



# UNIVERSIDAD DEL MAR

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

BIOLOGÍA REPRODUCTIVA, DESARROLLO LARVARIO Y EFECTO DE LA ACIDIFICACIÓN DEL OCÉANO EN EL ÉXITO DE LA FERTILIZACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO DE *Arbacia stellata* (Blainville, 1825; ?Gmelin, 1788) (ECHINODERMATA: ECHINOIDEA).

### TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

### DOCTORA EN ECOLOGÍA MARINA

PRESENTA:

M. en C. JULIA PATRICIA DÍAZ MARTÍNEZ

DIRECTOR:

Dr. EUGENIO DE JESÚS CARPIZO ITUARTE

CO-DIRECTOR:

Dr. FRANCISCO BENÍTEZ VILLALOBOS

Puerto Ángel, Oaxaca, México

Septiembre, 2019

## **Resumen**

*Arbacia stellata* es un equinoideo regular con distribución amplia en el Pacífico oriental, desde la zona tropical hasta la templada de ambos hemisferios. Su abundancia se ha incrementado en el extremo norte de su distribución, a pesar de que en las localidades más norteñas, incluyendo la localidad de Punta Banda, Baja California México, se han registrado estacionalmente (primavera-verano) condiciones de mayor acidificación del océano (AO) de lo que se había previsto para finales del presente siglo. En el presente estudio se caracterizó el ciclo reproductivo de esta especie durante un año, a partir del ciclo de desarrollo gonadal, proporción sexual, índice gonadosomático (IGS), índice de madurez (IM), fecundidad real y distribución de tallas de ovocitos. Se evaluó la relación de los índices reproductivos con variables ambientales (temperatura superficial del mar, fotoperiodo, clorofila *a* y producción primaria neta). Se caracterizaron las etapas de desarrollo temprano (desde fecundación hasta metamorfosis) de esta especie, tomado en cuenta el tamaño y tiempo en el que se alcanzó cada etapa y las condiciones de cultivo. Por último, se evaluó el posible efecto de la AO en el éxito de fecundación en un gradiente de densidad de espermatozoides, así como en el desarrollo embrionario. Se utilizaron dos condiciones de pH: 8.0-8.1 para valores de pH alto y 7.5-7.6 para valores de pH bajo. *Arbacia stellata* se caracterizó por tener un ciclo reproductivo semicontinuo para ambos sexos, con mayor actividad reproductiva desde finales del verano hasta inicio del invierno y desoves parciales durante todo el año. La proporción de hembras y machos no fue significativamente diferente entre ellos en la mayoría de los meses y no hubo evidencia de diferencias significativas en los valores del IGS entre sexos ni entre meses. Sin embargo los valores más altos se observaron durante la primavera mostrando una correlación positiva con la clorofila *a*. Se observaron diferencias significativas en los valores del IM entre meses. Se evidenció una correlación positiva con la temperatura y negativa con la clorofila *a*. Los valores de fecundidad presentaron variaciones amplias durante el año y una correlación significativa con la clorofila *a* y con la temperatura. La distribución de diámetros

de ovocitos fue unimodal en todos los meses y la frecuencia predominante fue la de los ovocitos maduros.

El tiempo de desarrollo desde la fecundación hasta la etapa de gástrula tardía consistió en 14 horas de cultivo a una temperatura de 24°C, con un tamaño inicial del  $77 \pm 3.5 \mu\text{m}$  de diámetro (embrión de dos células) y un tamaño final de  $76.1 \pm 5.3 \mu\text{m}$  de largo del cuerpo (gástrula). El estadio de larva plantotrófica inicia con la larva de cuatro brazos y finaliza con una larva de 10 brazos (anterolaterales, postorales, posterolaterales, preorales y posterodorsales), con un tiempo de desarrollo de 23 días, a una temperatura promedio de  $22.5 \pm 0.8^\circ\text{C}$ . El tamaño promedio de las larvas fue de  $324 \pm 56 \mu\text{m}$  de largo y  $225 \pm 19 \mu\text{m}$  de ancho antes de iniciar la metamorfosis, el cuerpo del juvenil es discoidal pentámero, con tres espinas en forma de remos en los interambulacros y un podio central en cada ambulacro.

El porcentaje de fecundación obtenido en dos de los tres experimentos realizados evidenció un efecto de la acidificación del medio a concentraciones bajas de espermatozoides. En uno experimentos (experimento 2) no se evidenció efecto en la fecundación a pH bajo en todo el gradiente de concentración de espermatozoides. No se registraron diferencias significativas en el porcentaje en los diferentes estadios embrionarios respecto a las dos condiciones de pH. Así mismo, el diámetro de las blástulas y el ancho de las gástrulas no variaron significativamente entre las dos condiciones de pH en ninguno de los dos experimentos realizados.

La estacionalidad inconspicua, con incremento en la actividad reproductiva desde finales del verano hasta inicio del invierno y el desarrollo larval relativamente corto (menor a un mes), aparentemente contrarrestan el efecto de la acidificación del medio durante los eventos de surgencias estacionales en el éxito del desarrollo temprano de *A. stellata*. Así mismo, la pre-adaptación de algunos individuos a las condiciones locales y la robustez en el crecimiento de los embriones a pH bajo, pueden ser indicios de la estrategia de *A. stellata*, la cual favorece su presencia y abundancia en localidades del norte de su distribución, donde las condiciones estacionales de acidificación son imperantes.

## Summary

*Arbacia stellata* is a regular echinoid with a wide distribution in the eastern Pacific, from the tropical zone to the temperate zone of both hemispheres. Its abundance has increased in the northern extreme of its distribution, despite the fact that in the most northern localities, including the study locality, have been registered seasonally (spring-summer), conditions of ocean acidification (OA) that had been predicted by the end of this century. In the present study, important aspects of the life cycle of the population of *A. stellata* inhabiting Punta Banda, Baja California Mexico were analyzed. The reproductive cycle of this species was characterized during one year, through the cycle of gonadal development, sexual proportion, Gonadosomatic Index (GSI), Maturity Index (MI), actual fecundity and size distribution of oocytes. The relationship of the reproductive indices with environmental variables (Sea Surface Temperature, Photoperiod, Chlorophyll *a*, and Net Primary Production) was evaluated. The stages of early development (from fecundation to metamorphosis) of this species were characterized, taking into account the size and time in which each stage was reached and the culture conditions. Finally, the possible effect of OA on the success of fertilization through a sperm-density gradient, as well as on embryonic development, was evaluated. Two pH conditions were used: 8.0-8.1 for high pH values and 7.5-7.6 for low pH values. *Arbacia stellata* was characterized by having a semi-continuous reproductive cycle for both sexes, with higher reproductive activity from late summer to early winter and partial spawning throughout the year. The proportion of females and males was not significantly different from the equality in most months and there was no evidence of significant differences in the IGS values between sexes or between months, however, the highest values were observed during the spring showing a positive correlation with chlorophyll *a*. Significant differences were observed in the values of the MI between months and a positive correlation with temperature and negative with chlorophyll *a*, were observed. Fecundity values showed wide variations during the year and a significant correlation with chlorophyll *a* and temperature. The distribution of oocyte diameters was unimodal in all months

and the predominant frequency was that of mature oocytes. The development time from fertilization to the late gastrula stage consisted of 14 hours of culture at 24 ° C, with an initial size of  $77 \pm 3.5 \mu\text{m}$  in diameter (embryo of 2 cells) and a final size of  $76.1 \pm 5.3 \mu\text{m}$  body length (gastrula). The planktotrophic larval stage begins with the 4-arm larva and ends with a 10-arm larva (anterolateral, post-oral, posterolateral, preoral, and posterodorsal), with a development time of 23 days, at an average temperature of 22.2 °C. The average larval size was 270  $\mu\text{m}$  long and 350  $\mu\text{m}$  wide before starting the metamorphosis. The body of the juvenile is discoid pentamerous, with three oars-like spines in the interambulacral zones and a central tube foot in each ambulacral zone.

The percentage of fertilization obtained in two of the three experiments showed an effect of the acidification at low sperm concentrations, whereas in one experiment there was no evidence of fertilization effect at low pH in the whole sperm concentration gradient. There were no significant differences in the percentage of the different embryonic stages with respect to the two pH conditions. Likewise, the diameter of the blastulae and the width of the gastrulae did not vary significantly between the two pH conditions in either of the two experiments carried out.

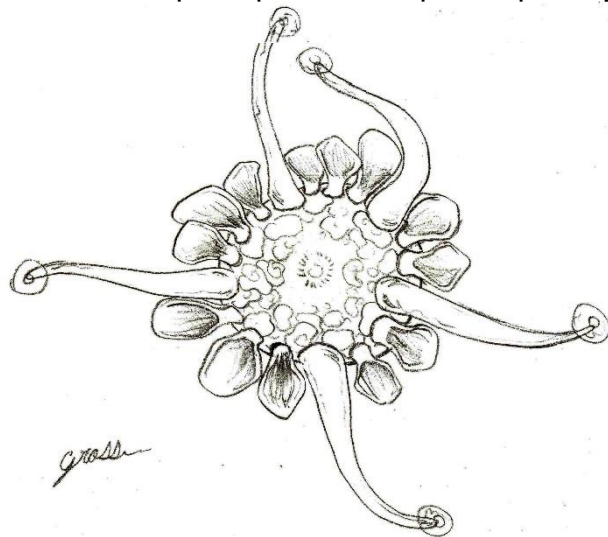
The inconspicuous seasonality, with increase in reproductive activity from late summer to early winter, and relatively short larval development (less than a month), apparently counteract the effect of acidification during seasonal upwelling events, in the success of the early development of *A. stellata*. Likewise, the apparent pre-adaptation of some individuals to local conditions and the robustness in the growth of embryos at low pH, may be indications of the strategy of *A. stellata*, which favors its presence and abundance in northern localities of its distribution, where prevail seasonal conditions of acidification.

## Dedicatorias

A mi hija Lobanna Benítez, quien es parte esencial en cualquier proyecto en el que me involucro. El periodo en el cual inició este proyecto, le toco a este hermoso ser pasar una de las etapas más difíciles tanto de los hijos como de los padres, la etapa de la metamorfosis que involucra la adolescencia (larva competente) y el periodo de culminación coincidió con la etapa del término de la adolescencia e inicio de la etapa de juvenil, que aunque aún no está completamente asentado ya es una hermosa mujer llena de seguridad y muy preparada para los desafíos que vienen. Sin querer, el carácter generalmente severo y las enseñanzas maternas, así como las enseñanzas y la paciencia paternal la han preparado para sobrevivir sin tanto cuidado parental en cualquier medio que se desarrolle. Gracias por existir, continúa creciendo.

A mi esposo Francisco Benítez, quien pacientemente me ha apoyado en cada uno de mis proyectos de vida. Además de apoyarme en la guía de la tesis, cuidó amorosamente de Lobanna en mis ausencias y me ayudó a construir la casita de mis sueños. Sin duda su amor y ejemplo son el espíritu de nuestra familia.

A mi abuela materna Ernestina Gózales, aunque yo no pude acompañarte en tus últimos momentos, sé que tu amor me acompaña por donde quiera que voy.



## **Agradecimientos**

A Lobanna, por su acompañamiento y paciencia en mi realización y desarrollo como profesional, por esperarme en casa por las noches casi siempre con una sonrisa, junto con su manada (Kyuzo, Kuma y Yuki), esos momentos son invaluable para mí. Aunque a veces te toque lo peor de mis momentos de crisis

A mi madre Virginia Martínez y mis hermanas Caro y Ana ejemplos de fortaleza y dedicación, siempre felices por mis logros y dispuestas a protegerme como solo una madre lo haría. A mi hermano Alex, por ser esa parte de mi misma que tengo que comprender y amar.

A mi director de tesis el Dr. Eugenio Carpizo Ituarte. Primero que todo, por su carisma que prendió la chispa de mi curiosidad en los temas abordados en esta tesis, así mismo, por aceptarme como parte del equipo en el EcoDel (IIO-UABC), por brindarme todo lo necesario en el trabajo de campo y laboratorio. Por su paciencia y comprensión, por ser mi guía y acompañamiento en cada una de las etapas de la realización y culminación de este proyecto. Así mismo, le agradezco por su apoyo en mis estancias en la UABC y junto con él, agradezco a su esposa Marcela Lugo y a sus hijas Karin y Andrea por compartir momentos de familia conmigo y en ocasiones con mi familia, estos momentos hicieron más agradable ese tiempo en Ensenada.

Al Dr. Francisco Benítez mi codirector de tesis, quien dio seguimiento a mi desarrollo y formación como investigadora durante la realización del proyecto de doctorado, sus conocimientos transmitidos durante todo el tiempo acompañado en lo académico, así como su ejemplo de disciplina siempre serán ingredientes esenciales en toda mi vida profesional y personal.

A mis revisores:

Dr. Francisco Solís Marín y Juan José Alvarado que una vez más forman parte de mi comité de tesis, las sugerencias, comentarios y material de apoyo, fueron esenciales para la mejora del manuscrito. Así mismo por contagiarme del entusiasmo por los equinodermos.

Dra María Luisa Leal y Dr. Miguel Ahumada por contribuir en el aspecto oceanográfico, igualmente sus comentarios, observaciones y recomendaciones enriquecieron este trabajo. Al Dr. Juan Meraz por sus comentarios acertados al manuscrito, sobre todo en la parte experimental.

Con mucho respeto y cariño al Dr. Pedro Cervantes Hernández quien aunque no fue revisor de esta tesis, una vez más sus conocimientos heredados contribuyeron a enriquecer y mejorar la misma, también por todo lo que me enseñó dentro y fuera de su papel como profesor desde la maestría, por siempre creer en mí.

Al Dr. J. Martín Hernández Ayón encargado del Laboratorio de Oceanografía Química del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California (IIO-UABC), quien amablemente me permitió utilizar el equipo para analizar las muestras de agua de los experimentos. Así mismo, por compartir conmigo su amplia experiencia y conocimiento en la química del carbono.

A mis compañeros del EcoDel UABC, Jimena, Alex, Viri, Carlitos y Maritza, gracias por ese compañerismo que muchas veces extraño, sobre todo los jueves de tacos de pescado.

A mis compañeros y amigos del ECODES UMAR, Magui, Juan, Malu, Karen, Isa, Walter, Astrid y como agregado Efra. Por ser como parte de la familia, todos siempre muy lindos y respetuosos conmigo, dispuestos a aprender y colaborar



hasta en las fiestas. Así mismo, agradezco a mi compañerita del doctorado Lili Castro, por los momentos agradables que compartimos dentro y fuera de la universidad, sobre todo por el apoyo en mis momentos de crisis.

A mis amigos de siempre Samy y Virgilio por animarme siempre que quería tirar la toalla y salir corriendo, siempre contentos y orgullosos de mis logros, tanto personales como académicos, son de esos amigos que a pesar de los años y las situaciones nunca te abandonan.

A mi amiga Maricela y familia, así como a Doña Yaya y familia, por integrarme y compartir momentos de familia conmigo y hacer más rica mi estancia en Ensenada.

A los técnicos académicos Javier García Pamares y Marco Aurelio González Gómez del IIO, UABC, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia en el mantenimiento y cultivo de organismos marinos y ayudarme a resolver mis contratiempos en el laboratorio durante mi estancia en la UABC. Al igual que mis revisores su colaboración fue esencial en mi tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por apoyarme con la beca para realizar mis estudios de doctorado y así contribuir a mi formación como profesional.

A mi alma máter, *Mare Nostrum Veritabile Faciendum. UMAR*

## ÍNDICE

	Página
Resumen .....	iii
Summary .....	v
Dedicatorias.....	vii
Agradecimientos.....	viii
Índice.....	xi
Índice de figuras .....	xiii
Índice de tablas .....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS .....	6
OBJETIVOS .....	7
General .....	7
Particulares .....	7
AREA DE ESTUDIO.....	9
CAPITULO I.....	14
Introducción.....	14
Material y Método.....	17
Resultados .....	24
Discusión.....	39
CAPITULO II.....	45
Introducción.....	45
Material y método.....	47
Resultados .....	50
Discusión.....	58
CAPITULO III.....	62
Introducción.....	62
Material y Método.....	67
Resultados .....	74
Discusión... ..	85
CONCLUSIONES GENERALES.....	90

RECOMENDACIONES .....	93
LITERATURA CITADA .....	95

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Localización geográfica de la localidad de Punta Banda en Baja California	9
2	Microfotografías de estadios gonadales de hembras de <i>Arbacia stellata</i>	27
3	Microfotografías de estadios gonadales de machos de <i>Arbacia stellata</i> .	29
4	Comparación de la variación mensual del Índice Gonadosomático de hembras, machos y de la población total de <i>Arbacia stellata</i> .	30
5	Comparación del comportamiento del Índice de Madurez de hembras, machos y del promedio total para la población.	31
6	Ciclo gametogénico anual de hembras y machos de <i>Arbacia stellata</i> mostrando las abundancias relativas de los diferentes estadios de desarrollo de la gónada.	33
7	Distribución de frecuencias del diámetro de los ovocitos de <i>Arbacia stellata</i> .	35
8	Variación mensual de los valores de fecundidad de <i>Arbacia stellata</i> .	36
9	Variación anual de los valores medios de A) fotoperiodo y temperatura B) Cha-a y Producción Primaria Neta, en Punta Banda BC, México.	38
10	Sistema de cultivo de embriones y larvas en el laboratorio EcoDel.	49
11	Parámetros morfométricos medidos a la larva de 4 brazos.	50
12	Reproductores en posición de desove inducido.	51
13	Estadios de desarrollo embrionario hasta el estadio de gástrula de <i>Arbacia stellata</i> .	52
14	Estadios de desarrollo larvario hasta la metamorfosis de	55

*Arbacia stellata*.

15	Tendencia media ( $\pm$ DE) del largo de los brazos postorales izquierdo (lbpoi) y derecho (lbpod), ancho a la mitad del cuerpo (amc), largo a la mitad del cuerpo (lmc) y tendencia media ( $\pm$ DE) de la temperatura durante el desarrollo de la larva pluteus de <i>Arbacia stellata</i> .	57
16	Concentraciones estimadas de las especies de carbono ( $\mu\text{mol kg}^{-1}$ ), valores de pH y estados de saturación de aragonita y calcita del agua de mar para concentraciones $\text{pCO}_2$ (ppmv) atmosféricos (periodo glacial, preindustrial y actual).	64
17	Óvulo A) fertilizado y B) óvulo no fertilizado de <i>Arbacia stellata</i> .	70
18	Microfotografías mostrando las medidas registradas en los embriones de <i>Arbacia stellata</i> , a) Blástula y b) Gástrula.	72
19	Porcentaje de óvulos fertilizados y no fertilizados (Media $\pm$ DE) en un gradiente de concentración de espermatozoides de <i>Arbacia stellata</i> AMF a un pH de 8.0.	74
20	Porcentaje de óvulos fertilizados (Media $\pm$ DE) a diferentes concentraciones de espermatozoides de <i>Arbacia stellata</i> , para el experimento 1	76
21	Porcentaje de óvulos fertilizados (Media $\pm$ DE) a diferentes concentraciones de espermatozoides de <i>Arbacia stellata</i> , para el experimento 2.	77
22	Porcentaje de óvulos fertilizados (Media $\pm$ DE) a diferentes concentraciones de espermatozoides de <i>Arbacia stellata</i> para el experimentos 3.	78
23	Ordenamiento del escalamiento multidimensional no-métrico (MDS) de los tiempos de muestreo (8,12,16,20,24) con respecto al efecto del pH (7.5 y 8), en el desarrollo embrionario de <i>Arbacia stellata</i> .	80
24	Diámetro (Media $\pm$ DE) de las blástulas de <i>Arbacia stellata</i> a lo largo del periodo de experimentación, en el experimento 1.	81
25	Ancho (media $\pm$ DE) de las gástrulas de <i>Arbacia stellata</i> a lo largo del periodo de experimentación (experimento 1).	82

26	Diámetro (Media $\pm$ DE) de las blástulas de <i>Arbacia stellata</i> a lo largo del periodo de experimentación (experimento 2).	83
27	Ancho (media $\pm$ DE) de las gástrulas de <i>Arbacia stellata</i> a lo largo del periodo de experimentación, (experimento 2).	84

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
I	Características de las masas de agua que componen el sistema de la corriente de California.	10
II	Valores medios y desviación estándar del diámetro de la testa y peso húmedo de machos y hembras en cada mes de muestreo.	23
III	Proporción de sexos de <i>Arbacia stellata</i> durante el periodo de noviembre 2013 a octubre del 2014.	24
IV	Tiempo aproximado de cada una de las etapas del desarrollo embrionario de <i>Arbacia stellata</i> , en condiciones de laboratorio.	52
V	Tiempo aproximado de cada una de las etapas de desarrollo, desde la etapa de prisma hasta la metamorfosis de <i>Arbacia stellata</i> en condiciones de laboratorio, 35 UPS y pH 8, alimentada con la microalga <i>Rhodomonas sp.</i> a partir del estadio de larva pluteus temprana.	55
VI	Concentración de espermatozoides de <i>Arbacia stellata</i> en cada factor de diluciones en el experimento 1, 2 y 3.	68
VII	Propiedades químicas del agua de mar utilizada para los experimentos de fertilización.	78
VIII	Propiedades químicas del agua de mar utilizada para los experimentos del desarrollo embrionario.	84

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Los erizos de mar regulares, representados por cerca de 1000 especies actuales, se encuentran divididos en dos subclases, Cidaroidea y Euechinoidea que pertenecen a la clase Echinoidea del Phylum Echinodermata (Kroh y Smith 2010). Los cuales se distribuyen en casi todos los ambientes bentónicos marinos (comunidades de algas, pastos marinos, arrecifes coralinos, ambientes fangosos, arenosos y rocosos) (Hendler *et al.* 1995) desde los polos hasta el Ecuador (Lessios 2005) y desde la zona intermareal (Hickman 1998), hasta profundidades abisales (Gage y Paul 1991). Los equinoideos son considerados especies claves, ya que juegan un papel ecológico de gran relevancia dentro de las comunidades bénticas alrededor del mundo. En arrecifes coralinos y bosques de macroalgas, por ejemplo son importantes consumidores de algas y su abundancia, talla máxima y mortalidad, les permiten mantener la actividad de pastoreo intensivo. Dicha actividad les permite modificar la distribución, abundancia relativa y composición de algas y corales en estos ambientes y en consecuencia pueden alterar dramáticamente la estructura física y biológica de la comunidad (Leinaas y Christie 1996).

Así mismo, los equinoideos son considerados importantes calcificadores, debido a que utilizan el carbonato de calcio con una eficiencia inusualmente alta con respecto a otros calcificadores, lo que da como resultado las características de resistencia y volumen de un esqueleto idóneo con una cantidad mínima de material. Su presencia en el fondo marino es esencial para los procesos de producción, incorporación, reciclaje y sedimentación de carbonatos (Weber *et al.* 1969, Lebrato *et al.* 2009).

Adicionalmente, algunas especies de erizos de mar son económicamente importantes, ya que las gónadas de los erizos regulares se han consumido desde hace varios miles de años, siendo la pesquería en Francia una de las más antiguas del mundo. Hoy en día países como Japón, Chile, EE. UU., Canadá, Perú y México sostienen pesquerías intensivas de equinoideos (Guillou y Lumingas 1998, Reynolds y Wilen 2000, Palleiro-Nayar *et al.* 2012, Aminur



*et al.* 2014). Así mismo, las gónadas del erizo de mar también son ricas en compuestos bioactivos valiosos para la industria química (Aminur *et al.* 2014).

Dependiendo de sus historias de vida y/o capacidades de dispersión, las especies pueden ocupar grandes extensiones geográficas o estar restringidas a pequeñas zonas. Entre las especies de equinoideos regulares con distribución tanto en la zona tropical como en la zona templada en ambos hemisferios del Pacífico oriental, se encuentra *Arbacia stellata* (Lessios *et al.* 2012). Esta especie se distribuye a lo largo de la costa del Pacífico oriental desde las Islas Lobos de Afuera, Perú (Hooker *et al.* 2005), hasta Estados Unidos de Norteamérica (Caso 1977, Metz *et al.* 1998). Hasta hace unos años *A. stellata* se consideraba una especie no muy abundante en todo su intervalo de distribución, encontrándose en pequeños grupos y a menudo como individuos solitarios (Caso 1977, Metz *et al.* 1998, Lessios 2005). Sin embargo, la presencia y sobre todo la abundancia de esta especie, se ha incrementado en algunas localidades del norte de Baja California y sur de California, como es el caso de la costa de Punta Banda frente a Ensenada, Baja California (B.C), Laguna Beach y Bahía de Monterrey en California, en el extremo norte de su distribución (Engle y Richards 2001, Burcham y Caruso 2015).

Para cada especie existe un conjunto de condiciones ambientales en las cuales puede sobrevivir y reproducirse exitosamente. Parámetros como la temperatura, pH, salinidad y niveles de oxígeno del agua de mar, son factores abióticos determinantes en la distribución de los organismos marinos. Las especies como *A. stellata*, con distribución amplia, presentan en sus poblaciones adecuaciones principalmente fisiológicas y reproductivas, a las condiciones imperantes en cada localidad en su intervalo de distribución.

A nivel global, cambios en la química y pH de los océanos están ocurriendo a una tasa no experimentada por organismos marinos en los últimos 20 millones de años (Ridgwell y Schmidt 2010). Debido a que el océano (incluyendo a la biota) constituye uno de los tres grandes reservorios, entre los cuales hay un intercambio significativo de CO<sub>2</sub>, la continua y rápida incorporación de CO<sub>2</sub>

atmosférico al océano durante la Época del Antropoceno está incrementando la concentración de iones de hidrógeno y en consecuencia disminuyendo los valores del pH en el agua de mar. Lo anterior resulta en una disminución en la concentración del ion carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), el cual reduce el estado de saturación de los minerales de carbonato de calcio ( $\Omega\text{CaCO}_3$ ) en la capa superficial del océano, en un proceso que se conoce como acidificación del océano (AO) (Key *et al.* 2004, Orr *et al.* 2005). La AO es un proceso que aunque no es considerado un problema de cambio climático, puesto que no afecta los patrones climáticos, puede generar consecuencias tan graves como el calentamiento global, tanto para los organismos y los ecosistemas marinos, como para el bienestar humano (Doney *et al.* 2009, Kroeker *et al.* 2013).

A partir de la incorporación del carbono antropogénico entre 1750 y 1994, se ha calculado un descenso de pH de los océanos de 0.1 sobre el nivel global. Los descensos más bajos (0.06) se calculan para los trópicos y aguas subtropicales y los más altos en altas latitudes (0.12). Esto es consistente con la baja capacidad de amortiguamiento de las aguas a altas latitudes debido al efecto de la temperatura. Así mismo, se espera que las reducciones futuras del pH en el océano sean de alrededor de 0.3 a 0.5 unidades en 2100 y de 0.7 a 0.8 unidades o más en 2300 (Caldeira y Wickett 2003, Caldeira 2005, Orr *et al.* 2005, IPCC 2007).

Una de las implicaciones de la acidificación del océano en organismos marinos, especialmente para los que incorporan carbonato de calcio para producir conchas, testas o esqueletos, es que estas estructuras calcificadas serán más susceptibles a la disolución en aguas más ácidas, como es el caso de la mayoría de los equinodermos (Andersson *et al.* 2008, Dupont *et al.* 2010a, 2010c). Los cambios químicos del agua de mar por efecto de la AO pueden afectar cualquier etapa del ciclo de vida de los organismos marinos. Para organismos que liberan sus gametos en la columna de agua como la mayoría de los equinodermos, la fertilización puede ser particularmente sensible a la AO, debido a la vulnerabilidad tanto del ovulo como del espermatozoide a cambios químicos

(Byrne 2011). Adicionalmente, los gametos, cigotos y embriones en las primeras etapas, carecen de un epitelio especializado en la regulación iónica, lo que les confiere limitada capacidad de responder a las condiciones ácido-base ambientales (Melzner 2009). Así mismo, las etapas larvales, así como la metamorfosis pueden ser especialmente susceptibles (Kurihara y Shirayama 2004, Moulin *et al.* 2011).

La población de *A. stellata* estudiada se encuentra distribuida en Punta Banda Baja California. Esta localidad es influenciada por el Sistema de la Corriente de California (SCC) (Checkley y Barth 2009) y presenta estacionalmente surgencias costeras que producen un transporte de aguas superficiales mar adentro y originan el afloramiento de aguas relativamente frías, ricas en nutrientes, con baja salinidad y ricas en carbono inorgánico disuelto (CID) (Munoz-Anderson *et al.* 2015). Estas surgencias generalmente comienzan al inicio de la primavera (abril) y duran hasta fines del verano o el otoño, cuando inician las tormentas de invierno. Los procesos de surgencia causan que toda la columna de agua se torne subsaturada de aragonita y presente condiciones bajas de pH (Feely *et al.* 2008), una condición que no se predijo que ocurriera en aguas superficiales abiertas hasta 2050 (Orr *et al.* 2005).

A pesar de la amplia distribución de *A. stellata*, el ciclo reproductivo no se ha documentado en ninguna de las localidades en las que se ha reportado su presencia. Así mismo, el conocimiento del desarrollo temprano (fecundación hasta la metamorfosis) es escaso y fragmentado. Puesto que la población de *A. stellata* del presente estudio ya está experimentando condiciones de acidificación, algunos aspectos de su ciclo de vida como los patrones reproductivos, la fertilización y el desarrollo temprano podrían verse comprometidos por el efecto de la AO, lo cual podría resultar en un cuello de botella para la especie en su distribución al norte. Sin embargo, su avance y presencia en las localidades de la región sur del oeste de Norte América, indican que esta especie podría tener estrategias que le permitan desarrollarse e incrementar su presencia en condiciones de AO.

La presente tesis doctoral comprende el estudio de aspectos importantes de la historia de vida y el efecto de la acidificación del océano a nivel experimental en las primeras etapas de desarrollo del equinoideo *Arbacia stellata*, evaluados en la población distribuida en la parte norte de Baja California, México.

La tesis está organizada en tres capítulos que corresponden a manuscritos originales de investigación.

El capítulo I, aborda el análisis y la caracterización del patrón reproductivo de esta especie y su relación con algunos parámetros ambientales, con el objetivo de dilucidar la estrategia reproductiva de la especie y las causas de ésta.

El capítulo II, se enfoca en la caracterización y la descripción de las etapas del desarrollo temprano desde la fecundación hasta la metamorfosis en condiciones de laboratorio, con lo cual se establece la estrategia de desarrollo embrionario y larval, así como el éxito en el asentamiento de la especie.

El capítulo III, comprende la evaluación de la respuesta de los gametos y la tolerancia de los embriones a la disminución del pH del medio en el contexto de la acidificación del océano, exponiéndolos a dos condiciones de pH: un medio de pH alto (8.0-8.1) usualmente registrado dentro del rango natural de su hábitat y un medio de pH bajo (7.5-7.6), propuesto para el año 2100 como resultado de la gradual acidificación del océano.

Finalmente, se adjuntan las conclusiones generales de esta tesis, las recomendaciones y un artículo ya publicado en la revista científica *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*.

## HIPÓTESIS

**Hipótesis 1.-** En las regiones marinas templadas y/o frías, durante las estaciones de primavera y verano las condiciones ambientales, como la temperatura del agua del mar y la disponibilidad de alimento son propicias para el desarrollo y supervivencia de las larvas y juveniles. Así mismo, las especies que en ellas habitan presentan un ciclo reproductivo estacional (con los procesos de desarrollo y maduración de las células reproductoras restringidos a unos meses del año). Por lo tanto, el ciclo reproductivo de *A. stellata* presentará una marcada estacionalidad en la localidad de estudio.

**Hipótesis 2.-** Estudios previos coinciden en que la mayoría de los equinoideos regulares entre ellos *A. stellata* presentan una larva equinopluteus, por lo que se deduce que el desarrollo temprano de esta especie presentará un patrón de tipo indirecto, con formación de una larva equinopluteus planctónica, nadadora y planctotrófica, (se desplaza en la columna de agua y se alimenta del material orgánico que se encuentra en suspensión) que completará la metamorfosis en un periodo relativamente corto (aproximadamente un mes).

**Hipótesis 3.-** Debido a que algunos estudios experimentales con equinoideos, han demostrado que las ventanas de tolerancia al estrés ambiental como la hipercapnia (una exposición a niveles extremos de CO<sub>2</sub>) son específicas de cada especie y varían a lo largo del ciclo de vida, se propone que el éxito de fertilización y el desarrollo ontogenético de *A. stellata* estará afectado negativamente como consecuencia del estrés que produce la acidificación del medio.

## OBJETIVOS

**Objetivo 1.-** Caracterizar el patron reproductivo de *Arbacia stellata* mediante la identificación de los estadios gonadales, índices reproductivos y su relación con la variación ambiental, en Punta Banda, Baja California, México.

### Objetivos específicos

- 1.- Evaluar la proporción de sexos por mes a lo largo de un ciclo anual.
- 2.- Describir el ciclo gametogénico de hembras y machos.
- 3.- Analizar los promedios mensuales del Índice Gonadosomático (IGS) y del Índice de Madurez (IM).
- 4.- Identificar la estructura de tallas de los ovocitos a lo largo del año.
- 5.- Caracterizar las variaciones temporales de la fecundidad real.
- 6.- Evaluar la relación entre las variaciones de los parámetros ambientales (Producción Primaria Neta (PPN), fotoperiodo (Fp) y Temperatura Superficial del Mar (TSM)) y los patrones reproductivos de la especie.

**Objetivo 2.-** Describir el desarrollo, crecimiento y morfología de las etapas tempranas de *Arbacia stellata* desde la fecundación hasta la metamorfosis en Punta Banda, Baja California, México.

### Objetivos específicos

- 1.- Obtener gametos viables y realizar la fecundación *in vitro* en condiciones controladas de laboratorio.
- 2.- Caracterizar temporalmente cada una de las etapas del desarrollo embrionario (segmentación, blástula y gástrula).
- 3.- Caracterizar los estadios larvales (pluteus de dos, cuatro, seis y ocho brazos) y los tiempos en que ocurre cada uno de ellos.
- 4.- Determinar el tiempo en el que ocurre la metamorfosis y realizar la descripción de postlarvas y juveniles.

**Objetivo 3.-** Analizar y evaluar las variaciones en el éxito de fertilización y el desarrollo ontogenético de *Arbacia stellata* en respuesta al estrés por acidificación del medio.

**Objetivos particulares**

- 1.- Caracterizar la cinética de fertilización a diferentes densidades de esperma.
- 2.- Comparar la respuesta del éxito de fertilización y el desarrollo temprano a la acidificación del medio, contrastando las condiciones de pH promedio del agua del mar (8.0 y 8.1) y un pH bajo (7.5-7.6).

## ÁREA DE ESTUDIO

La localidad de Punta Banda (PB), está ubicada entre  $31^{\circ}44'39.92''$  N y  $116^{\circ}42'13.69''$  W, en la parte sur de la Bahía de Todos Santos (BTS) en la región noroeste de la península de Baja California, México (Fig. 1). Los cambios estacionales de las propiedades físicas, químicas y biológicas de la BTS se derivan de los procesos particulares de la región oceánica del Océano Pacífico adyacente, por lo que el agua presente en esta zona está relacionada con la dinámica y variabilidad del Sistema de la Corriente de California (SCC) (Trasviña *et al.* 2003).

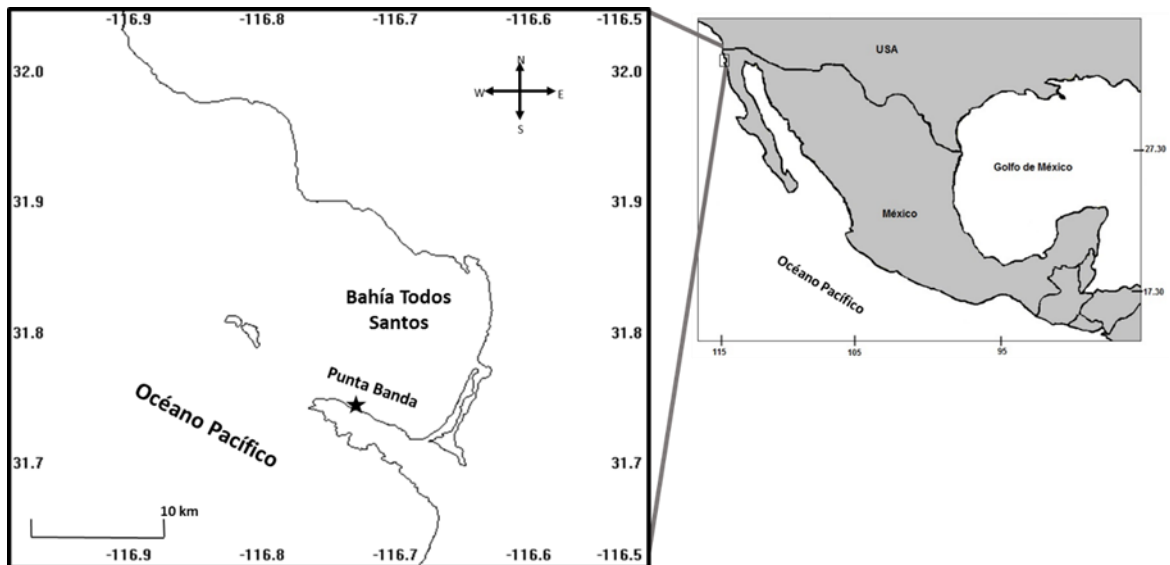


Figura 1.- Ubicación geográfica de la localidad de Punta Banda (★) en el área de la Bahía de Todos Santos (Baja California, México).

El SCC ocurre frente a las costas del oeste de Estados Unidos y noroeste de México, en el océano pacífico nororiental y es considerado dentro del grupo de corrientes llamados “sistemas de corrientes de frontera oriental” (Pares-Sierra *et al.* 1997, Gay y Chereskin 2009). Las características típicas de un sistema de circulación de frontera oriental, son principalmente la presencia de una frontera meridional y el hecho de ser principalmente controlados por el viento. Las propiedades del agua del SCC están determinadas por cuatro masas de agua:



1) la masa de agua subártica del Pacífico que se forman en latitudes altas en regiones de exceso de precipitación y pérdida de calor, exhibe una temperatura relativamente baja, baja salinidad, valores altos oxígeno disuelto y alto contenido de fosfato. Esta masa es transportada por la Corriente de California (CC). 2) La masa de agua central del Pacífico nororiental es cálida, salada y relativamente baja en oxígeno y nutrientes disueltos. El agua subártica del Pacífico y el agua central del Pacífico nororiental se mezclan en las capas superiores a 200 m, mientras la CC fluye hacia el sur. 3) La masa de agua ecuatorial del Pacífico tiene una temperatura relativamente alta, alta salinidad, alto contenido de nutrientes y valores bajos de oxígeno disuelto y se mueve en la zona más profunda (200–500 m) por debajo de la termoclina. Finalmente, 4) La masa de agua de las surgencias costeras, se forma de la mezcla profunda de las masas de aguas subárticas del Pacífico y ecuatorial del Pacífico para crear agua fría y profunda. El afloramiento costero estacional impulsado por el viento trae a la superficie esta agua relativamente fría, salada, rica en nutrientes, baja en oxígeno y relativamente ácida (Lynn y Simpson 1987, McClatchie 2014, Bograd *et al.* 2019). Las características de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, fosfatos y nitratos de cada una de las masas de agua se resumen en la tabla I.

Tabla I.- Características de las masas de agua que componen el sistema de la corriente de California.

<b>Masas de agua</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Salinidad</b>	<b>O<sub>2</sub></b>	<b>NO<sub>3</sub></b>	<b>PO<sub>4</sub></b>
Subártica del Pacífico	6.88-7.75	32.8-33.6	4.58-6.24	10.33-22.21	1.16-1.75
Central del Pacífico nororiental	12.82-18.77	34.18-34.87	4.94-5.32	0.25-0.75	0.14-0.66
Ecuatorial del Pacífico	12.0-20.0	34.2-35.0	0.42-1.06	28.38-36.41	2.04-2.73
Surgencias costeras	11.0-18.0	33.35-33.65	0.5	10.0-25.0	0.1
Temperatura (°C), Salinidad (UPS), O <sub>2</sub> (ml L <sup>-1</sup> ), NO <sub>3</sub> (μmol L <sup>-1</sup> ), PO <sub>4</sub> (μmol L <sup>-1</sup> )					

Los vientos del noroeste prevalecen en la región durante la mayor parte del año y como consecuencia, los eventos de surgencia costera se producen durante todo el año cerca de Baja California. Estos vientos son más intensos en primavera, por lo tanto, los eventos de surgencia costera son más fuertes y más frecuentes, que generan el surgimiento de aguas frías, relativamente saladas y ricas en nutrientes hacia la zona eufótica de la costa (Castro y Martinez 2010). Cabe mencionar que los eventos de surgencia en el Sistema de la CC, pueden estar modulados por diversos factores como variaciones interanuales y decadales, patrones de viento y circulación superficial del océano, lo cual cambia la distribución de las masas de agua. Así mismo, la variación de estos factores puede propiciar efectos en los primeros 250 m de profundidad (Chhak y Di Lorenzo 2007).

La BTS es un cuerpo de agua relativamente pequeño de aproximadamente 16 km de largo en su eje principal, poco profundo (40 m de profundidad promedio) y semicerrado. La bahía cuenta con dos bocas por las que establece comunicación con el Océano Pacífico, además de dos pequeñas islas, llamadas islas de Todos Santos. Las características termohalinas del agua en la BTS corresponden primordialmente a la influencia del SCC por un intercambio de agua en la región NO de la bahía. Flores-Vidal *et al.* (2015) sugieren que las características del SCC se restringen a la zona aledaña a la BTS, por lo que las propiedades físicas y biogeoquímicas del agua pueden ser diferentes dentro y fuera de la bahía. Durante los periodos de vientos intensos paralelos a la costa se desarrolla un flujo de agua desde fuera de la bahía hacia la parte más interna de la misma y este flujo trae aguas desde el océano adyacente a la bahía, las cuales pueden quedar atrapadas allí si el viento se atenúa (Flores-Vidal *et al.* 2015).

De acuerdo con Mancilla-Peraza y Martinez-Garcia (1991), la temperatura superficial del agua en la bahía varía de bajos valores en febrero, hasta los mayores en agosto y septiembre, con una salinidad máxima de 33.7 en el verano y mínima de 33.3 en invierno. Por otro lado, Granados-Guzmán *et al.*

(1995) reportaron mínimos de la temperatura superficial cercanos a 11.0°C en junio y máximos de hasta 21.4°C en agosto. Espinosa-Carreón *et al.* 2001, reportan que la temperatura del agua a 25m de profundidad dentro de la bahía tuvo un intervalo de junio a septiembre de ~11.0°C a ~17.0°C. Las temperaturas más bajas se registraron en marzo y junio, y las más altas en enero y septiembre. La salinidad fue de 33.42 en enero, 33.65 en junio y 33.35 en septiembre y octubre.

En estudios recientes de las condiciones fisicoquímicas en las costas de Baja California se han observado cambios en la química del sistema del CO<sub>2</sub> que podrían estar controlados por variaciones estacionales. Los cambios en la biogeoquímica de la columna de agua pueden generar cambios regionales importantes en los ecosistemas marinos debido a sus efectos en organismos calcificadores. Cervantes Díaz *et al.* (2013), estudiaron la dinámica del CID y pH asociados a los ciclos estacionales de surgencias, su variación estacional e interanual y los efectos en su distribución en la columna de agua de la estación Ensenada y de la estación 100.30 del programa CalCOFI (California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations) e IMECOCAL (Investigaciones Mexicanas de la Corriente de California), ambas cercanas a la localidad de Punta Banda, del 2006 al 2012. Los resultados reflejan altos valores de salinidad (34-34.3) y bajas temperaturas (9-15°C) principalmente durante los periodos de abril (2007, 2008 y 2009), mayo, agosto (2008) y marzo (2011 y 2012). En estas condiciones se observó el ascenso de agua enriquecida en CID con valores de ~2200 µmol/kg y bajos valores de pH (~7.7) en la zona eufótica. Así mismo, detectaron periodos de baja salinidad (~33.3) principalmente durante los periodos de noviembre (2006, 2009 y 2010), durante todo el 2011 y en enero 2012, cuando los valores de pH en la columna de agua fueron de ~8 y con concentraciones de CID de ~2050 µmol/kg.

Oliva-méndez *et al.* (2018), caracterizaron la distribución espacial y temporal del sistema del CO<sub>2</sub> en la BTS a partir de datos de cuatro cruceros basados en el periodo estacional, febrero (invierno), mayo (primavera), agosto (verano-otoño) y

noviembre (otoño) del 2011, año que se caracterizó por condiciones de la Niña. La red de muestreo abarcó 74 estaciones hidrográficas, 32 correspondieron a estaciones internas ubicadas dentro de la BTS y el resto se distribuyeron en cuatro transectos transversales a la línea de costa fuera de la bahía y un transecto en la entrada sur. Los resultados mostraron una variación estacional asociada con la presencia de aguas menos salinas ( $\sim 33.3$ ) y más frías ( $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) desde la superficie hasta 200 m de profundidad y alto contenido de DIC ( $\sim 2,180\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) y bajos valores de  $\Omega$  aragonita ( $\Omega_a$ ) en invierno, desde la superficie hasta  $\sim 100\text{ m}$  de profundidad en primavera y desde  $\sim 100\text{ m}$  hasta 200 m de profundidad en verano. El horizonte de saturación de la aragonita ( $Z\Omega_a$ ) fue de  $\sim 30\text{ m}$  en la zona más cercana a la costa, en contraste con la región más oceánica, donde el  $Z\Omega_a$  fue de  $\sim 150\text{ m}$ . Sin embargo, el  $Z\Omega_a$  más somero cerca de la costa no se encontró durante la temporada de surgencias costeras más intensas (primavera-verano), sino en invierno.

## CAPÍTULO I

### **Patrones reproductivos de *Arbacia stellata* (Blainville, 1825; ?Gmelin, 1788) en Punta Banda, Ensenada, Baja California.**

#### **Introducción**

Los géneros de erizos de mar de aguas someras son generalmente considerados como enteramente tropicales o enteramente templados y solo se presenta solapamiento limitado en los subtrópicos (Lessios *et al.* 2012). Sin embargo, el género *Arbacia* está representado por especies que habitan aguas someras desde la zona templada septentrional hasta los trópicos, tales como *A. lixula* (Linneo, 1758), *A. punctulata* (Lamarck, 1816) y *A. stellata* (Blainville, 1825). Dentro del género también existen especies que se restringen a las zonas templadas y subantárticas en el hemisferio sur, como *Arbacia spatuligera* (Valenciennes, 1846), *Arbacia crassispina* (Mortensen, 1910) y *Arbacia dufresnii* (Blainville, 1825) (Lessios *et al.* 2012).

Entre los aspectos de la historia de vida de las especies, la reproducción es uno de los más importantes, debido que constituye una fase crítica para la supervivencia de las poblaciones dentro de un ecosistema y es altamente sensible a cualquier perturbación ambiental (Bögner, 2016). La mayoría de los miembros del Phylum Echinodermata pueden reproducirse sexual y/o asexualmente, sin embargo, los erizos de mar se reproducen exclusivamente de manera sexual y aunque por regla general la mayoría de las especies son dioicas, se han reportado algunos casos de hermafroditismo (Harvey 1939, Gonor 1973, Mogami *et al.* 1985). Aunque la diferencia entre los sexos de la mayoría de los equinoideos es extremadamente indistinguible, las hembras de algunas especies presentan una marcada diferencia en el tamaño de las papilas genitales y de los gonoporos o presentan depresiones en la testa que funcionan como cámaras de incubación de los embriones (Abessa *et al.* 2001, Jeffery y Emler 2003, Arab y Vaziri 2010). Si bien, la reproducción sexual es la única forma de reproducirse en los adultos, las larvas de varias especies de

equinoideos pueden reproducirse asexualmente a través de la escisión o clonación (Eaves y Palmer 2003, Vaughn y Strathmann 2008).

La reproducción sexual involucra la evolución de las gónadas a través de un ciclo gametogénico y la mayoría de los erizos tienen ciclos reproductivos anuales, con estadios celulares predecibles de desarrollo gonadal y desove (Pearse y Cameron 1991). Generalmente las gónadas de ambos sexos experimentan una serie de cambios estructurales en la abundancia, principalmente de las dos poblaciones celulares del epitelio germinal: las células germinales (oogonias o espermatogonias) y las células somáticas o fagocitos nutritivos. La importancia de este último tipo de células se debe a que proporcionan un microentorno estructural y nutricional para las células germinales durante la gametogénesis (Walker y Lesser 1998, Walker *et al.* 2013, Agnello 2017).

Los ciclos reproductivos en equinoideos están influenciados por una serie de factores exógenos y endógenos, incluyendo fotoperiodo (Pearse *et al.* 1986a, Walker y Lesser 1998), ciclos lunares (Iliffe y Pearse 1982, Lessios 1991, Coppard y Campbell 2005), temperatura (Pearse y Cameron 1991, Shpiguel *et al.* 2004) y densidad poblacional (Wahle y Peckham 1999). Sin embargo, el momento del desove en invertebrados incluyendo a los erizos de mar es independiente de la fisiología reproductiva rítmica anterior y se requiere algún tipo de estímulo adicional para inducir la liberación de gametos. A veces no es posible separar los estímulos para la producción de gametos de la señal de desove real, ya que la culminación de la producción en sí misma puede estimular el desove (Mercier y Hamel 2009).

Las especies que presentan amplia distribución como *A. stellata*, ajustan los patrones de su historia de vida de acuerdo con las condiciones locales y en consecuencia, la permanencia y éxito de las poblaciones, están directamente relacionados con las tasas de asentamiento y reclutamiento, que a su vez se relacionan con la estrategia reproductiva de la especie (Stearns 2000). Giese y Pearse (1974), establecen que los organismos deben sincronizar su

reproducción con las condiciones ambientales que serán más favorables para la sobrevivencia de la descendencia y a menudo las actividades reproductivas, tales como la gametogénesis comienzan mucho antes de que se presenten esas condiciones.

La reproducción ya se ha estudiado para algunas poblaciones de las especies del género *Arbacia*. Por ejemplo, *A. lixula* presenta un ciclo estacional con desoves de mayo a julio y otro de octubre a noviembre en el noroeste de España. El índice gonadosomático de esta especie sigue la misma tendencia que el fotoperiodo y la variación interanual en los valores máximos tiene una fuerte relación con la temperatura media del mar. También se observó una asincronía entre los individuos con varios estadios de desarrollo en la misma gónada (Wangensteen *et al.* 2013). *A. punctulata* se reproduce a lo largo del verano (junio a agosto) en Florida y este patrón puede variar con las oscilaciones interanuales de la temperatura (Harvey 1949). Aunque se ha reportado que las especies del género *Arbacia* son principalmente gonocóricas (Shapiro 1935, Harvey 1939)) reportaron incidencia de hermafroditismo en esta especie.

*Arbacia dufresni*, presenta dos periodos de desove, el primero ocurre en primavera y el segundo y más intenso ocurre en verano en Nuevo Golfo, Argentina (Brogger *et al.* 2010). Así mismo se ha reportado que *A. spatuligera*, se reproduce durante la primavera en la Bahía Concepción en Chile (Bay-Schmith 1981). Si bien para la mayoría de las especies del género *Arbacia* ya se han documentado algunos aspectos reproductivos, no existen datos disponibles del ciclo reproductivo de *A. crassispina*, así como de *A. stellata* (Gianguzza y Bonaviri 2013). En el presente trabajo se examina a detalle el ciclo reproductivo de *A. stellata* en un periodo de un año en el extremo norte de su distribución. Se describen por primera vez aspectos detallados de su gametogénesis de acuerdo con índices gonádicos, así como con análisis histológico para observar la progresión de los eventos celulares asociados con el crecimiento de la gónada,

gametogénesis, maduración y desove, en la población que habita Punta Banda, Baja California, al norte del Pacífico Mexicano.

## **Material y Método**

### ***Trabajo de campo***

De noviembre del 2013 a octubre del 2014 se recolectaron mensualmente aproximadamente 20 erizos por medio de buceo con equipo SCUBA en sustrato rocoso, a aproximadamente 5 m de profundidad. Posteriormente, los organismos fueron transportados al laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Oceanológicas en la Universidad Autónoma de Baja California, donde se colocaron en agua de mar a 4°C por 24 horas, para su posterior disección, medición y extracción de las gónadas.

### ***Variables Ambientales***

El fotoperiodo (Fp) se tomó de valores teóricos para la localidad Ensenada a partir de los informes del grupo de meteorología del Departamento de oceanografía Física del CICESE. Del portal Ocean Color se obtuvieron compuestos mensuales de imágenes de satélite de la Temperatura Superficial del Mar (TSM) (°C), Clorofila *a* (Chl *a*) ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) y Radiación Fotosintética Activa (RFA) ( $\text{Einstein m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) de noviembre 2013 a octubre 2014, proveniente del sensor Aqua Modis a una resolución de 4 km por píxel, las cuales son productos de procesamiento completo nivel L3 (en grados decimales Long-Lst).

A las imágenes anteriormente mencionadas se les ubicó una estación “testigo” frente a la localidad de Punta Banda entre -116.694 y 31.745 (grados decimales) y con la técnica desarrollada por Cervantes-Hernández y Manzano-Sarabia (2017), se extrajo en 1.9 píxeles los promedios mensuales de dichas variables. Con esta información y el modelo de Behrenfeld y Falkowski (1997) se estimó la Producción Primaria Neta (PPN,  $\text{mgCm}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) con el programa Wim/Wam, ver. 9.10 (Wim/Wam Inc. 2016).



### ***Trabajo de laboratorio***

En el laboratorio se midió el diámetro y la altura de la testa y se obtuvo el peso húmedo de cada erizo usando una balanza digital a una precisión de 0.001 g. Se realizó la disección de los organismos y se hizo una descripción macroscópica de las gónadas, tomando en cuenta características tales como color, textura, posición, forma y tamaño. Se extrajeron las gónadas y se estimó el peso húmedo con la misma balanza digital. Se calculó el volumen de la gónada mediante la técnica de desplazamiento de fluido y la variación del balance hidrostático modificado de Mohr-Westphal (Scherle 1970).

### **Proceso Histológico**

Las gónadas obtenidas se fijaron en una solución de Bouin durante 72 horas y se preservaron en alcohol al 70% (Humason 1962, Muñeton-Gómez *et al.* 2000). Posteriormente el tejido se colocó en alcohol etílico a diferentes concentraciones para su posterior inclusión en parafina, utilizando la técnica de inclusión de rutina para Histokinette de Muñeton-Gómez *et al.* (2000).

Inmediatamente después del último cambio en parafina fundida, el tejido se incluyó en recipientes de inclusión para formar bloques, los cuales se cortaron con la ayuda de un micrótopo semiautomático a un grosor de 7-8  $\mu\text{m}$ , obteniendo secciones a cada 150  $\mu\text{m}$  para obtener al menos tres laminillas de cada gónada.

Los cortes obtenidos se colocaron en un baño de flotación a una temperatura de 40 a 50 °C para que se extendieran y posteriormente se recuperaron con portaobjetos que se dejaron secar a temperatura ambiente. Las laminillas obtenidas se colocaron en una estufa a 60°C durante 12 h con la finalidad que los cortes se adhirieran mejor al cristal.

La tinción de las laminillas se llevó a cabo mediante la técnica de tinción de Hematoxilina-Eosina y finalmente se realizó el montaje permanente usando resina sintética (Muñeton-Gómez *et al.* 2000).

### Descripción histológica de la gónada

Las fases o estadios de desarrollo gonádico se identificaron con base en las características celulares distintivas del núcleo, citoplasma, pared del epitelio folicular y germinal, de acuerdo con los criterios propuesto por (Pérez *et al.* 2010). El ciclo reproductivo se definió con base en la proporción de individuos que se encuentran mensualmente en cada una de las fases de desarrollo gonádico. Según Pérez *et al.* (2010) se consideraron seis estadios de desarrollo gonadal para ambos sexos: 1) Inmaduro, 2) Crecimiento, 3) Pre-madurez I, 4) Pre-madurez II, 5) Madurez y 6) Desovado.

Posteriormente se calculó la frecuencia relativa de individuos en cada etapa reproductiva, para cada mes de muestreo. Finalmente se analizó el ciclo reproductivo de hembras, machos y total de la población a través de gráficas de frecuencia relativa.

### Análisis de Imágenes

Una vez identificados los tipos celulares en la gónada, en cada hembra se midieron al menos 100 ovocitos seccionados a través del núcleo (diámetro Feret) usando el software de análisis de imágenes Image J. Con los datos obtenidos se elaboraron diagramas de frecuencias de talla de ovocitos y se compararon con los resultados obtenidos por el IG. Las estimaciones de los diámetros de los ovocitos se utilizaron en el cálculo de su volumen, con base en lo descrito por (Ramirez Llodra 2002).

### **Calculo de Índices**

#### **Índice Gonadosomático**

Una vez obtenido el peso de la gónada y el peso del organismo se calculó el índice gonadosomático, utilizando la siguiente ecuación (Lawrence *et al.* 1965):

$$IGS = \left( \frac{P_g}{P_t} \right) \times 100$$

Donde:

IGS= Índice gonadosomático

Pg= Peso de la gónada

Pt= Peso total del organismo.

### **Índice de Madurez**

Con los datos de estadios por individuos por mes se calculó en Índice de Madurez con la siguiente fórmula (Spirlet *et al.* 1998).

$$IM = \frac{\sum(ni*si)}{N}$$

Donde:

ni: Número de organismos en cada estadio

si: Valor asignado al estadio

N: Total de organismos recolectados en el mes

### ***Calculo de la fecundidad***

La fecundidad real (número de ovocitos vitelogénicos próximos al máximo desarrollo) se estimó de acuerdo al método propuesto por (Ramirez Llodra 2002), El cual consiste en relacionar el volumen medio de los ovocitos y el de la gónada para cada hembra.

El volumen de los ovocitos (VO) se calculó asumiendo que poseen una forma esférica:

$$VO = \left[ \frac{(4 \times \pi \times R^3)}{3} \right]$$

Donde:

VO= volumen medio de los ovocitos.

R= Radio medio de los ovocitos (calculado a partir del diámetro Feret).

Se calculó la proporción (P) entre ovocitos pre y vitelogénicos, utilizando los datos obtenidos del conteo de 100 ovocitos por hembra:

$$P = \frac{N_{pvo}}{N_{vo}}$$

Donde:

P= Relación entre ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos.

$N_{pvo}$ = Número de ovocitos previtelogénicos contados en una muestra de 100 ovocitos por gónada.

$N_{vo}$ = Número de ovocitos vitelogénicos contados en una muestra de 100 ovocitos por gónada.

Considerando que P medido en una muestra de la gónada (100 ovocitos) es el mismo que P en la gónada completa, entonces:

$$P = \frac{N_{pvo}}{N_{vo}} = \frac{F_{pvo}}{F_{vo}} \therefore F_{pvo} = P \times F_{vo} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

$F_{pvo}$ = Número total de ovocitos.

$F_{vo}$ = Número total de ovocitos vitelogénicos.

Dado que el volumen de la gónada es equivalente al número de ovocitos multiplicado por su volumen, entonces:

$$V_g = (V_{vo} \times F_{vo}) + (V_{pvo} \times F_{pvo}) \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

$V_g$ = Volumen de la gónada.

$V_{vo}$ = Volumen de ovocitos vitelogénicos.

$V_{pvo}$ = Volumen de ovocitos previtelogénicos.

Reemplazando  $F_{pvo}$  de la ecuación 2 en la ecuación 1, se obtiene:

$$V_g = (V_{vo} \times F_{vo}) + (V_{pvo} \times (P \times F_{pvo}))$$

$$V_g = F_{vo} \times (V_{vo} + (V_{pvo} \times P))$$

Acomodando lo factores, se obtiene el número total de ovocitos vitelogénicos (fecundidad real)

$$F_{vo} = \frac{V_g}{V_{vo} + (V_{pvo} \times P)}$$

### **Análisis estadísticos**

La proporción entre hembras y machos se calculó mensualmente y anualmente, la desviación de la proporción esperada de 1:1 se evaluó con la prueba Chi cuadrada ( $X^2$ ), utilizando la corrección de continuidad de Yates (v2c), debido a los grados de libertad =1 en el cálculo mensual (Yates 1934, Zar 2010). Se

realizó una prueba t (Mann-Whitney) para detectar diferencias de los valores del índice gonadosomático (IGS) entre hembras y machos.

Dado que los datos del GSI y fecundidad no cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad (pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente), se realizó un análisis de varianza por rango de Kruskal-Wallis de una vía para identificar diferencias significativas en los valores totales de la población (hembras y machos) del IGS entre meses. De igual manera, para evidenciar la existencia de diferencias significativas entre los valores de la fecundidad mensual se realizó otro ANOVA por rangos (Kruskal-Wallis) de una vía y una comparación múltiple por pares con el método de Dunn. Para determinar si hubo diferencias significativas entre los valores del índice de madurez (IM) entre hembras y machos, se aplicó una prueba t-Student. Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa SigmaStat 10.0 (Systat Software, Inc.2006).

La relación entre el IGS, IM y la fecundidad con las variables ambientales (TSM, Fp, Cha a y PPN) se evaluó mediante una Regresión Lineal Múltiple (RLM) paso a paso con el programa Statistica, ver. 7.0 (StatSoft Inc. 2004). La significancia estadística se aceptó con un valor de  $p < 0,05$  para todas las pruebas.

## Resultados

Se examinaron un total de 283 erizos con una talla promedio de diámetro de testa de  $47.1 \pm 6.0$  mm, alto de testa de  $26.0 \pm 4.1$  mm y un peso húmedo promedio de  $62.7 \pm 19.4$  g. Los valores de diámetro de la testa, así como el peso húmedo tanto de hembras como machos en cada mes de muestreo se resumen en la tabla II.

Tabla II.- Valores medios y desviación estándar del diámetro de la testa y peso húmedo de machos y hembras en cada mes de muestreo en Punta Banda.

Machos				Hembras		
Meses	N	Diámetro (mm)	Peso (g)	N	Diámetro (mm)	Peso (g)
nov-13	12	$47.7 \pm 3.0$	$67.5 \pm 12$	9	$45.9 \pm 3.0$	$58.9 \pm 14.4$
dic-13	14	$43.0 \pm 4.3$	$47.9 \pm 9.7$	8	$42.7 \pm 3.4$	$47.5 \pm 6.4$
ene-14	11	$50.6 \pm 2.2$	$74.7 \pm 7.5$	13	$49.6 \pm 2.4$	$73.1 \pm 19.4$
feb-14	12	$38.6 \pm 4.2$	$34.7 \pm 6.4$	12	$37.4 \pm 4.8$	$33.3 \pm 11.4$
mar-14	12	$51.5 \pm 3.1$	$77.8 \pm 9.4$	11	$48.1 \pm 4.1$	$65.7 \pm 14.3$
abr-14	6	$46.3 \pm 4.9$	$59.4 \pm 15.9$	18	$47.4 \pm 4.0$	$63.9 \pm 15.3$
may-14	11	$52.3 \pm 3.2$	$79.0 \pm 11.8$	12	$45.4 \pm 11.9$	$67.3 \pm 27.7$
jun-14	11	$50.3 \pm 3.1$	$73.9 \pm 11.6$	10	$49.8 \pm 2.3$	$69.6 \pm 13.2$
jul-14	12	$44.1 \pm 4.4$	$53.2 \pm 17.5$	12	$45.5 \pm 5.6$	$55.9 \pm 18.0$
ago-14	11	$49.7 \pm 5.2$	$69.8 \pm 17.5$	12	$46.2 \pm 3.8$	$55.3 \pm 10.3$
sep-14	12	$49.2 \pm 5.7$	$68.0 \pm 21.1$	10	$45.8 \pm 3.9$	$68.3 \pm 13.2$
oct-14	11	$49.5 \pm 3.2$	$67.6 \pm 10.4$	12	$49.1 \pm 3.2$	$65.5 \pm 13.7$

## Proporción de sexos

*Arbacia stellata* es una especie gonocórica en Punta Bandaya que no se presentó ni un individuo hermafrodita en los organismos muestreados. Del total de organismos 143 fueron hembras y 140 fueron machos. En la mayoría de los meses la proporción de sexos fue de 1:1, excepto en el mes de abril 2014 (Tabla III) y la proporción de sexos anual (macho / hembra) fue de 0.96:1, la cual no difiere significativamente de 1:1 ( $X^2 = 10.60$ ,  $gf = 11$ ,  $\alpha = 0.05$ ).

Tabla III.- Proporción de sexos de *Arbacia stellata* durante el periodo de noviembre 2013 a octubre del 2014 en Punta Banda.

<b>Meses</b>	<b><math>\chi^2</math> Calculada</b>	<b><math>\chi^2</math> tablas</b>	<b>Proporción</b>	<b>gl</b>	<b><math>\alpha</math></b>	<b>N</b>
nov-13	1.14	3.84	1:1	1	0.05	22
dic-13	3.38	3.84	1:1	1	0.05	24
ene-14	0.16	3.84	1:1	1	0.05	25
feb-14	0.15	3.84	1:1	1	0.05	27
mar-14	0.04	3.84	1:1	1	0.05	24
abr-14	5.04	3.84	1:3	1	0.05	24
may-14	0.05	3.84	1:1	1	0.05	22
jun-14	0.17	3.84	1:1	1	0.05	23
jul-14	0.04	3.84	1:1	1	0.05	24
ago-14	0.00	3.84	1:1	1	0.05	23
sep-14	0.05	3.84	1:1	1	0.05	23
oct-14	0.70	3.84	1:1	1	0.05	23

### **Morfología de las gónadas**

Las gónadas de *A. stellata* tienen forma de sacos irregulares con posición más cargada hacia la región aboral. El color de las gónadas de las hembras varió de amarillo blanquecino en hembras inmaduras a rojo marrón en las hembras maduras. En machos la coloración generalmente es amarillo lechoso en todos los estadios de maduración.

### **Estadios del desarrollo gonadal**

En hembras el estadio de Inmaduro se caracteriza porque el lumen de la gónada está ocupado por una red de fagocitos nutritivos de color pálido, con vesículas grandes de color oscuro en el citoplasma. También se observan pocos ovocitos previtelogénicos con citoplasma basófilo pegados a la pared de la gónada (Fig.2a). El estadio de Crecimiento es el comienzo de la vitelogénesis, caracterizado por la presencia de ovocitos vitelogénicos primarios, pegados a la pared del acino. El citoplasma de estos ovocitos se tiñe de morado pálido mostrando una disminución en la acidofilia. Distribuidos en el centro del lumen



de la gónada se observan fagocitos nutritivos conteniendo vacuolas vacías o con material granular (Fig.2b).

En el estadio de Pre-madurez I el número y tamaño de los ovocitos vitelogénicos incrementa, asociado con una marcada reducción en la abundancia de los fagocitos nutritivos y material glicoproteíco. La gónada contiene ovocitos en todos los estados de desarrollo pero el número de ovocitos maduros es muy bajo. El citoplasma de los ovocitos vitelogenicos es acidófilo, con forma de pera y es proyectado hacia el lumen (Fig.2c). En el estadio de Pre-madurez II se observó un incremento en el número y la talla de los ovocitos que conservaban las características de coloración. Un pequeño número de óvulos maduros con un citoplasma finamente granular y sin núcleo visible son encontrados en el centro del lumen de la gónada (Fig.2d).

En el estadio de Madurez el folículo contiene numerosos óvulos maduros, densamente empaquetados en el lumen, un pequeño número de fagocitos nutritivos y ovocitos primarios son localizados a los largo de la pared del folículo (Fig.2e). Finalmente, el estadio de Desovado se caracterizó porque el ovario contiene solo un número pequeño de óvulos restantes. La pared del folículo es gruesa, hay un incremento en el número de fagocitos nutritivos y un pequeño número de ovocitos primarios (Fig.2f).

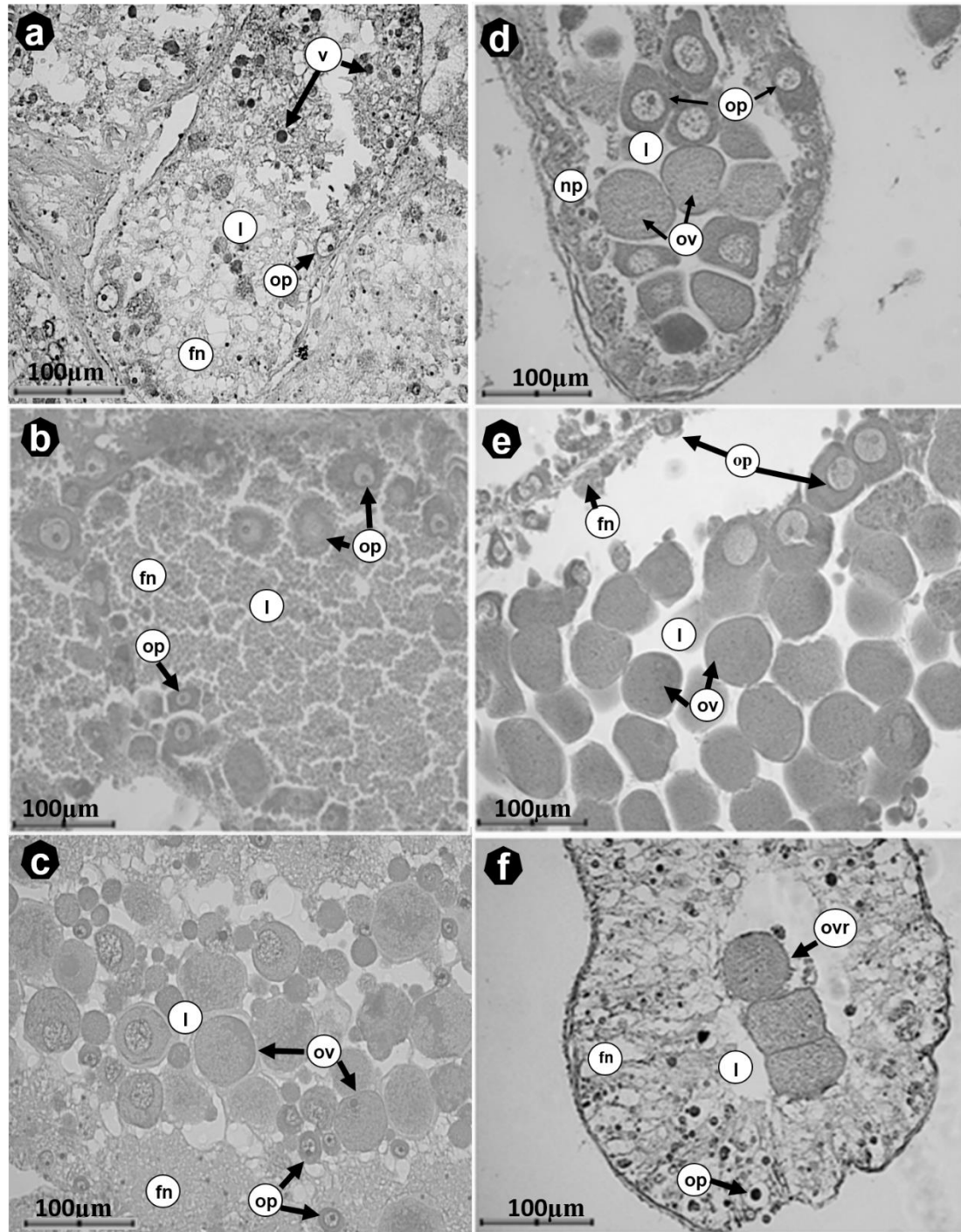


Figura 2.- Microfotografías de estadios gonadales de hembras de *A. stellata*: a) Inmaduro, b) Crecimiento, c) Premadurez I, d) Premadurez II, e) Madurez f) Desovado. fn= fagocito nutritivo, l= lumen, v= vesícula, op= ovocito previtelogénico, ov= ovocito vitelogénico, ovr= ovocito vitelogénico residual.

En el caso de los machos el estadio de Inmaduro se caracteriza por que el lumen de la gónada es dominado por una ligera red de fagocitos nutritivos de color pálido conteniendo pequeños gránulos oscuros y vesículas, Hay algunas espermatogonias pegadas a la pared de la gónada (Fig.3a). En el estadio de Crecimiento, una capa de espermatogonias y espermatocitos primarios se localizan a lo largo de la pared de la gónada y se observan columnas de espermatocitos casi regulares proyectados al centro de cada folículo. Fagocitos nutritivos remanente dominan el centro del lumen, aunque la cantidad de material nutritivo ha disminuido (Fig.3b).

En el estadio de Pre-madurez conspicuas columnas de espermatocitos son proyectadas hacia el lumen. Los espermatozoos comienzan a acumularse en el centro de la gónada. El número de fagocitos nutritivos decrece y son desplazados desde el centro hacia la periferia (Fig.3c). El estadio Pre-madurez II tiene una estructura similar al Pre-maduro I, pero la gónada contiene un número más abundante de espermatozoos libres en el centro del lumen. Las columnas de espermatocitos se mantienen constante (Fig.3d).

En el estadio de Madurez, la gónada está llena con espermatocitos densamente empaquetados. La capa espermatogénica llega a adelgazarse o desaparecer, decreciendo en espesor. Hay fagocitos nutritivos localizados hacia la periferia de la gónada, a lo largo del epitelio germinal (Fig.3e). En el estadio de Desovado el lumen de la gónada está casi vacío aunque pequeñas agrupaciones de espermatozoides y fagocitos nutritivos son encontrados, así mismo, la pared de la gónada es muy pequeña (Fig.3f).

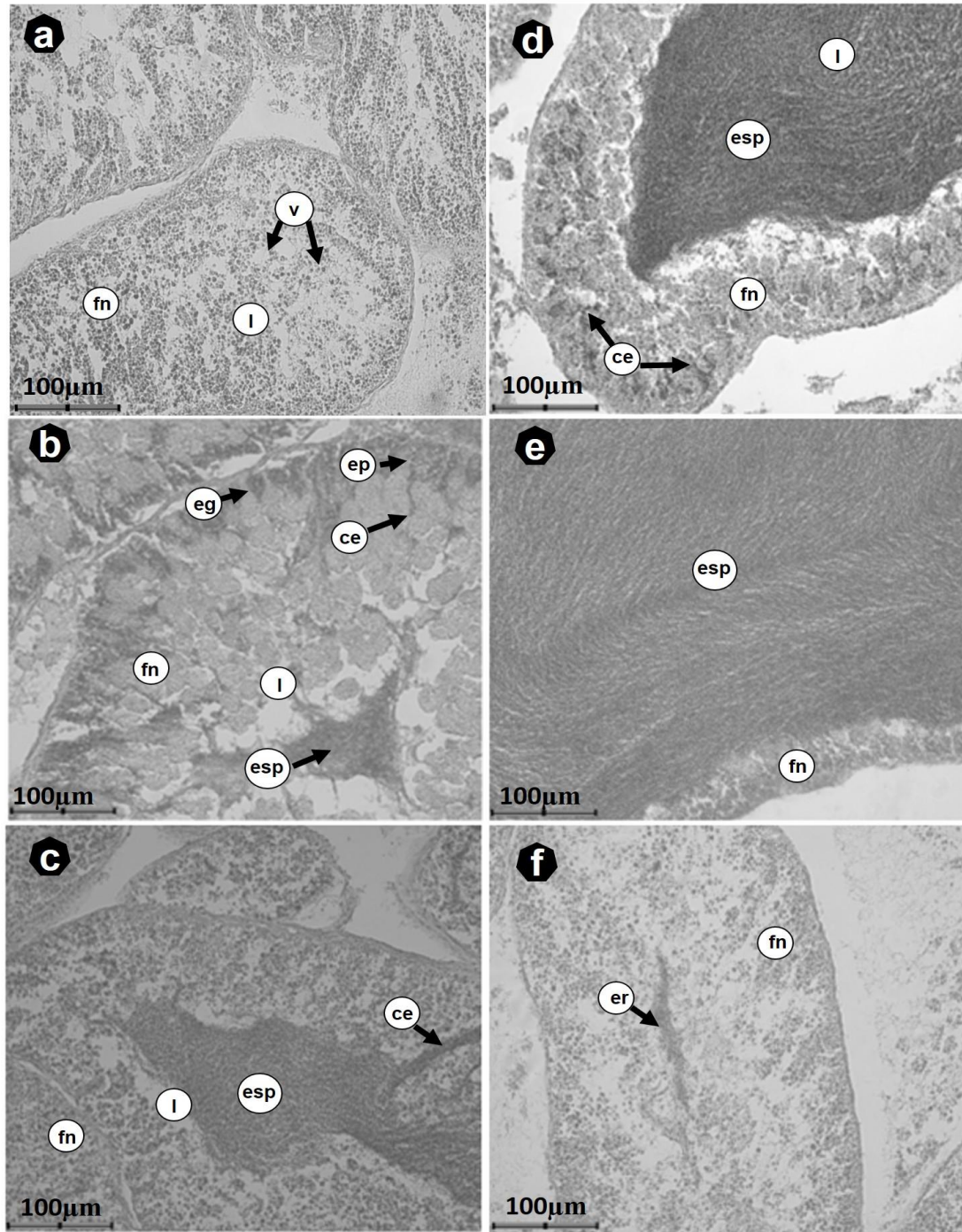


Figura 3.- Microfotografías de estadios gonadales de machos de *A. stellata*: a) Inmaduro, b) Crecimiento, c) Premadurez I, d) Premadurez II, e) Madurez f) Desovado. fn= fagocito nutritivo, l= lumen, v= vesícula, esp= espermatozoides, ce= columna de espermatozoides, ep= espermatozoide primario, eg= espermatoгония, er= espermatozoide residual.

## Índice Gonadosomático

Las oscilaciones mensuales del IGS de hembras y machos fueron similares durante el periodo de estudio. El promedio anual para hembras fue  $5.6 \pm 2.6$  y  $6.7 \pm 2.2$  para machos, lo cual no fue significativamente diferente ( $t = 21014.000$ ,  $p = 0.100$ ). Sin embargo, las variaciones mensuales sí fueron significativamente diferentes ( $H = 143.406$ ,  $gl = 11$ ,  $P < 0.001$ ). El mes en el que se observó el valor máximo ( $10.0 \pm 3.5$ ) fue abril 2014 y el valor más bajo ( $1.7 \pm 0.8$ ) ocurrió en diciembre 2013. Así mismo, se observó que el intervalo de variación de IGS en cada mes fue relativamente amplio (Fig.4).

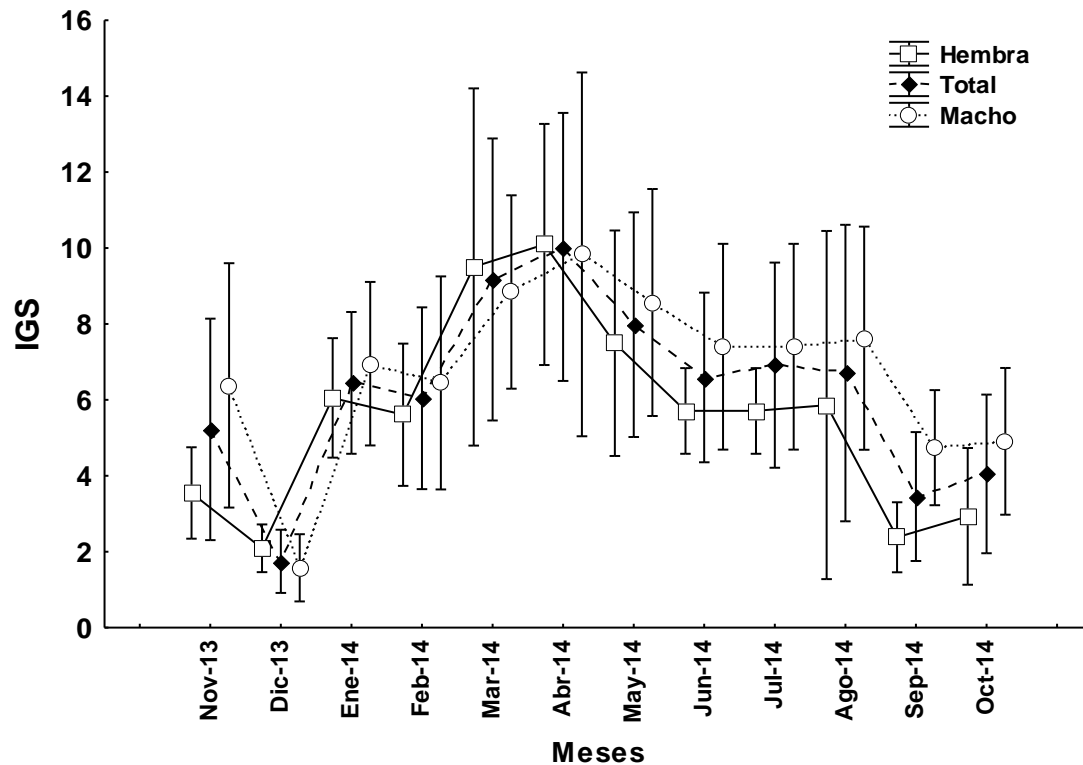


Figura.4. Comparación de la variación mensual (media  $\pm$  DE) del índice gonadosomático de hembras, machos y de la población total de *Arbacia stellata* en Punta Banda B.C México.

## Índice de Madurez (IM)

El comportamiento del IM durante los meses de muestreo fue similar tanto en hembras como en machos, A pesar de que en diciembre 2013 se observa que el

IM de hembras y machos tiene un comportamiento inverso, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre sexos ( $t = -0.656$  gl= 22,  $P = 0.518$ ) (Fig.5).

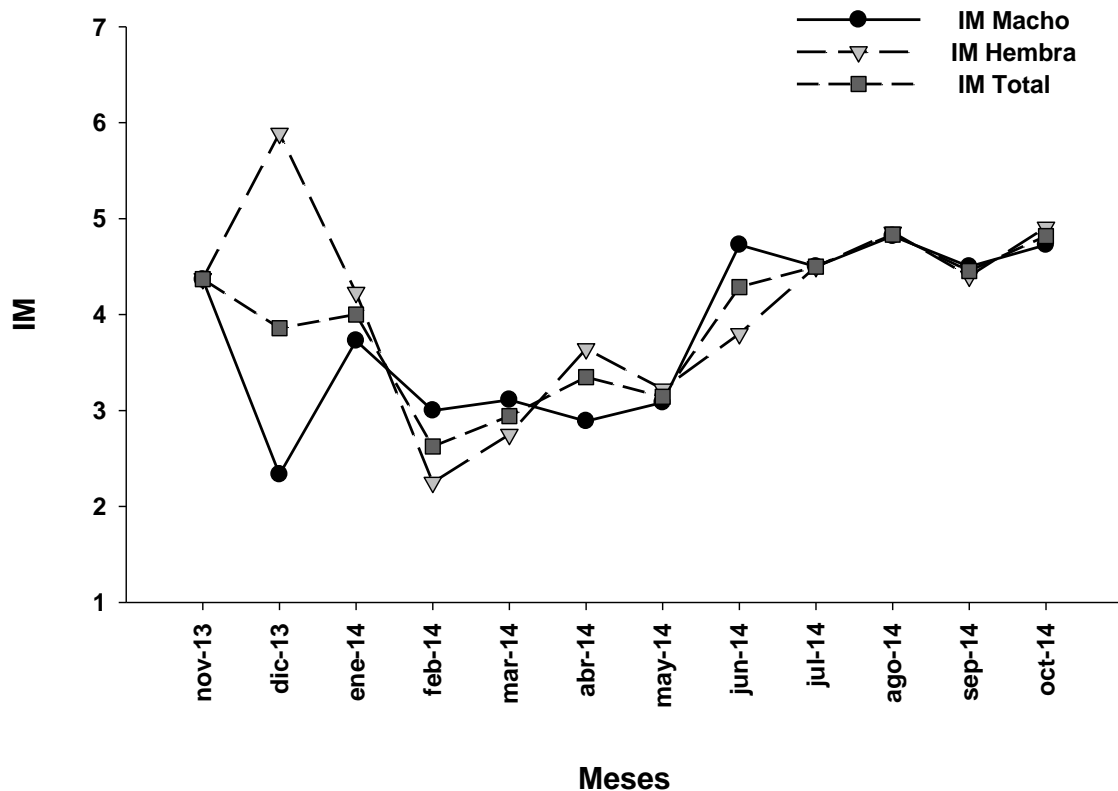


Figura 5. Comparación del comportamiento del Índice de Madurez de hembras, machos y del promedio total para la población.

EL IGS y el IM no mostraron el mismo comportamiento. En los meses que se presentaron los valores más altos del IGS (marzo a mayo del 2014), se observaron los valores más bajos del IM. Así mismo, los meses que presentaron los valores más altos del IM (noviembre, diciembre y enero del 2013 y de julio a octubre del 2014) fueron los meses en los que el IGS presenta valores bajos.

### Ciclo gametogénico

El ciclo gametogénico de *A. stellata* es semi-continuo. Se observó una alta asincronía entre individuos, y dentro de la gónada en cualquiera de los meses

estudiados, tanto en hembras como en machos, se observaron varios estadios gonadales presentes en los individuos muestreados e inclusive en la misma gónada de cada individuo.

En las hembras, el mes en el que se observó una mayor proporción de organismos desovados (88.9%) fue diciembre. Posteriormente, los estadios de Inmaduro y crecimiento comienzan a aparecer, siendo febrero el más representado por estos estadios (25 y 41.7% respectivamente). Marzo y mayo del 2014 están mayormente representados por el estadio de Premadurez I (62% y 41% respectivamente). A partir de junio 2014 los estadios de Premadurez II y Madurez comienzan a ser más representativos, siendo agosto mayormente representado por el estadio de Madurez (85.7 %) y septiembre 2014 el estadio de Desovado comienza a aparecer (Fig.6a).

En machos, el estadio de Madurez está presente en la mayoría de los meses de muestreo, con excepción de abril y mayo y mayormente representado de junio a octubre, siendo agosto el de mayor incidencia de este estadio (82%). El estadio de desove se observó en diferentes meses del ciclo de muestreo (noviembre 2013, enero, febrero, junio, septiembre y octubre del 2013). El estadio de pre-madurez I también estuvo presente en la mayoría de los meses de muestreo, con excepción de enero 2013 y agosto 2014 y el estadio de pre-madurez II se observó durante todos meses de muestreo sin excepción. El estadio de inmaduro estuvo presente de diciembre a febrero, con una mayor incidencia en diciembre (33%). El estadio de crecimiento comienza a ser evidente de diciembre 2013 a mayo 2014 mayormente representado en abril (44%) (Fig.6b).



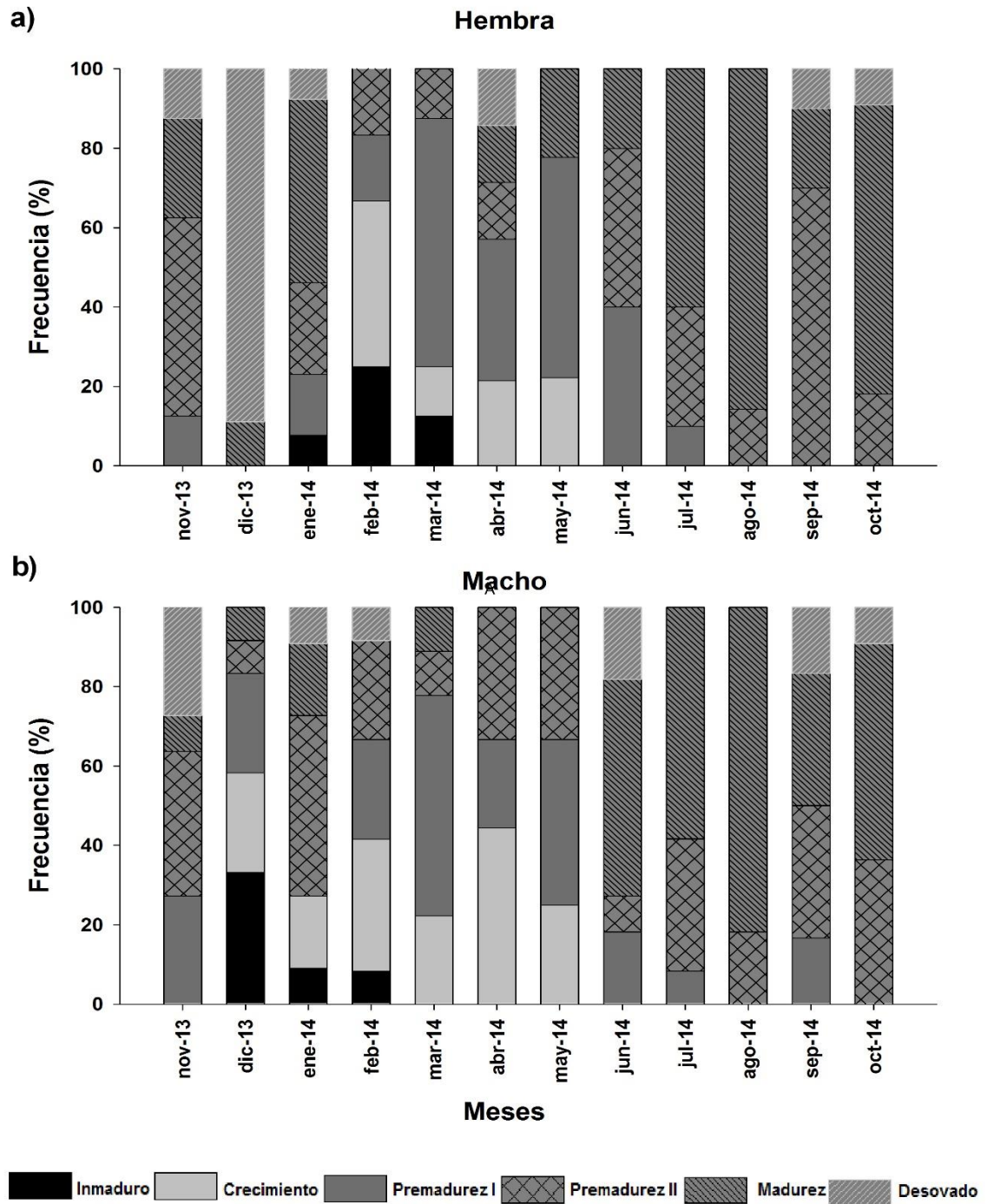


Figura 6.- Ciclo gametogénico anual de los hembras (a) y machos (b) de *Arbacia stellata* mostrando las abundancias relativas de los diferentes estadios de desarrollo de la gónada en Punta Banda B.C, México.



### **Estructura de tallas de los ovocitos**

A lo largo del estudio se observó que en las hembras hay una producción continua de ovocitos previtelogenicos y vitelogenicos. La talla más frecuente está representada por el intervalo de 80  $\mu\text{m}$  y en todos los meses dicha talla coincide con el diámetro promedio de los ovocitos vitelogénicos ( $85.9 \pm 9.3 \mu\text{m}$ ). La segunda talla más frecuente es 60  $\mu\text{m}$ , la cual corresponde al diámetro promedio de los ovocitos previtelogénicos ( $54.0 \pm 8.5 \mu\text{m}$ ). Esto también se observó en diciembre 2013 y enero 2014, cuando la cantidad de gametos en las gónadas fue baja. La talla máxima de los ovocitos vitelogénicos que esta especie alcanza en el área de muestreo es de  $102.6 \pm 9.8 \mu\text{m}$  (Fig.7).

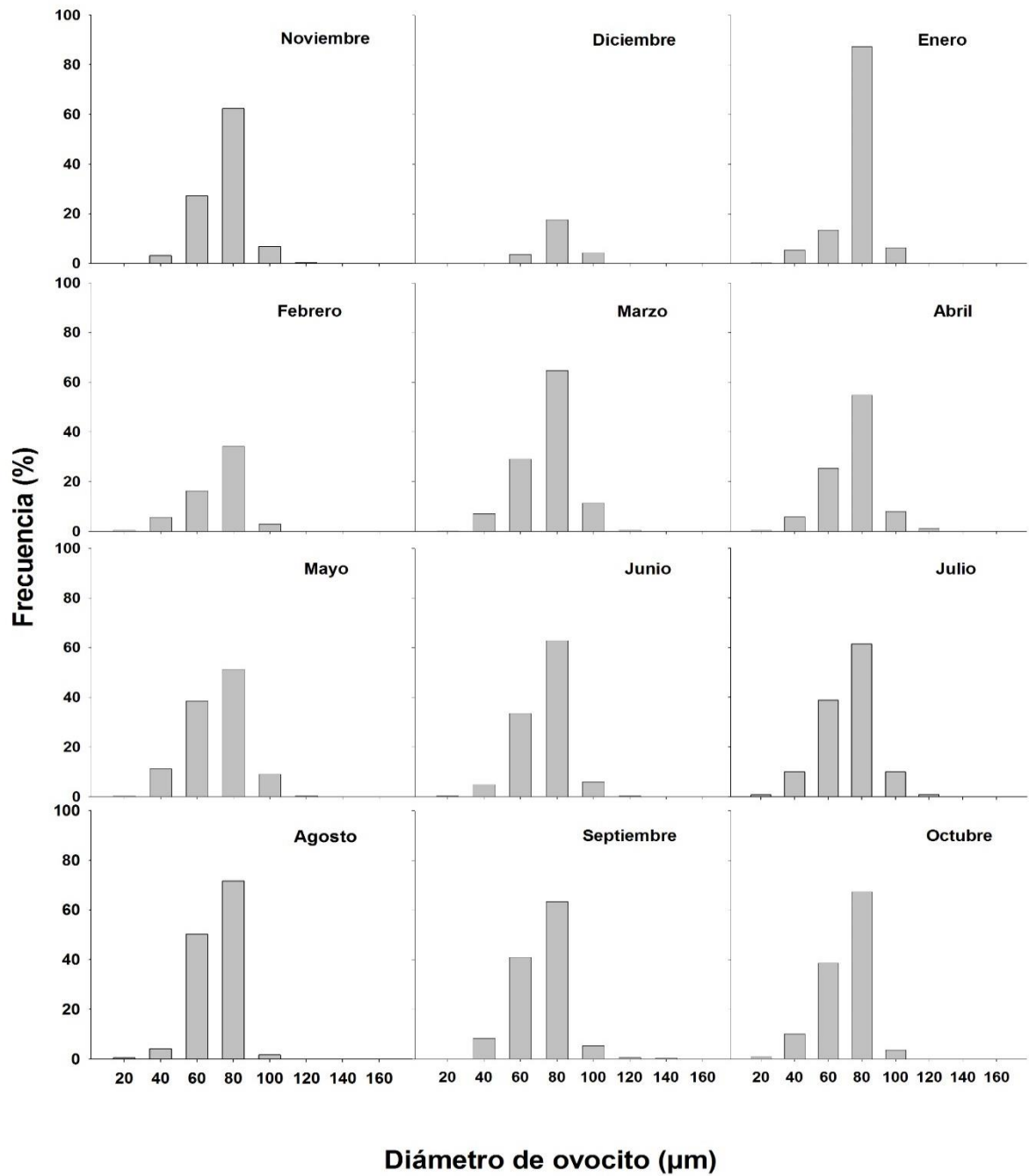


Figura 7.- Distribución de frecuencia del diámetro de los ovocitos de *Arbacia stellata* (noviembre 2013-Octubre 2015) en Punta Banda B.C México.

## Fecundidad

La fecundidad media de *A. stellata* se estimó en  $1.704.498.507 \pm 943.039.1002$  ovocitos vitelogénico por hembra. Estadísticamente se observaron diferencias significativas entre los meses ( $H = 45.445$ , gl 11  $P = <0.001$ ). Los meses que mostraron diferencias significativas fueron abril con noviembre y diciembre del 2013 y con septiembre y octubre del 2014. Así mismo enero de 2014 con diciembre 2013 y septiembre 2014 mostraron diferencias significativas. Cabe mencionar que la amplitud de los valores de fecundidad en un mismo mes es relativamente amplia (Fig.8).

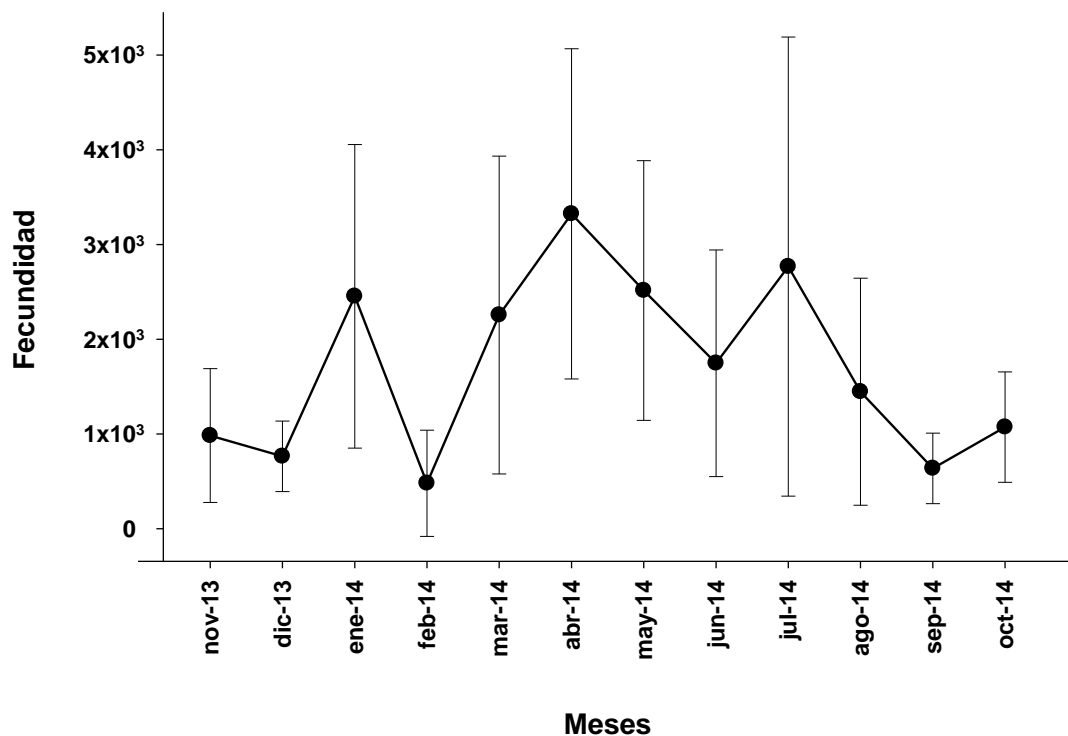


Figura 8.- Variación mensual de los valores de fecundidad (media  $\pm$  DE) de *Arbacia stellata* en Punta Banda BC, México.

## Parámetros ambientales

Los valores mínimos de la TSM se presentaron de noviembre a febrero, con el valor más bajo en diciembre (15°C). A partir de marzo comienza a

incrementarse para alcanzar el valor máximo en julio (23°C) y a partir de agosto comienza a descender de nuevo (22°C). Los valores máximos de horas luz se alcanzan de mayo a junio (11.59-14.11 horas luz) y a partir de agosto comienza un descenso, observándose los valores mínimos de noviembre a enero (10.32-10.20 horas luz), con el valor más bajo en diciembre (10.06 horas luz) (Fig.9a). El valor promedio mensual de la  $Cha_a$ , comienza a incrementarse a partir de marzo ( $1.69 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) y tiene su valor máximo en abril ( $3.57 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ), y decae progresivamente en los meses subsecuentes hasta alcanzar su valor mínimo en septiembre ( $0.69 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ). La PPN comienza a incrementarse a partir de mayo ( $1233 \text{ mgCm}^2\text{d}^{-1}$ ) para alcanzar su valor máximo en junio ( $2152 \text{ mgCm}^2\text{d}^{-1}$ ) y comienza a decaer en agosto con su valor mínimo en febrero ( $715 \text{ mgCm}^2\text{d}^{-1}$ ) (Fig.9b).

El análisis de regresión lineal múltiple del IGS con los parámetros ambientales se resolvió en un paso ( $\text{IGS} = 3.363 + (1.833 * Cha_a)$ ) e indicó que la variación total explicada sobre el IGS en término de la variable seleccionada ( $Cha_a$ ) fue de 50%, con un valor de correlación múltiple de 0.70 y un nivel de  $p < 0.05$ . En el caso del IM, el modelo de RLM se resolvió en dos pasos ( $\text{MI} = 1.574 + (0.154 * \text{TMS}) - (0.367 * Cha_a)$ ). La variación total explicada por las variables seleccionadas fue de 53%, con un valor de correlación múltiple de 73 % y un nivel de  $p < 0.05$ . Para la fecundidad el análisis de RLM también se resolvió en dos pasos:  $\text{Fecundidad} = -1422366.292 + (777496.760 * Cha_a) + (102199.394 * \text{TMS})$ . La variación total explicada por las variables seleccionadas fue de 55 %, con un valor de correlación múltiple de 0.74 y un nivel de  $p < 0.05$ .

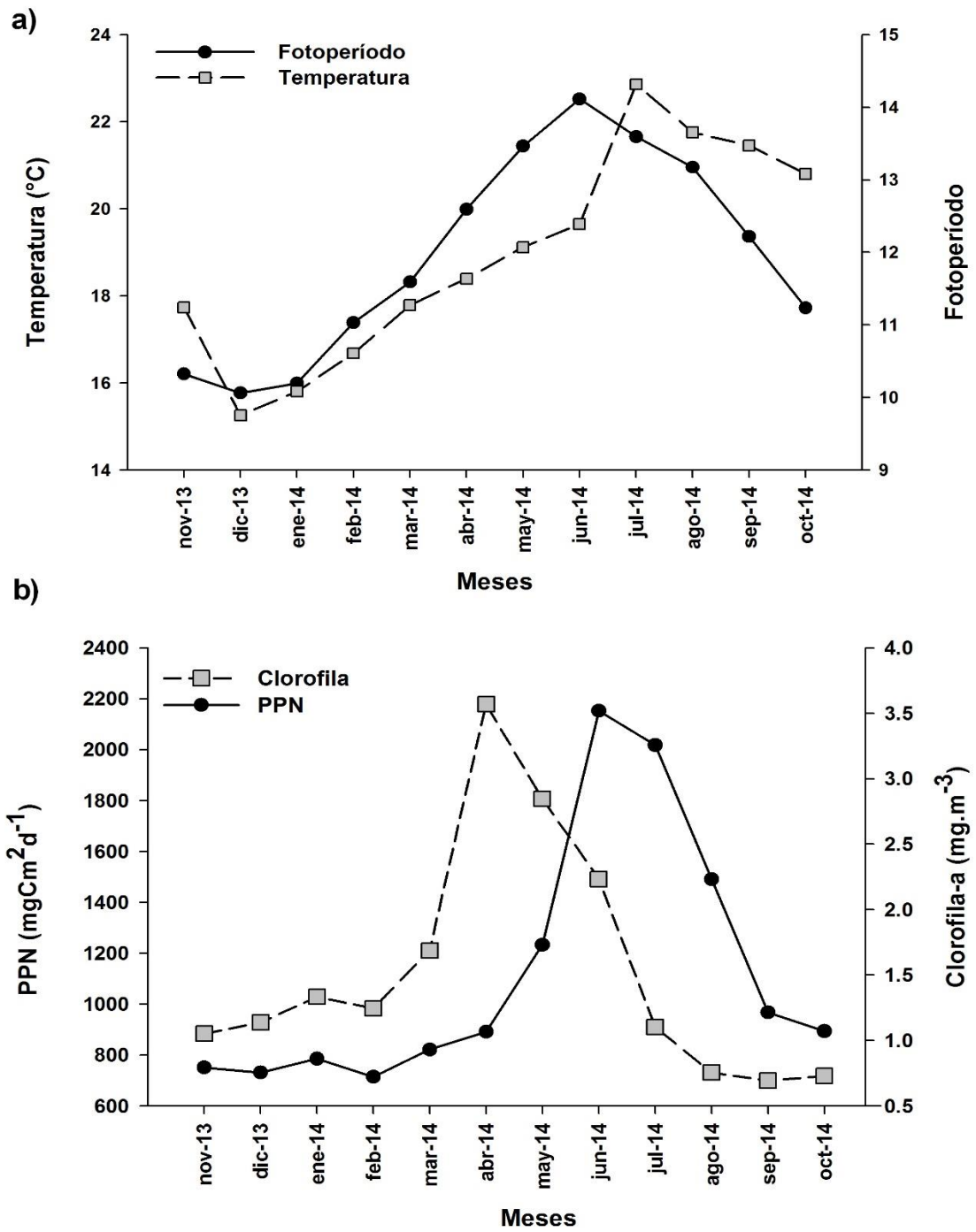


Figura 9. Variación anual de los valores medios de A) fotoperiodo y temperatura B) Cha a y Producción Primaria Neta en Punta Banda BC, México.

## Discusión

El valor mínimo del IGS en la población de *A. stellata* en Punta Banda se observó en diciembre 2013 para ambos sexos, Este se recupera significativamente rápido en los meses subsecuentes, cuando se observan la mayor proporción de organismos inmaduros y en etapa de crecimiento (diciembre 2013 a abril 2014 para machos y de enero 2013 a abril 2014 para hembras). Tradicionalmente el IGS ha sido usado para evaluar la reproducción en equinodermos, sin embargo, este índice no es suficiente para describir el ciclo reproductivo de los equinoideos. Se ha determinado que el aumento de tamaño de las gónadas no sólo corresponde al aumento de tamaño y número de gametos, sino también a las células somáticas en el epitelio germinal, a los fagocitos, o incluso al almacenamiento de nutrientes para el inicio de la gametogénesis (Walker y Lesser 1998, Harrington *et al.* 2007). Para *A. stellata*, los valores altos del IGS no solo reflejaron la abundancia de gametos, sino también el incremento de nutrientes en organismos inmaduros y células germinales en ciertas porciones de la gónada de los organismos en crecimiento. Según el análisis de RLM, el IGS tiene una relación positiva con la clorofila *a*, por lo que el aumento de su valor al inicio del año y su valor máximo en abril (en primavera) podrían indicar una asimilación de nutrientes durante la primavera, cuando ocurren los máximos de clorofila *a* y la época de surgencias cerca de la localidad de Punta Banda, reflejándose en el engrosamiento de la gónada más que en la proliferación de gametos.

Las variaciones mensuales amplias del IGS pueden indicar una variabilidad intra-poblacional en el desarrollo de la gónada. Este comportamiento se observó tanto en las hembras como en los machos, por lo que se podría hablar de una sincronía entre sexos, lo cual se confirmó con el análisis de varianza de este índice, en el que no se detectaron diferencias significativas entre hembras y machos.

El IM, presenta una correlación positiva con la temperatura y una correlación negativa con la Cha *a*. Sus valores comienzan a incrementarse al inicio del

verano con las temperaturas altas, disminución de la Cha a y el pico de la PPN, alcanzando su máximo en el otoño, (cuando la temperatura comienza a descender) y se mantiene hasta el principio del invierno. El IM en las hembras presentó su valor máximo en diciembre 2013, con un gran porcentaje de organismos en etapa de desove. Esto indica que diciembre es el mes con la mayor actividad reproductiva para las hembras, a pesar de ser el mes más frío del periodo de estudio (15° C). Esto no ocurrió en la primavera y verano cuando la temperatura del agua comienza a incrementarse y los valores de la Cha a y de la PPN alcanzan sus máximos. Esta condición también se reportó para la galleta de mar *Dendraster excentricus*, en la que la principal época de maduración de gametos aparentemente ocurre durante el invierno (diciembre–febrero), a temperaturas cercanas a las más bajas registradas en el estero de Punta Banda (14–18° C) (Olivares-Bañuelos *et al.* 2012).

Así mismo, en la fecundidad, aún con las variaciones amplias en los valores a lo largo del año, se pueden observar tres pico importantes: El primer pico en enero 2014, coincide con uno de los valores más bajos de temperatura, el segundo en abril 2014, coincide con el pico de los valores de clorofila a y el tercero en julio 2014 con el valor máximo de la PPN, el máximo de temperatura y el pico máximo del IM.

A pesar de que la secuencia de la ovogénesis en *A. stellata* fue similar a la descrita para otros equinoideos (la ovogénesis comenzó con células germinales primarias que se desarrollaron a través de varias etapas vitelógenas y produjeron óvulos) (Pearse y Cameron 1991), no se observaron estadios discretos de desarrollo en el ciclo de muestreo. Esto es que no se observó sincronía en el desarrollo de la gónada en la población muestreada sino que en cada mes se podían encontrar de 2 a 4 estadios de desarrollo, inclusive en la misma gónada. Así mismo los ovocitos pre-vitelogénicos y vitelogénicos estuvieron presente en casi todos los meses de muestreo, siendo los vitelogénicos los más frecuentes, como lo reportado por (Wangenstein *et al.* 2013) para *A. lixula* en el Mediterráneo.

De manera general, los cambios en el porcentaje de ovocito y óvulos en la distribución de frecuencia de tallas indican la presencia de un ciclo anual en la producción de gametos. Sin embargo, en el caso de *A. stellata* no se pudo detectar claramente ninguna secuencia del crecimiento de los ovocitos a lo largo del año y se observó una predominancia de gametos maduros en la mayoría de los individuos. Este tipo de reproducción se ha observado en otras especies como *Holopneustes purpurascens* (Williamson y Steinberg 2002), *Stylocidaris affinis* (Holland 1967) *Paracentrotus lividus* (Byrne 1990), *Arbacia lixula* (Wangensteen *et al.* 2013) y *Dendraster excentricus* (Olivares-Bañuelos *et al.* 2012). Lo cual contrasta con la mayoría de los erizos que tienen ciclos reproductivos anuales bien definidos, con estadios discretos predecibles de desarrollo celulares (Pearse y Cameron 1991). Por otro lado, aunque el desove fue variable en el tiempo y a pesar de observar organismos maduros en casi todo el año, se pudo registrar una etapa de reposo aunque con muy poca frecuencia al inicio del año, indicando que la producción de gametos requiere solo de un breve periodo de descanso o no se presenta en algunos individuos. Pearse y Phillips (1968), observaron algo similar para *Echinometra mathaei* en Rottnes Island, en la costa occidental de Australia, sugiriendo que probablemente esta etapa sea de corta duración en los individuos o tal vez no ocurre normalmente.

Los equinoideos de zonas templadas exhiben ciclos reproductivos típicamente anuales o semi anuales, y la gametogénesis está influenciada por factores tales como cambios estacionales en el fotoperiodo (Pearse *et al.* 1986b, Bay-schmith y Pearse 1987), temperatura y nutrición (Pearse y Cameron 1991). La población estudiada de *A. stellata* en Punta Banda BC, presenta una producción de gametos semi-continua, con desoves parciales y mayor porcentaje de organismos maduros desde el verano hasta inicio del invierno, coincidiendo con temperaturas bajas del agua de mar y la longitud del día más corta. Exhibe poca actividad reproductiva durante la primavera, contrastando con lo que se esperaría debido a la localización de la población estudiada, la cual se encuentra en una región templada del hemisferio norte. Teóricamente los ciclos



reproductivos tienden a ser más sincronizados con el aumento de la distancia desde el ecuador, y la estacionalidad presumiblemente se hace más pronunciada (Pearse 1969, 1970). Sin embargo, la estacionalidad de la reproducción en los organismos marinos también se sincroniza de forma intra-específica para maximizar la supervivencia de las larvas planctotróficas, exponiéndolas a las condiciones más favorables del año para su desarrollo y crecimiento (Giese y Pearse 1974, Villalobos y García 2012, Benítez-Villalobos *et al.* 2015). Probablemente el hecho de que el desove más intenso de la población de *A. stellata* ocurra a finales del verano, otoño e inicio del invierno sea para evitar las condiciones imperantes durante la primavera cuando las surgencias traen consigo el ascenso de agua enriquecida en CID con valores de 2140  $\mu\text{mol/kg}$  y bajos valores de pH ( $\sim 7.8$ ) (Feely *et al.* 2008, Cervantes Díaz *et al.* 2013). Lo anterior podría afectar negativamente el desarrollo de larvas calcificadoras como es el caso de la larva pluteus de los erizos de mar, a pesar de que en la zona de estudio durante la primavera el fitoplancton es más abundante y favorecería el crecimiento de las larvas.

El IGS muestra una correlación positiva con la  $\text{Chl } a$ , la cual presenta sus valores máximos durante la primavera. Sin embargo no se observó incremento en el IM, sino al contrario, lo cual indica que esta población incrementa los niveles de nutrientes en la gónada para ocuparlos en los meses subsiguientes, asegurando así la gametogénesis y la sincronización de los desoves más intensos con las condiciones de no surgencias, cuando predominan periodos de baja salinidad y condiciones de pH que se mantienen en  $\sim 8$  y concentraciones de CID de  $\sim 2050 \mu\text{mol/kg}$  (Cervantes Díaz *et al.* 2013). Estas condiciones de la química del agua pueden en gran medida favorecer el desarrollo exitoso de los estadios larvales, asegurando así el mantenimiento de la población de *A. stellata* en la región. Por otro lado, la flexibilidad en el patrón de reproducción semi-continuo permite a los individuos que no se reprodujeron en el periodo principal, hacerlo cuando encuentran una señal adecuada. Como consecuencia, los nuevos reclutas pueden entrar a la población a lo largo del periodo más intenso y/o a través de pequeños eventos de reproducción durante el año, sugiriendo

que la gametogénesis puede ocurrir en un periodo corto (pocas semanas) si las condiciones son favorables (Williamson y Steinberg 2002).

En estudios de hábitos alimenticios de las especies *A. punctulata*, *A. lixula*, *A. spatuligera* y *A. dufresnii* se ha establecido que tienden a ser carnívoras (Penchaszadeh y Lawrence 1999, Hill y Lawrence 2003, Silva *et al.* 2004, Cobb y Lawrence 2005, Wangensteen *et al.* 2013). Pearse *et al.* (1991) encontraron que el grado de estacionalidad en la biología de los organismos marinos polares varía con su posición en la red alimentaria. En general, los herbívoros tienen historias de vida altamente estacionales, mientras que los carnívoros y depredadores de nivel superior muestran patrones de reproducción menos estacionales, por lo que el tipo de alimentación predominante en el género *Arbacia* podría ser un factor importante en la poca estacionalidad en la gametogénesis de *A. stellata* quien también posiblemente tenga una tendencia a ser carnívora.

Algunos autores han sugerido que *A. stellata* es un invasor reciente en la región de California, aumentado su presencia y abundancia conforme se ha ido desplazando hacia el norte. Engle y Richards (2001), reportaron la ocurrencia de *A. stellata* en Channel Islands California y concluyeron basándose en el momento de la ocurrencia y tamaño de los erizos, que las larvas de estos individuos fueron traídas probablemente por aguas más calientes durante El Niño 1997- 1998. Así mismo, Burcham y Caruso (2015), proponen que la ausencia de juveniles y la existencia de individuos de tamaño más grande en las poblaciones de *A. stellata* de Laguna Beach, sugieren que los animales son más viejos y posiblemente provienen de eventos previos de reclutamiento, por lo que sus resultados corroboran los hallazgos de Engle y Richards (2001). Estos últimos, sugirieron que *A. stellata* no puede reproducirse con éxito en el sur de California, pero su presencia puede ser el resultado de un evento de reclutamiento propiciado por aguas más cálidas. De acuerdo con el presente estudio se sugiere que esta especie se reproduce continuamente durante casi todo el año, sin embargo, la mayor intensidad se observa durante la época más

fría del año, lo cual contradice la sugerencia de que las larvas de *A. stellata* en el sur de California pudieron reclutarse durante los periodos más cálidos. Sin embargo, es importante considerar que las especies con distribución amplia adecuan aspectos de su historia de vida a las condiciones locales donde se distribuye cada población, por lo que la reproducción y el desarrollo óptimo de las larvas son aspectos importantes para la sobrevivencia de estas poblaciones (Stearns 2000). Según Byrne *et al.* (1998), el patrón exacto de desove para una especie puede variar entre localidades y entre años. Debido a que *Arbacia stellata* tiene una distribución amplia en el Pacífico, las características reproductivas podrían variar debido a las características imperantes en cada localidad.

## CAPÍTULO II

### **Caracterización del desarrollo embrionario y larvario hasta la metamorfosis del erizo *Arbacia stellata***

#### **Introducción**

El desarrollo embrionario de varias especies de equinodermos en general y en particular de los erizos de mar, ha sido documentado ampliamente (Giudice 1973, Hinegardner 1975, Czihak 1996, Ernst 1997, Cameron y Davidson 2006). Algunas características como el desove inducido, la fertilización artificial, el desarrollo coordinado y rápido, así como la claridad óptica de los embriones ha facilitado la caracterización de la embriogénesis (Ghorani *et al.* 2012).

De manera particular la segmentación de los equinoideos, es de tipo holoblástica radial, esto es, que todo el cigoto se divide y los planos de división son perpendiculares unos a otros (Donald y Henley 1971). Las dos primeras divisiones del cigoto y los blastómeros son meridionales, perpendiculares entre sí, lo cual significa que el surco de división se forma desde el polo animal al polo vegetal del cigoto. La tercera división, en cambio, es perpendicular a las dos anteriores, o sea ecuatorial, determinando un embrión de ocho células de idéntico tamaño y partir de este momento, las subsiguientes divisiones originarán blastómeros de diferente tamaño, definiéndose éstos como macrómeros, mesómeros y micrómeros. La disposición de estos blastómeros en relación con los polos del embrión determinará finalmente el destino de dichas células y la posterior formación de las tres hojas embrionarias principales: endodermo, ectodermo y mesodermo (Gilbert 2000).

La etapa de blástula inicia cuando el embrión alcanza 128 células, las cuales forman un hueco o cavidad central conocido como blastocele. Posteriormente, la gastrulación se caracteriza por la ingresión del mesénquima primario (primer estadio de la invaginación del arquenterón), seguido de un segundo y tercer estadio de la invaginación del arquenterón. El último paso de la embriogénesis da lugar a la formación de una larva. Los equinoideos pueden tener dos tipos de larvas, la larva equinopluteus planctotrófica y una larva lecitotrófica, o pueden

tener un mesogeno no larval (McClay 2011, Etensohn 2017).

La larva equinopluteus es característica de los erizos de mar con desarrollo planctotrófico indirecto y ha sido documentada en 8 de los 11 órdenes de equinoideos. Esta larva se alimenta del plancton y tiene una forma corporal bilateral simétrica y prismática con variación en el número de brazos (2 a 13, pero típicamente hasta 8 brazos) y en la talla relativa de estos (Strathmann 1975, 1987, Nunes y Jangoux 2007). Los brazos son extensiones huecas de la pared del cuerpo que contiene un espacio blastocélico, soportados por varillas esqueléticas calcáreas sólidas o fenestradas. Las bandas ciliadas de los brazos trazan también un círculo complejo alrededor del cuerpo, el cual funciona para la alimentación y la locomoción. La posición de los brazos se ubica a ambos lados del cuerpo y proyectados anteriormente, con excepción de algunos casos donde hay a un brazo impar meridional, proyectado posteriormente. En algunas especies, en los estadios larvales tardíos se pueden observar pedicelarios bien desarrollados (Emlet *et al.* 2002).

Los estadios larvarios de los organismos bentónicos marinos, especialmente aquellos con desarrollo planctotrófico indirecto juegan un papel importante como unidades de transporte en la dispersión y conexión de las poblaciones distantes, así como en la colonización de nuevas zonas. Sin embargo el paso final y trascendental ocurre una vez que la larva alcanza el estadio de competencia y adquiere la capacidad de responder a estímulos para metamorfosearse (ver: Hadfield y Paul 2001). En esta etapa la larva presenta un comportamiento de búsqueda y al entrar en contacto con la superficie adecuada, reacciona a las propiedades físicas, químicas y biológicas del sustrato (Pawlik 1992). Aquí es cuando finalmente el juvenil funcional (se alimenta, mueve y permanece conectado en el sustrato) se asienta en el hábitat juvenil/adulto definitivo. La selección de un hábitat adecuado por parte de la larva determina la supervivencia a largo plazo de los juveniles y adultos. Debido a que este último paso es fundamental para la permanencia de la especie, muchas larvas de invertebrados marinos, incluyendo a los erizos de mar, tienen la cualidad de

retrasar la metamorfosis hasta encontrar un sitio adecuado para el asentamiento (Mercier *et al.* 2000, Rahim *et al.* 2004, Pechenik 2006).

*Arbacia stellata* es una especie con distribución geográfica amplia en el Pacífico Este, sin embargo, el desarrollo temprano de esta especie no ha sido completamente documentado en ningún punto de su distribución y la información que se tiene se restringen a solo dos estadios (larva de 10 brazos y juvenil de 1 día) de su desarrollo (Emlet *et al.* 2002, Emlet 2010). La documentación del desarrollo embrionario y larval, así como las condiciones y el tiempo en que ocurre el mismo, conjuntado con el conocimiento de los aspectos reproductivos, como la estacionalidad, duración de los desoves y fecundidad, son imprescindibles para entender las estrategias que favorecen la presencia y abundancia de esta especie en las localidades al norte de su distribución. Por lo anterior, en el presente estudio se documenta el tiempo y la evolución de las etapas de desarrollo desde la fecundación hasta la metamorfosis, en condiciones de laboratorio.

## **Material y método**

### ***Obtención de gametos y fertilización***

De la población de *A. stellata* distribuida en la localidad de Punta Banda, Baja California, México, se recolectaron cada mes mediante buceo con equipo SCUBA, aproximadamente 20 erizos adultos de septiembre a octubre del 2015. Estos individuos se mantuvieron en el Laboratorio de Biología y Ecología del Desarrollo (EcoDel) del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California (IIO-UABC), en estanques circulares de 400 l de capacidad y provistos con agua de mar a temperatura ambiente y aireación constante hasta su utilización.

La obtención de los gametos se realizó de acuerdo con el método descrito por Strathmann (1987) que consiste en estimular la expulsión de los gametos mediante la inyección de 2 a 3 ml de KCl (0.53 M) 0.5 molar en la cavidad celómica a través de la membrana peristomial. Los organismos se colocaron con

el extremo oral hacia arriba sobre frascos de vidrio de 30 ml conteniendo agua de mar filtrada hasta 1  $\mu\text{m}$  e irradiada con luz UV (AMF). Se comprobó la viabilidad de los gametos mediante la observación al microscopio del movimiento de los espermatozoides y el rompimiento de la vesícula germinal en los óvulos.

Una vez inducido el desove y evaluada la calidad de los gametos, se fertilizaron los óvulos adicionando los espermatozoides obtenidos de un macho por cada hembra. Para la fertilización se utilizaron recipientes de 2 l con AMF, manteniendo una proporción aproximada de 10 espermatozoides por óvulo para asegurar la fecundación, la cual fue verificada mediante la presencia de la membrana de fertilización. Los óvulos fecundados (cigotos) se enjuagaron con AMF y posteriormente se mantuvieron en recipientes de 20 l (Fig.10a) hasta que alcanzaron el estadio larvario de prisma. Durante las primeras 12 h se monitoreó el desarrollo embrionario a un intervalo de 1 h y durante los subsiguientes 2 días se monitorearon a un intervalo de 6 h.

### ***Mantenimiento de larvas***

Una vez que se observó el estadio de prisma se transfirieron las larvas a tanques cónicos de 45 l a una densidad máxima de 4 larvas/ml, con aireación constante (Fig.10b). Se hicieron recambios diarios de agua del 50 o 100%. Las larvas obtenidas se alimentaron con la microalga *Rhodomonas sp.* a una concentración de 5000 células/ml a partir del estadio prisma hasta larvas de 6 brazos y después se incrementó a una concentración aproximada de 8750 células/ml hasta alcanzar el estadio de larva competente, considerando la experiencia en el cultivo de larvas de equinodermos en EcoDel (Carpizo-Ituarte *et al.* 2002, Olivares-Bañuelos *et al.* 2012).



Figura 10.- Sistema de cultivo de embriones (a) y larvas (b) de *Arbacia stellata* en el laboratorio EcoDel.

Para caracterizar el desarrollo embrionario y larvario hasta el estadio de juvenil, se recolectaron aproximadamente 15 embriones de cada tanque de cultivo. Los organismos se observaron al microscopio para identificar su estadio y se tomaron fotografías de los mismos con una cámara adaptada al microscopio compuesto Axiscop de C. Zeiss. Con la ayuda del programa ImageJ se obtuvieron las medidas del diámetro en el caso de los embriones de 2 células hasta la etapa de blástula, el ancho del cuerpo en el caso de las gástrulas. para larvas desde dos brazos hasta el inicio de la larva competente se midió el largo de los brazos postorales izquierdo y derecho, el ancho del cuerpo, el largo del cuerpo y la amplitud de los brazos (Fig.11), tomando en consideración lo descrito por Smith *et al.* (2008) para *Strongylocentrotus purpuratus* y Wheeler *et al.* (2016) para *Arbacia punctulata*. A los juveniles se les midió el diámetro de la testa.



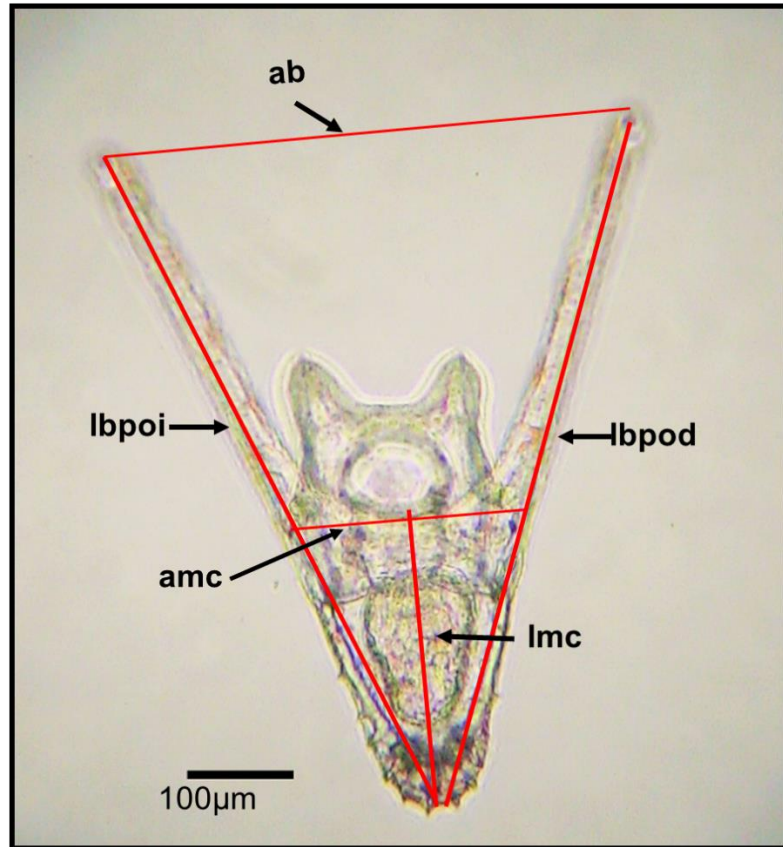


Figura 11.- Parámetros morfométricos medidos a la larva de 4 brazos (c). ac= Ancho del cuerpo, ab= Distancia entre los brazos post-orales, lbpoi= Largo del brazo post-oral izquierdo, lbpod= Largo del brazo post-oral derecho, amc= Ancho a la mitad del cuerpo, lmc= Largo a la mitad del cuerpo.

## Resultados

La inducción al desove fue exitosa y la expulsión de los gametos en los individuos maduros ocurrió inmediatamente después de la estimulación con KCl. En el caso de las hembras, se observaron expulsiones continuas de óvulos de color rojo marrón emergiendo por cada uno de los gonoporos y en el caso de los machos las expulsiones de espermatozoides presentaron una coloración amarillo lechoso (Fig.12).



Figura 12.- Reproductores en posición de desove inducido. El organismo de la izquierda corresponde a una hembra desovando y el de la derecha a un macho.

Los ovocitos maduros sin fertilizar son esféricos y con una coloración rojo marrón intensa con un diámetro promedio de  $76.9 \pm 3.5 \mu\text{m}$  (Fig.13a). La elevación completa de la membrana de fertilización se visualizó transcurridos aproximadamente 90 segundos después de la fertilización (Fig. 13d). La primera división celular ocurrió a los 36 minutos (Fig.13e) y la segunda división fue visible en una hora y 50 min después de la fertilización (Fig.13f). La aparición de la blástula temprana ocurrió aproximadamente a las 6 h (Fig.13j) y la blástula ciliada se formó a las 8 h después de la fertilización (Fig. 13l). Entre los dos estadios anteriores se observó una blástula arrugada con pared blastular gruesa (Fig.13k).

La formación de gástrula temprana o inicio de la gastrulación se alcanzó aproximadamente a las 11 h, cuando la capa engrosada de células del polo vegetal migró hacia adentro para comenzar el proceso de invaginación (Fig. 13m). La membrana del blastocele fue gruesa en esta fase inicial de la

gastrulación y en la vista transversal de la gástrula media se observó que el blastoporo es estrecho (Fig. 13o). La membrana del blastocele se volvió más delgada a medida que avanzaba la invaginación y ya en la gástrula tardía, que se alcanzó a las 14 h, el arquenteron hizo contacto con la membrana del blastocele, usando la contracción filipodial para completar la última parte de la elongación (Fig. 13p).

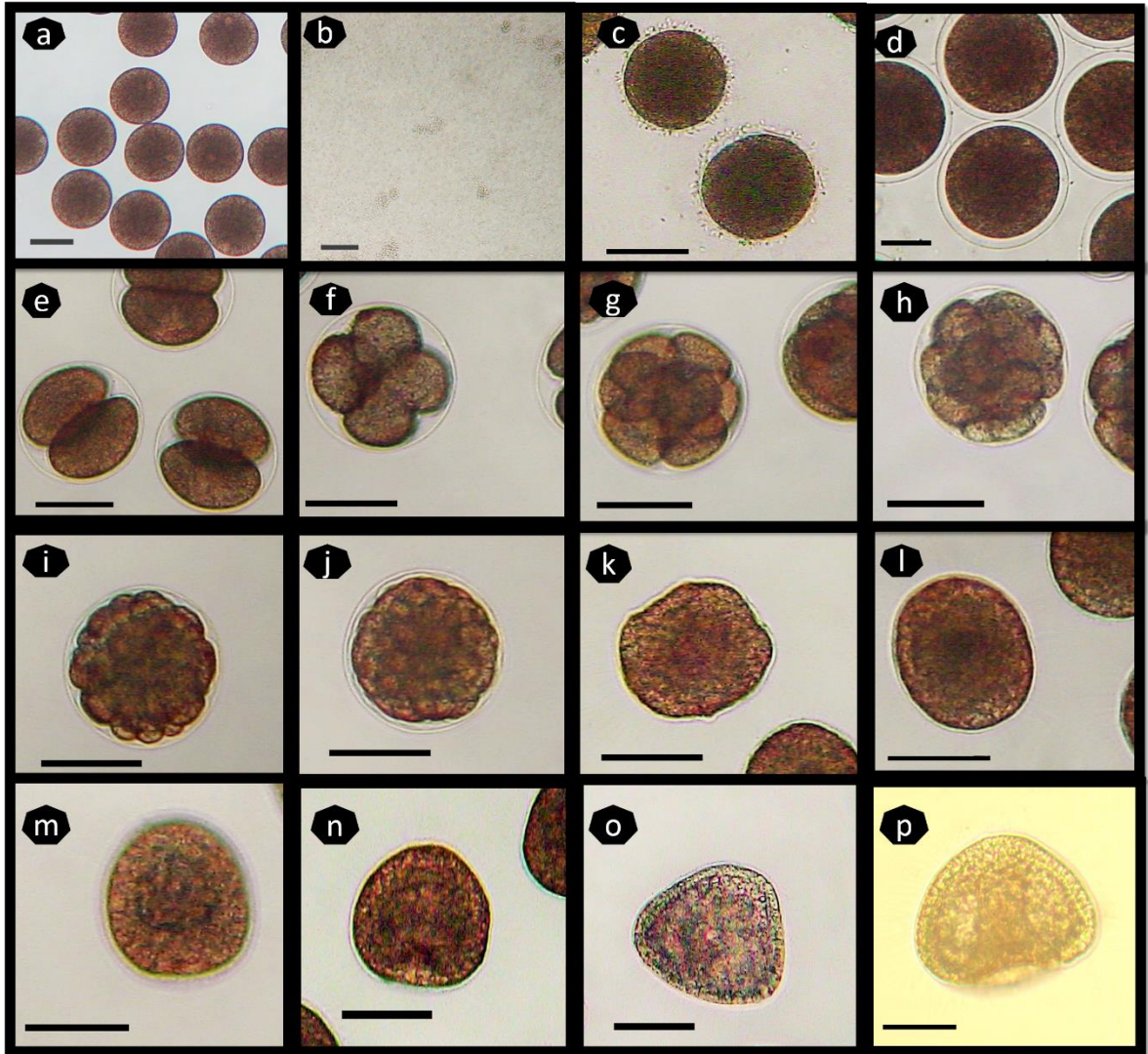


Figura.13.- Estadios de desarrollo embrionario hasta el estadio de gástrula de *Arbacia stellata*. (a) óvulo maduro no fertilizado, (b) espermatozoides activos en agua de mar, (c) fertilización e inicio del levantamiento de la membrana de fertilización, (d) óvulo fecundado con membrana de fertilización completa, (e) estadio de 2

células, (f) estadio de 4 células, (g) estadio de 16 células, (h) estadio de 32 células, (i) estadio de 128 células, (j) blástula temprana, (k) blástula arrugada, (l) blástula tardía, (m) gástrula temprana, (n) gástrula media, (o) vista transversal de la gástrula tardía, (p) gástrula tardía. Barra de escala= 50µm.

El tiempo de desarrollo desde la fertilización hasta completar la gastrulación, así como las condiciones de cultivo y los tamaños en cada estadio se encuentran resumidos en la tabla IV.

Tabla IV.- Tiempo aproximado de cada una de las etapas del desarrollo embrionario de *Arbacia stellata*, en condiciones de laboratorio, 33 UPS y pH 8.

Estadios de desarrollo	Tiempo posterior a la fertilización	Tamaño µm	Temperatura (°C)
Formación de la membrana de fertilización	00:01:32 min	5.9 ±1.7 G	24
Primera división (2 células)	00:36:00 min	77.0 ± 3.5 D	24
Segunda división (4 células)	01:50:00 h	82.3 ± 2.1 D	24
Tercera división (16 células)	03:34:00 h	83.7 ± 1.9 D	24
Blástula temprana	06:07:00 h	83.1 ± 2.4 D	24
Blástula tardía (eclosionada, nadadora)	08:40:00 h	75.8 ± 1.8 D	24
Gástrula temprana (inicio de formación del arquenterón )	11:20:00 h	84.1 ± 2.7 D	24
Gástrula tardía (arquenterón casi formado)	14:00:00 h	76.1±5.3 LC	24

G=Grosor, D=Diámetro LC=Largo del cuerpo

*Arbacia stellata* desarrolla una larva planctónica y planctotrófica con facultad de alimentarse desde el estadio de prisma. La etapa de larva de 4 brazos se inició a las 40 h cuando los brazos anterolaterales (**bal**) emergen anteriormente desde la región dorsal adyacente a la boca y los brazos postorales (**bpso**) se forman ventralmente a cada lado del ano extendiéndose anteriormente. El tejido entre los **bal** se engruesa ligeramente y se extiende más allá de la boca (**b**), para formar la campana oral (**co**), algunas células pigmentadas se observaron dispersas en el cuerpo (Fig.14b). La siguiente etapa (larva de 6 brazos) se observó a los 6 días y se caracterizó por la aparición de un nuevo par de brazos posterolaterales (**bpl**) en la región dorsal. En esta etapa las células pigmentadas

se agruparon en las puntas de los brazos (Fig.14c). La etapa de larva de 8 brazos, se observó a los 9 días y se caracterizó por el desarrollo de los brazos preorales (**bpro**) que se proyectan anterior y ventralmente (Fig.14d). La última etapa de desarrollo de la larva pluteus de *A. stellata* es la etapa de 10 brazos y se observó a los 11 días y es cuando se desarrolla el último par de brazos; los brazos posterodorsales (**bpsd**), los cuales salen posteriormente al segundo par y en la región dorsal (Fig.14e).

La metamorfosis de larval pluteus a postlarva inicia cuando la larva cambia su forma, de esbelta y puntiaguda en el extremo posterior a ensanchada y redondeada debido al agrandamiento del estómago (**est**), lo cual se observó a partir del día 14. A partir del día 16, la epidermis y las varillas del esqueleto de los brazos comienzan a reabsorberse, e inicia el desarrollo del rudimento juvenil (**rd**). En este proceso el conducto hidropórico y el hidrocele se desarrollan en el saco celómico y una pequeña invaginación epitelial comienza a desarrollarse en el lado izquierdo del ectodermo oral dando lugar al vestíbulo primario.

Conforme se desarrolla el rudimento, la campana oral continúa creciendo en dirección anal, sobresaliendo más allá de la boca y los podios primarios (**pp**) sobresalen del espacio vestibular a medida que se desarrollan (Fig.14f), lo cual se observó a partir del día 19. A este estadio se le denominó larva competente y estuvo caracterizado por la presencia del rudimento juvenil característico de las larvas pluteus planctotróficas de otros equinoideos (Cameron y Hinegardner 1978, Cameron *et al.* 1989, Carpizo-Ituarte *et al.* 2002, Nunes y Jangoux 2007). En este estadio la larva aún tiene la facultad de nadar ya que los brazos remanentes conservan las bandas ciliadas utilizadas en la locomoción y a su vez los pies ambulacrales primarios le ayudan a sujetarse para explorar el sustrato y establecerse antes de finalizar la metamorfosis.

En el último paso de la metamorfosis, los podios primarios y las espinas primarias (**epp**) emergen completamente al exterior del cuerpo (Fig.14g). Una vez completada la metamorfosis, el juvenil presenta una simetría pentaradial típica de los adultos. Los juveniles de *A. stellata* presentan tres espinas juveniles



(spp) de igual tamaño en cada región interambulacral en la superficie aboral, las cuales son transparentes y aplanadas en forma de pétalos redondeados. En cada región ambulacral se observa un podio primario central extensible y con un disco terminal (Fig.14h). El cuerpo del juvenil es redondeado y con una coloración rojo marrón y conforme los juveniles crecen, las espinas cambian de redondeadas a lanceoladas (Fig.14i).

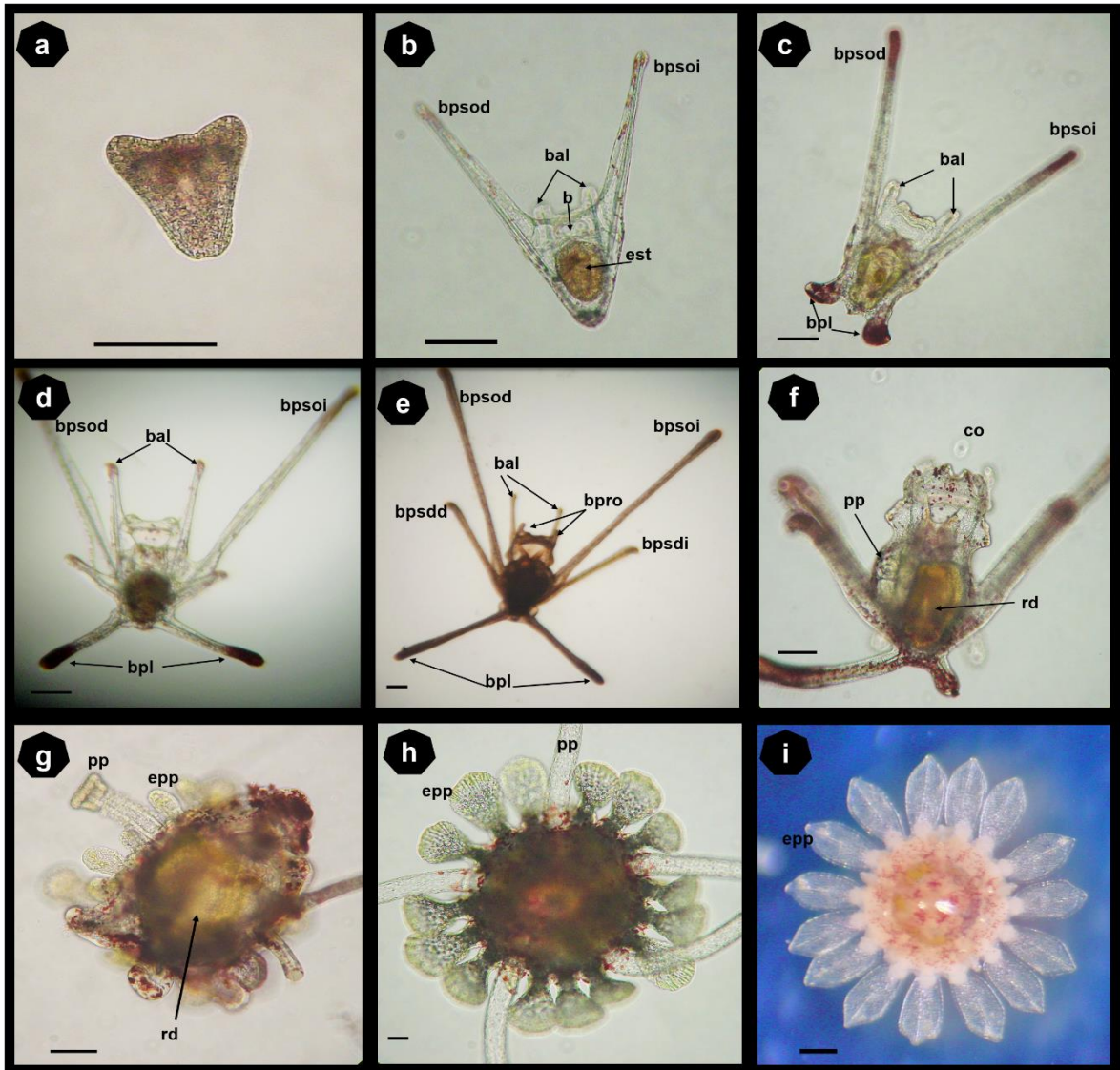


Figura 14.- Estadios de desarrollo larvario hasta la metamorfosis de *Arbacia stellata*. (a) estadio de prisma con primordio de los brazos postorales, (b) vista anal de la larva de 4 brazos, (c) vista abanal de la larva de 6 brazos, con inicio de la elongación de los brazos posterolaterales, (d) larva de 8 brazos con

elongación completa de los brazos posterolaterales e inicio de la elongación de los brazos posdorsales, (e) larva de 10 brazos, con elongación completa de todos los brazos, f) larva competente, g) larva en estadio final de la metamorfosis h) juvenil de 1 día, f) juvenil de 5 días. La barra de escala corresponde a 100  $\mu\text{m}$ , excepto la lámina i, donde corresponde a 200  $\mu\text{m}$ . bal=brazos anterolaterales, bpso= brazos postorales, b= boca, bpl= brazos posterolaterales, bpro= brazos preorales, bpsd= brazos posterodorsales, co= campana oral, est estómago, rd= rudimento, pp= podios primarios y epp= espinas primarias.

El tiempo aproximado del desarrollo desde la etapa pluteus de 4 brazos hasta la etapa de juvenil, así como las condiciones de cultivo y los tamaños en cada estadio se presentan en la tabla V.

Tabla V.- Tiempo aproximado de cada una de las etapas de desarrollo, desde la etapa de prisma hasta la metamorfosis de *Arbacia stellata* en condiciones de laboratorio, 35 UPS y pH 8, alimentada con la microalga *Rhodomonas sp.* a partir del estadio de larva pluteus temprana.

Estadios de desarrollo	Tiempo	Tamaño $\mu\text{m}$					T ( $^{\circ}\text{C}$ )
		lbpod	lbpoi	lmc	amc	ab	
Larva temprana	16:29:00 h	84 $\pm$ 2 ac					24 $\pm$ 0.3
Larva de 4 brazos	2 días	201 $\pm$ 16	200 $\pm$ 15	126 $\pm$ 6	118 $\pm$ 41	146 $\pm$ 12	23 $\pm$ 0.3
Larva de 6 brazos	6 días	691 $\pm$ 51	581 $\pm$ 51	251 $\pm$ 32	247 $\pm$ 21	482 $\pm$ 33	22 $\pm$ 0.7
Larva de 8 brazos	9 días	698 $\pm$ 48	690 $\pm$ 66	254 $\pm$ 99	283 $\pm$ 99	757 $\pm$ 33	22 $\pm$ 0.9
Larva de 10 brazos	11 días	659 $\pm$ 60	595 $\pm$ 65	324 $\pm$ 56	225 $\pm$ 19	781 $\pm$ 58	22 $\pm$ 0.6
Larva competente	19 días	337 $\pm$ 45 df					20 $\pm$ 0.7
Juvenil	23 días	427 $\pm$ 52 df					19 $\pm$ 0.8

ab= Ancho de los brazos, lbpoi= Largo del brazo postoral izquierdo, lbpod= Largo del brazo postoral izquierdo, amc= Ancho a la mitad del cuerpo, lmc= Largo a la mitad del cuerpo, df= Diámetro de Feret, ac= Ancho del cuerpo.

El cultivo en el cual se caracterizó morfométricamente a las larvas se desarrolló durante el mes de octubre a temperatura ambiente, iniciando con 23°C y finalizando con una temperatura de 20°C, con variaciones diurnas de aproximadamente 0.6 °C. El tamaño de los brazos postorales en la larva pluteus temprana fue de aproximadamente 200 µm y a partir del día 6 alcanzaron una asíntota con aproximadamente 700 µm. El cuerpo de la larva pluteus temprana midió aproximadamente 130 µm de largo y 120 µm de ancho y alcanzó su asíntota al sexto día de cultivo, midiendo aproximadamente 270 µm de largo y 350 µm de ancho. La medida que continuó incrementándose hasta el final del desarrollo de la larva fue el ancho entre los brazos postorales; en la larva pluteus temprana midió 150 µm y alcanzó su máximo valor al día 14 con aproximadamente 900 µm (Fig. 15).

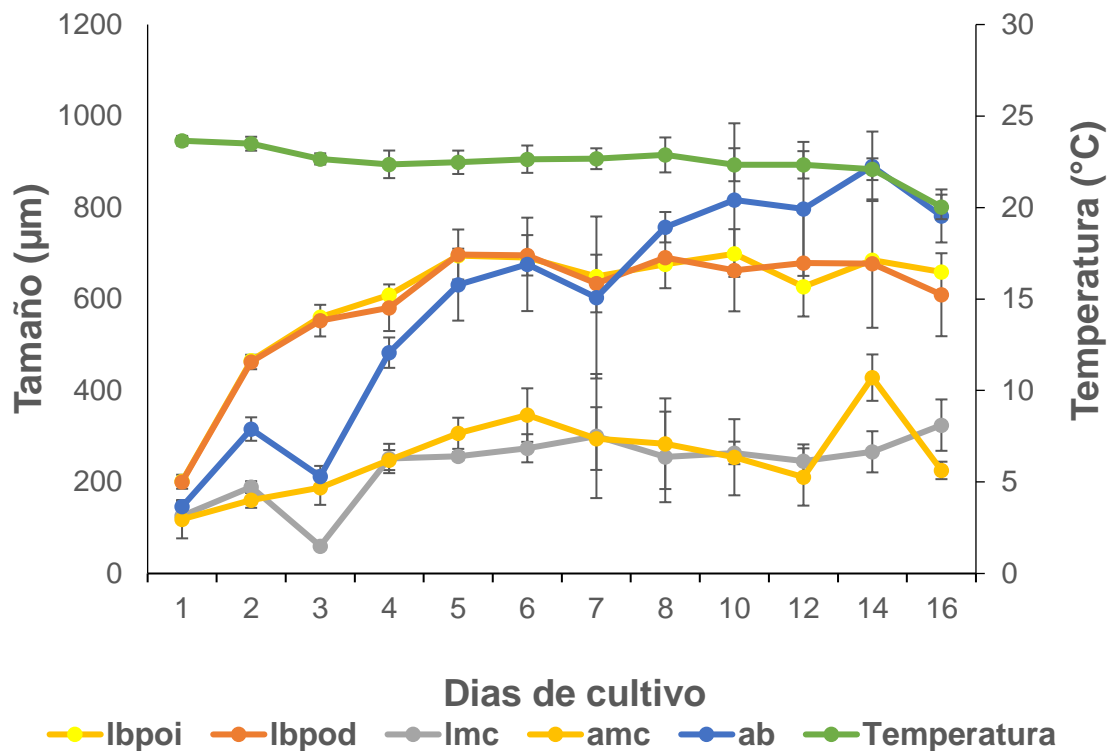


Figura 15.- Tendencia media ( $\pm$  DE) del largo de los brazos postorales izquierdo (lbpoi) y derecho (lbpod), ancho a la mitad del cuerpo (amc), largo a la mitad del cuerpo (lmc) y tendencia media ( $\pm$  DE) de la temperatura durante el desarrollo de la larva pluteus de *Arbacia stellata*.



## Discusión

La coloración rojo marrón de los óvulos de *A. stellata* se conserva durante el desarrollo del embrión, provocando que este sea opaco y dificultando la descripción de algunas características durante el desarrollo embrionario. Aunque las etapas de segmentación hasta la etapa de 128 células son similares en todas las especies de erizos de mar, los embriones presentan características morfológicas especie específicas en las etapas de blástula y gástrula (Kitazawa *et al.* 2016). Los ovocitos de *A. lixula*, *A. punctulata* y *A. stellata* están altamente pigmentados. En el caso de *A. lixula* se ha documentado la presencia del pigmento rojo equinocromo como resultado de la deposición de carotenoides obtenidos de su dieta (Cirino *et al.* 2017).

No obstante la falta de claridad de los embriones, se observó que justo antes de eclosionar, la blástula de *A. stellata* presenta una superficie irregular como el estadio de blástula “arrugada” la cual ha sido descrita anteriormente en especies de desarrollo directo con larvas lecitotróficas. Sin embargo, el estadio de blástula arrugada también se ha observado en equinoideos. Por ejemplo, Kitazawa *et al.* (2009), documentaron que *Temnopleurus toreumaticus*, considerada una especie típica de desarrollo indirecto con una etapa de larva planctotrófica, presenta este estadio de blástula arrugada. Otra característica importante que se pudo observar durante la etapa de blástula es que inicialmente la membrana blastular es gruesa, con un blastocelo estrecho, no obstante, se volvió más delgada conforme la gastrulación avanzaba, como lo observado por Takata y Kominami (2004) para *Anthocidaris crassispina*.

A pesar de que hay numerosos estudios del desarrollo larvario de equinoideos regulares, las descripciones de los primeros estadios de los erizos del género *Arbacia* son escasos y antiguos. Una de las especies mayormente estudiadas es *Arbacia punctulata* y la descripción del desarrollo temprano más completa de esta especie fue realizada por Harvey (1949), quien describió el crecimiento de la larva pluteus hasta la metamorfosis; dicho autor define a la larva pluteus temprana como una larva de 4 brazos, la cual presenta un par de largos brazos

anales (postorales) en el lado ventral y un par de brazos orales cortos (preorales) en el lado dorsal. La larva de 4 brazos de *A. stellata* presentó brazos postorales y brazos anterolaterales, pero a diferencia de *A. punctulata* los brazos preorales se desarrollaron hasta la etapa de larva de 8 brazos. Asimismo Harvey (1949), menciona que el último par de brazos en desarrollarse son los brazos posterodorsales, lo cual corresponde a lo observado en el presente trabajo para *A. stellata*.

Al igual que *A. stellata* la larva de 4 brazos de *A. lixula* es definida por George *et al.* (1990) por la presencia de los brazos postorales y anterolaterales, mientras que la larva de 6 brazos se define por la aparición de los brazos posterolaterales como en *A. stellata* y *A. punctulata*. George *et al.* (1990), diferencian las etapas de la larva pluteus de *Arbacia lixula* de acuerdo con la aparición de los brazos. El estadio de 8 brazos se define por la aparición de los brazos posterodorsales en las tres especies y el estadio de larva de 10 brazos se define con la aparición de los brazos preorales en *A. stellata* y *A. lixula*. Según la descripción de Harvey (1949) *A. punctulata* no desarrolla brazos anterolaterales, mientras que Goerge *et al.* (1990) mencionan brazos anterodorsales extras en *A. lixula*, los cuales no están presentes en las otras dos especies.

Específicamente para *A. stellata*, Emlet *et al.* (2002) esquematizan la larva de 10 brazos, sin embargo no enumeran ni nombran las características de la larva. Emlet (2010) reporta y enumera para esta especie, caracteres externos como espinas, pies ambulacrales y pedicelarios en postlarvas de un día de haberse metamorfoseado. En su descripción reporta tres espinas adultas en la región interambulacral en forma de remos y cinco pies ambulacrales primarios, lo cual coincide con lo observado en las postlarvas en el presente estudio. Sin embargo, las espinas oculares juveniles, los pies ambulacrales secundarios y los 20 bulbos podiales reportados por dicho autor no se pudieron observar en los especímenes en el presente estudio. Cabe mencionar que tanto la larva como el juvenil descrito por Emlet *et al.* (2002) y Emlet (2010) (respectivamente) son de la población de *A. stellata* distribuida en Panamá.

La epidermis y las varillas del esqueleto se absorbieron simultáneamente en la larva de *A. stellata* durante la metamorfosis, como ocurre en *Salmacis sphaeroides* (Rahman *et al.* 2012) y *Diadema setosum* (Rahman *et al.* 2014) en algunas especies como *Eucidaris thouarsi* (Emlet 1988) y *Paracentrotus lividus* (Gosselin y Jangoux 1998) en la absorción tisular, la epidermis se retrae dejando a las varillas del esqueleto expuestas, las cuales eventualmente se romperán. Tal tipo de discrepancia puede estar relacionado con las diferencias entre especies (Pearse y Cameron 1991).

Las larvas competentes de *A. stellata* se observaron a partir del día 19 de cultivo, mientras que *A. punctulata* puede tardar hasta 42 días para alcanzar este estadio (Harvey 1949) y puede tomar de 22 a 26 días en *A. lixula* a 22°C (George *et al.* 1990). Sin embargo, los datos de las primeras etapas de desarrollo y los tiempos requeridos para alcanzarlas, documentados en el presente estudio para la población de *A. stellata* ubicada en el extremo norte de su distribución geográfica, podrían variar geográfica y temporalmente. George *et al.* (1990) encontraron que *A. lixula* muestra una variación significativa en la calidad del huevo (contenido de proteínas y lípidos), la supervivencia y el crecimiento de las larvas dentro de las poblaciones mediterráneas y sugieren que la disparidad en la calidad del huevo tiene que ver con diferentes dietas en las distintas áreas geográficas. Otra discrepancia en el crecimiento de la larva, es la variabilidad observada dentro de los cultivos. Smith *et al.* (2008) mencionan que para *Strongylocentrotus purpuratus*, las etapas embrionarias se desarrollan en casi perfecta sincronía hasta la etapa de pluteus de dos brazos en un mismo cultivo, sin embargo, cuando la larva comienza a alimentarse, el desarrollo se vuelve cada vez menos sincrónico dentro de los cultivos, incluso en larvas provenientes de una sola pareja de progenitores. Esta alta variabilidad en el tamaño también fue observado en las larvas de *A. stellata* cultivadas en condiciones de laboratorio en el presente estudio, sobre todo en la última fase de desarrollo, lo cual se puede ver en los valores graficados de las medidas de los brazos postorales, así como el ancho y largo del cuerpo.

Los estadios tempranos como embriones y larvas sin duda juegan un papel importante en la distribución de las especies. La caracterización de las primeras etapas (desde fertilización hasta juvenil), los tiempos en los cuales se alcanzan y la descripción morfométrica de las larvas cultivadas de *Arbacia stellata* documentados en el presente estudio, aportan y completan información importante de la historia de vida de esta especie, con distribución amplia el Pacífico Oriental y con creciente expansión hacia el norte debido al incremento de aguas cálidas frente a las costas de Baja California y California como resultado del cambio global en el océano.

## CAPÍTULO III

### **Efecto de la acidificación del medio en la cinética de fertilización y desarrollo temprano del erizo de mar *Arbacia stellata*.**

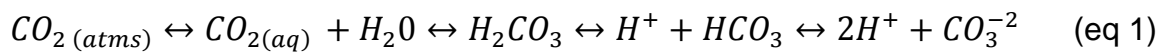
#### **Introducción**

Desde el comienzo del período industrial a fines del siglo XVIII, la humanidad ha estado emitiendo a la atmósfera grandes cantidades de CO<sub>2</sub> como resultado de la quema de combustibles fósiles, deforestación, producción de cemento y cambios en el uso de suelo. Se han alcanzado concentraciones que van desde 280 ppm antes del periodo industrial hasta 411.97 ppm de CO<sub>2</sub> atmosférico en la actualidad (Sabine *et al.* 2004, NOAA 2019). Esto implica valores más altos que los que habían existido durante más de 800,000 años (Lüthi *et al.* 2008) y se espera que siga aumentando a un ritmo acelerado (Orr *et al.* 2005, Fabry *et al.* 2008). Una de las consecuencias de este proceso es el incremento del efecto invernadero propiciado por la presencia del CO<sub>2</sub> en la atmósfera, lo que produce un aumento en la temperatura promedio de la capa inferior de la atmósfera y de las capas superficiales de los océanos. Este proceso es conocido como calentamiento global y puede provocar el derretimiento del hielo terrestre, el aumento del nivel del mar, incremento de la estratificación oceánica y el cambio climático en general (Bindoff *et al.* 2007, Misra 2014, Joshi *et al.* 2017).

Dentro del ciclo del Carbono, los tres grandes reservorios entre los cuales hay un intercambio de CO<sub>2</sub>, son la atmósfera, la biosfera terrestre y el océano (incluyendo a la biota). Solo la mitad del CO<sub>2</sub> liberado por la actividad antropogénica ha permanecido remanente en la atmósfera en las pasadas décadas, mientras que el resto ha sido absorbido por el océano (30%) y por la biosfera terrestre (20%) (Feely *et al.* 2004, Sabine *et al.* 2004).

En el agua de mar, los componentes esenciales del sistema de carbonato son el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), carbonato (CO<sub>3</sub><sup>-2</sup>) y los iones hidrógeno (H<sup>+</sup>) e hidróxido (OH<sup>-</sup>). A diferencia de otros gases atmosféricos, como el oxígeno y el nitrógeno, cuando el dióxido de carbono se disuelve en el

mar, reacciona con el agua para formar ácido carbónico ( $H_2CO_3$ ) y la mayor parte de este se disocia rápidamente en un ion hidrógeno ( $H^+$ ) y  $HCO_3^-$ . Un ion hidrógeno puede reaccionar con un  $CO_3^{2-}$  para formar bicarbonato (Fig. 16). Las especies de carbonato están relacionadas por los siguientes equilibrios químicos:



Por lo tanto, el efecto neto de agregar  $CO_2$  al agua de mar consiste en aumentar las concentraciones de  $H_2CO_3$ ,  $HCO_3^{2-}$  y  $H^+$ , al mismo tiempo que se disminuye la concentración de  $CO_3^{2-}$  y se obtiene un pH más bajo.

La continua y rápida incorporación de  $CO_2$  atmosférico al océano durante la época del Antropoceno está incrementando la concentración de iones  $H^+$  y disminuyendo el pH, lo cual resulta en una disminución en la concentración del ion carbonato ( $CO_3^{2-}$ ). Lo anterior reduce el estado de saturación de los minerales del carbonato de calcio ( $\Omega CaCO_3$ ) en la capa superficial del océano y da lugar al proceso que se conoce como acidificación del océano (AO) (Feely *et al.* 2004, Orr *et al.* 2005).

A partir de la incorporación del carbono antropogénico entre 1750 y 1994, se ha calculado un descenso de pH de 0.1 sobre el nivel mundial de los océanos. Los descensos más bajos (0.06) se calculan para los trópicos y aguas subtropicales, y los más altos en las altas latitudes (0.12), lo cual es consistente con su baja capacidad de amortiguamiento debido al efecto de la baja temperatura. Esto significa que se disuelve más  $CO_2$  a temperaturas medias y bajas, en comparación con las latitudes bajas con temperaturas altas (Caldeira y Wickett 2003b, Caldeira 2005).

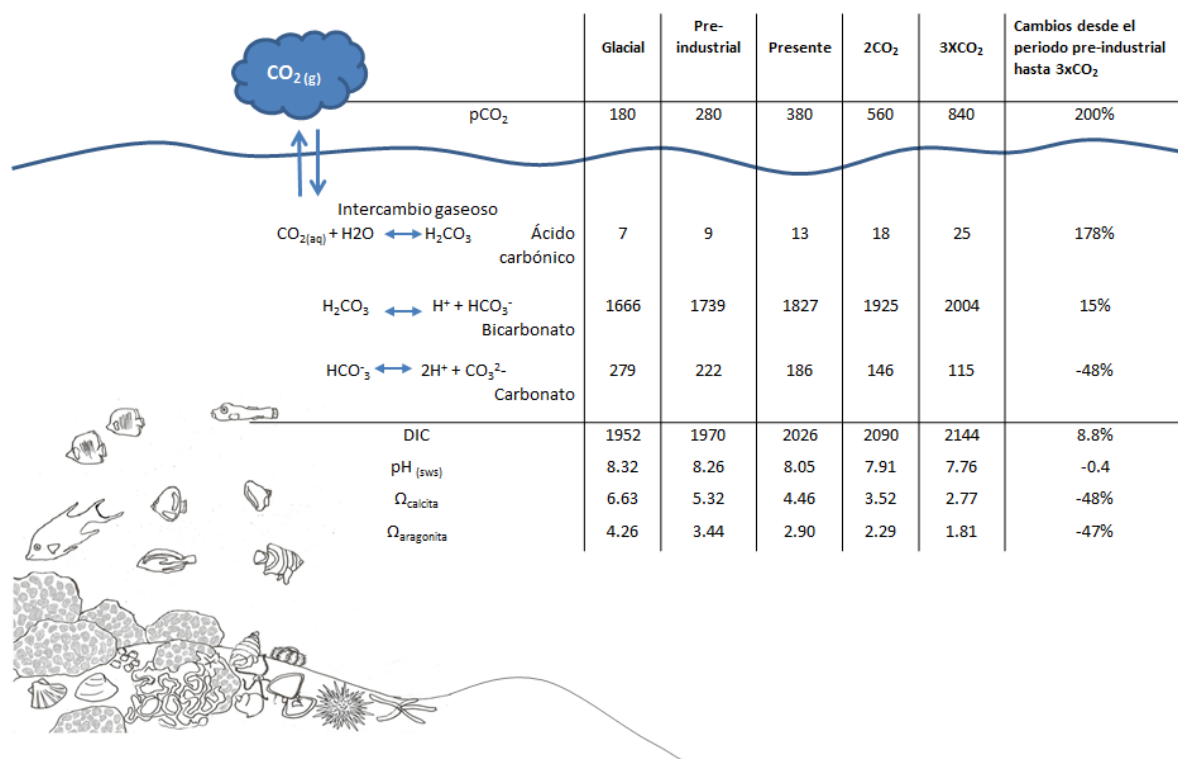


Figura 16.- Concentraciones estimadas de las especies de carbono ( $\mu\text{mol kg}^{-1}$ ), valores de pH y estados de saturación de aragonita y calcita del agua de mar para concentraciones pCO<sub>2</sub> (ppmv) atmosféricos (periodo glacial, preindustrial y actual). Se muestran también las proyecciones de los cambios en estos parámetros cuando se alcance el doble (2xCO<sub>2</sub>) y el triple (3xCO<sub>2</sub>) de la concentración del CO<sub>2</sub> en la atmosfera, estimados a partir del periodo preindustrial. La última columna indica la magnitud (%) del cambio en los parámetros al alcanzarse tres veces la concentración del CO<sub>2</sub> atmosférico (modificado de Fabry *et al.* 2008).

Una de las implicaciones de la acidificación del océano es el efecto potencial en organismos marinos, especialmente para los que incorporan carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>) en forma de calcita o aragonita y producen una concha, testa o esqueleto, debido a que estas estructuras calcificadas serán más susceptibles a la disolución en aguas ácidas (Andersson *et al.* 2008, Dupont *et al.* 2010b,

2010a). La presencia de estas dos especies minerales carbonatadas, comúnmente de origen biogénico, está definida por su solubilidad potencial, es decir, si las condiciones del agua favorecen su precipitación o disolución, la cual se estima mediante el estado de saturación ( $\Omega$ ). En regiones donde el  $\Omega$  de la aragonita ( $\Omega_a$ ) o de la calcita ( $\Omega_{ca}$ ) es mayor a 1 se favorece la formación de estructuras carbonatadas (conchas y exoesqueletos), pero si  $\Omega_a$  o  $\Omega_{ca}$  son menores a 1, puede ocurrir la disolución de estas estructuras. El límite entre ambas condiciones ( $\Omega_a$  o  $\Omega_{ca} = 1$ ) se conoce como horizonte de saturación (Feely *et al.* 2008).

Dentro del grupo de los calcificadores más afectados se encuentra a los equinodermos, y ese impacto se debe a que sus estructuras como espículas, dientes, testas y espinas (en la fase adulta) o varillas esqueléticas (en la fase larvaria), están formadas de cristales precursores de calcita amorfa (calcita de magnesio). Este tipo de calcita es treinta veces más soluble que la calcita en su forma de cristales ordenados (Politi *et al.* 2004).

Los niveles de defensas celulares al estrés ambiental en los embriones y larvas son adquiridos desde el desarrollo de los gametos previamente a la liberación de estos y a la fecundación (Hamdoun y Epel 2007). La clave de un desarrollo exitoso se debe en parte a estos mecanismos celulares que pueden modificar la ruta de desarrollo en respuesta a las condiciones encontradas en el medio, amortiguando así los efectos negativos del entorno. Estos mecanismos proporcionan defensas potentes contra los factores estresantes comunes en el desarrollo, como son los cambios en la temperatura, la hipoxia, los agentes patógenos, la radiación ultravioleta, la presencia de radicales libres y/o toxinas. Sin embargo, los cambios rápidos en el clima global del planeta podrían sobrepasar esta capacidad intrínseca, con serias consecuencias (Kurihara 2008, Przeslawski *et al.* 2008, Brierley y Kingsford 2009, Hofmann *et al.* 2014). La mayoría de los invertebrados, incluyendo los equinodermos, liberan sus gametos teniendo como medio extracelular el agua de mar circundante. Un problema al que se enfrentan tanto los gametos como los embriones respecto a



la acidificación del medio, es que estos rudimentos de pocas células poseen limitados sistemas de defensa en relación con los que desarrollarán como adultos (sistema inmune y/o sistema nervioso). Además carecen de un epitelio especializado en la regulación iónica, lo cual limita la capacidad de responder a las condiciones ácido-base ambientales (Hamdoun y Epel 2007, Melzner *et al.* 2009).

Para la perpetuación de las especies y en consecuencia para la funcionalidad de los ecosistemas, es crucial garantizar una reproducción exitosa, asegurando la gametogénesis, fertilización y desarrollo de las larvas en juveniles y adultos viables. Sin embargo, la disminución del pH del agua de mar, conlleva efectos negativos en el éxito de fertilización, desarrollo embrionario y sobrevivencia de larvas en organismos calcificadores como en no calcificadores que no puedan sobrellevar este cambio (Dupont *et al.* 2008, O'Donnell *et al.* 2009, Bögner 2016).

En equinoideos, la disminución de pH en el agua de mar puede afectar mecanismos y procesos importantes en la fertilización de los gametos tales como la capacitación del espermatozoide y la activación de la movilidad, así como los mecanismos moleculares del reconocimiento de los gametos y la interacción entre ambos. A su vez puede afectar el bloqueo de la polispermia, los mecanismos moleculares para la señalización de calcio, la regulación del pH dentro del óvulo y la formación de la membrana hialina del huevo. En el cigoto puede afectar la activación del metabolismo, así como la función del citoesqueleto, la citocinesis, la cariocinesis, la diferenciación celular y el desarrollo de la larva (Levitan *et al.* 1991, Benzie y Dixon 1994, Levitan 1996, Bögner 2016).

La considerable vulnerabilidad de las etapas tempranas de desarrollo respecto a las condiciones adversas de la OA futura ha sido demostrada en muchas especies de invertebrados marinos, incluyendo los erizos de mar (Dupont *et al.* 2010, Byrne 2011). Sin embargo, debido a la alta variabilidad en los resultados obtenidos con las especies estudiadas hasta el momento, no se ha podido

documentar con claridad, hasta qué punto las especies marinas cuentan con los mecanismos de aclimatación y la capacidad de adaptación necesarias, que les permitan mantenerse en un entorno que continua cambiando (Byrne *et al.* 2010). El objetivo del presente estudio es evaluar el efecto de la acidificación del medio en el éxito de la fertilización y su impacto en las primeras etapas del desarrollo embrionario en el erizo de mar *Arbacia stellata*, como una forma de examinar la plasticidad fisiológica inherente de esta especie frente al cambio global en el océano. Así mismo, la población estudiada habita en una región marina templada, particularmente sometida a eventos de surgencias episódicas, la cual experimentara un cambio ambiental rápido en el futuro con respecto a la acidificación de los océanos (Munoz-Anderson *et al.* 2015, Oliva-méndez *et al.* 2018). Para evaluar los efectos y generar predicciones sobre el destino de la biota local frente al cambio climático, se requieren datos experimentales, obtenidos en condiciones controladas sobre los efectos integradores de los factores estresantes del cambio climático a nivel global y regional (Fabry *et al.* 2008, Przeslawski *et al.* 2008, Widdicombe y Spicer 2008).

## **Materiales y Métodos**

### *Recolecta de organismos y obtención de gametos*

Se colectaron aproximadamente 30 individuos adultos de *Arbacia stellata* a una profundidad de 5 m y se transportaron en hieleras con agua de mar al Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (EcoDel) del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), donde se mantuvieron en tanques circulares con capacidad de 400 l y en un sistema de agua corriente y aireación continua hasta su utilización en los experimentos.

Previo a la realización del experimento de acidificación, se llenaron dos contenedores de 20 l con AMF y se dejaron durante un día para que la temperatura del agua se igualara a la del ambiente. A cada contenedor se le introdujo un sensor conectado a un lector de pH y temperatura (Honeywell-UDA2182. Escala: 0-14 pH, -10-110°C, Precisión: +/- 0.01 mA, +/- 0.1°C), con el

cual se monitoreó constantemente ambas variables del agua. Una vez que la temperatura del agua se igualó con la del medio, a uno de los contenedores se le ajustó el pH a 7.5 (valor predicho para 2100 por el Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (IPCC) 2007) mediante burbujeo de CO<sub>2</sub> gaseoso hasta alcanzar el pH objetivo y se dejó por 24 h bajo monitoreo constante para asegurarse que el pH no variara. Así mismo, un día previo a la realización de los experimentos, se dejó un recipiente con agua de mar para que la temperatura del agua se igualara con la del ambiente y esta fungiera como Baño María durante la realización de los experimentos.

La liberación de gametos fue inducida mediante la inyección de 2 a 3 ml de KCl 0.53 M en la cavidad celómica a través de la membrana peristomial de los organismos de acuerdo con lo descrito por Strathmann (1987) y la experiencia en EcoDel con el desove de diversas especies de equinoideos (Carpizo-Ituarte *et al.* 2002, Salas-Garza *et al.* 2006). Para recolectar los óvulos, las hembras se colocaron con el extremo oral hacia arriba sobre frascos de vidrio de 30 ml conteniendo agua de mar filtrada hasta 1 µm e irradiada con luz UV (AMF). Los espermatozoides se recolectaron en seco, (los organismos después de ser inyectados se colocaron en frascos de vidrio sin agua) y se refrigeraron a 4 °C hasta su uso. Se comprobó la viabilidad de los gametos, mediante la observación al microscopio del movimiento acelerado de los espermatozoides y el rompimiento de la vesícula germinal en óvulos. Una vez que las hembras terminaron de desovar, la mitad de los óvulos se suspendieron en agua de mar filtrada y con pH 8.0 (pH del agua de mar en el laboratorio) y la otra mitad en agua con pH 7.5.

Los gametos no se usaron en los experimentos a menos que una prueba de fertilización mostrara más del 80% de fertilización y se observara la elevación normal de la membrana de fertilización. Una vez revisados los gametos, se eligió a la pareja de reproductores con el mejor porcentaje de fecundación (>80%) para comenzar las etapas experimentales. Cabe mencionar que para cada experimento se utilizaron los gametos obtenidos de parejas de reproductores

diferentes (una pareja por cada experimento), con el objetivo de verificar la variabilidad de la respuesta individual. Se realizaron tres experimentos, cada uno en tres fechas diferentes con menos de un mes de diferencia entre ellos para la evaluar el efecto de la AO en el éxito de fertilización (denominados experimentos 1, 2 y 3) y dos experimentos (experimento 1 y 2) para el desarrollo embrionario.

### ***Cinética de fertilización***

Se cuantificó la densidad inicial de los óvulos, para ajustar a una densidad de 200 óvulos por ml en cada condición de pH. Posteriormente se agregaron 4 ml de AMF a 33 tubos de ensayo, con el fin de realizar una serie de 10 diluciones (1-10) por triplicado (A-C) y un control, para cada condición de pH.

Posteriormente se preparó una solución “stock” inicial de espermatozoides lo cual consistió en poner 100  $\mu$ L de espermatozoide seco en 9.9 ml de AMF, para cada condición de pH. Del stock inicial se agregó 1ml a cada tubo en la primera terna de tubos, conteniendo 4 ml de agua en cada condición de pH, se mezcló tres veces suavemente por inversión del tubo y se tomó 1 ml para transferir a la siguiente terna hasta completar las 10 diluciones ( $10^1$ - $10^{10}$ ) por triplicado (Levitan *et al.* 2007, Reuter *et al.* 2011).

El conteo de la concentración absoluta de espermatozoides se realizó en la primera dilución para cada uno de los experimentos, para tener un aproximado de la cantidad de espermatozoides en cada dilución. El conteo de espermatozoides se realizó con la ayuda de un hematocitómetro. El número promedio ( $\pm$ DE) de espermatozoides para cada factor de dilución en cada experimento se resume en la tabla VI.

Tabla VI.- Concentración de espermatozoides de *Arbacia stellata* en cada factor de dilución en los experimentos 1, 2 y 3.

Experimento	1		2		3	
Dilución (células m l <sup>-1</sup> )	Media ± DE		Media ± DE		Media ± DE	
D1	4368333	723089	3365833	1429849	4748333	55480
D2	436833	72309	336583	142985	474833	5548
D3	43683	7231	33658	14298	47483	555
D4	4368	723	3366	1430	4748	55
D5	437	72	337	143	475	6

Posteriormente, se agregó a cada tubo de ensayo 5 ml de la suspensión de 200 óvulos por ml de cada condición de pH, para completar 10 ml con 100/ml, se mezcló suavemente por inversión del tubo tres veces, se dejó incubar por 30 min y posteriormente se fijó con formol al 4%, considerando como tiempo inicial, al momento que se llenó la primera tercia de tubos.

Para caracterizar la cinética de fertilización, se estimó el porcentaje de fertilización, para el cual se cuantificó el número de óvulos fertilizados, caracterizados por la aparición de la membrana de fertilización (Fig.17a) y óvulos no fertilizados (sin membrana de fertilización) (Fig.17b) en una muestra de 100 óvulos observados con ayuda de un microscopio compuesto Axiscop de C. Zeiss. El procedimiento anterior se realizó para cada réplica.

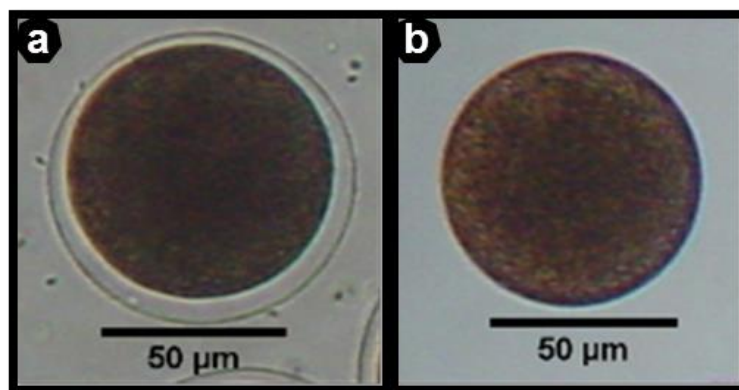


Figura 17.- Ovulo A) fertilizado y B) óvulo no fertilizado de *Arbacia stellata*.

Tres tubos de ensayo adicionales fueron agregadas a cada tratamiento de pH y cada dilución para la obtención de la muestras de agua con el fin de calcular el Carbono Inorgánico Disuelto (CID) durante el experimento. Así mismo, se tomaron muestras de agua del reservorio y del agua donde se encontraban los óvulos suspendidos antes de pasarlos a los tubos de ensayo. Las muestras de agua se fijaron con 20 µl de cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) y se cerraron herméticamente con un tapón de goma y un sello de aluminio. Así permanecieron hasta que se realizaron las mediciones de los parámetros del sistema de CO<sub>2</sub> en el Laboratorio de Oceanografía Química (IIO-UABC). Simultáneamente a la toma de muestras de agua se verificaron nuevamente los datos de temperatura, salinidad y pH para cada una de las muestras.

### ***Efecto de la acidificación del medio en el desarrollo embrionario***

Una vez obtenidos los gametos, como se mencionó anteriormente, se procedió a realizar la fertilización y ésta se revisó a intervalos de 5 min. Una vez que la mayoría de los óvulos (90-100%) presentaron la membrana de fertilización se tamizaron con un tamiz de 35 µm la mitad de ellos para eliminar el exceso de espermatozoides y se colocaron en agua de mar con un pH de 8.0. El mismo procedimiento se realizó con la otra mitad de los cigotos poniéndolos en agua de mar con pH 7.5. Se contabilizaron los embriones de cada condición y ambas se ajustaron a 5 óvulos/ml.

De cada condición de pH se llenaron 18 viales de 50 ml. Cada 4 h y hasta las 24 h se extrajeron 3 viales de cada tratamiento y su contenido se preservó con formol al 4%. Adicionalmente se registró el pH, la temperatura, el oxígeno y la salinidad de 2 viales y se tomaron 20 ml de cada uno para la determinación del Carbono Inorgánico Disuelto (CID) en el laboratorio de Oceanografía Química IIO-UABC. Así mismo, se tomaron muestras de agua del reservorio y del agua donde se encontraban los embriones antes de pasarlos a los viales.

Para evaluar el efecto de la acidificación en el desarrollo, se fotografiaron 30 embriones al azar en cada una de las tres réplicas de los dos tratamientos. Posteriormente, se midió el diámetro en caso de las blástulas (Fig.18a) y el

ancho en caso de las gástrulas (Fig.18b) usando el software Image J y se calculó la tasa de crecimiento relativo (TCR). La estimación de la TCR se estimó mediante las siguientes relaciones matemáticas (Bastías & Finot, 2014):

$$TCA = (Dt_1 - Dt_0) / (t_1 - t_0) \quad (1)$$

$$TCR = \frac{TCA}{D_0} \quad (2)$$

Donde TCA es la tasa de crecimiento absoluto ( $\mu\text{m h}^{-1}$ ), TCR es la tasa de crecimiento relativo del diámetro ( $\mu\text{m} * \mu\text{m}^{-1} \text{h}^{-1}$ ),  $Dt_1$  y  $Dt_0$  son la variación de diámetro en el tiempo actual ( $t_1$ ) y anterior ( $t_0$ ) al muestreo, respectivamente.

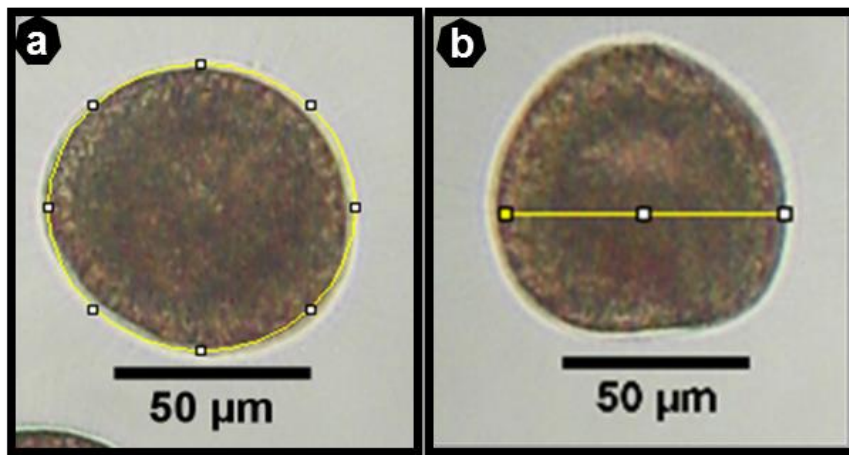


Figura 18.- Microfotografías mostrando las medidas registradas en los embriones de *Arbacia stellata*, A) Blástula y B) Gástrula.

### **Análisis de datos**

Una prueba de normalidad y homocedasticidad (Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente) se le aplicó a los datos del porcentaje de fertilización, los cuales resultaron no pasar ninguna de las dos pruebas. Se realizó un ANOVA de una vía Kruskal-Wallis por rango entre los experimentos realizados (experimento 1, 2 y 3) y un ANOVA de dos vías a cada experimento por

separado para detectar diferencias significativas entre cada condición de pH (pH 8.0 y pH 7.5) y finalmente en la serie de diluciones ( $1-10^5$ ) y una prueba de comparación múltiple con el método de Student-Newman-Keuls. Las pruebas estadísticas se ejecutaron con el programa SigmaStat ver 10.0. (Systat Software, Inc.2006).

Para identificar el posible arreglo espacial de grupos en el tiempo de desarrollo (8, 12, 16, 20, 24 h) y condición de cultivo (pH 8.0 y pH 7.5), según el porcentaje de aparición de los estadios de desarrollo (blástulas y gástrulas), se aplicó un análisis de ordenación mediante la técnica de escalamiento multidimensional no métrico (mMDS) basado en una matriz de similitud de Bray-Curtis. Los datos se analizaron en crudo debido a que se realizó una prueba *a priori* Box & Cox y el valor de *b* fue cercano a uno (0.279) (Neter *et al.* 1996). El análisis incluyó los datos de las dos fuentes independientes de embriones, proveniente de dos parejas distintas, debido a que los datos presentaron un comportamiento similar.

Para evidenciar diferencias significativas en el efecto del pH en el desarrollo embrionario se aplicó un ANOSIM de dos vías basado en una matriz de similitud de Bray-Curtis, utilizando como factores al tiempo y el pH en el cual se desarrollaron los embriones con el programa PRIMER-E Ltd 2006, ver 6.1.10.

Debido a que los datos del diámetro de las blástulas resultaron no normales en ambos experimentos, se realizó un ANOVA de una vía por rangos de Kruskal-Wallis para detectar posibles diferencias en el diámetro de las blástulas entre ambas condiciones de cultivo para cada experimento por separado y una prueba de comparación múltiple por el método de Dunn. Por otro lado, para detectar diferencias en el ancho de las gástrulas se aplicó un ANOVA de una vía entre ambas condiciones de cultivo para cada experimento por separado y una prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak.

### ***Química del carbono en el agua de mar***

Para caracterizar el sistema del Carbono de las muestras de agua de los diferentes experimentos se midió en primera instancia el Carbono Inorgánico



Disuelto (CID) con la ayuda del Il-cor (Il-7000 CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O analyzer) y con el programa TCO<sub>2</sub>\_Li700.

Una vez que se obtuvieron los valores del CID de cada muestra se procedió a calcular los parámetros y las especies del sistema del Carbono con el programa CO<sub>2</sub>sys.xls Versión 2012 (Lewis y Wallace, 1998), el cual utiliza como datos de entrada a la temperatura, la salinidad y la presión a la cual se llevó a cabo el experimento y dos variables medidas del CO<sub>2</sub>, en este caso fueron el pH y el CID. Como datos de salida se obtuvieron los parámetros pH, pCO<sub>2</sub> (uatm) y CO<sub>2</sub> (umol/kg-SW), así como las especies de Carbono tales como HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (umol/kg-SW) y el CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (umol/kg-SW).

## Resultados

De acuerdo a los resultados obtenidos de la cinética de fertilización en el pH control (8.0), se observó que a partir de la dilución 3 (D3) el porcentaje de fertilización disminuyó drásticamente y para la dilución 6 (D6) las variaciones en la curva fueron poco perceptibles, por lo que se determinó que para los experimentos sucesivos solo se realizarían cinco diluciones (Fig.19).

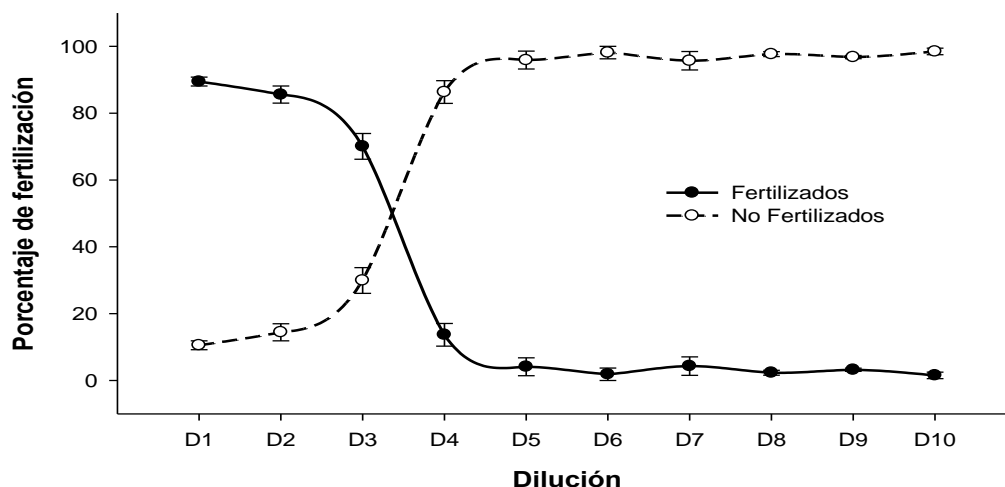


Figura 19.- Porcentaje de óvulos fertilizados y no fertilizados (Media  $\pm$  DE) en un gradiente de concentración de espermatozoides de *Arbacia stellata* AMF a un pH de 8.0.

De acuerdo con el ANOVA ( $H=12.46$ ,  $gl=2$ ,  $N=90$ ,  $p=0.002$ ) existieron diferencias significativas entre los tres experimentos. El experimento 2 fue significativamente diferente al experimento 1 ( $p=0.002$ ) y al 3 ( $p=0.021$ ). Sin embargo, entre estos dos últimos no se detectaron diferencias significativas ( $p=1.0$ ). El factor de dilución en los tres experimentos tuvo una influencia significativa en el porcentaje de óvulos fertilizados (Experimento 1:  $F=127$ ,  $gl=3$ ,  $p<0.001$ , Experimento 2:  $F=106.5$ ,  $gl=3$ ,  $p<0.001$ , Experimento 3:  $F=172.0$ ,  $gl=3$ ,  $p<0.001$ ), por lo que el éxito de fertilización disminuyó a partir de la segunda dilución de espermatozoides para los experimentos 1 y 3 y desde la primera dilución para el experimento 2. Al llegar a la dilución 4 el porcentaje de fertilización fue prácticamente nulo en los tres experimentos.

Se observó una interacción significativa entre el factor de dilución y el pH en el experimento 1 ( $F=16.6$ ,  $gl=4$ ,  $P<0.001$ ). Para la dilución 1 el porcentaje de óvulos fertilizados en el pH 7.5 fue mayor (92.8%) respecto al pH 8.0 (80.29%), observando diferencias significativas ( $P<0.001$ ) en los valores medios entre las condiciones de pH. Para la dilución 2, el porcentaje de fertilización tuvo un comportamiento similar a la anterior, los valores medios del porcentaje de óvulos fertilizados entre ambos tratamientos de pH fueron estadísticamente diferentes ( $p<0.001$ ), 89.1% para el pH 7.5 y 62.1 % para el pH 8. Así mismo para las siguientes diluciones (3 y 4) se estimaron diferencias significativas en el porcentaje de óvulos fertilizados ( $P=0.001$  para ambos casos). Sin embargo el comportamiento que se observó en las primeras diluciones se invirtió para las últimas, siendo el porcentaje de fertilización mayor en el pH 8 (8.6 % para dilución 3 y 0.31 % para la dilución 4), que a pH 7.5 (1.3 % para la dilución 3 y 0.0 % para la dilución 4) ( $p<0.001$ ) (Fig.20). Para la dilución 5 el porcentaje de fertilización para ambos tratamientos fueron similares (2 % para ambos pH) observándose diferencias no significativas ( $P=0.539$ ).

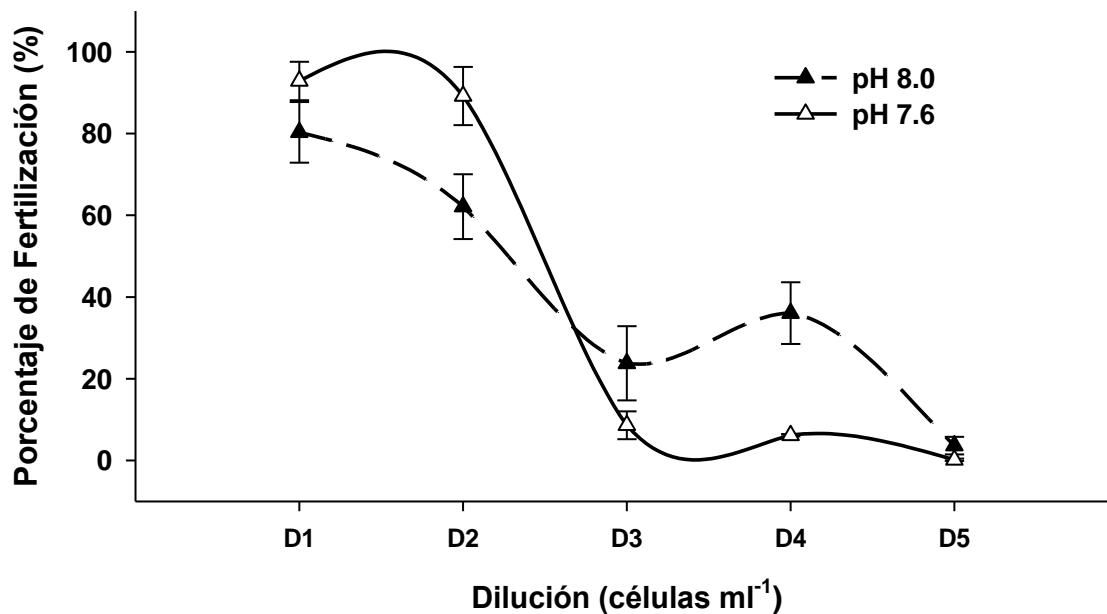


Figura 20.- Porcentaje de óvulos fertilizados (Media  $\pm$  DE) a diferentes concentraciones de espermatozoides de *Arbacia stellata*, para el experimento 1. (Línea punteada con triángulos rellenos pH 8.0, línea sólida con triángulos sin relleno pH 7.5). La densidad de espermatozoides correspondiente a cada una de las diluciones se especifica en la tabla VI.

Para el experimento 2 no se observó una interacción entre la dilución y los niveles de pH ( $F=0.305$ ,  $gl=5$ ,  $p=0.081$ ), mostrando que el porcentaje de fertilización tuvo un decaimiento similar conforme la concentración de espermatozoides disminuía en ambas condiciones de pH, aunque gráficamente el porcentaje de óvulos fertilizados en la dilución 2 fue menor a pH 7.5 (70.9 %) que a pH 8.0 (73.2%) (Fig. 21).

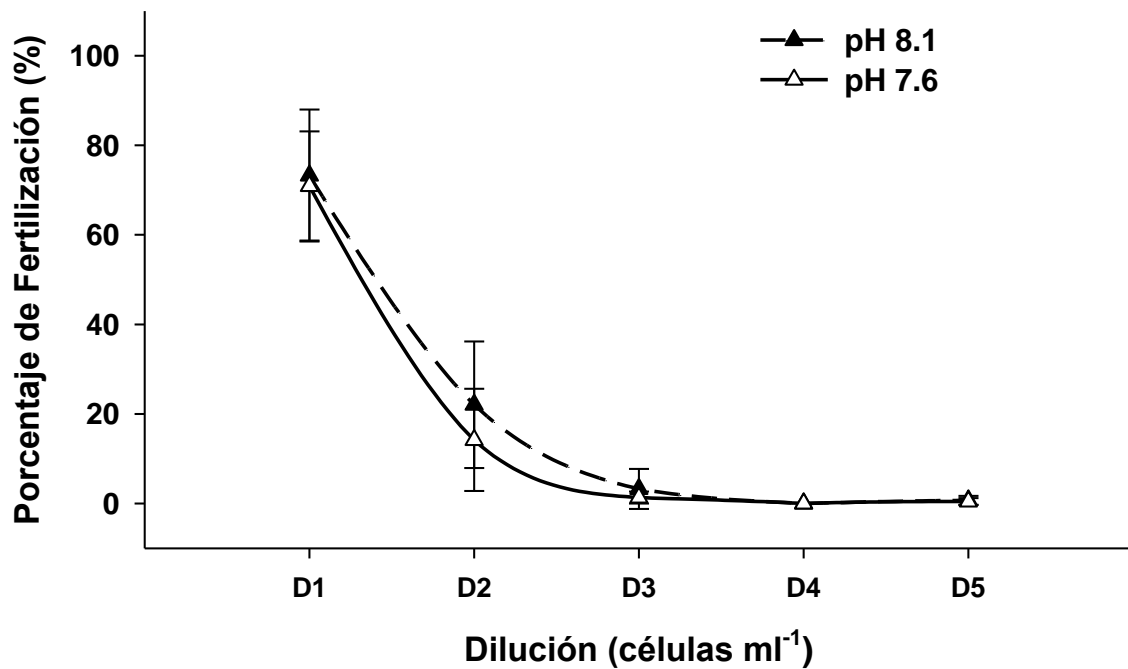


Figura 21.- Porcentaje de óvulos fertilizados (Media  $\pm$  DE) a diferentes concentraciones de espermatozoides de *Arbacia stellata*, para el experimento 2. (Línea punteada con triángulos rellenos pH 8.0, línea sólida con triángulos sin relleno pH 7.5). La densidad de espermatozoides correspondiente a cada una de las diluciones se especifica en la tabla VI.

En el caso del experimento 3, al igual que el experimento 1 el porcentaje de óvulos fertilizados en cada dilución dependió del nivel de pH ( $F=10.828$ ,  $gl=4$ ,  $p<0.001$ ). Para las diluciones 1 y 2 el porcentaje de óvulos fertilizados no fue estadísticamente diferentes entre ambos pH ( $P = <0.001$ ). Para la dilución 3 y 4, el pH aparentemente fue un factor determinante en el porcentaje de fertilización, debido a que dicho porcentaje en las diluciones 3 y 4 para el pH 7.5 fue menor (6.14 y 0.9 %, respectivamente) en comparación con el pH 8 (44 y 13 % respectivamente) (Fig. 22).

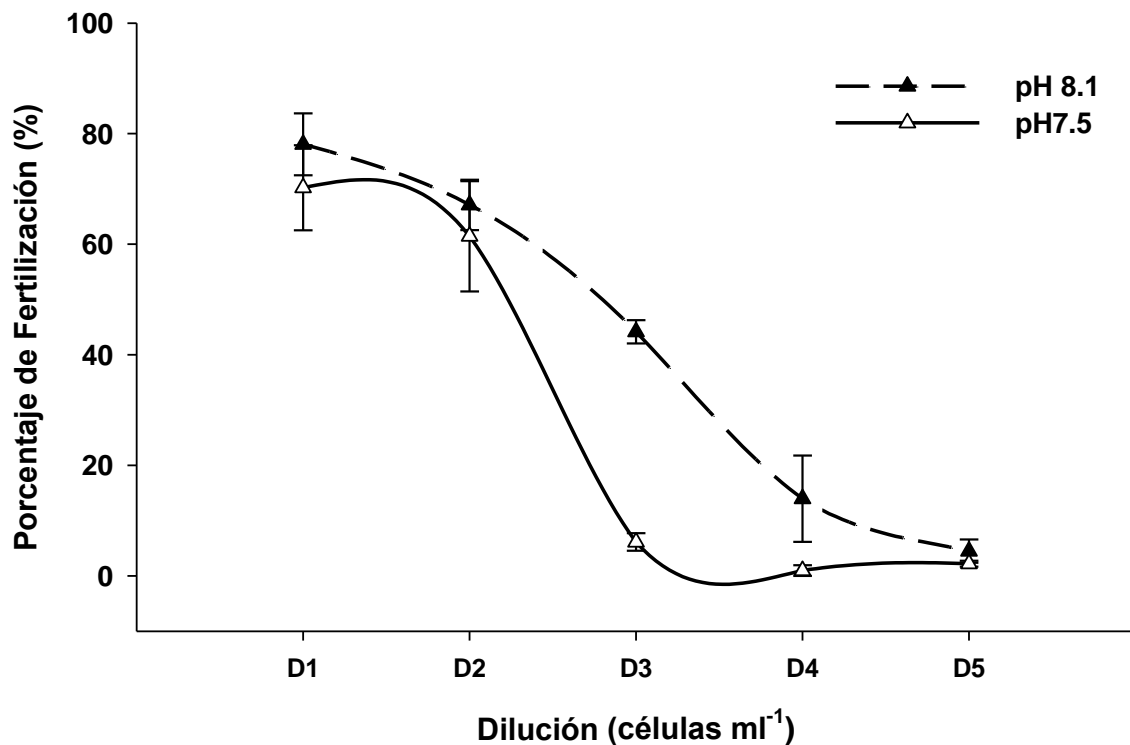


Figura 22.- Porcentaje de óvulos fertilizados (Media  $\pm$  DE) a diferentes concentraciones de espermatozoides de *Arbacia stellata* para el experimentos 3. (Línea punteada con triángulos rellenos pH 8.0, línea sólida con triángulos sin relleno pH 7.5). La densidad de espermatozoides correspondiente a cada una de las diluciones se especifica en la tabla VI.

Las condiciones del agua de mar durante los experimentos del éxito de la fertilización en cada condición de pH se resumen en la Tabla VII. Cabe mencionar que no fue posible calcular el CID del experimento 1 ni las especies de Carbono en el agua de mar, sin embargo, se cuenta con los datos de salinidad, temperatura y pH no recalculado (\*).

Tabla VII.-Propiedades químicas del agua de mar utilizada para los experimentos de fertilización. Los parámetros calculados se obtuvieron utilizando el programa CO2sys.xls Versión 2012 (Lewis y Wallace, 1998) utilizando las constantes de disociación predeterminadas y la escala de pH NBS5.

		pH	pH <sub>rc</sub>	pCO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CO <sub>3</sub> <sup>--</sup>	T	Salinidad
Experimento	1	Control	8.0*	-	-	-	-	18	33.3
		bajo	7.6*	-	-	-	-	18	33.3
	2	Control	8.1	332.66	11.51	1907.78	209.48	18	33.3
		Bajo	7.6	1258.49	43.03	2132.35	70.41	18	33.3
	3	Control	8.1	343.12	11.61	1895.45	207.55	19	33.3
		bajo	7.5	1344.71	45.33	2151.18	68.57	19	33.3

pH<sub>rc</sub>= pH recalculado, pCO<sub>2</sub> (µatm), CO<sub>2</sub> (µmol/kg-SW), HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (µmol/kg-SW), CO<sub>3</sub><sup>--</sup> (µmol/kg-SW), T=Temperatura (°C), Salinidad UPS.

### Efecto de la acidificación en el desarrollo embrionario

El análisis ANOSIM de la proporción (frecuencia de aparición) de los estadios embrionarios para cada tiempo de observación en ambos experimentos realizados no mostró diferencias significativas, (R global= -0.005, p= 0.45), por lo que se agruparon ambos experimentos para su análisis.

Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de aparición de los estadios respecto al tiempo, (R global= 0.555, p= 0.0005). El MDS mostró un patrón de agrupación particular, a las 8 y 12 h después de la fertilización, el porcentaje de blástulas fue del 100%, por lo que están fuertemente agrupados (grupo 1). A partir de 16 horas comenzaron a aparecer las primeras gástrulas (6%), aunque predominaron los embriones en etapa de blástulas (93 %) (Grupo 2). A las 20 h las gástrulas ya alcanzaban el 29 % (grupo 3) y para las 24 h predominaron los embriones en etapa de gástrula (69%), aunque aún había embriones que estaban en etapa de blástulas (grupo 4).

Estadísticamente el porcentaje de embriones en cada etapa, para cada tiempo no varió significativamente para cada condición de pH (ANOSIM R global = 0.023, P= 0.237), es decir que el cambio de estadios ocurrió simultáneamente, tanto en los embriones que se desarrollaron en agua de mar de pH 8.0 como para los expuestos a agua de mar con pH 7.5 (Fig.23).

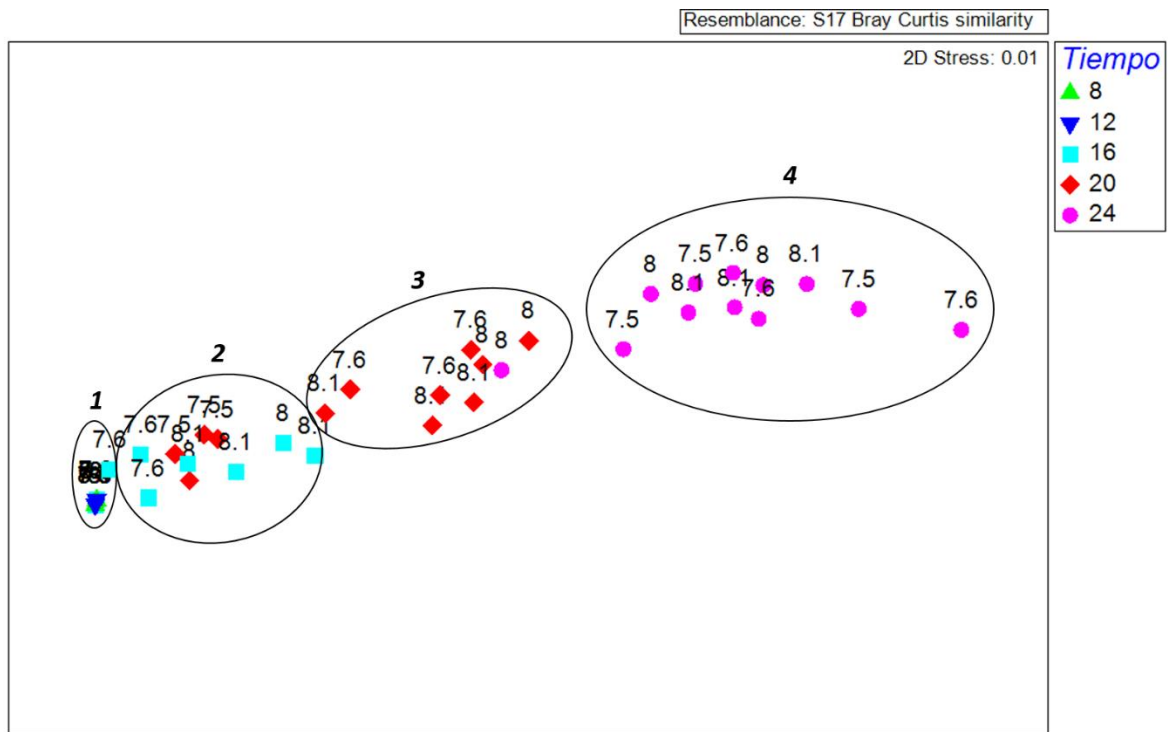


Figura 23.- Ordenamiento del escalamiento multidimensional no-métrico (mMDS) de los tiempos de muestreo (8,12,16,20,24) con respecto al efecto del pH (7.5 y 8.0 para el experimento 1, 7.6 y 8.1 para el experimento 2), en el desarrollo embrionario de *Arbacia stellata*.

El diámetro de los embriones en estadio de blástula varió significativamente en el tiempo ( $H = 142.780$ ,  $gl.= 9$ ,  $p < 0.001$ ) en el experimento 1. Las pruebas pareadas del análisis de varianza, mostraron diferencias significativas en el tamaño de las blástulas entre las condiciones de pH a las 12 h, la tasa instantánea de incremento (TIC) para el pH 8.0 fue de 3.9 %, mientras que para el pH 7.5 disminuyó en un 2.6 %. A las 16 h también hubieron diferencias significativas en el tamaño de las blástulas; en este caso la TIC disminuyó en un

6 % para las blástulas que se desarrollaron en pH 8.0 y la TIC incrementó en un 1.8% para blástulas que se desarrollaron a pH 7.5. A partir de 20 h el desarrollo de las blástulas no mostró diferencias significativas entre los dos tratamientos de pH. Para las 24 h la TIC fue la más alta registrada en todo el experimento para las blástulas en los dos tratamiento (9.3% para pH 8 y 4.8% para el pH 7,5) (Fig. 24).

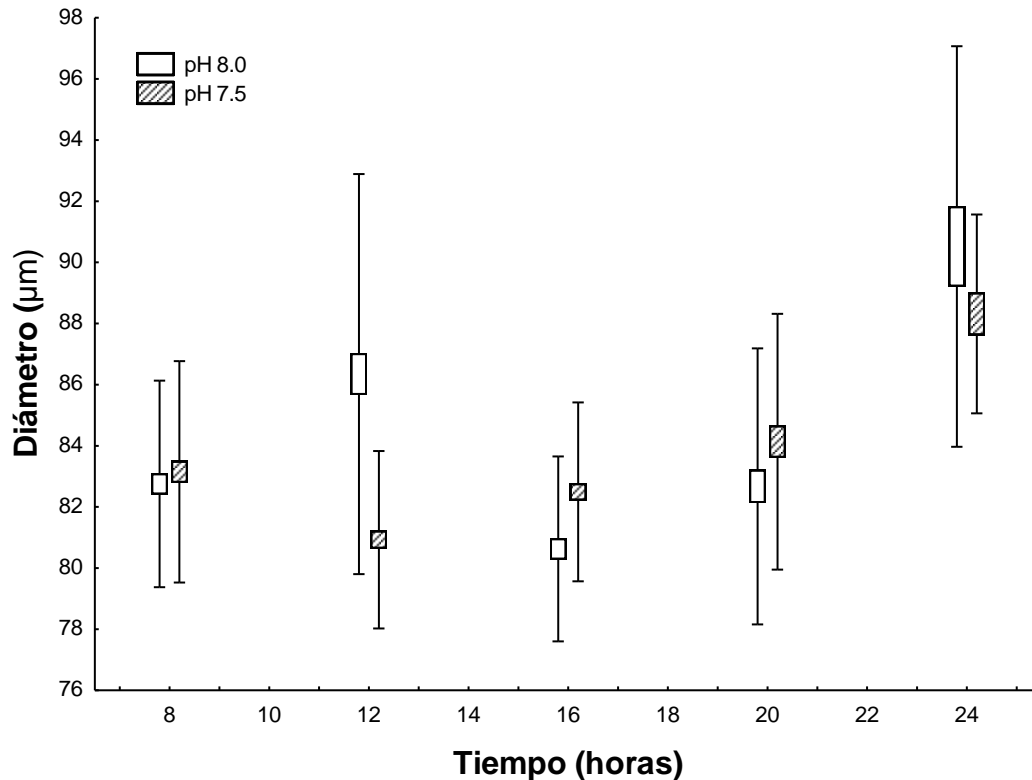


Figura 24.- Diámetro (Media  $\pm$  DE) de las blástulas de *Arbacia stellata* a lo largo del periodo de experimentación, en el experimento 1.

A partir de 16h de cultivo cuando comenzaron a aparecer las gástrulas y hasta las 24 h, se registró un aumento significativo en el tamaño de los embriones en etapa de gástrula en ambas condiciones de pH. La TIC de las gástrulas del pH 8.0 fue de 15.7% y la del pH 7.5 fue de 14.8%, sin embargo, el crecimiento de los embriones no fue estadísticamente diferente entre las dos condiciones de pH ( $F=55.49$ ,  $gl=5$ ,  $P<0.001$ ) (Fig.25).



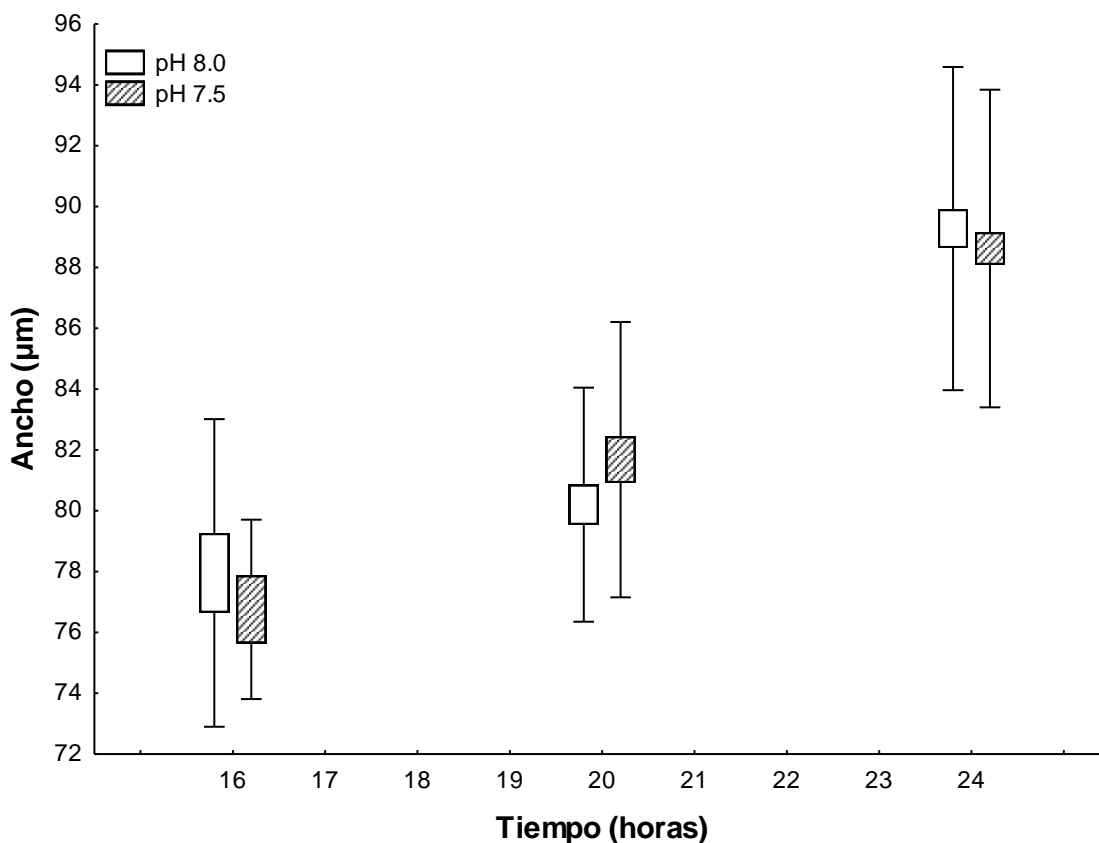


Figura 25.- Ancho (media  $\pm$  DE) de las gástrulas de *Arbacia stellata* a lo largo del periodo de experimentación (experimento 1).

Así mismo para el caso del segundo experimento el diámetro de los embriones en estadio de blástula también varió significativamente en el tiempo ( $H = 175.047$ ,  $gl. = 9$ ,  $p < 0.001$ ). Sin embargo las diferencias en el diámetro de las gástrulas no fueron estadísticamente significativas entre ambas condiciones de pH, excepto para las 16 h cuando el tamaño de las gástrulas desarrolladas en pH 8.1 incrementó con una TIC de 2.83 %, mientras que el diámetro de las gástrulas desarrolladas en pH 7.6 disminuyó en un 0.97 % (Fig.26).

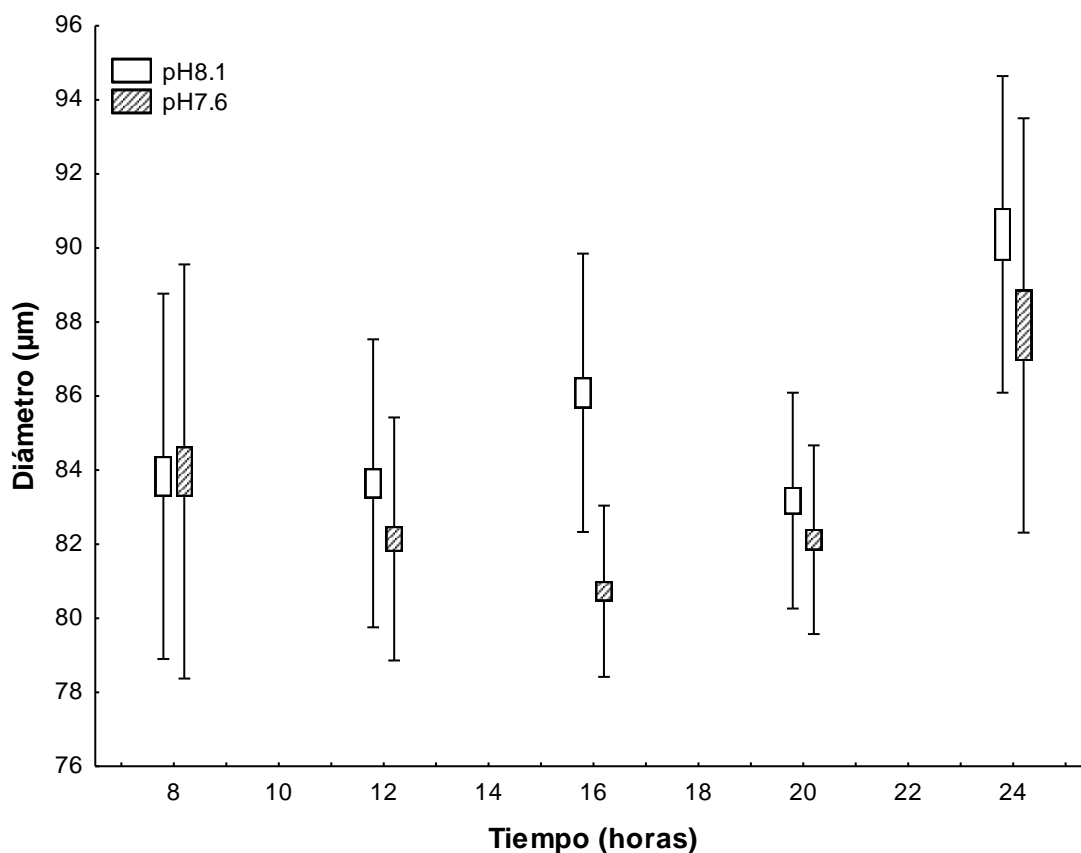


Figura 26.- Diámetro (Media  $\pm$  DE) de las blástulas de *Arbacia stellata* a lo largo del periodo de experimentación (experimento 2).

El desarrollo de la etapa de gástrula para este segundo experimento, comenzó a las 16 h para el pH 8.1, mientras que las gástrulas comenzaron a aparecer a las 20 h en el pH 7.6. El incremento del ancho de las gástrulas de 20 a 24 h fue de 14.3 % para el pH 8 y de 10.4 para el pH 7.5. Este crecimiento no fue significativamente diferente entre los embriones de ambas condiciones de pH ( $F=66.28$ ,  $gl=3$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 27). Las condiciones del agua de mar para los dos experimentos se resumen en la Tabla VIII.

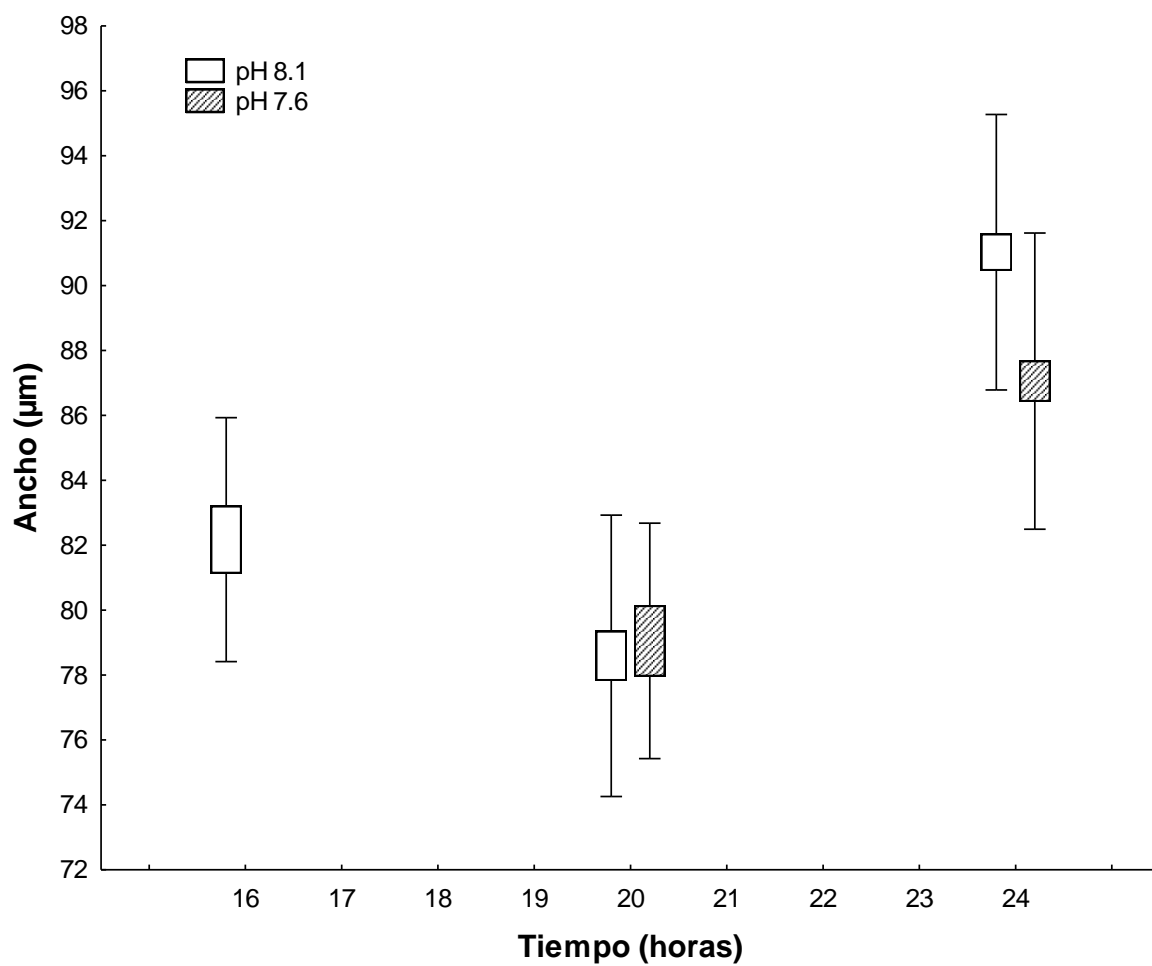


Figura 27.- Ancho (media  $\pm$  DE) de las gástrulas de *Arbacia stellata* a lo largo del periodo de experimentación, (experimento 2).

Tabla VIII.-Propiedades químicas del agua de mar utilizada para los experimentos del desarrollo embrionario. Los parámetros calculados se obtuvieron utilizando el programa CO2SYS utilizando las constantes de disociación predeterminadas y la escala de pH NBS5

	Tiempo (h)	pHrc	pCO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	T	Salinidad
Experimento 1	8	7.5	1138.8	40.2	2061.4	69.3	17.2	33.3
	12	7.5	1085.9	38.6	2053.7	71.4	17.0	33.3
	16	7.5	1108.8	39.1	2055.9	70.7	17.2	33.3
	20	7.5	1186.8	41.2	2053.5	67.6	17.8	33.3
	24	7.5	1184.2	41.5	2072.6	68.1	17.5	33.3
	8	8.0	281.8	10.4	1811.8	202.5	15.8	33.3
	12	8.0	298.5	10.9	1821.1	196.7	16.2	33.3
	16	8.0	312.1	11.2	1833.1	193.6	16.5	33.3
	20	8.0	327.8	11.4	1838.0	194.7	17.6	33.3
	24	8.0	325.3	11.7	1848.3	188.5	16.5	33.3
Experimento 2	8	7.6	1140.2	39.8	2081.9	71.8	17.6	33.3
	12	7.6	1031.4	36.6	2067.5	76.4	17.0	33.3
	16	7.6	1157.0	40.6	2078.4	69.9	17.4	33.3
	20	7.6	1035.2	36.3	2071.7	77.6	17.4	33.3
	24	7.6	1174.6	41.1	2076.6	69.1	17.5	33.3
	8	8.1	307.5	10.7	1827.6	205.2	17.6	33.3
	12	8.1	298.3	10.4	1822.5	209.4	17.5	33.3
	16	8.1	309.0	10.7	1828.7	205.4	17.7	33.3
	20	8.1	317.9	11.0	1834.2	201.3	17.7	33.3
	24	8.1	315.9	11.0	1834.3	201.2	17.6	33.3

pHrc= pH recalculado, pCO<sub>2</sub> (µatm), CO<sub>2</sub> (µmol/kg-SW), HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (µmol/kg-SW), CO<sub>3</sub><sup>-</sup> (µmol/kg-SW), T=Temperatura (°C), Salinidad UPS.

## Discusión

El éxito máximo de fertilización en *A. estellata*, cuantificado como el porcentaje de óvulos fertilizados, se registró en la primera dilución (93-70%), cayendo fuertemente a partir de la dilución 2 en los tres experimentos. Levitan *et al.* (2007), determinaron que para *Strongylocentrotus franciscanus* una concentración menor de diez mil espermatozoides por ml puede limitar el

máximo de fertilización, mientras que la polispermia ocurre a concentraciones cercanas a diez millones de espermatozoides por ml para esa especie, sin embargo, este intervalo puede variar entre especies. Para *A. stellata* se necesitaron aproximadamente cuatro millones de espermatozoides ml para alcanzar los porcentajes máximos de fertilización. El decaimiento del porcentaje de fertilización en diluciones subsecuentes a la primera dilución, quizás se deba a que cuando los espermatozoides se encuentran en suspensiones densas, la probabilidad de encuentro con los óvulos es mayor, pero con la dilución, los espermatozoides se vuelven cada vez más activos, debido a la baja probabilidad del encuentro con un óvulo y se agotan rápidamente. En este caso, resulta una ventaja que los espermatozoides sean de larga vida o que permanezcan inactivos hasta que detecten la presencia de los óvulos (Pennington 1985).

Los porcentajes máximos de fertilización ocurridos a altas cantidades de espermatozoides (primeras dos diluciones) no fueron afectados significativamente por el pH bajo y en el caso del experimento 1, el porcentaje de fertilización a pH bajo fue mayor en la primera dilución. Sin embargo, para los experimento 1 y 3, en las diluciones 3 y 4 los porcentajes de fertilización fueron mayores a pH 8 respecto al pH 7.5, lo cual evidencia que la disminución del pH en el medio es determinante para el espermatozoide y a medida que el pH disminuye en el medio, se necesitarán concentraciones de espermatozoides más altas para lograr un alto éxito de fertilización. Lo anterior también evidencia que la posibilidad de detectar el efecto de la disminución de pH en la fertilización, dependerá de la concentración de espermatozoides utilizada (Reuter *et al.* 2011).

Debido a que a concentraciones bajas de espermatozoides, el efecto del pH fue evidente para dos de tres parejas de erizos, se puede establecer que la eficiencia de los espermatozoides de *A. stellata* se ve afectada por la disminución del pH. Algunos estudios han identificado reducciones en la velocidad de nado del espermatozoide y/o la proporción de espermatozoides móviles en al menos uno de sus tratamientos de pH bajos en algunas especies

de equinodermos (Havenhand *et al.* 2008, Morita *et al.* 2010, Gonzalez Bernat 2011, Reuter *et al.* 2011). En erizos de mar, el pH interno se mantiene por debajo de pH 7.3 en las gónadas por tensión estable de CO<sub>2</sub>, lo que inhibe la respiración y la motilidad (Johnson y Epel 1981). La motilidad flagelar de los espermatozoides se activa cuando son liberados al agua de mar, donde la absorción de sodio (Na<sup>+</sup>) en el espermatozoide desencadena una liberación de iones de hidrógeno (H<sup>+</sup>), causando que el pH interno se incremente hasta 7.5 u 8.0. Este aumento del pH interno induce la activación de la dineína ATPasa y la respiración mitocondrial que da como resultado el inicio de la motilidad con el consecuente desplazamiento de los espermatozoides (Christen *et al.* 1982, Mita y Nakamura 1998). Dado que la motilidad flagelar del espermatozoide es indispensable para la fertilización y está regulada por un cambio del pH del medio intracelular (Christen *et al.* 1982, Lee *et al.* 1983, Nakajima *et al.* 2005), los espermatozoides podrían perder su capacidad para moverse como resultado de una disminución del pH ambiental, esto es, que la acidificación del medio externo puede provocar la acidificación de los fluidos corporales y los cambios en el equilibrio iónico dentro de los gametos (Raven *et al.* 2005); por lo tanto, una futura acidificación del océano podría afectar la motilidad flagelar de los espermatozoides de organismos de reproducción externa, con activación al contacto con el medio, como los erizos de mar. Teniendo en cuenta que la motilidad flagelar de los espermatozoides es indispensable para el transporte del genoma haploide paterno (Morita *et al.* 2010). El efecto combinado de la dilución del esperma y condiciones de pH bajos en el medio marino podrían exacerbar el bajo éxito de la fertilización en poblaciones de *A. stellata* de baja densidad o en áreas con alta turbulencia de agua; sin embargo, la agregación de los adultos o el desove sincronizado podrían contrarrestar el efecto de la dilución de gametos producida por corrientes y mareas (Pennington 1985). Según el estudio del ciclo reproductivo de la población de *A. stellata* distribuida en Punta Banda, esta especie no presenta una estacionalidad marcada en su reproducción (Capítulo 1), sino que algunos individuos de la población desovan parcialmente en algunos meses del año y los desoves con mayor intensidad ocurren en invierno,

cuando no se registran las surgencias locales con condiciones de pH del agua de hasta 7.7. Entonces aparentemente los desoves intensos en meses de no surgencias contrarrestan en parte el efecto de la dilución del espermatozoide y por otro lado evitan las condiciones de pH bajo.

Sin embargo, un escenario futuro de condiciones constantes de pH bajo en el agua de mar, podría ser desfavorable para esta especie si el tamaño de la población disminuye por un efecto de mortalidad natural o pesca. Cabe mencionar que en los gametos de una de las tres parejas estudiadas no se detectaron efectos negativos de la fertilización debido a pH bajo, aun en las diluciones más bajas de espermatozoides, lo cual podría indicar la repuesta de una pre-adaptación por parte de algunos individuos adultos a las condiciones de los eventos de surgencias locales ya que los entornos parentales pueden afectar directamente la plasticidad y el rendimiento de los gametos (Crean y Marshall 2008, Crean *et al.* 2013, Jensen *et al.* 2014).

Los umbrales de tolerancia al cambio climático y otros factores estresantes antropogénicos varían ampliamente entre las especies y aunque pH bajos tienen el potencial de afectar el éxito de la fertilización al cambiar las propiedades de los gametos, los estudios que examinaron este proceso han encontrado que los niveles manipulados de pCO<sub>2</sub>/pH afectaron el éxito de la fertilización solo en algunos casos (Kurihara y Shirayama 2004, Ericson *et al.* 2010, Frieder 2014, Schlegel *et al.* 2015), pero no en otros (Kurihara 2008, Byrne *et al.* 2010, 2013, Byrne 2011, Caldwell *et al.* 2011, Frieder 2014, Sewell *et al.* 2014). Incluso, múltiples estudios sobre una sola especie (*H. erythrogramma*), han arrojado resultados contradictorios, dado que la fertilización se vio afectada sustancialmente por la disminución del pH en un caso (Havenhand *et al.* 2008), mientras que en otros no (Byrne *et al.* 2009, 2010).

Algunos trabajos con etapas posteriores a la fertilización resaltan una capacidad de amortiguamiento a valores bajos de pH, en los que la sobrevivencia no se ve comprometida significativamente. Esta respuesta se ha atribuido a que los embriones y larvas de equinodermos son capaces de regular los cambios de pH

mediante un ajuste fisiológico (O'Donnell *et al.* 2009, Stumpp *et al.* 2011b, 2011a) y/o la plasticidad fenotípica (Chan *et al.* 2011), pero a nivel metabólico el costo puede reducir el crecimiento (Stumpp *et al.* 2011b). Los recursos destinados al crecimiento se desvían al mantenimiento (es decir, regulación ácido-base) y esto puede acentuarse en larvas de invertebrados de vida libre que por lo general, se ven limitadas energéticamente durante el desarrollo planctónico (Hofmann y Todgham 2010). Los embriones de *A. stellata*, según los resultados obtenidos en el presente estudio muestran una capacidad de amortiguamiento, debido a que el costo del metabolismo, estimado con el tamaño del embrión, no fue significativamente diferente a valores bajos de pH en ninguno de los dos experimentos. En el caso de la sincronización en el desarrollo, el paso de blástula a gástrula en el primer experimento ocurrió sincrónicamente a las 16 horas post- fertilización en ambas condiciones de pH, en este caso el pH bajo no retrasó la embriogénesis. No así para el segundo experimento en el que los estadios de gástrulas se alcanzaron a las 16 h en el pH 8 y a las 20 h en el pH 7.5. Sin embargo este retraso no afectó significativamente la tasa de crecimiento de los embriones en los tiempos subsiguientes.

Pese a que varias especies de equinodermos serán afectados negativamente por el calentamiento y la acidificación de los océanos, algunas otras serán más resistentes y tomarán ventaja para ampliar su intervalo de distribución; lo anterior tiene implicaciones para la persistencia de algunas especies, o la invasión de otras lo cual resultará en un reajuste de las comunidades marinas alrededor del mundo. La estrategia reproductiva de *A. stellata* para contrarrestar el efecto de la acidificación del medio a diluciones bajas de espermatozoides, la aparente pre-adaptación de algunas individuos a las condiciones locales y estacionales de bajos pH en el medio y la robustez en el crecimiento de los embriones podrían estar favoreciendo la expansión hacia el norte de su distribución, donde las condiciones de acidificación ya se están experimentando.



## CONCLUSIONES GENERALES

El presente estudio demostró que la población de *Arbacia stellata*, distribuida en Punta Banda, Baja California, México, presenta un ciclo reproductivo semi-continuo, con mayor actividad reproductiva desde finales del verano hasta finales del invierno.

Los organismos analizados mostraron ser gonocóricos y la proporción de sexos fue de 1:1 en la mayoría de los meses estudiados con excepción del mes de abril del 2014.

El índice gonadosomático tuvo una correlación positiva con la clorofila, no obstante, sus valores altos no solo reflejaron la proliferación de gametos, sino también el incremento de nutrientes en organismos inmaduros y células germinales en ciertas porciones de la gónada en crecimiento.

El índice de madurez presentó una correlación positiva con la temperatura y una correlación negativa con la clorofila *a*. Los valores comenzaron a incrementarse al inicio del verano con las temperaturas altas y alcanzaron su máximo en el otoño. El índice de madurez en las hembras presentó su valor máximo en el mes más frío del periodo de estudio (diciembre 2013), con un alto porcentaje de organismos en etapa de desove.

La fecundidad presentó tres picos importantes. El primer pico en enero 2014, coincidió con uno de los valores más bajos de temperatura, el segundo en abril 2014, coincidió con el pico de los valores de clorofila *a* y el tercero en julio 2014 con el valor máximo de la producción primaria neta, el máximo de temperatura y el valor máximo del índice de madurez.

No se observaron estadios discretos de desarrollo durante el ciclo de muestreo debido a la asincronía en el desarrollo de la gónada de los individuos, los cuales presentaron de dos a cuatro estadios de desarrollo, inclusive en la misma gónada. Así mismo, no se detectó una progresión modal en el tamaño de los ovocitos, observándose ovocitos pre-vitelogénicos y vitelogénicos presentes en casi todos los meses de muestreo, siendo los vitelogénicos los más frecuentes.

Los óvulos liberados de *A. stellata* presentaron una coloración rojo marrón intenso y midieron aproximadamente 77  $\mu\text{m}$  de diámetro. El desarrollo embrionario tuvo una duración de aproximadamente 14 h y durante la primera división (dos células) el embrión mide 77  $\mu\text{m}$ , mientras que al final del desarrollo embrionario mide en promedio 84  $\mu\text{m}$  (gástrula temprana); ya una vez formada la gástrula ésta mide en promedio 76  $\mu\text{m}$  de diámetro.

Una vez que el sistema digestivo está desarrollado en el estadio de prisma, *A. stellata* presenta una larva planctotrófica que inicia con el estadio de larva equinopluteus de 4 brazos: los brazos anterolaterales que surgen anteriormente desde la región dorsal adyacente a la boca y los brazos postorales que emergen ventralmente a cada lado del ano larval y se proyectan anteriormente.

La etapa de 6 brazos se caracteriza por la presencia de los brazos posterolaterales que se desarrollan en la región dorsal y se proyectan posteriormente. En la etapa de 8 brazos se desarrollan los brazos preorales en la parte ventral y se proyectan anteriormente. Finalmente en la etapa de 10 brazos, aparecen los brazos posterodorsales, los cuales se desarrollan subsecuentes a los brazos postorales y se proyectan anteriormente.

El desarrollo larval tuvo una duración de aproximadamente 11 días a una temperatura promedio de  $24.2 \pm 2.7^\circ \text{C}$ , a una salinidad de 35 UPS y pH 8. El cuerpo de la larva pluteus midió aproximadamente 130  $\mu\text{m}$  de largo y 120  $\mu\text{m}$  de ancho en su fase inicial (4 brazos) y 270  $\mu\text{m}$  de largo y 350 de ancho en la etapa de 10 brazos, los brazos postorales midieron aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  en la etapa pluteus temprana y alcanzaron 700  $\mu\text{m}$  de largo al alcanzar el estadio competente y antes de iniciar la metamorfosis.

Los juveniles se observaron a partir de los 23 días de cultivo y midieron aproximadamente 280  $\mu\text{m}$  de diámetro, presentan tres espinas juveniles de igual tamaño en cada región interambulacral en la superficie aboral y un pie ambulacral central extensible con un disco terminal en cada ambulacro. Las espinas son transparentes y en forma de remo, cambiando a lanceoladas conforme el juvenil crece.

El éxito de la fertilización (porcentaje de óvulos fertilizados) de la población de *A. stellata* con distribución en la zona templada del hemisferio norte se vio afectado por la acidificación del medio (de pH 8 a pH 7.5) a concentraciones bajas de espermatozoides en dos de tres experimentos realizados con parejas independientes de erizos.

En el experimento 1, los porcentajes más altos de fertilización se observaron a pH bajo (7.6), sin embargo esto se revirtió en las diluciones subsecuentes, cuando la concentración de espermatozoides disminuyó. En el experimento 2, el efecto del pH bajo en el medio no fue significativo en todo el gradiente de concentración de espermatozoides. En el experimento 3 aunque no hay evidencia estadística del efecto de la disminución del pH en el medio, los porcentajes en el éxito de fertilización fueron menores a pH bajo en las diluciones 3 y 4.

Los estadios de desarrollo embrionario estudiados hasta las 24 h después de la fertilización mostraron sincronía en la aparición de las etapas en ambas condiciones de pH en el experimento 1, dado que el estadio de blástula se registró a las 8 y 12 h y a las 16 h inició la etapa de gástrula, la cual continuó desarrollándose hasta las 24 h. Para el experimento 2 se observó un retraso en la iniciación de la gástrula, la cual se observó a las 20 h a pH bajo y a las 16 h a pH normal. Aun cuando hubo un retaso en la etapa de gástrula en el experimento 2, el tamaño tanto de las blástulas como de las gástrulas no varió significativamente entre los dos tratamientos de pH en ninguno de los dos experimentos realizados.

El ciclo reproductivo semicontinuo de *A. stellata* proporciona varios periodos de producción de larvas que en conjunto con el periodo de desarrollo larval relativamente corto, permite un reclutamiento continuo de individuos a la población. Así mismo, los desoves más intensos durante los periodos de no surgencias y la resistencia tanto de los gametos como de los embriones a las oscilaciones de pH bajo, podrían ser rasgos de la especie que podrían estar favoreciendo que esta especie esté incrementando su presencia y abundancia

en el norte de su distribución, lo cual podría tener un impacto en otras especies locales y en la estructura de la comunidad de la fauna de arrecifes rocosos intermareales y submareales del sistema de la corriente de California

## RECOMENDACIONES

Dado que el erizo de mar *Arbacia stellata* presenta una distribución amplia en el Pacífico oriental, se recomienda hacer estudios dirigidos a aspectos poblacionales tales como el asentamiento, la abundancia y el crecimiento individual para complementar la información generada en el presente estudio y tener una visión más completa del tipo de estrategia de la especie. Así mismo, se recomienda estudiar otras poblaciones habitando en diferentes latitudes dentro de su intervalo de distribución, para contrastar la información obtenida en el presente estudio.

Con base en los resultados del efecto de la acidificación del océano obtenidos en el presente estudio, se recomienda realizar experimentos con las etapas subsiguientes del desarrollo (etapa larval y la metamorfosis) de *A. stellata* para conocer de manera más completa como responden las etapas tempranas del desarrollo a la disminución del pH del medio, sobre todo su efecto en procesos de la formación del esqueleto y la fisiología en el asentamiento. Así mismo, es importante considerar aspectos como la reproducción, metabolismo y crecimiento en adultos ya que estos también pueden verse comprometido por la acidificación del medio, debido a que cada etapa de vida difiere en forma y función y los efectos de un factor estresante pueden depender de la etapa de desarrollo considerada.

Por otro lado las herramientas moleculares como estudios de expresión génica pueden agregar nueva información y ser útiles en la comprensión de los fenotipos expresados y los genes involucrados en la calcificación, el metabolismo y respuesta inmune de *A. stellata*, con el objetivo de identificar los

aspectos clave de su respuesta a las tensiones ambientales derivadas de la acidificación del océano.

## Literatura citada

- Abessa, D. M. S., B. R. F. Rachid, y E. C. P. M. Sousa. 2001. Preliminary results in the sexual dimorphism determination of the sea urchin *Lytechinus variegatus variegatus* (Lamarck, 1816), Echinoidea, Toxopneustidae. *Revista Brasileira de Oceanografia* 49:133–135.
- Agnello, M. A. E.-M. 2017. Introductory Chapter: Sea Urchin - Knowledge and Perspectives. Pp 144 *Sea Urchin From Environment to Aquaculture and Biomedicine*. IntechOpen, Rijeka.
- Aminur, R. M., A. Arshad, y F. M. Yusoff. 2014. Sea urchins (Echinodermata: Echinoidea): their biology, culture and bioactive compounds. *Proceedings of the International Conference on Agricultural, Ecological and Medical Sciences (AEMS'14)*:39–48.
- Andersson, A. J., F. T. Mackenzie, y N. R. Bates. 2008. Life on the margin: Implications of ocean acidification on Mg-calcite, high latitude and cold-water marine calcifiers. *Marine Ecology Progress Series* 373:265–273.
- Arab, A, y M. Vaziri. 2010. Sexual Dimorphism in a New Species of Cassiduloid Echinoid, *Pygaulus baghinensis*, from the Aptian Strata of Baghin Area, West of Kerman, Iran. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran* 1:43–47.
- Bastías, R. M., F. Diez, y V. L. Finot. 2014. Absolute and relative growth rates as indicators of fruit development phases in sweet cherry *Prunus avium*. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences, ex Agro-Ciencia* 30:89–98.

- Bay-Schmith, E. 1981. Ciclo anual de reproducción de *Arbacia spatuligera* (Valenciennes, 1846) en Bahía de Concepción. Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción 51:47–59.
- Bay-schmith, E., y J. Pearse. 1987. Effect of Fixed Daylengths on the Photoperiodic Regulation of Gametogenesis in the Sea Urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. International Journal of Invertebrate Reproduction and Development 11:287–294.
- Behrenfeld, M. J., y P. G. Falkowski. 1997. Photosynthetic rates derived from satellite-based chlorophyll concentration. Limnology and Oceanography 42:1–20.
- Benítez-Villalobos, F., O. H. Avila-Poveda, J. P. Díaz-Martínez, y A. R. Bravo-Ruiz. 2015. Gonad development stages and reproductive traits of *Diadema mexicanum* (Echinodermata: Echinoidea) from Oaxaca, Mexico. Invertebrate Reproduction and Development 59:237–249.
- Benzie, J. A. H., y P. Dixon. 1994. The Effects of Sperm Concentration, Sperm:Egg Ratio, and Gamete Age on Fertilization Success in Crown-of-Thorns Starfish (*Acanthaster planci*) in the Laboratory. The Biological Bulletin 186:139–152.
- Bindoff, N. L., J. Willebrand, V. Artale, a Cazenave, J. M. Gregory, S. Gulev, K. Hanawa, C. Le Quere, S. Levitus, Y. Nojiri, C. K. Shum, L. D. Talley, y S. Unnikrishnan. 2007. Observations: oceanic climate change and sea level. Changes AR4:385–432.
- Bögner, D. 2016. Life under Climate Change Scenarios: Sea Urchins' Cellular Mechanisms for Reproductive Success. Journal of Marine Science and Engineering 4:28.

- Bograd, S. J., I. D. Schroeder, y M. G. Jacox. 2019. A water mass history of the Southern California current system. *Geophysical Research Letters* 46.
- Brierley, A. S., y M. J. Kingsford. 2009. Impacts of Climate Change on Marine Organisms and Ecosystems. *Current Biology* 19:R602–R614.
- Brogger, M. I., M. I. Martinez, y P. E. Penchaszadeh. 2010. Reproduction of the sea urchin *Arbacia dufresnii* (Echinoidea: Arbaciidae) from Golfo Nuevo, Argentina. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 90:1405–1409.
- Burcham, D., y N. L. Caruso. 2015. Abundance, size, and occurrence of *Arbacia stellata* in Orange County, California. *California Fish and Game* 101:184–187.
- Byrne, M. 1990. Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the west coast of Ireland. *Marine Biology* 289:275–276.
- Byrne, M. 2011. Impact of ocean warming and ocean acidification on marine invertebrate life history stages: vulnerabilities and potential for persistence in a changing ocean. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 49:1–42.
- Byrne, M., N. L. Andrew, D. G. Worthington, y P. A. Brett. 1998. Reproduction in the diadematoïd sea urchin *Centrostephanus rodgersii* in contrasting habitats along the coast of New South Wales, Australia. *Marine Biology* 132:305–318.
- Byrne, M., M. Ho, P. Selvakumaraswamy, H. D. Nguyen, S. A. Dworjanyn, y A. R. Davis. 2009. Temperature, but not pH, compromises sea urchin fertilization and early development under near-future climate change



scenarios. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276:1883–1888.

Byrne, M., M. Lamare, D. Winter, S. A. Dworjanyn, y S. Uthicke. 2013. The stunting effect of a high CO<sub>2</sub> ocean on calcification and development in sea urchin larvae a synthesis from the tropics to the poles. *Phil Trans R Soc B* 368: 20120439. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2012.0439>.

Byrne, M., N. Soars, P. Selvakumaraswamy, S. A. Dworjanyn, y A. R. Davis. 2010. Sea urchin fertilization in a warm, acidified and high pCO<sub>2</sub> ocean across a range of sperm densities. *Marine Environmental Research* 69:234–239.

Caldeira, K. 2005. Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *Journal of Geophysical Research* 110:C09S04.

Caldeira, K., y M. E. Wickett. 2003a. Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* 425:365.

Caldwell, G. S., S. Fitzner, C. S. Gillespie, G. Pickavance, E. Turnbull, y M. G. Bentley. 2011. Ocean acidification takes sperm back in time. *Invertebrate Reproduction & Development* 55:217–221.

Cameron, A., y E. Davidson. 2006. Poster: The Sea Urchin. *Science* 314:938a–938a.

Cameron, R. A., y R. T. Hinegardner. 1978. Early events in sea urchin metamorphosis, description and analysis. *Journal of Morphology* 157:21–31.

- Cameron, R. A., T. R. Tosteson, y V. Hensley. 1989. The Control of Sea Urchin Metamorphosis: Ionic Effects. Development, Growth & Differentiation 31:589–594.
- Carpizo-Ituarte, E., A. Salas-Garza, y G. Pares-Sierra. 2002. Induction of metamorphosis with KCl in three species of sea urchins and its implications in the production of juveniles Inducción de la metamorfosis con KCl en tres especies de erizos de mar y sus implicaciones en la producción de juveniles. Ciencias Marinas 28:157–166.
- Caso, M. E. 1977. Ordenes Stiridonta y Camarodonta. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Castro, R., y A. Martinez. 2010. Variabilidad espacial y temporal del campo de viento. Dinámica del Ecosistema pelágico frente a Baja California. Página 501 en G. Gaxiola-Castro y R. Durazo, editores. Dinámica del ecosistema pelágico frente a Baja California, 1997–2007. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Cervantes-Hernández, P., y M. Manzano-Sarabia. 2017. Procesamiento y análisis satelital, Windows Image Manager. Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, México.
- Cervantes Díaz, G. Y., M. J. Hernández-Ayón, R. Durazo-Arvizu, L. P. Linacre-Rojas, V. Camacho-Ibar, R. Lara-Lara, A. Siqueiros-Valencia, y C. Bazán-Guzmán. 2013. Variabilidad temporal del sistema del CO<sub>2</sub> y nutrientes frente a las costas de Baja California. Páginas 1–131 en G. G.-C. y R. Durazo, editor. Dinámica del ecosistema pelágico frente a Baja California, 1997–2007. Primera Ed.

- Chan, K. Y. K., D. Grunbaum, y M. J. O'Donnell. 2011. Effects of ocean-acidification-induced morphological changes on larval swimming and feeding. *Journal of Experimental Biology* 214:3857–3867.
- Checkley, D. M., y J. A. Barth. 2009. Patterns and processes in the California Current System. *Progress in Oceanography* 83:49–64.
- Chhak, K., y E. Di Lorenzo. 2007. Decadal variations in the California Current upwelling cells. *Geophysical Research Letters* 34.
- Christen, R., W. Schackmann, y M. Shapiro. 1982. Elevation of the Intracellular pH Activates Respiration and Motility of Sperm of the Sea Urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. 257:14881–14890.
- Cirino, P., C. Brunet, M. Ciaravolo, C. Galasso, L. Musco, T. V. Fernández, C. Sansone, y A. Toscano. 2017. The sea urchin *Arbacia lixula*: A novel natural source of astaxanthin. *Marine Drugs* 15:1–10.
- Cobb, J., y J. M. Lawrence. 2005. Diets and coexistence of the sea urchins *Lytechinus variegatus* and *Arbacia punctulata* (Echinodermata) along the central Florida gulf coast. *Marine Ecology Progress Series* 295:171–182.
- Coppard, S. E., y A. C. Campbell. 2005. Lunar periodicities of diadematid echinoids breeding in Fiji. *Coral Reefs* 24:324–332.
- Crean, A. J., J. M. Dwyer, y D. J. Marshall. 2013. Adaptive paternal effects? Experimental evidence that the paternal environment affects offspring performance. *Ecology* 94:2575–2582.
- Crean, A. J., y D. J. Marshall. 2008. Gamete plasticity in a broadcast spawning marine invertebrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:13508–13513.

- Czihak, G. 1996. Sea urchin embryology in the sixties. *International Journal of Developmental Biology* 40:97–101.
- Donald, C., y C. Henley. 1971. Methods for obtaining and handling marine eggs and embryos [by] Donald P. Costello and Catherine Henley. Woods Hole, Mass., Massachusetts, USA.
- Doney, S. C., V. J. Fabry, R. A. Feely, y J. A. Kleypas. 2009. Ocean Acidification: The Other CO<sub>2</sub> Problem. *Annual Review of Marine Science* 1:169–192.
- Dupont, S., N. Dorey, y M. Thorndyke. 2010a. What meta-analysis can tell us about vulnerability of marine biodiversity to ocean acidification? *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 89:182–185.
- Dupont, S., J. Havenhand, W. Thorndyke, L. Peck, y M. Thorndyke. 2008. Near-future level of CO<sub>2</sub>-driven ocean acidification radically affects larval survival and development in the brittlestar *Ophiothrix fragilis*. *Marine Ecology Progress Series* 373:285–294.
- Dupont, S., B. Lundve, y M. Thorndyke. 2010b. Near future ocean acidification increases growth rate of the lecithotrophic larvae and juveniles of the sea star *Crossaster papposus*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 314 B:382–389.
- Dupont, S., O. Ortega-Martínez, y M. Thorndyke. 2010c. Impact of near-future ocean acidification on echinoderms. *Ecotoxicology* 19:449–462.
- Eaves, A. A., y A. R. Palmer. 2003. Widespread cloning in echinoderm larvae. *Nature* 425:146.
- Emlet, R. B. 1988. Larval Form and Metamorphosis of a “Primitive” Sea Urchin, *Eucidaris thouarsi* (Echinodermata: Echinoidea: Cidaroida), with

Implications for Developmental and Phylogenetic Studies. Biological Bulletin 174:4.

Emlet, R. B. 2010. Morphological evolution of newly metamorphosed sea urchins-a phylogenetic and functional analysis. Integrative and Comparative Biology 50:571–588.

Emlet, R. B., C. Young, y S. B. George. 2002. Phylum Echinodermata: Echinoidea. Páginas 531–551 en American Press, editor. Atlas of marine invertebrate larvae. Craig Young, Mary Rice, Mary Sewell, San Diego.

Engle, J. M., y D. V Richards. 2001. New and unusual marine invertebrates discovered at the California Channel Islands during the 1997-1998 El Nino. Bulletin of the Southern California Academy of Sciences 100:186–199.

Ericson, J. A., M. D. Lamare, S. A. Morley, y M. F. Barker. 2010. The response of two ecologically important Antarctic invertebrates (*Sterechinus neumayeri* and *Parborlasia corrugatus*) to reduced seawater pH: Effects on fertilisation and embryonic development. Marine Biology 157:2689–2702.

Ernst, S. G. 1997. A Century of Sea Urchin Development. American Zoologist 37:250–259.

Ettensohn, C. A. 2017. Sea Urchins as a Model System for Studying Embryonic Development. Module in Biomedical Sciences. Elsevier Inc., Pittsburgh, PA.

Fabry, V. J., B. a. Seibel, R. A. Feely, y J. C. Orr. 2008. Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. ICES Journal of Marine Science 65:414–432.

- Feely, R. A., C. L. Sabine, J. M. Hernandez-Ayon, D. Ianson, y B. Hales. 2008. Evidence for upwelling of corrosive “acidified” water onto the continental shelf. *Science* 320:1490–1492.
- Feely, R. A., C. L. Sabine, K. Lee, W. Berelson, J. Kleypas, V. J. Fabry, y F. J. Millero. 2004. Impact of anthropogenic CO<sub>2</sub> on the CaCO<sub>3</sub> system in the oceans. *Science* 305:362–366.
- Flores-Vidal, X., R. Durazo, R. Castro, L. F. Navarro, F. Dominguez, y E. Gil. 2015. Chapter 12 - Fine-Scale Tidal and Subtidal Variability of an Upwelling-Influenced Bay as Measured by the Mexican High Frequency Radar Observing System. Páginas 209–228 en Y. Liu, H. Kerkering, y R. H. Weisberg, editores. *Coastal Ocean Observing Systems*. Academic Press, Boston.
- Frieder, C. A. 2014. Present-Day Nearshore pH Differentially Depresses Fertilization in Congeneric Sea Urchins. *Biol. Bull.* 226:1–7.
- Gage, J. D. A., y T. Paul. 1991. *Deep sea biology: A natural history of organisms at the deep sea floor*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Gay, P. S., y T. K. Chereskin. 2009. Mean structure and seasonal variability of the poleward undercurrent off southern California. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 114.
- George, S. B., C. Cellario, y L. Fenaux. 1990. Population differences in egg quality of *Arbacia lixula* (Echinodermata: Echinoidea): proximate composition of eggs and larval development. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 141:107–118.
- Ghorani, V., M. S. Mortazavi, E. Mohammadi, E. Sadripour, M. Soltani, N. Mahdavi Shahri, y F. Ghassemzadeh. 2012. Determination of

- developmental stages of embryo in the Sea Urchin, *Echinometra mathaei*. Iranian Journal of Fisheries Sciences 11:294–304.
- Gianguzza, P., y C. Bonaviri. 2013. *Arbacia*. Páginas 275–283 en J. M. Lawrence, editor. Developments in Aquaculture and Fisheries Science. 3rd Edition. Academic Press; 3 edition, Tampa, USA.
- Giese, A., y J. Pearse. 1974. Introduction:general principles. Pp 1–49 en A. :Giese y J. S. Pearse, editores. Reproduction of marine invertebrates. Academic Press, New York.
- Gilbert, S. F. 2000. Developmental Biology. Palgrave Macmillan, Dunfermline, UK.
- Giudice, G. 1973. Chapter 1 - Experimental Embryology of the Sea Urchin. Pp 3–42 en G. Giudice, editor. Developmental Biology of the Sea Urchin Embryo. Academic Press, New York.
- Gonor, J. J. 1973. Sex ratio and hermaphroditism in Oregon intertidal populations of the echinoid *Strongylocentrotus purpuratus*. Marine Biology 19:278–280.
- Gonzalez Bernat, M. J. 2011. Ocean acidification and its potential effects on the early life-history of non-calcifying and calcifying echinoderm (Echinodermata) larvae. Department of Marine Science MSc thesis:124.
- Gosselin, P., y M. Jangoux. 1998. From competent larva to exotrophic juvenile: a morphofunctional study of the perimetamorphic period of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoida). Zoomorphology 118:31–43.
- Granados-Guzmán, A., R. M. Hidalgo-González, y S. Álvarez-Borrego. 1995. Variabilidad temporal de la temperatura en las islas de Todos Santos y

San Jerónimo, Baja California, durante mayo 1992 a marzo de 1993.  
Ensenada.

Guillou, M., y L. Lumingas. 1998. The reproductive cycle of the 'blunt' sea urchin.  
*Aquaculture International* 6:147–160.

Hadfield, M., y V. Paul. 2001. Natural Chemical Cues for Settlement and  
Metamorphosis of Marine-Invertebrate Larvae. Pp 431–461 en B. J. B.  
James B. McClintock, editor. *Marine Chemical Ecology*. CRC Press, Boca  
Raton.

Hamdoun, A., y D. Epel. 2007. Changing world Protection Strategies in Early  
Development : A General Strategy. 104:1745–1750.

Harrington, L. H., C. W. Walker, y M. P. Lesser. 2007. Stereological analysis of  
nutritive phagocytes and gametogenic cells during the annual  
reproductive cycle of the green sea urchin, *Strongylocentrotus*  
*droebachiensis*. *Invertebrate Biology* 126:202–209.

Harvey, E. B. 1939. An Hermaphrodite *Arbacia*. *Biological Bulletin* 77:74–78.

Harvey, E. B. 1949. The Growth and Metamorphosis of the *Arbacia punctulata*  
Pluteus and Late Development of the White Halves of Centrifuged Eggs  
Author (s): Ethel Browne Harvey Published by : The University of Chicago  
Press in association with the Marine Biological Stable. *Biological Bulletin*  
97:287–299.

Havenhand, J. N., F. Buttler, M. C. Throndyke, y J. E. Williamson. 2008. Near-  
future levels of ocean acidification reduce fertilization success in a sea  
urchin. *Current Biology* 18:R651–R652.



- Hendler, G., J. E. Miller, D. L. Pawson, y M. P. Kier. 1995. Sea Stars, Sea Urchins, and Allies: Echinoderms of Florida and the Caribbean. Smithsonian Institution Press. Washington, DC.
- Hickman, C. P. 1998. Field Guide to sea start and other echinoderms of Galápagos. Sugar Spring Press, Virginia, USA.
- Hill, S. K., y J. M. Lawrence. 2003. Habitats and characteristics of the sea urchins *Lytechinus variegatus* and *Arbacia punctatus* (Echinodermata) on the Florida shelf. Marine Ecology 24:15–30.
- Hinegardner, R. T. 1975. Morphology and genetics of sea urchin development. Integrative and Comparative Biology 15:679–689.
- Hofmann, G. E., T. G. Evans, M. W. Kelly, J. L. Padilla-Gamiño, C. A. Blanchette, L. Washburn, F. Chan, M. A. McManus, B. A. Menge, B. Gaylord, T. M. Hill, E. Sanford, M. LaVigne, J. M. Rose, L. Kapsenberg, y J. M. Dutton. 2014. Exploring local adaptation and the ocean acidification seascape studies in the California Current Large Marine Ecosystem. Biogeosciences 11:1053–1064.
- Hofmann, G. E., y A. E. Todgham. 2010. Living in the Now: Physiological Mechanisms to Tolerate a Rapidly Changing Environment. Annual Review of Physiology 72:127–145.
- Holland, N. D. 1967. Gametogenesis During the Annual Reproductive Cycle in a Cidaroid Sea Urchin (*Stylocidaris Affinis*). The Biological Bulletin 133:578–590.
- Hooker, Y., F. A. Solís-Marín, y M. Lleellish. 2005. Equinodermos de las Islas Lobos de Afuera (Lambayeque, Perú). Revista Peruana de Biología 12:77–82.

- Humason, G. L. 1962. Animal tissue techniques. W. H. Freeman, San Francisco.
- Iliffe, T. M., y J. S. Pearse. 1982. Annual and lunar reproductive rhythms of the sea urchin, *Diadema antillarum* (Philippi) in Bermuda.
- Jeffery, C. H., y R. B. Emlet. 2003. Sexually dimorphic sea urchins: Identifying the sexes in *Pentechinus mirabilis*. *Alcheringa* 27:117–123.
- Jensen, N., R. M. Allen, y D. J. Marshall. 2014. Adaptive maternal and paternal effects: gamete plasticity in response to parental stress. *Functional Ecology* 28:724–733.
- Johnson, C. H., y D. Epel. 1981. Intracellular pH of Sea Urchin Eggs Measured by the Dimethyloxazolidinedione (DMO) Method. *The Journal of Cell Biology* 89:284–291.
- Joshi, M., R. von Glasow, R. S. Smith, C. G. M. Paxton, A. C. Maycock, D. J. Lunt, C. Loptson, y P. Markwick. 2017. Global warming and ocean stratification: A potential result of large extraterrestrial impacts. *Geophysical Research Letters* 44:3841–3848.
- Key, R. M., A. Kozyr, C. L. Sabine, K. Lee, R. Wanninkhof, J. L. Bullister, R. A. Feely, F. J. Millero, C. Mordy, y T. H. Peng. 2004. A global ocean carbon climatology: Results from Global Data Analysis Project (GLODAP). *Global Biogeochemical Cycles* 18:1–23.
- Kitazawa, C., T. Fujii, Y. Egusa, M. Komatsu, y A. Yamanaka. 2016. Morphological diversity of blastula formation and gastrulation in temnopleurid sea urchins. *Biology Open* 5:1555–1566.

- Kitazawa, C., H. Nishimura, T. Yamaguchi, M. Nakano, y A. Yamanaka. 2009. Novel Morphological Traits in the Early Developmental Stages of *Temnopleurus toreumaticus*. The Biological Bulletin 217:215–221.
- Kroeker, K. J., R. L. Kordas, R. Crim, I. E. Hendriks, L. Ramajo, G. S. Singh, C. M. Duarte, y J.-P. Gattuso. 2013. Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. Global Change Biology 19:1884–1896.
- Kroh, A., y A. B. Smith. 2010. The phylogeny and classification of post-Palaeozoic echinoids. Journal of Systematic Palaeontology 8:147–212.
- Kurihara, H. 2008. Effects of CO<sub>2</sub> driven ocean acidification on the early developmental stages of invertebrates. Marine Ecology Progress Series 373:275–284.
- Kurihara, H., y Y. Shirayama. 2004. Effects of increased atmospheric CO<sub>2</sub> on sea urchin early development. Marine Ecology Progress Series 274:161–169.
- Lawrence, J., A. Lawrence, y N. Holland. 1965. Annual Cycle in the Size of the Gut of the Purple Sea Urchin, *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson). Nature 205:1238–1239.
- Lebrato, M., D. Iglesias-Rodriguez, R. Feely, D. Greeley, D. Jones, N. Suarez-Bosche, R. Lampitt, J. Cartes, D. Green, y B. Alker. 2009. Global contribution of echinoderms to the marine carbon cycle: a re-assessment of the oceanic CaCO<sub>3</sub> budget and the benthic compartments. Ecological Monographs 80:100318220649095.

- Lee, H. cheung, C. Johnson, y D. Epel. 1983. Changes in internal pH associated with initiation of motility and acrosome reaction of sea urchin sperm. *Developmental Biology* 95:31–45.
- Leinaas, H. P., y H. Christie. 1996. Effects of Removing Sea Urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*): Stability of the Barren State and Succession of Kelp Forest Recovery in the East Atlantic. *Oecologia* 105:524–536.
- Lessios, H. A. 1991. Presence and absence of monthly reproductive rhythms among eight Caribbean echinoids off the coast of Panama. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 153:27–47.
- Lessios, H. A. 2005. Echinoids of the Pacific Waters of Panama: Status of knowledge and new records 53:147–170.
- Lessios, H. A., S. Lockhart, R. Collin, G. Sotil, P. Sanchez-Jerez, K. S. Zigler, A. F. Perez, M. J. Garrido, L. B. Geyer, G. Bernardi, V. D. Vacquier, R. Haroun, y B. D. Kessing. 2012. Phylogeography and bindin evolution in *Arbacia*, a sea urchin genus with an unusual distribution. *Molecular Ecology* 21:130–144.
- Levitan, D. R. 1996. Effects of gamete traits on fertilization in the sea and the evolution of sexual dimorphism. *Nature* 382:153–155.
- Levitan, D. R., M. A. Sewell, y Fu-Shiang Chia. 1991. Kinetics of fertilization in the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*: interaction of gamete dilution, age, and contact time. *Biological Bulletin* 181:371–378.
- Levitan, D. R., C. P. TerHorst, y N. D. Fogarty. 2007. The risk of polyspermy in three congeneric sea urchins and its implications for gametic incompatibility and reproductive isolation. *Evolution* 61:2007–2014.

- Lüthi, D., M. Le Floch, B. Bereiter, T. Blunier, J.-M. Barnola, U. Siegenthaler, D. Raynaud, J. Jouzel, H. Fischer, K. Kawamura, y T. F. Stocker. 2008. High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000–800,000 years before present. *Nature* 453:379.
- Lynn, R. J., y J. J. Simpson. 1987. The California Current system: The seasonal variability of its physical characteristics. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 92:12947–12966.
- Mancilla Peraza, M., y G. Martinez Garcia. 1991. Variación estacional de temperatura, salinidad y oxígeno disuelto en la bahía de todos santos, BC, México (marzo 1986 a junio 1987). *Revista de investigación científica - Área de Ciencias del Mar. Universidad Autónoma de Baja California Sur* 2:33–40.
- McClatchie, S. 2014. Oceanography of the Southern California Current System Relevant to Fisheries. Pp 13–60 en McClatchie, editor. *Regional Fisheries Oceanography of the California Current System: The CalCOFI program*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- McClay, D. R. 2011. Evolutionary crossroads in developmental biology: sea urchins. *Development* 138:2639–2648.
- Melzner, F., M. A. Gutowska, M. Langenbuch, S. Dupont, M. Lucassen, M. C. Thorndyke, M. Bleich, y H. O. Pörtner. 2009. Physiological basis for high CO<sub>2</sub> tolerance in marine ectothermic animals: Pre-adaptation through lifestyle and ontogeny? *Biogeosciences* 6:2313–2331.
- Mercier, A., S. C. Battaglene, y J.-F. Hamel. 2000. Settlement preferences and early migration of the tropical sea cucumber *Holothuria scabra*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 249:89–110.

- Mercier, A., y J.-F. Hamel. 2009. Appendix. Pp 195–236 Endogenous and Exogenous Control of Gametogenesis and Spawning in Echinoderms. Academic Press.
- Metz, E. C., G. Gómez-Gutiérrez, y V. D. Vacquier. 1998. Mitochondrial DNA and bindin gene sequence evolution among allopatric species of the sea urchin genus *Arbacia*. *Molecular Biology and Evolution* 15:185–195.
- Misra, A. K. 2014. Climate change and challenges of water and food security. *International Journal of Sustainable Built Environment* 3:153–165.
- Mita, M., y M. Nakamura. 1998. Energy metabolism of sea urchin spermatozoa: An approach based on echinoid phylogeny. *Zoological Science* 15:1–10.
- Mogami, Y., M. Degawa, y S. Sekiguchi. 1985. Hermaphroditism in the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimu*. *Natural Science Report, Ochanomizu University* 36:147–152.
- Morita, M., R. Suwa, A. Iguchi, M. Nakamura, K. Shimada, K. Sakai, y A. Suzuki. 2010. Ocean acidification reduces sperm flagellar motility in broadcast spawning reef invertebrates. *Zygote* 18:103–107.
- Moulin, L., A. I. Catarino, T. Claessens, y P. Dubois. 2011. Effects of seawater acidification on early development of the intertidal sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816). *Marine Pollution Bulletin* 62:48–54.
- Muñeton-Gómez, M. S., M. Villalejo-Fuerte, y G. García-Melgar. 2000. Manual de técnicas histológicas aplicadas a organismos marinos. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, México.
- Muñoz-Anderson, M. A., J. R. Lara-Lara, S. Álvarez-Borrego, C. Bazán-Guzmán, M. de la Cruz-Orozco, M. A. Muñoz-Anderson, J. R. Lara-Lara, S.

- Álvarez-Borrego, C. Bazán-Guzmán, y M. de la Cruz-Orozco. 2015. Water–air carbon fluxes in the coastal upwelling zone off northern Baja California. *Ciencias Marinas* 41:157–168.
- Nakajima, A., M. Morita, A. Takemura, S. Kamimura, y M. Okuno. 2005. Increase in intracellular pH induces phosphorylation of axonemal proteins for activation of flagellar motility in starfish sperm. *Journal of Experimental Biology* 208:4411 LP-4418.
- Neter, J., M. H. Kutner, C. Nachtsheim, y W. Wasserman. 1996. *Applied Linear Statistical Models*. 4th Editio. WCB McGraw-Hill, New York.
- NOAA. 2019. CarbonTracker CT2017, <http://carbontracker.noaa.gov>.
- Nunes, C. D. A. P., y M. Jangoux. 2007. Larval growth and perimetamorphosis in the echinoid *Echinocardium cordatum* (Echinodermata): The spatangoid way to become a sea urchin. *Zoomorphology* 126:103–119.
- O'Donnell, M. J., A. E. Todgham, M. A. Sewell, L. M. Hammond, K. Ruggiero, N. A. Fangué, M. L. Zippay, y G. E. Hofmann. 2009. Ocean acidification alters skeletogenesis and gene expression in larval sea urchins. *Marine Ecology Progress Series* 398:157–171.
- Oliva-Méndez, N., F. Delgadillo-Hinojosa, P. Pérez-Brunius, A. Valencia-, M. A. Huerta-Díaz, E. Palacios-Coria, y J. M. Hernández-Ayón. 2018. The carbonate system in coastal waters off the northern region of the Baja California Peninsula under La Niña conditions 44:203–220.
- Olivares-Bañuelos, T., S. Figueroa-Flores, y E. Carpizo-Ituarte. 2012. Gonad index and larval development of the sand dollar *Dendraster excentricus* (Echinodermata; Echinoidea) in Baja California, Mexico. *Ciencias Marinas* 38:411–425.

- Orr, J. C., V. J. Fabry, O. Aumont, L. Bopp, S. C. Doney, R. A. Feely, A. Gnanadesikan, N. Gruber, A. Ishida, F. Joos, R. M. Key, K. Lindsay, E. Maier-Reimer, R. Matear, P. Monfray, A. Mouchet, R. G. Najjar, G. K. Plattner, K. B. Rodgers, C. L. Sabine, J. L. Sarmiento, R. Schlitzer, R. D. Slater, I. J. Totterdell, M. F. Weirig, Y. Yamanaka, y A. Yool. 2005. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* 437:681–686.
- Palleiro-Nayar, J. S., G. Montaña-Moctezuma, y O. Sosa-Nishizaki. 2012. Variación espacio-temporal de la densidad poblacional de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* (Echinodermata: Echinoidea: Strongylocentrotidae) en Baja California. *Hidrobiológica* 22:28–34.
- Pares-Sierra, A., M. López, y E. Pavia. 1997. Oceanografía Física del Océano Pacífico Nororiental. Páginas 1–24 en L. M.A, editor. Contribuciones a la Oceanografía Física en México. 1st edición. Unión Geofísica Mexicana, Baja California, México.
- Pawlik, J. R. 1992. Chemical Ecology of the Settlement of Benthic Marine-Invertebrates. Aberdeen University Press, London.
- Pearse, J. S. 1969. Reproductive Periodicities of Indo-Pacific Invertebrates in the Gulf of Suez. II. The Echinoid *Echinometra Mathaei* (De Blainville). *Bulletin of Marine Science* 19:580–613.
- Pearse, J. S. 1970. Reproductive periodicities of indo-pacific invertebrates in the Gulf of Suez. III. The echinoid *Diadema setosum* (Leske). *Bulletin of Marine Science* 20:698–720.
- Pearse, J. S., y R. A. Cameron. 1991. Echinodermata: Echinoidea. Páginas 513–662 en P. V. Pearse, J. S., editor. Reproduction of marine invertebrates. Press, Boxwood, Pacific Grove.



- Pearse, J. S., D. J. Eernisse, V. B. Pearse, y K. A. Beauchamp. 1986a. Photoperiodic regulation of gametogenesis in sea stars, with evidence for an annual calendar independent of fixed daylength. *Integrative and Comparative Biology* 26:417–431.
- Pearse, J. S., J. B. McClintock, y I. Bosch. 1991. Reproduction of Antarctic benthic marine invertebrates: Tempos, modes, and timing. *Integrative and Comparative Biology* 31:65–80.
- Pearse, J. S., V. B. Pearse, y K. K. Davis. 1986b. Photoperiodic regulation of gametogenesis and growth in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Journal of Experimental Zoology* 237:107–118.
- Pearse, J. S., y B. F. Phillips. 1968. Continuous reproduction in the indo-pacific sea urchin *Echinometra mathaei* at rotnest island, western Australia. *Marine and Freshwater Research* 19:161–172.
- Pechenik, J. A. 2006. Larval experience and latent effects metamorphosis is not a new beginning. *Integrative and Comparative Biology* 46:323–333.
- Penchaszadeh, P., y J. M. Lawrence. 1999. *Arbacia dufresnii* (Echinodermata: Echinoidea): A carnivore in Argentinian waters. *Echinoderm Research*: 525–530.
- Pennington, J. T. 1985. The ecology of fertilization of echinoid eggs: the consequences of sperm dilution, adult aggregation, and synchronous spawning. *Biological Bulletin* 169:417–430.
- Pérez, A. F., C. Boy, E. Morriconi, y J. Calvo. 2010. Reproductive cycle and reproductive output of the sea urchin *Loxechinus albus* (Echinodermata: Echinoidea) from Beagle Channel, Tierra del Fuego, Argentina. *Polar Biology* 33:271–280.

- Politi, Y., T. Arad, E. Klein, S. Weiner, y L. Addadi. 2004. Sea urchin spine calcite forms via a transient amorphous calcium carbonate phase. *Science* 306:1161–1164.
- Przeslawski, R., S. Ah Yong, M. Byrne, G. Wörheide, y P. Hutchings. 2008. Beyond corals and fish: The effects of climate change on noncoral benthic invertebrates of tropical reefs. *Global Change Biology* 14:2773–2795.
- Rahim, S. A. K. A., J. Y. Li, y H. Kitamura. 2004. Larval metamorphosis of the sea urchins, *Pseudocentrotus depressus* and *Anthocardis crassispina* in response to microbial films. *Marine Biology* 144:71–78.
- Rahman, M. A., F. M. Yusoff, y A. Arshad. 2014. First Successful Documentation on the Embryonic, Larval and Juvenile Development of the Tropical Sea Urchin, *Diadema Setosum* (Lesk, 1778). International Conference on Agriculture, Food and Environmental Engineering (ICAFEE'2014) Jan. 15-16, 2014 Kuala Lumpur (Malaysia):80–84.
- Rahman, M. A., F. M. Yusoff, A. Arshad, M. N. Shamsudin, y S. M. N. Amin. 2012. Embryonic, larval, and early juvenile development of the tropical sea urchin, *Salmacis sphaeroides* (Echinodermata: Echinoidea). *The Scientific World Journal* 2012.
- Ramirez Llodra, E. 2002. Fecundity and life-history strategies in marine invertebrates. Pp 87–170 en A. J. Southward, P. Tyler, C. M. Young, y L. A. Fuiman, editores. *Advances in Marine Biology*. Academic Press, London, UK.
- Raven, J. A., K. Caldeira, H. Elderfield, O. Hoegh-Guldberg, P. S. Liss, U. Riebesell, J. Shepherd, C. Turley, y A. Watson. 2005. Ocean acidification

due to increasing atmospheric carbon dioxide. Pp Royal Society. The Royal Society, London.

Reuter, K. E., K. E. Lotterhos, R. N. Crim, C. A. Thompson, y C. D. G. Harley. 2011. Elevated pCO<sub>2</sub> increases sperm limitation and risk of polyspermy in the red sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*. *Global Change Biology* 17:163–171.

Reynolds, J. A., y J. E. Wilen. 2000. The Sea Urchin Fishery: Harvesting, Processing and the Market. *Marine Resource Economics* 15:115–126.

Ridgwell, A., y D. N. Schmidt. 2010. Past constraints on the vulnerability of marine calcifiers to massive carbon dioxide release. *Nature Geoscience* 3:196.

Sabine, C. L., R. A. Feely, N. Gruber, R. M. Key, K. Lee, J. L. Bullister, R. Wanninkhof, C. S. Wong, D. W. R. Wallace, B. Tilbrook, F. J. Millero, T. H. Peng, A. Kozyr, T. Ono, y A. F. Rios. 2004. The oceanic sink for anthropogenic CO<sub>2</sub>. *Science* 305:367–371.

Salas-Garza, A., E. Carpizo Ituarte, G. Parés-Sierra, R. Martínez-López, y R. Quintana-Rodríguez. 2006. Juvenile production of the red sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus* (Echinodermata: Echinoidea) in Baja California, México. *Revista de biología tropical*.53(3):345-355.

Scherle, W. 1970. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* 26:57–60.

Schlegel, P., M. T. Binet, J. N. Havenhand, C. J. Doyle, y J. E. Williamson. 2015. Ocean acidification impacts on sperm mitochondrial membrane potential bring sperm swimming behaviour near its tipping point. *Journal of Experimental Biology* 218:1084–1090.

- Sewell, M. A., R. B. Millar, P. C. Yu, L. Kapsenberg, y G. E. Hofmann. 2014. Ocean acidification and fertilization in the antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*: the importance of polyspermy. *Environmental Science & Technology* 48:713–722.
- Shapiro, H. 1935. A case of functional hermaphroditism in the sea urchin *Arbacia punctulata* and an estimate of the sex ratio. *The American Naturalist* 69:286–288.
- Shpigel, M., S. C. McBride, S. Marciano, y I. Lupatsch. 2004. The effect of photoperiod and temperature on the reproduction of European sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture* 232:343–355.
- Silva, J., A. Larrain, E. Bay-Schmith, y R. Roa. 2004. Feeding-regime experiments to enhance gamete production in the carnivorous Sea Urchin *Arbacia spatuligera*. *Aquaculture* 231:279–291.
- Smith, M. M., L. C. Smith, R. A. Cameron, y L. A. Urry. 2008. The larval stages of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Journal of Morphology* 269:713–733.
- Spirlet, C., P. Grosjean, y M. Jangoux. 1998. Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus*: Analysis by means of the maturity index. *Invertebrate Reproduction and Development* 34:69–81.
- Stearns, S. C. 2000. Life history evolution: Successes, limitations, and prospects. *Naturwissenschaften* 87:476–486.
- Strathmann, M. F. 1987. Reproduction and Development of Marine Invertebrates of the Northern Pacific Coast: Data and Methods for the Study of Eggs, Embryos, and Larvae. (M. F. Strathmann, Ed.). University of Washington Press, Seattle.

- Strathmann, R. R. 1975. Larval feeding in echinoderms. *Integrative and Comparative Biology* 15:717–730.
- Stumpp, M., S. Dupont, M. C. Thorndyke, y F. Melzner. 2011a. CO<sub>2</sub> induced seawater acidification impacts sea urchin larval development II: Gene expression patterns in pluteus larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 160:320–330.
- Stumpp, M., J. Wren, F. Melzner, M. C. Thorndyke, y S. T. Dupont. 2011b. CO<sub>2</sub> induced seawater acidification impacts sea urchin larval development I: Elevated metabolic rates decrease scope for growth and induce developmental delay. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 160:331–340.
- Takata, H., y T. Kominami. 2004. Behavior of pigment cells closely correlates the manner of gastrulation in sea urchin embryos. *Zoological science* 21:1025–1035.
- Trasviña, A., M. Ortiz-Figueroa, H. Herrera, M. A. Cosío, y E. González. 2003. 'Santa Ana' winds and upwelling filaments off Northern Baja California. *Dynamics of Atmospheres and Oceans* 37:113–129.
- Vaughn, D., y R. R. Strathmann. 2008. Predators induce cloning in echinoderm larvae. *Science* 319:1503.
- Benítez-Villalobos, F., y M. Martínez-García. 2012. Reproductive biology of the starfish *Pharia pyramidatus* (Echinodermata: Asteroidea) from the Mexican tropical Pacific. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 92:1409–1418.

- Wahle, R. A., y S. H. Peckham. 1999. Density-related reproductive trade-offs in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Marine Biology* 134:127–137.
- Walker, C. W., y M. P. Lesser. 1998. Manipulation of food and photoperiod promotes out-of-season gametogenesis in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*: implications for aquaculture. *Marine Biology (Berlin)* 132:663–676.
- Walker, C. W., M. P. Lesser, y T. Unuma. 2013. Sea urchin gametogenesis - Structural, functional and molecular/genomic biology. Pp 25–43 en L. JM, editor. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. Elsevier Academic Press, United Kingdom.
- Wangensteen, O. S., X. Turon, M. Casso, y C. Palacín. 2013. The reproductive cycle of the sea urchin *Arbacia lixula* in northwest Mediterranean: Potential influence of temperature and photoperiod. *Marine Biology* 160:3157–3168.
- Weber, J., R. Greer, B. Voight, E. White, y R. Roy. 1969. Unusual strength properties of echinoderm calcite related to structure. *Journal of Ultrastructure Research* 26:355–366.
- Wheeler, J. D., K. Y. K. Chan, E. J. Anderson, y L. S. Mullineaux. 2016. Ontogenetic changes in larval swimming and orientation of pre-competent sea urchin *Arbacia punctulata* in turbulence. *The Journal of Experimental Biology* 219:1303–1310.
- Widdicombe, S., y J. I. Spicer. 2008. Predicting the impact of ocean acidification on benthic biodiversity: What can animal physiology tell us? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 366:187–197.

- Williamson, J. E., y P. D. Steinberg. 2002. Reproductive cycle of the sea urchin *Holopneustes purpurascens* (Temnopleuridae: Echinodermata). Marine Biology 140:519–532.
- Yates, F. 1934. Contingency Tables Involving Small Numbers and the  $\chi^2$  Test. Supplement to the Journal of the Royal Statistical Society 1:217–235.
- Zar, J. H. 2010. Biostatistical analysis. 5th Edition. Prentice-Hall, NJ, USA.

## Original Article

**Cite this article:** Díaz-Martínez JP, Carpizo-Ituarte EDJ, Benítez-Villalobos F (2019). Reproductive patterns of the black starry sea urchin *Arbacia stellata* in Punta Banda, Baja California, Mexico. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 1–13. <https://doi.org/10.1017/S0025315419000316>

Received: 19 July 2018

Revised: 28 January 2019

Accepted: 2 April 2019

### Key words:

Echinoidea; seasonal reproduction; starry sea urchin

### Author for correspondence:

Eugenio de Jesús Carpizo-Ituarte,  
E-mail: [ecarpizo@uabc.edu.mx](mailto:ecarpizo@uabc.edu.mx)

# Reproductive patterns of the black starry sea urchin *Arbacia stellata* in Punta Banda, Baja California, Mexico

Julia Patricia Díaz-Martínez<sup>1</sup>, Eugenio De Jesús Carpizo-Ituarte<sup>2</sup>  
and Francisco Benítez-Villalobos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>División de Estudios de Posgrado, Universidad del Mar (UMAR), Campus Puerto Ángel, Distrito de San Pedro Pochutla, Puerto Ángel, Oaxaca, C.P. 70902, México; <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Ensenada, B.C. C.P. 22860, México and <sup>3</sup>Instituto de Recursos, Universidad del Mar (UMAR), Campus Puerto Ángel, Distrito de San Pedro Pochutla, Puerto Ángel, Oaxaca, C.P. 70902, México

## Abstract

Widely distributed species such as *Arbacia stellata* adjust patterns of their life history according to local conditions. In the present study the reproductive cycle of this species was analysed throughout a sampling year. Gonadal development cycle, sex ratio, actual fecundity and oocyte size distribution were characterized and the relationship of these reproductive characteristics with environmental variables such as sea surface temperature, photoperiod, chlorophyll *a* and net primary production evaluated. Our results showed that *A. stellata* is a gonochoric sea urchin. Gametogenesis was classified into six stages for both sexes (immature, growth, pre-maturity I, pre-maturity II, mature and spawning) and no synchrony was observed for the gonads between individuals. The female to male ratio was close to 1:1 in most months. The gonadosomatic index (GSI) showed significant differences between sexes or months; however, the highest values were observed during spring, with positive correlation with chlorophyll *a*. No significant differences were observed in the maturity index (MI) between sexes, with a positive correlation with temperature but negative with chlorophyll. Actual fecundity showed wide variations throughout the year and correlation with chlorophyll *a* and temperature. Oocyte size distribution was unimodal and the predominant frequency was that of mature oocytes. The reproductive cycle of *A. stellata* has a semi-continuous pattern for both sexes and partial spawning throughout the year in the sampling site. We observed nutrient assimilation in the gonads during spring and a larger reproductive activity from late summer to early winter.

## Introduction

Sea urchins from shallow waters are considered to be entirely tropical or temperate, and very limited overlap occurs in the subtropics. The genus *Arbacia* is represented by species that are distributed in shallow waters from temperate to the tropics, such as *Arbacia lixula* (Linneo, 1758), *A. punctulata* (Lamarck, 1816) and *A. stellata* (Blainville, 1825). Some species are restricted to temperate and sub-Antarctic zones in the southern hemisphere, such as *A. spatuligera* (Valenciennes, 1846), *A. crassispina* (Mortensen, 1910) and *A. dufresnii* (Blainville, 1825) (Lessios *et al.*, 2012). However, *A. crassispina* and *A. dufresni* are probably not separate species, and represent two morphs. They are not distinct in either the mitochondrial or the nuclear gene, but Lessios *et al.* (2012) does not formally synonymize the two species (Gianguzza & Bonaviri, 2013).

Reproduction is one of the most important features of the life history. Species that are widely distributed such as *A. stellata* adjust their life-history patterns according to local conditions. Consequently, success of populations is directly related to settlement and recruitment rates, which in turn are related to the reproductive strategy (Stearns, 2000). Giese & Pearse (1974) established that species should synchronize reproduction with environmental conditions that will be most favourable for the survival of offspring, and often gametogenesis begins before these conditions occur. Gametogenesis in echinoids is modulated by several endogenous and environmental factors (Giese & Pearse, 1974; Byrne, 1990; Mercier & Hamel, 2009).

Reproduction has been studied for some populations of *Arbacia* (Tavares, 2004; Kino, 2010; Wangenstein *et al.*, 2013; Epherra *et al.*, 2015). Tavares (2004) found that in *A. lixula* from Paraná state in Brazil, mature individuals were present during the whole sampling period, with female gonads in the resting state and male gonads in proliferation. The same species (*A. lixula*) in north-west Spain exhibits a seasonal cycle with spawning late spring to summer (from May to July) and during autumn (from October to November); the gonadosomatic index (GSI) followed the same trend as the photoperiod and has a strong relation with the average sea surface temperature (SST). Asynchrony was observed among individuals with several stages of development in the same gonad (Wangenstein *et al.*, 2013). *Arbacia punctulata* reproduces throughout the summer (June to August) in Florida and this pattern may vary with inter-annual temperature fluctuations (Harvey, 1956). *Arbacia dufresni* presents two spawning





periods, the first during spring and the second and more intense during summer in Nuevo Golfo, Argentina (Brogger *et al.*, 2010). *Arbacia spatuligera* reproduces during spring in Bahía Concepción in Chile (Bay-Schmith, 1981). Although it has been reported that the species of *Arbacia* are mainly gonochoric, Shapiro (1935) and Harvey (1956) reported incidences of hermaphroditism. Finally, Epherra *et al.* (2015) on the eastern coast of Patagonia looked at two sea urchin populations of *A. dufrenoyi*, with different oceanographic regimes, and found that one population presented a strong seasonal pattern of reproduction with gonads showing re-absorption and accumulation of reserves at different seasons, in contrast to the other where mature gametes were found throughout the year. Most reproductive aspects have been documented for several species of the genus *Arbacia*, but there are no data on the reproductive cycle of *A. crassispina*, as well as *A. stellata* (Gianguzza & Bonaviri, 2013).

Distribution of *A. stellata* extends along the Pacific coast of North, Central and South America, from southern California to Peru, including the Galapagos Islands and the peninsular coasts of the Gulf of California (Mortensen, 1935; Clark, 1948; Brusca, 1980; Metz *et al.*, 1998; Hooker *et al.*, 2005; Burcham & Caruso, 2015). *Arbacia stellata* is not very abundant, living in small numbers and as solitary individuals (Morris *et al.*, 1980; Lessios, 2005; Carlton, 2007), but is starting to appear as one of the most common species at its northern distribution, being the third most common in localities as Laguna Beach in southern California (Burcham & Caruso, 2015). With its increase along de Baja California and California, *A. stellata* could have an impact on local sea urchin populations or other benthic invertebrates of commercial or ecological value. Its reproductive strategy may be critical to their success in further expansion to northern habitats. To fill in this information gap, the present work examines in detail the reproductive cycle of *A. stellata* in a one-year period in the northern extreme of its distribution. We also describe for the first time detailed aspects of its gametogenesis. We performed a detailed histological examination to quantify the progression of cellular events associated with gonad growth, gametogenesis, maturation and spawning.

## Materials and methods

### Sample collection and measurement

About 20 individuals of *Arbacia stellata* (mean test diameter of  $47.1 \pm 6.0$  mm, mean high test of  $26.0 \pm 4.1$  mm and mean wet weight of  $62.7 \pm 19.4$  g) were haphazardly collected monthly by scuba from November 2013 to October 2014. Specimens were collected on rocky substratum at ~5 m depth in Punta Banda ( $31^{\circ}44'39.92''\text{N}$   $116^{\circ}42'13.69''\text{W}$ ), located off the north-west coast of the Baja California peninsula, Mexico. Samples were transported to the Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo of the Instituto de Investigaciones Oceanológicas at the Universidad Autónoma de Baja California (UABC), where they were placed in seawater at  $4^{\circ}\text{C}$  for 24 h (to prevent spawning) for their subsequent dissection, measurement and extraction of gonads.

Samples were dissected and macroscopic characteristics of gonads recorded such as colour, texture, position, shape and size. Gonads were extracted and the wet weight was estimated with a digital scale ( $\pm 0.001$  g). Volume of the gonad was measured by displacement of the fluid method until a hydrostatic equilibrium was reached, using a variation of the Mohr–Westphal balance (Scherle, 1970; Nagy & Pieri, 1975).

Sea surface temperature (SST), net primary production (NPP) and chlorophyll, as well as photosynthetically active radiation (PAR) were obtained from satellite information through monthly

images. The information was obtained from the Ocean Colour Web portal at 4 km in the HDF format and with a level of L3 Processing (in decimal degrees Long-Lat) from the Aqua Modis sensor. Photoperiod (Fp) was estimated using the model developed by the KCANE Project of the Department of Physical Oceanography at CICESE.

### Histological processing and microscopic examination

Gonads were fixed in Bouin's solution for 72 h and preserved in 70% alcohol. Soon after they were dehydrated in graded ethanol series, cleared in Citrisolv<sup>®</sup>, infiltrated and embedded in paraffin wax using the routine inclusion technique for the Histokinette and finally sectioned at  $7\text{ }\mu\text{m}$  and stained with haematoxylin and eosin as described by Humason (1979).

Stages of gonad development were identified on the basis of the cellular characteristics of the nucleus, cytoplasm, and follicular and germinal epithelial wall, according to the criteria proposed by Pérez *et al.* (2010). The reproductive cycle was defined based on the proportion of individuals found every month in each of the gonadal developmental stages. Six stages were considered for both sexes: (1) immature, (2) growth, (3) pre-maturity I, (4) pre-maturity II, (5) maturity and (6) spawned.

Oogenesis and spermatogenesis were described using the histological sections. At least 100 oocytes per gonad, per female and sectioned through the nucleus, were measured (Feret diameter) using the image analysis package Image J 1.41. Oocyte size frequencies were compared with GSI.

To quantify reproductive status, two indices were calculated for females and males, as well as for both sexes combined. (1) The traditional gonadosomatic index (GSI), calculated as  $\text{GSI} = [\text{GW}/(\text{TBW} - \text{GW})] \times 100$ , where GW = gonad wet weight and TBW = total body weight, and (2) the maturity index (MI); this index is also known as the microscopic maturity index because it provides a weighted mean of the microscopic stage of development of the gonads for the majority of individuals in the population at a certain time. Thereby, each MI value indicates its respective gonad development stage throughout the collecting period. It has been applied in several echinoderms (Sewell, 1992; Oyarzún *et al.*, 1999; Despalatović *et al.*, 2004; Kazanidis *et al.*, 2014). The MI was calculated as  $\text{MI} = \sum (\text{ni} \times \text{si})/\text{N}$ , where ni = the number of sea urchins at each microscopic gonadosomatic index stage (i.e. GDS), si = the numerical score attributed to each stage (i.e. GDS-I = 1, GDS-II = 2, GDS-III = 3, GDS-IV = 4, GDS-V = 5, GDS-V = 6), and N is the total number of sea urchins collected monthly. Thereby, each MI value indicates its respective gonad development stage throughout the collecting period. We tried to sample only one size of sea urchin for histological analysis. Table 1 summarizes the sizes and weights of the sea urchins sampled.

Monthly values of fecundity were quantified as the total number of vitellogenic oocytes ( $F_{\text{vo}}$ ) per female (actual fecundity gives an estimation of the number of eggs that would be released in the following spawning event, but not the precise eggs produced) from the mean volume of oocytes and the gonad volume (GV) in each female. Oocyte volume (OV) of at least 100 oocytes sectioned across the nucleus, per female, per month, was calculated assuming a spherical shape  $[\text{OV} = (4 \times \pi \times r^3)/3]$  and averaged. Fecundity was estimated as follows:

$$F_{\text{vo}} = V_{\text{g}}/[V_{\text{vo}} + (V_{\text{nvo}} \times P)]$$

where  $V_{\text{g}}$  = volume of the gonad,  $V_{\text{vo}}$  = mean volume of a vitellogenic oocyte,  $V_{\text{nvo}}$  = mean volume of a non-vitellogenic oocyte,  $P$  = ratio between non-vitellogenic and vitellogenic oocytes:  $P = N_{\text{nvo}}/N_{\text{vo}}$ ,  $N_{\text{nvo}}$  = number of non-vitellogenic oocytes counted

**Table 1.** Morphometric measurements of the specimens of *Arbacia stellata* analysed during the sampling period.

		Male					Female			
		Diameter mm			Weight g	N	Diameter mm			Weight g
Date	N	Min	Max	Mean	Mean ± SD	N	Min	Max	Mean	Mean ± SD
November-13	12	41.1	52.5	47.7	67.5 ± 12	9	41.5	51.0	45.9	58.9 ± 14
December-13	14	36.6	51.3	43.0	47.9 ± 9	8	38.8	49.6	42.7	47.5 ± 6
January-14	11	47.8	55.2	50.6	74.7 ± 7	13	45.5	53.0	49.6	73.1 ± 19
February-14	12	32.4	46.4	38.6	34.7 ± 6	12	31.3	50.1	37.4	33.3 ± 11
March-14	12	46.6	56.8	51.5	77.8 ± 9	11	38.3	52.5	48.1	65.7 ± 14
April-14	6	40.0	53.5	46.3	59.4 ± 15	18	39.6	52	47.4	63.9 ± 15
May-14	11	47.3	57.7	52.3	79.0 ± 11	12	10.5	57.7	45.4	67.3 ± 27
June-14	11	45.8	56.2	50.3	73.9 ± 11	10	46.8	54.4	49.8	69.6 ± 13
July-14	12	34.7	50.2	44.1	53.2 ± 17	12	37.3	55.5	45.5	55.9 ± 18
August-14	11	39.0	54.9	49.7	69.8 ± 17	12	41.1	52.1	46.2	55.3 ± 10
September-14	12	41.0	61.0	49.2	68.0 ± 21	10	37.3	49.8	45.8	68.3 ± 13
October-14	11	44.3	57.0	49.5	67.6 ± 10	12	41.9	55.5	49.1	65.5 ± 13

on a subsample of 100 oocytes per gonad,  $N_{vo}$  = number of vitellogenic oocytes counted on a subsample of 100 oocytes per gonad (Ramírez-Llodra, 2002; Ramírez-Llodra *et al.*, 2002). It is important to point out that this is an estimate of fecundity based on converting non-vitellogenic oocytes into their equivalent mass to vitellogenic oocytes.

### Statistical analysis

Sex ratio (male:female) was calculated monthly, and deviation from the expected ratio of 1:1 was tested with the Chi square goodness of fit test, using Yates' correction for continuity (v2c), due to degrees of freedom = 1 (Yates, 1934; Zar, 2010). The GSI and fecundity data did not fulfil the assumptions of normality and homoscedasticity (Shapiro–Wilk and Levene tests, respectively), for which non-parametric tests were applied. For GSI a Kruskal–Wallis one way analysis of variance on ranks was performed to identify significant differences among months, whereas a Mann–Whitney rank sum test was used to identify significant differences between sexes. To determine if there were significant differences among values of the MI regarding sexes, a Student's t-test was applied. To determine if there were significant differences among monthly values of fecundity a Kruskal–Wallis one way analysis of variance on ranks and Dunn's pairwise multiple comparison test were performed. The relationship of GSI and MI with the environmental variables, SST, photoperiod and net primary production was evaluated by a stepwise multiple linear regression (MLR). Statistical analyses were carried out using STATISTICA® 7. Statistical significance was accepted at  $P < 0.05$  for all tests (Table 2 summarizes the statistical analysis used with the corresponding results obtained and shown in the following section).

## Results

### Sex-ratio and gonad morphology

*Arbacia stellata* is confirmed to be a gonochoric species since no hermaphroditism was found from the total sample of 283 sea urchins, showing an annual sex ratio (m:f) of 0.96:1, which

does not differ significantly from 1:1 ( $\chi^2 = 10.60$ ,  $df = 11$ ,  $\alpha = 0.05$ ), except in April 2014 (sex ratio 0.96:3). Gonads of *A. stellata* are irregular sacs positioned more skewed towards the aboral region. Colour of the female gonads varied from whitish-yellow in immature to dark purple in mature ones. In males, the colouration was usually milky yellow in all stages.

### Gonad developmental stages

#### Females

The immature stage was characterized by the gonad lumen being occupied by a network of nutritive phagocytes of pale colour, with large vesicles of dark colour in the cytoplasm. Also, a few pre-vitellogenic oocytes with basophilic cytoplasm attached to the gonad walls were also observed (Figure 1A). The growth stage showed the beginning of vitellogenesis, characterized by the presence of primary vitellogenic oocytes, attached to the acini wall. The cytoplasm of these oocytes was stained pale purple showing a decrease in acidophilia. Distributed in the centre of the gonad lumen, nutritive phagocytes containing empty vacuoles or granular material were observed (Figure 1B).

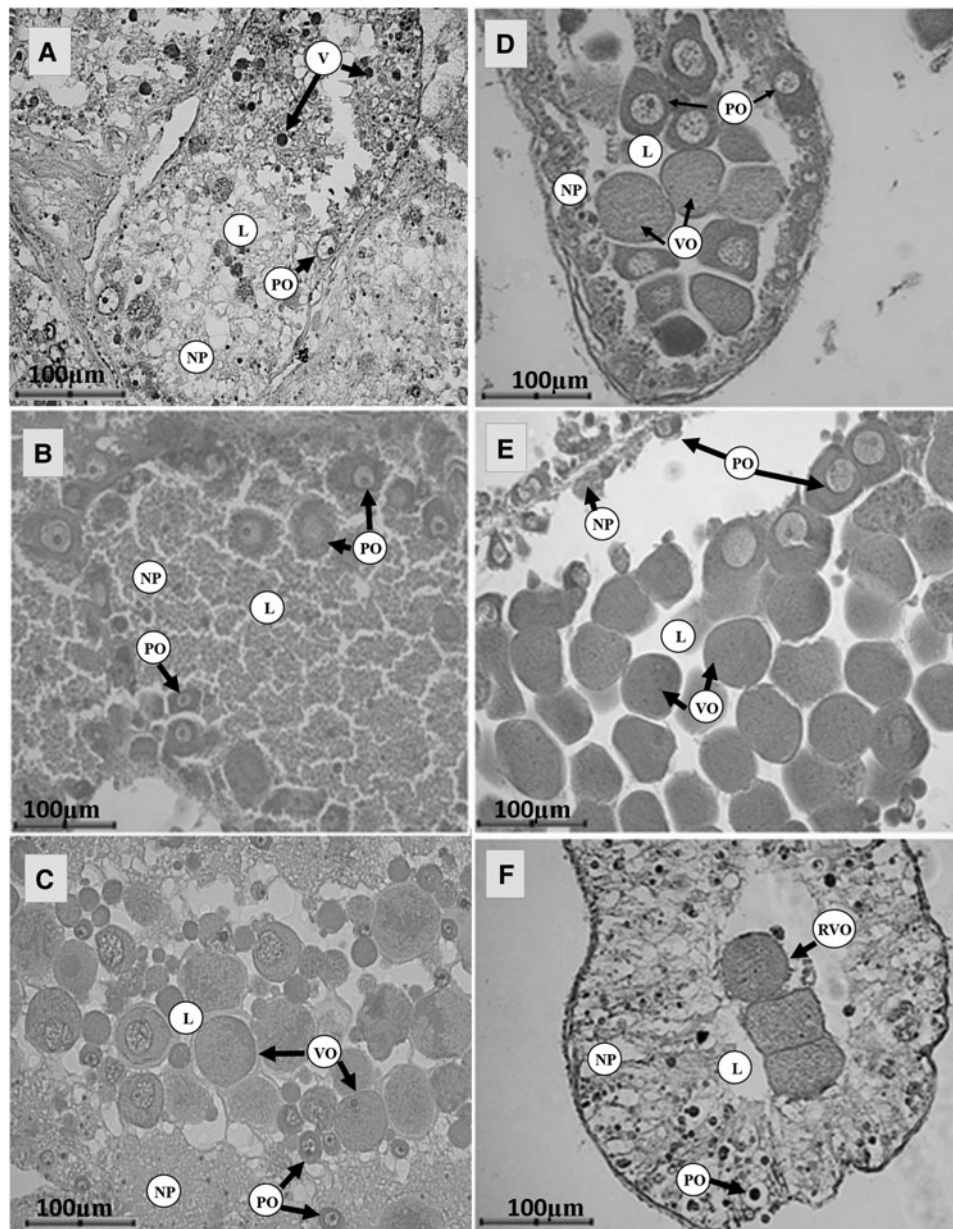
In the pre-maturity I stage, the number and size of vitellogenic oocytes increased associated with a reduction in the abundance of nutritive phagocytes and glycoprotein material. The gonad contains oocytes in all stages of development but the number of mature oocytes is very low. The vitellogenic oocytes with acidophilic cytoplasm are pear-shaped and are projected into the lumen (Figure 1C). In the pre-maturity II stage, an increase in the number and size of the oocytes that retained the characteristic reddish colouration was observed, and a small number of mature eggs with a finely granular cytoplasm with no visible nucleus were found in the centre of the gonad lumen (Figure 1D).

At the maturity stage, the follicle contained numerous mature eggs, densely packed in the lumen, and a small number of nutritive phagocytes and primary oocytes were located along the follicle walls (Figure 1E). Finally the spawning stage was characterized by the presence of a small number of remaining eggs. At this stage, the wall of the follicle is thick and there is an

**Table 2.** Summary of results obtained from the statistical analyses. GSI = Gonadosomatic Index, MI = Maturity Index. Statistical significance was accepted at  $P < 0.05$  for all tests.

Parameters	Test	N	df	Statistical contrast	<i>P</i> values <i>a priori</i>	<i>P</i> values <i>a posteriori</i>	Results
Sex ratio	$\chi^2$ goodness of fit	279	11	$\chi^2 = 10.602$	<0.05	0.477	The proportion of males and females do not vary from 1:1
GSI: Differences between months	Kruskal–Wallis One Way ANOVA on Ranks	279	11	$H = 143.406$	<0.05	<0.001	The differences in the median GSI values among months are significant
GSI: Differences between sexes	Mann–Whitney Rank Test Sum	279	1	$U = 8876.000$	<0.05	0.100	The difference in the median values of GSI between sexes is not significant
MI: Differences between sexes	<i>t</i> -Student test	24	22	$T = -0.656$	<0.05	0.518	The difference in the mean values of MI between sexes is not significant
Fecundity: Differences between months	Kruskal–Wallis One way ANOVA on Ranks and Dunn’s Pairwise Multiple Comparison test	93	11	$H = 45.445$	< 0.05	<0.001	The differences of the fecundity median values among months are significant The months in which the values were different are: April 2014 and September 2014 April 2014 and December 2013 April 2014 and November 2013 April 2014 and October 2013 January 2013 and September 2013 January 2013 and December 2013
Relationship of the GSI with the environmental variables	Stepwise multiple linear regression	12	1,10	$R = 0.71, R^2 = 0.50, \text{Adj } R^2 = 0.45, F = 10.16$	< 0.05	0.009	GSI values can be predicted from a linear correlation of the chlorophyll
Relationship of the MI with the environmental variables	Stepwise multiple linear regression	12	2, 90	$R = 0.73, R^2 = 0.53, \text{Adj } R^2 = 0.43, F = 5.175$	< 0.05	0.032	MI values can be predicted from a linear combination of the chlorophyll and temperature
Relationship of fecundity with the environmental variables	Stepwise multiple linear regression	12	2,90	$R = 0.74, R^2 = 0.55, \text{Adj } R^2 = 0.45, F = 5.53$	< 0.05	0.027	Fecundity values can be predicted from a linear combination of the chlorophyll and temperature
Relationship of the MI with the environmental variables	Stepwise multiple linear regression	12	2, 90	$R = 0.73, R^2 = 0.53, \text{Adj } R^2 = 0.43, F = 5.175$	0.032	MI values can be predicted from a linear combination of the chlorophyll and temperature	
Relationship of fecundity with the environmental variables	Stepwise multiple linear regression	12	2,90	$R = 0.74, R^2 = 0.55, \text{Adj } R^2 = 0.45, F = 5.53$	0.027	Fecundity values can be predicted from a linear combination of the chlorophyll and temperature	





**Fig. 1.** Micrographs of gonadal stages of *Arbacia stellata* females: (A) immature, (B) growth, (C) pre-maturity I, (D) pre-maturity II, (E) maturity and (F) spawning. NP, nutritive phagocyte; V, vesicles of dark colour; PO, pre-vitellogenic oocyte; L, lumen; VO, vitellogenic oocyte; RVO, residual vitellogenic oocyte.

increase in the number of nutritive phagocytes and a small number of primary oocytes (Figure 1F).

### Males

The immature stage was characterized by the gonad lumen dominated by a light network of nutritive phagocytes of pale colour with small dark granules and vesicles; there were some spermatogonia attached to the gonad walls (Figure 2A). In the growth stage, a layer of spermatogonia and primary spermatocytes were located along the gonad wall and columns of almost regular spermatocytes are seen projected to the centre of each follicle. Remnant nutritive phagocytes dominate the centre of the lumen, although the amount of nutritive material had decreased (Figure 2B).

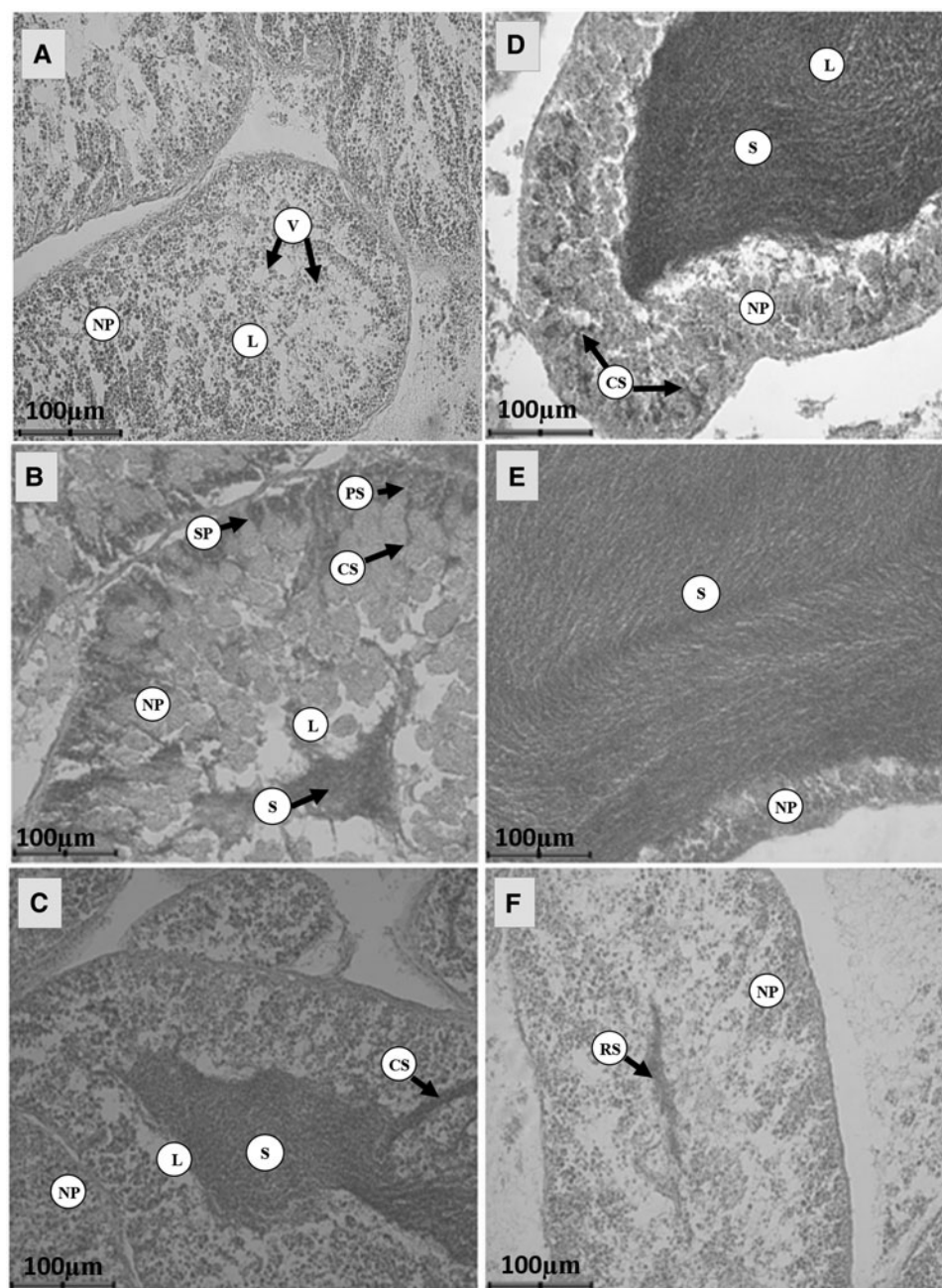
In the pre-maturity I stage, conspicuous columns of spermatocytes were projected towards the lumen. The spermatozoa began to accumulate in the centre of the gonad. The number of nutritive phagocytes decreased and was displaced from the centre to the periphery (Figure 2C). The pre-maturity stage II had a similar

structure to that of the pre-mature I, but the gonad contained free spermatozoa in the centre. The columns of spermatocytes were constant (Figure 2D).

In the maturity stage, the gonad was filled with densely packed spermatozoa. The spermatogenic layer became thin or disappeared. Nutritive phagocytes were located towards the periphery of the gonad, along the germinal epithelium (Figure 2E). In the spawning stage, the gonad lumen was almost empty although small clusters of spermatozoa and nutritive phagocytes were found. The gonad wall was very thin (Figure 2F).

### Gonadosomatic and maturity indices

Oscillations of the GSI of females and males were similar during the studied period. The annual mean ( $\pm$ SD) for females was  $5.6 \pm 2.6$ , and  $6.7 \pm 2.2$  for males, which were not significantly different ( $t = 21,014.000$ ,  $P = 0.100$ ). However, the monthly variations were significantly different ( $H = 143.406$ ,  $df = 11$ ,  $P < 0.001$ ) (Figure 3).



**Fig. 2.** Micrographs of gonadal stages of *Arbacia stellata* males: (A) immature, (B) growth, (C) pre-maturity I, (D) pre-maturity II, (E) maturity and (F) spawning. L, lumen; SP, spermatogonia; NP, nutritive phagocyte; PS, primary spermatocytes; S, spermatozoa; V, vesicles of dark colour; RS, residual spermatozoa.

The month when the maximum value ( $10.03 \pm 3.5$ ) was observed was April 2014 and the lowest value ( $1.7 \pm 0.8$ ) occurred in December 2013. The interval of variation of GSI in each month was relatively broad (Figure 3).

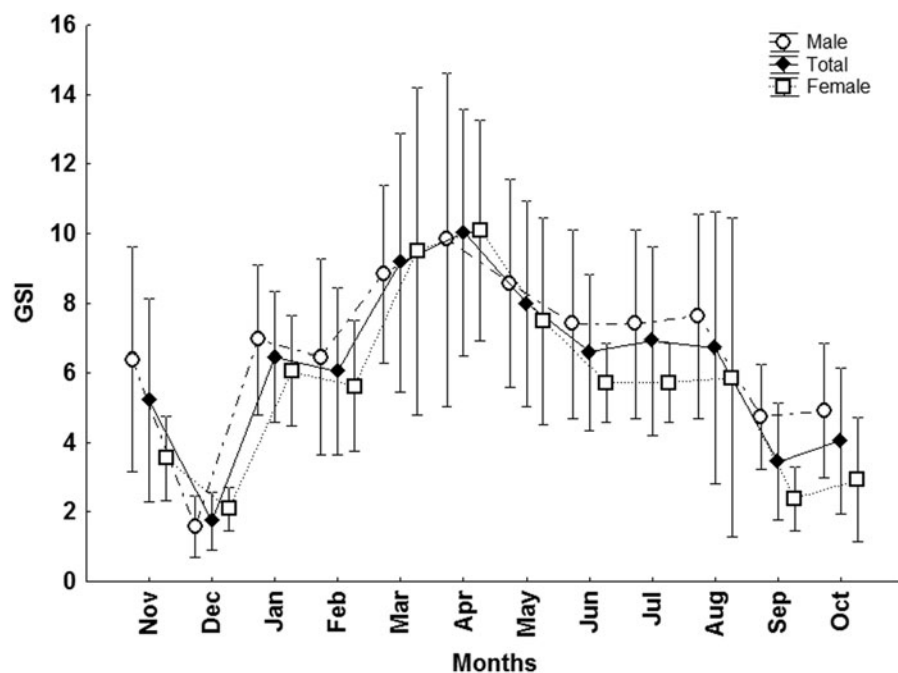
The trend of the MI during the sampling months was similar in both females and males, although in December 2013 it was observed that females and males showed an inverse trend. Statistically no significant differences were found between sexes ( $T = -0.656$ ,  $df = 22$ ,  $P = 0.518$ ) (Figure 4).

The GSI and MI did not follow the same trend. During the months when the GSI showed the highest values (March to May 2014), the lowest MI values were recorded. Likewise, the months when the highest values of MI were observed (November, December and January of 2013 and from July to October of 2014) were also the months in which the GSI exhibited the lowest values (compare Figures 3 and 4).

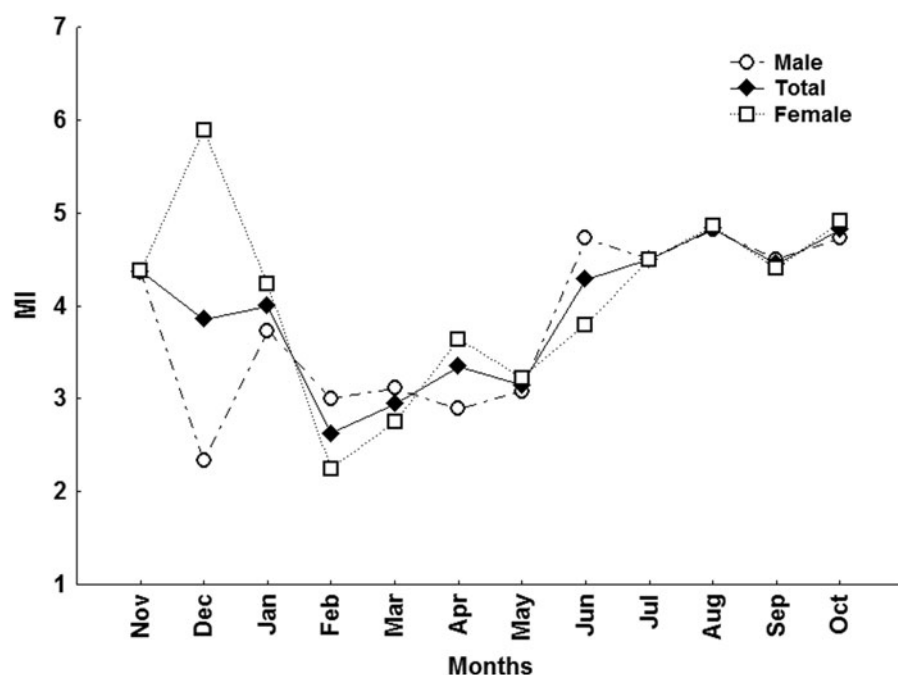
### Gametogenic cycle

The gametogenic cycle of *Arbacia stellata* is semi-continuous since a high asynchrony was observed among individuals and within the gonad in any of the months studied, for both sexes. Several gonadal stages were represented in the sampled individuals and even in the same gonad of each individual.

In females, the month in which a higher proportion of spawned urchins were observed (88.9%) was December 2013. Soon after, stages of immature and growth began to appear, with February 2014 being the month with the highest representation of these stages (25 and 41.7%, respectively). March and May 2014 were mainly represented by the stage of pre-maturity I (62 and 41%, respectively). As of June 2014, the stages of pre-maturity II and maturity began to be more representative; with August being mostly represented by the maturity stage (85.7%), and in September 2014 the spawning stage began to appear (Figure 5).



**Fig. 3.** Monthly variation of the gonadosomatic index (GSI) of females, males and the total population of *Arbacia stellata* in Punta Banda, BC, Mexico. Every point represents the mean  $\pm$  Standard Deviation (SD) of the mean. On the x-axis, the first two months Nov. and Dec. correspond to the year 2013 and the following January–October to the year 2014.



**Fig. 4.** Maturity index (MI) value of females, males, and the total average for the population of *Arbacia stellata*. On the x-axis, the first two months Nov. and Dec. correspond to the year 2013 and the following January–October to the year 2014.

In males, the maturity stage was present in most sampling months (June to October 2014), with the exception of April and May 2014, with August having the highest incidence (82%). The spawning stage was observed in different months including November 2013, January, February, June, September and October 2014. The pre-maturity I stage was also present in most sampling months, except for January 2013 and August 2014. The pre-maturity II stage was observed during all sampling periods. The immature stage was present from December 2013 to February 2014, with a higher incidence in December (33%). The growth stage started to be evident from December 2013 to May 2014, mostly represented in April (44%) (Figure 5).

#### Size structure of oocytes

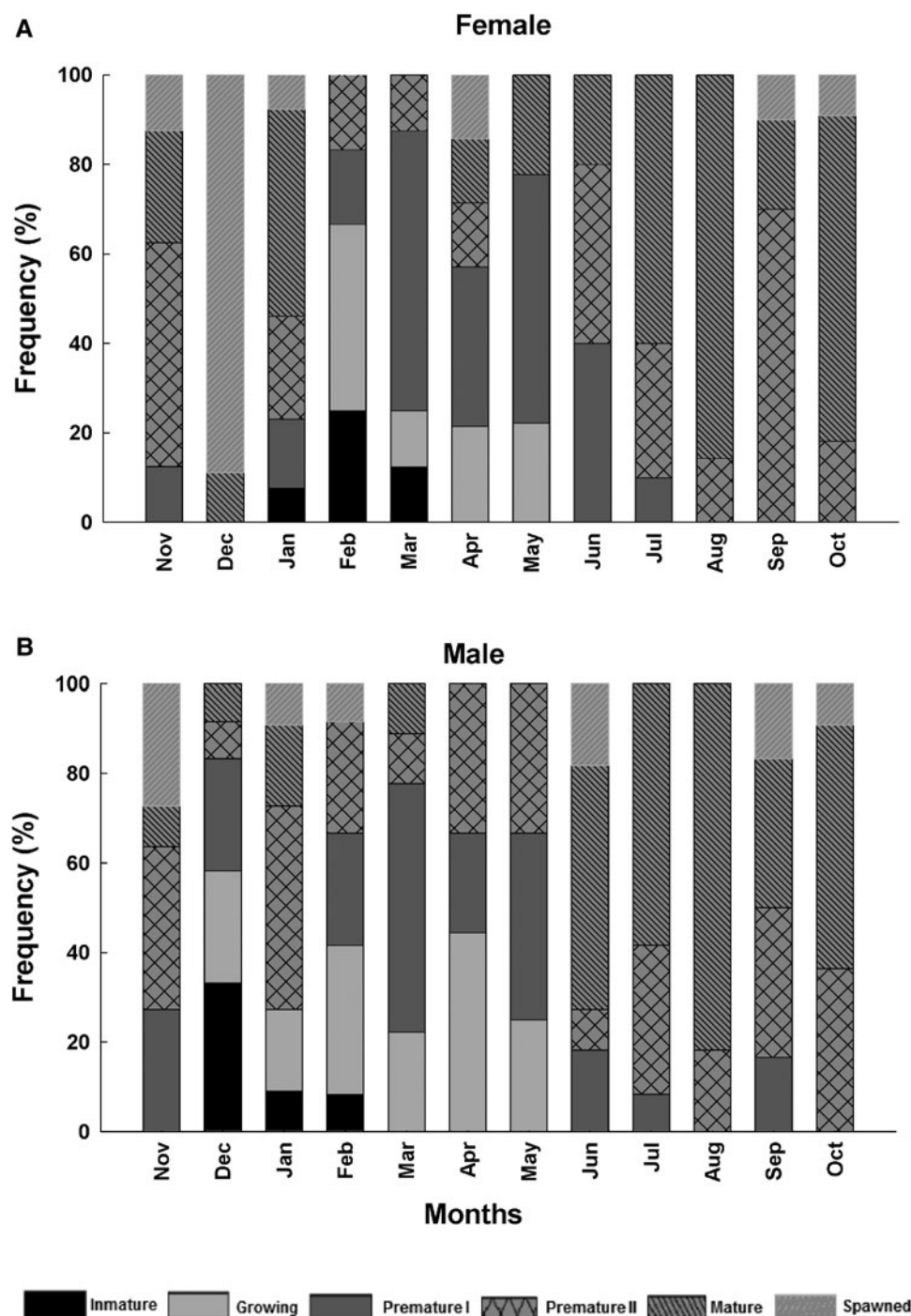
Females showed a continuous production of pre-vitellogenic and vitellogenic oocytes. The most frequent size was the 80  $\mu\text{m}$

interval and in all months this size coincided with the mean diameter of vitellogenic oocytes ( $85.9 \pm 9.3 \mu\text{m}$ ). The second most frequent size was 60  $\mu\text{m}$ , which corresponds to the mean diameter of pre-vitellogenic oocytes ( $54.0 \pm 8.5 \mu\text{m}$ ). This was also observed in December 2013 and January 2014, when the number of gametes in the gonads was low. The maximum size of vitellogenic oocytes in the sampling area was  $102.6 \pm 9.8 \mu\text{m}$  (Figure 6).

#### Fecundity

Mean fecundity ( $\pm$ SD) was estimated at  $1.7 \times 10^9 \pm 9.4 \times 10^9$  vitellogenic oocytes per female. Statistically significant differences were observed among months ( $H = 45.445$ ,  $df = 11$ ,  $P \leq 0.001$ ). Months that showed significant differences were April 2014 with November 2013; December 2013 with September and October 2014; and January 2014 with December 2013 and





**Fig. 5.** Gametogenic cycle of females and males of *Arbacia stellate* in Punta Banda, BC, Mexico. On each x-axis, the first two months Nov. and Dec. correspond to the year 2013 and the following January–October to the year 2014.

September 2014. The ranges of fecundity values within months were relatively broad (Figure 7).

#### Environmental variables

Minimum values of SSW occurred from November 2013 to February 2014, with the lowest value in December 2013 (15°C). From March 2014, the temperature began to increase to a maximum value in July 2014 (23°C). From August 2014, temperature began to descend again. Maximum values of light hours were reached from May to June 2014, and from August values started to decrease. The minimum values were recorded from November 2013 to January 2014, with the lowest value in December (Figure 8A). Mean monthly values of chlorophyll *a* started to increase from March 2013 and showed the maximum value in

April 2014, then decayed progressively until reaching the minimum value in September (Figure 8B). Net primary production started to increase from May 2014 reaching its maximum value in June and started to decline in August to its minimum value recorded in February 2014 (Figure 8B).

The multiple linear regression (MLR) analysis of the GSI with the environmental parameters was solved in one step ( $GSI = 3.363 + (1.833 \times \text{chlorophyll})$ ) and indicated that the total variation explained for the GSI in terms of the selected variable (chlorophyll) was 50%, with a multiple correlation value of 0.70 and a *P* level <0.05. In the case of MI, the MLR model was solved in two steps ( $MI = 1.574 + (0.154 \times \text{temperature}) - (0.367 \times \text{chlorophyll})$ ). The total variation explained by the selected variables was 53%, with a multiple correlation value of 73% and a

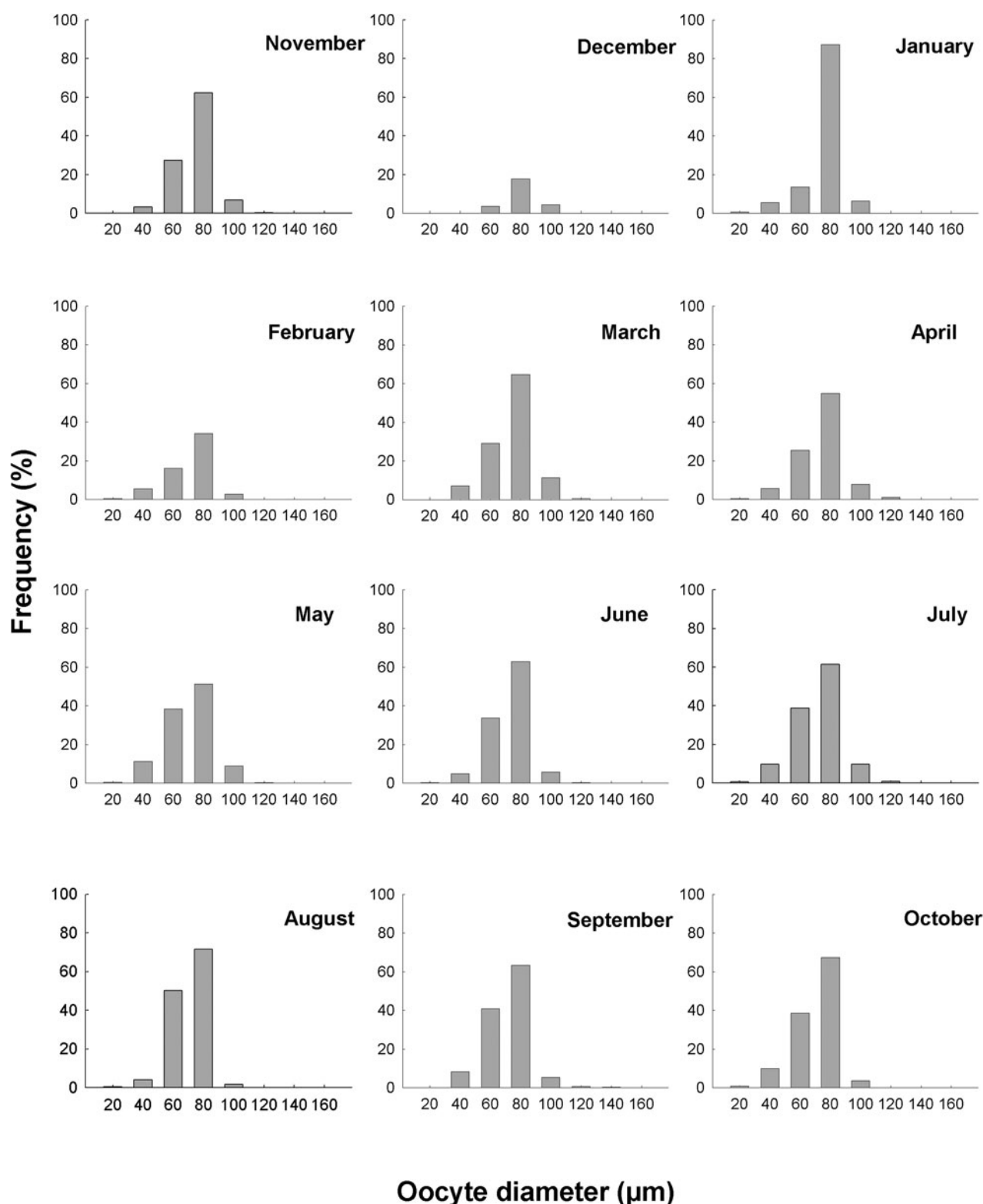


Fig. 6. Frequency distribution of the oocyte diameter of *Arbacia stellata* (November 2013–October 2015) in Punta Banda, BC, Mexico.

$P$  level  $<0.05$ . For fecundity the MLR analysis was also solved in two steps:  $\text{Fecundity} = -1,422,366.292 + (777,496.760 \times \text{chlorophyll}) + (102,199.394 \times \text{temperature})$ . The total variation explained with the selected variables was 55%, with a multiple correlation value of 0.74 and a  $P$  level  $<0.05$ .

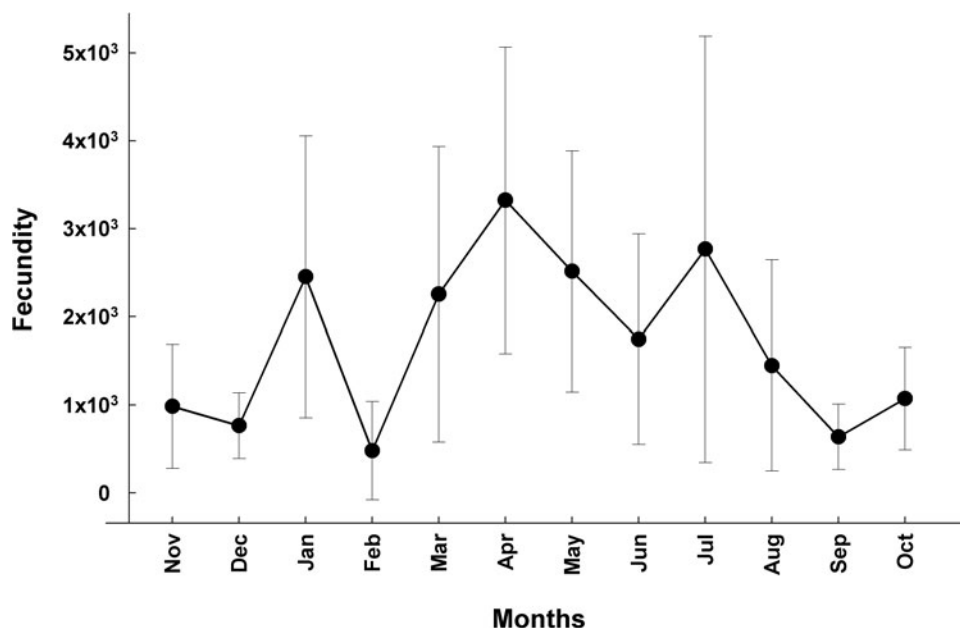
## Discussion

In the sampling area *Arbacia stellata* was gonochoric, with a semi-continuous reproductive cycle for both sexes and partial spawning

throughout the year. The minimum GSI value recorded in December 2013 recovered significantly faster in subsequent months, when the highest proportion of urchins at immature (Stage I) and growth (Stage II) stages was observed.

GSI has been widely used to evaluate reproduction, however, it is not sufficient to describe the cycle in echinoids because the increase of gonads not only corresponds to size and number of gametes, but also to somatic cells, phagocytes or storage of nutrients (Walker *et al.*, 1998, 2007; Ebert *et al.*, 2011). For *A. stellata*, high GSI values not only reflect gamete abundance, but also the





**Fig. 7.** Monthly variation (Mean±SD) of fecundity values of *Arbacia stellata* in Punta Banda BC, Mexico. On the x-axis, the first two months Nov. and Dec. correspond to the year 2013 and the following January–October to the year 2014.

increase of nutrients in immature urchins and germ cells in portions of the gonad at the growth stage (Stage II) of development. According to the MLR analysis, GSI has a positive relationship with chlorophyll, so the increase in its value at the beginning of the year and its maximum value in April (spring) could indicate a nutrient assimilation during spring. During this period, the maximum values of chlorophyll were recorded and correspond to the time when upwelling occurs near the sampling site at Punta Banda (Durazo, 2015; Oliva-Méndez et al., 2018), therefore this high availability of nutrients was reflected in the thickening of the gonad rather than in the proliferation of gametes.

The broad monthly variations of the GSI may indicate intra-population variability in the development of the gonads. This feature was observed in both females and males, so we suggest a synchrony between sexes.

The MI had a positive relation with temperature and a negative relation with chlorophyll *a*. Its values started to increase at the beginning of the summer when higher temperatures prevail, chlorophyll *a* starts declining, and the peak of NPP is reached. On the other hand, maximum values are reached in autumn (when temperature starts descending) and are maintained until the beginning of winter. However, MI in females showed its maximum value in December 2013, with a large percentage of individuals in the spawning stage, this being the month with the highest reproductive activity for females, despite being the coldest month of the study period (15°C). This condition was also reported for the sand dollar *Dendraster excentricus*, in which the main gamete maturation apparently occurs during the winter (December–February) at temperatures close to the lowest recorded in the Punta Banda estuary (14–18°C) (Olivares-Bañuelos et al., 2012).

Although the sequence of oogenesis in *A. stellata* was similar to that described for other echinoids (oogenesis started with primary germ cells that developed through several vitellogenic stages and produced eggs) (Pearse & Cameron, 1991), no synchrony was observed in the development of the gonad, where from two to four stages of development within the same gonad were observed. Likewise, pre-vitellogenic and vitellogenic oocytes were present in almost all sampling months, with vitellogenic ones being the most frequent, as reported by Wangenstein et al. (2013) for *A. lixula* in

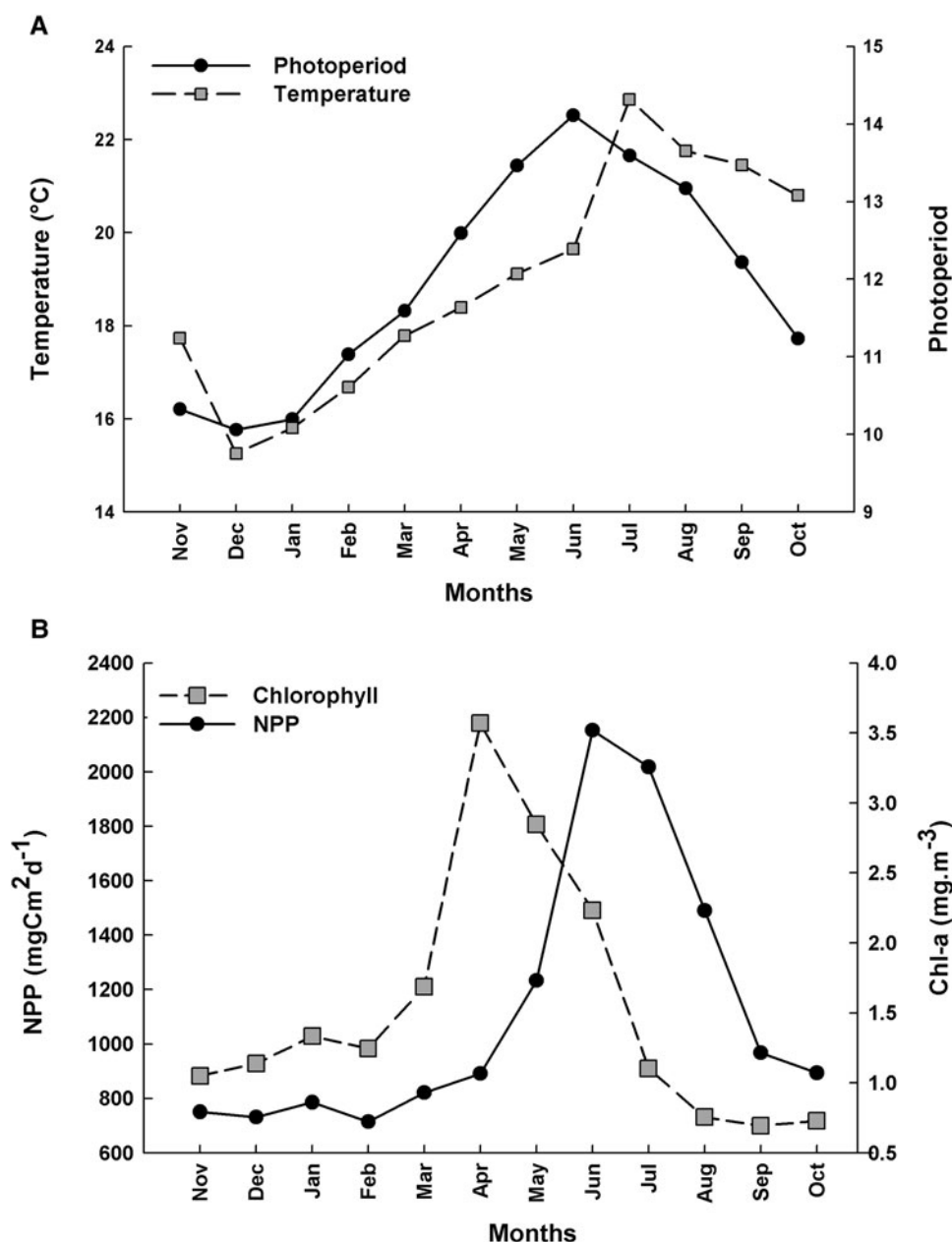
the Mediterranean. Other authors who studied reproduction of *Arbacia* also reported this characteristic (Kino, 2010; Epherra et al., 2015).

Changes in the frequency of diameter distribution of oocytes and eggs indicate the presence of an annual cycle in the production of gametes. However, in *A. stellata* no oocyte growth sequence could be detected throughout the year and a predominance of mature gametes was observed. This type of reproduction has been observed in other species of echinoids, such as *Holopneustes purpurascens* (Williamson & Steinberg, 2002), *Stylocidaris affinis* (Holland, 1967), *Paracentrotus lividus* (Byrne, 1990), *Arbacia lixula* (Wangenstein et al., 2013) and *Dendraster excentricus* (Olivares-Bañuelos et al., 2012).

Our results are in contrast with most of the echinoids that have well-defined annual reproductive cycles, with predictable discrete stages of development (Pearse & Cameron, 1991). On the other hand, although mature individuals were observed throughout the year, a stage of repose could be inconspicuous, indicating that production of gametes requires a brief period of resting or does not occur in some individuals. Pearse & Phillips (1968) observed something similar for *Echinometra mathaei* on the west coast of Australia, suggesting that this stage is likely to be short or perhaps does not normally occur.

Semi-continuous gamete production of *A. stellata* with high percentage of mature organisms from summer to winter, coinciding with low seawater temperatures and short days, is in contrast with what would be expected of populations in temperate regions of the northern hemisphere. Reproductive cycles tend to be more synchronized with increasing distance from the equator, and seasonality becomes more pronounced (Pearse, 1968, 1970). Seasonality of reproduction is also synchronized to maximize the survival of spawning, exposing the larvae to more favourable conditions for development (Giese & Pearse, 1974; Benítez-Villalobos & Martínez-García, 2012; Benítez-Villalobos et al., 2015).

Most intense spawning of *A. stellata* during summer, autumn and early winter may have evolved to avoid the spring upwelling season, which brings the rising of carbon-enriched water (DIC) and low pH (~7.8) (Feely et al., 2008; Cervantes-Díaz et al., 2013). This could negatively affect calcification of pluteus larvae



**Fig. 8.** Annual variation of the mean values: (A) photoperiod and temperature; (B) chlorophyll *a* and net primary production in Punta Banda, Baja California, Mexico. On each x-axis, the first two months Nov. and Dec. correspond to the year 2013 and the following January–October to the year 2014.


of sea urchins (Stumpp *et al.*, 2011; Dorey *et al.*, 2013). Additionally, the correlation of GSI with chlorophyll *a*, and the opposite in the MI, may indicate the accumulation of nutrients in the gonad during the spring ensuring that gametogenesis and spawning coincide with non-upwelling periods, when low salinity and high pH ( $\sim 8$ ) prevail in the area (Cervantes-Díaz *et al.*, 2013). These water conditions could greatly favour larval development, ensuring maintenance of *A. stellata* populations.

A semi-continuous reproduction pattern allows individuals to reproduce when they find a suitable signal, considering also, that they can mature different cohorts of gametes in the same gonad. Then, new recruits can enter the population during the most intense period and/or through small breeding events during the year (Williamson & Steinberg, 2002). This reproductive activity throughout the year, with other ecological adaptations of recruits and juveniles, could explain the increasing abundance of *A. stellata* in the study area.

*Arbacia stellata* is moving northward in the California region, increasing its abundance. Engle & Richards (2001) reported the

occurrence of *A. stellata* in Channel Islands, California, and concluded warmer waters probably brought the larvae during El Niño 1997–1998. They proposed that the absence of juveniles and presence of larger individuals in Laguna Beach populations suggest that the animals are older and possibly come from previous recruitment events. We suggest this species reproduces continuously during most of the year in Baja California, with the highest intensity during the coldest period. This observation supports the hypothesis that larvae of *A. stellata* in southern California were able to recruit during warmer periods. Species with wide distributions could adapt aspects of their life history to the local conditions. Reproduction and optimal development of larvae are important aspects of these important life history features (Stearns, 1992, 2000). Byrne *et al.* (1998) found that the pattern of spawning may vary among localities and years. Because *A. stellata* has a wide distribution in the Pacific, reproduction of particular populations could vary with conditions in each locality. For *Arbacia stellata* in its northern distribution, the possibility of an extended reproductive season could have strong implications for

its dispersal, permanent presence and possible impacts in this region.

**Author ORCID.**  Eugenio De Jesús Carpizo-Ituarte, 0000-0002-3253-2357

**Financial support.** This work was supported by CONACYT, project Genes de respuesta al estrés como bioindicadores para evaluar el efecto del cambio global en organismos estructuradores de bentos en el Pacífico Mexicano (EJC-I, Grant No. 181597) and IIO-UABC project Biología del desarrollo para el aprovechamiento sostenible y conservación de los recursos costeros (EJC-I, Grant No. 403/1030). JPD-M received a CONACYT scholarship for doctoral studies and the results presented here are part of her dissertation research.

## References

- Bay-Schmith E (1981) Ciclo anual de reproducción de *Arbacia spatuligera* (Valenciennes, 1846) en Bahía de Concepción. *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción* **51**, 47–59.
- Benítez-Villalobos F and Martínez-García M (2012) Reproductive biology of the starfish *Pharia pyramidalis* (Echinodermata: Asteroidea) from the Mexican tropical Pacific. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **92**, 1409–1418.
- Benítez-Villalobos F, Hernando Avila-Poveda O, Díaz-Martínez JP and Ruiz Bravo-Ruiz A (2015) Gonad development stages and reproductive traits of *Diadema mexicanum* (Echinodermata: Echinoidea) from Oaxaca, Mexico. *Invertebrate Reproduction and Development* **59**, 237–249.
- Brogger MJ, Martínez MI and Penchaszadeh PE (2010) Reproduction of the sea urchin *Arbacia dufresnii* (Echinoidea: Arbaciidae) from Golfo Nuevo, Argentina. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **90**, 1405–1409.
- Brusca RC (1980) *Common Intertidal Invertebrates of the Gulf of California*, 2nd Edn. Tucson, AZ: University of Arizona Press.
- Burcham D and Caruso NL (2015) Abundance, size, and occurrence of *Arbacia stellata* in Orange County, California. *California Fish and Game* **101**, 184–187.
- Byrne M (1990) Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the west coast of Ireland. *Marine Biology* **104**, 275–289.
- Byrne M, Andrew NL, Worthington DG and Brett PA (1998) Reproduction in the diademoid sea urchin *Centrostephanus rodgersii* in contrasting habitats along the coast of New South Wales, Australia. *Marine Biology* **132**, 305–318.
- Carlton RT (2007) *The Light and Smith Manual: Intertidal Invertebrates from Central California to Oregon*. Berkeley, CA: University of California Press.
- Cervantes-Díaz GY, Hernández-Ayón JM, Durazo-Arvizu R, Linacre-Rojas LP, Camacho-Ibar V, Lara-Lara R, Siqueiros-Valencia A and Bazán-Guzmán C (2013) Variabilidad temporal del sistema del CO<sub>2</sub> frente a las costas de Baja California. In Paz F, Wong J, Bazan M and Saynes V (eds), *Estado Actual del Conocimiento del Ciclo del Carbono y sus Interacciones en México: Síntesis a 2013. Serie Síntesis Nacionales*. Texcoco: Programa Mexicano del Carbono en colaboración con el Colegio de Postgraduados, la Universidad Autónoma de Chapingo y el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, pp. 421–427.
- Clark HL (1948) *A Report on the Echini of the Warmer Eastern Pacific, Based on the Collections of the Vellero III. Allan Hancock Pacific Expeditions*. Los Angeles, CA: University of Southern California Press.
- Despalatović M, Grubelić I, Šimunović A, Antolić B and Žuljević A (2004) Reproductive biology of the holothurian *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) in the Adriatic Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **84**, 409–414.
- Dorey N, Lançon P, Thorndyke M and Dupont S (2013) Assessing physiological tipping point of sea urchin larvae exposed to a broad range of pH. *Global Change Biology* **19**, 3355–3367.
- Durazo R (2015) Seasonality of the transitional region of the California Current System off Baja California. *Journal of Geophysical Research: Oceans* **120**, 1173–1196.
- Ebert TA, Hernandez JC and Russell MP (2011) Problems of the gonad index and what can be done: analysis of the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Marine Biology* **158**, 47–58.
- Engle JM and Richards DV (2001) New and unusual marine invertebrates discovered at the California Channel Islands during the 1997–1998 El Niño. *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences* **100**, 186–198.
- Epherra L, Gil DG, Rubilar T, Perez-Gallo S, Reartes MB and Tolosano JA (2015) Temporal and spatial differences in the reproductive biology of the sea urchin *Arbacia dufresnii*. *Marine and Freshwater Research* **66**, 329–342.
- Feely RA, Christopher L, Sabine J, Hernández-Ayón M, Ianson D and Hales B (2008) Evidence for upwelling of corrosive ‘acidified’ water onto the continental shelf. *Science* **320**, 1490–1492.
- Gianguzza P and Bonaviri C (2013) *Arbacia*. In Lawrence JM (ed.), *Sea Urchins. Biology and Ecology*. Amsterdam: Elsevier, pp. 275–283.
- Giese AC and Pearse JS (1974) Reproduction: general principles. In Giese AC and Pearse JS (eds), *Reproduction of Marine Invertebrates*. New York, NY: Academic Press, pp. 1–49.
- Harvey EB (1956) *The American Arbacia and Other Sea Urchins*. Princeton, NJ: Princeton University Press, 298 pp.
- Holland ND (1967) Gametogenesis during the annual reproductive cycle in a cidaroid sea urchin (*Stylocidaris affinis*). *Biological Bulletin* **133**, 578–590.
- Hooker Y, Solís-Marín FA and Llellish M (2005) Equinodermos de las Islas Lobos de Afuera (Lambayeque, Perú). *Revista Peruana de Biología* **12**, 77–82.
- Humason GL (1979) *Animal Tissue Techniques*. San Francisco, CA: W.H. Freeman and Company Press.
- Kazanidis G, Lolas A and Vafidis D (2014) Reproductive cycle of the traditionally exploited sea cucumber *Holothuria tubulosa* (Holothuroidea: Aspidochiroidea) in Pagasitikos Gulf, western Aegean Sea, Greece. *Turkish Journal of Zoology* **38**, 306–315.
- Kino S (2010) Reproduction and early life history of sea urchins, *Arbacia dufresnei* and *Pseudechinus magellanicus*, in Chiloé Island and Reloncaví Sound, Chile. *Aquaculture Science* **58**, 65–73.
- Lessios HA (2005) Echinoids of the Pacific waters of Panama: status of knowledge and new records. *Revista de Biología Tropical* **53**, 147–170.
- Lessios HA, Lockhart S, Collin R, Sotil G, Sanchez-Jerez P, Zigler KS, Perez AF, Garrido MJ, Geyer LB, Bernardi G, Vacquier VD, Haroun R and Kessing BD (2012) Phylogeography and binding evolution in *Arbacia*, a sea urchin genus with an unusual distribution. *Molecular Ecology* **21**, 132–144.
- Mercier A and Hamel JF (2009) Endogenous and exogenous control of gametogenesis and spawning in echinoderms. *Advances in Marine Biology* **55**, 1–302.
- Metz EC, Gómez-Gutiérrez G and Vacquier VD (1998) Mitochondrial DNA and binding gene sequence evolution among allopatric species of the sea urchin genus *Arbacia*. *Molecular Biology and Evolution* **15**, 185–195.
- Morris RH, Abbott DP and Haderlie EC (1980) *Intertidal Invertebrates of California*. Redwood City, CA: Stanford University Press, 690 pp.
- Mortensen T (1935) *A Monograph of the Echinoidea*, Vol. II. Copenhagen: C. A. Reitzel, 446 pp.
- Nagy IZ and Pieri C (1975) A new method for very precise volumetry of organs of irregular shape. *Mikroskopie* **31**, 70–72.
- Oliva-Méndez N, Delgadillo-Hinojosa F, Pérez-Brunius P, Valencia-Gasti A, Huerta-Díaz MA, Palacios-Coria E and Martín Hernández-Ayón JM (2018) The carbonate system in coastal waters off the northern region of the Baja California Peninsula under La Niña conditions. *Ciencias Marinas* **44**, 203–220.
- Olivares-Bañuelos T, Figueroa-Flores S and Carpizo-Ituarte E (2012) Gonad index and larval development of the sand dollar *Dendraster excentricus* (Echinodermata; Echinoidea) in Baja California, Mexico. *Ciencias Marinas* **38**, 411–425.
- Oyarzún ST, Marín SL, Valladares C and Iriarte JL (1999) Reproductive cycle of *Loxechinus albus* (Echinodermata: Echinoidea) in two areas of the Magellan region (53°S, 70–72°W), Chile. *Scientia Marina* **63** (Suppl. 1), 439–449.
- Pearse JS (1968) Patterns of reproductive periodicities in four species of Indo-Pacific echinoderms. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences – Section B* **67**, 247–279.
- Pearse JS (1970) Reproductive periodicities of Indo-Pacific invertebrates in the Gulf of Suez. III. The echinoid *Diadema setosum* (Leske). *Bulletin of Marine Science* **20**, 697–720.
- Pearse JS and Cameron RA (1991) Echinodermata, Echinoidea. In Giese AC, Pearse JS and Pearse VB (eds), *Reproduction of Marine Invertebrates*. Pacific Grove, CA: Boxwood Press, pp. 514–662.
- Pearse JS and Phillips BF (1968) Continuous reproduction in the Indo-Pacific sea urchin *Echinometra mathaei* at Rottneest Island, western Australia. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* **19**, 161–172.
- Pearse JS, McClintock JB and Bosch I (1991) Reproduction of Antarctic benthic marine invertebrates: tempos, modes, and timing. *American Zoologist* **31**, 65–80.

- Pérez AF, Boy C, Morriconi E and Calvo J** (2010) Reproductive cycle and reproductive output of the sea urchin *Loxechinus albus* (Echinodermata: Echinoidea) from Beagle Channel, Tierra del Fuego, Argentina. *Polar Biology* **33**, 271–280.
- Ramírez-Llodra E** (2002) Fecundity and life-history strategies in marine invertebrates. *Advances in Marine Biology* **43**, 87–170.
- Ramírez-Llodra E, Tyler PA and Billett DSM** (2002) Reproductive biology of porcellanasterid asteroids from three abyssal sites in the northeast Atlantic with contrasting food input. *Marine Biology* **140**, 773–788.
- Scherle W** (1970) A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* **26**, 57–60.
- Sewell MA** (1992) Reproduction of the temperate Aspidochirote *Stichopus mollis* (Echinodermata: Holothuroidea) in New Zealand. *Ophelia* **35**, 103–121.
- Shapiro H** (1935) A case of functional hermaphroditism in the sea-urchin, *Arbacia punctulata*, and an estimate of the sex-ratio. *American Naturalist* **69**, 286–288.
- Stearns SC** (1992) *The Evolution of Life Histories*. New York, NY: Oxford University Press.
- Stearns SC** (2000) Life history evolution: successes, limitations, and prospects. *Science of Nature* **87**, 476–486.
- Stumpp M, Wren J, Melzner F, Thorndyke MC and Dupont ST** (2011) CO<sub>2</sub> induced seawater acidification impacts sea urchin larval development. I: Elevated metabolic rates decrease scope for growth and induce developmental delay. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **160**, 331–340.
- Tavares YAG** (2004). Biologia reprodutiva dos equinóides *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) e *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) na Ilha da Galheta, litoral paranaense, Brasil.
- Walker CW, McGinn NA, Harrington LM and Lesser MP** (1998) New perspectives on sea urchin gametogenesis and their relevance to aquaculture. *Journal of Shellfish Research* **17**, 1507–1514.
- Walker CW, Unuma T and Lesser MP** (2007) Gametogenesis and reproduction of sea urchins. In Lawrence JM (ed.), *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*, 2nd Edn. Amsterdam: Elsevier, pp. 11–33.
- Wangensteen OS, Turon X, Casso M and Palacín C** (2013) The reproductive cycle of the sea urchin *Arbacia lixula* in northwest Mediterranean: potential influence of temperature and photoperiod. *Marine Biology* **160**, 3157–3168.
- Williamson JE and Steinberg PD** (2002) Reproductive cycle of the sea urchin *Holopneustes purpurascens* (Temnopleuridae: Echinodermata). *Marine Biology* **140**, 519–532.
- Yates F** (1934) Contingency tables involving small numbers and the  $\chi^2$  test. *Supplement to the Journal of the Royal Statistical Society* **1**, 217–235.
- Zar JH** (2010) *Biostatistical Analysis*, 5th Edn. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.