los organismos marinos no está influenciada sólo por una variable (temperatura), sino que existen muchas otras, como el pH, salinidad, nutrientes, etc., que muy posiblemente también serán modificadas en un futuro cercano, pero evaluar los efectos de todas estas variables en conjunto resulta muy difícil, de tal forma que los trabajos de laboratorio como el que se desarrolló aquí, proporcionan una primera aproximación de lo que les espera a los diferentes organismos que se estudian bajo este tipo de escenarios.

Conclusiones

- Spirobranchus incrassatus se desarrolló hasta larva en 12 h y S. cf. corniculatus en 14 h, por lo que se encuentran dentro del intervalo en el que se han desarrollado otras especies del género (12-28 h).
- En S. incrassatus se hizo la caracterización desde los ovocitos hasta larvas en metamorfosis de 24 días; mientras que en S. cf. corniculatus se caracterizó sólo hasta trocóforas tempranas de ocho días.
- En ambas especies de Spirobranchus el desarrollo fue más rápido a partir de la temperatura de 30°C.
- Las temperaturas de 28 y 30°C fueron las óptimas para el correcto desarrollo embrionario, pero sólo para S. cf. *corniculatus*, la probabilidad de que los embriones se desarrollaran correctamente fue mayor a 28°C. A 32°C se encontró el límite letal superior y 34°C fue una temperatura letal para ambas especies.
- Para S. incrassatus el mayor porcentaje de supervivencia larval (94.2%) ocurrió a 30°C y el menor porcentaje (23.5%) a 34°C; mientras que para S. cf. corniculatus el mayor porcentaje de supervivencia larval (90.7%) se

registró a 28°C y el porcentaje más bajo de supervivencia (19.8%) también fue a 34°C.

- Para ambas especies, el efecto negativo del incremento de la temperatura se evidenció por el incremento del porcentaje de los embriones anormales y por la disminución del porcentaje de supervivencia larval.
- Spirobranchus incrassatus presentó mayor tolerancia térmica que S. cf. corniculatus.
- El presente trabajo consiste en la primera aproximación de lo que les espera a las especies de serpúlidos del área de estudio, bajo escenarios en los que se alteren de manera significativa las condiciones actuales en las que se desarrollan.

Referencias

- Abe, N. 1943. The ecological observation on *Spirorbis*, especially on the postlarval development of *Spirorbis argutus* Bush. Scientific Reports of the Tohuku University, Series 4 (Biology) 17(4): 327–351.
- Allen, M.J. 1957. The breeding of polychaetous annelids near Parguera, Puerto Rico. Biological Bulletin 113: 49–57.
- Arenas-Mena, C. & A. Li. 2014. Development of a feeding trochophore in the polychaete *Hydroides elegans*. The International Journal of Developmental Biology 58: 575–583.
- Barton, E.D., M.L. Argote, J. Brown, M. Kosro, M.F. Lavin, J.M. Robles & R.L. Smith. 1993. Supersquirt: Dynamics of the Gulf of Tehuantepec, Mexico. Oceanography 6(1): 23–30.
- Bastida-Zavala, J.R. 2008. Serpulids (Annelida: Polychaeta) from the Eastern Pacific, including a brief mention of Hawaiian serpulids. Zootaxa 1722: 1–61.
- Bastida-Zavala, J.R. 2009. Serpulidae Rafinesque, 1815. Pp: 521–554. *In*: de León-González, J.A., J.R. Bastida-Zavala, L.F. Carrera-Parra, M.E. García-Garza, A. Peña-Rivera, S.I. Salazar-Vallejo & V. Solís-Weiss (eds.), Poliquetos (Annelida: Polychaeta) de México y América Tropical. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. 737 pp.

- Bastida-Zavala, J.R., L.D. McCann, E. Keppel & G.M. Ruiz. 2017. The fouling serpulids (Polychaeta: Serpulidae) from United States coastal waters: an overview. European Journal of Taxonomy 344: 1–76.
- Bleidorn, C., C. Helm, A. Weigert & M.T. Aguado. 2015. Annelida. Pp: 193–230. In: Wanninger, A. (Ed.), Evolutionary developmental biology of invertebrates 2: Lophotrochozoa (Spiralia). Springer-Verlag Wien.
- Box, G.E.P. & D.R. Cox. 1964. An analysis of transformations. Journal of the Royal Statistical Society Series B: 211–243.
- Brusca, R.C. 1980. Common intertidal invertebrates of the Gulf of California. 2a ed., University of Arizona Press, Arizona, 513 pp.
- Carpizo-Ituarte, E. & M.G. Hadfield. 1998. Stimulation of metamorphosis in the polychaete *Hydroides elegans* Haswell (Serpulidae). Biological Bulletin 194: 14–24.
- Castric-Fey, A. 1984. Contribution à l'étude de la sexualité chez *Pomatoceros lamarckii* et *P. triqueter* en Baie de Concarneau (Sud Finistère). Annales de l'Institut d'Océanographie Paris 60(2): 163–187.
- Clarke, K.R. & R.H. Green. 1988. Statistical design and analysis for a biological effects study. Marine Ecology Progress Series 46: 213–226.
- Clarke, K.R. & R.N. Gorley. 2015. PRIMER v7: User Manual/Tutorial (Plymouth: PRIMER-E). 296 pp.
- Crisp, M. 1977. The development of the serpulid *Pomatoleios kraussii* (Annelida, Polychaeta). Journal Zoology 183: 147–160.
- de Vantier, L.M., R.E. Reichelt & R.H. Bradbury. 1986. Does Spirobranchus giganteus protect host Porites from predation by Acanthaster planci: predator pressure as a mechanism of coevolution? Marine Ecology Progress Series 32: 307–310.
- Díaz-Pérez, L. & E. Carpizo-Ituarte. 2011. Effect of thermal stress on survival and delay of metamorphosis in larvae of the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Ciencias marinas 34(4A): 403–414.
- Evans, J. & D. Marshall. 2005. Male-by-female interactions influence fertilization success and mediate the benefits of polyandry in the sea urchin *Heliocidaris erythrogramma*. Evolution 59: 106–112.
- Gaikwad, U. 1988. Artificial fertilization in serpulid worm *Spirobranchus tetraceros* (Schmarda) (Polychaeta, Annelida) and some larval stages. Pp: 280–284. *In:* Palanichamy, S. (Ed.), Recent advances in invertebrate reproduction and aquaculture. Palani, India: Arulmugi Palaniandavar College of Art and Culture.

- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Copen para adaptarla a las condiciones de la República Mexicana. Instituto de Geografía UNAM, México. 246 pp.
- Gee, J.M. 1967. Growth and breeding of *Spirorbis rupestris* (Polychaeta: Serpulidae). Journal of Zoology 152: 235–244.
- Glynn, P.W. & J.S. Ault. 2000. A biogeographic analysis and review of the far eastern Pacific coral reef region. Coral Reefs 19: 1–23.
- Gómez, P., J.A. Mercado, L.M. Mitchell & S.I. Salazar-Vallejo. 1997. Poliquetos de fondos duros (Polychaeta) de bahías de Huatulco y Puerto Ángel, Oaxaca, México. Revista de Biología Tropical 45(3): 1067–1074.
- Gray, J.S. 1976. The effect of salinity, temperature and mercury on mortality of the trochophore larvae of *Serpula vermicularis* L. (Annelida, Polychaeta). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 23: 127–134.
- Groepler, C. 1984. Entwicklung von *Pomatoceros triqueter* (L.) (Polychaeta, Serpulidae). Biologie in Unserer Zeit 14: 88–92.
- Hair, F., J. Anderson, M.L. Tatha & C. Black. 1999. Multivariate data analysis. Prentice Hall, New Jersey. 542 pp.
- Haykin, S. 1999. Neural networks: A comprehensive foundation. Prentice Hall, New Jersey. 842 pp.
- Herbert-Wilson, W. 1991. Sexual reproductive modes in polychaetes: classification and diversity. Bulletin of Marine Science 48: 500–516.
- Hörstadius, S. 1923. Physiologische untersuchungen über die eireifung bei *Pomatoceros triqueter* L. Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik 98: 1–9.
- IPCC. 2007. Cambio Climático. Impactos, adaptación vulnerabilidad. Cuarto informe de evaluación, grupo intergubernamental de expertos sobre el cambio climático. http://www.ipcc.ch.
- IPCC. 2014. Cambio climático. Impactos, adaptación vulnerabilidad. Quinto informe de evaluación, grupo intergubernamental de expertos sobre el cambio climático. http://www.ipcc.ch.
- Keppel, E., I. Keith, G.M. Ruiz & J.T. Carlton. 2019. New records of native and nonindigenous polychaetes (Annelida: Polychaeta) in the Galapagos Islands. Aquatic Invasions 14: 59–84.
- Kupriyanova, E., E. Nishi, H.A. ten Hove & A.V. Rzhavsky. 2001. Life-history patterns in serpulimorph polychaetes: ecological and evolutionary perspectives. Pp: 1–

101. *In:* Gibson, R.N., M. Barnes M & R.J.A. Atkinson (Eds.). Oceanography and Marine Biology: an Annual Review. New York: Taylor & Francis.

- Lacalli, T.C. 1977. Remarks on the larvae of two serpulids (Polychaeta) from Barbados. Canadian Journal of Zoology 55: 300–303.
- Lacalli, T.C. 1981. Structure and development of the apical organ in trochophores of *Spirobranchus polycerus, Phyllodoce maculata* and *Phyllodoce mucosa* (Polychaeta). Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences 212(1189): 403–432.
- Lavín, M.F. J.M. Robles, M.L. Argote, E.D. Barton, R. Smith, J. Brown, M. Kosro, A. Trasviña, H.S. Vélez-Muñoz & J. García. 1992. Física del golfo de Tehuantepec. Ciencia y Desarrollo 18(103): 97–108.
- Leone, D.E. 1970. The maturation of *Hydroides dianthus*. Biological Bulletin 138: 306–315.
- Lewis, J.B. 1960. The fauna of rocky shores of Barbados, West Indies. Canadian Journal of Zoology 38: 391–435.
- López-Pérez A., S. Guendulain-García, R. Granja- Fernández, V. Hernández-Urraca, L. Galván-Rowland, R. Zepeta-Vilchis & D. López-López. 2016. Reef community changes associated with the 2009–2010 El Niño in the Southern Mexican Pacific. Pacific Science 70(2):175–190.
- Lorente, I., J.I. Gómez, R. Santos, A. Camacho, L. Galindo, L. Flores & J. Navarro. 2004. Los efectos biológicos del cambio climático. Ecosistemas 8(1): 103– 110.
- Marsden, J.R. 1960. Polychaetous annelids from the shallow waters around the Barbados and other Islands of the West Indies, with notes on larval forms. Canadian Journal of Zoology 38: 989–1020.
- Marsden, J.R. 1992. Reproductive isolation in two forms of the serpulid polychaete. *Spirobranchus polycerus* (Schmarda) in Barbados. Bulletin of Marine Science 51: 14–18.
- McDougall, C., W.C. Chen, S.M. Shimeld & D.EK. Ferrier. 2006. The development of the larval nervous system, musculature and ciliary bands of *Pomatoceros lamarckii* (Annelida): heterochrony in polychaetes. Frontiers in Zoology 3: 1– 13.
- Mejía-Gutiérrez, L.M., F. Benítez-Villalobos & J.P. Díaz-Martínez. 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.

- Misra, V., D. Groenen, A. Bharadwaj & A. Mishra. 2016. The warm pool variability of the tropical northeast Pacific. International Journal of Climatology 36(14): 4625–4637.
- Nishida, M. & J.S. Lucas. 1988. Genetic differences between geographic populations of the crown-of-thorns starfish throughout the Pacific region. Marine Biology 98: 359–368.
- Nishi, E. & M. Nishihira. 1996. Age-estimation of the Christmas tree worm *Spirobranchus giganteus* (Polychaeta, Serpulidae) living buried in the coral skeleton from the coral-growth band of the host coral. Fish Sci 62(3): 400–403.
- Perry, O., O. Bronstein, N. Simon-Blecher, A. Atkins, E.K. Kupriyanova, H.A. ten Hove, O. Levi & M. Fine. 2018. On the genus *Spirobranchus* (Annelida, Serpulidae) from the northern Red Sea, and a description of a new species. Invertebrate Systematics 32: 605–626.
- Qiu, J.W. & P.Y. Qian. 1997. Combined effects of salinity, temperature and food on early development of the polychaete *Hydroides elegans*. Marine Ecology Progress Series 152: 79–88.
- Qiu, J.W. & P.Y. Qian. 1998. Combined effects of salinity and temperature on juvenile survival, growth and maturation in the polychaete *Hydroides elegans*. Marine Ecology Progress Series 168: 127–134.
- Rahman, S., M. Tsuchiya & T. Uehara. 2009. Effects of temperature on hatching rate, embryonic development and early larval survival of the edible sea urchin, *Tripneustes gratilla*. Biología 64/4: 768–775.
- Read, G. & K. Fauchald (Eds.) (2018). World Polychaeta database. Spirobranchus Blainville, 1818. World Register of Marine Species. Consultado el 30 de julio, 2018. http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=129582
- Rodríguez-Medellín, M.L. 2019. Efecto del incremento de la temperatura en la fecundación, desarrollo embrionario y supervivencia larval del erizo irregular *Rhyncholampas pacificus* (A. Agassiz, 1863). Tesis de Licenciatura, Universidad del Mar, Oaxaca, México.
- Rupp, J.H. 1973. Effects of temperatura on fertilization and early cleavage of some tropical echinoderms, with emphasis on *Echinometra mathaei*. Mar. Biol. 23: 183–189.
- Sánchez-Ovando, J.P. 2019. Revisión de las especies del género *Spirobranchus* Blainville, 1818 (Polychaeta: Serpulidae) de América tropical. Tesis de Licenciatura, Universidad del Mar, Puerto Ángel, Oaxaca.

- Schroeder, P.C. & C. Hermans. 1975. Annelids and Echiurans. Pp: 1–213. In: Giese, A.C. & J.S. Pearse (Eds.), Reproduction of marine invertebrates. Cap 1. Academic Press, New York. 343 pp.
- Segrove, F. 1941. The development of the serpulid *Pomatoceros triqueter* L. Quarterly Journal of Microscopical Science 82: 476–540.
- Selim, S.A., F. Abdel Naby, A. Gab-Alla & A. Ghobashy. 2005. Gametogenesis and spawning of *Spirobranchus tetraceros* (Polychaeta, Serpulidae) in Abu Kir Bay, Egypt. Mediterranean Marine Science 6: 89–97.
- Smith, R. 1984. Development and settling of Spirobranchus giganteus (Polychaeta, Serpulidae). Pp: 461–483. In: Hutchings, P.A. (Ed.), Proceedings of the first international polychaete conference, Sydney, 1983. Linnean Society of New South Wales.
- Stranges, S., A.P. Cuervo-Robayo, E. Martínez-Meyer, H.N. Morzaria-Luna & H. Reyes-Bonilla. 2019. Distribución potencial bajo escenarios de cambio climático de corales del género *Pocillopora* (Anthozoa: Scleractinia) en el Pacífico oriental tropical. Revista Mexicana de Biodiversidad 90: 1–16.
- Strathmann, M.F. 1987. Phylum Annelida, Class Polychaeta. Pp: 138–195. In: Strathmann, M.F. (Ed.), Reproduction and development of marine invertebrates of northern Pacific Coast. Data and methods for the study of eggs, embryos, and larvae. Seattle: University of Washington Press.
- Ten Hove, H.A. 1984. Towards a phylogeny in serpulids (Annelida: Polychaeta). Pp: 181–196. In: Hutchings, P.A. (Ed.), Proceedings of the First International Polychaete Conference, Sydney, 1983. Linnean Society of New South Wales.
- Thorson, G. 1950. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. Biological Reviews 25: 1–45.
- Vuillemin, S. 1958. Fixation obtenue au laboratoire des larves de quelques serpuliens (Annélides polychaètes) du lac de Tunis. Competes Rendus Hebdomaires des Séances de l'Academie des Sciences, Paris 247: 2038–2040.
- Wang, C. & D.B. Enfield. 2001. The tropical Western Hemisphere warm pool. Geophysical research letters 28(8): 1635–1638.
- Wilkinson, T., E. Wiken, J. Bezaury-Creel, T. Hourigan, T. Agardy, H. Herrmann, L. Janishevski, C. Madden, L. Morgan & M. Padilla. 2009. Marine ecoregions of North America. Commission for Environmental Cooperation. Montreal, Canada. 200 pp.
- Willette, D.A., A.R. Iñiguez, E.K. Kupriyanova, C.J. Starger, T. Varman, A.H. Toha, B.A. Maralit & P.H. Barber. 2015. Christmas tree worms of Indo-Pacific coral

reefs: Untangling the *Spirobranchus corniculatus* (Grube, 1862) complex. Coral Reefs 34: 899–904.

Xie, Z.C., N.C. Wong, P.T. Qian & J.W. Qiu. 2005. Response of polychaete *Hydroides elegans* life stages to copper stress. Marine Ecology Progress Series 285: 89–96.