



**UCSC**

**FACULTAD DE  
CIENCIAS**

## **FACULTAD DE CIENCIAS**

Descripción de los estados tempranos del desarrollo embrionario de *Arbacia spatuligera* y el efecto de la modificación de la temperatura de incubación

Por

**ÓSCAR ROMÁN BRAVO CARRASCO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL  
TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO MARINO**

Profesor Guía: Rodrigo Díaz Yáñez

Profesora Co-Guía: Paulina Medina Castillo

Concepción, Chile

2024

## ACTA DE CERTIFICACIÓN



# UCSC

## FACULTAD DE CIENCIAS

Certifico que el presente trabajo de Memoria de Título se realizó bajo mi dirección y ha sido aprobado.

Profesor guía: Rodrigo Díaz Yáñez

Declaro que el contenido de esta Memoria de Título no ha sido presentado total o parcialmente para optar a otro Título o Grado Académico.

**Óscar Román Bravo Carrasco**

Nota del Examen de Título: \_\_\_\_

Fecha de aprobación del Examen de Título:

\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 202\_

Ministro de Fe: \_\_\_\_\_

*El esfuerzo, tiempo y dedicación de esta investigación está dedicada especialmente a mis padres Patricio Bravo y Cecilia Carrasco. “O haces algo con eso, o eso hace algo contigo”.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco profundamente a todo el personal del laboratorio de Ecotoxicología del Centro Regional de Estudios Ambientales (CREA), que forma parte de la Universidad Católica de la Santísima Concepción, y que está conformado por: Rodrigo Díaz, Claudio Espinoza, Ivonne Calisto, Alexa Gayoso, Marisol Gajardo, Carolina Barriga, Guillermo Guerreo y Margarita Guerrero. Estoy agradecido con la institución por la confianza que depositaron en mí para formar parte de la realización de esta investigación, por el constante apoyo y por el soporte que me brindaron este semestre que resultó en la presente investigación.

También agradecer eternamente a mi familia, especialmente a mis padres Patricio Bravo y M<sup>o</sup> Cecilia Carrasco, por el sacrificio que hicieron por mí y por el apoyo, cariño y amor que me brindó mi familia durante toda mi vida, sobre todo en estos últimos 5 años. Gracias a ellos soy quién soy y estoy donde estoy, ya que sin ellos no estaría cumpliendo esto, que es uno de mis grandes sueños.

Quiero dar gracias a mis amigos y compañeros con los que viví tiempos más cercanos durante esta etapa universitaria, especialmente a Dalet Mena y Cristian Lagos, ya que gracias a ellos me llevo muy buenos recuerdos tanto en la universidad como en mi vida personal, donde espero que sigamos compartiendo por mucho tiempo más.

Por último, y no menos importante, agradecer a todos los docentes y personal que pertenecen a la Facultad de Ciencias de la UCSC, por su grata labor y por forjar mi camino y ampliar mis capacidades para prepararme como persona y futuro profesional.

## TABLA DE CONTENIDOS

Resumen .....	vi
Abstract.....	vii
Introducción.....	1
Problemática General.....	3
Problemáticas Específicas.....	3
Objetivos.....	4
Objetivo General.....	4
Objetivos Específicos .....	4
Métodos .....	5
Obtención y aclimatación de individuos.....	5
Descripción del ensayo .....	6
<i>Obtención de espermatozoides</i> .....	6
<i>Obtención de óvulos</i> .....	8
Fecundación de gametos .....	9
Fijación y observación de muestras .....	9
Caracterización de morfotipos .....	9
Evaluación del efecto de la temperatura .....	10
Análisis estadístico .....	11
Resultados.....	12
Discusión .....	17
Conclusiones.....	21
Referencias bibliográficas .....	22
Anexo .....	26

## RESUMEN

La reproducción es el principal proceso de mantención de las poblaciones porque aumenta la variabilidad genética. Los erizos de mar tienen con fecundación externa, donde posteriormente ocurrirá la diferenciación celular hasta larva pluteus. El desarrollo larval de los erizos de mar ha sido muy estudiado gracias al bajo costo y a la fácil obtención, visualización y manipulación de sus embriones. *Arbacia spatuligera* es un erizo que habita en las costas chilenas y sin valor comercial, con un enfoque de unidad experimental en bioensayos como bioindicador. Por lo general, los equinodermos son utilizados como indicadores biológicos debido a su alta sensibilidad a un amplio rango de contaminantes. Sin embargo, hay factores ambientales que afectan diferentes aspectos de los organismos, como lo puede ser la temperatura. El presente informe tiene como objetivo el describir el desarrollo embrionario de *A. spatuligera* a distintas temperaturas de incubación (12°C y 20°C) mediante protocolos estandarizados. Para ello se realizó la obtención y calificación de gametos en machos y hembras para asegurar una correcta fecundación para llevar a cabo la observación de las etapas dominantes del desarrollo larval a las 24, 48, 72 y 96 horas del tiempo de incubación y así determinar la proporción de los principales morfotipos. Los resultados indican que el desarrollo embrionario se acorta a la temperatura de incubación de 20°C, alcanzando etapas más avanzadas en tiempos más próximos. Esto es debido a que la temperatura es afectada por el metabolismo, donde a mayor temperatura, mayor será la tasa metabólica. Estudios plasman que mientras mayor sea la temperatura, menor será la duración del periodo larval de las especies. Por ello es por lo que la descripción del desarrollo embrionario de *Arbacia spatuligera* tiene importancia para establecer los tiempos óptimos de exposición para una correcta determinación de los efectos que se están evaluando.

**Palabras clave:** Bioensayo de toxicidad, ciclo de vida, erizos de mar, fecundación, prueba de toxicidad.

## ABSTRACT

Reproduction is the main survival process over time for populations because it increases genetic variability. Sea urchins have external fertilization, where cellular differentiation occurs until the pluteus larval stage. The larval development of sea urchins has been extensively studied due to the low cost and easy of obtaining, visualizing and manipulating their embryos. *Arbacia spatuligera* is a sea urchin specie found along the Chilean coasts and has no commercial value, being mainly used as an experimental unit in bioassays. Echinoderms are commonly used as biological indicators due to their high sensitivity to a wide range of contaminants. However, environmental factors, such as temperature, can affect various aspects of the organisms. This report aims to describe the embryonic development of *A. spatuligera* under different incubation temperatures (12°C and 20°C) using standardized protocols. For this, gametes were obtained and evaluated from males and females to ensure proper fertilization, followed by the observation of dominant larval development stages at 24, 48, 72 and 96 hours of incubation to determine the proportion of the main morphotypes. The results indicate that embryonic development is faster at the 20°C incubation temperature, reaching more advanced stages at shorter times. This is because temperature affects metabolism, with higher temperatures leading to higher metabolic rates. Studies show that as temperature increases, the duration of the larval period decreases. Therefore, the description of embryonic development in *A. spatuligera* is important for establishing optimal exposure times for accurately determining the effects being evaluated.

**Key words:** Fertilization, life cycle, sea urchins, toxicity bioassay, toxicity testing.

## INTRODUCCIÓN

La reproducción es el principal proceso que asegura la mantención de las poblaciones a través del tiempo e incluso la recuperación de algunas que fueron perturbadas. Este proceso asegura la variabilidad genética y aumenta el área de distribución de las especies (Metaxas 2020). Ciertos grupos de animales tienen ciclos de vida que incluyen una etapa larval no reproductiva, característica dominante en animales tales como las esponjas, moluscos y equinodermos (Degnan & Degnan 2023).

Los erizos de mar son invertebrados marinos clasificados dentro de la clase Echinoidea, phylum Echinodermata. Estos son importantes por su rol en las redes tróficas y por la capacidad de modificar el sustrato, además de ser muy abundantes (Olascoaga et al. 2023). Los erizos de mar son organismos con fecundación externa y presentan un desarrollo embrionario durante el cual podemos identificar diferentes morfotipos como: mórula, blástula, gástrula, prisma y la larva planctónica pluteus (Fuentes & Barros 2000). El desarrollo embrionario comienza con la división constante hasta la etapa de 64 células o mórula, después en el embrión se empieza a formar el blastodermo (o ectodermo) lo que se denomina blástula. Posteriormente, ocurre el proceso de gastrulación, el cual resulta de una invaginación del ectodermo que dará lugar a la siguiente etapa: la gástrula. En esta etapa es donde comenzará el desarrollo del sistema digestivo y esquelético (esqueletogénesis) para dar origen a las siguientes dos etapas: larva prisma y larva pluteus (Vacquier 2011). En esta fase del desarrollo embrionario la larva cuenta con un sistema digestivo desarrollado y brazos que le permite moverse y alimentarse (Mattaliano 2020), y pueden sobrevivir hasta 72 horas sin alimento (Fenaux et al. 1985).

El desarrollo embrionario de erizo de mar ha sido muy estudiado debido a que, por su morfología, es fácil de visualizar y manipular. Sus embriones se obtienen fácilmente en condiciones de laboratorio, donde se obtienen larvas pluteus en un período de 48 horas aproximadamente, con pequeñas variaciones entre especies (Bonaventura et al. 2021). Además, para realizar experimentos con estos organismos no se necesitan sistemas ni equipamientos costosos, lo que es una ventaja para su amplia utilización (Khurram et al. 2004).

Los bioensayos son técnicas utilizadas para evaluar cambios biológicos, sobre todo internos, de los organismos y que tienen un enfoque en procesos de nivel celular (EPA, 2018)

donde se utilizan diferentes tiempos de exposición para evaluar diferentes respuestas, incluida la sobrevivencia, reproducción y crecimiento (Picone et al. 2016). Los erizos de mar se han utilizado como bioindicadores por más de 150 años debido a su alta frecuencia y gran volumen de desove (Láruson et al. 2018). Los equinodermos son frecuentemente elegidos como indicadores biológicos debido a su extensa distribución, desarrollo meroplanctónico, rápida respuesta y la alta sensibilidad de su larva planctónica a un amplio rango de contaminantes (Morrone et al. 2016) como metales (Novelli et al. 2003; Pinsino et al. 2010, 2011, 2014), productos farmacéuticos (Aguirre et al. 2015). Además, los equinodermos se utilizan como bioindicadores para evaluar matrices ambientales complejas como agua y sedimentos marinos (Beiras et al. 2003; Kobayashi & Okamura 2004; Cesar et al. 2009; Khosrovyan et al. 2013).

La reproducción de los erizos de mar es afectada por distintos factores como la distribución, época del año y alimento (Zhao et al. 2024). La temperatura es uno de los factores abióticos que más afectan directamente la regularidad de este tipo de procesos biológicos (Spanopoulos et al. 2005). Los invertebrados marinos bentónicos, sobre todo los equinodermos, son sensibles a las temperaturas del agua situadas por sobre aquellas consideradas habituales en los ambientes que habitan. Estas mayores temperaturas pueden afectar su supervivencia y distribución (Rupp 1973). Además, se ha descrito que las fases más tempranas del desarrollo embrionario son las más vulnerables al estrés provocado por la variación de la temperatura (Hammond & Hofmann 2010). Esta variación provocaría la aparición de anomalías en el desarrollo de los individuos, sin embargo, estas anomalías también se originan por baja calidad de los gametos, presencia de sustancias extrañas en el cuerpo de agua, entre otros (Gambardella et al. 2021).

En este sentido el ensayo de toxicidad con embriones de erizo de mar ha sido ampliamente usado como una herramienta confiable, sensible y de bajo costo para evaluar la toxicidad de un amplio rango de compuestos contaminantes y matrices naturales (Morrone et al. 2016). Así la mayoría de estos estudios utilizan protocolos basados en métodos estandarizados (USEPA 2002) con ligeras diferencias en las características y duración del ensayo que dependen de la especie de erizo de mar expuesto y las condiciones de laboratorio, como la temperatura de incubación.

## **Problemática General**

La especie *Arbacia spatuligera* tiene una distribución que abarca desde Perú hasta el sur de Chile y habita en la zona submareal hasta una profundidad de 30 metros. En Chile esta especie no tiene valor comercial, y su principal enfoque es su utilización como objeto de estudio en bioensayos (Millán et al. 2019), donde se utiliza como especie de prueba en bioensayos de toxicidad mediante protocolos desarrollados originalmente con especies de otras latitudes. Actualmente el laboratorio de Ecotoxicología del Centro Regional de Estudios Ambientales CREA-UCSC realiza el protocolo denominado “Bioensayo de toxicidad crónica con *Arbacia spatuligera* Parte B (estado larval) para sustancias químicas, agua de mar, agua residual, sedimentos marinos y sedimentos acuáticos (estuarinos)” (Procedimiento interno PT-06) el cual está acreditado bajo la norma NMX-EC-17025-INMC-2018 (ISO/IEC 17025:2017). Para este ensayo se utilizan embriones de *Arbacia spatuligera* y se evalúa su desarrollo embrionario hasta larva pluteus a las 96 h post fecundación, pero el desarrollo embrionario para esta especie no ha sido descrito.

## **Problemáticas Específicas**

- Debido a que la metodología del bioensayo requiere la observación y conteo a 96 horas, el desarrollo embrionario de *Arbacia spatuligera* no se ha descrito según sus fases y su duración en tiempos previos al establecido en el bioensayo.
- La metodología es utilizada en especies de latitudes distintas, por lo que no se sabe con claridad el proceso del desarrollo embrionario de *Arbacia spatuligera* a la temperatura que supone el protocolo (20°C).

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Realizar una descripción del desarrollo embrionario de *Arbacia spatuligera* en condiciones de laboratorio y evaluar el efecto de diferentes temperaturas de incubación.

### Objetivos Específicos

- O1: Establecer la proporción de los principales morfotipos del desarrollo embrionario de *Arbacia spatuligera* durante los tiempos de incubación de 24, 48, 72 y 96 horas según la temperatura del ambiente (12°C) en el período del bioensayo.
- O2: Determinar el efecto de diferentes temperaturas de incubación (12°C: ambiente; 20°C: condición de laboratorio) sobre los distintos morfotipos del desarrollo embrionario temprano de *Arbacia spatuligera* durante el tiempo de incubación (24, 48, 72 y 96 horas).
- O3: Determinar el efecto de las temperaturas de incubación (12°C: ambiente; 20°C: condición de laboratorio) en el porcentaje de larva pluteus durante el tiempo de incubación (24, 48, 72 y 96 horas)

## MÉTODOS

### Obtención y aclimatación de individuos

Los erizos se obtuvieron a través de buceo autónomo en Bahía Coliumo (localidad de Dichato) (FIGURA 1), realizados por pescadores artesanales del sector. Una vez desembarcados, los individuos fueron transportados, en seco en cajas isotérmicas, a la estación de Biología Marina Abate Juan Ignacio Molina de la Universidad Católica de la Santísima Concepción para su aclimatación previa al ensayo.



FIGURA 1

Punto de extracción de los erizos.

El experimento se llevó a cabo en distintos grupos de organismos que se extrajeron entre septiembre y noviembre del 2024. Se diferenciaron entre grupos y sets de desove, los grupos correspondieron a las distintas fechas de extracción y los sets a los días de aclimatación en la estación costera de la UCSC previo al desove (set 1, erizos con 3 días de aclimatación; set 2, 7 días de aclimatación).

## Descripción del ensayo

Para cada set de desove se seleccionaron 4 hembras y 4 machos adultos en condiciones saludables y se indujeron al desove mediante la inyección de 1 ó 2 ml de cloruro de potasio (KCl 0,5 M) en la zona oral de los organismos. Luego se esperaron 15 minutos hasta que se produjera el desove (FIGURA 2).



FIGURA 2

Distribución espacial de los erizos de *Arbacia spatuligera* en el desove.

### *Obtención de espermatozoides*

Una vez producido el desove se obtuvo una alícuota de solución espermática y se diluyó en 10 ml de agua de mar control (FIGURA 3). Esta solución de espermatozoides diluida fue utilizada para evaluar la calidad de los gametos utilizando la movilidad como criterio de calidad. Se utilizó una escala de 1 al 5 según su movilidad y una vez comprobada, se colectaron los espermatozoides de aquellos individuos con gametos de mayor movilidad (mejores condiciones) y fueron almacenados juntos en un tubo de ensayo en seco sobre hielo (tubo stock).



FIGURA 3.

Gametos desovados de machos de *Arbacia spatuligera*.

Una vez obtenidos y clasificados los espermatozoides se realizó una dilución seriada (FIGURA 4) a través de la adición de 200  $\mu\text{l}$  de espermatozoides a un tubo de ensayo con 10 ml de agua de mar (tubo A) y se mezcló. Seguido de ello, se agregaron 5 ml de la suspensión de espermatozoides del tubo A, a un tubo de ensayo con 5 ml de agua de mar (tubo B) y se mezcló. De forma similar al paso anterior, se añadieron 5 ml de suspensión de espermatozoides del tubo B a un tubo de ensayo con 5 ml de agua de mar (tubo C) y se mezcló. Luego se le añadieron 5 ml de suspensión de espermatozoides del tubo C a otro tubo de ensayo con 5 ml de agua de mar (tubo D). Luego, al tubo C se le agregaron 5 ml de ácido acético (10%) para inmovilizar a los espermatozoides y facilitar el conteo, y establecer la concentración de espermatozoides por ml de solución. Para determinar la concentración de espermatozoides en la solución de stock se agregaron 1 ml del tubo C a un tubo con 4 ml de agua de mar (Tubo E) y se mezcló. Finalmente se usó una cámara Neubauer bajo el microscopio para contar el número de espermatozoides y así lograr obtener una concentración final de  $5 \times 10^7$  espermatozoides  $\cdot \text{ml}^{-1}$ .

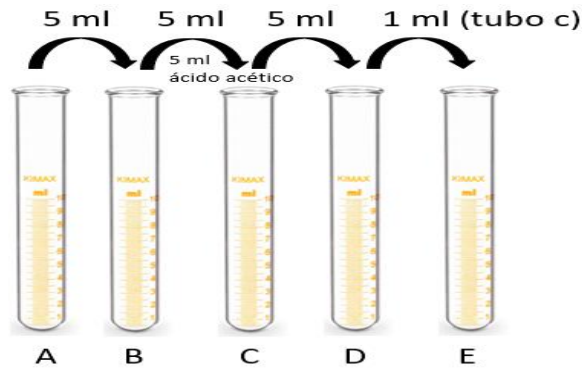


FIGURA 4

Proceso de dilución seriada de la solución espermática.

*Obtención de óvulos*

En las hembras, al igual que en los machos, una vez transcurridos los 15 minutos luego de la inducción al desove, se diluyó una alícuota de gametos en 10 ml de agua de mar control (FIGURA 5). Los óvulos fueron evaluados según su forma, ya sea esférica o irregular y su capacidad de fecundación. De esta forma se realizó una fecundación de prueba utilizando los óvulos seleccionados según su forma (esférica), y en el caso de no observar fecundación la hembra evaluada es descartada. Finalmente se utilizaron los óvulos que presentan forma esférica y fecundación positiva. Se preparó una solución de óvulos a partir de la mezcla de los gametos obtenidos de hembras seleccionadas. Posteriormente, se agregó 1 ml de la solución de óvulos a un tubo de ensayo con 9 ml de agua de mar control y se utilizó una cámara de conteo Sedwick-Rafter bajo lupa para contar los óvulos y para alcanzar una densidad de  $2.000 \text{ óvulos} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

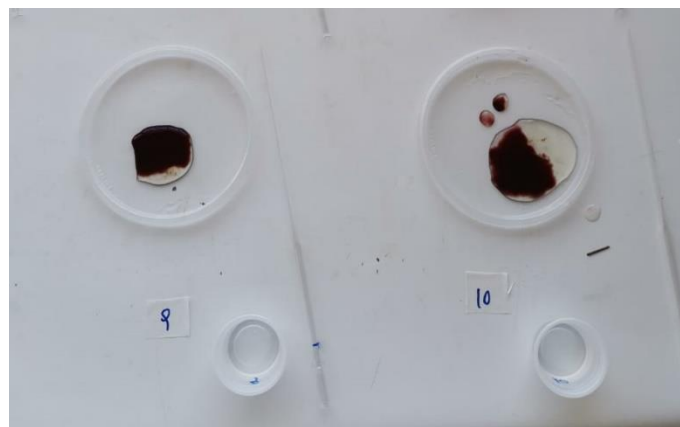


FIGURA 5.

Gametos desovados de hembras de *Arbacia spatuligera*.

## **Fecundación de gametos**

Luego de obtener los gametos femeninos y masculinos de los organismos de experimentación se realizó la fecundación. En un vaso de precipitado se preparó una solución de stock entre 300 y 500 ml (según la cantidad de ml que se vayan a utilizar) con una densidad de 2.000 óvulos\*ml<sup>-1</sup>, luego se le agregó un volumen a partir de la solución diluida de espermatozoides para obtener una concentración final de 5x10<sup>7</sup>espermatozoides\*ml<sup>-1</sup> en la solución de óvulos. Se mezcló y se observó en el microscopio, transcurridos 15 a 20 minutos, una submuestra para evaluar el porcentaje de fecundación y, como criterio de aceptabilidad, se espera que sea igual o mayor del 90%. Finalmente, se agregó 1 ml de óvulos fecundados con una pipeta repetidora a cinco tubos de ensayo con 8 ml de agua de mar control, por cada tiempo de incubación y temperaturas.

## **Fijación y observación de muestras**

Los tubos de ensayo con óvulos fecundados fueron mantenidos en incubadoras a temperaturas controladas a 12°C y 20°C paralelamente durante el tiempo establecido hasta su observación. Se extrajeron los tubos de ensayo (n=5) transcurrido cada tiempo de incubación (24, 48, 72 y 96 horas post fecundación), y fueron fijados con 300 µl de formalina al 10%. Luego de la fijación se extrajeron alícuotas de cada tubo para su observación bajo microscopio óptico con un aumento de 10X.

## **Caracterización de morfotipos**

En cada una de las muestras observadas se identificaron los principales morfotipos del desarrollo embrionario (24, 48, 72 y 96 horas post fecundación), de *A. spatuligera*. De forma preliminar se realizó un ensayo sólo a 12°C con una duración mayor (168 horas) a la establecida en el protocolo “Bioensayo de toxicidad crónica con *Arbacia spatuligera* Parte B (estado larval) para sustancias químicas, agua residual, agua de mar, sedimentos marinos y sedimentos acuáticos (estuarinos)” acreditado bajo la norma NMX-EC-17025-INMC-2018 (ISO/IEC 17025:2017), con el objeto de obtener resultados preliminares y facilitar la identificación de los principales estadios embrionarios al momento de la observación y conteo de las muestras.

## Evaluación del efecto de la temperatura

Para evaluar el efecto de la temperatura de incubación durante el desarrollo embrionario en laboratorio se realizaron ensayos en paralelo con temperaturas de incubación de 12°C y 20°C, correspondientes a la temperatura ambiente y la de protocolo de ensayo, respectivamente (Tabla 1). Esto debido a que en la época del año cuando se realizó la investigación (primavera, de septiembre hasta noviembre de 2024) la temperatura del agua de mar (ambiente y aclimatación) era cercana a los 12°C (11,6°C específicamente). Mientras que los 20°C corresponden a los grados de temperatura establecidos por la metodología estandarizada del bioensayo.

TABLA 1  
Diseño experimental.

TEMPERATURA (°C)	TIEMPOS DE INCUBACIÓN (HORAS)			
	24	48	72	96
12	3 tubos de ensayo	3 tubos de ensayo	3 tubos de ensayo	3 tubos de ensayo
	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo
	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo
	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo
	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo
	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo
	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo
	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo
	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo
20	3 tubos de ensayo	3 tubos de ensayo	3 tubos de ensayo	3 tubos de ensayo
	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo
	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo
	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo
	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo

	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo
	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo
	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo
	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo	5 tubos de ensayo

### **Análisis estadístico**

El primer análisis estadístico realizado fue de carácter exploratorio, donde se utilizó el análisis modelo lineal general en el software Minitab. Posteriormente, para evaluar la normalidad de los datos, se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk en el software Past. Posteriormente, en función del objetivo 3 de la investigación, se analizaron las diferencias en la proporción de larvas pluteus en los distintos tiempos de incubación a ambas temperaturas mediante la prueba Kruskal Wallis.

## RESULTADOS

El ensayo preliminar que se realizó permitió la identificación de los principales morfotipos del desarrollo embrionario temprano de la especie, por lo menos hasta las 96 horas de tiempo de incubación a 12°C. Este ensayo se realizó cada 24 horas hasta las 168 horas post fecundación y se calculó el porcentaje de todos los morfotipos principales a los distintos tiempos de incubación en los que fueron observados. Como resultados, a las 24 horas la blástula era el morfotipo con mayor proporción con un 98,51%, mientras que la gástrula comprende el porcentaje restante que corresponde al 1,49%. Luego, a las 48 horas, la tónica fue la misma con la blástula que corresponde al 57,02%, mientras que la gástrula aumento en proporción a un 42,98%. No hubo registros de larva prisma ni larva pluteus a las 24 y 48 horas. A las 72 horas las proporciones de los morfotipos fueron distintos, donde la tónica cambió a la larva prisma con un 70,12%, seguida de la larva pluteus con un 8,35%, la gástrula con un 10,04% y la blástula con un 11,48%. Ya a las 96 horas el morfotipo con mayor proporción fue la larva pluteus con un 60,5% y le sigue la prisma con un 26,65%, mientras que la gástrula y blástula corresponden a un 5,25% y 7,6%, respectivamente. Posteriormente, a las 120 horas, la tónica se mantiene, pero con una proporción mayor de la larva pluteus que alcanza un 79,21%, mientras que la larva prisma tuvo una proporción menor a la observación anterior y es del 11,17%, por otro lado, la gástrula y blástula corresponden a un 4,28% y 5,34%, respectivamente. Finalmente, a las 168 horas el porcentaje de larva pluteus alcanzó un 88,86% y casi alcanzó el porcentaje de criterio de aceptabilidad utilizado en la fecundación del bioensayo. El porcentaje de larva prisma fue de 8,9%, gástrula 0,86% y blástula 1,38% (FIGURA 6).

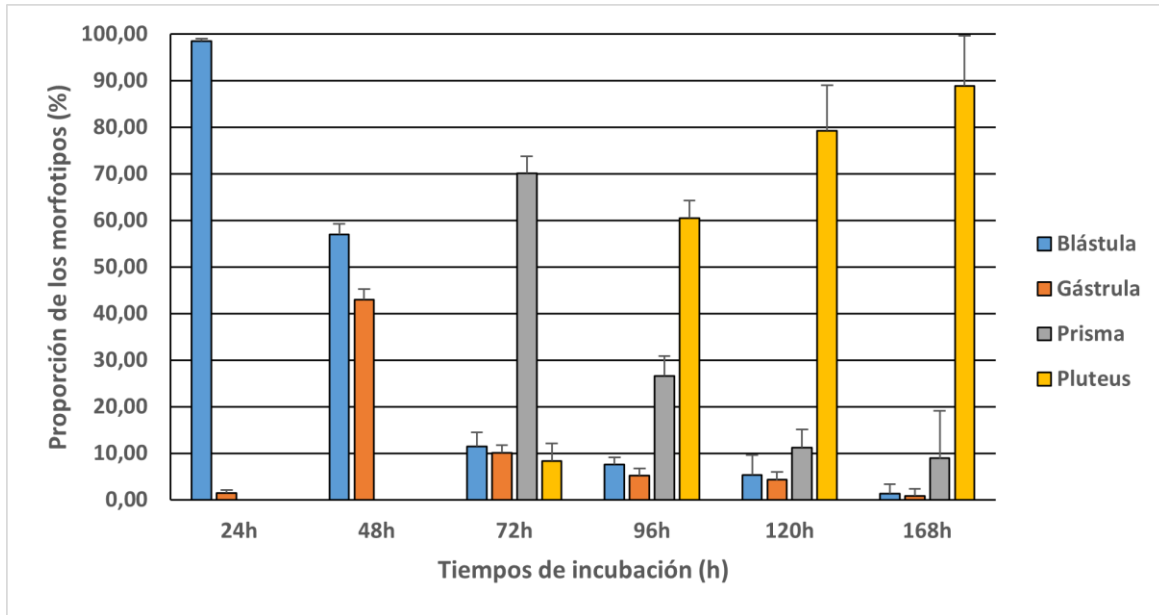


FIGURA 6

Proporción de los principales morfotipos del desarrollo embrionario de *Arbacia spatuligera* a las 24, 48, 72, 96, 120 y 168 h post fecundación a 12°C.

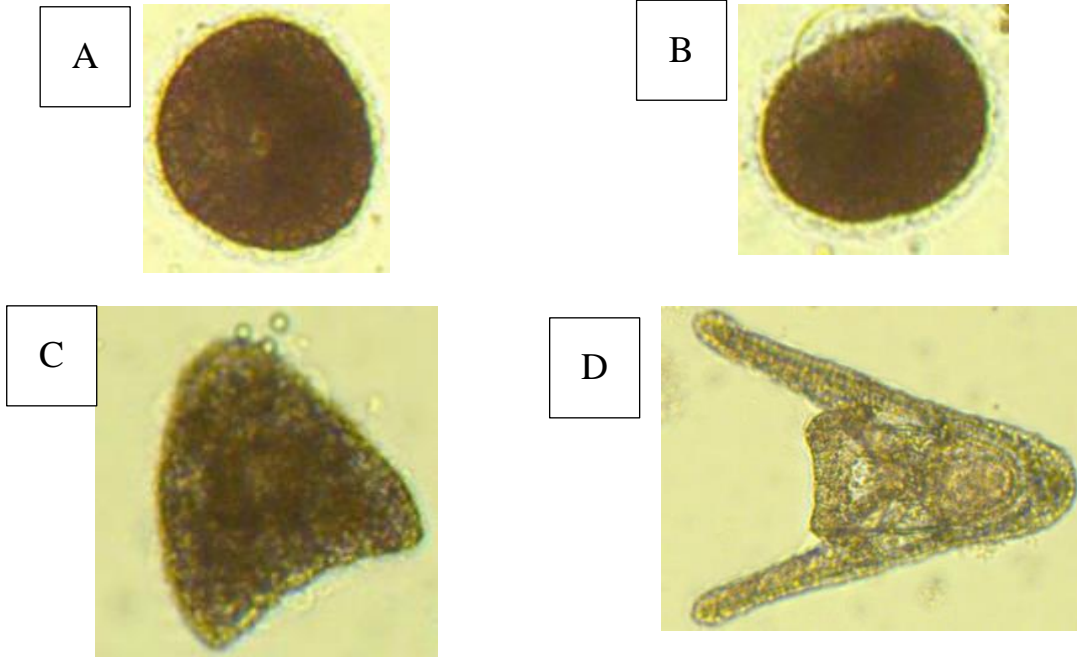


FIGURA 7

Observaciones de morfotipos consideradas como (A) blástula, (B) gástrula, (C) larva prisma y (D) larva pluteus en el desarrollo embrionario de *Arbacia spatuligera*.

Con los resultados de las observaciones realizadas, y gracias a la identificación del ensayo preliminar, se puede lograr describir el desarrollo embrionario de *Arbacia spatuligera* a 12°C y 20°C. A las 24 horas de tiempo de incubación el morfotipo principal fue la blástula con un 98,99% y 75,55% para 12°C y 20°C, respectivamente, pero las muestras difieren en el porcentaje de gástrula, donde a 12°C solo se observó un 1,01% versus un 24,45% a 20°C, siendo un indicio en la aceleración del desarrollo embrionario que es provocado por un aumento de temperatura. A las 48 horas es donde ocurre la principal diferencia provocada por el aumento de temperatura, ya que a 20°C hay un 72,6% de larva pluteus, mientras que a 12°C el morfotipo principal todavía es la blástula con un 73,96%, sin embargo, el porcentaje de proporción de gástrula aumentó a un 26,04%. Según respecta a los demás morfotipos a 48 horas a 20°C la larva prisma supone un 15,68%, la gástrula un 3,92% y la blástula un 7,8%. Por otro lado, a las 72 horas hubo un aumento en la proporción de larva pluteus a 20°C hasta un 87,35%, mientras que la larva prisma corresponde a un 7,7%, la gástrula a un 1,62% y la blástula a un 3,32%. Por otra parte, a los 12°C, y al mismo tiempo de incubación, el morfotipo principal es la larva prisma con un 55,76%, sin embargo, ya se observan las primeras larvas pluteus que alcanzaron un 23,35%, mientras que la gástrula corresponde a un 11,36% y la blástula a un 9,53%. Finalmente, a las 96 horas el morfotipo principal para 12°C y 20°C es la larva pluteus que corresponde a un 63,09% y un 90,55%, respectivamente. A 12°C las proporciones son tal que prisma corresponde un 26,06%, gástrula un 3,93% y blástula un 6,92%. Mientras que a 20°C la proporción de prisma corresponde a un 4,42%, gástrula un 0,67% y blástula un 4,36% (FIGURA 8; TABLA 2).

El análisis estadístico mostró diferencias significativas según la temperatura ( $F = 10,56$ ,  $p < 0,05$ ) y los tiempos de incubación de las muestras ( $F = 43,30$ ,  $p < 0,05$ ) determinando una relación entre la temperatura y tiempos de incubación según el efecto sobre el desarrollo embrionario de *Arbacia spatuligera*. Con esto decir definir que la temperatura afecta al desarrollo embrionario de la especie, donde a mayor temperatura se observa una aceleración en los procesos de desarrollo (TABLA 4; ANEXO).

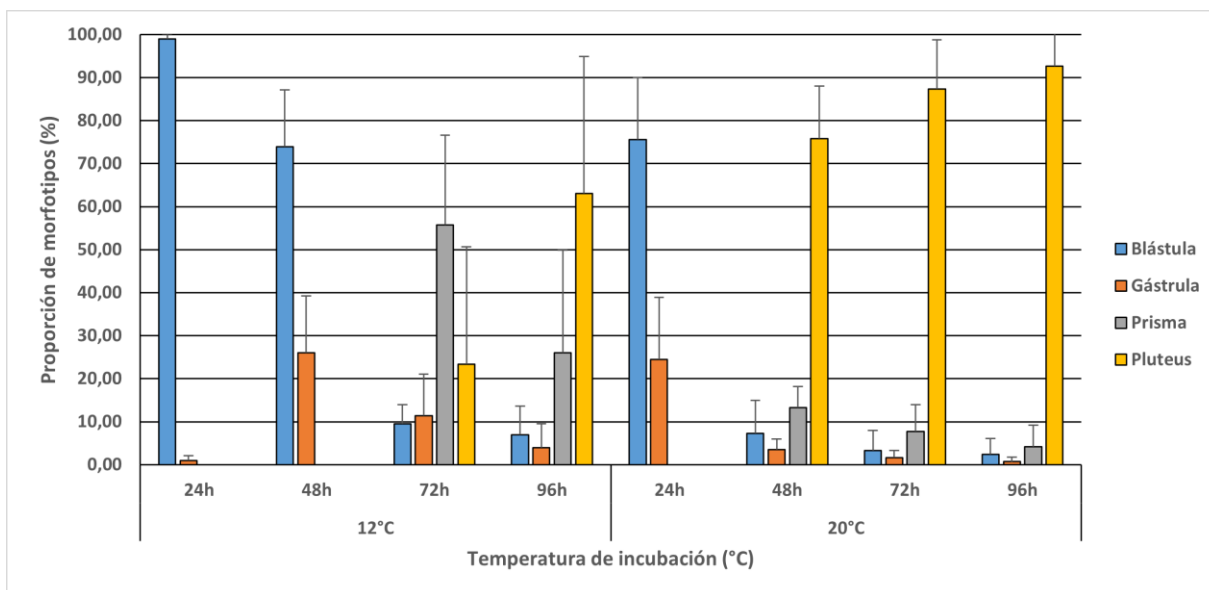


FIGURA 8

Proporción de los principales morfotipos del desarrollo embrionario de *Arbacia spatuligera* a las 24, 48, 72 y 96 h post fecundación.

TABLA 2

Proporción (%) de los principales morfotipos del desarrollo embrionario de *A. spatuligera* en los distintos tiempos de incubación.

Morfotipo	Temperatura	24h	48h	72h	96h
Blástula	12	98,99	73,96	9,53	6,92
	20	75,55	7,80	3,32	4,36
Gástrula	12	1,01	26,04	11,36	3,93
	20	24,45	3,92	1,62	0,67
Prisma	12	0,00	0,00	55,76	26,06
	20	0,00	15,68	7,70	4,42
Pluteus	12	0,00	0,00	23,35	63,09
	20	0,00	72,60	87,35	90,55

En relación con los registros de larvas pluteus, a las 24 horas de incubación no se registraron a ninguna temperatura. Por otro lado, a las 48 horas después de haber ocurrido la fecundación se observaron las primeras larvas pluteus en las muestras que fueron incubadas a 20°C, las que alcanzaron un 75,87% en promedio según todas las observaciones realizadas. Mientras que, en aquellas muestras a 12°C, no hubo registros de larvas pluteus. Por otro lado, a

las 72 horas a 20°C el porcentaje de larvas pluteus fue de 87,35%, mientras que para aquellas muestras incubadas a 12°C se comienzan a observar las primeras larvas pluteus en un desarrollo temprano y que corresponden a una proporción del 23,35% del total de muestras observadas; el morfotipo principal a ese tiempo fue la larva prisma con un 55,76%. Finalmente, a las 96 horas, los porcentajes de larvas pluteus a ambas temperaturas de incubación fueron mayores respecto al tiempo anterior, donde se alcanzó un 92,69% y 63,09% a las temperaturas de 20°C y 12°C, respectivamente (FIGURA 9).

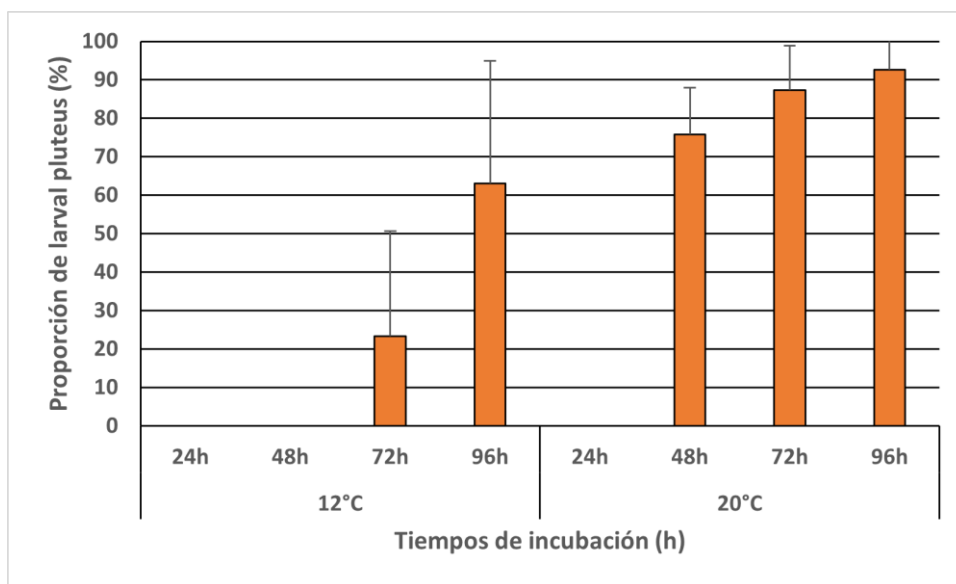


FIGURA 9

Proporción de larva pluteus a las 48, 72 y 96h post fecundación a 12°C y 20°C de temperatura de incubación.

\*A las 24 horas no hubo registros de larva pluteus.

## DISCUSIÓN

El ensayo preliminar que se realizó permitió identificar los principales morfotipos del desarrollo embrionario de *Arbacia spatuligera* a lo largo del tiempo. Además, se consideró como referencia el trabajo realizado por Palombo et al. (2023) que documenta el desarrollo embrionario de la especie *Arbacia lixula* (FIGURA 10B) en tres distintas temperaturas de incubación (16°C, 22°C y 28°C), en contraste con la presente investigación donde se usaron dos temperaturas (12°C y 20°C). Las primeras 48 horas del desarrollo predomina la etapa de blástula. A las 72 horas comienza el desarrollo temprano de la larva pluteus y corresponde a un 8,35% de la muestra bajo un 70,12% de la larva prisma. Los siguientes tiempos de incubación, desde las 96 hasta las 168 horas, presentan un crecimiento en la tónica de la larva pluteus como morfotipo principal que va desde el 60,5% hasta el 88,86%. Del mismo modo, Bustos y Olave (2001) realizaron la descripción del ciclo de vida de *Loxechinus albus*, una especie de erizo de mar que también habita en las costas chilenas. Esta especie, en el ambiente, en 24 horas alcanza el estado gástrula y a las 48 horas el estado de larva prisma, después de 3 o 4 días post fecundación se observan los primeros registros de la larva pluteus.

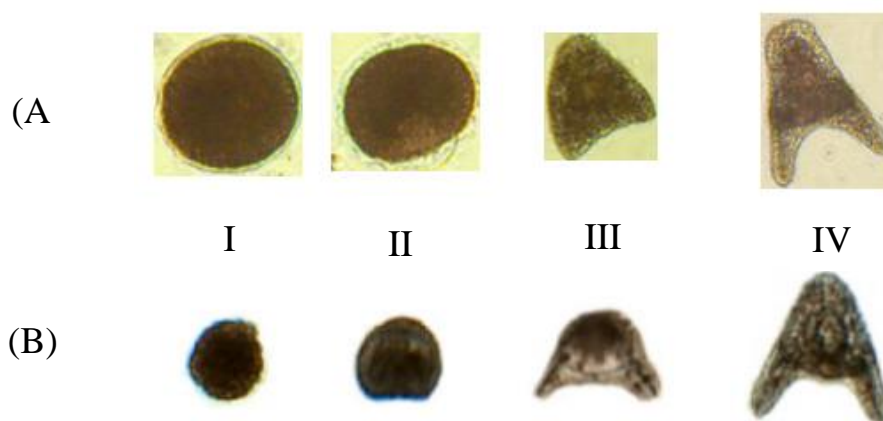


FIGURA 10

Fotografías representativas de los distintos morfotipos de (A) *Arbacia spatuligera* (I: blástula; II: gástrula; III: larva prima y IV: larva pluteus) en comparación a las identificadas por Palombo et al., (2023) en (B) *Arbacia lixula*.

Las diferencias de los resultados obtenidos de los bioensayos realizados durante el período de la investigación a distintas temperaturas se ajustan a lo descrito por la literatura. Donde se describe que la temperatura del agua de mar afecta al metabolismo que genera la energía utilizada en los procesos fisiológicos, de reproducción, entre otros. Mientras mayor sea la temperatura del agua, mayor será la tasa metabólica de los animales acuáticos, lo que supone un aumento del consumo de oxígeno. Además, el nivel mínimo de oxígeno requerido aumenta a medida que también lo hace la temperatura, lo que se traduce en un aumento de la tasa metabólica (Rubalcaba 2024). Los principales morfotipos a cada tiempo de incubación a ambas temperaturas son tal que, a modo de resumen, a las 24 horas post fecundación tanto para 12°C y 20°C es la blástula con un 98,99% y 75,55%, respectivamente. Sin embargo, en las muestras incubadas a 20°C hay un mayor porcentaje de gástrula, que corresponde a un 24,45% frente a un 1,01% respecto a las muestras incubadas a 12°C. A las 48 horas las muestras incubadas a 12°C mantienen la tónica con la blástula con un 73,92%, pero con mayores observaciones de gástrula donde se registra un aumento hasta el 26,04%. Por otro lado, a 20°C ya se alcanzó la larva pluteus y corresponde un 72,60% de la muestra. Luego, a las 72 horas, las muestras a 12°C alcanzaron a desarrollarse hasta la larva prisma con un 55,76%, además ya se comenzaron a observar las primeras pluteus tempranas con una proporción de 23,35%. Finalmente, a las 96 horas, en 12°C y 20°C el morfotipo principal es la larva pluteus con un 63,09% y 92,69%, respectivamente (FIGURA 8, TABLA 3).

Ya que el análisis exploratorio de los datos estableció que no hubo diferencias significativas en los efectos de los grupos y sets, todos los datos obtenidos desde septiembre hasta noviembre se consideraron como réplicas. Las respuestas observadas son correspondientes a lo descrito en el estudio de Bay-Schmith (1981) donde describe el ciclo reproductivo de la especie en estudio (*Arbacia spatuligera*) y detalla que en septiembre es donde se alcanza el máximo IG en los organismos de la especie. Sin embargo, el índice gonádico comienza a disminuir los meses siguientes hasta alcanzar su mínimo en diciembre.

Según la observación y medición del desarrollo embrionario de *A. spatuligera* utilizando la proporción de larvas pluteus en los distintos tiempos de incubación, los resultados indican que se acertó en las muestras incubadas a mayor temperatura. Las primeras observaciones de

larva pluteus en el bioensayo fue a las 48 horas en las muestras incubadas a 20°C, mientras que en aquellas muestras incubadas a 12°C se registraron las primeras larvas pluteus a las 72 horas. Por ello, se considera que el desarrollo embrionario de *Arbacia spatuligera* a 20°C es más eficiente para las necesidades del bioensayo en el laboratorio. Asimismo, Pía-Fernández et al. (2021) observó que en *Arbacia dufresnii* a las 48 horas de incubación a 17°C se desarrollaron las primeras larvas pluteus, mientras que al mismo tiempo a los 12°C el desarrollo estaba en un estado de transición entre blástula y gástrula. Por otro lado, en los resultados obtenidos por Olaechea et al. (2017) se observó que en tres temperaturas de incubación (5, 10 y 15°C) tan solo alcanzaron larva pluteus aquellas muestras incubadas a 10 y 15°C a las 345,5 y 120 horas, respectivamente. Mientras que aquellas muestras incubadas a 5°C alcanzaron el estado blástula a las 164 horas después del comienzo del desarrollo embrionario.

La investigación se realizó con base en una metodología que supone un control de las condiciones en las que desarrollan los embriones de erizos. Por otro lado, la variación de la temperatura del ambiente puede afectar procesos de especies, poblaciones, comunidades y, últimamente, se ha relacionado el metabolismo individual con el de la comunidad y con ello se logra predecir tasas de crecimiento de las poblaciones, flujo de carbono y patrones de diversidad. La relación entre el metabolismo y la temperatura es inversa, pues a medida que aumenta la temperatura, la duración de la “etapa vital” disminuye (O’Connor et al. 2007). Además, en los resultados de O’Connor et al. (2007) se observa una relación inversa entre la temperatura y la duración del periodo larval de 72 especies (6 peces y 66 invertebrados), donde se observa una relación inversa entre los 2 factores anteriormente mencionados, ya que a medida que la temperatura es mayor, la duración del periodo larval de TODAS las especies se reduce.

La temperatura en ambientes acuáticos tiene un impacto crucial en el metabolismo de los animales, ya que influye en la demanda de energía de las enzimas y en la fisiología general del organismo (Yu et al. 2024). En los resultados de la investigación del autor citado anteriormente, Yu et al. (2024), se observa que en el erizo de mar *Heliocidaris crassispina* hay una mayor tasa metabólica a medida que se le somete a temperaturas mayores. A medida que la temperatura aumenta, los organismos marinos deben ajustar su metabolismo para mantener el funcionamiento adecuado de sus procesos fisiológicos. Estos ajustes son fundamentales para la capacidad de los animales marinos de adaptarse a los cambios térmicos de su entorno. Además, el efecto de la temperatura sobre el metabolismo varía a lo largo de las distintas etapas de vida

de una especie, ya que la fisiología cambia con la edad, lo que provoca que las respuestas metabólicas sean diferentes en distintos momentos del desarrollo (Spanopoulos et al. 2005). Este investigador observa que en *Litopenaeus stylirostris*, en tratamientos de distintas salinidades y temperatura, donde mayor consumo de oxígeno hubo por parte de los organismos fue en aquel tratamiento donde la temperatura era mayor.

## CONCLUSIONES

1. Se describió el desarrollo embrionario temprano, hasta la larva pluteus, de *Arbacia spatuligera* a una temperatura aproximada a la del ambiente (12°C) durante el periodo de investigación.
2. El desarrollo embrionario de *Arbacia spatuligera* se acelera a temperaturas mayores que la del ambiente, por ello se observan larvas pluteus en tiempos más próximos en las muestras incubadas a 20°C.
3. Los primeros registros de larvas pluteus se obtienen a las 48 horas post fecundación en las muestras incubadas a 20°C, lo que significa una mayor eficiencia para el bioensayo.
4. La descripción de proceso de desarrollo embrionario y los distintos morfotipos observados, bajo condiciones estandarizadas como un protocolo de bioensayo, tiene relevancia para establecer tiempos óptimos de exposición que aseguren una correcta determinación de los efectos evaluados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre GV, Owuor MA, Garrido-Pérez C, Salamanca MJ, Del Valls TA, Martín-Díaz ML (2015) Are standard tests sensitive enough to evaluate effects of human pharmaceuticals in aquatic biota? Facing changes in research approaches when performing risk assessment of drugs. *Chemosphere* 120: 75-85. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.05.087.
- Bay-Schimth E (1981) Ciclo anual de reproducción de *Arbacia spatuligera* (Valenciennes, 1846) en la bahía de Concepción, Chile. (Echinoidea, Arbaciidae). *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción* tomo LI: 47-59.
- Beiras R, Fernández N, Bellas J, Besada V, González-Quijano A, Nunes T (2003) Integrative assessment of marine pollution in Galician estuaries using sediment chemistry, mussel bioaccumulation, and embryo-larval toxicity bioassays. *Chemosphere* 52(7): 1209-1224. DOI: 10.1016/S0045-6535(03)00364-3.
- Bonaventura R, Zito F, Morroni L, Pellegrini D, Regoli F, Pinsino A (2021) Development and validation of new analytical methods using sea urchin embryo bioassay to evaluate dredged marine sediments. *Journal of Environmental Management* 281: 111862. DOI: 10.1016/j.jenvman.2020.111862.
- Cesar A, Marín A, Marin-Guirao L, Vita R, Lloret J, Del Valls TA (2009) Integrative ecotoxicological assessment of sediment in Portmán Bay (southeast Spain). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(7): 1832-1841. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2008.12.001.
- Degnan BM, Degnan SM (2023) How larvae and life cycles evolve. *Trends in Genetics* 39(7): 528-530. DOI: 10.1016/j.tig.2023.03.008.
- Fernández J, Belén-Chaar F, Epherra L, González-Aravena J-M, Rubilar T (2021) Embryonic and larval development is conditioned by water temperature and maternal origin of eggs in the sea urchin *Arbacia dufresnii* (Echinodermata: Echinoidea). *Revista de Biología Tropical* 69(Suppl.1): S452-S463. DOI: 10.15517/rbt.v69iSuppl.1.46384.
- Fenaux L, Cellario C, Etienne M (1985) Variations in the ingestion rate of algal cells with morphological development of larvae of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). *Marine Ecology Progress Series* 24(1): 161-165.
- Fuentes I, Barros C (2000) Larval development and metamorphosis of cultured *Tetrapyrgus niger* (Echinodermata Echinoidea): an uncommon form of echinoplutei. *Invertebrate Reproduction & Development* 37(3): 201-209. DOI: 10.1080/07924259.2000.9652420.
- Gambardella C, Marcellini F, Falugi C, Varrella S, Corinaldesi C (2021) Early-stage anomalies in the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) as bioindicators of multiple stressors in the marine environment: Overview and future perspectives. *Environmental Pollution* 287: 117608. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.117608.

- Hammond LM, Hofmann GE (2010) Thermal tolerance of *Strongylocentrotus purpuratus* early life history stages: mortality, stress-induced gene expression and biogeographic patterns. *Marine Biology* 157(12): 2677-2687. DOI: 10.1007/s00227-010-1528-z.
- Khosrovyan A, Rodríguez-Romero A, Salamanca MJ, Del Valls TA, Riba I, Serrano F (2013) Comparative performances of eggs and embryos of sea urchin (*Paracentrotus lividus*) in toxicity bioassays used for assessment of marine sediment quality. *Marine Pollution Bulletin* 70(1-2): 204-209. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2013.03.006.
- Khurram M, Hernandez A, Eskalaei M, Badali O, Coyle-Thompson C, Oppenheimer SB (2004) Carbohydrate involvement in cellular interactions in sea urchin gastrulation. *Acta Histochemica* 106(2): 97-106. DOI: 10.1016/j.acthis.2004.01.001.
- Kobayashi N, Okamura H (2004) Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. 1. Tracing the cause by the effects. *Chemosphere* 55(10): 1403-1412. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2003.11.052.
- Láruson AJ, Coppard SE, Pespeni MH, Reed FA (2018) Gene expression across tissues, sex, and life stages in the sea urchin *Tripneustes gratilla* [Toxopneustidae, Odontophora, Camarodonta]. *Marine Genomics* 41: 12-18. DOI: 10.1016/j.margen.2018.07.002.
- Metaxas A (2020) Larval ecology of echinoids. En: *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* Vol. 43 (pp. 77-93). Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-819570-3.00006-8.
- Mattaliano A (2020) El erizo de mar *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) en un mundo de cambio [Tesis de Fin de Grado].
- Millán C, Díaz A, Poulin E, Merino-Yunnissi C, Martínez A (2019) Genetic diversity and demographic history of the endemic Southeastern Pacific sea urchin *Arbacia spatuligera* (Valenciennes 1846). *Gayana (Concepción)* 83(2): 81-92. DOI: 10.4067/S0717-65382019000200081.
- Morrone L, Pinsino A, Pellegrini D, Regoli F, Matranga V (2016) Development of a new integrative toxicity index based on an improvement of the sea urchin embryo toxicity test. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 123: 2-7. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.09.026.
- Novelli AA, Losso C, Ghetti PF, Ghirardini AV (2003) Toxicity of heavy metals using sperm cell and embryo toxicity bioassays with *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea): Comparisons with exposure concentrations in the Lagoon of Venice, Italy. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(6): 1295-1301. DOI: 10.1002/etc.5620220616.
- O'Connor MI, Bruno JF, Gaines SD, Halpern BS, Lester SE, Kinlan BP, Weiss JM (2007) Temperature control of larval dispersal and the implications for marine ecology, evolution, and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(4): 1266-1271. DOI: 10.1073/pnas.0603422104.

- Olaechea P, Panéz JJ, Gonzáles- Figueroa H (2017) Desarrollo embrionario de *Tetrapygyus niger* (Molina, 1782) “erizo negro” en diferentes temperaturas. *Biotempo* 6: 27-31. DOI: 10.31381/biotempo.v6i0.879.
- Olascoaga D, Nisperuza-Pérez, Carlos, Yepes-Escobar J, Quirós-Rodríguez JA (2023) Diversidad, densidad poblacional y distribución espacial de equinoideos regulares (Echinodermata: Echinoidea) en Isla Fuerte, Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 26(2):. DOI: 10.31910/rudca.v26.n2.2023.2254.
- Palombo C, Chiarore A, Ciscato M, Asnicar D, Mirasole A, Fabbrizzi E, Teixidó N, Munari M (2023) Thanks mum. Maternal effects in response to ocean acidification of sea urchin larvae at different ecologically relevant temperatures. *Marine Pollution Bulletin* 188: 114700. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2023.114700.
- Picone M, Bergamin M, Losso C, Delaney E, Arizzi Novelli A, Ghirardini AV (2016) Assessment of sediment toxicity in the Lagoon of Venice (Italy) using a multi-species set of bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 123: 32-44. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.09.002.
- Pinsino A, Matranga V, Trinchella F, Roccheri MC (2010) Sea urchin embryos as an in vivo model for the assessment of manganese toxicity: developmental and stress response effects. *Ecotoxicology* 19(3): 555-562. DOI: 10.1007/s10646-009-0432-0.
- Pinsino A, Turturici G, Sconzo G, Geraci F (2011) Rapid changes in heat-shock cognate 70 levels, heat-shock cognate phosphorylation state, heat-shock transcription factor, and metal transcription factor activity levels in response to heavy metal exposure during sea urchin embryonic development. *Ecotoxicology* 20(1): 246-254. DOI: 10.1007/s10646-010-0576-y.
- Pinsino A, Roccheri MC, Matranga V (2014) Manganese overload affects p38 MAPK phosphorylation and metalloproteinase activity during sea urchin embryonic development. *Marine Environmental Research* 93: 64-69. DOI: 10.1016/j.marenvres.2013.08.004.
- Rubalcaba JG (2024) Metabolic responses to cold and warm extremes in the ocean. *PLOS Biology* 22(1): e3002479. DOI: 10.1371/journal.pbio.3002479.
- Rupp JH (1973) Effects of temperature on fertilization and early cleavage of some tropical echinoderms, with emphasis on *Echinometra mathaei*. *Marine Biology* 23(3): 183-189. DOI: 10.1007/BF00389483.
- Spanopoulos M, Martínez-Palacios CA, Vanegas-Pérez RC, Rosas C, Ross LG (2005) The combined effects of salinity and temperature on the oxygen consumption of juvenile shrimps *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874). *Aquaculture* 244(1-4): 341-348. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2004.11.023.
- U.S Environmental Protection Agency (2018) Bioassays: A technical brief.

- Vacquier VD (2011) Laboratory on sea urchin fertilization. *Molecular Reproduction and Development* 78(8): 553-564. DOI: 10.1002/mrd.21360.
- Yu J, Wang G, Zhang L, Huang S (2024) Effects of temperature on fertilization, hatching, larval growth, ingestion, metabolism, and metamorphosis of the purple sea urchins, *Heliocidaris crassispina*. *Aquaculture International* 32(4): 4597-4617. DOI: 10.1007/s10499-024-01392-9.
- Zhao X, Mu X, Guo Y, Li J, Ma Z, Yu G, Qin C (2024) Assessment of annual variability in the population status and reproductive cycle of purple sea urchins (*Heliocidaris crassispina*, Agassiz, 1864) in Daya Bay, China. *Frontiers in Marine Science* 10: 1337159. DOI: 10.3389/fmars.2023.1337159.

## ANEXO

TABLA 3

Promedios, desviación estándar y (tubos contados) del bioensayo.

Morfortipo	Temperatura (°C)	Tiempos de incubación (h)			
		24	48	72	96
Blástula	12	98,99±1,07 (23)	73,96±13,14 (25)	9,53±4,47 (28)	6,92±6,66 (25)
	20	75,55±14,43 (19)	7,32±7,62 (20)	3,32±4,63 (22)	2,40±3,62 (20)
Gástrula	12	1,01±1,07 (23)	26,04±13,07 (25)	11,36±9,65 (28)	3,93±5,62 (25)
	20	24,45±14,43 (19)	3,53±2,47 (20)	1,62±1,72 (22)	0,7±1,01 (20)
Prisma	12	0	0 (25)	55,76±20,84 (28)	26,06±23,81 (25)
	20	0	13,28±4,91 (20)	7,7±6,27 (22)	4,21±5,02 (20)
Pluteus	12	0	0 (25)	23,35±27,26 (28)	63,09±31,79 (25)
	20	0	75,87±12,11 (20)	87,35±11,44 (22)	92,69±9,03 (20)

TABLA 4

Modelo lineal general.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Temperatura	1	3409	3409,0	10,56	0,001
Grupo (Temperatura)	6	2037	339,6	1,05	0,394
Set (Temperatura; Grupo)	3	274	91,4	0,28	0,837
Incubación (Temperatura; Grupo; Set)	11	153699	13972,7	43,30	0,000
Error	157	50665	322,7		
Falta de ajuste	21	46444	2211,6	71,26	0,000
Error puro	136	4221	31,0	-	-
Total	178	303974	-	-	-

<b>Analista:</b>	<b>Fecha:</b>	<b>Hora de Desove:</b>	<b>Fecha de Agua control:</b>
<b>Observación en portaoobjeto concavidades</b>			
<b>Machos</b>		<b>Hembras</b>	
<b>Identificación</b>	<b>Identificación</b>	<b>Forma de Óvulo</b>	<b>Forma de Óvulo</b>
<b>Motilidad Espermio</b>	<b>Fecundación</b>	<b>Selección de Gametos</b>	<b>Selección de Gametos</b>
<b>Conteo de Cantidad de Espermio en Cámara de Neubauer</b>			
<b>Valor Dilución E</b>	<b>Conteo 1:</b>	<b>Conteo 2:</b>	<b>Promedio:</b>
			<20% entre conteo 1 y conteo 2
<b>EPM Stock Seco:</b>			
Valor Dilución al 10% 1:			
Valor Dilución al 10% 2:			
Valor Dilución al 10% 3:			
Promedio: <small>Criterio de Concentración, todos los valores deben ser &gt; a 200 cel/ml Si el Valor es &lt; 200 cel/ml se debe concentrar.</small>			
Valor se solución stock			
<b>Volumen de Stock Seco para obtener 5X10<sup>7</sup> EPM:</b>			
<b>Bioensayo de Fecundación</b>			
Criterio de Aceptación Si el valor estar entre 2000-2500 cel/ml se acepta			
Volumen de ovulos a fecundar:			
Fecundación >80%:			
Hora de Adición de Óvulos:			
Hora de Fijación:			
<b>Observaciones:</b>			
Volumen de espermatozoide:			
Hora de Fecundación:			
Fecha y hora de Fijación:			

Fecha Extracción de Erizos:

<b>Criterio de Selección de Gametos</b>	
<b>Motilidad</b>	<b>Forma de Óvulo</b>
0. Ningún espermio se mueve	E= Esférica / I=irregular
1. Algunos espermios se agitan ligeramente	<b>Fecundación</b>
2. Pocos espermios se desplazan rápidamente	(+) = Positivo / (-) = Negativo
3. Algunos se desplazan vigorosamente, algunos lentamente y otros inmóviles	<b>Selección de Gametos</b>
4. La mayoría de los espermios se desplazan rápido	✓ Aprueba X Rechaza
5. Todos los espermios se desplazan vigorosamente	
EPM seco= Promedio x 25000x2000 5 Volumen Stock seco= (5 x10 <sup>7</sup> ) x volumen a diluir EPM seco Para realizar la fecundación en el Estado Larval se debe considerar agregar 100 ul de solución de espermatozoide por cada ml de solución de óvulos (concentración aprox. 2000e4/ml)	

V/B° \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

FIGURA 11

Ficha de selección de gametos.