

## Effect of thermal stress on survival and delay of metamorphosis in larvae of the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*

### Efecto del estrés térmico en la supervivencia y el retraso de la metamorfosis en larvas del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*

L Díaz-Pérez, E Carpizo-Ituarte\*

Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, Apartado postal 453, Km 103 carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada 22800, Baja California, México.

\*Corresponding author. E-mail: [ecarpizo@uabc.edu.mx](mailto:ecarpizo@uabc.edu.mx), [ecarpizo@gmail.com](mailto:ecarpizo@gmail.com)

**ABSTRACT.** The effect of thermal stress (heat shock) on survival was evaluated for advanced larval stages and the possible effect on delay of metamorphosis in competent larvae was also evaluated in the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* under laboratory conditions. Eight-arm precompetent and competent larvae were kept at 15, 19, 23, 28, and 31 °C during 24 h to estimate their thermal tolerance and measure their survival in each treatment. Delay of metamorphosis was evaluated in competent larvae exposed to heat shock treatments of 15, 20, 24, 28, and 32 °C for 30 min. After this, larvae were induced to metamorphose in the presence of biofilms and KCl. Our results indicated that the thermal tolerance limit for precompetent and competent larvae was 27 °C; temperatures equal or above this value are lethal for both stages of development, where we observed 100% mortality in a period of 24 h for the treatment at 27 °C and of 2 h at 31 °C. Competent larvae subjected to a heat shock treatment of 28 °C for 30 min delayed the onset of metamorphosis (<40%) and showed high percentage of larvae with incomplete metamorphosis (55%). These results indicate the sensitivity of late larval stages to temperatures above 27 °C for short periods of time, and that this sensitivity may compromise the onset of metamorphosis. This could have some effect on the settlement and recruitment patterns of the purple sea urchin, particularly in intertidal sites exposed to high temperatures during the summer.

**Key words:** competent larva, metamorphosis, delay of metamorphosis, KCl, biofilm.

**RESUMEN.** El efecto del estrés térmico (choque térmico) en la supervivencia de estadios larvarios avanzados y en el retraso de la metamorfosis en larvas competentes de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* fueron evaluados en condiciones de laboratorio. Las larvas precompetentes de ocho brazos y competentes se mantuvieron a 15, 19, 23, 27 y 31 °C durante 24 h para determinar su límite de tolerancia térmica y medir su supervivencia en cada tratamiento. El retraso de la metamorfosis se evaluó en larvas competentes sometidas a tratamientos de choque térmico a 15, 20, 24, 28 y 32 °C durante 30 min; las larvas fueron inducidas a la metamorfosis mediante biopelículas y KCl. Los resultados indicaron que el límite de tolerancia térmica para larvas precompetentes y competentes fue de 27 °C; las temperaturas iguales o superiores a este valor resultaron letales para ambos estadios de desarrollo, donde se observó 100% de mortalidad en un periodo de 24 h para el tratamiento de 27 °C y de 2 h para el de 31 °C. Se observó que las larvas competentes sometidas a condiciones de estrés térmico de 28 °C durante 30 min retrasaron el inicio de la metamorfosis (<40% de metamorfosis), y mostraron porcentajes altos de larvas con metamorfosis incompleta (55%). Estos resultados indican la sensibilidad de los estadios larvales tardíos a temperaturas superiores a 27 °C por periodos de tiempo cortos, y que esta sensibilidad puede comprometer el inicio de la metamorfosis. Esto puede tener algún efecto en el asentamiento y los patrones de reclutamiento del erizo morado, particularmente en sitios del intermareal expuestos a altas temperaturas durante el verano.

**Palabras clave:** larva competente, metamorfosis, retraso de la metamorfosis, KCl, biopelícula.

## INTRODUCTION

The purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson 1857) is distributed in warm waters of the Pacific Ocean, from Alaska to Cedros Island off Baja California, Mexico, and experiences a wide range of temperatures, from 4 to 20 °C (Osovitz and Hofmann 2005). It inhabits the shallow subtidal zone, where mean annual sea surface temperature is between 16 and 20 °C off Baja California (McClatchie *et al.* 2008). It also inhabits the rocky intertidal zone where it can experience temperatures 8 °C above the annual average (Palleiro-Nayar *et al.* 2008). Changes in temperature in the intertidal zone can occur rapidly and in some cases can

## INTRODUCCIÓN

El erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson 1857) se distribuye en aguas templadas del océano Pacífico, desde Alaska hasta la isla de Cedros en Baja California, México, y experimenta un intervalo amplio de temperaturas que oscila de 4 a 20 °C (Osovitz y Hofmann 2005). Esta especie habita en la zona somera del submareal, donde el promedio anual de temperatura superficial del mar es entre 16 y 20 °C frente Baja California (McClatchie *et al.* 2008). También habita en la zona del intermareal rocoso en donde puede llegar a experimentar temperaturas por encima de 8 °C del promedio anual (Palleiro-Nayar *et al.* 2008).

be extreme, likely causing physiological problems for the organisms (Helmuth *et al.* 2006, Kuo and Sanford 2009). Temperature is thus one of the most important environmental factors as it plays a central role in the development, survival, and distribution of organisms in ecosystems.

Several studies have shown the effect of temperature on embryonic and larval development, and the settlement, metamorphosis, and survival of larvae of diverse marine invertebrates (O'Connor and Lawler 2004, Dove and O'Connor 2007, O'Connor *et al.* 2007, Putnam *et al.* 2008, Parker *et al.* 2009, Saunders and Metaxas 2009). Rahman *et al.* (2009) determined that in the sea urchin *Tripneustes gratilla*, temperatures below 22 °C and above 29 °C affected the survival and presence of abnormalities in embryonic and larval development at different times of exposure. For *S. purpuratus*, Hammond and Hofmann (2010) reported that a 1-h exposure to a temperature of 32 °C was lethal (100% mortality) during early development stages (gastrula and four-armed equinopluteus). Nonetheless, despite the research conducted on the effect of temperature on the development and survival of larvae of marine invertebrates (see Bassim and Sammarco 2003, Randall and Szmant 2009), in particular echinoderms (see Johnson and Babcock 1994), little is known about the effects of high temperatures on settlement and onset of metamorphosis. There are reports on larval development of species of a more tropical distribution, such as *Tripneustes ventricosus*, which properly completes its development at temperatures of up to 29 °C (see Rosas *et al.* 2009). Chen and Chen (1992) found that larvae of *Arachnoides placenta* maintained at temperatures ranging from 28 to 34 °C showed a decrease in percentage of metamorphosed larvae at the end of the experiments.

Metamorphosis is a key event in the life cycle of many marine invertebrates; it is a change from a pelagic larva to a benthic juvenile/adult lifestyle and, therefore, involves changes in behaviour and morphogenetics. Larvae initiate metamorphosis in response to environmental cues, either chemical or physical, associated with the habitat and/or presence of adults of the same species. Bacterial films associated with marine surfaces are also known to play an important role in the generation of metamorphosis-inducing compounds (Lau and Qian 2001, Díaz-Pérez 2006, Chiu *et al.* 2007, Hadfield 2011). Moreover, the response to bacterial films has been reported to be species-specific; that is, larvae have the ability to discriminate and respond to certain environmental cues related to biofilms on substrates suitable for survival and development (Elkin and Marshall 2007). Thus, an increase in temperature at the onset of metamorphosis can have adverse ecological consequences at the moment of detecting the environmental cue and, therefore, selecting suitable substrates for development (Gebauer *et al.* 2003).

There are few studies documenting the effect of temperature on the delay of metamorphosis in marine invertebrates and none in particular on the purple sea urchin. This study thus aimed to determine the limits of thermal tolerance and

La variación de la temperatura en la zona intermareal puede ser muy rápida y en algunos casos puede ser extrema, lo que podría ocasionar problemas fisiológicos para los organismos (Helmuth *et al.* 2006, Kuo y Sanford 2009). Por lo tanto, la temperatura es uno de los factores ambientales más importantes ya que juega un papel central en el desarrollo, la supervivencia y la distribución de los organismos en los ecosistemas.

Diversos estudios han mostrado la dependencia de la temperatura durante el desarrollo embrionario y larvario, el asentamiento, la metamorfosis y la supervivencia de larvas de diferentes invertebrados marinos (O'Connor y Lawler 2004, Dove y O'Connor 2007, O'Connor *et al.* 2007, Putnam *et al.* 2008, Parker *et al.* 2009, Saunders y Metaxas 2009). Rahman *et al.* (2009) encontraron que, en el erizo de mar *Tripneustes gratilla*, las temperaturas por debajo de 22 °C y por encima de 29 °C tuvieron efectos en la supervivencia y presencia de anomalías en el desarrollo embrionario y larvario con diferentes tiempos de exposición. Hammond y Hofmann (2010) determinaron que, para *S. purpuratus*, una temperatura de 32 °C durante 1 h de exposición era letal (100% mortalidad) en estadios de desarrollo tempranos (gástrula y equinopluteus de cuatro brazos). A pesar de los estudios realizados acerca del efecto de la temperatura en el desarrollo y la supervivencia de larvas de invertebrados marinos (ver Bassim y Sammarco 2003, Randall y Szmant 2009), en particular los equinodermos (ver Johnson y Babcock 1994), poco se sabe acerca de los efectos de altas temperaturas en el asentamiento y el inicio de la metamorfosis. Se han reportado desarrollos larvarios de especies de distribución más tropical, como *Tripneustes ventricosus*, que completa adecuadamente su desarrollo a temperaturas de hasta 29 °C (ver Rosas *et al.* 2009). Chen y Chen (1992) encontraron que las larvas de la galleta de mar *Arachnoides placenta* mantenidas a un intervalo de temperaturas entre 28 y 34 °C mostraron una disminución en el porcentaje de larvas metamorfoseadas al final de los experimentos.

La metamorfosis es un evento clave durante el ciclo de vida de muchos invertebrados marinos; es un cambio de la forma de vida pelágica en larvas a bentónica en juveniles y adultos, por lo tanto, incluye cambios de comportamiento y morfogenéticos. La metamorfosis se inicia con la respuesta de las larvas a claves ambientales, que pueden ser de origen químico o físico, asociadas al hábitat y/o presencia de adultos de la misma especie. Se ha registrado que las películas bacterianas asociadas a las superficies marinas juegan un papel esencial en la generación de compuestos inductores de la metamorfosis (Lau y Qian 2001, Díaz-Pérez 2006, Chiu *et al.* 2007, Hadfield 2011). Además, se ha documentado que la respuesta a películas bacterianas es especie-específica; es decir, las larvas tienen la capacidad de discriminar y responder a ciertas claves ambientales asociadas a biopelículas en los sustratos apropiados para sobrevivir y desarrollarse (Elkin y Marshall 2007). De esta manera, un incremento de

the effect of thermal stress on the onset of metamorphosis in late-stage and competent larvae of the purple sea urchin *S. purpuratus*. Our findings represent the first data for the species.

## MATERIAL AND METHODS

### Collection of organisms and larval culture

Adult purple sea urchins (*S. purpuratus*) were collected during winter from the intertidal zone at two sites in Baja California, Mexico: Punta Baja (29°56'58.29" N, 115°48'42.65" W; sea surface temperature of 17°C) and Bajamar (32°00'51.32" N, 116°52'27.23" W; sea surface temperature of 16°C). The specimens were transported to the laboratory at the Institute of Oceanological Research of the University of Baja California at Ensenada, where they were maintained in 40-L tanks with continuous water flow, at temperatures between 15 and 16°C ( $\pm 1$ °C), and fed the macroalga *Macrocystis pyrifera* until used.

Gametes were obtained according to the method described by Strathmann (1987), which consisted of stimulating their expulsion by injecting 2–3 mL of 0.53 M KCl into the coelomic cavity through the peristomal membrane. Eggs were fertilized and larvae were maintained following Carpizo-Ituarte *et al.* (2002). Larval development was carried out in 45-L conical tanks containing 5- and 1- $\mu$ m filtered seawater passed through UV light to eliminate bacterial contamination. Larvae were cultured at a density of 3 larvae mL<sup>-1</sup> with continuous aeration at a temperature of 16°C ( $\pm 1$ °C); 50% water change was done every two days and 100% once a week. Larvae were fed daily on *Rhodomonas* sp. at a concentration of 20,000 cells mL<sup>-1</sup> until they attained metamorphic competence. They were considered competent when the rudiment was clearly visible and occupied the left part of the larval body, and the tube feet were well differentiated, as described by Carpizo-Ituarte *et al.* (2002) and Smith *et al.* (2008). Competency was attained after 23 days of development at a temperature of 16°C ( $\pm 1$ °C).

### Thermal tolerance limit in advanced larval stages

Eight-armed, 18-day-old precompetent larvae (experiment 1a) and 23-day-old competent larvae (experiment 1b) were exposed to different thermal shock treatments (15, 19, 23, 27, and 31°C). Experiments were performed using Falcon multiwell plates, with 5 mL of 5- and 1- $\mu$ m filtered, UV-irradiated seawater per well. From 20 to 30 eight-armed precompetent larvae and competent larvae were placed in each well in independent experiments. All treatments were performed in triplicate. The 15°C treatment was used as control in all experiments because complete larval development occurred at this temperature. Percent larval survival was determined after 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, and 24 h for eight-armed

la temperatura al inicio de la metamorfosis puede tener consecuencias ecológicas desfavorables al momento de la detección de la clave ambiental y, por ende, en la selección de los sustratos adecuados para desarrollarse (Gebauer *et al.* 2003).

Hasta el momento son pocos los trabajos que documentan el efecto de la temperatura en el retraso de la metamorfosis en invertebrados marinos y ninguno en particular en el erizo morado. El objetivo del presente estudio fue documentar los límites de tolerancia térmica y el efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis en larvas de estadios avanzados y competentes del erizo morado *S. purpuratus*. Los resultados del presente estudio representan los primeros datos para esta especie.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección de organismos y cultivo de larvas

Se recolectaron erizos morados (*S. purpuratus*) adultos durante la temporada de invierno en la zona intermareal de dos localidades en Baja California, México: Punta Baja (29°56'58.29" N, 115°48'42.65" W; temperatura superficial del océano, 17°C) y Bajamar (32°00'51.32" N, 116°52'27.23" W; temperatura superficial del océano, 16°C). Los organismos se transportaron al laboratorio en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California en Ensenada, donde se mantuvieron en estanques de 40 L con flujo de agua continua, a una temperatura de 15 a 16°C ( $\pm 1$ °C), y alimentaron con la macroalga *Macrocystis pyrifera* hasta su utilización.

La obtención de los gametos se realizó de acuerdo con el método descrito por Strathmann (1987), que consistió en estimular su expulsión mediante la inyección de 2–3 mL de KCl 0.53 M en la cavidad celómica a través de la membrana peristomal. La fertilización de los huevos y el mantenimiento de larvas se realizó de acuerdo con el método descrito por Carpizo-Ituarte *et al.* (2002). El desarrollo larvario se llevó a cabo en tanques cónicos de 45 L con agua de mar filtrada a 5 y 1  $\mu$ m y pasada a través de una lámpara de luz ultravioleta para eliminar la contaminación bacteriana. Los cultivos se realizaron a una densidad de 3 larvas mL<sup>-1</sup> con aireación continua a una temperatura de 16°C ( $\pm 1$ °C); el recambio de agua al 50% se realizó cada dos días y el recambio al 100%, una vez a la semana. Las larvas se alimentaron diariamente con la microalga *Rhodomonas* sp. a una concentración de 20,000 células mL<sup>-1</sup> hasta que alcanzaron el estadio de competencia. Se consideraron larvas competentes cuando el rudimento era claramente visible y ocupaba la región izquierda del cuerpo larval, y en él se observaba la presencia de pies ambulacrales bien diferenciados, de acuerdo con lo descrito por Carpizo-Ituarte *et al.* (2002) y Smith *et al.* (2008). El estadio de competencia se alcanzó a los 23 días de desarrollo a una temperatura de 16°C ( $\pm 1$ °C).

precompetent larvae (experiment 1a) and after 1, 2, 4, 6, and 24 h for competent larvae (experiment 1b).

### Delay of metamorphosis under conditions of thermal stress and induction with KCl and biofilms

Competent larvae maintained at 16 °C throughout their development were exposed to heat shock for 30 min in different experimental treatments (15, 20, 24, 28, and 32 °C) (experiment 2a). After this, from 20 to 25 larvae (per well) were placed in 5 mL of filtered seawater and induced to metamorphose by adding 100 mM KCl for 15 min, as described by Carpizo-Ituarte *et al.* (2002). The KCl solution was replaced by filtered seawater after 15 min to prevent toxic effects resulting from prolonged exposure. Six replicates were used per treatment and temperature was maintained at 16 °C ( $\pm 1$  °C) until the end of the experiment.

In an additional experiment (experiment 2b), competent larvae were acclimatized for 30 min at 20 °C and then exposed for 30 min to different experimental temperatures (15, 20, 24, 28, and 32 °C). After stress exposure, larvae were placed in contact with biofilms to induce the onset of metamorphosis. The biofilms were generated before the experiment by placing Falcon multiwell plates for 10 consecutive days in tanks containing adult purple sea urchins at a temperature of 17 °C ( $\pm 3$  °C). Each treatment was performed in triplicate. After thermal stress, the treatments were maintained at 16 °C ( $\pm 1$  °C) until the end of the experiment. A positive control was included in both experiments (2a and 2b), which consisted of inducing metamorphosis in 20 to 30 larvae per well by exposure to 100 mM KCl for 15 min; after this time the solution was removed and replaced by 5 mL of filtered seawater. The positive control was not exposed to thermal stress and was kept at 16 °C ( $\pm 1$  °C) throughout the experimental period. A negative control was also included, in which competent larvae were kept in filtered seawater at 16 °C ( $\pm 1$  °C) throughout the experimental period, following Carpizo-Ituarte *et al.* (2002). The percentage of larvae that metamorphosed was evaluated 12 and 24 h after induction of metamorphosis in both experiments. We also determined the percentage of larvae with incomplete metamorphosis, percent survival of larvae that initiated metamorphosis, and percent survival of all larvae in both experiments. Larvae were considered to have undergone metamorphosis when there was no evidence of the larval epithelium, the postlarva moved along the bottom of the container, and the juvenile spines were visible (fig. 1a). Metamorphosis was considered incomplete when, after 12 or 24 h, the larval body was still visible and the juvenile spines were not visible in their entirety (fig. 1b). The percentage of incomplete metamorphosis (IM) was determined as follows:

$$\% \text{ IM} = \frac{\text{Number of larvae showing IM} \times 100 (\%)}{\text{Number of larvae that initiated metamorphosis}} \quad (1)$$

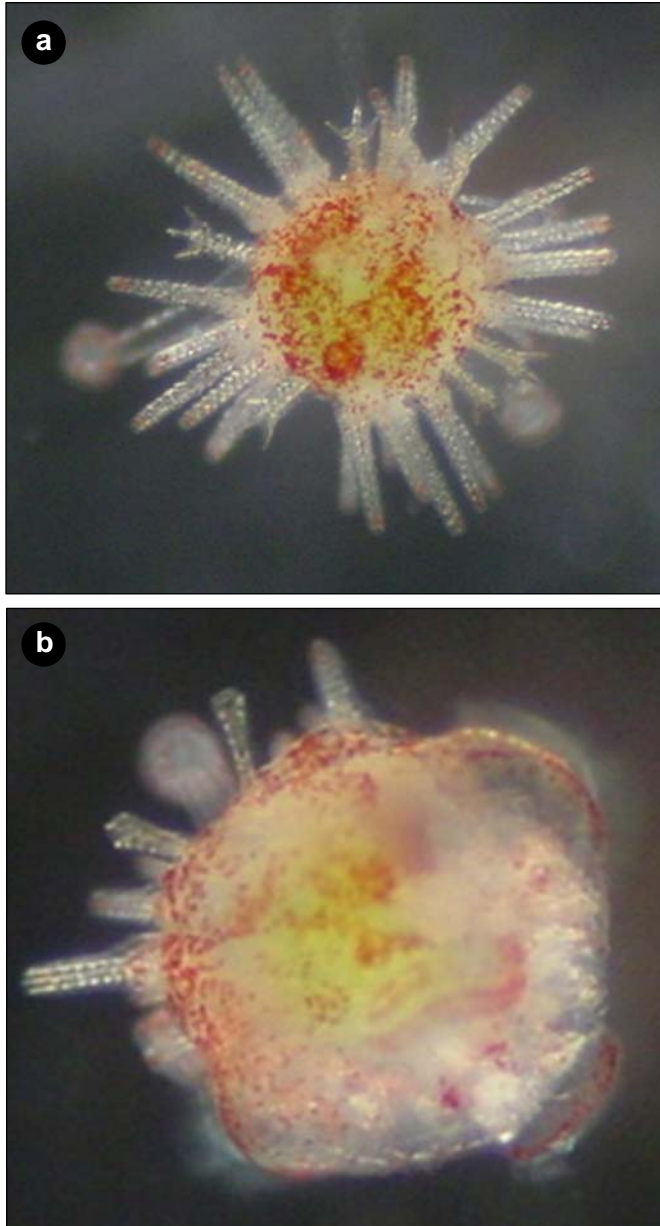
### Límite de tolerancia térmica en estadios larvarios avanzados

Las arvas precompetentes de ocho brazos y de 18 días de edad (experimento 1a) y las larvas competentes de 23 días de edad (experimento 1b) fueron expuestas a diferentes tratamientos experimentales de choque térmico (15, 19, 23, 27 y 31 °C). Los experimentos se realizaron en cajas multipozos (Falcon), con 5 mL de agua de mar filtrada (AMF) a 5 y 1  $\mu\text{m}$  e irradiada con luz ultravioleta por pozo. Se colocaron de 20 a 30 larvas precompetentes de ocho brazos y competentes por pozo en experimentos independientes. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. El tratamiento a 15 °C fue considerado como control en todos los experimentos debido a que todo el desarrollo larvario se llevó a cabo a esta temperatura. El porcentaje de supervivencia se determinó al transcurrir 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 y 24 h para las larvas precompetentes de ocho brazos (experimento 1a) y al transcurrir 1, 2, 4, 6 y 24 h para las larvas competentes (experimento 1b).

### Retraso de la metamorfosis en condiciones de estrés térmico e inducción con KCl y biopelículas

Las larvas competentes que se mantuvieron a 16 °C durante todo su desarrollo fueron sometidas a choque térmico durante 30 min en diferentes tratamientos experimentales (15, 20, 24, 28 y 32 °C) (experimento 2a). Posterior al estrés, se colocaron de 20 a 25 larvas (por pozo) en 5 mL de AMF y se les indujo a la metamorfosis mediante la adición de KCl (100 mM durante 15 min), de acuerdo con lo descrito por Carpizo-Ituarte *et al.* (2002). La solución de KCl fue sustituida por AMF después de 15 min para evitar efectos tóxicos por una exposición prolongada. Se realizaron seis réplicas por tratamiento y la temperatura se mantuvo a 16 °C ( $\pm 1$  °C) hasta el final del experimento.

En un experimento adicional (experimento 2b), las larvas competentes se aclimataron durante 30 min a 20 °C y, posteriormente, se expusieron a estrés térmico durante 30 min adicionales en diferentes tratamientos experimentales (15, 20, 24, 28 y 32 °C). Posterior al estrés, las larvas fueron puestas en contacto con biopelículas para inducir el inicio de la metamorfosis. Las biopelículas se generaron previo a la realización del experimento mediante la introducción de cajas multipozos (Falcon) durante 10 días consecutivos en acuarios con presencia de erizos morados adultos a una temperatura de 17 °C ( $\pm 3$  °C). Cada tratamiento se realizó por triplicado. Posterior al estrés térmico, los tratamientos se mantuvieron a 16 °C ( $\pm 1$  °C) hasta el final del experimento. En ambos experimentos (2a y 2b) se incluyó un control positivo, que consistió en la inducción a la metamorfosis en 20 a 30 larvas competentes por pozo con exposición a KCl (100 mM, durante 15 min); pasado el tiempo, la solución fue retirada y remplazada por 5 mL de AMF. El control positivo no fue sometido a estrés térmico y se mantuvo a una temperatura de 16 °C ( $\pm 1$  °C) durante todo el periodo experimental.



**Figure 1.** (a) Newly metamorphosed postlarva of the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. (b) Incomplete metamorphosis: this photograph corresponds to *S. franciscanus* since the characteristics at this stage of development are comparable for the purposes of this study.

**Figura 1.** (a) Postlarva recién metamorfoseada de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*. (b) Metamorfosis incompleta: esta fotografía corresponde a *S. franciscanus* ya que las características en este nivel del desarrollo resultan comparables para los propósitos del presente trabajo.

### Statistical analysis

All statistical tests were performed using SigmaStat 3.5 (SigmaPlot 11) software. Percentage data were arcsine-transformed prior to statistical analysis. The Shapiro-Wilk

También se incluyó un control negativo en donde las larvas competentes permanecieron en AMF a una temperatura de 16 °C ( $\pm 1$  °C) durante todo el periodo experimental, tal como lo describen Carpizo-Ituarte *et al.* (2002). El porcentaje de larvas metamorfoseadas se evaluó a las 12 y 24 h después de la inducción a la metamorfosis en ambos experimentos. También se evaluó el porcentaje de larvas con metamorfosis incompleta, el porcentaje de supervivencia de larvas que iniciaron la metamorfosis y el porcentaje de supervivencia de larvas totales para ambos experimentos. Las larvas se consideraron metamorfoseadas cuando ya no había evidencia del epitelio larval, la postlarva se desplazaba en el fondo del recipiente y las espinas juveniles fueron evidentes (fig. 1a). Se determinó como metamorfosis incompleta cuando, transcurridas 12 o 24 h, todavía era evidente el cuerpo larval y las espinas juveniles no estaban desplegadas en su totalidad (fig. 1b). El porcentaje de metamorfosis incompleta (MI) se determinó de la siguiente manera:

$$\% \text{ MI} = \frac{\text{Número de larvas que presentan MI} \times 100 (\%)}{\text{Número de larvas que iniciaron la metamorfosis}} \quad (1)$$

### Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el uso del software SigmaStat 3.5 (SigmaPlot 11). A los datos en porcentaje se les realizó la transformación arcoseno previo a los análisis estadísticos. Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad y la homogeneidad de varianzas. Cuando los datos no cumplían con la normalidad y/o homogeneidad de varianzas, se aplicaron pruebas no paramétricas. Para los experimentos 1a y 1b, los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de Kruskal-Wallis para cada tiempo de evaluación y se utilizó la prueba de Student-Newman-Keuls (SNK) para realizar las comparaciones múltiples entre tratamientos. Para el experimento 2a, los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de Kruskal-Wallis para cada tiempo de evaluación y se utilizó la prueba de Mann-Whitney para determinar diferencias entre los tratamientos. En el experimento 2b, los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) de una vía para cada tiempo de evaluación y se utilizó la prueba de Fisher de menor diferencia significativa (LSD) como prueba *a posteriori* para determinar diferencias entre los tratamientos. En todas la pruebas estadísticas se consideraron diferencias significativas cuando los valores de *P* fuesen menor que 0.05.

### RESULTADOS

#### Límite de tolerancia térmica en estadios larvarios avanzados

Las larvas precompetentes de ocho brazos (experimento 1a) tuvieron una supervivencia de entre el 90% y el 100% en

test was applied to test normality and homogeneity of variance. Nonparametric tests were performed when data did not comply with normality and/or homogeneity of variance. In experiments 1a and 1b, data were analyzed using a Kruskal-Wallis analysis of variance for each assessment time and the Student-Newman-Keuls (SNK) test was used for multiple comparisons among treatments. In experiment 2a, data were analyzed by a Kruskal-Wallis analysis of variance for each assessment time and the Mann-Whitney test was used to determine differences among treatments. In experiment 2b, data were analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA) for each assessment time and Fisher's least significant difference (LSD) *a posteriori* test was used to determine differences among treatments. In all tests, *P* values less than 0.05 were considered significant.

## RESULTS

### Thermal tolerance limit in advanced larval stages

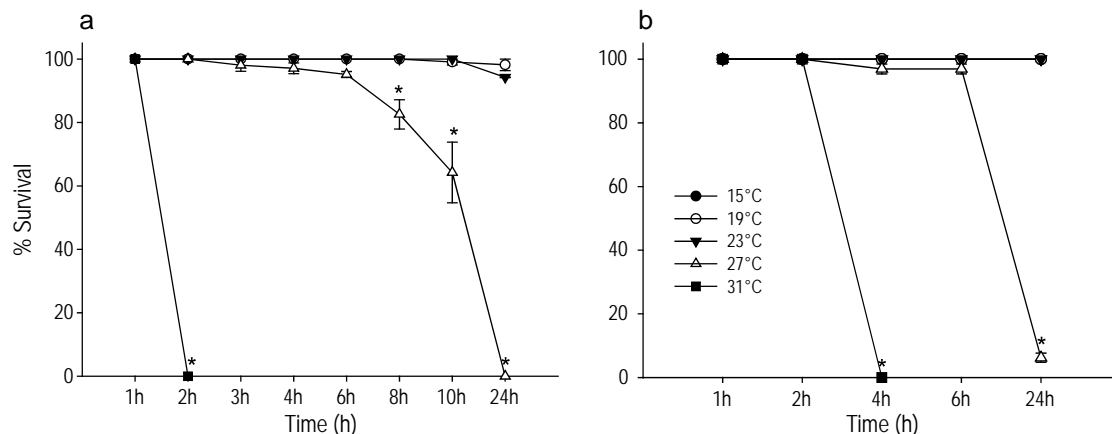
Percent survival of eight-armed precompetent larvae (experiment 1a) was between 90% and 100% in the treatments at 15, 19, and 23 °C throughout the experimental period (fig. 2a). In the treatment at 27 °C, percent survival was above 90% in the first 6 h and then decreased to 83%, 65%, and 0% after 8, 10, and 24 h, respectively. In the treatment at 31 °C, 100% mortality occurred after 2 h of initiating the experiment (fig. 2a). The results obtained in the treatments at 27 and 31 °C showed significant differences relative to the other treatments: the latter treatment was different after 2 h (Kruskal-Wallis,  $P < 0.001$ ; SNK,  $P < 0.05$ ) and the former after 8, 10, and 24 h (Kruskal-Wallis,  $P < 0.001$ ; SNK,  $P < 0.05$ ) (fig. 2a).

los tratamientos a 15, 19 y 23 °C durante todo el periodo experimental (fig. 2a). En el tratamiento a 27 °C, el porcentaje de supervivencia estuvo por encima del 90% en las primeras 6 h y posteriormente disminuyó a 83%, 65% y 0% transcurridas 8, 10 y 24 h, respectivamente. En el tratamiento a 31 °C la mortalidad fue del 100% transcurridas 2 h de haber iniciado el experimento (fig. 2a). Los resultados obtenidos en los tratamientos a 27 y 31 °C mostraron diferencias significativas con relación al resto de los tratamientos: el tratamiento a 31 °C fue diferente a las 2 h de evaluación (Kruskal-Wallis,  $P < 0.001$ ; SNK,  $P < 0.05$ ) y el tratamiento a 27 °C, a las 8, 10 y 24 h (Kruskal-Wallis,  $P < 0.001$ ; SNK,  $P < 0.05$ ) (fig. 2a).

La supervivencia de las larvas competentes (experimento 1b) fue del 100% en los tratamientos a 15, 19 y 23 °C durante todo el experimento (fig. 2b). En el tratamiento a 27 °C, la supervivencia fue entre el 90% y el 100% durante las primeras 6 h, similar a los tratamientos con temperaturas inferiores, pero se redujo a 0% a las 24 h (fig. 2b). Los resultados obtenidos en el tratamiento a 31 °C mostraron una supervivencia del 100% en las primeras 2 h y del 0% a las 4 h (fig. 2b). La respuesta obtenida en los tratamientos a 27 y 31 °C fue estadísticamente significativa en los diferentes tiempos de evaluación con respecto al resto de los tratamientos: el tratamiento a 31 °C fue diferente a las 4 h de evaluación y el tratamiento a 27 °C, a las 24 h (Kruskal-Wallis,  $P < 0.001$ ) (fig. 2b).

### Estrés térmico e inducción a la metamorfosis con KCl y bipelículas (retraso de la metamorfosis)

El efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis en *S. purpuratus* fue evaluado a las 12 y 24 h, y se



**Figure 2.** Thermal tolerance limits for advanced larval stages. (a) Eight-armed precompetent larvae and (b) competent larvae of the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* exposed to different temperature treatments (15, 19, 23, 27, and 31 °C) for 24 h. Overlapping of the symbols represents the same percentage of survival. Vertical lines indicate the standard error and asterisks indicate significant differences among treatments for that assessment time.

**Figura 2.** Límites de tolerancia térmica en estadios larvales tardíos. (a) Larvas precompetentes de ocho brazos y (b) larvas competentes de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* expuestas a diferentes tratamientos de temperatura (15, 19, 23, 27 y 31 °C) durante 24 h. El traslape de los símbolos representa el mismo porcentaje de supervivencia. Las líneas verticales indican el error estándar y los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos para ese tiempo de evaluación.

Percent survival of competent larvae (experiment 1b) was 100% in the treatments at 15, 19, and 23 °C throughout the experiment (fig. 2b). At 27 °C, percent survival was between 90% and 100% in the first 6 h, similar to the lower temperature treatments, but fell to 0% after 24 h (fig. 2b). In the treatment at 31 °C, percent survival was 100% in the first 2 h and 0% after 4 h (fig. 2b). The response obtained in the treatments at 27 and 31 °C was statistically significant at the different assessment times from the other treatments, the latter being different after 4 h and the former after 24 h (Kruskal-Wallis,  $P < 0.001$ ) (fig. 2b).

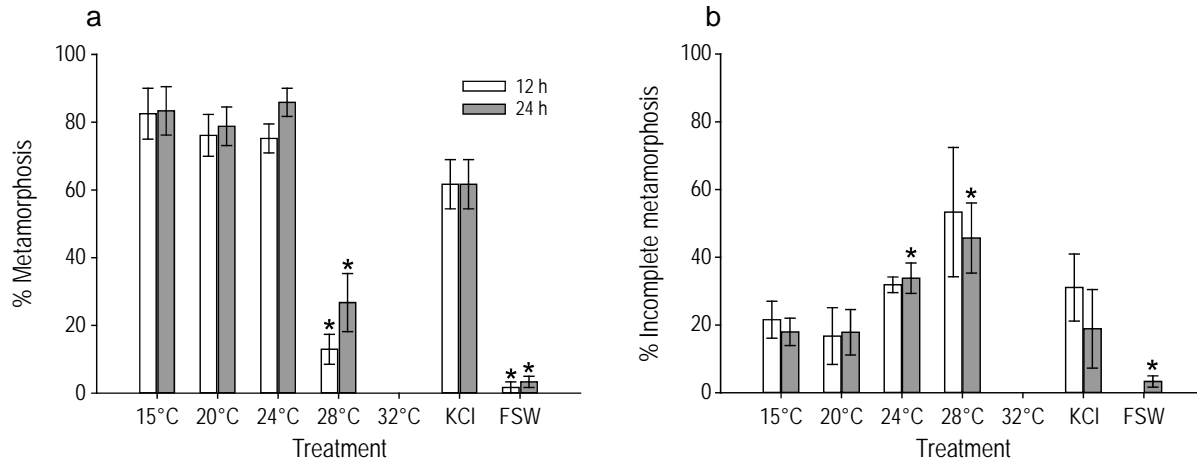
### Thermal stress and induction of metamorphosis with KCl and biofilms (delay of metamorphosis)

The effect of thermal stress on the onset of metamorphosis in *S. purpuratus* was assessed after 12 and 24 h, and statistical differences were found between treatments at the different assessment times (Kruskal-Wallis,  $P < 0.05$ ) (experiment 2a). The percentage of larval metamorphosis in the treatments at 15, 20, and 24 °C was similar after 12 and 24 h (between 75% and 85%, respectively); hence, there were no significant differences between these treatments or in relation to the positive control using KCl (62% metamorphosis) (Mann-Whitney,  $P > 0.05$ ) (fig. 3a). Percent metamorphosis for larvae exposed to 28 °C was less than 25% after 24 h and was significantly different from the other treatments except the negative control (Mann-Whitney,  $P < 0.05$ ) (fig. 3a). Metamorphosis was not observed in the treatment at 32 °C. No significant differences in the percentage of larvae that underwent incomplete metamorphosis were found between treatments after 12 h (Kruskal-Wallis,  $P > 0.05$ ), but differences were observed after 24 h (Kruskal-Wallis,  $P < 0.05$ ). The number of larvae with incomplete metamorphosis tended to increase at higher temperatures (fig. 3b). Percent survival of larvae that initiated metamorphosis in the treatments using 15, 20, 24 °C, and KCl was 100% at the end of the experiment, while in the treatment at 28 °C it was 80%. Total larval survival (metamorphosed and not metamorphosed) was between 94% and 100% in all treatments, except in that of 32 °C, where it was 50% at 12 h and 0% at 24 h.

When larvae were acclimatized for 30 min at 20 °C, prior to exposure to different experimental temperatures and induction of metamorphosis in the presence of biofilms (experiment 2b), significant differences were found between treatments after 12 and 24 h (one-way ANOVA,  $P < 0.05$ ). The percentage of larval metamorphosis in the treatments at 15, 20, and 24 °C after 12 and 24 h was between 66% and 80% (fig. 4a), and no significant differences were observed relative to the positive control (KCl) (79% metamorphosis) (LSD,  $P > 0.05$ ). Percent metamorphosis for larvae exposed to 28 °C was 35% and 50% after 12 and 24 h, respectively, and was significantly different from the other treatments at both assessment times (LSD,  $P < 0.05$ ). Metamorphosed larvae were not observed in the treatment at 32 °C (fig. 4a).

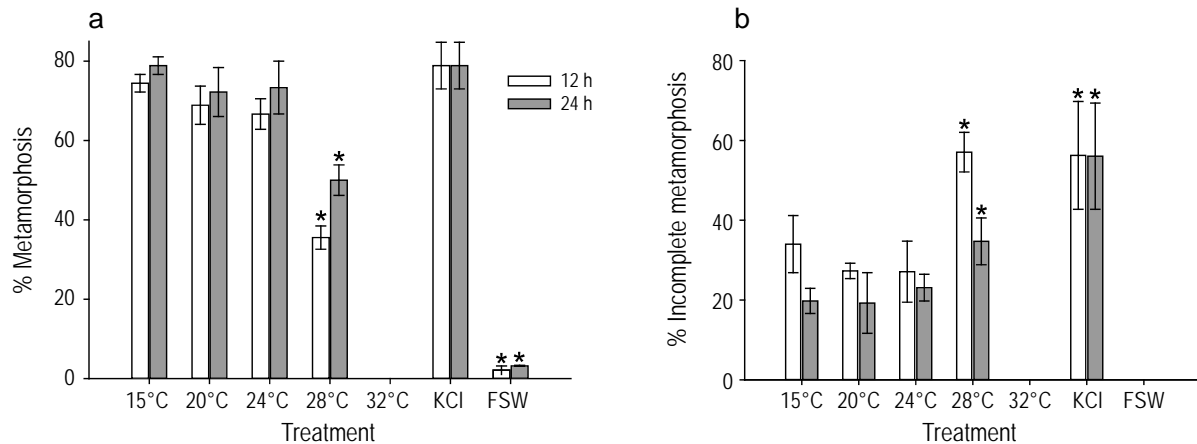
encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos en los diferentes tiempos de evaluación (Kruskal-Wallis,  $P < 0.05$ ) (experimento 2a). El porcentaje de larvas con metamorfosis que se observó para los tratamientos a 15, 20 y 24 °C fue similar a las 12 y 24 h (del 75% al 85%, respectivamente); por lo tanto, no se encontraron diferencias significativas entre estos tratamientos ni en relación con el control positivo de KCl (62% de larvas metamorfoseadas) (Mann-Whitney,  $P > 0.05$ ) (fig. 3a). Para el tratamiento a 28 °C, este porcentaje fue menor que 25% a las 24 h y fue significativamente diferente al resto de los tratamientos, a excepción del control negativo (Mann-Whitney,  $P < 0.05$ ) (fig. 3a). En el tratamiento de 32 °C no se observó metamorfosis. Para el porcentaje de larvas con metamorfosis incompleta, no se encontró que existieran diferencias significativas entre los tratamientos a las 12 h de evaluación (Kruskal-Wallis,  $P > 0.05$ ), pero sí se observaron diferencias a las 24 h (Kruskal-Wallis,  $P < 0.05$ ). El número de larvas con metamorfosis incompleta tendió a incrementar a mayor temperatura (fig. 3b). El porcentaje de supervivencia de las larvas que iniciaron la metamorfosis en los tratamientos a 15, 20, 24 °C y KCl fue del 100% al final del experimento, mientras que en el tratamiento a 28 °C fue del 80%. El porcentaje de supervivencia de larvas totales (metamorfoseadas y no metamorfoseadas) osciló entre el 94% y el 100% para todos los tratamientos, excepto en el tratamiento a 32 °C, donde fue del 50% a las 12 h y del 0% a las 24 h.

Cuando las larvas se aclimataron durante 30 min a 20 °C, previo a ser expuestas a los diferentes tratamientos experimentales de temperatura e inducidas a la metamorfosis con biopelículas (experimento 2b), se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a las 12 y 24 h de evaluación (ANOVA de una vía,  $P < 0.05$ ). El porcentaje de larvas metamorfoseadas observado en los tratamientos a 15, 20 y 24 °C a las 12 y 24 h fue entre el 66% y el 80% (fig. 4a), y no se observaron diferencias significativas con relación al control positivo (KCl) (79% de metamorfosis) (LSD,  $P > 0.05$ ). Para el tratamiento a 28 °C, el porcentaje de larvas con metamorfosis fue del 35% y 50% a las 12 y 24 h, respectivamente, y fue significativamente diferente al resto de los tratamientos en ambos tiempos evaluados (LSD,  $P < 0.05$ ). No se observaron larvas metamorfoseadas en el tratamiento a 32 °C (fig. 4a). El porcentaje de larvas que presentaron metamorfosis incompleta mostró diferencias significativas entre los tratamientos a las 12 y 24 h de evaluación (ANOVA de una vía,  $P < 0.05$ ). Para los tratamientos a 28 °C y con KCl, el porcentaje de metamorfosis incompleta varió entre el 35% y el 56%, y fue significativamente diferente al resto de los tratamientos (LSD,  $P < 0.05$ ) (fig. 4b). Se observó un mayor número de larvas con metamorfosis incompleta a mayor temperatura, similar a lo observado en el experimento 2a. El porcentaje de supervivencia de las larvas que iniciaron la metamorfosis en los tratamientos a 15, 20, 24 y 28 °C varió entre el 70% y el 80% a las 24 h. La supervivencia de larvas totales fue entre el 63% y el 99% al final del experimento en



**Figure 3.** Effect of thermal stress (heat shock) on the onset of metamorphosis. **(a)** Percent metamorphosis and **(b)** percent incomplete metamorphosis for competent larvae of the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* previously exposed to different heat shock treatments (15, 20, 24, 28, and 32 °C) for 30 min and induced to metamorphose in the presence of 100 mM KCl for 15 min. A positive control (KCl) and a negative control (filtered seawater, FSW) were included. Percent metamorphosis was assessed after 12 and 24 h. Vertical lines indicate the standard error and asterisks indicate significant differences between treatments for that assessment time.

**Figura 3.** Efecto del estrés térmico (choque térmico) en el inicio de la metamorfosis. **(a)** Porcentaje de metamorfosis y **(b)** porcentaje de metamorfosis incompleta para larvas competentes de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*, previamente sometidas a choque térmico a diferentes temperaturas (15, 20, 24, 28 y 32 °C) durante 30 min e inducidas a la metamorfosis con KCl (100 mM) durante 15 min. Se incluyó un control positivo (KCl) y un control negativo (agua de mar filtrada, FSW). La evaluación del porcentaje de larvas metamorfoseadas fue a las 12 y 24 h. Las líneas verticales indican el error estándar y los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos para cada tiempo de evaluación.



**Figure 4.** Effect of thermal stress on the onset of metamorphosis in competent larvae of the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* acclimatized for 30 min at 20 °C. **(a)** Percent metamorphosis and **(b)** percentage of larvae undergoing incomplete metamorphosis exposed to different heat shock treatments (15, 20, 24, 28, and 32 °C) for 30 min and induced to metamorphose in the presence of 10-day biofilms. A positive control (KCl) and a negative control (filtered seawater, FSW) were included. Percent metamorphosis was assessed after 12 and 24 h. Vertical lines indicate the standard error and asterisks indicate significant differences between treatments for that assessment time.

**Figura 4.** Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis en larvas competentes de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* aclimatizadas a 20 °C durante 30 min. **(a)** Porcentaje de larvas metamorfoseadas y **(b)** porcentaje de larvas con metamorfosis incompleta sometidas a choque térmico a diferentes temperaturas (15, 20, 24, 28 y 32 °C) durante 30 min e inducidas a la metamorfosis con biopelículas de 10 días de formación. Se incluyó un control positivo (KCl) y un control negativo (agua de mar filtrada, FSW). La evaluación del porcentaje de larvas metamorfoseadas fue a las 12 y 24 h después de la inducción. Las líneas verticales indican el error estándar y los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos para cada tiempo de evaluación.



Significant differences in the percentage of larvae that underwent incomplete metamorphosis were observed between treatments after 12 and 24 h (one-way ANOVA,  $P < 0.05$ ). In the treatments using 28 °C and KCl, the percentage of larvae with incomplete metamorphosis ranged from 35% to 56%, and was significantly different relative to the other treatments (LSD,  $P < 0.05$ ) (fig. 4b). The higher the temperature, the higher the number of larvae that underwent incomplete metamorphosis, similar to that observed in experiment 2a. Percent survival of larvae that initiated metamorphosis in the treatments at 15, 20, 24, and 28 °C was between 70% and 80% after 24 h. Total larval survival was between 63% and 99% at the end of the experiment in all treatments, except in that of 32 °C, where all larvae were dead after 12 h. In the treatment using KCl, larval survival was 82% and 26% at 12 and 24 h, respectively.

## DISCUSSION

Our findings show that eight-armed precompetent larvae and competent larvae (experiments 1a and 1b) of the purple sea urchin *S. purpuratus* possess high thermal tolerance for a short period of time (24 h). They are thus capable of withstanding significant temperature changes, higher than those found in the subtidal zone of both sampling sites (16–20 °C), as well as temperature increases in climate change scenarios that predict an increase in sea surface temperature of 4 °C over the next 90 years (Brennand *et al.* 2010). Extreme heat conditions are possible in the rocky intertidal zone at low tide (Helmuth 2002, Helmuth *et al.* 2006). At Punta Baja, we have recorded temperatures of about 25 °C and, on occasion, extreme temperatures of 30 °C. Hence, larvae may experience extreme temperatures in the intertidal zone, which can exceed their maximum thermal tolerance, jeopardizing the onset of metamorphosis and their survival.

Studies on *Heliocidaris erythrogramma* and *S. purpuratus* have documented their high thermal tolerance during the fertilization process and early larval development (Farmamfarmaian and Giese 1963, Byrne *et al.* 2009). Hammond and Hofmann (2010) determined that thermal stress tolerance in two *S. purpuratus* early life stages (gastrula and four-armed pluteus) was similar, recording 100% mortality after 1 h of exposure to 32 °C and a very similar expression profile of heat shock proteins for both stages of development. They mention that this species likely has a universal temperature tolerance during larval development as a mechanism for survival in the planktonic stage. Our results for *S. purpuratus* late larval stages (eight-armed pluteus and competent) revealed a similar thermal tolerance as that reported by Hammond and Hofmann (2010) for early life stages. We observed 100% mortality of eight-armed precompetent larvae and of competent larvae after 2 and 4 h, respectively, of exposure to 31 °C. It is therefore possible that *S. purpuratus* has a similar thermal tolerance throughout larval

todos los tratamientos, excepto el tratamiento a 32 °C, donde todas las larvas estaban muertas a las 12 h de evaluación. En el tratamiento de KCl se observó una supervivencia del 82% y el 26% a las 12 y 24 h, respectivamente.

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio mostraron que las larvas precompetentes de ocho brazos y las larvas competentes (experimentos 1a y 1b) de erizo morado *S. purpuratus* tienen una termotolerancia alta en periodos de tiempo cortos (24 h). Por lo tanto, estas larvas son capaces de soportar cambios de temperatura significativos, superiores a los encontrados en el submareal en ambas localidades de muestreo (16–20 °C), así como el incremento de temperatura en escenarios de cambio climático en donde se pronostica un incremento de la temperatura superficial del mar de 4 °C en los próximos 90 años (Brennand *et al.* 2010). En la zona del intermareal rocoso se pueden llegar a presentar temperaturas extremas en condiciones de marea baja (Helmuth 2002, Helmuth *et al.* 2006). Para el sitio de muestreo en Punta Baja, hemos registrado temperaturas de alrededor de 25 °C y, en algunos casos, temperaturas extremas de 30 °C. De esta manera, es posible que las larvas puedan llegar a experimentar temperaturas extremas en la zona intermareal, las cuales pueden llegar a superar su máximo de tolerancia termal y, consecuentemente, comprometer el inicio de la metamorfosis y su supervivencia. Algunos estudios sobre *S. purpuratus* y *Heliocidaris erythrogramma* han documentado esta termotolerancia alta durante el proceso de fertilización y el desarrollo larvario temprano (Farmamfarmaian y Giese 1963, Byrne *et al.* 2009). Hammond y Hofmann (2010) determinaron que la tolerancia al estrés térmico en dos estadios de desarrollo temprano (gástrula y larva pluteus de cuatro brazos) fue de manera similar: registraron una mortalidad del 100% con 1 h de exposición a 32 °C y un perfil de expresión de proteínas de choque térmico muy similar para ambos estadios de desarrollo. Estos autores mencionan que es probable que exista una tolerancia de temperatura universal durante el desarrollo larvario en esta especie, como un mecanismo para su supervivencia en su etapa planctónica. Nuestros resultados para los estadios tardíos (pluteus de ocho brazos y competente) de *S. purpuratus* mostraron una termotolerancia muy similar a lo reportado por Hammond y Hofmann (2010) para estadios tempranos. En el presente estudio se observó una mortalidad del 100% en larvas pluteus de ocho brazos y larvas competentes después de 2 y 4 h, respectivamente, de exposición a 31 °C. Por lo tanto, es posible que *S. purpuratus* presente una tolerancia de temperatura similar a lo largo de su desarrollo larvario, con un incremento de la termotolerancia en el estadio competente, el cual le permita llevar a cabo el asentamiento y la metamorfosis con éxito.

En cuanto al retraso de la metamorfosis por efectos de estrés térmico, los resultados mostraron que a medida que se incrementa la temperatura se retrasa la metamorfosis

development, with an increase in thermal tolerance during the competent stage, allowing the larvae to settle and undergo successful metamorphosis.

Regarding the delay of metamorphosis due to the effect of thermal stress, our results showed that metamorphosis is delayed as temperature increases (experiments 2a and 2b). This has also been documented by Chen and Chen (1992) for *Arachnoides placenta*. They found that the percentage of metamorphosed larvae was <40% at a temperature of 28 °C and <10% at 34 °C. For *S. purpuratus*, we recorded the lowest percentage of larval metamorphosis at 28 °C (20–40%), and when larvae were exposed to 31 °C for 30 min, it was 0%. The latter occurred despite inducing the larvae to metamorphose using KCl as an artificial inducer. The use of KCl has proven quite effective in inducing metamorphosis in several marine invertebrates, including the purple sea urchin (Carpizo-Ituarte *et al.* 2002). The percentage of larval metamorphosis obtained using biofilms to induce metamorphosis was similar to that found with KCl. A similar pattern was observed in both experiments: percent metamorphosis decreased as the temperature increased. This suggests that despite using different inducers of metamorphosis (natural and artificial), larvae delay the onset of metamorphosis if they are thermally stressed. This delay of metamorphosis in turn suggests that under conditions of thermal stress, a response is produced at the cellular level on the metamorphic signal transduction pathways and/or regulation of gene expression, which prevents larvae from initiating metamorphosis, probably as a survival mechanism. The differences in larval survival found in experiments 2a and 2b are probably due to variability among the cohorts of larvae used in both trials.

In general, our findings show that the temperature threshold at which larvae are able to initiate and successfully complete metamorphosis is below 28 °C. The ecological consequences of the delay of metamorphosis have been documented for some marine invertebrates (see Pechenick 1990, 2006). It is possible that under conditions of thermal stress, the selection of favourable settlement substrates by larvae is altered and, therefore, metamorphosis does not occur at suitable sites. This results in the prolongation of larval life, as has been reported previously (Gebauer *et al.* 2003, Toonen and Tyre 2007). Moreover, it is possible that larval survival at the moment of metamorphosis can be directly affected during extreme temperature events, especially in the intertidal zone, where we have registered temperatures above 27 °C off Punta Baja. Studies addressing thermal tolerance limits of species that inhabit an ecosystem, as well as their ability to adjust to increases in temperature are necessary to understand how organisms may be affected by variations in ocean temperature (Somero 2002, Pörtner 2008, Visser 2008), and are of particular interest in view of the current status of global climate change.

(experimentos 2a y 2b). Esto mismo fue observado por Chen y Chen (1992) para la galleta de mar *Arachnoides placenta*. Estos autores mostraron que el porcentaje de larvas metamorfoseadas disminuyó a niveles inferiores al 40% a una temperatura de 28 °C e inferiores al 10% a 34 °C. Para *S. purpuratus*, en el presente trabajo, el menor porcentaje de larvas metamorfoseadas se observó a 28 °C (entre el 20% y el 40%) y, cuando las larvas fueron mantenidas a 31 °C durante 30 min, se redujo a cero. Lo anterior ocurrió a pesar de inducir a las larvas a metamorfosearse utilizando KCl como un inductor artificial. La inducción con KCl usualmente resulta muy eficaz para inducir la metamorfosis en una gran variedad de larvas de invertebrados marinos, incluido el erizo morado (Carpizo-Ituarte *et al.* 2002). Por otro lado, el porcentaje de larvas metamorfoseadas observado con biopelículas como inductores de la metamorfosis fue similar a lo encontrado con KCl. Se observó un patrón similar en ambos experimentos: el porcentaje de larvas con metamorfosis disminuyó a medida que se incrementó la temperatura. Lo anterior sugiere que a pesar de utilizar diferentes inductores (naturales o artificiales) para estimular el inicio de la metamorfosis, las larvas retrasan el inicio de la metamorfosis si se encuentran térmicamente estresadas. Este retraso en la metamorfosis, a su vez, sugiere que en condiciones de estrés térmico se produce una respuesta a nivel celular en las rutas de transducción metamórfica y/o regulación de la expresión génica, que previene que las larvas inicien la metamorfosis, probablemente como un mecanismo de supervivencia. Por otro lado, las diferencias encontradas en la supervivencia larval en los experimentos 2a y 2b probablemente se deban a la variabilidad entre las cohortes de larvas utilizadas en ambos experimentos.

En general, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que el umbral de temperatura en la cual las larvas tienen la capacidad de iniciar y terminar con éxito la metamorfosis se encuentra por debajo de los 28 °C. Las consecuencias ecológicas del retraso de la metamorfosis han sido documentadas para algunos invertebrados marinos (ver Pechenick 1990, 2006). Es posible que, en condiciones de estrés térmico, la selección de los sustratos favorables para el asentamiento y la metamorfosis por parte de las larvas se vea alterada y, por lo tanto, tenga como consecuencia que no metamorfoseen en los sitios adecuados. Lo anterior las obligaría a prolongar su vida larval en busca de los sustratos adecuados, tal como lo han reportado diversos autores (Gebauer *et al.* 2003, Toonen y Tyre 2007). Además, es posible que la supervivencia de las larvas en el momento de la metamorfosis pueda verse afectada de manera directa durante eventos de temperaturas extremas, particularmente en el intermareal, donde hemos registrado temperaturas superiores a los 27 °C en la localidad de Punta Baja. Los estudios encaminados a documentar los límites de tolerancia térmica de las especies que habitan un ecosistema, así como su capacidad de ajustarse a incrementos de temperatura, serán necesarios para entender cómo los organismos podrían ser afectados por las

## CONCLUSIONS

The results reported herein indicate that larvae of the purple sea urchin *S. purpuratus* in advanced stages of development have a high thermal tolerance; however, larval exposure to temperatures of about 28 °C for short periods of time (30 min) can affect the onset of metamorphosis. Moreover, larval metamorphosis is delayed as temperature increases, which could have implications for the distribution of this species, since it seems to be particularly sensitive to higher temperatures at the moment of leaving the water column to select a benthic substrate. Periods of thermal stress associated with sites for metamorphosis in the rocky intertidal may result in a decrease in the number of recruits and will consequently affect the population dynamics of the purple sea urchin at these locations. The latter is probably more relevant in the southern part of its geographic distribution (Baja California Peninsula), where sea surface temperature will likely increase in climate change scenarios.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was financed by the Mexican Council for Science and Technology (CONACYT grant No. 47658) and by the Autonomous University of Baja California (IIO-UABC internal project No. 533 to ECI). The first author acknowledges receipt of a PhD scholarship from CONACYT (No. 207382). The authors thank the staff at the Laboratory for Developmental Biology and Ecology of the Institute of Oceanological Research (UABC) for their help and valuable comments. Special thanks to E Valenzuela and F Núñez-Cebrero for providing the microalga *Rhodomonas* sp. used as larval feed.

English translation by Christine Harris.

## REFERENCIAS

- Bassim KM, Sammarco PW. 2003. Effects of temperature and ammonium on larval development and survivorship in an scleractinian coral (*Diploria strigosa*). *Mar. Biol.* 142: 241–252.
- Brennand HS, Soars N, Dworjanyn SA, Davis AR, Byrne M. 2010. Impact of ocean warming and ocean acidification on larval development and calcification in the sea urchin *Tripneustes gratilla*. *PLoS ONE* 5: 1–7.
- Byrne M, Ho M, Selvakumaraswamy P, Nguyen HD, Dworjanyn SA, Davis AR. 2009. Temperature, but not pH, compromises sea urchin fertilization and early development under near-future climate change scenarios. *Proc. R. Soc. B* 276: 1883–1888.
- Carpizo-Ituarte E, Salas-Garza A, Parés-Sierra G. 2002. Induction of metamorphosis with KCl in three species of sea urchins and its implications in the production of juveniles. *Cienc. Mar.* 28: 157–166.
- Chen CP, Chen BY. 1992. Effects of high temperature on larval development and metamorphosis of *Arachnoides placenta* (Echinodermata: Echinoidea). *Mar. Biol.* 112: 445–449.
- Chiu JMY, Thiyagarajan V, Pechenick JA, Hung OS, Qian PY. 2007. Influence of bacteria and diatoms in biofilms on metamorphosis of the marine slipper limpet *Crepidula onyx*. *Mar. Biol.* 151: 1417–1431.
- Díaz-Pérez L. 2006. Inducción a la metamorfosis en larvas del erizo blanco *Lytechinus pictus* (Verrill 1867), mediante biopelículas y caracterización bioquímica de las cepas aisladas. M.Sc. thesis, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Mexico, 95 pp.
- Dove MC, O'Connor WA. 2007. Salinity and temperature tolerance of Sydney rock oysters *Saccostrea glomerata* during early ontogeny. *J. Shellfish Res.* 26: 939–947.
- Elkin C, Marshall DJ. 2007. Desperate larvae: Influence of deferred cost and habitat requirements on habitat selection. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 335: 143–153.
- variaciones de temperatura en el océano (Somero 2002, Pörtner 2008, Visser 2008), y resultan de particular interés en las condiciones actuales del cambio climático global.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación indican que las larvas de erizo morado *S. purpuratus* en estadios de desarrollo avanzados tienen una alta termotolerancia; sin embargo, la exposición de las larvas a temperaturas alrededor de 28 °C por periodos de tiempo cortos (30 min) puede comprometer el inicio de la metamorfosis. Asimismo, la metamorfosis en las larvas se retrasa a medida que incrementa la temperatura, lo que pudiera tener implicaciones en la distribución de esta especie, ya que parece ser particularmente sensible a las temperaturas altas en el momento de transición de la columna de agua a la elección de un sustrato en el bentos. Los periodos de estrés térmico asociados a sitios de metamorfosis en el intermareal rocoso pueden tener como consecuencia una disminución en el número de reclutas y, por ende, en la dinámica poblacional del erizo morado en estos sitios. Lo anterior podría ser más relevante en la parte sur de su distribución (península de Baja California), en donde es posible que la temperatura superficial del océano se incrementa en escenarios de cambio climático.

## AGRADECIMIENTOS

La presente investigación contó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, No. 47658) y de la Universidad Autónoma de Baja California (proyecto interno IIO-UABC No. 533 a cargo de ECI). El primer autor contó con el apoyo de la beca CONACYT (No. 207382) para sus estudios de doctorado. Los autores agradecen también a todos los miembros del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Oceanológicas su ayuda y valiosos comentarios durante la realización de este trabajo. Un agradecimiento especial a E Valenzuela y F Núñez-Cebrero por proporcionar la microalga *Rhodomonas* sp. para alimentar las larvas de erizo.

- Farmanfarmanian A, Giese AC. 1963. Thermal tolerance and acclimation in the western purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Physiol. Zool.* 36: 237–343.
- Gebauer P, Paschke K, Anger K. 2003. Delayed metamorphosis in decapod crustaceans: Evidence and consequences. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 76: 169–175.
- Hadfield MG. 2011. Biofilms and marine invertebrate larvae: What bacteria produce that larvae use to choose settlement sites. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 3: 453–470.
- Hammond LM, Hofmann GE. 2010. Thermal tolerance of *Strongylocentrotus purpuratus* early life history stages: Mortality, stress-induced gene expression and biogeographic patterns. *Mar. Biol.* 157: 2677–2687.
- Helmuth B. 2002. How do we measure the environment? Linking intertidal thermal physiology and ecology through biophysics. *Integr. Comp. Biol.* 42: 837–845.
- Helmuth B, Broitman BR, Blanchette CA, Gilman S, Halpin P, Harley CDG, O'Donell MJ, Hofmann GE, Menge B, Strickland D. 2006. Mosaic patterns of thermal stress in the rocky intertidal zone: Implications for climate change. *Ecol. Monogr.* 76: 461–479.
- Johnson LG, Babcock RC. 1994. Temperature and the larval ecology of the crown-of-thorns starfish, *Acanthaster planci*. *Biol. Bull.* 187: 304–308.
- Kuo ESL, Sanford E. 2009. Geographic variation in the upper thermal limits of an intertidal snail: Implications for climate envelope models. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 388: 137–146.
- Lau SCK, Qian PY. 2001. Larval settlement in the serpulid polychaete *Hydroides elegans*, in response to bacterial biofilms: An investigation of the nature of putative larval settlement cue. *Mar. Biol.* 138: 321–328.
- McClatchie S, Goericke R, Koslow JA, Schwing FB, Bograd SJ, Charter R, Watson W, Lo N, Hill K, Gottschalck J, L'Heureux M, Xue Y, Peterson WT, Emmett R, Collins C, Gaxiola-Castro G, Durazo R, Kahru M, Mitchell BG, Hyrenbach KD, Sydeman WJ, Bradley RW, Warzybok P, Bjorkstedt E. 2008. The state of the California Current, 2007–2008: La Niña conditions and their effects on the ecosystem. *CalCOFI Rep.* 49: 39–76.
- O'Connor WA, Lawler NF. 2004. Salinity and temperature tolerance of embryos and juveniles of the pearl oyster, *Pinctada imbricata* Röding. *Aquaculture* 229: 493–506.
- 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. *PNAS* 104: 1266–1271.
- Osovitz CJ, Hofmann GE. 2005. Thermal history-dependent expression of the *hsp70* gene in purple sea urchins: Biogeographic patterns and the effect of temperature acclimation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 327: 134–143.
- Palleiro-Nayar JS, Salgado-Rogel ML, Aguilar-Montero D. 2008. La pesca de erizo morado, *Strongylocentrotus purpuratus*, y su incremento poblacional en Baja California, México. *Cienc. Pesq.* 16: 29–35.
- Parker LM, Ross PM, O'Connor WA. 2009. The effect of ocean acidification and temperature on the fertilization and embryonic development of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould 1850). *Global Change Biol.* 15: 2123–2136.
- Pechenick JA. 1990. Delayed metamorphosis by larvae of benthic marine invertebrates. Does it occur? Is there a price to pay? *Ophelia* 32: 63–94.
- Pechenick JA. 2006. Larval experience and latent effects: Metamorphosis is not a new beginning. *Integr. Comp. Biol.* 46: 323–333.
- Pörtner HO. 2008. Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: A physiologist's view. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 373: 203–217.
- Putnam HM, Edmunds PJ, Fan TY. 2008. Effect of temperature on settlement choice and photophysiology of larvae from the reef coral *Stylophora pistillata*. *Biol. Bull.* 215: 135–142.
- Rahman S, Tsuchiya M, Uehara T. 2009. Effects of temperature on hatching rate, embryonic development and early larval survival of the edible sea urchin, *Tripneustes gratilla*. *Biologia* 64: 768–775.
- Randall CJ, Szmant AM. 2009. Elevated temperature reduced survivorship and settlement of the larvae of the Caribbean scleritian coral, *Flavia fragum* (Esper). *Coral Reefs* 28: 537–545.
- Rosas J, Velásquez A, Fernández S, Mata E, Cabrera T. 2009. Desarrollo larvario y supervivencia hasta la metamorfosis del erizo *Tripneustes ventricosus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea) alimentado con microalgas a dos temperaturas. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 44: 387–396.
- Saunders MI, Metaxas A. 2009. Effects of temperature, size and food on the growth of *Membranipora membranacea* in laboratory and field studies. *Mar. Biol.* 156: 2267–2276.
- Smith MM, Cruz-Smith L, Cameron RA, Urry LA. 2008. The larval stages of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *J. Morphol.* 269: 713–733.
- Somero GM. 2002. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: Optima, limits, and cost of living. *Integr. Comp. Biol.* 42: 780–789.
- Strathmann MF. 1987. Phylum Echinodermata: Class Echinoidea. In: Strathmann MF (ed.), *Reproduction and Development of Marine Invertebrates of the Northern Pacific Coast*. University of Washington Press, Seattle, pp. 511–534.
- Toonen RJ, Tyre AJ. 2007. If larvae were smart: A simple model for optimal settlement behavior of competent larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 349: 43–46.
- Visser ME. 2008. Keeping up with a warming world; assessing the rate of adaptation to climate change. *Proc. R. Soc. B* 275: 649–659.

Received November 2010;  
accepted May 2011.