

EVIDENCIAS DE ADAPTACIÓN A LA
ACIDIFICACIÓN OCEÁNICA EN LA
PROGENIE DEL ERIZO DE MAR *Arbacia lixula*
QUE VIVE EN LOS AFLORAMIENTOS
NATURALES DE CO₂

EVIDENCES OF ADAPTATION TO OCEAN
ACIDIFICATION IN THE PROGENY OF THE
SEA URCHIN *Arbacia lixula* LIVING IN
NATURAL CO₂ SEEPS



Javier Sepúlveda Rodríguez

Máster en Biología Marina: Biodiversidad y
Conservación

Septiembre 2021

JOSÉ CARLOS HERNÁNDEZ PÉREZ, profesor titular y SARA GONZÁLEZ-DELGADO contratada predoctoral

CERTIFICAN:

Que la memoria presentada por Javier Sepúlveda Rodríguez, titulada “Evidencias de adaptación a la acidificación en la descendencia del erizo de mar *Arbacia lixula* que vive en los afloramientos naturales de CO₂” ha sido realizada bajo nuestra dirección y consideramos que reúne todas las condiciones de calidad y rigor científico requeridas para optar a su presentación como Trabajo de Fin de Máster, en el Máster de Biología Marina: Biodiversidad y Conservación de la Universidad de La Laguna, curso 2020-2021.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en San Cristóbal de La Laguna, a 1 de septiembre de 2021.

HERNANDEZ
PEREZ JOSE
CARLOS -
78611575J

Firmado
digitalmente por
HERNANDEZ PEREZ
JOSE CARLOS -
78611575J
Fecha: 2021.09.07
16:28:52 +01'00'

Fdo: Dr. José Carlos Hernández

GONZALEZ
DELGADO
SARA -
78590681A

Firmado
digitalmente por
GONZALEZ
DELGADO SARA -
78590681A
Fecha: 2021.09.07
15:37:15 +01'00'

Fdo: Sara González-Delgado

INDICE

Resumen /Abstract.....	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	5
3.1. Área de estudio	5
3.2. Experimento 1: fecundidad de <i>Arbacia lixula</i> en un gradiente de pH.....	7
3.3. Experimento 2: supervivencia y desarrollo larvario de <i>Arbacia lixula</i>	8
3.4. Análisis estadístico	11
4. RESULTADOS.....	12
4.1. Fecundidad y tamaño de óvulos de <i>Arbacia lixula</i>	12
4.2. Desarrollo larvario de <i>Arbacia lixula</i>	15
5. DISCUSIÓN.....	23
6. CONCLUSIONES.....	28
7. AGRADECIMIENTOS	29
8. REFERENCIAS	30

RESUMEN

Se investiga por primera vez los efectos de la acidificación oceánica (AO) en la caracterización de los huevos, supervivencia y morfología larvaria de la especie de erizo de mar *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758). Para ello se han utilizado poblaciones que han vivido toda su vida en los afloramientos naturales de CO₂ de la Punta de Fuencaliente, en la isla de La Palma, y poblaciones de zonas control no acidificadas. El objetivo principal fue investigar el potencial de adaptación de ambas poblaciones, mediante el estudio de la fecundidad, la supervivencia y morfología de las larvas, las cuales fueron sometidas a diferentes condiciones de pH. Para el primer experimento se recolectaron un total de 60 hembras en zonas de afloramiento, transición y control que posteriormente se indujeron al desove. Se observó una disminución de la abundancia de óvulos en las hembras procedentes del afloramiento natural de CO₂, si bien no hubo diferencias en las tallas de los óvulos. Para el segundo experimento, se realizaron cultivos larvarios de linajes procedentes del afloramiento natural de CO₂ (AA) y de una zona control (CC), siendo tratados bajo 7,40 y 8,20 unidades de pH. La mortalidad larvaria fue mayor en los linajes CC 8,20, observándose una mayor supervivencia del linaje AA 7,40. Las larvas más desarrolladas fueron las del linaje AA 8,20. Se confirma una adaptación potencial de la progenie de *A.lixula* a condiciones de AO.

PALABRAS CLAVE: Acidificación oceánica, Afloramiento natural de CO₂, larva

ABSTRACT

The effects of ocean acidification (OA) on the characterization of eggs, survival and larval morphology of the sea urchin *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) was investigated for the first time. Populations that have lived for a long in the natural CO₂ vent of Punta de Fuencaliente, La Palma, and populations from non-acidified control sites were used. We aim to investigate the adaptation potential of both populations by studying the fecundity, survival and morphology of the larvae, which were subjected to different pH conditions. For the first experiment, total of 60 females were collected in vent, transition and control sites, and subsequently induced to spawn. A decrease in egg abundance was observed in females from natural CO₂ vent, although there were no differences in egg sizes. For the second experiment, larval cultures of lineages from the natural CO₂ vent (AA) and control site (CC) were treated under 7,40 and 8,20 pH units. Larval mortality was higher in the CC 8,20 lineages, survival of AA 7,40 lineage was better. The most developed larvae were from AA 8,20 lineages. The larval adaptation potential of the *A. lixula* progeny to OA conditions is confirmed.

KEYWORDS: Ocean acidification, natural CO₂ vent, larvae

1. INTRODUCCIÓN

Debido a las emisiones antropogénicas de dióxido de carbono (CO₂) y otros gases de efecto invernadero, los ecosistemas marinos están siendo alterados a un ritmo sin precedentes a escala geológica (Zeebe *et al.*, 2016). El aumento de estos gases ha provocado el incremento de temperatura oceánica de hasta 3°C. Además, se estima que un 30% de estas emisiones ha sido absorbida por el océano, reduciendo el estado de saturación del carbonato cálcico, lo que ha provocado la acidificación de los océanos (AO) (Caldeira y Wickett, 2005; IPCC, 2021). La acidificación oceánica cambia el equilibrio del sistema de carbonatos del agua de mar, disminuyendo la tendencia termodinámica a precipitar minerales de carbonato, y exponiendo a los organismos a hipercapnia, que es un factor de estrés metabólico (Pörtner, 2010). Estos cambios pueden perjudicar la capacidad de los invertebrados marinos calcificadores para construir sus esqueletos, como se ha demostrado en los experimentos de laboratorio (Przeslawski *et al.*, 2015; Munari *et al.*, 2016) y en los afloramientos naturales de CO₂ (Fabricius *et al.*, 2011; Foo *et al.*, 2018a).

Los estudios que se han realizado en un entorno de laboratorio, por lo general tienen condiciones de pH estable, que generan un efecto negativo en el desarrollo y la calcificación de los organismos estudiados (Byrne *et al.*, 2013 ; Kroeker *et al.*, 2013a ; Przeslawski *et al.*, 2015 ; Byrne y Fitzner, 2020 ; Byrne y Hernández, 2020). Sin embargo, incorporar todos los factores ambientales presentes en la naturaleza y su variabilidad inherente en el entorno de laboratorio es complicado (Harvey *et al.*, 2013 ; Ban *et al.*, 2014 ; Nagelkerken y Munday, 2016). En este sentido, es importante señalar que un estudio comparativo llevado a cabo por Foo y colaboradores (2020) mostró diferencias en los resultados obtenidos en laboratorio y en un afloramiento natural de CO₂ para el tamaño de larvas de erizo. Por lo tanto, para comprender la respuestas de las especies a la AO, es necesario comprender las respuestas de estos organismos a la variación natural de las condiciones ambientales (Hurd *et al.*, 2011 ; Small *et al.*, 2015), utilizando en la medida de lo posible laboratorios naturales de acidificación como los que se dan en las zonas volcánicas de afloramiento de CO₂ (González-Delgado y Hernández, 2018).

Los afloramientos naturales de CO₂, o surgencias, se han utilizado como un complemento a los estudios de laboratorio para investigar los impactos de la AO, ya que

incluyen de manera mucho más realista las variaciones naturales. Estos sistemas incorporan una variedad de factores ambientales que incluyen redes tróficas planctónicas, productividad, flujo de agua e interacciones de especies que también se ven afectadas por cambios en el pH (Kroeker *et al.*, 2011 ; Connell *et al.*, 2013). Además, los niveles de pH son fluctuantes como en otros sistemas oceánicos naturales, como los charcos de marea y los arrecifes de coral.

Para una gran diversidad de invertebrados marinos (corales, moluscos, equinodermos, etc), la acidificación experimental en estudios de laboratorio y la acidificación natural debido a los afloramientos volcánicos de CO₂ han mostrado generalmente respuestas negativas en la calcificación, crecimiento, fecundación y supervivencia (Duarte *et al.*, 2013; Fitzner *et al.*, 2018; Viotti *et al.*, 2019). También se ha demostrado que el crecimiento se correlaciona con la exposición media al pH más que con la variabilidad del pH (García *et al.*, 2018a; Kapsenberg *et al.*, 2018) o que la variabilidad del pH exacerba los efectos negativos del pH bajo (Johnson *et al.*, 2019). El impacto de la acidificación natural varía entre regiones y hábitats, y algunas especies o poblaciones parecen soportar muy bien la acidificación natural de los afloramientos de CO₂ (Uthicke *et al.*, 2016). En algunos moluscos, por ejemplo, se ha visto que puede alterar la forma del aragonito en una forma más favorable y resistente a la acidificación, de igual modo que la alta resiliencia observada en los erizos de mar de los afloramientos naturales, cuyo esqueleto es de calcita magnésica (Calosi *et al.*, 2013; Hofmann *et al.*, 2014).

Los erizos de mar calcifican en sus estadios planctónicos y bentónicos, por lo que son buenos modelos para investigar los efectos de la AO tanto en el laboratorio (Byrne *et al.*, 2013; Przeslawski *et al.*, 2015) como en afloramientos naturales de CO₂ (Kroeker *et al.*, 2013b; Foo *et al.*, 2018a). Varios estudios en laboratorios han visto los efectos de la disminución del pH en las diferentes etapas, desde la formación de los gametos hasta su fecundación y la formación de las larvas (García *et al.*, 2018b; Byrne y Hernández, 2020). En regiones de afloramientos de CO₂, se ha observado que varias especies de erizos de mar exhiben un gran potencial para adaptarse a ambientes de bajo pH (Pespini *et al.*, 2013; Foo *et al.*, 2018a; García *et al.*, 2018a; González-Delgado y Hernández, 2018). Especies como *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus*, *Evechinus chloroticus* y *Echinometra sp.* han mostrado características inesperadas ante los afloramientos de CO₂,

tolerando las condiciones de pH bajo (Calosi *et al.*, 2013; Bray *et al.*, 2014; Brinkman, 2014; Collard *et al.*, 2016; Uthicke *et al.*, 2016).

En los erizos de mar, al igual que en otros invertebrados marinos, la abundancia de óvulos y el tamaño de los mismos son parámetros de importancia asociados al ciclo de vida y que se ven afectados ante un cambio en las condiciones ambientales, proporcionando una idea de la inversión materna y del modo de desarrollo larvario posterior (Hernández *et al.*, 2020). A pesar de ello, el tamaño del huevo no indica una alta calidad en su composición bioquímica y energética, pero la obtención de estos últimos valores conlleva mayor dificultad, por lo que el diámetro de los óvulos es la variable más utilizada (McAlister y Moran, 2012). Además, el diámetro de los gametos influye en la fecundación, ya que la probabilidad de encuentro entre ellos será directamente proporcional a su tamaño (Levitan, 2006), siendo las condiciones óptimas de producción de gametos y fertilización específicas de cada especie, y variables a diferentes condiciones de pH y temperatura (Visconti *et al.*, 2017).

Por otro lado, Przeslawiski y colaboradores (2015) sugieren que las etapas larvarias tardías pueden ser más vulnerables que las etapas anteriores a factores estresantes como el pH o la temperatura. Normalmente, las larvas de erizo de mar producen esqueletos frágiles, por lo que el $\text{pH} \leq 7,60$ unidades genera un efecto de atrofia en su crecimiento, impulsado en gran medida por la hipercapnia (Byrne *et al.*, 2013). Sin embargo, se ha visto que la progenie de los erizos de mar residentes en entornos de pH fluctuante son más resistente a la AO (Byrne *et al.*, 2013; García *et al.*, 2018b; Wong *et al.*, 2018).

La mayoría de los estudios de laboratorio sobre la respuesta de los erizos de mar a la AO han utilizado diferentes tratamientos de pH constante y, en ocasiones, variaciones en diferentes factores ambientales como la salinidad, temperatura, o disponibilidad de alimento. Aun así, todavía existen muchas variables naturales difícil de incluir en estos experimentos, a no ser que trabajemos con los afloramientos naturales de CO₂, además de la importancia de la variabilidad genética como factor importante en la capacidad de tolerar la AO (Foo y Byrne, 2016). Es por ello que, recientemente se está impulsando el estudio no solo de los gametos (Foo *et al.*, 2018b) sino también de las larvas de erizo de mar que viven estas zonas acidificadas, ya que permiten estudiar no solo la AO de forma directa, sino también los efectos indirectos que surgen debido a la variabilidad natural de los factores que se encuentran dentro del ecosistema. Hasta la fecha, no son muchos los

trabajos relacionados con este tema, y las respuestas observadas han sido variables (Kapsenberg y Cyronak, 2019). Por ejemplo, en Papúa Nueva Guinea se observó efectos nocivos en el crecimiento de las larvas de *Echinometra* spp. (Lamare *et al.*, 2016), mientras que en Italia observaron efectos no tan negativos en *Arbacia lixula* al compararlos con los resultados obtenidos en el laboratorio (Foo *et al.*, 2020).

Arbacia lixula, especie objetivo del presente estudio, habita en profundidades de 0 a 40 metros en sustratos rocosos y poco profundos (Miguel, 2018). Se distribuye por el mar Mediterráneo, Atlántico Este, Noreste de África, islas Canarias, Madeira y Azores, y se considera una especie termófila de afinidades tropicales (Wangenstein *et al.*, 2012). Es una especie ingeniera de ecosistemas, debido a su capacidad para transformar comunidades de macroalgas en blanquiales con su actividad de pastoreo (Hernández *et al.*, 2013; Foo *et al.*, 2020; Gianguzza, 2020; Zhan *et al.*, 2020; Anand *et al.*, 2021). Como especie termófila, el aumento de la temperatura del océano ha propiciado un aumento en la abundancia de esta especie de erizo de mar, ya que su reproducción y desarrollo larvario se ven favorecidos por las altas temperaturas, aunque también están modulados por el pH y la disponibilidad de alimentos (Gianguzza *et al.*, 2011; Calosi *et al.*, 2013; Wangenstein *et al.*, 2013; Foo *et al.*, 2018b; Gianguzza, 2020). Por lo tanto, es de suma importancia determinar la vulnerabilidad de esta especie a la AO en escenarios naturales como los afloramientos de CO₂, en todas las regiones en las que habita (no solo en el Mediterráneo), para aumentar nuestra comprensión de la resiliencia y capacidades de adaptación de la especie en el contexto del cambio climático.

Por ello, hemos realizado nuestro estudio en el afloramiento natural de CO₂ de la playa del Faro de Fuencaliente (La Palma, islas Canarias), siendo el primer afloramiento de CO₂ poco profundo conocido en el Atlántico, y perteneciente a una región subtropical, sirviendo como análogo para estudiar los efectos de la AO (Hernández *et al.*, 2016; González-Delgado *et al.*, 2021). Por lo tanto, su presencia en las costas de las islas Canarias sirve para mejorar el estudio de los efectos de la acidificación a causa del cambio climático y la posible adaptación de los organismos a dichas condiciones futuras.

2. OBJETIVOS

Debido a la oportunidad de disponer de un afloramiento natural de CO₂ en las islas Canarias donde poder investigar acerca de la acidificación oceánica, se pretende aportar nueva información a la investigación global acerca de la respuesta de los equinodermos, en especial de la especie *Arbacia lixula*, a estas condiciones futuras. Por lo tanto, los objetivos principales de este trabajo son:

1. Estimar los efectos de la AO del afloramiento natural de CO₂ de la Punta de Fuencaliente en la abundancia y tamaño de los óvulos de las hembras de *Arbacia lixula*.
2. Investigar el potencial de adaptación de la descendencia de *Arbacia lixula* del afloramiento natural de CO₂ a la acidificación, mediante el estudio de la supervivencia y de plasticidad fenotípica de sus larvas.

Para ello, se realizaron dos experimentos: (1) el primero para conocer los efectos del gradiente natural de pH de Fuencaliente (isla de La Palma) en el número y tamaño de óvulos desovados por las hembras de *Arbacia lixula*; y (2) el segundo, investigar la supervivencia y morfología de las larvas de *A. lixula* provenientes de diferentes linajes. El linaje cuyos parentales provenían de la zona acidificada se denominó AA, mientras que los provenientes de la zona control se denominaron CC, los cuales se cultivaron tanto a pH 7,40 como a pH 8,20 unidades.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

Las zonas de estudio se ubicaron en diferentes puntos de las islas de La Palma y Tenerife (zona occidental del Archipiélago de Canarias, España). Para el primer experimento, se muestreó en una zona de la playa de Boca Cangrejo, Santa Cruz de Tenerife, denominada “Control” (con pH 8,14 en marea baja y 8,11 en marea alta) y en tres puntos diferentes en la playa del Faro, municipios de Fuencaliente (La Palma). Estos últimos fueron seleccionados según el gradiente de pH generado por el enriquecimiento natural de CO₂, que debe su origen al afloramiento de aguas subterráneas acidificadas por la actividad volcánica de la isla (González-Delgado *et al.*, 2021). Los puntos de muestreo

fueron denominados según la distancia al punto de emisión del afloramiento, como: zona de “Afloramiento” (7,56 unidades de pH en marea baja y 7,95 en marea alta), “Transición25” a 25 m del afloramiento (7,81 unidades de pH en marea baja y 8,15 en marea alta) y “Transición 75” a 75 m del afloramiento (7,95 unidades de pH en marea baja y 8,08 en marea alta) (Fig. 1 y Tabla 1).

Respecto al segundo experimento, se recolectaron erizos de las poblaciones procedentes de ambientes acidificados de la zona de “Afloramiento” de la playa del Faro. Por otro lado, para obtener los erizos “Control” se muestreó a más de 500 m del punto “Afloramiento” en la playa de Echentive, al suroeste de la isla de La Palma (con pH de 8,14 en marea baja y 8,16 en marea alta) (Fig. 1 y Tabla 1). En este segundo experimento intentamos utilizar un control más cercano al afloramiento para minimizar en la medida de lo posible la variación ambiental que pueda existir entre las islas.

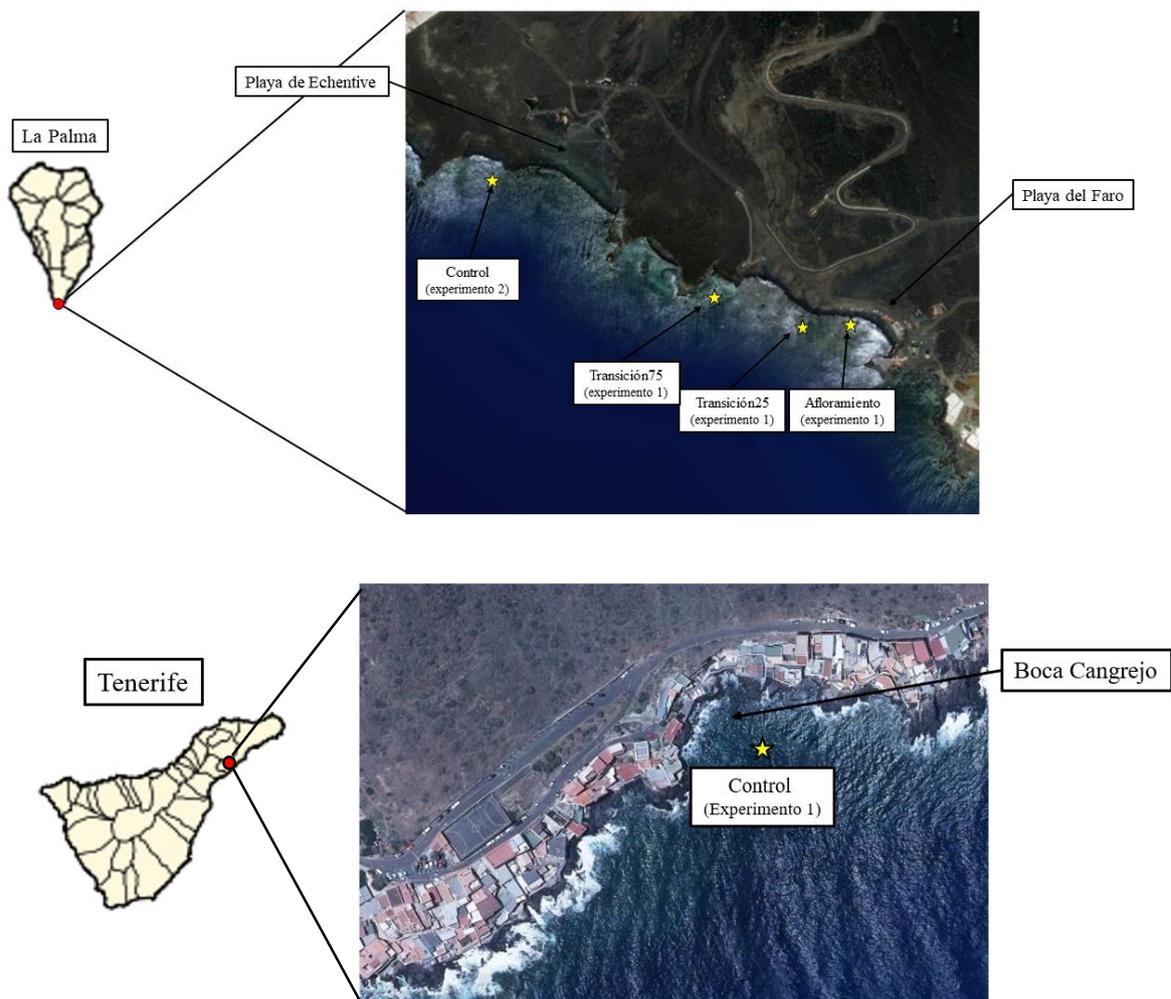


Figura 1. Localización de los puntos de muestreo en las islas de La Palma y en Tenerife. Los puntos de Afloramiento, Transición25 y Transición75 (experimento 1) en la playa del Faro de Fuencaliente y el Control (experimento 2) en la playa de Echentive, isla de La Palma, y el Control (Experimento 1) en Boca Cangrejo, isla de Tenerife. (Fuente: GRAFCAN, 08/08/2021).

Tabla 1. Valores de pH, alcalinidad total (At), Ω_{calcite} y $\Omega_{\text{aragonite}}$ en los puntos de “Afloramiento”, “Transición25”, “Transición75” y “Control”, tanto en marea baja como marea alta para el experimento 1 (exp 1) y el experimento 2 (exp 2) (Viotti *et al.*, 2019; González-Delgado *et al.*, 2021).

	Marea baja				Marea alta			
	pH	At ($\mu\text{mol/kg}$)	Ω_{calcite}	$\Omega_{\text{aragonite}}$	pH	At ($\mu\text{mol/kg}$)	Ω_{calcite}	$\Omega_{\text{aragonite}}$
Control (exp 1)	8,14	2573,98	6,11	3,98	8,11	2559,17	5,76	3,76
Control (exp 2)	8,14 \pm 0,01	2573,06 \pm 12	5,17 \pm 0,08	3,87 \pm 0,06	8,16 \pm 0,01	2485,96 \pm 6	6,09 \pm 0,12	3,98 \pm 0,08
Transición75	7,95 \pm 0,09	2798,68 \pm 69	4,73 \pm 0,69	3,09 \pm 0,45	8,08 \pm 0,01	2626,33 \pm 7	5,57 \pm 0,11	3,64 \pm 0,07
Transición25	7,81 \pm 0,01	2783,85 \pm 11	3,55 \pm 0,06	2,32 \pm 0,04	8,15 \pm 0,01	2501,37 \pm 8	5,95 \pm 0,30	3,93 \pm 0,08
Afloramiento	7,56 \pm 0,02	3252,43 \pm 42	2,48 \pm 0,07	1,62 \pm 0,04	7,95 \pm 0,07	2728,37 \pm 11	4,57 \pm 0,58	2,98 \pm 0,38

3.2. Experimento 1: fecundidad de *Arbacia lixula* en un gradiente de pH

Los individuos de *Arbacia lixula* fueron recolectados en apnea en abril de 2017, entre 0-5 m de profundidad en los cuatro puntos de muestreo. Posteriormente, en el laboratorio, se indujo al desove de los especímenes mediante la inyección de 2 mL de KCl 0,5 M en la cavidad perivisceral, y colocándolos posteriormente boca abajo en recipientes de 100 mL con agua de mar para almacenar los óvulos. De los individuos recolectados, se obtuvieron un total de 60 hembras: 17 del “Control”, 8 en “Transición75”, 11 de la zona “Transición25” y 24 en el “Afloramiento”.

Tras el desove, los erizos fueron limpiados con hipoclorito de sodio, tomando posteriormente las medidas de diámetro y altura de los individuos usando un calibre Vernier digital, y se calculó su volumen por la fórmula descrita por Elliott y colaboradores (2012). Por último, se realizó un recuento de los óvulos de cada hembra usando la cámara de recuento de Sedgewick-rafter, midiendo el tamaño de los mismos con el software de análisis de imágenes ImageJ (National Institutes of Health, E.E.U.U.).

Para los análisis estadísticos, debido a la relación directa entre el volumen de las hembras y la abundancia de sus óvulos, del total de hembras medidas se escogieron los individuos con el rango de volumen más común en todas las localidades. Se seleccionaron, por tanto, las ubicadas en el rango de volumen entre 18,12 – 24,78 cm³, resultando finalmente 20 individuos para el análisis estadístico: 7 del “Afloramiento”, 2 de “Transición25”, 5 de “Transición75” en La Palma, y 6 del “Control” en Boca Cangrejo, Tenerife.

3.3. Experimento 2: supervivencia y desarrollo larvario de *Arbacia lixula*

El 15 de mayo de 2021 se procedió a la recolección de individuos adultos de *A. lixula* en apnea en la playa de Echentive como parentales de la zona “Control”, e individuos de la zona de “Afloramamiento” de la playa del Faro, como parentales de la zona acidificada.

Posteriormente, en el laboratorio ubicado en el interior del Faro de Fuencaliente, se realizó, al igual que en el experimento 1, el desove de los especímenes. Con los individuos que resultaron hembras se procedió igual que en el experimento 1, mientras que, con los machos se les retiró el esperma mediante pipeteo y se almacenó en tubos eppendorf (Fig. 2). Para el linaje de parentales provenientes de la zona “Control”, se seleccionaron óvulos de 3 hembras y esperma de 2 machos, mientras que para el linaje de la zona de “Afloramamiento”, se seleccionaron 2 hembras y 2 machos, aumentando así la variabilidad genética para la fecundación. Por último, se almacenaron por separado los óvulos y esperma de las zonas “Control” y “Afloramamiento” en dos recipientes de 1.5 L con agua de mar cada uno, permitiendo así la fecundación y la facilitación en el transporte hacia el laboratorio de embriología del grupo de *Ecología de Comunidades Marinas y Conservación* de la Universidad de la Laguna, Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología. Una vez en el laboratorio definitivo, se procedió a limpiar las muestras con agua de mar filtrada y se separaron en tres matraces por cada linaje “AA” (Afloramamiento) y “CC” (Control) para disminuir así la densidad de embriones por litro.

Cuando las larvas se encontraron en estadio de gástrulas se realizaron los cálculos de densidades para añadir a cada matraz enlennmeyer de 2L una densidad media de 4 larvas por mililitro.. Por cada linaje (“CC” y “AA”) se montaron 6 réplicas, de las cuales 3 de ellas fueron sometidas a tratamientos de pH de 8,20 unidades (control) y las otras 3 réplicas a 7,40 unidades de pH (acidificado). Por lo tanto, se obtuvieron cuatro tipos de cultivo posibles: CC 8,20, CC 7,40, AA 8,20 y AA 7,40. Por lo que finalmente se obtuvieron 12 cultivos con densidades de 8000 larvas por cada matraz de enlennmeyer de 2L.



Figura 2. Proceso de desove de los individuos muestreados en la playa del Faro y Echentive. (A) Equipo de investigación preparando el material para el desove. (B) Inyección de 2 mL de KCl 0,5 M en la cavidad perivisceral. (C) Obtención del esperma en seco con una pipeta Pasteur y almacenamiento en un tubo Eppendorf. (D) Obtención de los óvulos en recipientes de 100 mL con agua de mar.

Para la preparación de los 12 sistemas de retroalimentación computarizados de pH, fue necesario el montaje de 12 ordenadores controladores de pH de la marca AquaMedic y Milwaukee's, 6 botellas de CO₂, 12 sensores de pH, 6 válvulas solenoides y 12 mangueras conectadas a los aireadores para cada cultivo. El sensor detecta el pH del cultivo, y a su vez el ordenador se encontraba conectado a una válvula solenoide que cerraba o abría una botella de CO₂ que permitía el burbujeo mediante una manguera en el interior del enlerrmeyer. La histéresis fue de $\pm 0,05$ unidades de pH, por lo que, al aumentar por encima de 7,45 unidades de pH, la válvula solenoide abría la botella para continuar con el burbujeo y disminuir así el pH. Únicamente los tratamientos CC 7,40 y AA 7,40 tuvieron control de pH, ya que el pH tiende a estabilizarse en 8,20 – 8,30 unidades. La aireación por burbujeo fue instalada en todos los cultivos para así aumentar la oxigenación y el movimiento de las larvas en el cultivo (Fig. 3).



Figura 3. Sistemas de retroalimentación computarizado de pH para los cultivos larvarios de *Arbacia lixula* en el laboratorio de embriología del Dpto. de Biología Animal, Edafología y Geología.

A los tres días, las larvas fueron alimentadas diariamente con las microalgas *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* sp., las cuales crecieron en un medio de cultivo F2 a una temperatura de 20°C y un ciclo de 12:12 horas de luz: oscuridad. La concentración de algas fue medida diariamente usando la cámara de recuento de Sedgewick-Rafter, y se alimentaba con 2000 células de microalgas por cultivo.

El agua de mar filtrada para los cultivos se obtenía mediante la purificación por filtros de microfibras de 100µm, 50µm y 10µm colocados en línea, además de un filtro ultravioleta. Debido a las buenas condiciones del agua de mar filtrada en los cultivos, únicamente se realizaron dos cambios de agua durante el experimento.

El cultivo tuvo una duración total de 33 días desde su fertilización, en los que se realizaron dieciséis medidas morfométricas y de densidad del cultivo larvario. Para cuantificar la supervivencia, crecimiento y desarrollo de las larvas en cada réplica de los diferentes tratamientos, se tomaban tres alícuotas de 5 mL cada dos días, estimando así la densidad de los cultivos. Además, diez larvas de cada réplica eran fijadas con paraformaldehído al 4% y fotografiadas cada día de muestreo usando una cámara digital conectada a un microscopio óptico. De cada larva fotografiada, se midió la longitud del cuerpo (BL), longitud del brazo post-oral (POL), el ratio POL: BL y volumen del estómago (SV) (Dorey *et al.*, 2013). Todas las medidas se hicieron usando el software Image J (National Institutes of Health, E.E.U.U.).

Por otra parte, se tomaron medidas de salinidad (g/L), temperatura (°C) y pH (unidades de pH) cada dos días con una sonda multiparamétrica Hannah HI98194, para el seguimiento químico del agua de los cultivos. También, se realizaron medidas de alcalinidad total (At) cada vez que hubo un cambio de agua en cada cultivo. Las medidas

se obtuvieron mediante una valoración potenciométrica de célula abierta con un valorador Metrohm Dosimat 665, utilizando HCl 0,01 N con una salinidad de aproximadamente 35 y siguiendo el Procedimiento Operativo Estándar 3b (Diskson *et al.*, 2007)

3.4. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico PRIMER 6 + PERMANOVA + v. 1.0.1 (Anderson *et al.*, 2008). Para el **primer experimento**, se realizó un análisis de la covarianza (ANCOVA) para la abundancia y diámetro de óvulos, calculando las matrices triangulares mediante distancias euclídeas. El diseño del análisis presentó un factor fijo con cuatro niveles de variación, representados por los lugares de muestreo (“Afloramiento”, “Transición25”, “Transición75” y “Control”) y el volumen de las hembras como covariable. Cuando las diferencias fueron significativas, se realizaron comparaciones *a posteriori* dos a dos (“pairwise”) entre los lugares de muestreo. Además, se obtuvieron gráficos de diagramas de cajas y bigotes para ambos análisis (abundancia y diámetro de óvulos).

Para el **segundo experimento**, de los cultivos larvarios se obtuvieron medias y desviaciones típicas de los parámetros fisicoquímicos de temperatura, pH y salinidad durante las 5 semanas de experimento. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) para las densidades larvarias y para sus medidas morfométricas, calculando las matrices triangulares mediante distancias euclídeas. El diseño del análisis para las densidades presentó tres factores fijos: “Cruce parental” (con dos niveles: “CC” y “AA”) “Tratamiento de pH” (con dos niveles: “8,20” y “7,40”) y “Semanas” (con cinco niveles: “1”, “2”, “3”, “4” y “5”). De igual modo, se realizó ANOVA para las medidas larvarias, cuyos factores fueron el “Cruce parental” y el “Tratamiento de pH” para las medidas de longitud del cuerpo (BL), longitud del brazo post-oral (POL), volumen estomacal (SV) y el ratio entre POL: BL, para los días 7 y 17 después de la fertilización. Cuando las diferencias fueron significativas, se realizaron comparaciones dos a dos *a posteriori* (“pairwise”), tanto para las densidades como para las medidas morfométricas. Todos los análisis presentaron 9999 permutaciones, estableciendo un nivel de significación de $\alpha=0,01$.

4. RESULTADOS

4.1. Fecundidad y tamaño de óvulos de *Arbacia lixula*

El análisis de la covarianza mostró una relación no significativa ($p=0,454$) entre el volumen de las hembras (Vo) y la abundancia de óvulos. Sin embargo, se detectó una diferencia significativa ($p=0,001$) de la abundancia de óvulos entre zonas de muestreo (Si). Por otra parte, se observó un valor no significativo ($p=0,841$) en la interacción entre el volumen y los diferentes lugares de muestreo, demostrando así que, las diferencias significativas de la abundancia de óvulos según el gradiente natural de CO₂ no dependen del volumen de la hembra (Tabla 2A). El análisis realizado *a posteriori* encontró diferencias significativas en la abundancia de óvulos entre las zonas “Afloramiento” y “Transición75” ($p=0,001$), y entre el “Afloramiento” y el “Control” ($p=0,001$) (Tabla 2B).

Tabla 2. (A) Resultados de análisis ANCOVA de 1 vía para la abundancia de óvulos de las hembras de volúmenes entre los rangos 18,12 y 24,78 mL, según el gradiente natural de CO₂, siendo “Vo” (Volumen de las hembras como covariable) y “Si” (Sitios de muestreo). (B) Resultados de análisis dos a dos a posteriori, comparando los lugares de muestreo.

(A) Fuente de variación	df	SS	MS	Pseudo-F	<i>p</i>	Unique perms
Vo	1	0,24	0,24	0,58	0,459	9824
Si	3	20,68	6,96	17,31	0,001	9954
Vo x Si	3	0,30	0,10	0,25	0,841	9956
Res	12	4,82	0,40			
Total	19	26,24				

(B) Análisis <i>a posteriori</i>		
Grupos	<i>t</i>	<i>p</i>
Afloramiento, Transición75	5,64	0,001
Afloramiento, Control	6,66	0,001
Afloramiento, Transición25	0,55	0,610
Transición75, Control	1,04	0,337
Transición75, Transición25	1,34	0,300
Control, Transición25	3,25	0,015

El análisis ANCOVA para el tamaño de óvulos mostró interacciones no significativas tanto para el volumen de las hembras (Vo) ($p=0,483$) como para los diferentes sitios de muestreo (Si) ($p=0,134$). Además, la interacción entre la covariable y los diferentes sitios de estudio fue no significativa ($p=0,336$) (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de análisis ANCOVA de 1 vía para el tamaño medio de los óvulos en hembras de volúmenes comprendidos entre 18,12 y 24,78 cm³, según el gradiente natural de CO₂, siendo “Vo” (Volumen de las hembras la covariable) y “Si” (Sitios de muestreo).

Fuente de variación	df	SS	MS	Pseudo-F	<i>p</i>	Unique perms
Vo	1	9,28E ⁻⁰⁶	9,28E ⁻⁰⁶	0,53	0,483	9824
Si	3	1,20E ⁻⁰⁴	4,00E ⁻⁰⁵	2,28	0,134	9954
Vo x Si	3	6,71E ⁻⁰⁵	2,24E ⁻⁰⁵	1,27	0,336	9956
Res	12	2,11E ⁻⁰⁴	1,76E ⁻⁰⁵			
Total	19	4,08E ⁻⁰⁴				

En la Fig. 4 se muestra el promedio de la abundancia de óvulos y su tamaño en cada lugar. Se muestra el menor dato registrado en el número de óvulos en el “Afloramiento” con $3,06 \times 10^6$, seguido de la zona “Transición25” con $5,26 \times 10^6$, mientras que las hembras del “Control” y “Transición75” desovaron un promedio de $12,93 \times 10^6$ y $17,69 \times 10^6$ óvulos, respectivamente (Fig. 4a). Por otra parte, los promedios del tamaño de los óvulos en las hembras de los diferentes lugares no muestran una gran diferencia, siendo de 0,006 mm en el afloramiento y 0,007 mm en la zona de Transición25, mientras que el promedio del diámetro de los óvulos en las zonas Control y Transición75 fueron de 0,006 mm y 0,007 mm, respectivamente (Fig. 4b).

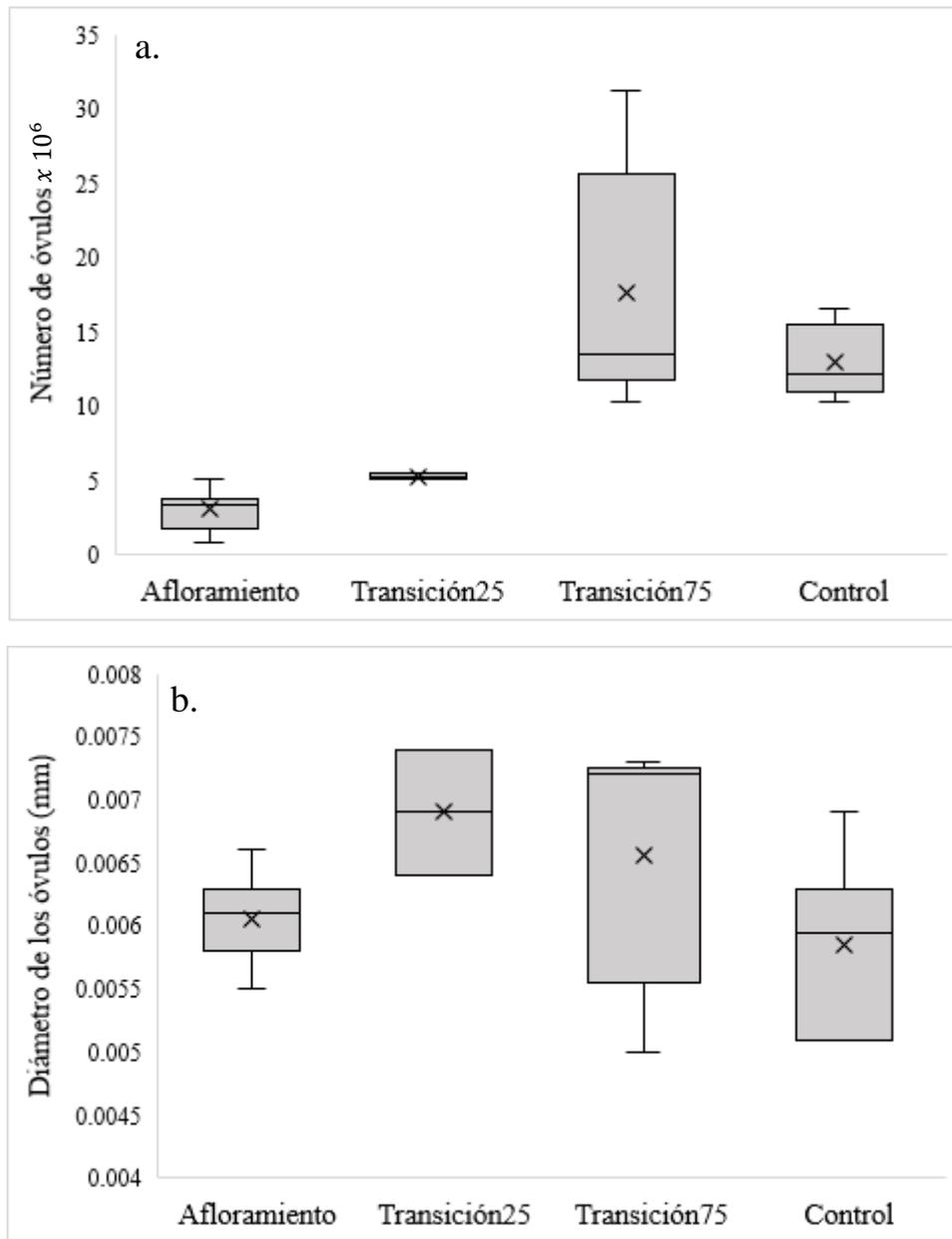


Figura 4. Diagrama de cajas y bigotes del número de óvulos desovados (a.) y del diámetro de los óvulos (b.) de las hembras de *Arbacia lixula* en las diferentes zonas de estudio: Afloramiento, Transición25, Transición75 y Control. Las medianas se encuentran marcadas con una línea horizontal; los bordes de cada caja representan los cuartiles 25% y 75%; los bigotes representan los datos más bajos y más altos de cada zona (N=20).

4.2. Desarrollo larvario de *Arbacia lixula*

Se representa a continuación el desarrollo larvario general que se obtuvo durante el experimento de *A. lixula* (Fig. 5). En las primeras 24h tras la fecundación aparecen las larvas prisma, y hasta el día 4 se forma la larva pluteus presentando dos brazos post-orales. Desde el día 4 al 17 las larvas presentaron 4 brazos: 2 post-orales y 2 antero-laterales. Posteriormente, durante un periodo prolongado desde el día 17 al día 30, las larvas presentaron 6 brazos: 2 post-orales, 2 antero-laterales y 2 pre-orales. Los últimos días de cultivo se obtuvieron larvas con 8 brazos: 2 post-orales, 2 antero-laterales, 2 pre-orales y 2 post-dorsales.

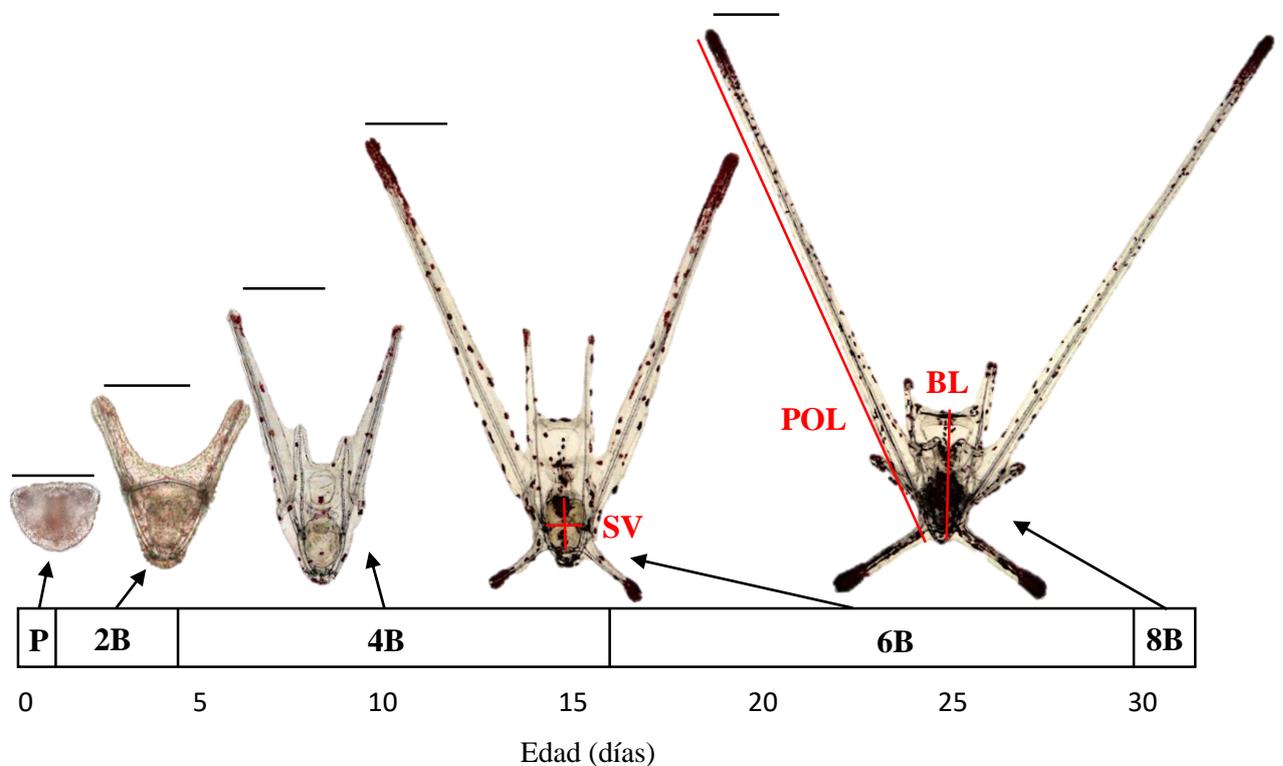


Figura 5. Estadios predominantes de *Arbacia lixula* durante los días de experimento. P= larvas prisma, 2B= larvas pluteus con 2 brazos, 4B= larvas pluteus con 4 brazos, 6B= larvas pluteus con 6 brazos y 8B= larvas pluteus con 8 brazos. La línea superior en cada larva representa una magnitud de 100 µm. Las líneas rojas en la larva 6B indican las medidas para el volumen estomacal (SV) y las líneas rojas en la larva 8B indican las medidas para la longitud del cuerpo (BL) y la longitud del brazo post-oral (POL).

En primer lugar, se obtuvieron medias \pm desviaciones típicas de los parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura y salinidad) en cada tratamiento (CC 8,20, CC 7,40, AA 8,20 y AA 7,40) durante los 33 días de duración del experimento (Tabla 4). Los valores de pH en los cultivos a 8,20 se encontraron estables, a excepción de las semanas 3 y 4 de AA 8,20 que alcanzaron medias de 8,30 unidades de pH. Por otro lado, los

cultivos con tratamientos de pH acidificado a 7,40 se mantuvieron estables, a excepción de la Semana 1 que presentaron medias de pH de 7,30. Respecto a la alcalinidad, se realizaron dos mediciones previas a los cambios de agua, correspondiendo una de ellas a las dos primeras semanas de experimento, y la otra antes del fin del mismo.

Tabla 4. Medias \pm desviación típica del pH (unidades de pH), temperatura ($^{\circ}$ C), salinidad (g/L) y alcalinidad total (At) (μ mol/kg) por tratamiento medidos durante el experimento. CC (linaje Control) y AA (linaje Afloramiento).

		Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
CC 8.2	pH	8,2 \pm 0,1	8,2 \pm 0,1	8,2 \pm 0,0	8,2 \pm 0,1	8,2 \pm 0,1
	Temperatura	22,2 \pm 0,3	21,0 \pm 0,2	21,2 \pm 0,2	22,8 \pm 0,7	23,0 \pm 0,0
	Salinidad	30,38 \pm 0,4	30,09 \pm 0,2	30,37 \pm 0,1	30,09 \pm 0,4	29,07 \pm 16,8
	At	2390,24		2392,05		
CC 7.4	pH	7,3 \pm 0,1	7,4 \pm 0,1	7,4 \pm 0,0	7,4 \pm 0,0	7,4 \pm 0,0
	Temperatura	21,9 \pm 0,1	20,6 \pm 0,3	21,1 \pm 0,2	23,2 \pm 0,2	22,9 \pm 0,1
	Salinidad	30,22 \pm 0,3	30,15 \pm 0,2	30,58 \pm 0,3	29,99 \pm 0,2	29,08 \pm 0,0
	At	2381,27		2382,34		
AA 8.2	pH	8,2 \pm 0,0	8,3 \pm 0,0	8,3 \pm 0,0	8,2 \pm 0,0	8,2 \pm 0,0
	Temperatura	22,3 \pm 0,2	21,1 \pm 0,4	21,5 \pm 0,1	23,1 \pm 0,1	23,1 \pm 0,1
	Salinidad	30,05 \pm 0,2	29,99 \pm 0,2	30,38 \pm 17,5	29,94 \pm 17,3	29,12 \pm 16,8
	At	2391,32		2392,10		
AA 7.4	pH	7,3 \pm 0,1	7,4 \pm 0,0	7,4 \pm 0,1	7,4 \pm 0,0	7,4 \pm 0,0
	Temperatura	22,0 \pm 0,3	21,0 \pm 0,2	21,3 \pm 0,4	23,3 \pm 0,3	23,0 \pm 0,1
	Salinidad	30,33 \pm 0,2	30,24 \pm 0,1	30,93 \pm 0,1	29,99 \pm 0,1	29,08 \pm 0,1
	At	2383,89		2384,45		

Los resultados de los análisis ANOVAs por permutaciones de las densidades larvarias mostraron, además de diferencias significativas para los tres factores creados (“Cruce parental”, “Tratamiento de pH” y “Semanas”), una interacción significativa ($p=0,006$) para los factores “Tratamiento pH x Semanas” (Tabla 5A), indicando que la influencia del pH en la supervivencia larvaria cambió a lo largo de las semanas. El análisis por pares *a posteriori* (Tabla 5B) de dicha interacción encontró diferencias significativas entre los tratamientos para la Semana 2 ($p=0,001$), Semana 3 ($p=0,000$), Semana 4 ($p=0,000$) y Semana 5 ($p=0,000$). Al comienzo del experimento, los cultivos se

encontraban en mayor densidad en el orden CC 7,40, CC 8,20, AA 7,40 y AA 8,20 (Fig. 6). Se observa una disminución drástica en la densidad larvaria de todos los cultivos a partir de la semana 2 (día 15). Los cultivos CC 8,20 y CC 7,40 presentaron una menor tasa de supervivencia a lo largo de los días. Por otra parte, los cultivos AA 8,20 y AA 7,40 alcanzaron mayor supervivencia a lo largo del cultivo, destacando la mayor supervivencia de las larvas de parentales del afloramiento a tratamiento 7,40.

Tabla 5. (A) Resultados del análisis ANOVA por permutaciones de tres vías que contrasta el efecto del “Tratamiento de pH” (TR) y el “Cruce parental” (CR) por “Semanas” (SE) en las densidades de las larvas de *Arbacia lixula* a lo largo de experimento. (B) Resultados de los análisis por pares a posteriori de la combinación “Tratamiento de pH” y “Cruce parental” (CC 8,20, CC 7,40, AA 8,20, AA7,4) por “Semanas” (SE 1, SE 2, SE 3, SE 4, SE 5).

(A) Fuente de						
variación	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	
CR	1	2,5038	2,5038	32,634	0,000	
TR	1	6,2256	6,2256	81,144	0,000	
SE	4	18,143	4,5357	59,118	0,000	
CRxTR	1	0,035967	0,035967	0,46879	0,499	
CRxSE	4	0,29956	0,074891	0,97612	0,424	
TrxSE	4	1,144	0,28599	3,7276	0,006	
CrxTRxSE	4	0,21277	0,053191	0,69329	0,601	
Res	154	11,815	0,076723			
Total	173	39,028				

(B) Análisis a posteriori						
Grupos		SE 1	SE 2	SE 3	SE 4	SE 5
7.40 vs 8.20	t	13,373	31,657	60,336	60,258	52,375
	P	0,187	0,001	0,000	0,000	0,000

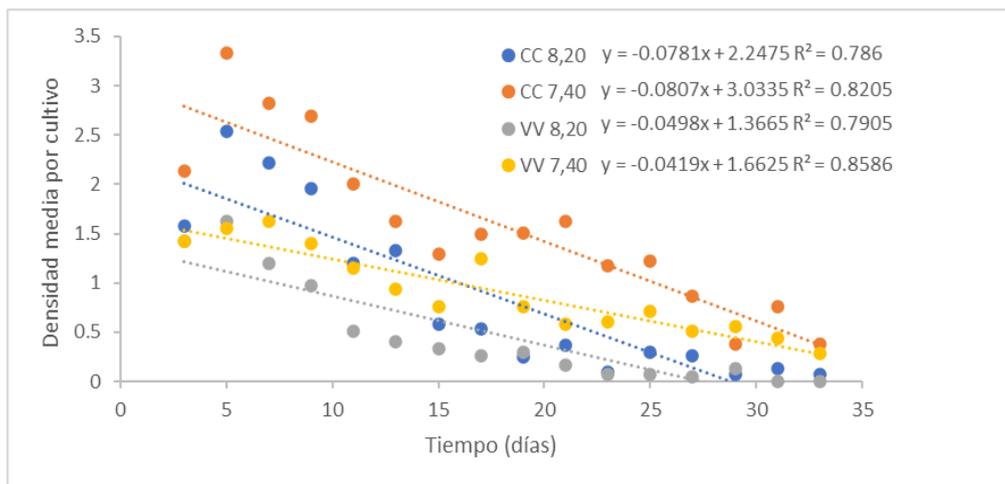


Figura 6. Densidad media de larvas por cultivo en cada combinación de tratamiento de pH (8,20 y 7,40) y el Cruce parental (Control: CC, y Afloramiento de CO₂: AA) durante los 33 días del experimento.

Los resultados de los análisis ANOVAs por permutaciones de las medidas larvarias para los días 7 y 17 post-fertilización revelaron diferencias significativas para los factores “Cruce parental” y “Tratamiento de pH” en todas las medidas excepto la del volumen estomacal en el día 7 post-fertilización (Tabla 6. A1). Por otro lado, las interacciones de los factores “Tratamiento pH x Cruce parental” solo fueron significativas en el día 17 post-fertilización (Tabla 6. A2), indicando que la influencia del pH de los cultivos en el crecimiento larvario fue diferente según el cruce parental, pero solo en las etapas más avanzadas del experimento. Concretamente, el análisis por pares *a posteriori* (Tabla 6. B) indicó que solo había diferencias significativas entre los tratamientos de pH (8,20 o 7,40) en el crecimiento de las larvas del linaje AA (del afloramiento de CO₂) para todas las medidas (p=0,001).

Tabla 6. (A) Resultados de los análisis ANOVAs por permutaciones de dos vías que contrasta el efecto del “Tratamiento de pH” (TR) y el “Cruce parental” (CR) en las medidas de las larvas de *Arbacia lixula*: longitud del cuerpo (BL), longitud del brazo post-oral (POL), volumen estomacal (SV) y ratio entre POL: BL, en el día 7 después de la fertilización (1) y en el día 17 después de la fertilización (2). (B) Resultados de los análisis por pares de la combinación “Tratamiento de pH” y “Cruce parental” de todas las medidas: Longitud del cuerpo (BL), Longitud del brazo post-oral (POL), Volumen estomacal (SV) y ratio entre POL: BL, en el día 17 después de la fertilización (B).

(A)	(1) Día 7 Post-fertilización					(2) Día 17 Post-fertilización					
	BL	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
Cr		1	0,01175	0,01175	10,226	0,002	1	0,039474	0,039474	19,543	0,001
Tr		1	0,044345	0,044345	38,593	0,001	1	0,02715	0,02715	13,442	0,003
Tr x Cr		1	8,37E-05	8,37E-05	0,072884	0,792	1	0,014099	0,014099	6,9803	0,007
Res		116	0,13329	0,001149			95	0,19189	0,0020199		
Total		119	0,18947				98	0,26602			

POL										
Cr	1	0,067875	0,067875	15,149	0,002	1	0,33162	0,33162	18,453	0,001
Tr	1	0,61718	0,61718	137,74	0,001	1	0,55639	0,55639	30,96	0,001
Tr x Cr	1	0,00253	0,00253	0,56465	0,447	1	0,29309	0,29309	16,309	0,001
Res	116	0,51975	0,0044806			95	1,7073	0,017971		
Total	119	1,2073				98	2,801			
SV										
Cr	1	5,90E-05	5,90E-05	0,059787	0,804	1	0,042022	0,042022	20,583	0,001
Tr	1	0,042818	0,042818	43,382	0,001	1	0,054536	0,054536	26,713	0,001
Tr x Cr	1	2,09E-05	2,09E-05	0,021187	0,888	1	0,041894	0,041894	20,521	0,001
Res	116	0,11449	0,000987			95	0,19395	0,0020415		
Total	119	0,15739				98	0,3202			
POL:BL										
Cr	1	0,050417	0,050417	6,7982	0,010	1	0,23392	0,23392	8,2817	0,005
Tr	1	1,1827	1,1827	159,47	0,001	1	0,81063	0,81063	28,699	0,001
Tr x Cr	1	0,0033854	0,0033854	0,45647	0,505	1	0,35932	0,35932	12,721	0,001
Res	116	0,86029	0,0074163			95	2,6833	0,028246		
Total	119	2,0968				98	4,0118			
(B) 17 día post-fertilización										
Tr x Cr		BL		POL		SV		POL:BL		
7,40 vs 8,20 en CC		t	0,723	10,977		0,490		12,352		
		p	0,485	0,280		0,646		0,223		
7,40 vs 8,20 en AA		t	44,686	66,856		64,224		64,702		
		p	0,001	0,001		0,001		0,001		

Si se observan las diferentes medidas tomadas (BL, POL, SV y ratio POL: BL) al día 17 post-fertilización (Fig. 7), se puede ver como las larvas AA 8,20 alcanzaron mayores tallas, seguido de las larvas CC 8,20. Por otra parte, el cultivo CC 7,40 y AA 7,40 mostraron los menores valores para todas las medidas. Además, siguiendo el desarrollo larvario a lo largo del experimento, todas las medidas muestran un aumento progresivo hasta la quinta semana y última del experimento (Fig. 8).

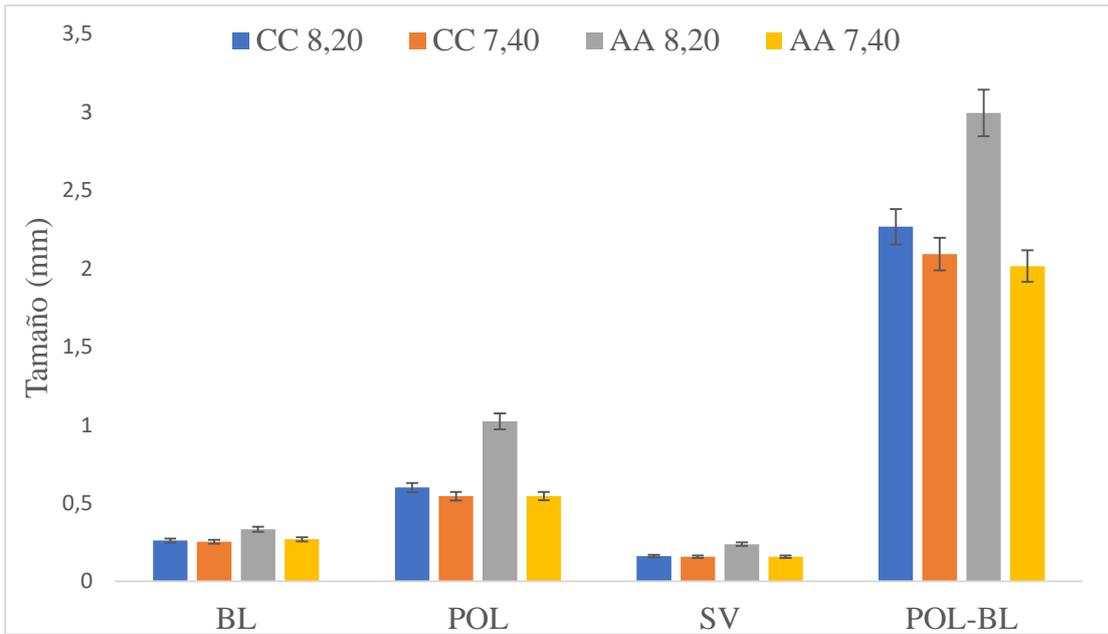
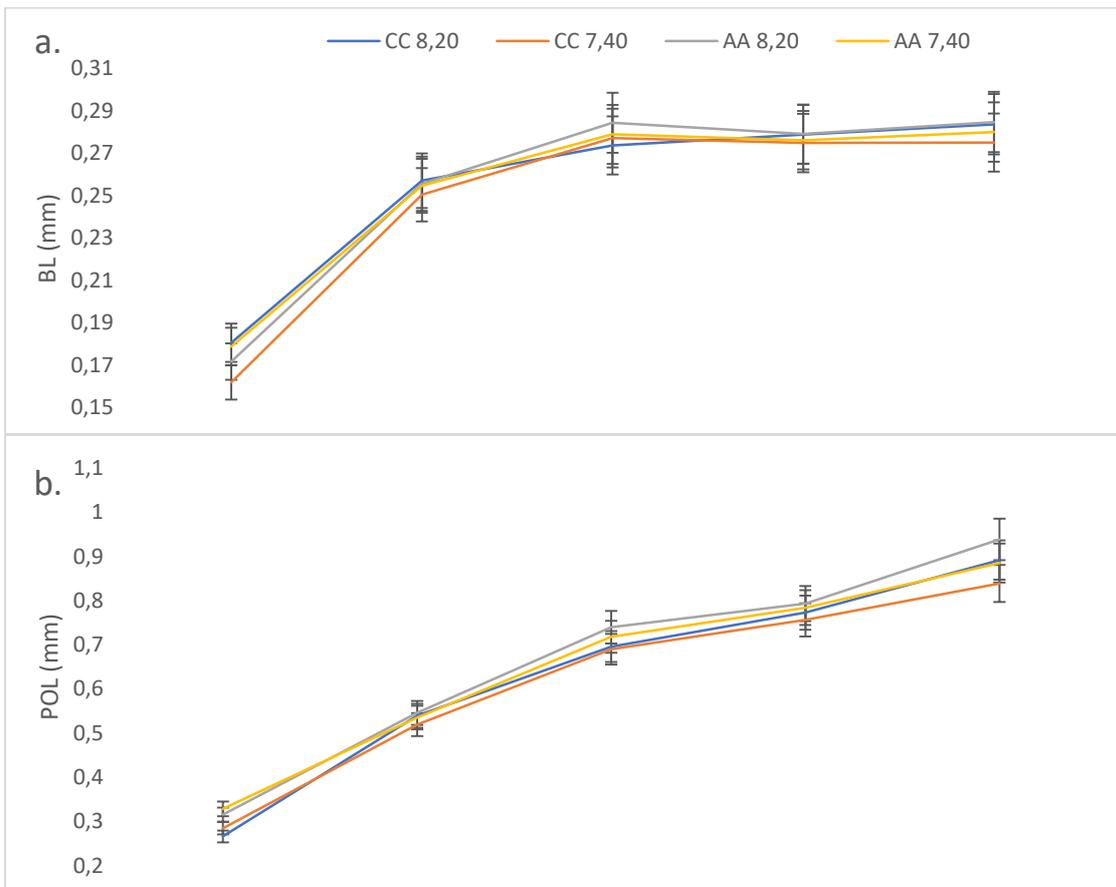


Figura 7. Medidas de las diferentes partes larvianas el día 17 post-fertilización para todos los cultivos (CC 8,20, CC 7,40, AA 8,20, AA 7,40). Longitud del cuerpo (BL), longitud del brazo post-oral (POL), volumen estomacal (SV) y ratio POL:BL (POL:BL).



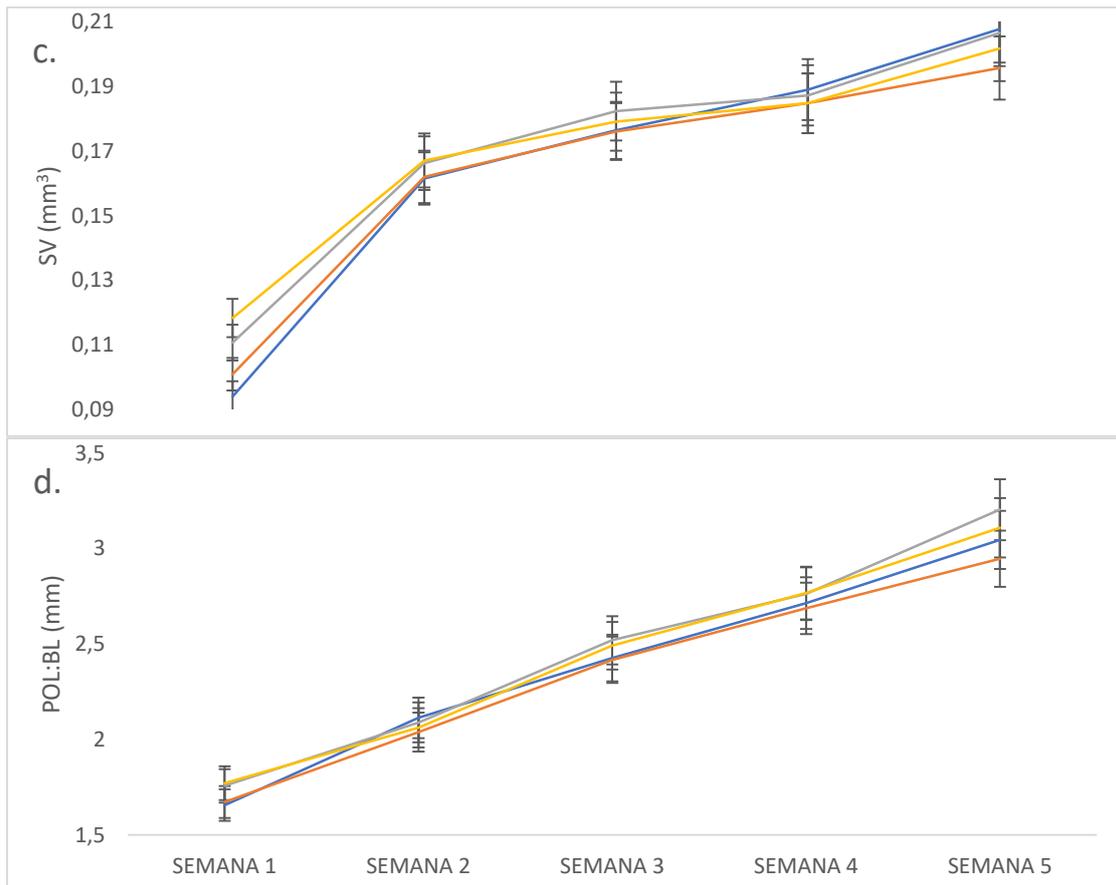
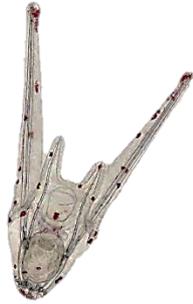


Figura 8. Medidas de las diferentes partes larvarias a lo largo de las 5 semanas de experimento para todos los cultivos (CC 8,20, CC 7,40, AA 8,20, AA 7,40). (a.) Longitud del cuerpo (BL). (b.) Longitud del brazo post-oral (POL). (c.) Volumen estomacal (SV). (d.) Ratio POL:BL (POL:BL).

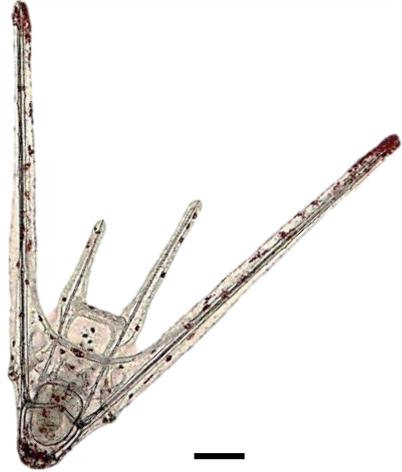
Por último, en la Fig. 9 se compara gráficamente el tamaño y la morfología de las larvas cultivadas (CC 8,20, CC 7,40, AA 8,20 y AA 7,40) para los días 7 y 17 post-fertilización. Aquí se corroboran los resultados vistos anteriormente, observando un retraso en el desarrollo de las larvas CC 7,40 y AA 7,40, siendo las larvas del cultivo AA 8,20 las más grandes y desarrolladas. Al comienzo, al día 7, todas las larvas presentaron 4 brazos. Sin embargo, las larvas del día 17 en los cultivos CC 8,20, CC 7,40 y AA 7,40 presentaron un comienzo del crecimiento de los brazos 5° y 6°, mientras que, el cultivo AA 8,20 ya presentaron larvas con 8 brazos.

DIA 7 Post-fertilización	DIA 17 Post-fertilización
---------------------------------	----------------------------------

CC 8,20



100 μm

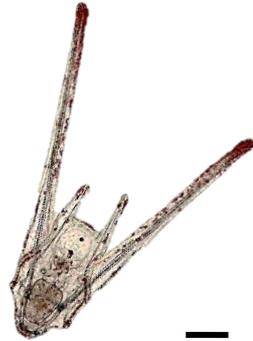


100 μm

CC 7,40



100 μm

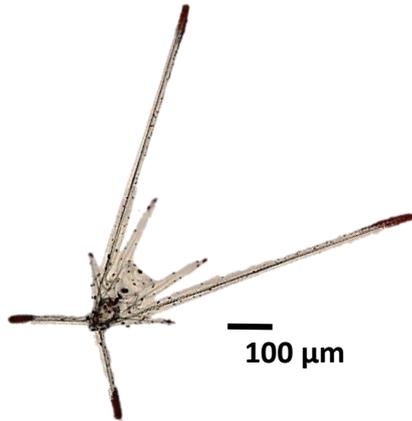


100 μm

AA 8,20



100 μm



100 μm

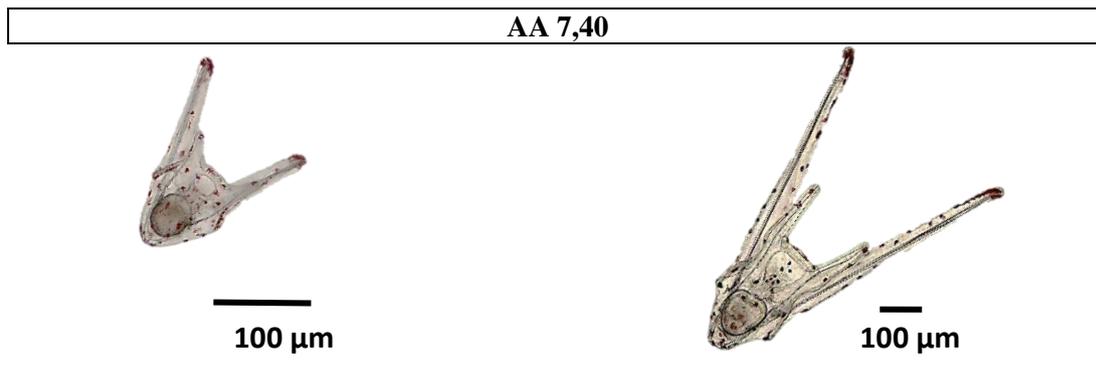


Figura 9. Estadíos del desarrollo larvario de *Arbacia lixula* en los que se muestra la morfología a los 7 y 17 días post-fertilización para todos los cultivos (CC 8,20, CC 7,40, AA 8,20 y AA 27,40).

5. DISCUSIÓN

En el presente estudio se aporta una mayor información acerca de los efectos de la acidificación oceánica sobre la fecundidad, y desarrollo larvario de la especie de erizo de mar *Arbacia lixula*. Se investiga por primera vez la posible adaptación de esta especie en el afloramiento natural de CO₂ descubierto en la costa de Fuencaliente (La Palma) por Hernández y colaboradores (2016). Se destaca la importancia de investigar los organismos que habitan en los afloramientos naturales de CO₂, esenciales para comprender las respuestas a largo plazo de los ecosistemas marinos al aumento de las concentraciones de CO₂ atmosférico.

La mayoría de los estudios hasta la fecha se han realizado en laboratorio, donde se exponían a los organismos provenientes de una zona cuyo pH es ambiental (~8,10 unidades), a unas condiciones puntuales de pH ácido, viendo así los efectos a corto plazo de las especies. Estas investigaciones son importantes para conocer la resistencia de determinadas especies a fuertes cambios puntuales en las condiciones ambientales y ver su resiliencia. Sin embargo, no permiten estudiar el potencial de adaptación de los organismos cómo es posible en los afloramientos naturales de CO₂. Es por ello, que nuestro trabajo recoge información novedosa y sorprendente sobre los organismos calcáreos que han vivido toda su vida en condiciones de acidificación.

Concretamente, nuestros resultados mostraron una disminución de la abundancia de óvulos en las hembras debido al ambiente acidificado del afloramiento de CO₂. Por otra parte, se demostró que el pH 7,40 afectó menos a la supervivencia de las larvas cuyos progenitores provenían del afloramiento. Respecto a la morfología y tamaño de las larvas,

se reveló que las larvas del afloramiento tratadas con pH 8,20 mostraron estar más desarrolladas al final del cultivo. Además, las larvas del afloramiento tratadas a pH 7,40 fueron mayores que las del control a pH 7,40. Todo esto prueba el hecho de que existe ya una adaptación a la acidificación de las poblaciones de *A. lixula* que viven en las zonas de afloramiento.

A. lixula, a pesar de no presentar cambios en el tamaño de sus gametos femeninos, sí que presentó una disminución significativa de la abundancia de los mismos a medida que nos acercamos al afloramiento natural de CO₂ de la Playa del Faro (pH 7,60). De igual modo, mediante experimentos de laboratorio, Siikauvuopio y colaboradores (2007) examinaron el crecimiento de las gónadas a los 56 días en el erizo de mar *Strongylocentrotus droebachiensis*, observando una reducción significativa del 67% expuesto a 6,98 unidades de pH, en comparación con los controles. Pero existen otros resultados, obtenidos con los gametos de otras especies de erizos de mar que han sufrido exposición prolongada al CO₂. Por ejemplo, en el caso de *Hemicentrotus pulcherrimus*, la gametogénesis y el desove se vieron retrasados tras 1 mes de exposición a pH 7,60, sin embargo, no tuvo efectos sobre la densidad de óvulos, la supervivencia o el crecimiento de las larvas (Kurihara *et al.*, 2013). Si bien el trabajo de Kurihara y colaboradores fue realizado en laboratorio y por un corto periodo de tiempo. Al contrario, Byrne y colaboradores (2010) observaron en el erizo de mar *Heliocidaris erythrogramma* que ni la gametogénesis, ni la fertilización se vieron afectadas por la acidificación en condiciones similares.

Por otra parte, *Tripneustes gratilla* mostró una disminución prácticamente total de la presencia de gónadas en las hembras cuando se expuso a largo plazo a 7,60 unidades de pH (Dworjanyn y Byrne, 2018). Sin embargo, a diferencia de *T. gratilla*, en otro estudio realizado con *A. lixula* se determinó que los efectos negativos debido a la acidificación pueden ser amortiguados por temperaturas superiores a 20°C (Gianguzza *et al.*, 2014). No solo eso, se ha observado que, en algunos casos, los efectos negativos de la acidificación también pueden compensarse con el aumento de alimento (George, 1996; Pansch *et al.*, 2014).

Las variaciones, tanto en la morfología como en la fisiología de los organismos ante un cambio en las condiciones ambientales, son debidas a la reasignación de energía (Fernández y Boudouresque, 1997). En el caso de *P. lividus* se demostró que la exposición a un pH bajo resulta en diferentes estrategias en erizos de mar machos y hembras (Marceta

et al., 2020). En nuestro trabajo, claramente se muestra una redistribución en la energía de las hembras, que en un principio está destinada a la producción de gametos, hacia otros procesos metabólicos que permiten a *A. lixula* vivir en ambientes de estrés, como ya se ha comprobado en otros afloramientos de CO₂ (Calosi *et al.*, 2013). La capacidad de redistribución de la energía ya se había observado con anterioridad en el desarrollo de equinodermos ante un aumento de CO₂ en el agua de mar (Stumpp *et al.*, 2012). De tal manera, se refleja una posible nueva estrategia de supervivencia de esta especie ante la acidificación oceánica. Esto nos recuerda el estudio realizado en el afloramiento de CO₂ de la isla de Ischia (Italia) sobre los efectos del gradiente de pH natural en los óvulos de *A. lixula*, donde se determinó que la capa gelatinosa de los óvulos procedentes del afloramiento era más robusta, mostrando así otra posible estrategia de adaptación materna y una mejora para la fertilización ante la acidificación (Foo *et al.*, 2018b).

Cabe destacar la importancia de conocer la composición bioquímica de los gametos, además de su tamaño y abundancia. Puesto que se pueden encontrar diferencias en las cantidades de lípidos, proteínas y carbohidratos suministrados por las hembras, pudiendo variar entre poblaciones de la misma especie. Por lo tanto, es de interés conocer el contenido de estas macromoléculas en los óvulos de las hembras de *A. lixula* en zonas de estrés ambiental, como es el afloramiento natural de CO₂ de La Palma, ya que la energía proporcionada por las madres en los óvulos puede determinar las respuestas de las larvas para mitigar los efectos de los estresores (Hernández *et al.*, 2020).

Los efectos de la acidificación en la abundancia de óvulos podrían tener efectos derivados en las futuras larvas, como se ha recogido anteriormente en varias investigaciones realizadas en laboratorio. Por ejemplo, Pace y Dalman (2021) expusieron a las larvas del erizo de mar *Lytechinus variegatus* provenientes de una zona control a diferentes unidades de pH (7,80 y 8,20), mostrando un aumento de la mortalidad, disminución del tamaño y mayor porcentaje de anomalías morfológicas en las larvas expuestas a pH 7,80. Otro estudio mostró que tras la exposición a pH 7,30, hubo efectos negativos en el desarrollo larvario de *L. variegatus* y *P. lividus*, siendo más tolerante la primera especie (Passarelli *et al.*, 2017). La disminución del pH en las larvas de *Strongylocentrotus droebachiensis*, sin embargo, mostraron disminución en todos los factores medidos, pero con cierta plasticidad morfológica, salvo a pH 7,00 (Dorey *et al.*, 2013).

En estos estudios, al ser realizados en laboratorio, no se tienen en cuenta las variables ambientales, como se ha citado anteriormente. Por lo tanto, se ha visto que establecer y generalizar los efectos de la AO no es tan simple, e influyen muchos factores ambientales y específicos de los organismos.

Por otro lado, el estudio de Suckling y colaboradores (2014) fue uno de los primeros trabajos en mostrar la importancia de tener en cuenta la posible aclimatación de los erizos adultos y el tiempo de exposición. Estos autores observaron que los individuos de *Psammechinus miliaris* aclimatados a un pH de 7,73 durante más de 48 días, obtuvieron larvas más grandes en sus etapas avanzadas, en comparación con las larvas procedentes de los adultos sin aclimatación previa. Lo mismo ocurrió con *Strongylocentrotus droebachiensis* (Dupont *et al.*, 2012), donde el aumento de mortalidad de las larvas en condiciones ácidas de 7,69 unidades de pH era notable aún a los 4 meses de experimento, pero no a los 16 meses de aclimatación de sus padres. Por el contrario, en el caso de *Echinometra* sp. se realizó una aclimatación de 2 años y se obtuvieron resultados diferentes a las especies anteriores, donde la mortalidad fue de hasta un 38% tras 15 días de cultivo en las larvas de progenitores aclimatados a pH 7,80 en comparación con las larvas de progenitores aclimatados a condiciones de pH 8,10 (Karelitz, 2020). Sabiendo además que esta aclimatación puede estar relacionada con la variabilidad genética que difiere entre las larvas provenientes de diferentes linajes maternos (Chan *et al.*, 2016), estas investigaciones *in vitro* demuestran claramente las posibles ventajas que podemos obtener con los afloramientos naturales de CO₂. Es decir, la importancia de estudiar los erizos de mar que han vivido toda su vida aclimatándose a un ambiente acidificado, y su descendencia.

Hasta la fecha, son pocos los estudios larvarios de erizos de mar realizados en afloramientos naturales de CO₂. En el presente estudio se demuestra la existencia de adaptación de la progenie de *Arbacia lixula* proveniente del linaje de zonas acidificadas, en comparación con la progenie de zonas control, observándose una mayor supervivencia a pH 7,40, y mayor tamaño y desarrollo a pH 8,20. Además, se observó como los efectos en el desarrollo larvario diferían entre los diferentes estadios, destacando así la influencia de estos efectos en las etapas más avanzadas del desarrollo. Un estudio comparativo con la misma especie fue realizado por Foo y colaboradores (2020), donde tomaron larvas de *A. lixula* provenientes de una zona cercana al afloramiento de Ischia (Italia) y las cultivaron tanto en laboratorio como en el mismo afloramiento. Las larvas cultivadas en

laboratorio mostraron una disminución de los brazos post-orales a pH 7,70, a diferencia de las criadas en el mismo afloramiento de CO₂, que desarrollaron brazos más largos, sin embargo, las larvas únicamente fueron comparadas tras 3 días post-fertilización. Estas respuestas divergentes de las mismas poblaciones de larvas, muestran la importancia de considerar la plasticidad fenotípica, las variaciones naturales del pH y las complejas interacciones de otros factores ambientales.

También, se han realizado estudios con otra especie de erizo de mar que vive en afloramientos de CO₂. Por ejemplo, las larvas del erizo de mar *Echinometra mathaei* cultivadas en los afloramientos naturales de CO₂ de Papua Nueva Guinea, muestran brazos más pequeños en las zonas cuyo pH es 7,50-7,72, en comparación con las cultivada en zonas naturales cuyo rango de pH es 7,89-7,92 (Lamare *et al.*, 2016). Por otro lado, los adultos de *E. mathaei* en este mismo afloramiento natural de Papua Nueva Guinea con rango de pH entre 7,89-7,92, eran tres veces más grandes en comparación con una zona control adyacente (Uthicke *et al.*, 2016). Además, ambos estudios incluyeron análisis morfológicos y genéticos, determinando que la especie no presentaba potencial de adaptación a las condiciones de acidificación.

En nuestra investigación se corrobora la posible adaptación a la acidificación oceánica de *Arbacia lixula*. Por último, destacamos la necesidad de seguir investigando las diferentes especies que habitan en los afloramientos naturales de CO₂ de todo el mundo. De ese modo, se podrá entender mejor la posible adaptación de los organismos a los océanos acidificados del futuro. En cuanto a los efectos de la acidificación, la generalización de los resultados es un aspecto que ha llevado a error en muchas ocasiones, debido a la gran variedad de factores que intervienen en el desarrollo de las especies marinas como los erizos de mar. A pesar de ello, las investigaciones en desarrollo se están realizando de forma más completa, teniendo en cuenta los efectos a largo plazo y el aprovechamiento las zonas de afloramiento de CO₂, como el de la playa del Faro de Fuencaiente en la isla de La Palma, siendo de vital importancia para la investigación de los efectos del cambio climático en los ecosistemas marinos.

6. CONCLUSIONES

1. Los últimos datos tomados en el afloramiento natural de CO₂ en la playa de Fuencaliente, en La Palma, aportan nueva información acerca de los efectos de la acidificación prolongada en la producción de gametos, supervivencia y morfología larvaria del erizo de mar *Arbacia lixula*. En primer lugar, se muestra una disminución en la abundancia de sus gametos femeninos como una estrategia ante la aclimatación a la acidificación.

2. En el caso de los cultivos larvarios, la supervivencia larvaria fue mayor en la descendencia de los adultos de *A. lixula* que viven en el afloramiento de CO₂ de La Palma, a pesar del general aumento de la mortalidad que existió en todos los cultivos sometidos a la acidificación (sobre todo a partir de las etapas larvarias más avanzadas). También se encontró que las larvas de erizos procedentes del afloramiento de CO₂ de Fuencaliente presentaron un crecimiento mayor que aquellas larvas procedentes de erizos que habitan en zonas control, tanto en los cultivos con pH normal como a pH ácido. Por lo tanto, se puede afirmar que existe cierta plasticidad fenotípica y la capacidad de adaptación de la progenie de *A. lixula* a las condiciones futuras de acidificación oceánica.

3. Por todo ello, se destaca la importancia del descubrimiento y el aprovechamiento de las zonas acidificadas de forma natural para el estudio de la acidificación oceánica.

Las perspectivas futuras en los estudios de acidificación oceánica, además de los afloramientos naturales, se enfocan en la necesidad de tener en cuenta otros factores ambientales como la disponibilidad de alimento, la salinidad, la temperatura, y la variabilidad genética, ya que se ha observado que influyen en la supervivencia y morfología de las larvas de diferentes especies de erizos de mar. Además, las investigaciones se deben alejar de los estudios a corto plazo y de exposiciones directas de individuos a las condiciones futuras, y centrarse en los estudios de plasticidad fenotípica de las especies, así como en su potencial de adaptación de las poblaciones en un océano cambiante.

7. AGRADECIMIENTOS

Ya casi he llegado al fin de esta dura pero bonita etapa de mi formación como biólogo marino, y a pesar del esfuerzo personal que he puesto en ello, y en hacerlo todo lo mejor posible, la energía y ganas para llegar donde estoy ahora me las dieron quienes me han rodeado. Infinitas gracias.

Agradecer a los más importantes, a mi familia. Mis padres, hermano y abuelos, quienes han confiado en mí y en mis decisiones durante toda mi vida, me han animado a seguir trabajando, esforzándome y dar lo mejor de mí. Sin su apoyo no habría cumplido mi sueño de venir a estudiar y vivir en Tenerife. Mis logros son vuestros logros.

A mi segunda familia que he podido formar en la isla, la “comuna”. Gracias por hacerme sentir el más afortunado de encontrar un grupo como ustedes, con quien compartir nuestra pasión por el mar. Hemos podido apoyarnos y desahogarnos mutuamente, tanto en la parte profesional como la personal, porque quién nos iba a entender mejor que entre nosotros mismos. En especial, a mis compañeras de vida este último año, Horten, Belén y Claudia, os quiero.

Mis amigas de Sevilla, que tanto aguantan de mí. Ojalá pudiera teneros aquí en la isla conmigo. Gracias por apoyarme desde siempre, por quererme con mis más y mis menos. Ana, Alicia, Alba, Gloria y Alba, sois los mayores tesoros de amigas que uno puede pedir.

A mis compañeros de CIMA, donde realicé las prácticas, que confiaron en mí para formar parte de su equipo. Gracias por brindarme la oportunidad que muchos buscan al acabar su formación académica, y por escucharme cuando el estrés me sobrepasaba durante la realización del TFM.

Por último, agradecer infinitamente al profesor José Carlos Hernández por confiar en mí para llevar a cabo esta investigación que tanto me apasiona, en el marco del proyecto “*ADAPTIVE*” PGC2018-100735-B-100 (MCIU/AEI/FEDER, UE) del Ministerio de Ciencia e Innovación. A la doctoranda Sara González-Delgado, que me ha motivado durante las semanas de experimento y los meses de verano en realizar un buen trabajo, siempre con una sonrisa y palabras de ánimo. A Juan Antonio y en especial a Iván, que sin ellos habría sido casi imposible realizar este experimento, gracias por vuestra pasión, esfuerzo, y compañerismo.

Javier

8. REFERENCIAS

- Anand, M., Rangesh, K., Maruthupandy, M., Jayanthi, G., Rajeswari, B. & Priya, J. 2021. Effect of CO₂ driven ocean acidification on calcification, physiology and ovarian cells of tropical sea urchin *Salmacis virgulata* – A microcosm approach. *Heliyon*, 7(1): e05970.
- Anderson, M., Gorley, R.N. & Clarke, R.K. 2008. PERMANOVA + for PRIMER: Guide to software and statistical methods, PRIMER-E, Plymouth, UK. Available from: <https://www.primer-e.com/>.
- Ban, S.S., Graham, N.A.J. & Connolly, S.R. 2014. Evidence for multiple stressor interactions and effects on coral reefs. *Global Change Biology*, 681-697.
- Bray, L., Pancucci-Papadopoulou, M.A. & Hall-Spencer, J.M. 2014. Sea urchin response to rising pCO₂ shows ocean acidification may fundamentally alter the chemistry of marine skeletons. *Mediterranean Marine Science*, 153: 510-519.
- Brinkman, T.J. 2014. Suitability of Volcanic Vents at White Island, New Zealand for Climate Change Research: Effects on Sea Urchins and Coralline Algae. *Ph. D. Thesis*, University of Otago, Otago.
- Byrne, M. & Fitzner, S. 2020. The impact of environmental acidification on the microstructure and mechanical integrity of marine invertebrate skeletons. *Conservation Physiology*, 7(1): 062.
- Byrne, M. & Hernández, J.C. 2020. Chapter 16 - Sea urchins in a high CO₂ world: Impacts of climate warming and ocean acidification across life history stages. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 43, 281-297.
- Byrne, M., Lamare, M., Winter, D., Dworjanyn, S. & Uthicke, S. 2013. The stunting effect of a high CO₂ ocean on calcification and development in sea urchin larvae, a synthesis from the tropics to the poles. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 368(1627): 20120439.
- Byrne, M., Soars, N., Selvakumaraswamy, P., Dworjanyn, S.A. & Davis, A.R. 2010. Sea urchin fertilization in a warm, acidified and high pCO₂ ocean across a range of sperm densities. *Marine Environmental Research*, 69(4), 234-239.
- Caldeira, K. & Wickett, M.E. 2005. Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *Journal of Geophysical Research*, 110 (C9).
- Calosi, P., Rastrick, S.P.S., Graziano, M., Thomas, S.C., Baggini, C., Carter, H.A., Hall-Spencer, J.M.M Milazzo, M. & Spicer, J.I. 2013. Distribution of sea urchins living near shallow water CO₂ vents is dependent upon species acid–base and ion-regulatory abilities. *Marine Pollution Bulletin*, 73, 470–484.
- Chan, K.Y.K., Grünbaum, D., Arnberg, M. & Dupont, S. 2016. Impacts of ocean acidification on survival, growth, and swimming behaviours differ between larval urchins and brittlestars. *ICES Journal of Marine Science*, 73(3): 951-961.
- Collard, M., Rastrick, S.P.S., Calosi, P., et al. 2016. The impact of ocean acidification and warming on the skeletal mechanical properties of the sea urchin *Paracentrotus lividus* from laboratory and field observations. *ICES Journal of Marine Science*, 73: 727-738.
- Connell, S.D., Kroeker, K.J., Fabricius, K.E., Kline, D.I. & Russell, B.D. 2013. The other ocean acidification problem: CO₂ as a resource among competitors for ecosystem dominance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 368(1627): 20120442.
- Dickson, A.G., Sabine, C.L. & Christian, J.R. 2007. Guide to best practices for ocean CO₂ measurements. *PICES Special Publication*, 3: 191 pp.
- Dorey, N., Lancon, P., Thorndyke, M.C. & Dupont, S. 2013. Assessing physiological tipping point of sea urchin larvae exposed to a broad range of Ph. *Global Change Biology*, 19(11): 3355-67.

- Duarte, C.M., Hendriks, I.E., Moore, T.S., Olsen, Y.S., Steckbauer, A., Ramajo, L. & McCulloch, M. 2013. Is ocean acidification an open-ocean síndrome? Understanding anthropogenic impacts on seawater pH. *Estuaries Coast*, 36: 221-236.
- Dupont, S., Dorey, N., Stumpp, M., Melzner, F. & Thorndyke, M. 2012. Long-term and trans-life-cycle effects of exposure to ocean acidification in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Marine Biology*, 160, 1835-1843.
- Dworjanyn, S.A. & Byrne, M. 2018. Impacts of ocean acidification on sea urchin growth across the juvenile to mature adult life-stage transition in mitigated by warming. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1876):20172684.
- Elliott, L.F., Russell, M.P. & Hernández, J.C. 2013. Estimating Echinoid test volume from height and diameter measurements. Echinoderms in a Changing World: Proceedings of the 13th International Echinoderm Conference. Craig Johnson, 105-112. Rotterdam.
- Fabricius, K.E., Langdon, C., Uthicke, S., Humphrey, C., Noonan, S., D'ath, G., Okazaki, R., Muehllehner, N., Glas, M.S. & Lough, J.M. 2011. Losers and winners in coral reefs acclimatized to elevated carbon dioxide concentrations. *Nature Climate Change*, 1, 165:169.
- Fernández, C. & Boudouresque, C. 1997. Phenotypic plasticity of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in a lagoonal environment. *Marine Ecology Progress Series*, 152: 145-154.
- Fitzer, S.C., Torres Gabarda, S., Daly, L., Hughes, B., Dove, M., O'Connor, W., Potts, J., Scanes, P. & Byrne M. 2018. Coastal acidification impacts on Shell mineral structure of bivalve mollusks. *Ecology and Evolution*, 8: 8973-8984.
- Foo, S.A. & Byrne, M. 2016. Acclimatization and adaptive capacity of marine species in a changing ocean. *Advances in Marine Biology*, 74: 69-116.
- Foo, S.A., Byrne, M. & Gambi, M.C. 2018b. Residing at low pH matters, resilience of the egg jelly coat of sea urchins living at a CO₂ vent site. *Marine Biology*, 165(6), 97.
- Foo, S.A., Byrne, M., Ricevuto, E. & Gambi, M.C. 2018a. The carbon dioxide vents of Ischia, Italy, a natural laboratory to assess impacts of ocean acidification on marine ecosystems; an overview of research and comparisons with other vent systems. *Oceanography and Marine Biology*, 56: 237:310.
- Foo, S.A., Koweek, D.A., Munari, M., Gambi, M.C., Byrne, M. & Caldeira, K. 2020. Responses of sea urchin larvae to field and laboratory acidification. *Science of the Total Environment*, 723, 138003.
- García, E., Clemente, S. & Hernández, J.C. 2018a. Effects of natural current pH variability on the sea urchin *Paracentrotus lividus* larvae development and settlement. *Marine Environmental Research*, 139: 11-18.
- García, E., Hernández, J.C. & Clemente, S. 2018b. Robustness of larval development of intertidal sea urchin species to simulated ocean warming and acidification. *Marine Environmental Research*, 139:35-45.
- George, S.B. 1996. Echinoderm egg and larval quality as a function of adult nutritional state. *Oceanologica Acta* 19(3): 297-308.
- Gianguzza, P. 2020. Chapter 24 – *Arbacia*. Sea Uchins: Biology and Ecology, Developments in Aquaculture and Fisheries Science, John M. Lawrence, Fourth Edition, Vol 43, 419-429.
- Gianguzza, P., Agnetta, D., Bonaviri, C., Di Trapani, F., Visconti, G., Gianguzza, F. & Riggio, S. 2011. The rise of thermophilic sea urchins and the expansion of barren grounds in the Mediterranean Sea. *Chemistry and Ecology*, 27(2): 129-134.

- Gianguzza, P., Visconti, G., Gianguzza, F., Vizzini, S., Sara, G. & Dupont, S. 2014. Temperature modulates the response of the thermophilous sea urchin *Arbacia lixula* early life stages to CO₂-driven acidification. *Marine Environmental Research*, 93:70-77.
- González-Delgado, S., González-Santana, D., Santana-Casiano, M., González-Dávila, M., Hernández, C. A., Sangil, C., & Hernández, J. C. 2021. Chemical characterization of Punta de Fuencaliente CO₂ seeps system (La Palma Island, NE Atlantic Ocean): a new natural laboratory for ocean acidification studies. *Biogeosciences*, 18: 1-15.
- González-Delgado, S. & Hernández, J.C. 2018. Chapter Two – The importance of natural acidified systems in the study of ocean acidification: what have we learned? *Advances in Marine Biology*, 80: 57-99.
- Harvey, B.P., Gwynn-Jones, D. & Moore, P.J. 2013. Meta-analysis reveals complex marine biological responses to the interactive effects of ocean acidification and warming. *Ecology Evolution*, 3(4): 1016-1030.
- Hernández, J.C., Clemente, S., García, E. & McAlister, J.S. 2020. Planktonic stages of the ecologically important sea urchin, *Diadema africanum*: larval performance under near future ocean conditions. *Journal of Plankton Research*, 42, 286-304.
- Hernández, J.C., Clemente, S., Tuya, F., Pérez-Ruzafa, A., Sangil, C., Moro-Abad, L. & Bacallado-Aránega, J.J. 2013. Echinoderms of the Canary Islands, Spain. En: Echinoderm research and diversity in Latin America (Alvarado, J.A. y Solís-Marín, F.): 471-510. Berlin. Alemania.
- Hernández, C.A., Sangil, C. & Hernández, J.C. 2016. A new CO₂ vent for the study of ocean acidification in the Atlantic. *Marine Pollution Bulletin*, 109(1).
- Hofmann, G.E., Evans, T.G., Kelly, M.W., Padilla-Gamiño, J.L., Blanchette, C.A., Washburn, L., Chan, F., McManus, M.A., Menge, B.A., Gaylord, B. & Hill T.M. 2014. Exploring local adaptation and the ocean acidification seascape- studies in the California current large marine ecosystem. *Biogeosciences*, 11: 1053-1064.
- Hurd, C.L., Cornwall, C.E., Currie, K.I., Hepburn, C.D., McGraw, C.M., Hunter, K.A. & Boyd, P. 2011. Metabolically-induced pH fluctuations by some coastal calcifiers exceed projected 22nd century ocean acidification: a mechanism for differential susceptibility? *Global Change Biology*, 17(10): 3254-3262.
- IPCC, 2021: Summary for Policymakers. In: Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Masson-Delmotte, V., P. Zhai, A. Pirani, S. L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M. I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J.B.R. Matthews, T. K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu and B. Zhou (eds.)]. Cambridge University Press. In Press.
- Johnson, M.D., Bravo, L.M.R., O'Connor, S.E., Varley, N.F. & Altieri, A.H. 2019. pH variability exacerbates effects of ocean acidification on a Caribbean crustose coralline alga. *Frontiers in Marine Science*, 6:150.
- Kapsenberg, L. & Cyronak, T. 2019. Ocean acidification refugia in variable environments. *Global Change Biology*, 25(10): 3201-3214.
- Kapsenberg, L., Miglioli, A., Bitter, M.C., Tambutté, E., Dumollard, R. & Gattuso, J.P. 2018. Ocean pH fluctuations affect mussel larvae at key developmental transitions. *Proceedings of the Royal Society B*, 285(1893):20182381.
- Karelitz, S.E. 2020. Transgenerational plasticity and acclimation of tropical sea urchins to ocean warming and acidification (Thesis, Doctor of Philosophy). University of Otago. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10523/10082>.

- Kroeker, K.J., Micheli, F., Gambi, M.C. & Martz, T.R. 2011. Divergent ecosystem responses within a benthic marine community to ocean acidification. *PNAS*, 108(35): 14515-14520.
- Kroeker, K.J., Kordas, R.L., Crim, R., Hendriks, I.E., Ramajo, L., Singh, G.S., Duarte, C.M. & Gattuso J. 2013a. Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. *Global Change Biology*, 19(6): 1884-1896.
- Kroeker K.J., Micheli, F. & Gambi, M.C. 2013b. Community dynamics and ecosystem simplification in a high-CO₂ ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(31): 12721-12726.
- Kurihara, H., Yin, R., Nishihara, G.N., Soyano, K. & Ishimatsu, A. 2013. Effect of ocean acidification on growth, gonad, development and physiology of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Aquatic Biology*, 18: 281-292.
- Lamare, M.D., Liddy, M. & Uthicke, S. 2016. In situ developmental responses of tropical sea urchin larvae to ocean acidification conditions at naturally elevated pCO₂ vent sites. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1843).
- Levitan, D.R. 2006. The relationship between egg size and fertilization success in broadcast-spawning marine invertebrates. *Integrative and Comparative Biology*, 46 (3): 298-311.
- Marceta, T., Matozzo, V., Alban, S., Badocco, D., Pastore, P. & Marin, M.G. 2020. Do males and females respond differently to ocean acidification? An experimental study with the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 39516-39530.
- McAlister, J.S. & Moran, A. 2012. Relationships among Egg Size, Composition, and Energy: A Comparative Study of Geminate Sea Urchin. *PLoS ONE*, 7(7): e41599.
- Miguel, A. 2018. Estimación del crecimiento del erizo de mar *Arbacia lixula*. Máster en Biología Marina: Biodiversidad y Conservación, Universidad de La Laguna, España.
- Munari, M., Chemello, G., Finos, L., Ingrosso, G., Giani, M. & Marin, M.G. 2016. Coping with seawater acidification and the emerging contaminant diclofenac at the larval stage; a tale from the clam *Ruditapes philippinarum*. *Chemosphere*, 160, 293:302.
- Nagelkerken, I. & Munday, P.L. 2016. Animal behaviour shapes the ecological effects of ocean acidification and warming: moving from individual to community level responses. *Global Change Biology*, 22(3): 974-89.
- Pace, E. & Dalman, N. 2021. The effects on low pH on sea urchin larval survivorship and development. *Georgia Journal of Science*, 79 (1): 51.
- Pansch, C., Schaub, I., Havenhand, J. & Wahl, M. 2014. Habitat traits and food availability determine the response of marine invertebrates to ocean acidification. *Global Change Biology*, 20, 765-777.
- Passarelli, M.C., Cesar, A., Riba, I. & DelValls, T.A. 2017. Comparative evaluation of sea-urchin larval stage sensitivity to ocean acidification. *Chemosphere*, 184: 224-234.
- Pespini, M.H., Sanford, E., Gaylord, B., et al. 2013. Evolutionary change during experimental ocean acidification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: 6937-6942.
- Pörtner, H. O. 2010. Oxygen- and capacity .limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *Journal of Experimental Biology*, 213 (6): 881-893.
- Przeslawski, R., Byrne, M. & Mellin, C. 2015. A review and meta-analysis of the effects of multiple abiotic stressors on marine embryos and larvae. *Global Change Biology*, 21(6): 2122-40.
- Siikavuuopio, S.I, Mortensen, A., Dale, T. & Foss, A. 2007. Effects of carbon dioxide exposure on feed intake and gonad growth in green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture*, 266(1-4): 97-101.

- Small, D.P., Milazzo, M., Bertolini, C., Graham, H., Hauton, C., Hall-Spencer, J.M. et al. 2015. Temporal fluctuations in seawater pCO₂ may be as important as mean differences when determining physiological sensitivity in natural systems. *ICES Journal of Marine Science*, 73(3): 604-612.
- Stumpp, M., Hu, M.Y., Melzner, F., Gutowska, M.A., Dorey, N., Himmerkus, N., Holtmann, W.C., Dupont, S.T., Thorndyke, M.C. & Bleich, M. 2012. Acidified seawater impacts sea urchin larvae pH regulatory systems relevant for calcification. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 109(44):18192-7.
- Suckling, C.C., Clark, M.S., Beveridge, C., Brunner, L., Hughes, A.D., Harper, E.M. et al. 2014. Experimental influence of pH on the early life-stages of sea urchins II: increasing parental exposure times gives rise to different responses. *Invertebrate Reproduction & Development*, 58, 161-175.
- Uthicke, S., Deshpande, N.P., Liddy, M., Patel, F., Lamare, M. & Wilkins, M.R. 2019. Little evidence of adaptation potential to ocean acidification in sea urchins living in “Future Ocean” conditions at a CO₂ vent. *Ecology and Evolution*, 9(17): 10004-10016.
- Uthicke, S., Ebert, T., Liddy, M., et al., 2016. *Echinometra* sea urchins acclimated to elevated pCO₂ at volcanic vents out perform those under present-day pCO₂ conditions. *Global Change Biology*, 22: 2451-2461.
- Viotti, S., Sangil, C., Hernández, C.A. & Hernández, J.C. 2019. Effects of long-term exposure to reduced pH conditions on the Shell and survival of an intertidal gastropod. *Marine Environmental Research*, 152, 104789.
- Visconti, G., Gianguzza, F., Butera, E., Costa, V., Vizzini, S., Byrne, M. & Gianguzza, P. 2017. Morphological response of the larvae of *Arbacia lixula* to near-future ocean warming and acidification. *ICES Journal of Marine Science*, 74(4):1180-1190.
- Wangensteen, O.S., Dupont, S., Casties, I., Turon, X. & Palacín, C. 2013. Some like it hot: Temperature and pH modulate larval development and settlement of the sea urchin *Arbacia lixula*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 449, 304-311.
- Wangensteen, O.S., Turon, X., Pérez-Portela, R. & Palacín, C. 2012. Natural or Naturalized? Phylogeography suggest that the abundant sea urchin *Arbacia lixula* is a recent colonizer of the Mediterranean. *PLoS ONE* 7 (9), e45067.
- Wong, J.M., Johnson, K.M., Kelly, M.W. & Hofmann, G.E. 2018. Transcriptomics reveal transgenerational effects in purple sea urchin embryos: adult acclimation to upwelling conditions alters the response of their progeny to differential pCO₂ levels. *Molecular Ecology*, 27(5): 1120-1137.
- Zeebe, R.E., Rigwell, A. & Zachos, J. 2016. Anthropogenic carbon release rate unprecedented during the past 66 million years. *Nature Geoscience*, 9(4): 325-329.
- Zhan, Y., Cui, D., Xing, D., Zhang, J., Zhang, W., Li, Y., Li, C. & Chang, Y. 2020. CO₂- driven ocean acidification repressed the growth of adult sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* by impairing intestine function. *Marine Pollution Bulletin*, 153:110944.