

TESIS DOCTORAL

ADRIANA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

2015

**Efecto de la acidificación del océano en
la alimentación, crecimiento y
depredación de las fases tempranas de
los erizos de mar *Paracentrotus lividus*
y *Diadema africanum***

Los Doctores en Biología, D. José Carlos Hernández Pérez, Dña. Sabrina Clemente Martín y D. Alberto Brito Hernández,

CERTIFICAN

Que la tesis doctoral titulada “Efectos de la acidificación del océano en la alimentación, crecimiento y depredación de las fases tempranas de los erizos de mar *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum*”, presentada por la licenciada Dña. Adriana Rodríguez Hernández, ha sido realizada bajo su dirección en la UDI de Ciencias Marinas del Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología de la Universidad de La Laguna y le otorgan un informe favorable para su lectura.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente en La Laguna a 9 de marzo de dos mil quince.

Fdo: Dr. José Carlos Hernández Pérez

Fdo: Dra. Sabrina Clemente Martín

Fdo: Dr. Alberto Brito Hernández

**A mis padres (Meme y Marce)
y a los chicos de mi vida
(Saulo y Óscar)**

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	13
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	19
SECCIÓN I. Alimentación de juveniles de erizos de mar y efecto de la acidificación.....	43
CAPÍTULO 1. Juvenile sea urchins algae consumptions depends on multiple algae traits.....	45
CAPÍTULO 2. Efecto de la acidificación del océano sobre las tasas de herbivoría de los erizos de mar: <i>Paracentrotus lividus</i> y <i>Diadema africanum</i>	79
SECCIÓN II. Crecimiento de juveniles de erizos de mar y efecto de la acidificación.....	119
CAPÍTULO3. Efficiencyoncalceintaggingonjuvenilesofthesea urchins <i>Diadema africanum</i> and <i>Paracentrotus lividus</i>	121

CAPÍTULO 4. Crecimiento de juveniles de dos especies de erizos de las islas Canarias.....	137
CAPÍTULO 5. Efecto de la acidificación del océano sobre el crecimiento de juveniles de los erizos <i>Paracentrotus lividus</i> y <i>Diadema africanum</i>	165
SECCIÓN III. Depredación de juveniles de erizos de mar y efecto de la acidificación.....	119
CAPÍTULO 6. Depredación sobre juveniles de erizos de mar: <i>Paracentrotus lividus</i> y <i>Diadema africanum</i>	191
CAPÍTULO 7. The effects of ocean acidification on predation of <i>Paracentrotus lividus</i> y <i>Diadema africanum</i> in urchin barrens off the Canary Islands.....	223
CONCLUSIONES	253

Agradecimientos



AGRADECIMIENTOS

Desde hace tiempo que pienso en los agradecimientos de esta tesis, pues han sido multitud de personas que bien directamente o indirectamente han contribuido a que este trabajo esté aquí o han influido en mi carrera investigadora. En numerosas ocasiones he estado a punto de comenzar a escribir, pero ha sido ahora, al final de toda la redacción, cuando he elegido el momento para hacerlo. Pues como todos saben, un buen postre siempre se hace esperar...

En primer lugar quiero agradecerles a mis padres, Meme y Marce, el saber transmitirme su amor por el mar, espero que yo sepa hacerlo tan bien como ustedes con Saulo. Mamá, papá, gracias por ese apoyo incondicional que recibo continuamente y por enseñarme a que uno puede conseguir lo que quiera si se lo propone. A mi hermana, Alejandra, porque es la mejor hermana y compañera de buceo que puedo tener, que tras salir de una larga inmersión en pleno invierno con las piernas dormidas, siempre está con su gran sonrisa cuando le dices que hay que hacer otra. Gracias Ale, sin ti, esto hubiera sido mucho más difícil, te lo aseguro. La vida es más fácil, gracias a ustedes.

14

En segundo lugar, quiero agradecerles a mis directores José Carlos Hernández, Sabrina Clemente y Alberto Brito, el haber compartido esta experiencia conmigo y por haberme hecho quedar con tan buen sabor de boca. Espero que el sentimiento sea mutuo.

Alberto, gracias por acogerme entre tu tripulación, apoyarme continuamente y permitirme formar parte de tu familia científica. La navegación ha sido larga, pero hemos llegado a buen Puerto.

José Carlos y Sabrina, gracias por darme la oportunidad de participar en el proyecto “ACIDROCK” y permitirme descubrir este mundo tan fascinante de la acidificación del océano y sus consecuencias. Jose, gracias por contagiarme tu entusiasmo por la ciencia. Sabri, gracias por tu apoyo en esta última etapa, en la que tu función como directora y amiga ha sido vital. Es un placer poder contar contigo para cosas académicas y no académicas, sé que aún nos quedan muchas aventuras juntas, así que disfrutémoslas...

A Mikel Becerro, coautor de un capítulo de esta tesis, le agradezco enormemente que me haya transmitido su pasión por la ecología y haber despertado en mí muchas curiosidades por la

AGRADECIMIENTOS



ecología química. Ha sido un placer, espero que esto sólo sea el comienzo de muchos trabajos venideros.

En el departamento siempre he tenido la ayuda desinteresada de muchos profesores, que siempre que han podido, me han facilitado mi estancia aquí, Fernando Lozano, Gonzalo Lozano, Pepe Braun, Jacinto Barquín, Covadonga Rodríguez e Ignacio Lozano, gracias. Nacho, fuiste la primera persona que me ofreciste trabajo como investigadora, sé que si estuvieras aquí estarías contagiándonos tu alegría. Todavía oigo el tintineo de tus llaves por el pasillo y sé, que cuando nos encontremos, será con un buen plato de percebes y una copa de albariño delante, lo tenemos pendiente.

Gracias Marta Sansón, del departamento de Botánica Marina por tu disponibilidad siempre para cualquier duda o sugerencia. A MariCarmen Alfayate del departamento de Citología e Histología animal y vegetal por facilitarme el uso de sus equipos.

Y como no, a colegas, que con el tiempo se han convertido en grandes amigos confidentes, y han hecho que todo este proceso sea más llevadero y confortable. Aunque estén lejos, o no nos veamos mucho, sé qué están ahí, así que gracias Dominique Girard, Kilian Toledo y José María Landeria!!

Cataisa López, gracias por llegar justo cuando estaba al borde del abismo, y salvarme de él. Gracias por tu amistad y apoyo en muchos de los experimentos de esta tesis, estoy en deuda contigo.

Carlos Sangil y Laura Martín, gracias por sus consejos y disponibilidad, pero sobre todo, gracias por su amistad.

Celso, gracias por tu buen asesoramiento en el mundo de la alcalinidad y de las calibraciones de consolas de pH, ha sido un lujo tenerte cerca. Eliseba, gracias por estos años en los que hemos compartido más que un laboratorio. Muchos becarios, precarios y voluntarios ayudaron durante el transcurso de esta tesis: Mishal, Rita, Yasmi, José Carlos Mendoza, Marc y el recién llegado Laure. Gracias compis por el trabajo, y ánimos que todo llega!

AGRADECIMIENTOS

Domingo, “kíquere”, eres el mejor técnico del laboratorio del mundo entero. Gracias por ayudarme siempre con el manejo de las mesas de agua, por los viajes a por agua al IEO y por compartir desayunos, cervezas y alguna fiesta. Todo ha sido más fácil por tu culpa, así que gracias. Se te echa mucho de menos!!! Efrén Rodríguez, gracias también por tu labor durante tu periodo de prácticas en el laboratorio, tus ideas y trabajo ayudaron a que se desarrollaran los últimos experimentos de esta tesis. Y Vizca, mil gracias por hacer que la burocracia no sea tan dura y por esas mañanitas más cálidas y alegres.

Natacha, gracias por los ánimos y por compartir tu merienda conmigo cuando yo olvidaba que había que comer. Nunca olvidaré esos pasteles de chocolate que me salvaban la vida y la tripa.

Al resto de la tropa de doctorandos del departamento: Alejandro Escánez, Jacobo, Andrea, Trini, José María Espinosa, gracias por compartir penas y alegrías juntos!! Y a esa primera promoción del máster de Biodiversidad y Conservación marina por recordarme las ilusiones de los comienzos, gracias chicos, fue un placer compartir varias campañas con ustedes y aportarles mi granito de arena.

Al grupo de Investigación de la Universidad de Murcia liderado por Ángel Ruzafa, con el que tuve el placer de trabajar unos cuantos meses e indudablemente mejoraron mi formación como investigadora y además me dejaron amistades de por vida. Charton,uento los días para encontrarnos y disfrutar de un rato juntos con los cachorros. Vicky, menos mal que ya te veo con más frecuencia porque si no te extrañaría mucho.

Pablo Martín Sosa, gracias por contratar a una mujer embarazada que en esos momentos estaba renunciado a una beca de formación de la Universidad de La Laguna por estar embarazada y no tener derecho a baja maternal, pues las bajas maternales no se registraban en las becas. Menos mal que en la actualidad se registran en algunas , pero aún queda mucho camino por recorrer con respecto a esta cuestión, así que seguiremos en la lucha!!

A compañeros de diversas campañas, por las horas que hemos compartido bajo el agua y fuera de ella y con los que el trabajo se ha convertido en pluro placer: Alejandro Vicente, Zeque, Falcón, Gustavo y Jaume.

AGRADECIMIENTOS



Thanks to my english teacher, Betty, for improving my english!! Thank you very much!!!

Al Centro de Investigaciones Medioambientales del Atlántico (CIMA) por facilitarme la logística del material de buceo siempre y cuando lo necesité, muchísimas gracias!.

A mis amigas de siempre, Jeny y Raquel, por estar ahí y por soportar mis ausencias. Les recompensaré el tiempo perdido, y los ratos en el laboratorio. A mis biólogos tronados también mil gracias por esos momentos tan divertidos fuera de la ciencia.

A mi familia en la distancia, Chiqui, Paloma, Palomita y Jordi, gracias por los ánimos. Y por supuesto mil gracias a mi sobrino Pau, el mejor ayudante de laboratorio durante los meses de verano.

Y por último, pero no por ello menos importante, a los chicos que hacen que mi vida sea más bonita, Saulo y Óscar. Saulo, pequeño, tu llegada hizo que mamá aprendiera a gestionar el tiempo y su valor. Gracias por tu enorme paciencia, por soportar las ausencias, por las esperas y por ofrecerme tu mejor sonrisa siempre. Además de por tus sucesivas ayudas siempre que decías que ibas a trabajar un poco en la tesis de mami. Óscar Monterroso, sí, el más hermoso, compañero de vida, compañero de viajes y compañero de sueños...gracias por tu apoyo en todo este proceso, desde el principio hasta el final, y por contagiarme tu entusiasmo por la vida, la naturaleza y la música. Es un placer poder compartir la vida contigo. Nos quedan muchas batallas y proyectos venideros juntos, sé que cuento contigo para todos ellos. GRACIAS, LOS QUIERO!

Mil gracias a todos, a los que nombré y a los que olvidé, porque sé que todos, en algún momento, contribuyeron con su granito de arena durante el proceso.

Salud!

Adri, Marzo 2015

Introducción general



ÍNDICE

1. CONTEXTO GENERAL	21
1.1. Contexto de cambio climático	21
1.2. Acidificación del océano	22
1.3. Efecto de la acidificación sobre los erizos de mar	26
1.4. Las islas Canarias, erizos clave y cambio climático	29
2. OBJETIVOS	32
3. ESTRUCTURA	33
4. BIBLIOGRAFÍA	35



1. CONTEXTO GENERAL

1.1. Contexto de Cambio climático

En las últimas décadas, la conciencia por un uso sostenible del medio natural se ha incrementado en los seres humanos, tanto que la creciente antropización del medio ha provocado que los científicos enfoquen sus estudios en los efectos del ser humano sobre la naturaleza, llegando a acuñar este impacto con el término cambio global. Desde la década de los 80 hasta la actualidad hay registrados un total de 105000 artículos científicos publicados sobre el cambio global, de los cuales 35014 se han centrado en las repercusiones en el océano y el resto en los ecosistemas terrestres (Duarte 2014). Las principales consecuencias del cambio global en los océanos son el calentamiento y la acidificación de las aguas, aunque otros procesos tales como el incremento de la radiación ultravioleta (UV) o la anoxia también han empezado a tomar relevancia en investigaciones recientes (Hendricks et al 2010; Dupont & Thornyde 2013; Duarte 2014; Riebesell & Gatusso 2015).

Como consecuencia de la alta tasa de uso de energías fósiles y el uso intensivo del suelo, con actividades como la deforestación y las prácticas agrícolas, se produce un exceso de gases liberados a la atmósfera, proceso conocido comúnmente como efecto invernadero. Este incremento desmesurado de las emisiones, ha provocado un progresivo aumento de la temperatura y un aumento del dióxido de carbono (CO_2) en la atmósfera en los últimos años (IPCC 2013). La acumulación del CO_2 en la atmósfera incrementa el efecto invernadero y genera procesos globales de cambio climático (IPCC 2013). Este aumento del CO_2 atmosférico, en torno a un 40% más desde la era preindustrial, repercute en la cantidad de CO_2 que es absorbido por el océano, que llega a cifras entorno a un 26% del total de CO_2 atmosférico producido por el hombre (Sabine et al 2004, Sabine & Feely 2007). En el océano existen multitud de organismos que utilizan este carbono como base de sus esqueletos calcáreos o como sustratos de la fotosíntesis, como en el caso de las algas y fanerógamas marinas. Así, se prevé que en futuras condiciones de cambio climático todos estos organismos se vean afectados por el progresivo aumento del CO_2 atmosférico (IPCC 2013).

1.2. Acidificación del océano

El creciente incremento de la concentración de CO₂ en la atmósfera (IPCC 2013), desencadena que parte de ese exceso de CO₂ atmosférico sea absorbido por el mar. Durante el periodo comprendido entre los años 1750-2000, los océanos absorbieron casi un tercio del CO₂ atmosférico, que al entrar en contacto con el agua de mar forma ácido carbónico (H₂CO₃⁻), que a su vez se disocia en iones bicarbonato (HCO₃⁻), en iones hidrógeno (H⁺) y carbonato (CO₃⁻²), lo que produce una disminución del pH de agua de mar (Figura 1), pasando de un pH próximo a 8,2 en condiciones normales a un pH más ácido en condiciones de cambio climático. El exceso de iones hidrógeno (H⁺) también reaccionan con los iones carbonato (CO₃⁻²), los cuales reducen el estado de saturación del agua de mar con respecto a los minerales del carbonato de calcio, aragonito y calcita. Estas formas de carbonato cálcico son usadas por muchos organismos marinos para construir sus esqueletos, por ejemplo el aragonito en corales y pterópodos, la calcita en cocolitofóridos y foraminíferos, o el magnesio-calcita para erizos, estrellas de mar y algunas algas calcáreas (Harold & Folger 2013). A los estudios que evalúan las consecuencias de la disminución del pH de mar debido a las actividades antrópicas se les denomina estudios de la acidificación del océano (AO).

22

Desde el principio de la época industrial, en la segunda mitad del siglo XVIII, hasta el año 2000, el océano pasó de tener un pH de 8,2 a 8,1 unidades, y podría alcanzar valores de 7,8 en el año 2100 (Gattusso & Lavigne 2009). Estudios recientes prevén un descenso del pH de hasta 0,4 unidades para el próximo centenario (Figura 2A) y de hasta 0,6 unidades (Figura 2B) para el 2140 (IPCC 2013). Estos cambios puede ser muy dramáticos, ya que en los últimos dos millones de años no se han registrado pH inferiores a 8,1 (Hönisch et al 2009). De hecho, estos cambios se están produciendo de forma muy rápida en algunas regiones, tales como la Corriente de California del Pacífico nororiental (Hauri et al 2013), donde la media anual del pH puede caer por debajo del límite inferior estacional registrado en los últimos 35 años.

INTRODUCCIÓN GENERAL

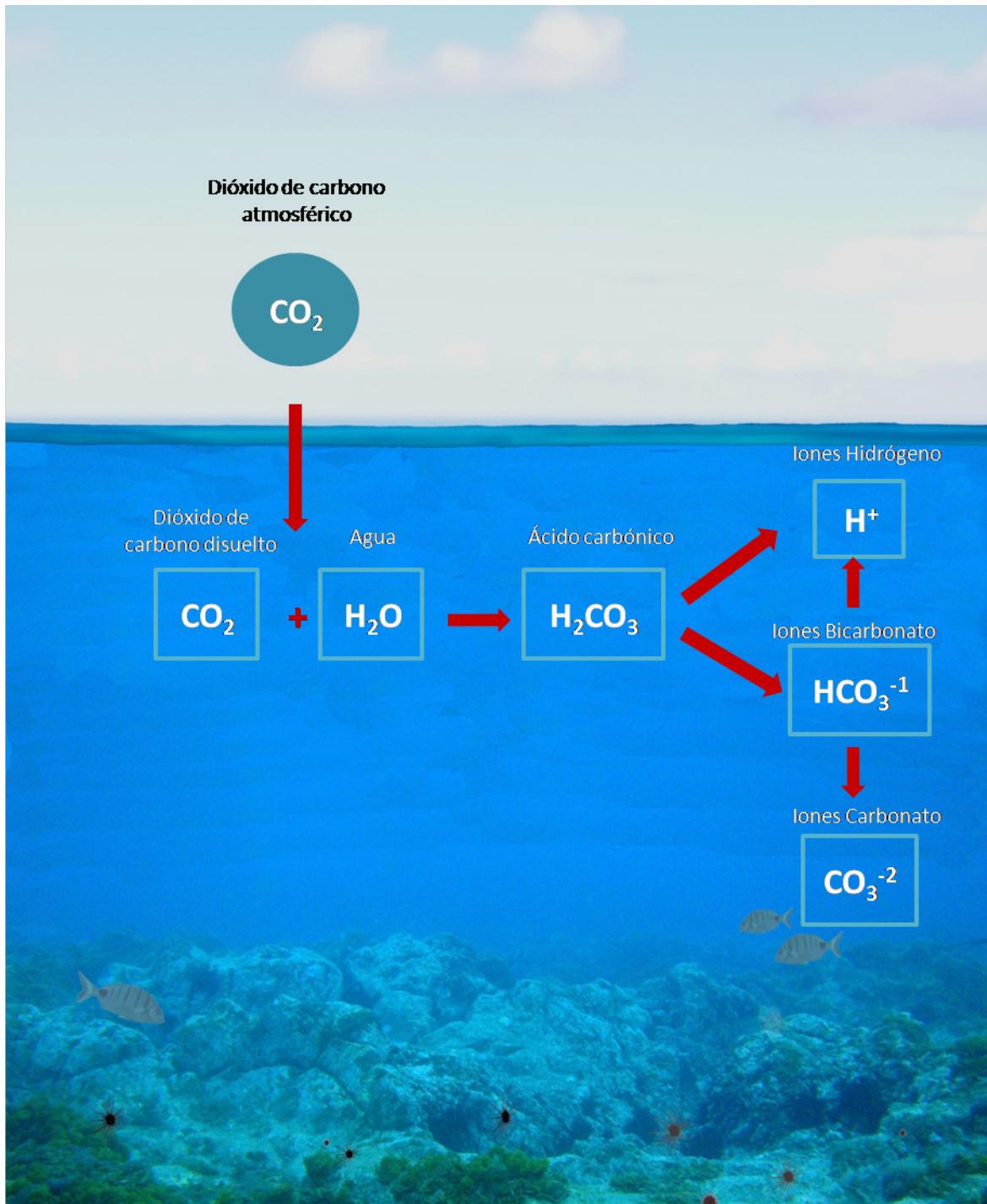


Figura 1. Esquema del proceso de disociación del CO₂ atmosférico al entrar en contacto con el agua de mar.

INTRODUCCIÓN

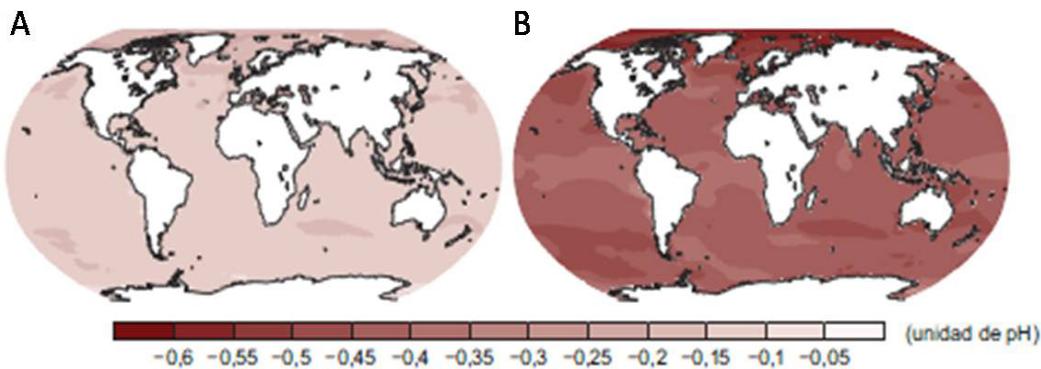


Figura 2. Mapa de la disminución del pH superficial de los océanos a nivel mundial en el periodo de tiempo, (A) comprendido entre los años 1986-2005 y (B) previsto para los años 2081-2100. Fuente: IPCC 2013.

24

El pH no se distribuye de forma homogénea en el océano y cambia de forma natural con las oscilaciones de las mareas, la latitud y la profundidad. En función de la latitud, nos encontramos con niveles de pH más básicos en regiones próximas a los polos, ya que el CO₂ se disuelve con mayor facilidad, y pH más ácidos a medida que nos acercamos al ecuador, como consecuencia del incremento de temperatura que hace que este gas sea menos soluble (Figura 3A). Por lo tanto, las regiones tropicales y subtropicales son las más sensibles a estos cambios de pH (IPCC 2013). También existe una variación en profundidad; a medida que ésta se incrementa, el océano actúa más como fuente de CO₂ que como sumidero, ya que existe una alta concentración de CO₂ en profundidad (Figura 3B). Los organismos bentónicos, pelágicos, y los sedimentos contribuyen a que exista una disminución del pH como consecuencia de la descomposición de la materia orgánica en profundidad y ausencia de fotosíntesis, pudiéndonos encontrar con pH próximos a 7,4 en profundidades cercanas a los 2000 m (Figura 4). Diversos organismos se verán afectados por la acidificación del océano asociada a los procesos de cambio climático, desde peces (Munday et al 2009, 2010), invertebrados calcáreos (Gazeau et al 2007; Dupont et al 2012; Byrne & Pzreslawsky 2013), algas calcáreas (Martin & Gatusso 2009; McCoy & Kamenos 2015) y otros tipos de macroalgas (Hurd et al 2009; Koch et al 2013).

INTRODUCCIÓN GENERAL

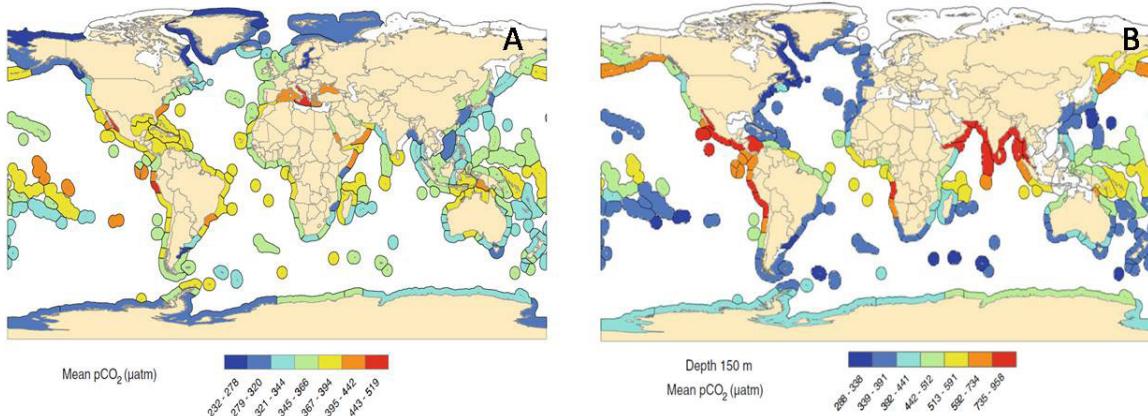


Figura 3. Variación a escala global de la presión parcial del CO₂ (μatm) A. en la superficie oceánica y B. en profundidad (150 metros). Fuente: Mc Elhany & Busch 2013.

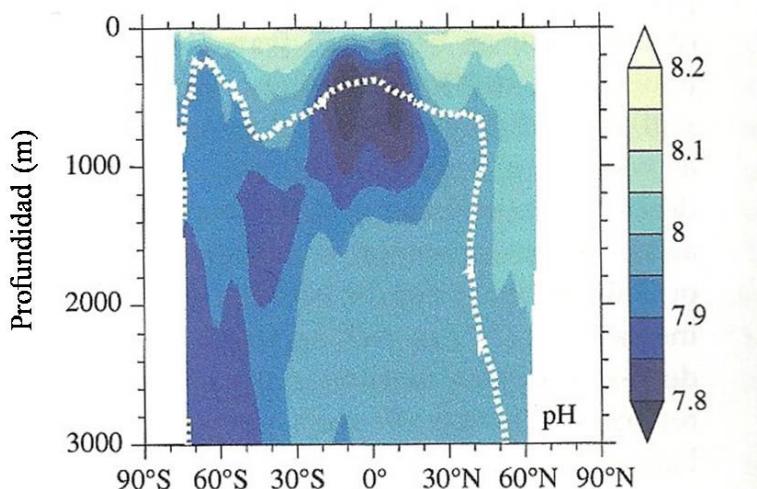


Figura 4. Esquema de la variación de pH en profundidad y latitud. La línea blanca discontinua muestra el horizonte de saturación del aragonito. Modificado de Orr (2012).

25

Moore et al (1906) ya evaluaron el efecto de la acidez sobre la fertilización, crecimiento y división celular de huevos de erizos de mar y el estudio de McClendon (1918) ya ponía de manifiesto la importancia de las interacciones de los factores ambientales en diferentes especies de algas y etapas de vida. Trabajos posteriores de Gail (1919) evaluaban el efecto del pH y la temperatura en la supervivencia, reproducción y crecimiento de *Fucus* sp. Igualmente, Rubey

(1951) ya concluía sobre la importancia de los efectos de la disminución del pH en los océanos y sus posibles repercusiones sobre diversos organismos dependientes del carbono. Pero, como comentamos anteriormente, ha sido en la última década, cuando se ha producido un gran incremento en los estudios realizados sobre la acidificación del océano y sus posibles efectos en multitud de organismos (Andersson et al 2011; Dupont & Thornyde 2013; Duarte 2014).

1.3. Efecto de la acidificación sobre los erizos de mar

26

Debido a que dependen del CaCO₃ para construir sus esqueletos calcáreos, en los últimos años numerosos estudios se han centrado en los efectos de la acidificación sobre los erizos de mar, siendo las dianas perfectas para desarrollar multitud de investigaciones (Dupon & Thornyde 2013). La mayoría de estos estudios se han centrado en las fases larvarias de estos organismos, evaluando cómo la acidificación del océano influye en la fertilización y primeras fases de desarrollo (Kurihara & Shirayama 2004; Cohen et al 2013; Byrne & Pzreslawsky 2013; Dupont & Thorndyke 2013; García 2014). Muchos menos estudios se han centrado en los efectos de la acidificación del océano sobre los juveniles, fase caracterizada por una alta vulnerabilidad a cambios ambientales y recientemente considerados como el estado más vulnerable y menos estudiado del ciclo de vida de los equinoideos (Dupont & Thornyde 2013). Actualmente tan sólo se han publicado 8 artículos científicos sobre el efecto de la acidificación del océano en estos estadios de vida, valorando la respuesta del crecimiento, cambio de estructuras externas y supervivencia ante escenarios de acidificación del océano previstos para condiciones futuras (ver tabla 1 para más detalle). De igual manera, muy poca atención se ha prestado al estudio de las interacciones entre especies, tales como relaciones de herbivoría (erizos-algas) o de depredación (peces-erizos), bien en el medio natural (Johnson et al 2012; Porzio et al 2011), en experimentos de mesocosmos (Alstenberg et al 2013) o en el laboratorio simulando condiciones de cambio climático (Diaz-Pulido et al 2011; Doropoulos et al 2012; Asnaghi et al 2013a; Burnell et al 2013). Estas interacciones son muy importantes ya que en muchos ecosistemas las relaciones algas-erizos-peces, son las que determinan que se originen fases de cambio en los ecosistemas (Sala et al 1998; Pinngar et al 2000). De hecho, en diversas regiones del mundo, los erizos juegan un papel clave en los ecosistemas marinos, pudiendo alterarlos considerablemente, actuando como auténticas especies clave (Ling et al 2015). Por ejemplo, en el Caribe las altas

INTRODUCCIÓN GENERAL



densidades de *Diadema antillarum* mantienen el crecimiento de las algas limitado sobre los arrecifes de coral, permitiendo que estos actúen como especies estructurantes (Lessios et al 1984). En Canarias, las altas densidades poblacionales de *D. africanum* y su gran capacidad ramoneadora modifica la estructura y composición de las comunidades de macroalgas (Sangil et al 2014), mientras que el control poblacional de *D. africanum* por parte de los depredadores determina, de forma indirecta, la cobertura de macroalgas frondosas (Clemente et al 2010).

Las interacciones biológicas han sido poco estudiadas en un contexto de cambio climático. La mayor parte de las investigaciones se han centrado en el estudio a nivel de especie y en las interacciones de factores abióticos como la temperatura o el pH, a pesar de que estudios recientes han puesto de manifiesto la importancia de las interacciones bióticas, incluyendo relaciones de competencia, herbivoría y/o depredación (Wernberg et al 2012; Connell et al 2013; Burnell et al 2013; Pfister et al 2014). Por ello, es de real importancia comenzar a evaluar estas interacciones biológicas, durante periodos de tiempo prolongados, e incluso, durante varios ciclos tras-generacionales (Dupont et al 2010a, b, c; Byrne & Prezlawsky 2013; Dupont & Thornyde 2013; Dorey et al 2013), pues al final los efectos indirectos van a ser, junto a los efectos directos, los que determinen que se desarrolle unos ecosistemas u otros en escenarios de cambio climático cercanos.

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Detalle de los estudios realizados de los efectos de la acidificación del océano sobre juveniles de distintas especies de erizos de mar, destacando la/s variable/s estudiadas, los rangos de pH, así como la duración de los tratamientos. Se incluyen las referencias. (*): Se estudió también la variable temperatura combinada con el pH.

Especie	Variable	Rango de pH	Duración	Referencia
<i>Strongylocentrotus droebachensis</i>	Crecimiento Supervivencia	8,07 vs. 7,69	3 meses	Dupont et al 2012*
<i>Heliocidaris erythrogramma</i>	Crecimiento Estructuras externas Supervivencia	7,6-7,8-8,2 7,4-7,6-7,8-8,1	5 días 14 días	Byrne et al 2011* Woolfe et al 2013*
<i>Echinometra mathaei</i>	Crecimiento Estructuras externas Supervivencia	7,90 vs. 7,94	6 meses	Shirayama & Thornton 2005
<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	Crecimiento Estructuras externas Supervivencia	7,90 vs. 7,94	6 meses	Shirayama & Thornton 2005
<i>Paracentrotus lividus</i>	Crecimiento Estructuras externas Supervivencia Herbivoría Depredación	7,6 vs. 8,1	100 días 100 días 100 días 14 días 100 días	Este estudio (Rodríguez et al a “enviado”, b “en preparación” y c “en pre- paración”.
	Crecimiento Estructura externas Supervivencia Herbivoría	6,6-7,8-8,1	30 días	Asnagui et al 2013 a, b.
<i>Diadema africanum</i>	Crecimiento Estructuras externas Supervivencia Herbivoría Depredación	7,6 vs. 8,1	100 días 100 días 100 días 100 días 14 días 100 días	Este estudio (Rodríguez et al a “enviado”, b “en preparación” y c “en pre- paración”.
<i>Lytechinus variegatus</i>	Estructuras externas Crecimiento Supervivencia	8,1-7,9-7,8	89 días	Albright et al 2012*
<i>Tripneustes gratilla</i>	Estructuras externas	7,6-7,8-8,1	146 días	Byrne et al 2014*



1.4. Las islas Canarias, erizos clave y cambio climático.

Las islas Canarias se encuentran situadas al Noroeste del continente africano ($27^{\circ} 37' - 29^{\circ} 25' N$ y $13^{\circ} 20' - 18^{\circ} 10' O$), próximas a las costa de Marruecos y del Sáhara, distando su extremo más oriental unos 95 km del continente africano. Se trata de islas volcánicas y forman parte de la ecoregión marina Macaronésica, en la cual se engloban también los archipiélagos de Azores y Madeira (Spalding et al 2007;Figura 5).



Figura 5. Localización de las Islas Canarias dentro de la ecoregión marina Macaronésica.

Su clima es característico de una región subtropical, influenciada por los vientos alisios procedentes del NE y la llamada Corriente Fría de Canarias. Al tratarse de islas volcánicas apenas poseen plataforma oceánica, pudiendo alcanzarse grandes profundidades a una distancia muy cercana a la costa. Como consecuencia de la proximidad de las islas más orientales al afloramiento o “up-welling” de la costa africana, existe un marcado gradiente en cuanto a los parámetros químicos del agua se refieren. Así, nos encontramos con masas de agua más frías y con mayor salinidad en las islas orientales, como consecuencia del aporte de aguas más profundas del “up-welling”, que deriva también en un gradiente térmico acusado. De hecho, se registran diferencias de hasta $2^{\circ}C$ entre las islas más orientales y occidentales en la misma época del año (Barton et al 1998). La salinidad de las aguas superficiales oscila entre valores anuales de 36,7-36,9 unidades, encontrando los valores más altos de salinidad en las islas orientales. El rango de temperatura varía de $16-18^{\circ}C$ en los meses de invierno y de $23-25^{\circ}C$ en los meses de verano (Hernández et al 2013). Los valores medios de pH se sitúan en torno a $\sim 8,1$ unidades (ver memoria Gobierno de Canarias 2006).

La estabilidad estacional y la variación espacial de los parámetros oceanográficos, unidas a la heterogeneidad geomorfológica y de exposición al oleaje con la orientación, dan lugar a una gran variabilidad ambiental, que permite la presencia de una rica biodiversidad marina, integrada por especies subtropicales, tropicales y templadas. Aunque los datos actualizados, aún no publicados, reflejan cifras muy superiores, el censo de 2003 ya registraba 5232 especies marinas de un total de 18000 catalogadas para las islas Canarias (Moro et al 2003).

En las últimas décadas, los paisajes de los fondos rocosos submareales someros más frecuentes en Canarias son los blanquizales, sustratos desprovistos de algas por la intensa acción ramoneadora del erizo clave *Diadema africanum* (Rodríguez et al 2013) (Figura 6B, D; ver Hernández et al 2010; Clemente et al 2007, 2010; Sangil et al 2014). Otra especie clave de los fondos rocosos, que a menor escala puede llegar a crear pequeños blanquizales, es el erizo *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1917), que se encuentra tanto en las zonas intermareales como submareales de las Islas, siendo éstas su límite de distribución sur (Figura 6A, C). Diversos estudios se han realizado sobre la fase adulta de ambas especies en Canarias, abarcando aspectos de la biología y ecología de las especies como la reproducción (Hernández et al 2006a; Girard et al 2008), el asentamiento (Hernández et al 2006b; 2010), la alimentación (Tuya et al 2001; Hernández et al 2007), la depredación (Tuya et al 2004; Clemente et al 2007, 2010) y el crecimiento (Hernández et al 2012; Toledo et al 2014). También se han estudiado los efectos de variables de cambio climático, en concreto de la acidificación y el calentamiento del agua, en la fertilización y desarrollo larvario de ambas especies de equinodermos en las Islas (Cohen et al 2013; García 2014). Sin embargo, se conoce muy poco sobre las fases juveniles de ambas especies, caracterizadas por una alta vulnerabilidad (Gosselin & Qian 1996, Hunt & Scheibling 1997), y consideradas auténticos cuellos de botella en las dinámicas de las poblaciones de erizos de mar (Tegner & Dayton 1981; Highsmith 1982; McClanahan & Mutiga 1989; Scheibling & Hamm 1991; Sala & Zabala 1996; Sala 1997; López et al 1998; Hereu et al 2005).

INTRODUCCIÓN GENERAL

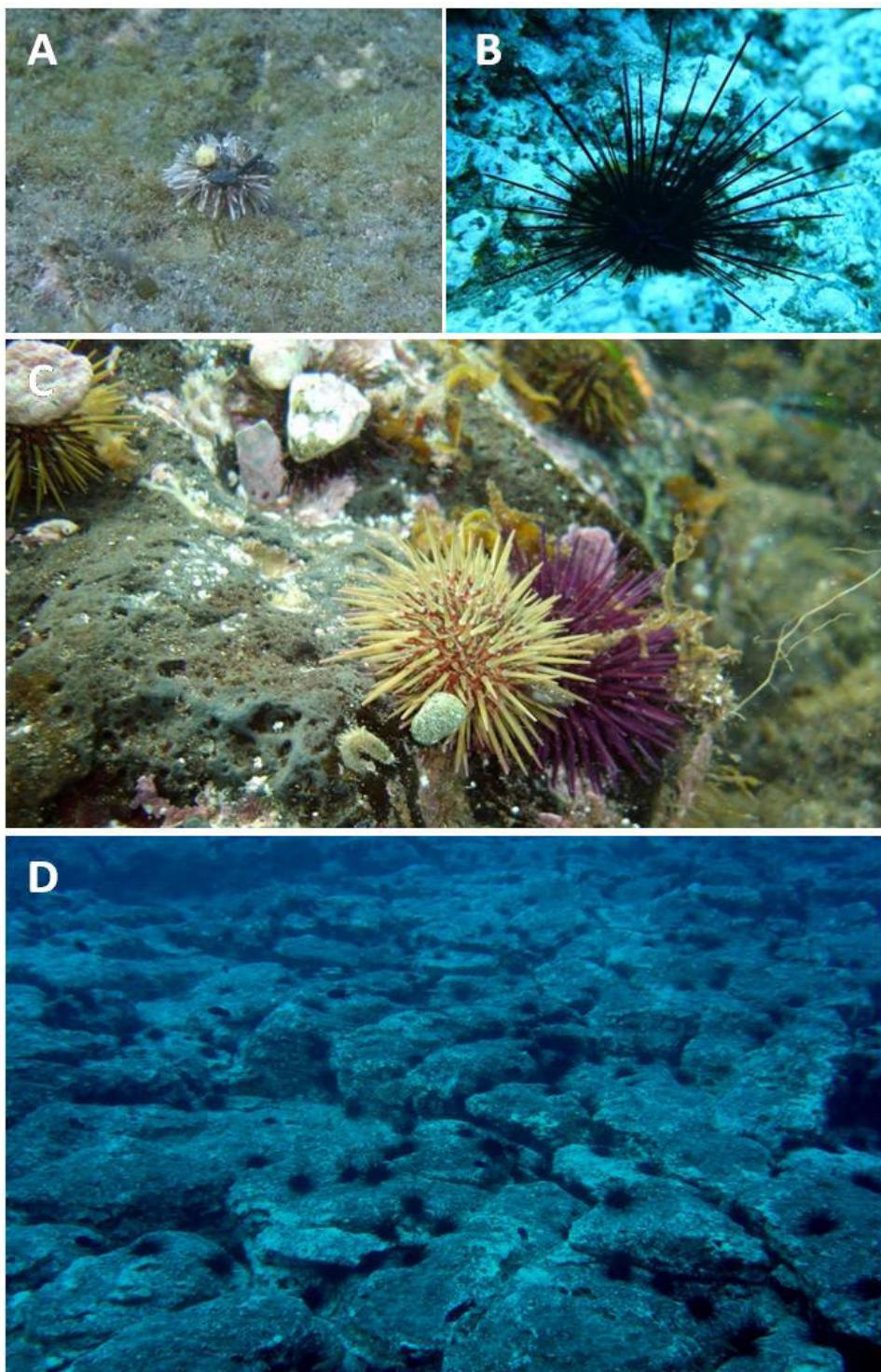


Figura 6. Principales erizos claves de las islas Canarias y ecosistemas que generan. A. Detalle de un juvenil de *Paracentrotus lividus*. B. Detalle de un juvenil de *Diadema africanum*. C. Ecosistema donde habita *P. lividus* y D. ecosistema dominado por *D. africanum* (blanquiza).

INTRODUCCIÓN

En cuanto al efecto de los procesos de cambio climático en la región de Canarias, durante las últimas décadas se ha constatado un aumento de la temperatura superficial del agua de mar de 1 °C (Hernández et al 2010) y las predicciones realizadas por Santana-Casiano et al (2007) prevén un descenso del pH de 0,002 unidades por año. Algunos efectos de estos procesos de cambio climático son ya patentes en las comunidades biológicas de las Islas, que están experimentando una progresiva tropicalización de la biota como efecto directo del calentamiento de las aguas (Brito et al 2005). Sin embargo, dado el importante papel modificador en los ecosistemas que tienen los erizos de mar, se hace necesario realizar estudios más específicos, con las previsiones de escenarios futuros de cambio climático, que reflejen los efectos directos e indirectos de la acidificación del océano sobre las fases juveniles de las dos especies clave de equinoideos, a fin de conocer un poco más sobre las interacciones que presentan estas especies de equinoideos en esta fase tan delicada del ciclo de vida.

2. OBJETIVOS

32

Parte de esta tesis se ha encuadrado en el proyecto ACIDROCK “*Influencia de las fitocenosis del litoral rocoso en la variación del pH y su relevancia para las poblaciones de invertebrados calcáreos en un contexto de cambio climático* (ACIDROCK-CTM 2010-21724)” y ha sido financiada a través de la Fundación Caja Canarias mediante una beca predoctoral durante los años 2011-2012, 2012-2013 y 2014-2015.

Esta investigación se centró en los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar las tasas de consumo en los juveniles de erizos *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum*, así como determinar las posibles defensas físicas y químicas de las 15 especies de algas más comunes en Canarias frente a la herbivoría de estas dos especies de equinoideos.
2. Valorar el efecto directo de la acidificación sobre el crecimiento, calcificación y modificaciones en la estructura interna de 9 especies de algas características de los fondos



rocosos de las islas Canarias, así como los efectos indirectos de la acidificación en la herbivoría de los juveniles *P. lividus* y *D. africanum* sobre dichas especies algales.

3. Evaluar la eficiencia de una técnica de marcaje interno mediante el uso de un marcador químico (calceína), para la realización de experimentos de crecimiento a largo plazo, en fases tan vulnerables como son los juveniles de erizos (*P. lividus* y *D. africanum*).
4. Determinar el crecimiento de los juveniles de *P. lividus* y *D. africanum* en el medio natural y sometidos a diferentes monodiетas representativas de macroalgas de Canarias.
5. Evaluar el efecto de la acidificación del océano sobre la supervivencia y crecimiento de juveniles de *P. lividus* y *D. africanum*.
6. Identificar los depredadores naturales de las fases juveniles de los erizos *P. lividus* y *D. africanum* en el medio natural, así como cuantificar la selección de presas por parte de los depredadores.
7. Cuantificar los efectos directos de la acidificación del océano sobre las estructuras externas de juveniles de los erizos de mar *P. lividus* y *D. africanum*, tales como púas, espesor y dureza del caparazón, y valorar los efectos indirectos de estas modificaciones en las estructuras defensivas sobre la depredación de los individuos en el medio natural.

3. ESTRUCTURA

Esta tesis consta de 7 capítulos englobados en 3 secciones diferentes de alimentación, crecimiento y depredación. Los capítulos corresponden a tres artículos científicos, que son manuscritos originales enviados a revistas internacionales con índice de impacto, de los cuales uno de ellos ya está en prensa y dos bajo revisión; y a cuatro artículos en preparación. Debido al desconocimiento sobre muchos aspectos de la biología y ecología de las fases juveniles de

INTRODUCCIÓN

estas dos especies de equinoideos en Canarias, en cada una de las secciones correspondientes se introduce un capítulo de conocimiento general sobre la alimentación, crecimiento y depredación, respectivamente, de juveniles en condiciones normales sin efectos de la acidificación del océano por procesos de cambio climático.

A continuación se detalla la estructura de esta tesis por secciones y capítulos:

INTRODUCCIÓN GENERAL: centrada en el marco conceptual del cambio climático y acidificación del océano; se realiza un resumen y una recopilación de los principales trabajos realizados con juveniles de erizos en un contexto de cambio climático, destacando la importancia de las interacciones entre especies y el papel que juegan los juveniles en el medio natural.

SECCIÓN I. ALIMENTACIÓN DE JUVENILES DE ERIZOS DE MAR Y EFECTO DE LA ACIDIFICACIÓN.

CAPÍTULO 1: Juvenile sea urchins algae consumption depends on multiple algae traits.

34

CAPÍTULO 2: Efectos de la acidificación del océano sobre la tasas de herbivoría de los juveniles de erizos de mar *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum*.

SECCIÓN II. CRECIMIENTO DE JUVENILES DE ERIZOS DE MAR Y EFECTO DE LA ACIDIFICACIÓN

CAPÍTULO 3: Efficiency on calcein tagging on juveniles of the sea urchins: *Diadema africanum* and *Paracentrotus lividus*.

CAPÍTULO 4: Crecimiento de juveniles de dos especies de erizos de mar en las islas Canarias.

CAPÍTULO 5: Efecto de la acidificación del océano sobre el crecimiento de los juveniles de erizos *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum*.



SECCIÓN III. DEPREDACIÓN DE JUVENILES DE ERIZOS DE MAR Y EFECTO DE LA ACIDIFICACIÓN

CAPÍTULO 6: Depredación sobre juveniles de erizos de mar: *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum*.

CAPÍTULO 7: The effects of ocean acidification on predation of *Paracentrotus lividus* and *Diadema africanum* juveniles in urchin barrens off the Canary Islands.

CONCLUSIONES: se incluyen las correspondientes conclusiones obtenidas en cada uno de los capítulos de esta tesis doctoral.

4. BIBLIOGRAFÍA

- Albright R**, Bland C, Gillette P, Serafy JE, Langdon C, Capo TR (2012). Juvenile growth of the tropical sea urchin *Lytechinus variegates* exposed to near-future ocean acidification scenarios. *J Exp Mar Biol Ecol*, 426-427:12–17.
- Alstenberg C**, Eklöf J, Gamfeldt L, Havenhand JN, Sundbäck K (2013). Consumer mediate the effects of experimental ocean acidification and warming on primary producer. *P Natl Acad Sci USA*, 110(21):8603-8608.
- Andersson AJ**, Mackenzie FT, Gattuso JP (2011). Effects of ocean acidification on benthic processes, organisms, and ecosystems. In: Gattuso J-P, Hansson L, editors. Ocean Acidification. Oxford University Press, Oxford. pp. 122–153.
- Asnaghi V**, Chiantore M, Mangialajo L, Gazeau F, Francour P, Alliouane S, Gatusso JP (2013a). Cascading effects of ocean acidification in a rocky subtidal community. *PLoS ONE* 8(4): e61978. doi:10.1371/journal.pone.0061978.
- Asnaghi V**, Mangialajo L, Gatusso JP, Francour P, Privitera D, Chiantore M (2013b). Effects of ocean acidification and diet on thickness and carbonate elemental composition of the test of juvenile sea urchins. *Mar Env Res*, 93:78–84.
- Barton ED**, Arístegui J, Tett P, Canton M, García-Braun J, Hernández-León S, Nykjaer L, Almeida C, Almunia J, Ballesteros S, Basterrerxe G, Escánez J, García-Weill L, Hernández-Guerra A, López-Latzen F, Molina R, Montero MF, Navarro-Pérez E, Rodríguez JM, Van Lenning K, Vélez H, Wild K (1998). The transition zone of the

INTRODUCCIÓN

Canary Current upwelling region. *Prog Oceanogr*, 41:455-504.

Brito A, Falcón JM, Herrera R (2005). Sobre la tropicalización reciente de la ictiofauna litoral de las islas Canarias y su relación con cambios ambientales y actividades antrópicas. *Vieraea*, 33:515-252.

Burnell OW, Bayden RD, Irving AD, Connell SD (2013). Eutrophication offsets increased sea urchin grazing on seagrass caused by warming and acidification. *Mar Ecol Prog Ser*, 485:37-46.

Byrne M, Przeslawski R (2013). Multistressor impacts of warming and acidification of the ocean on marine invertebrates' life histories. *Integr Comp Biol*, 53(4):582-596.

Byrne M, Ho M, Wong E, Soars NA, Selvakumaraswamy P, Shepard-brennand H, Dwoejany SA, Davis AR (2011). Unshelled abalone and corrupted urchins, development of marine calcifiers in a changing ocean. *P Roy Soc B-Biol Sci*, 278: 2376–2383.

Byrne M, Smith AM, West S, Collard M, Dubois P, Graba-landry A, Dwoejany A (2014). Warming influences Mg²⁺ content, while warming and acidification influence calcification and test strength of a sea urchin. *Environ Sci Technol*;DOI:dx.doi.org/10.1021/es5017526.

Cohen-Rengifo M, García E, Hernández CA, Hernández JC ,Clemente S (2013). Global warming and ocean acidification affect fertilization and early development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Cah Biol Mar*, 54:667-675.

Clemente S, Hernández JC, Toledo K, Brito A (2007). Predation upon *Diadema* aff. *antillarum* in barren grounds in the Canary Islands. *Sci Mar*, 71(4):745-754.

Clemente S, Hernández JC, Rodríguez A, Brito A (2010). Identifying keystone predators and the importance of preserving functional diversity in sublittoral rocky-bottom areas. *Mar Ecol Prog Ser*, 413:55-67.

Connell SD, Kroeker KJ, Fabricius KE,Kline DI, Russell BD (2013). The other ocean acidification problem: CO₂ as a resource among competitors for ecosystem dominance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*,368:20120442.

Diaz-Pulido G, Gouezo M, Tilbrook B, Dove S, Anthony KRN (2011). High CO₂ enhances the competitive strengths of seaweeds over coral. *Ecol Lett*, 14: 156-162.

Dorey N, Lancon P, Thorndyke MC, Dupont S (2013). Assessing physiological tipping point of sea urchin larvae exposed to a broad range of pH. *Glob Change Biol*, 19(11): 3355-3367.

Doropoulos C, Ward S, Diaz-Pulido, Hoegh-Guldberg O, Mumby PJ (2012). Ocean acidification reduces coral recruitment by disrupting intimate larval-algal settlement interactions. *Glob Chan Biol*, 15: 338-346.

Duarte CM (2014). Global change and the future ocean: a grand challenge for marine sciences. *Frontiers in marine science*. doi: 10.3389/fmars.2014.00063.

INTRODUCCIÓN GENERAL



Dupont S, Thorndyke M (2013). Direct impacts of near-future ocean acidification on sea urchins. In: Fernández-Palacios JM, de Nascimiento L, Hernández JC, Clemente S, González A, Díaz-González JP (eds). Climate Change Perspectives from the Atlantic: Past, Present and Future. Servicio de publicaciones de La Universidad de La Laguna, La Laguna, Spain.

Dupont S, Dorey N, Thorndyke M (2010a). What meta-analysis can tell us about vulnerability of marine biodiversity to ocean acidification? *Estuar Coast Shelf Sci*, 89:182-185.

Dupont S, Lundve B, Thorndyke M (2010b). Near future ocean acidification increases growth rate of the lecithotrophic larvae and juveniles of the sea star *Crossaster papposus*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 314B:382-389.

Dupont S, Ortega-Martínez O, Thorndyke M (2010c). Impact of near-future ocean acidification on echinoderms. *Ecotoxicology*, 19:449-462.

Dupont S, Dorey N, Stumpp M, Melzner F, Thorndyke M (2012). Long-term and trans-life-cycle effects of exposure to ocean acidification in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Mar Biol*, 160:1835-1843.

Gail HE (1919). Hydrogen ion concentration and other factors affecting the distribution of *Fucus*. *Publication Puget Sound Biological Station*, 2:287-306.

García E (2014). Effects of global warming and ocean acidification on fertilization, larvae development and settlement of the sea urchins in the Canary Islands. Tesis doctoral, Universidad de La Laguna.252pp.

Gatusso JP, Lavigne H (2009). Technical note:approaches and software tolos to investigate the impact of ocean acidification. *Biogeosciences*, 6:2123-2133.

Gazeau F, Quiblier C, Jansen JM, Gattuso JP, Middleburg JJ, Heip CHR (2007). Impact of elevated CO₂ on shellfish calcification. *Geophys Res Lett*, 34: L07603.

Girard D, Herrero A, Mora J, Hernández JC, Brito A, González N, Catoire JL (2008). Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) in its southern population limit (Canary Islands eastern Atlantic). *Gulf Mex Sci*, 26: 149.

Gobierno de Canarias, Consejería de infraestructuras, transportes y vivienda. Dirección general de aguas (2006). Memoria Condiciones de referencia de las tipologías de las masas de agua costeras: parámetros indicadores que definen los límites entre los estrados ecológicos. Directiva Marco del Agua. Archipiélago Canario.108pp.

Gosselin LA, Qian PY (1996). Juvenile mortality in benthic marine invertebrates. *Mar Ecol Progr Ser*, 146:265-282.

Harold FU, Folger P (2013). Ocean Acidification. IN: Ocean acidification, Raisman S , Murphy T (Eds).Nova Science Publisher.

INTRODUCCIÓN

Hauri C, Gruber N, Vogt M, Doney SC, Feely RA, Lachkar, Leinweber A, McDonnell AMP, Munnich M, Plattner G-K (2013). Spatiotemporal variability and long-term trends of ocean acidification in the California Current System. *Biogeosciences*, 10:193–216.

Hendriks IE, Duarte CM, Álvarez M (2010). Vulnerability of marine biodiversity to ocean acidification: A meta-analysis. *Estuar Coast Shelf S*, 86:157-164.

Hereu B, Zabala M, Linares C, Sala E (2005). The effects of predator abundance and habitat structural complexity on survival of juvenile sea urchins. *Mar Biol*, 146:293-299.

Hernández JC, Brito A, García N, Gil-Rodríguez MC, Herrera-López G, Cruz-Reyes A, Falcón JM (2006a). Spatial and seasonal variation of the gonad index of *Diadema antillarum* (Echinodermata:Echionidea) in the Canary Islands. *Sci Mar*, 70: 689-698.

Hernández JC, Brito A, Cubero E, García N, Girard D, González-Lorenzo G, Flacón JM (2006b). Temporal patterns of larval settlement of *Diadema antillarum* (Echinodermata:Echionidea) in the Canary Islands using an experimental larval collector. *Bull Mar Sci*, 78: 271-279.

Hernández JC, Gil-Rodríguez MC, Herrera-López G, Brito A (2007). Diet of the “key herbivore” *Diadema antillarum* in two contrasting hábitats in the Canary Islands (Eastern-Atlantic). *Vieraea*, 35:109-120.

Hernández JC, Clemente S, Girard D, Pérez-Ruzafa A, Brito A (2010). Effect of temperature on settlement and postsettlement survival in a barrens-forming sea urchin. *Mar Ecol Prog Ser*, 413:69-80.

Hernández JC, Clemente S, Sangil C, Rodríguez A, Ebert T (2012). Population dynamics of a barren forming sea urchin: influence of island shelter and algae assemblage on population age structure. Comunicación oral en : 14th International Echinoderm Conference. Bruselas, Bélgica.

Hernández JC, Clemente S, Tuya F, Pérez-Ruzafa A, Sangil C, Moro-Abad L and Bacallado-Aránega JJ (2013). Echinoderms of the Canary Islands, Spain IN: “Echinoderm Research and Diversity in Latin America”Eds:Alvarado J.A, Solís-Marín F.Springer Heidelberg New York Dordrecht London. ISBN 978-3-642-20020-2.

Highsmith RC (1982). Induced settlement and metamorphosis of sand dollar (*Dendraster excentricus*) larvae in predator-free sites: adult sand dollar beds. *Ecology*, 51:1046-1051.

Hönisch B, Hemming NG, Archer D, Siddall M, McManus JF (2009). Atmospheric carbon dioxide concentration across the mid-Pleistocene transition. *Science*,324:1151-1554.

Hunt HL, Scheibling RE (1997). The role of early post-settlement mortality in recruitment of benthic marine invertebrates. *Mar Ecol Prog Ser*, 55:269-301.

Hurd CL, Hepburn CD, Currie KI, Raven JA, Hunter KA (2009). Testing the effects of ocean acidification on algal metabolism: considerations for experimental designs. *J Phycol*, 45:1236-1251.

INTRODUCCIÓN GENERAL



IPCC (2013). Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Stocker TF, Qin D, Plattner GK, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM (eds.)] Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Johnson V, Russell BD, Fabricius KE, Brownlee C, Hall-Spencer JM (2012). Temperature and tropical brown macroalgae thrive, despite decalcification, along natural CO₂ gradientes. *Global Change Biol*, 18:2792-2803.

Koch M, Bowes G, Ross C, Zhang X-H (2013). Climate change and ocean acidification effects on seagrass and marine macroalgae. *Global Change Biol*, 19:103-132.

Kurihara H, Shirayama Y (2004). Effects of increased atmospheric CO₂ on sea urchin early development. *Mar Ecol Prog Ser*, 274: 161-169.

Lessios HA, Robertson DR, Cubit JD (1984). Spread of *Diadema* mass mortality through the Caribbean. *Science*, 226: 335-337.

Ling SD, Scheibling RE, Rassweiler A, Johnson CR, Shears N, Connell SD, Salomon AK, Norderhaug KM, Pérez-Matus A, Hernández JC, Clemente S, Blamey LK, Hereu B, Ballesteros E, Sala E, Garrabou J, Cebrina E, Zabala M, Fujita D, Johnson E (2015). Global regime shift dynamics of catastrophic sea urchin overgrazing. *Phil Trans R Soc B*, 370:20130269.

Lopez S, Turon X, Montero E, Palacin C, Duarte CM, Tarjuelo I (1998). Larval abundance, recruitment and early mortality in *Paracentrotus lividus* (Echinoidea). Interannual variability and plankton-benthos coupling. *Mar Ecol Prog Ser*, 172:239-251.

Martin S, Gattuso JP (2009). Response of Mediterranean coralline algae to ocean acidification and elevated temperature. *Global Change Biol*, 15:2089-2100.

McClanahan TR, Muthiga NA (1989). Patterns of predation on a sea urchin, *Echinometra mathaei* (de Blainville), on Kenyan coral reefs. *J Exp Mar Biol Ecol* 126:77-94.

McClendon JF (1918). On changes in the sea and their relation to organisms. *Carnegie I Wash*, 252:219-258.

McCoy S, Kamenos NA (2015). Coralline algae (Rhodophyta) in a changing world: integrating ecological, physiological, and geochemical responses to global change. *J Phycol*, 51:6-24.

McElhany P, Busch DS (2013). Appropriate pCO₂ treatments in ocean acidification experiments. *Mar Biol*, 1160:1807-1812.

Moore B, Roaf HE, Whitley E (1906). On the effects of alkalies and acids, and of alkaline and acid salts, upon growth and cell division in the fertilized eggs of *Echinus esculentus*. A study in relationship to the causation of malignant disease. *P R Soc B-Biol Sci*, 77:102-136.

INTRODUCCIÓN

Moro L, Martín JL, Garrido MJ, Izquierdo I (2003). Lista de especies marinas de Canarias (algas, hongos, plantas y animales). Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente del Gobierno de Canarias.250pp.

Munday PL, Dixson DL, Donelson JM, Jones GP, Pratchett MS, Devitsina GV, Døving KB (2009). Ocean acidification impairs olfactory discrimination and homing ability of a marine fish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106:1848-1852.

Munday PL, Dixson DL, McCormick MI, Meekan M, Ferrari MCO, Chivers DP (2010). Replenishment of fish populations is threatened by ocean acidification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107, 12930–12934.

Orr JC (2011). Recent and future changes in ocean carbonate chemistry. In: Ocean Acidification, Gatusso JP, Hansson L (Eds).Oxford University Press, 41-66pp.

Pinnegar JK, Polunin NVC, Francour P, Badalamenti F, Chemello ML, Harmelin-Vivien ML, Hereu B, Milazzo M, Zabala M, D'Anna G, Pipitone C (2000). Trophic cascades in benthic marine ecosystems: lessons for fisheries and protected-area management. *Environ Conserv*, 27:179-200.

Pfister CA, Esbaugh AJ, Frieder CA, Baumann H, Bockmon EE, White MM, Carter BR, Benway HM, Blanchette CA, Carrington E, McClintock JB, McCorkle DC, McGillis WR, Mooney TA, Ziveri P (2014). Detecting the unexpected: a research framework for Ocean acidification. *Environ Sci Technol*, 48:9982-9994.

Porzio L, Buia MC, Hall-Spencer JM (2011). Effects of ocean acidification on macroalgal communities. *J Exp Mar Biol Ecol*, 400:278-287.

Riebesell U, Gatusso JP (2015). Lessons learned from ocean acidification research. *Nature Clim Change*, 5:12-14.

Rubey WW (1951). Geologic History of sea water: an attempt to state the problem. *Geol Soc Am Bull*, 62: 1111-48.

Sala E (1997). Fish predators and scavengers of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in protected areas of the north-west Mediterranean Sea. *Mar Biol*, 129:531-539.

Sala E, Zabala M (1996). Fish predation and the structure of sea urchin *Paracentrotus lividus* populations in the NW Mediterranean. *Mar Ecol Prog Ser*, 140:71-81.

Sala E, Boudouresque CF, Harmelin-Vivien M (1998). Fishing, trophic cascades, and the structure of algal assemblages: evaluation of an old but untested paradigm. *Oikos*, 82:425–439.

Sabine CL, Feely RA, Gruber N, Key RM, Lee K, Bullister JL, Wanninkhof R., Wong CS, Wallace, DWR, Tilbrook B, Millero FJ, Peng TH, Kozyr A, Ono T, Rios AF (2004). The oceanic sink for anthropogenic CO₂. *Science*, 305: 367–371.

Sabine CL, Feely RA (2007). The oceanic sink for carbon dioxide. In: Reay D, Hewitt N, Grace J, Smith J (eds) Greenhouse gas sinks. CABI Publishing, Oxfordshire.

INTRODUCCIÓN GENERAL



Sangil C, Sansón M, Díaz-Villa T, Hernández JC, Clemente S, Afonso-Carrillo J (2014). Spatial variability, structure and composition of crustose algal communités in *Diadema africanum* barrens. *Helgol Mar Res*, DOI 10.1007/s10152-014-0401-8.

Santana-Casiano JM, González-Dávila M, Rueda MJ, Llinás O, González-Dávila EF (2007). The interannual variability of oceanic CO₂ parameters in the northeast Atlantic subtropical gyre at the ESTOC site. *Global Biogeochem Cy*, 21(1): 1015-1031.

Scheibling RE, Hamm J (1991). Interactions between sea urchins (*Strongylocentrotus droebachensis*) and their predator in field and laboratory experiments. *Mar Biol*, 110:105-116.

Shirayama Y, Thornton H (2005). Effect of increased atmospheric CO₂ on shallow water marine benthos. *J Geophys Res*, 110(C9):C09S08.

Spalding MD, Fox HE, Gerald GR, Davidson N, Fersaña ZA, Finlayson M, Halpern M, Jorge MA, Lombana AL, Lurie SA, Martin KD, McManus E, Molnar J, Recchia A, Roberson J (2007). Marine ecoregions of the world: A bioregionalization of coastal and shelf areas. *BioScience*, 57(7):573-583.

Tegner MJ, Dayton PK (1981). Population structure, recruitment and mortality of two sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus* and *S. purpuratus*) in a kelp forest. *Mar Ecol Prog Ser*, 5: 255-268.

Toledo H, Clemente S, Hernández JC (2014). Estimación del crecimiento del erizo de mar *Paracentrotus lividus*. *Revi Acad Canar Cienc*, (XXVI):263-279.

Tuya F, Martín JA, Reuss GM, Luque A (2001). Food preferences of the sea urchin *Diadema antillarum* in Gran Canaria (Canary Islands, central-east Atlantic Ocean). *J Mar Bio Ass UK*, 81:845-849.

Tuya F, Boyra A, Sánchez-Jerez P, Barcera C, Haroun RJ (2004). Relationship between rocky-reef fish assemblages, the sea urchin *Diadema antillarum* (Echinodermata: Echinoidea) in the eastern Atlantic. *Hydrobiologia*, 519:221-214.

Wernberg T, Smale DA, Thomsen MS (2012). A decade of climate change experiments on marine organisms: procedures, patterns and problems. *Global Change Biol*, 18:1491-1498.

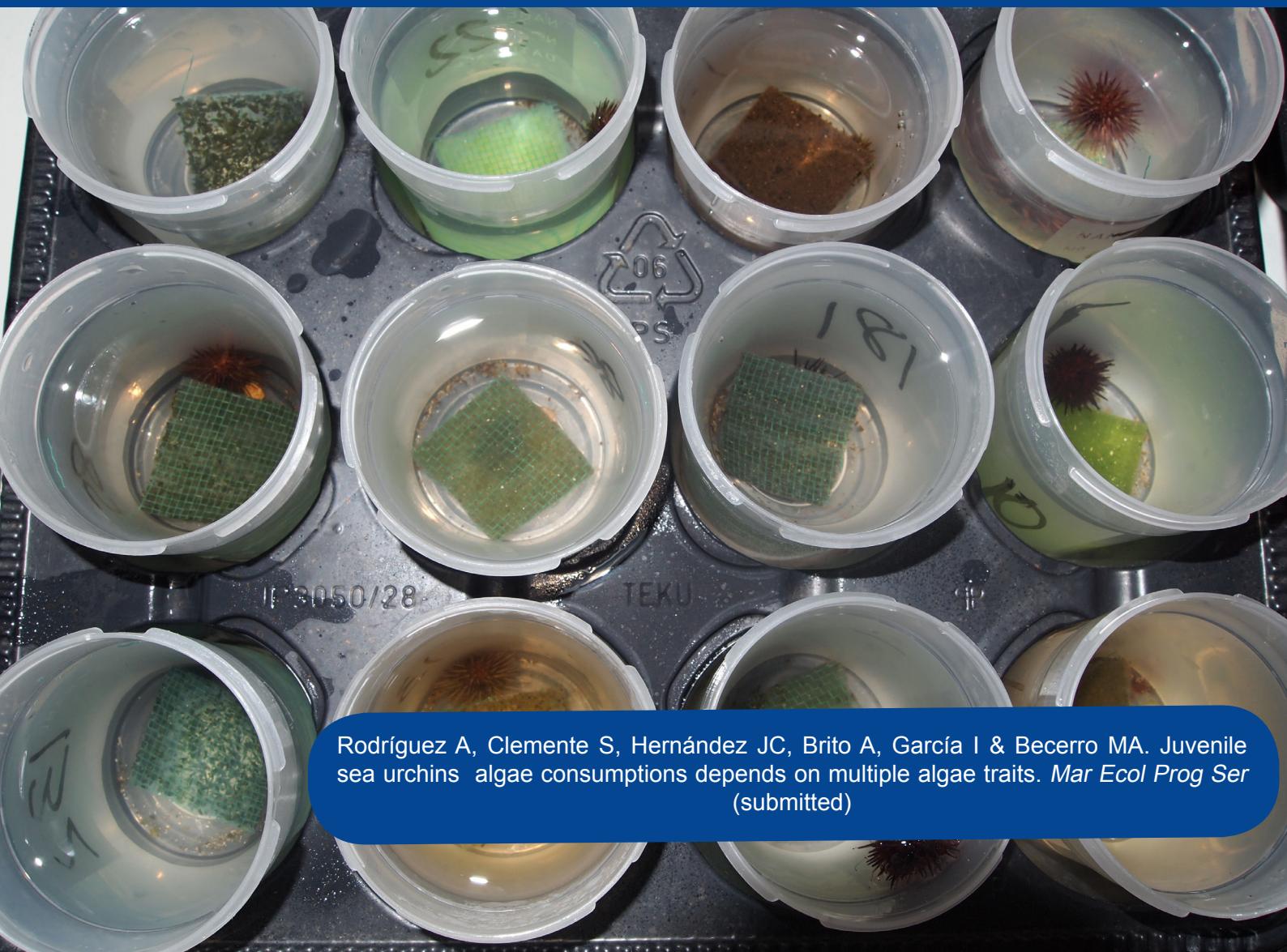
Wolfe K, Dwoejanyn S, Byrne M (2013). Effects of ocean acidification on survival, growth and skeletal development in the early benthic juvenile sea urchin (*Heliocidaris erythrogramma*). *Global Change Biol*, 19:2698-2707.



Sección I: Alimentación de juveniles de erizos de mar y efecto de la acidificación

Capítulo 1

“Juvenile sea urchins algae consumptions depends on multiple traits”



Rodríguez A, Clemente S, Hernández JC, Brito A, García I & Becerro MA. Juvenile sea urchins algae consumptions depends on multiple algae traits. *Mar Ecol Prog Ser* (submitted)

ÍNDICE

1. ABSTRACT	47
2. INTRODUCTION	48
3. MATERIAL AND METHODS	50
3.1. Algal and herbivore species	50
3.2. Nutritional traits	52
3.3. Consumption rates on fresh algae	53
3.4. Consumption rates on structure free algae	54
3.5. Consumption rates on agar based with algal extracts	55
3.6. Statistical analyses	56
4. RESULTS	57
4.1. Nutritional traits	57
4.2. Consumption rates of fresh algae	61
4.3. Consumption rates on structure free algae	63
4.4. Relativity of algal structural and chemical traits against herbivores	64
5. DISCUSSION	64
6. REFERENCES	69



1. ABSTRACT

Herbivory is a widespread biotic interaction with important ecological and evolutionary implications. Benthic marine systems show greater producer consumption than any other aquatic or terrestrial environment. Marine algae and plants have a variety of defensive mechanisms including the presence of structural, chemical, and nutritional traits with the capacity to reduce herbivore consumption. These mechanisms can function simultaneously, yet we have little evidence for their relative contribution to the overall defensive strategy of algae or plants. Here, we quantified consumption by juveniles of two common sea urchin species on 15 algal species i) to investigate the relative contribution of algal nutritional, chemical, and structural traits to the emerging patterns of consumption and ii) to assess whether this relative contribution varies as a function of herbivore species. The sea urchin *Diadema africanum* consumed more on high mineral content algae than on carbohydrate or lipid rich algae, while *Paracentrotus lividus* showed preference for none of these groups. Chemical and structural traits changed patterns of consumption in both sea urchin species; however, changes differed across algal and herbivore species. Compared to fresh algal consumption, removal of algal structure resulted in contrasting herbivore response, with about 2 times higher effect size in *Paracentrotus* and 14 times lower effect size in *Diadema*. Structural traits can therefore deter or enhance herbivore feeding. Although individual algal species can chemically deter herbivory, addition of algal extracts to edible food resulted in enhanced rather than deterred consumption, particularly in *Paracentrotus*. Overall, our results show evidence for the relativity of algal defensive mechanisms and suggest that multiple defensive traits are necessary to effectively deter herbivores in the field. Further research on the relative importance of these traits against other herbivore groups such as fish or specialists grazers will help to understand the interactions between multiple defensive strategies and shed light on the generality of our results.

2. INTRODUCTION

Herbivory is a widespread biotic interaction and evolutionary force that can regulate a number of ecological processes including species abundance and distribution, population dynamics, and community organization (Steneck et al 2002; Valentine & Duffy 2006; Connell et al 2013). Globally, grazers can take over 20% of the annual net primary productivity (Agrawal, 2011), a figure that can exceed 65% in high herbivore intensity systems such as benthic marine communities (Cry & Pace 1993, Gruner et al 2008, Poore et al 2012). These impressive consumption figures are caused by a phylogenetically diverse group of herbivores, particularly in marine environments (McCarty & Sotka 2013). Most benthic herbivores include fish, turtle, gastropods, sea urchins, crabs, amphipods, isopods, shrimps, polychaete worms, copepods, and a few insect species (see McCarty & Sotka 2013; John et al 1992; Fauchald et al 1979; Jangoux & Lawrence 1983; Hawkins & Hartnoll 1983; Pennings et al 1993; Littler et al 1995; Poore & Steinberg 1999; Cruz-Rivera & Hay 2000; Fauchald et al 1979). The impact of these herbivore species on the system is large, to the point that they can shift ecosystems into alternate states (Hernández et al 2013; Sangil et al 2014; Vergés et al 2014; Ling et al 2015). Compared to macro herbivores, mesograzers herbivores, ranging between 0.2 and 20 mm, have more specialized diets due to their limited mobility and high predation risk (Hay et al 1987; Brawley 1992; Duffy & Hay 1994; Poore & Steinberg 1999).

48

Given the strong top-down control of marine benthic systems (Shurin et al 2002) and the large diversity of herbivores, it is not surprising that benthic producers have evolved a number of strategies to minimize the negative effects of herbivory (Núñez-Farfán et al 2007; Vergés et al 2007a, b). Numerous plants inhibit herbivore consumption with behavioral, morphological, and chemical traits that function as deterrents, providing producers with multiple defensive strategies to decrease their vulnerability to herbivores (Duffy & Hay 1990, Hay et al 1994, Abrams 2001, Cruz Rivera & Hay 2000). Chemical deterrence is widespread in the marine benthos (Paul 1992, Hay 1996, McClintock & Baker 2001, Paul et al 2001, Craft et al 2013, Pawlik et al 2013, McCarty & Sotka 2013). Herbivores consume less biomass of chemically defended plants and seaweeds (Hay & Steinberg 1992, Craft et al 2013, Pawlik et al 2013), which also are less preferred than undefended species (Williamson et al 2004). There is ample evidence for the role



of algal and seagrass structural components against marine herbivores (Pennings & Paul 1992, Hay et al 1994, Lyons & Scheibling 2007). Nutritional traits also determine herbivore feeding choices, with preference for high over low nutritional value algae (Duffy & Hay 1990; Pennings et al 1993; Cruz Rivera & Hay 2003; Barile et al 2004; Lyons & Scheibling 2007; Duarte et al 2011). Alternatively, herbivores can increase consumption rates when feeding on algae with low nutritional content (Slansky & Wheeler 1992; Cruz Rivera & Hay 2000). Since these traits may function simultaneously in the producer, they could either complement or counteract each other, strengthening or weakening the defensive role of individual traits. In fact, weakening could cancel a defensive trait and potentially act as a feeding enhancer. For example, structural and chemical traits may act additively or synergetically against herbivores (Hay 1997; Schupp & Paul 1994; Pennings et al 1996), yet, high nutritional content may turn these defensive traits ineffective (Hay et al 1994). How these mechanisms interact with each other has received little attention (Hay et al 1994), but their contribution to the overall deterrent effect is critical to understand herbivory in real systems. Our study adds to the limited information on this topic by quantifying major nutritional traits on 15 algal species and measuring sea urchin consumption patterns on fresh and manipulated algal treatments.

Sea urchins are known to exert strong control on algal populations and trigger ecosystem phase shifts (Sangil et al 2014; Ling et al 2015). Collapse of the sea urchin *Diadema antillarum* is behind the shift from coral to algal dominated communities throughout the Caribbean region (Lessios et al 1984; Hughes et al 1987). In the Canary Islands, the species *Diadema africanum* is likely the most abundant herbivore in rocky reef communities, with densities exceeding 10 individual/m² (Hernández et al 2013) that cause extensive barren grounds (Hernández et al 2008). *Paracentrotus lividus* is another sea urchin species common in shallow subtidal communities in the Canary Islands (Girard et al 2008; Hernández et al 2013), with densities between 1 and 2 individuals/m² (Girard unpublished data). At these densities, *P. lividus* can reduce in just six months non-crustose algal cover by 25% (Palacin et al 1998), which is consistent with the presence of small barren grounds associated with this species in shallow subtidal rocky reefs in the Canarian Archipelago (authors' pers.obs). Small densities of both sea urchin species are capable of modifying algal communities substantially (Palacin et al 1998; Hernández et al 2008).

CAPÍTULO 1

Most information on sea urchin herbivory refers to adults and feeding habits on earlier stages of developments is scarce (Williamson et al 2004). However, ontogenetic diet shifts are common in marine organisms including many marine invertebrates (Hentschel 1998; Johnston 2003; Williamson et al 2004). In this study, we aimed to understand whether algal consumption by juvenile sea urchin species is determined by algal nutritional, structural, and chemical traits. We quantified carbohydrate, lipid, protein, and ash contents in 15 algal species that were offered in manipulative experiments to juveniles of two sea urchins species, *Diadema africanum* and *Paracentrotus lividus*. We ran multiple experiments to obtain consumption rates associated with unmanipulated algae and to dissociate the effect of structural and chemical defenses. We then used meta-analysis to combine the results from our multiple experiments to test whether algal structural and chemical traits provided defense against herbivores and whether the relative contribution of these traits to consumption patterns varied as a function of herbivore species. Our results show evidence for the relativity of defensive mechanisms in algae, with traits that can either enhance or deter feeding depending on the herbivore species, and suggest that multiple traits are necessary to cope with herbivory in the field.

50

3. MATERIAL AND METHODS

We followed an observational and experimental approach using 15 algal and 2 herbivore species. Our observations quantified four nutritional traits of all algal species, while experiments provided a measure of herbivore consumption under multiple algal manipulations.

3.1. Algal and herbivore species

We chose 7 brown, 4 red, and 4 green algae for a total of 15 algal species (Table 1). All algae are common in the Canary Islands, although they vary substantially in percent cover between locations (Sangil 2011; Sangil et al 2014). We collected all algal species from Punta del Hidalgo ($28^{\circ} 34' 23.4''$ N, $16^{\circ} 32' 47.87''$ W) and Puerto de la Cruz ($28^{\circ} 25' 4.37''$ N, $16^{\circ} 32' 47.87''$ W), both in the island of Tenerife (Canary Islands). Algae were placed underwater in plastic bags



and taken to the laboratory within 3-4 hours. Once in the laboratory, algae were distributed in 400L aerated seawater tanks until the beginning of the experiment (same day of collection, see below).

Table 1. List of the fifteen algae species chosen for sea urchin consumption experiments. Type of defensive traits known for each species and its reference in the literature are shown. Species of algae are pooled by class (Brown, red and green). Ch: Chemical defenses; Str: Structure defences; Unk: Unknown.

	Algae	Defenses	References
Brown	<i>Colpomenia sinuosa</i> (Roth) Derbès & Solier,1851	Ch Sr	Granado & Caballero 2001
	<i>Cystoseira abies-marina</i> (S.G.Gmelin) C. Agardh,1820	Ch	Granado & Caballero 2001
	<i>Dictyota dichotoma</i> (Hudson) J.V. Lamouroux,1809	Ch	Bianco et al 2010
	<i>Halopteris scoparia</i> (Linnaeus) Sauvageau,1904	Ch	Frantzis & Grémare 1992
	<i>Lobophora variegata</i> (J.V.Lamouroux) Womersley ex E.C. Oliveira,1977	Ch	Kubanek et al 2003
	<i>Padina pavonica</i> ,(Linnaeus)Thivy,1960	Str Ch	Lewis et al 1987 Kamenarska et al 2002
Red	<i>Stypopodium zonale</i> (J.V.Lamouroux) Papenfuss,1940	Ch	Paul and Hay 1986, Hay et al 1987
	<i>Asparagopsis taxiformis</i> ,(Delile) Trevisan de Saint-León ,1845	Ch	Manilal et al 2010
	<i>Ellisolandia elongata</i> (J.Ellis & Solander)	Str	Hay et al 1988c
	K.R:Hind & G.W.Saunders, 2013		
Green	<i>Gelidium canariense</i> (Grunow) Seoane Camba	Unk	
	<i>Lophocladia trichoclados</i> (C.Agardh) J.Agardh,1890	Ch	Paul and Hay 1986
	<i>Cladophora liebetruthii</i> Grunow,1884	Unk	
	<i>Codium intertextum</i> Collins & Hervey,1917	Unk	
	<i>Ulva compressa</i> Linnaeus,1753	Unk	
	<i>Ulva rigida</i> C.Agardh,1823	Unk	

We used the sea urchins *Diadema africanum* (hereafter *Diadema*) and *Paracentrotus lividus* (hereafter *Paracentrotus*) as herbivore species. We selected juveniles ranging 4 to 15 mm in size (test diameter, not including spines). Juveniles of *Diadema* were collected in Abades ($28^{\circ} 8'31.05''N$, $16^{\circ}26'12.49''W$) while juveniles of *Paracentrotus* were collected in La Caleta ($28^{\circ} 16'20.33''N$, $16^{\circ}23'4.43''W$), both in the island of Tenerife. These localities are known to have large recruitment episodes for each species respectively, facilitating collection and minimizing the impact on natural populations (Girard et al 2008; Hernández et al 2013). Juveniles were placed underwater in plastic containers and transferred to the laboratory within 3-4 hours. Once in the laboratory, each species was placed in a 400L tank with aerated sea water for 3 days before the experiments started. During this time, they were fed with a variety of algal species of the genus *Ulva* and *Dictyota*.

3.2. Nutritional traits

We quantified carbohydrate, lipid, protein, and ash content of algal species as an estimate of algal nutritional traits. Total carbohydrates was determined by Antrona's method (Adrian et al 2000). Briefly, antrona (9, 10-dihidro-9-oxoantraceno) reacts with glucose forming colored derivatives whose concentrations can be determined measuring the signal at 580 nm in a spectrophotometer (Adrian et al 2000). We mixed 100 mg (wet mass) of algae with 15 ml of perchloric acid (52%) and 10 ml of distilled water. The resultant solution was filtered and treated with Antrona reactive (Sulphuric Acid 76% and Antrona reactive 0.1%), then boiled for 12 minutes prior to quantification.

Concentrations of lipids were quantified following a modified version of the method described in Christie (1982). Lipids were extracted with chloroform-methanol (2:1 by vol) from previously weighed tissues (200 mg dry mass) and centrifuged at 3500 RPM for 15 min. The lower phase, corresponding to lipids, was extracted, placed in glass containers, dried under vaccum at room temperature, and weighed. We then calculated total lipid content as the weight of the lipidic fraction over the total dry mass times 100.

Concentrations of proteins were calculated following the Kjeldahl method (A.O.A.C., 2006).



The Kjeldhal method consisted in 3 phases: digestion, distillation, and valuation. The result is the percentage of nitrogen present in the initial sample. The final result is calculated after applying a correction factor that provides the actual protein percentage that originated the amount of nitrogen observed. We used a correction factor of 6.25 for each algal species (Jones 1931).

Concentrations of ashes were determined by incinerating 3 g (dry mass) of every algal species in a furnace at 450°C for 24 hours (A.O.A.C. 1984). The resulting residue is free of water and organic matter, providing the total amount of minerals in the sample. We calculated ash content as the weight of the residue over the algal weight times 100.

3.3. Consumption rates on fresh algae

We used a number of feeding experiments to quantify sea urchin consumption rates for each of the 15 algae we investigated. Essentially, we offered a single sea urchin a known amount of food and calculated consumption as the weight difference before and after the experiments.

Our first experiment calculated consumption rates on fresh algae. For each sea urchin species we had 15 treatments (one for each algal species) that were replicated 10 times. Since every replicate had one juvenile sea urchin, for this experiment we used a total of 150 individuals of *Diadema* (5-11 mm) and 150 individuals of *Paracentrotus* (4.5-11 mm). All juveniles were captured in February (*Diadema*) and March (*Paracentrotus*) 2012. The 15 species of algae were collected the same day that the experiment started. Every individual sea urchin was measured with a calliper and all algal pieces were cleaned and weighed right before the experiment. To remove excess of water in our samples and to minimize weight errors associated with water content on the surface of the alga, we spin algal pieces 20 times in a salad spinner just before they were placed on an analytical balance (precision ± 0.001 g). Each sea urchin was then placed in an aerated 100 ml beaker with 100 ml of sea water and the corresponding algal treatment.

We also set five additional control replicates for each algal species to account for intrinsic mass changes unrelated to herbivory, such us growth or adaptability to experimental conditions (Roa,

1992). These replicates were therefore identical to the remaining algal treatments except for their lack of sea urchins. We used these algal specific changes in biomass to calculate a correction factor that allowed a more accurate quantification of the actual algal biomass consumed by sea urchins.

Experiments ran for 6 days in a temperature-controlled (21°C) environmental chamber with natural light/dark cycle. Water in each beaker was replaced on a daily basis. At the end of the experiment, we weighed all algal pieces again to quantify mass changes during the experiment. To determinate the mass loss associated with the sea urchin feeding activity, we used the equation

$$C_{tot} = \frac{B_{ti} * \left(\frac{B_{cf}}{B_{ci}} \right) - B_{tf}}{B_{ti} * \left(\frac{B_{cf}}{B_{ci}} \right)} * 100$$

where C_{tot} was the percentage of alga consumed, B_{ti} was the initial algal mass in the treatment, B_{tf} was the final algal mass in the treatment, B_{ci} was the average of initial algal mass in the absence of herbivores (controls), and B_{cf} the average of the final algal mass in the absence of herbivores (controls). The ratio B_{cf}/B_{ci} accounted for biomass changes intrinsically associated with each algal species. Ratio values above or below one accounted for algal growth or shrinkage during the course of the experiment, respectively, minimizing our chances to underestimate or overestimate consumption rates.

3.4. Consumption rates on structure free algae

To evaluate how algal morphological and structural traits affected sea urchin consumption, we converted all algal species into a fine powder that was incorporated into an agar-based food that was offered to individual sea urchins. All 15 seaweed species were lyophilized for 48 hours and then ground to a fine powder using a Wilwy mini-mill with an 180 µm mesh sieve. Agar-based foods were prepared by boiling a mixture of 1.25 g of agar and 50 ml of water that were boiled in a microwave. Once the solution started boiling, we took it out of the microwave, stirred it thoroughly, added 2 g of seaweed powder, and stirred it again to obtain a homogeneous agar



based food solution. We set a window screening layer over wax paper on which we placed a rectangular mold where the agar based seaweed mixture was poured. After cooling down the mix solidified. We then used a cutter to obtain 3x3 cm replicates that were placed in experimental units (modified from Hay et al 1994; Pennings & Paul 1992).

Experimental design was identical to that described earlier except that no additional controls to account for algal intrinsic changes were necessary (see Peterson & Renaud 1989). Each experimental unit had a single sea urchin and a 3x3 agar based replicate in an aerated 100 ml beaker. We used 10 replicates of 15 algal treatments for each sea urchin species. Sea urchins were sampled in June 2012 in the same locations described above and the 150 specimens of *Diadema* ranged from 4.5 to 11.5 mm while the 150 specimens of *Paracentrotus* ranged from 5 to 13 mm in test diameter. Again, the experiment ran for 6 days. At the end of the experiment, we counted the number of window screening squares eaten (free of agar) in each treatment. Percentage eaten was calculated as number of squares eaten over total number of squares, times 100.

3.5. Consumption rates on agar based food with algal extracts

To test whether or not algae were chemically defended, we incorporated algal extracts at naturally occurring concentrations into an agar-based food that was offered to individual sea urchins. We used 3.250 gr of lyophilized, ground algae to extract algal secondary metabolites. We ran three successive, 45min extractions with 50 ml acetone. After each extraction, the extract solution was filtered and poured into a beaker. The three extract solutions for each alga were combined into a single beaker, dried down under rotary evaporation, and the resulting residue weighed and stored in the freezer until experiments were run.

We used freeze-dried and ground *Ulva compressa* as the base for our agar based food, which was prepared as described above. Algal extracts were dissolved in 2 ml of acetone and incorporated into the agar-based food before pouring it into the mould. Because the agar-based food had 2 gr of alga and 1.25 gr of agar, all extracts were at naturally occurring concentrations (dry mass) in the agar-based food. The *U. compressa* treatment functioned as control food, which

was identically prepared except that we added 2 ml of acetone instead of 2 ml of acetone with extract.

Experimental design was identical to that described above. Each experimental unit had a single sea urchin and a 3x3 agar based replicate in an aerated 100 ml beaker. We used 10 replicates of 15 treatments for each sea urchin species. Sea urchins were sampled in June and September 2012 in the same locations described as above and the 150 specimens of *Diadema* ranged from 6 to 15 mm while the 150 specimens of *Paracentrotus* ranged from 4 to 12 mm. Again, the experiment ran for 6 days. At the end of the experiment, we counted the number of window screening squares eaten (free of agar) in each treatment. Percentage eaten was calculated as number of squares eaten over total number of squares, times 100.

3.6. Statistical analyses

56

We used a number of univariate, multivariate, and meta-analytical techniques to understand patterns of consumption and to elucidate whether or not they were mediated by nutritional, structural, and chemical traits. Statistical analyses consisted on 1 way-permutational ANOVAs with Euclidean distances of raw data and 4999 permutations of the appropriate exchangeable units (Anderson 2004). For each studied variable we used one way designs to test for differences between algal nutritional groups or algal species (fixed factors). When necessary, we used permutation techniques to calculate pair wise *a posteriori* comparisons (Anderson 2004). When the number of permutations was small, we used the Monte Carlo p-values ($n=4999$) (Anderson & Robinson 2003). Additionally, we used a multiple regression and Principal Components Analysis (PCA) to look at the relationship between nutritional traits and sea urchin consumption of fresh algae. Data were analyzed in SPSS 15.0 and PRIMER 6 & PERMANOVA+ (Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research; Clarke and Warwick, 2001).

Because the six experimental feeding assays in this study were run independently, we used meta-analysis to combine all results and test additional hypotheses. Meta-analysis provides a formal framework for the quantitative synthesis of results from independent datasets (Adams et al 1997). It transforms the outcome of each experiment into a measure of the effect size, which



in our study is based on sea urchin consumption rates. We used Hedges' d as the metric in our meta-analysis, which corresponds to the differences in consumption between treatment and control means, weighed by sample size and pooled standard deviation (Hedges & Olkin 1985). We ran a random effects model to estimate the mean effect size because we believed effect sizes may differ between algal and herbivore species (Gurevith & Hedges 2001, Borenstein et al 2009). Meta-analysis was carried out using Comprehensive meta-analysis statistical program (Borenstein et al 2009). Using this technique, we tested whether algae as a group were structurally or chemically defended and looked for differences in consumption patterns between the two herbivore species.

4. RESULTS

4.1. Nutritional traits

The percentage of carbohydrates, lipids, proteins, and ashes significantly varied between algal species (Table 2, Figure 1). Rather than randomly distributed, algal ordination based on these traits (Principal Components Analysis, 98.5% of total variance explained) positioned algae along three directions driven by carbohydrates, ashes, and lipids, resulting in three algal groups (Figure 2). These groups included red, green, and brown algal species and differed in their nutritional traits despite the large differences in traits found at the species level (Table 2, Figure 3).

CAPÍTULO 1

Table 2. A. Results of the one-way permutational ANOVAs on the concentrations of carbohydrates, lipids, proteins, ashes and chemical extracts among groups of algae obtained in PCA analysis (Ash rich, Carbohydrate rich and Lipid rich algae) and between the different species of algae tested. B. Estimates for pairwise comparisons of significant factors are shown for comparison between groups of algae (Ash rich, Carbohydrate rich and Lipid rich). Significant results ($p < 0.05$) are shown in bold.

A. Source of variation		df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
Carbohydrates	<i>Groups</i>	2	7603.9	3801.9	8.95	0.000
	<i>Algae (Groups)</i>	12	5097.8	424.81	80.01	0.000
	<i>Residual</i>	30	159.28	5.31		
	<i>Total</i>	44	12861			
Lipids	<i>Groups</i>	2	108.35	54.18	3.72	0.040
	<i>Algae (Groups)</i>	12	174.54	14.54	95.22	0.000
	<i>Residual</i>	30	4.58	0.15		
	<i>Total</i>	44	287.47			
Proteins	<i>Groups</i>	2	179.35	89.67	3.78	0.051
	<i>Algae (Groups)</i>	12	284.64	23.72	346.57	0.000
	<i>Residual</i>	30	2.05	6.84E-2		
	<i>Total</i>	44	466.04			
Ashes	<i>Groups</i>	2	11431	5715.7	20.31	0.000
	<i>Algae (Groups)</i>	12	3377.7	281.48	21.31	0.000
	<i>Residual</i>	30	396.24	13.21		
	<i>Total</i>	44	15205			
Chemical extracts	<i>Group</i>	2	1.04	0.52	7.09	0.012
	<i>Algae (Groups)</i>	12	0.88	7.31E-2		
	<i>Residual</i>					
	<i>Total</i>	14	1.91			
B. Pair-wise		Groups		T	P (MC)	
<i>Carbohydrates</i>		Ashes vs. Carbohydrates		3.102	0.015	
		Ashes vs. Lipids		0.212	0.834	
		Carbohydrates vs. Lipids		2.989	0.020	
		Ashes vs. Carbohydrates		1.205	0.267	
<i>Lipids</i>		Ashes vs. Lipids		2.674	0.025	
		Carbohydrates vs. Lipids		1.313	0.233	
		Ashes vs. Carbohydrates		4.258	0.003	
		Ashes vs. Lipids		5.888	0.001	
<i>Ashes</i>		Carbohydrates vs. Lipids		1.231	0.263	
		Ashes vs. Carbohydrates		4.911	0.001	
		Ashes vs. Lipids		0.737	0.463	
		Carbohydrates vs. Lipids		2.352	0.052	

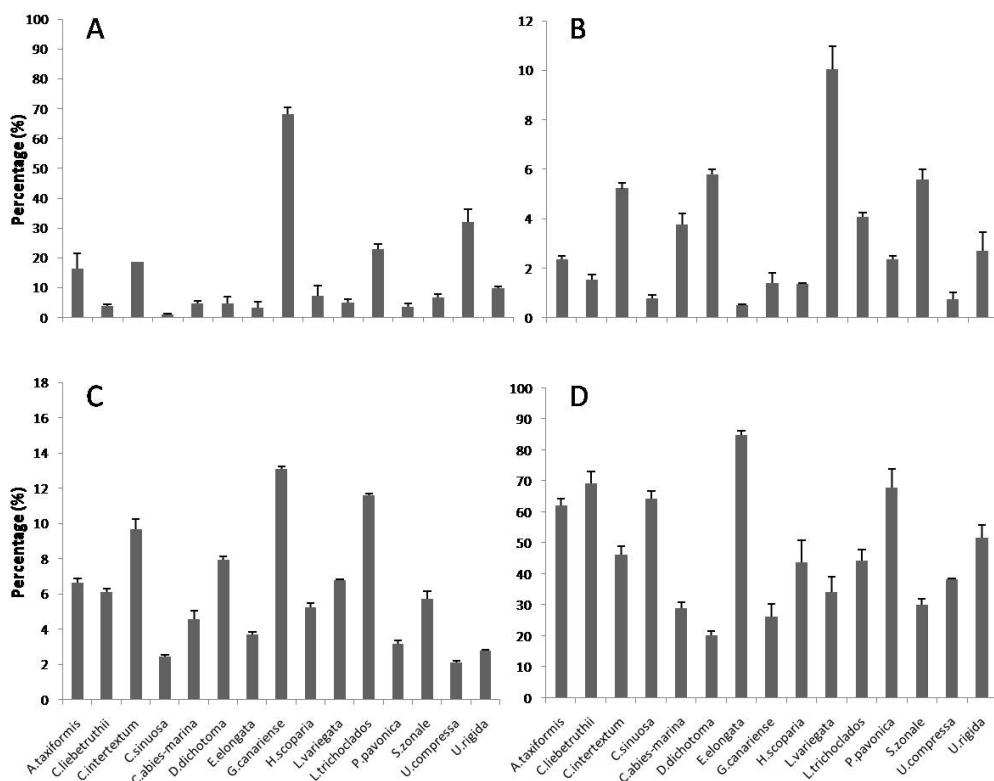
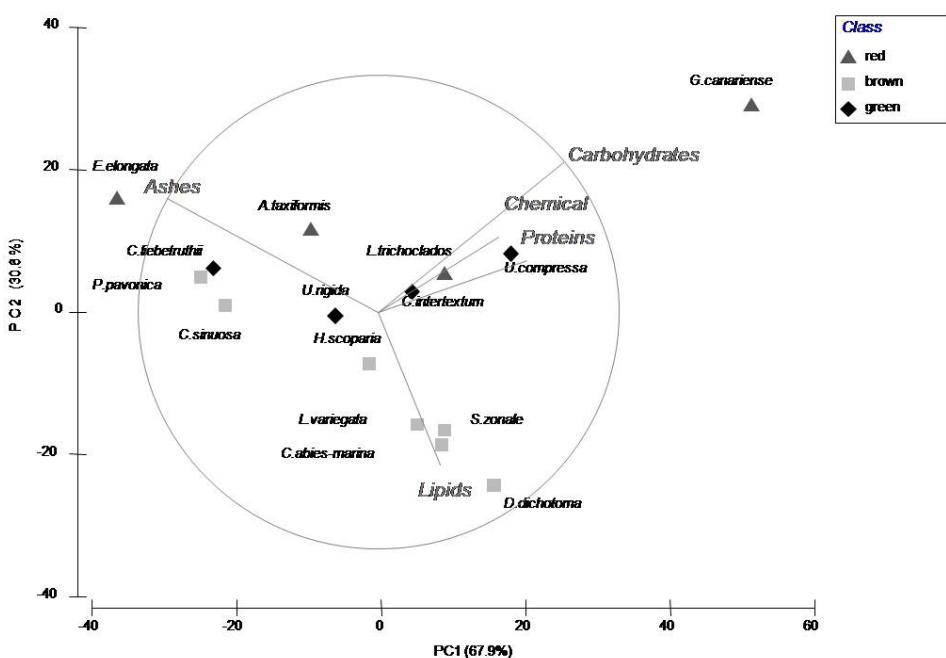


Figure 1. Percentage of nutritional content of each species of algae used in sea urchin consumption experiments. **A.** Carbohydrates. **B.** Lipids. **C.** Proteins and **D.** Ashes. n=3.



59

Figure 2. Principal Components Analyses (PCA) showing the first 2 axes that explain the 98.5% of variability (67.9% first axis and 30.6% second axis) based on carbohydrates, proteins, lipids and ashes contents of each species algae (15 species: *A. taxiformis*, *C. liebetrichii*, *C. intertextum*, *C. sinuosa*, *C. abies-marina*, *D. dichotoma*, *E. elongata*, *G. canariense*, *H. scoparia*, *L. variegata*, *L. trichoclados*, *P. pavonica*, *S. zonale*, *U. compressa* and *U. rigida*). The species of algae were pooled by class of algae (red, brown or green).

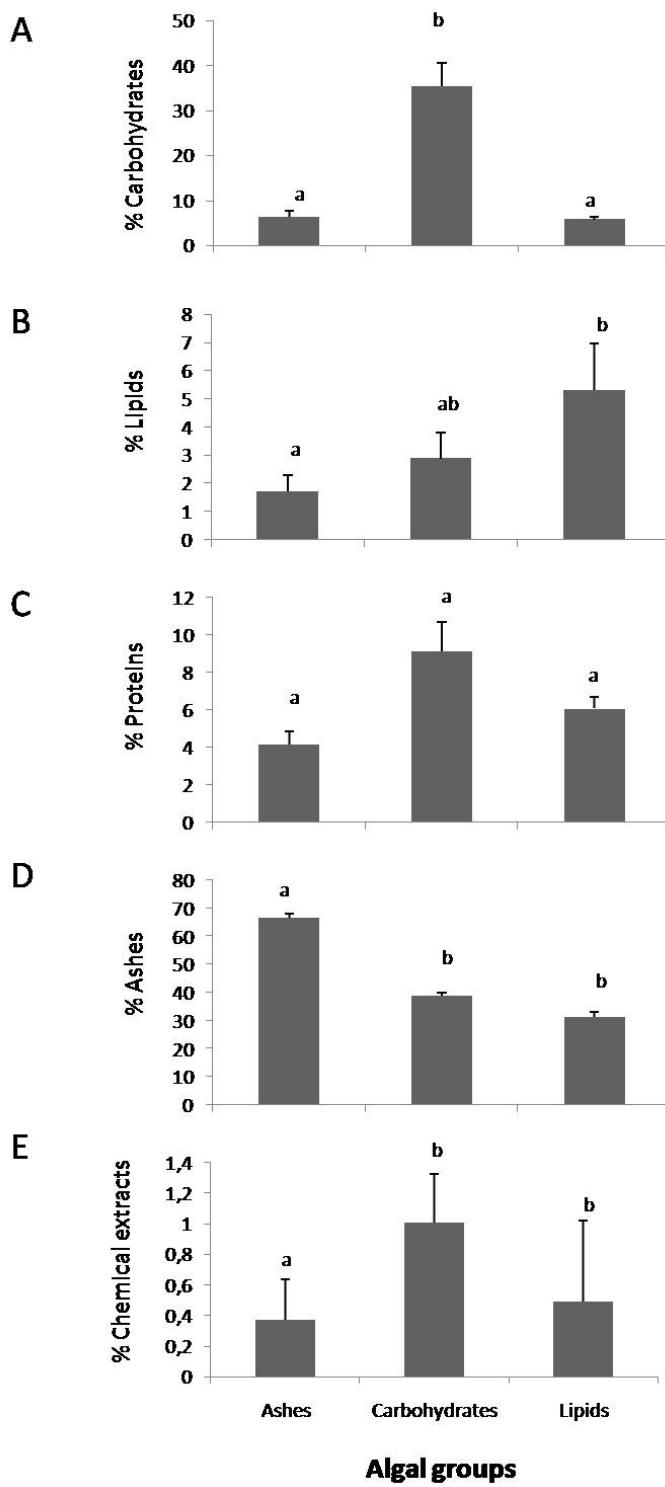


Figure 3. Medium value in percentage \pm SE by each group obtained of PCA for A. Carbohydrates. B. Lipids. C. Proteins. D. Ashes and E. Chemical extracts. The different letters show significant differences ($p < 0.05$).



4.2. Consumption rates of fresh algae

Because species within the groups differed in their nutritional traits, we ran a nested ANOVA to test for differences in consumption rates as a function of nutritional group and species (nested within nutritional groups, (Table 3). *Diadema* consumed more ash rich algae than carbohydrate and lipid rich species, while *Paracentrotus* equally consumed species from the three groups (Figure 4). Of the total consumption variance in *Diadema*, nutritional group accounted for over 25%, while variation at the species level was less than 8% (Table 3A). Significant variation in *Paracentrotus* consumption occurred at the species level, accounting for 22% of the total variance (Table 3B). *Diadema* consumption on fresh algae was positively associated with the percentage of ash and chemical extracts in the algae (see Figure 5). No association was found in *Paracentrotus*.

Table 3. Results of the one-way permutational ANOVA on consume rates of fresh algae in **A.** *Diadema africanum* and **B.** *Paracentrotus lividus* among algal groups (Ash rich, Carbohydrate rich and Lipid rich algae) and between the different species of algae tested. Estimates for pairwise comparisons of significant factors are shown for comparison between groups of algae (Ash rich, Carbohydrate rich and Lipid rich). Significant results ($p < 0.05$) are shown in bold. The variance (V) of each factor is showed in percentage.

A. *Diadema africanum*

Source of variation	Df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	V(%)
<i>Groups</i>	2	19880	9940.1	6.36	0.009	25
<i>Algae (Groups)</i>	12	18759	1563.3	2.20	0.014	9.23
<i>Residual</i>	135	95895	710.33			26.65
<i>Total</i>	149	1.3453E5				

Pairwise

	Group	T	P (MC)
	Ashes vs. Carbohydrates	2.90	0.021
<i>Diadema africanum</i>	Ashes vs. Lipids	3.15	0.011
	Carbohydrates vs. Lipids	0.04	0.968

B. *Paracentrotus lividus*

Source of variation	Df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	V (%)
<i>Groups</i>	2	2020.9	1010.5	0.17	0.844	Ns
<i>Algae (Groups)</i>	12	70026	5835.5	6.17	0.000	22.11
<i>Residual</i>	135	1275.9E2	945.14			30.74
<i>Total</i>	149	1996.4E2				

CAPÍTULO 1

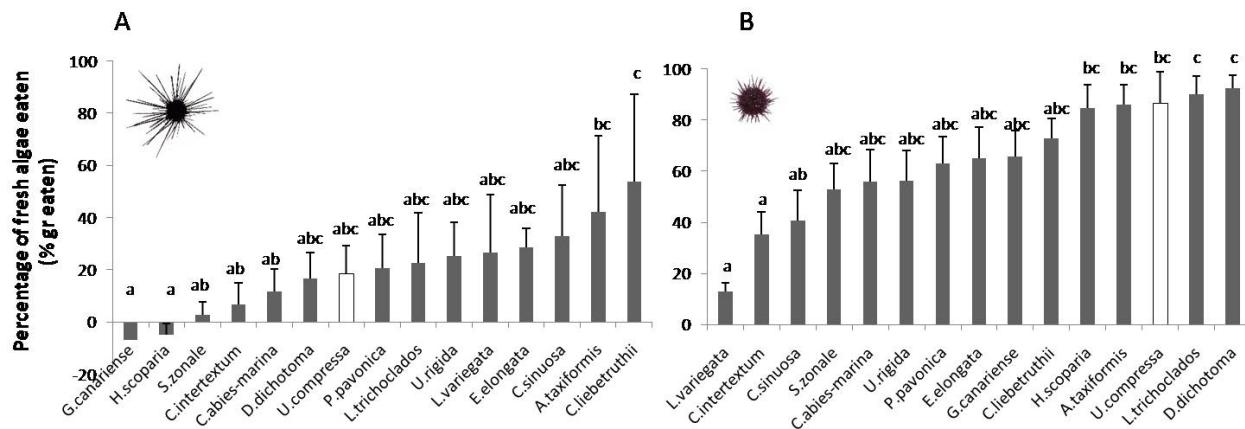


Figure 4. Medium value \pm SE of consume rates (in percentage of fresh algae eaten) of each algae species for the sea urchins *D. africanum* (A) and *P. lividus* (B). Different letters show significant differences ($p<0.05$) for $n=10$.

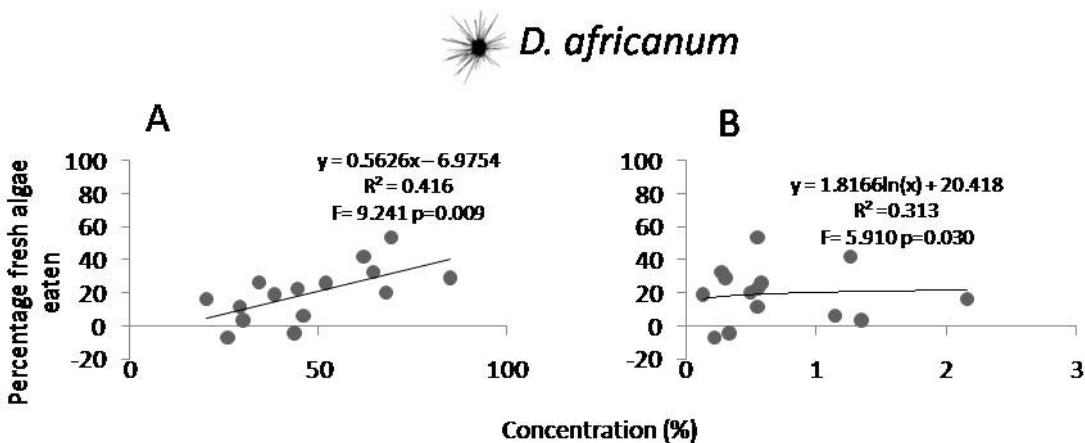


Figure 5. Lineal and log-linear relationships between consume rates of fresh algae and nutritional contents for juveniles of the sea urchin *D. africanum*; only significant differences are shown. A. Ashes concentration. B. Chemical extraction concentration.



4.3. Consumption rates on structure free algae

Diadema consumption of agar-based food with ground algae differed significantly between species ($F= 2.886$, $p=0.001$, Figure 6A). We found no significant differences in *Paracentrotus* consumption of ground algae ($F= 0.901$, $p=0.557$, Figure 6B).

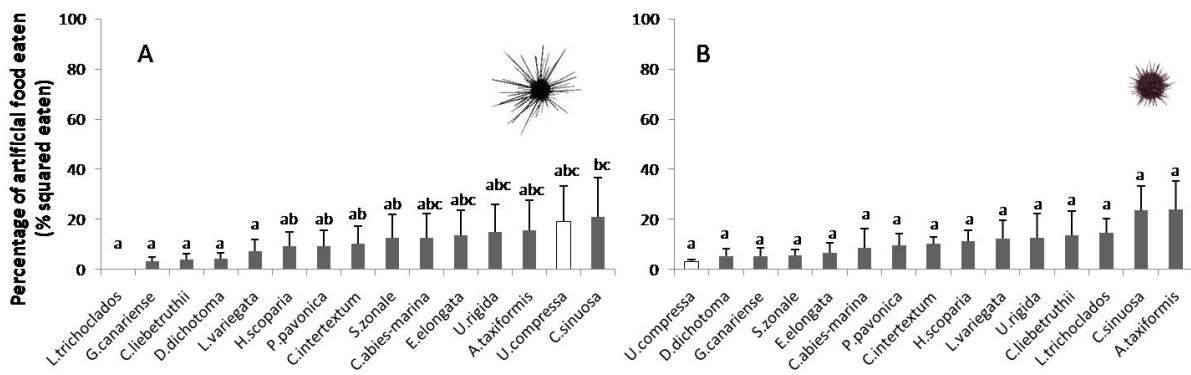


Figure 6. Medium values \pm SE of consume rates (in percentage of artificial food eaten) of each algae species for the sea urchins *D. africanum* (A) and *P. lividus* (B). Different letters show significant differences ($p<0.05$).

4.4. Consumption rates on agar-based food with algal extracts

Diadema and *Paracentrotus* consumption of agar-based, structure free *Ulva compressa* varied as a function of algal extract ($F=7.855$, $p<0.001$, Figure 7A and $F= 2.237$, $p=0.007$, Figure 7B; respectively). Most and least consumed algal extracts differed between the two sea urchin species (Figure 7).

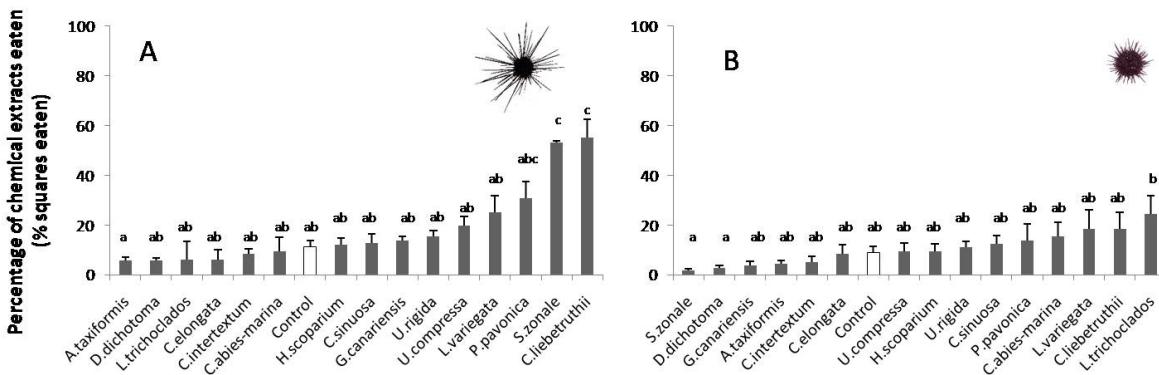


Figure 7. Medium value \pm SE of consume rates (in percentage of chemical extracts eaten) of each algae species for the sea urchins *D. africanum* (A) and *P. lividus* (B). Same letters show not significant differences and different letters show significant differences ($p<0.05$).

4.5. Relativity of algal structural and chemical traits against herbivores

We combined the results of our experiments and used meta-analysis to test for the deterrence of algal structural and chemical traits against herbivores and to evaluate their relative contribution to the overall algal defensive strategy (Figure 8). *Diadema* and *Paracentrotus* differed in their consumption of fresh ($Q=15.944$; $df=1$; $p<0.001$, Figure 8A) and structure free ($Q=43.151$; $df=1$; $p<0.001$, Figure 8B) algae. We found significant effects sizes between fresh, structure free, and agar-based food with algal extracts for both sea urchin species (*Paracentrotus*: $Q=50.331$, $df=2$, $p<0.001$; *Diadema*: $Q=34.263$, $df=2$, $p<0.001$).

As compared to fresh algae, *Paracentrotus* significantly increased while *Diadema* significantly reduced consumption of structure free algae ($p<0.05$, Figure 8D-E). We found no significant differences in consumption of agar-based food with algal extracts between the two sea urchin species ($Q=2.448$; $df=1$; $p>0.05$, Figure 8C). As compared to fresh algae, we found that addition of algal extracts significantly enhanced rather than deterred *Paracentrotus* consumption ($p<0.05$, Figure 8D) while algal extracts had no significant effect on *Diadema* consumption ($p>0.05$, Figure 8E).

5. DISCUSSION

Understanding the complex nature of herbivory is challenging. According to the optimal foraging theory (OFT) consumers rank resources as a function of their energetic value per unit handling time (Araujo et al 2011). Ultimately, this ranking depends on both resource and consumer traits such as resource nutritional content and consumer nutritional demand (Augustine et al 2011) or resource defensive mechanisms and consumer capacity to cope with such mechanisms (Cronin & Hay 1996), among others. In our study, we investigated whether algal nutritional, chemical, and structural traits explain patterns of consumption of two sea urchin on 15 algal species. Our data showed evidence for the flexible contribution of these traits to consumption patterns of two common sea urchin species, suggesting that algae rely on multiple traits to cope with the diversity of herbivores in the field.

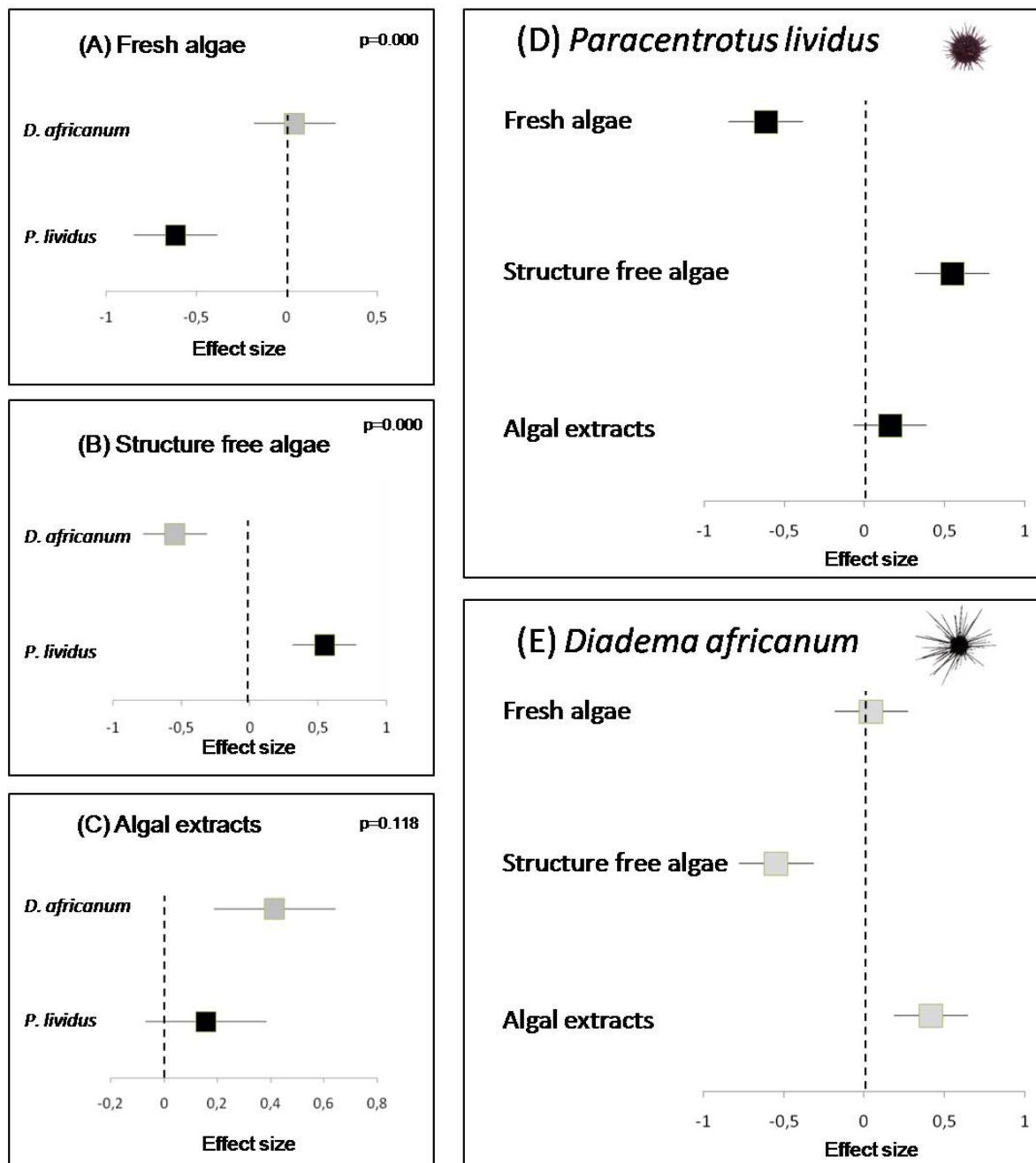


Figure 8. Effect size and confidence intervals (CI) from the meta-analysis including all feeding assays. Individual species have 95% CIs generated using non-parametric variances. For the grand mean, we used all assays of *U. compressa*. **(A)** Effect size and confidence intervals (CI) from meta-analysis of fresh algae feeding assays. **(B)** Effect size and confidence intervals (CI) from meta-analysis of artificial consumption feeding assays. **(C)** Effect size and confidence intervals (CI) from meta-analysis of chemical consumption feeding assays. **(D)** Effect size and confidence intervals (CI) from meta-analysis of *Paracentrotus lividus* and **(E)** Effect size and confidence intervals (CI) from meta-analysis of *Diadema africanum*. The p-value between species in (A), (B) and (C) is showed. In all experiments *D. africanum* as gray square and *P. lividus* as black square.

Nutritional traits seem to be unrelated to the patterns of consumption in *Diadema africanum* and *Paracentrotus lividus*, which is in contrast with the relationship observed in other organisms (Rico 1989; Cruz-Rivera & Hay 2003; Tomas et al 2011?). First, *Paracentrotus lividus* consumed any algae regardless their nutritional content. The large nutritional traits we quantified in our group may not represent well the nutritional demands of *Paracentrotus*, which did show significant differences in consumption between algal species. Known preferred algal species of juveniles of *Paracentrotus* are *P. pavonica*, *E. elongata*, *Cystoseira spp*, and *Halopteris scoparia* (Nédélec 1982; Verlaque 1987; Rico 1989), which is consistent with the results of our study. Since we used a larger number of algal species than previous studies, the group of algal species most consumed by *Paracentrotus* in our study included additional species such as *D. dichotoma*, *L. trichoclados*, or *U. compressa*. Second, *Diadema africanum* consumed larger quantities of ash rich than carbohydrate or lipid rich algae. Ash rich algae had lower carbohydrate and lipid concentrations than carbohydrate and lipid rich algae, respectively, and also had the lowest concentrations of secondary metabolites of any algal group. Protein concentrations showed no variation between algal groups. Given these differential nutritional traits between algal groups, *Diadema* consumption patterns might be driven by structural or chemical traits rather than actual nutritional contents in the algae. *Diadema* larger consumption of structurally rich and chemically poor algae may respond to the capacity of this sea urchin species to feed on and process such traits, which is further discussed below. Should ash rich algae be energetically poor or have limited concentrations of a desirable nutritional element, the consumption patterns observed in our study could also respond to a compensatory feeding strategy (Cruz-Rivera & Hay 2000).

Diadema africanum also showed significant differences in consumption rates across algal species. The group of algae most consumed in our study are in agreement with results from a previous study with adults of this same sea urchin species (Tuya et al 2001). Out of a total of five algal species, *L. variegata* and *D. dichotoma* were the most consumed, *C. abies-marina* was the least preferred, and *P. pavonica* fell in between (Tuya et al 2001). In our study, we used 15 species, so the number of species that were most, least, or intermediately consumed is larger and included those reported by Tuya et al (2001). Also, the consumption rates we quantified in our study are similar to those obtained by Tuya et al (2001). Algae found in stomach contents of



adult individuals of *D. africanum* by Herrera-López et al (2003) were mainly red algae such as *A. taxiformis* and *E. elongata*, which were the second and fourth most consumed in our study.

Structural traits had contrasting roles in sea urchin consumption patterns. Feeding experiments with ground algae incorporated into agar molds resulted in larger and lower consumption rates by *Paracentrotus* and *Diadema*, respectively. The increase in consumption by *Paracentrotus* after removal of structure provides evidence for a structurally mediated algal defense mechanism against this sea urchin species. Removal of structure also resulted in increased sea grass consumption by *P. lividus* (Vergés et al 2007a) and increased algal consumption by the sea urchin *Strongylocentrotus droebachensis* (Lyons & Scheibling 2007). Structural defenses are widespread in nature against a large variety of herbivores and across multiple systems (Hay et al 1994; Livore & Scheibling 2007; Vergés et al 2007a; Hughes et al 2012) and our results with *Paracentrotus* provides an additional example of structurally mediated defense. Contrarily, the decrease in consumption by *Diadema* after removal of structure failed to support a defensive role against this sea urchin species. Reduced consumption of structure free algae does support our previous finding than this sea urchin species consumed larger amounts of tough, ash rich than soft, structurally simpler algae. The large and sharp Aristotle lantern of *Diadema* might be behind the consumption patterns of this species, which inhabits barren grounds dominated by highly calcified algae (Hernández et al 2003). *Diadema* seems to target structurally defended algal species, suggesting for a role as a feeding attractant rather than a defensive function against this sea urchin species.

Algal secondary chemistry enhanced rather than deterred herbivore consumption. Some marine species that lack of complex sensorial organs such as eyes, ears, etc perceive their life via chemical signals (Hay 2009). Plants and microbes also regulate their behaviour across chemical cues (Amsler 2008, Strom 2008). However we found differences among algae species in the degree of attracter cues to herbivores. The main attractant to *D. africanum* were chemical extracts of *C. liebetruthii*, and *S. zonale*. However, *P. lividus* juveniles were highly deterred by chemical extracts *S. zonale* and *D. dichotoma*. The brown algae *S. zonale* and *D. dichotoma* have been chemically studied in previous studies, finding that they produced different secondary metabolites (Gerwick et al 1985; Paul & Hay 1986) that have been shown to deter feeding by

CAPÍTULO 1

fishes or sea urchins (Hay et al 1987, 1988; Paul & Hay 1986, Litter et al 1983), for example *D. antillarum* (Hay et al 1987). Solandt & Campbell (2001) found that *S. zonale* was a deterrent to *D. antillarum*, but these results were performed with adult individuals of the echinoid; there are not specific studies that determine the effects of chemical extracts on juvenile stages of sea urchins. The effects of chemical components of algae on other mesograzers, such as amphipods, have been studied, identifying chemical extracts of certain algae tested as an attractant for the feeding behavior of these herbivores (Duffy & Hay 1994). Juveniles stages of sea urchins have a high risk of predation (Hunt & Scheibling 1997) and to live and feed on chemically defended algae can be a strategy for their survival, acting as refuge against predation. Most of the rest of algal species tended to be an attractant for sea urchins but these tendencies was not significant with respect to grand mean (Figure 8). Numerous studies have investigated the secondary metabolites of different species of algae as deterrence of feeding, although only a few have focused in attractant cues for feeding (Hay et al 1996, 1991, 2009). This study constitutes a clear example of the important role of chemical cues, more as feeding attractants than as deterrents in mesograzers feeding behavior such as sea urchins.

68

Sea urchins can be voracious herbivores with capacity to regulate algal populations and cause ecosystem phase shifts (Ling et al 2015). Here, we showed that juveniles of two sea urchin species differed in their feeding preferences. Multiple algal defensive strategies are key to effectively deter herbivory by juvenile sea urchins. We have assessed for the first time, the role of structural defenses, chemical defenses and nutritional value of 15 species of algae on the grazing behavior of juvenile stages of two key species of sea urchins. Despite the inherent difficulties in determining feeding behavior of organisms, our results have revealed the importance of chemical and structure defenses for these algae species against herbivory of two species of sea urchins. Chemical defenses were relevant for the feeding activity of *D. africanum*, while physical structure of algae was determinant in the case of *P. lividus*. In general, results highlighted the role of chemical cues in the early life stages of sea urchins, in which individuals are more vulnerable to predation and its feeding and living habits between algae with chemical defenses may act as a mechanism to avoid predation, as other studies have shown with other mesograzers (Hay et al 1988a, b, 1989a, b). We conclude that same algal traits can deter or enhance herbivore consumption; we showed that chemical cues, in general, tended to enhance herbivory of studied sea urchin species rather than acting as a deterrent.



However, future research on the importance of these defenses against other herbivore groups, such as fish or other macro and mesograzers, will help understand the interactions between multiple defensive strategies and explain the generality of our results.

6. REFERENCES

- Abrams PA** (2001). Describing and quantifying interspecific interactions a commentary on recent approaches. *Oikos*, 94:209-218.
- Adams DC**, Gurevitch J, Rosenberg M (1997). Resampling test for meta-analysis of Ecological data. *Ecology*, 78(5):1277-1283.
- Adrian J**, Potur J, Poiffait A, Dauvillier (2000). Análisis nutricional de los alimentos, Acribia, S. A.
- Agrawal AA** (2011). Current trends in the evolutionary ecology of plant defense. *Functional Ecology*, 25: 420-432.
- Amsler CD** (2008). Algal Chemical Ecology. Berlin: Springer-Verlag. 313 pp.
- Anderson MJ** (2004). PERMANOVA 2factor: a FORTRAN computer program for permutational multivariate analysis of variance using permutation tests. University of Auckland, Auckland.
- Anderson MJ**, Robinson J (2003). Generalized discriminant analysis based on distances. *Aust NZ J Statist*, 45:301-318.
- AOAC** (1984). Official Methods of Analysis 13th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA.
- AOAC** (2006). Official Methods of Analysis .IN: Association of Official Analytical Chemist, Washington DC, USA.
- Araújo M**, Bolnick D, Layman CA (2011). The ecological causes of individual specialization. *Ecol Lett*, 14:948-958.
- Augustine DJ**, Veblen KE, Goheen JR, Riginos C, Young T (2011). Pathways for positive cattle-wildlife interactions in semiarid rangelands. *Smithsonian Contrib Zool*, 632:55-71
- Barile PJ**, Lapointe BE, Capo TR (2004). Dietary nitrogen availability in macroalgae enhances growth of the sea hare *Aplysia californica* (Opisthobranchia: Anaspidea). *J Exp Mar Biol Ecol*, 303:65-78.
- Bianco EM**, Teixeira VL, Pereira RC (2010). Chemical defenses of the tropical marine seaweed *Canistrocarpus cervicornis* against herbivory by sea urchin. *Brazil J Oceanogr*, 58(3):213-218.

CAPÍTULO 1

Borenstein M, Hedges L, Higgins J, Rothstein H.(2007). Introduction to Meta-Analysis. 298pp (www.Meta-Analysis.com).

Brawley S H (1992). Mesoherbivores. In :Plant–Animal Interactions in the Marine Benthos, John D M, Hawkins S J, Price J(Eds). Clarendon Press, Oxford, UK, 1992.

Clarke KR, Warwick RM (2001). Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation, 2nd edition. PRIMER-E: Plymouth.

Christie WW (1982). Lipid Analysis, 2nd ed. Pergamon, Oxford, pp. 209

Connell SD, Kroeker KJ, Fabricius KE,Kline DI, Russell BD (2013). The other ocean acidification problem: CO₂ as a resource among competitors for ecosystem dominance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368:20120442.

Craft J, Paul V, Sotka, E (2013). Biogeographic and phylogenetic effects on feeding resistance of generalist herbivores toward plant chemical defenses. *Ecology*. 94: 18-24.

Cronin G, Hay ME (1996). Susceptibility to herbivores depends on recent history of both plant and animal. *Ecology*, 77(5):1531-1543.

Cruz-Rivera E, Hay ME (2000). Can quantity replace quality? Food choice, compensatory feeding, and fitness of marine mesograzers. *Ecology*, 81:201-219.

Cruz Rivera E, Hay M (2003). Prey nutritional quality interacts with chemical defenses to affect consumer feeding and fitness. *Ecol Monogr*, 73(3):483-506.

Cyr H, Pace ML (1993). Magnitude and patterns of herbivory in aquatic and terrestrial ecosystems. *Nature*, 361: 148-150.

Duarte C, Acuña J, Navarro JM, Gómez I (2011). Intra-plant differences in seaweed nutritional quality and chemical defenses: Importance for the feeding behavior of the intertidal amphipod *Orchestoidea tuberculata*. *J Sea Res*. 66:215-221.

Duffy JE, Hay ME (1990). Seaweed adaptations to herbivory. *BioScience*, 40:368-375.

Duffy JE, Hay ME (1994). Herbivore resistance to seaweed chemical defense: the roles of mobility and predation risk. *Ecology*, 75:1304-1319.

Fauchald K, Jumars, PA (1979). The diet of worms: a study of polychaete feeding guilds. *Oceanogr Mar Biol Ann Rev*, 17:193-284

Frantzis A, Gremare A (1992). Ingestion, absorption and growth rates of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fed different macrophytes. *Mar Ecol Progr Ser*, 95: 169-183.

Gerwick WH, Fenical W, Norris JN (1985). Chemical variation in the tropical seaweed *Styropodium zonale* (Dictyotaceae). *Phytochemistry*, 24:1279-1283.



- Girard D**, Herrero A, Mora J, Hernández JC, Brito A, González N, Catoire JL (2008). Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) in its southern population limit (Canary Islands - eastern Atlantic). *Gulf Mex Sci*, 26(2): 149.
- Granado I**, Caballero P (2001). Feeding rates of *Littorina striata* and *Osilinus atratus* in relation to nutritional quality and chemical defenses of seaweeds. *Mar Biol*, 138:1213-1224.
- Gruner DS**, Smith JE, Seabloom EW, Sandin SA, Ngai JT, Hillebrand H, Harlope WS, Elser JJ, Cleland EE, Bracken ME, Borer ET, Borer ET, Bolker BM (2008). A cross-system synthesis of consumer and nutrient resource control on producer biomass. *Ecol Lett*, 11: 740-755.
- Gurevitch J**, Hedges L (2001). Meta-analysis: combining the results of independent experiments. In: Scheiner S, Gurevitch J (eds). *Design and analysis of ecological experiments*. Oxford University Press, Oxford.
- Hay ME** (1991). Marine-terrestrial contrasts in the ecology of plant chemical defenses against herbivores. *Trends Ecol Evol* 6: 362–365.
- Hay ME** (1996). Marine chemical ecology: what's Known and what's next?. *J Exp Mar Biol Ecol*, 200:103-134.
- Hay ME** (1997). The ecology and evolution of seaweed-herbivore interactions on coral reefs. *Coral Reefs*, 16:67-76.
- Hay ME** (2009). Marine Chemical Ecology: Chemical signals and cues structure marine populations, communities, and ecosystems. *Annu Rev Mar Sci*, 1:193-212.
- Hay ME**, Fenical W, Gustafson K (1987a). Chemical defense against diverse coral reef herbivores. *Ecology*, 68:1581-1591.
- Hay ME**, Duffy JE, Pfister CA, Fenical W (1987b). Chemical defense against different marine herbivores: are amphipods insect equivalents? *Ecology*, 68, 1567- 1.
- Hay ME**, Renaud PE, Fenical W (1988a). Large mobile versus small sedentary herbivores and their resistance to seaweed chemical defenses. *Oecologia* ,75:246-252.
- Hay ME**, Duffy JE, Fenical W (1988b). Seaweed chemical defenses: among-compound and among herbivore variance, *Proc. 6th Int. Coral Reef Sym*, 3: 43-48.
- Hay ME**, Fenical W (1998c). Marine plant-herbivore interactions: The ecology of chemical defense. *Ann Rev Ecol Syst*, 19:111-145.
- Hay ME**, Paul VJ, Lewis SM, Gustafson K, Tucker J, Trindell RN (1989a). Can tropical seaweeds reduce herbivory by growing at night? Diel patterns of growth, nitrogen content, herbivory, and chemical versus morphological defenses. *Oecologia*, 75:233-245.

CAPÍTULO 1

Hay ME, Pawlik JR, Duffy JE, Fenical W (1989b). Seaweed-herbivore-predator interactions: hostplant specialization reduces predation on small herbivores. *Oecologia*, 81:418-427.

Hay ME, Kappel QR, Fenical W (1994). Synergisms in plant defenses against herbivores: interactions of chemistry, calcification and plant quality. *Ecology*, 75, 1714-

Hay ME, Steinberg PD (1992). The chemical ecology of plant-herbivore interactions in marine versus terrestrial communities. In: Rosenthal GA, Berenbaum M (eds) *Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites*, vol 2: Ecological and evolutionary processes. Academic, San Diego, CA, pp 371–413.

Hawkins SJ, Hartnoll RG (1983). Grazing of intertidal algae by marine invertebrates. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev*, 21:195-282.

Hedges L, Olkin I (1985). Statistical methods for meta-analysis. Academic Press, New York.

Hentschel BT (1998). Intraspecific variations in delta-13C indicate ontogenetic diet changes in deposit-feeding polychaetes. *Ecology*, 79:1357-1370.

Hernández JC (2006). Estrategia reproductiva de la población canaria del erizo *Diadema aff. antillarum* Philippi, 1845: maduración gonadal, asentamiento larvario y reclutamiento. PhD thesis. University La Laguna.

Hernández JC, Clemente S, Sangil C, Brito A (2008). The key role of the sea urchin *Diadema aff. antillarum* in controlling macroalgae assemblages throughout the Canary Islands (eastern subtropical Atlantic): a spatio-temporal approach. *Mar Environ Res*, 66:259–270.

Hernández JC, Clemente S, Tuya F, Pérez-Ruzafa A, Sangil C, Moro-Abad L and Bacallado-Aránega JJ (2013). Echinoderms of the Canary Islands, Spain In: Alvarado J.A, Solís-Marín (ed) *Echinoderm Research and Diversity in Latin America*, F.Springer. Heidelberg New York Dordrecht London, pp 471-510.

Herrera-López G, Cruz-Reyes A, Hernández JC, García N, González-Lorenzo G, Gil-Rodríguez MC, Brito A, Flacón JM (2003). Alimentación y diversidad algal en la dieta del erizo *Diadema antillarum* en Tenerife, Islas Canarias. *Revista de la Academia Canaria de las Ciencias*, 15:129-141.

Hughes TP, Reed DC, Boyle, MJ (1987). Herbivory on coral reefs: community structure following mass mortalities of sea urchins. *J Exp Mar Biol Ecol*, 133: 39–59

Hughes AD, Brunner L, Cook Ej, Kelly MS, Wilson B (2012) Echinoderms display morphological and behavioural phenotypic plasticity in response to their trophic environment. PLoS ONE 7(8):e41243,doi:10.1371/journal.pone.0041243.

Hunt HL, Scheibling RE (1997).The role of early post-settlement mortality in recruitment of benthic marine invertebrates. *Mar Ecol Prog Ser*,55:269-301.



Jangoux M, Lawrence JM., Eds., *Echinoderm Nutrition*, A. A. Balkema, Rotterdam, 1983

John, D. M., Hawkins, S. J., and Price, J., Eds., Plant–Animal Interactions in the Marine Benthos, Clarendon Press, Oxford, 1992.

John DM, Hawkins SJ, Price J (1992). Plant–Animal Interactions in the Marine Benthos. John DM, Hawkins SJ, Price J (Eds).Clarendon Press, Oxford, 1992.

Johnston DJ (2003).Ontogenetic changes in digestive enzyme activity of the spiny lobster, *Jasus edwardsii* (Decapoda;Palinuridae). *Mar Biol*, 143:1071-1082.

Jones DB (1931). Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of protein. USDA Circ. 183:1–21.

Kamenarskaa Z, Gasicb M, Zlatovicb A, Rasovicd D, Sladicb Z, Kljajicd K, Stefanova K,Seizovaa H, Najdenskic A, Kujumgiev A, Tsvetkovac I, Popova S (2002). Chemical composition of the brown alga *Padina pavonica*. *Bot Mar*, 45:339-345.

Kubanek J, Jensen PR, Keifer PA, Sullards MC, Collins D, Fenical W (2003). Seaweed resistance to microbial attack: A targeted chemical defense against marine fungi. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 100(12):6916-6921.

Lessios HA, Robertson DR, Cubit JD (1984). Spread of *Diadema* mass mortality through the Caribbean. *Science*, 226: 335-337.

Lewis SM, J.N. Norris JM, SearlesRB (1987). The regulation of morphological plasticity in tropical reef algae by herbivory. *Ecology*, 68(3): 636-641.

Ling SD, Scheibling RE, Rassweiler A, Johnson CR, Shears N, Connell SD, Salomon AK, Norderhaug KM, Pérez-Matus A, Hernández JC, Clemente S, Blamey LK, Hereu B, Ballester E, Sala E, Garrabou J, Cebrina E, Zabala M, Fujita D, Johnson E (2015). Global regime shift dynamics of catastrophic sea urchin overgrazing. *Phil Trans R Soc B*, 370:20130269.

Littler MM, Taylor PR, Littler DS (1983). Algal resistance to herbivory on a Caribbean reef. *Coral reefs*, 2:111-118.

Littler MM, Littler DS, Taylor PR (1995). Selective herbivore increases the biomass of its prey: a chiton-coralline reef building association. *Ecology*, 76:1666-1681.

Lyons DA, Scheibling, RE (2007). Effect of dietary history and algal traits of feeding rate and food preference in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*.*J Exp Mar Biol Ecol*, 349:194-204.

Manilal A, Sujith S, Sabarathnam B, Kiran GS, Selvin J,Shakir Ch, Lipton AP(2010). Bioactivity of the red algae *Asparagopsis taxiformis* collected from the southwestern coast of India. *Brazilian J Oceanography* 58(2):93-100.

CAPÍTULO 1

McCarty AT, Sotka EE (2013). Geographic variation in feeding preference of a generalist herbivore: the importance of seaweed chemical defenses. *Oecologia*.172:1071-1083.

McClinton JB, Baker BJ (2001). Marine Chemical Ecology. McClinton JB , Baker J (Eds).626 pp

Nédélec H (1982). Ethologie alimentaire de *Paracentrotus lividus* dans la baie de Galeria (Corse) et son impact sur les peuplements phytobenthiques. PhD Thesis, Univ Aix-Marseille 2.

Núñez-Farfán J, Fornoni J, Valverde PL (2007). The evolution of resistance and tolerance to herbivores. *Annu Rev Ecol Syst*, 38:541-66.

Palacín C, Ginbet G, Carner S, Dantart L, Turon X (1998). Low densities of sea urchins influence the structure of algal assemblages in the Western Mediterranean. *J Sea Res*, 39:281-290.

Paul V (1992). Seaweed chemical defenses on coral reefs. In: Paul V (ed) Ecological roles of marine natural products. Comstock, Ithaca, pp 24-50.

Paul VJ, Hay ME (1986). Seaweed susceptibility to herbivory: Chemical morphological correlates. *Mar Ecol Prog Ser*, 33: 255-264.

Paul VJ, Cruz-Rivera E ,Thacker RW (2001). Chemical Mediation of Macroalgal-Herbivore interactions: Ecological and Evolutionary perspectives. In: Marine Chemical Ecology. Eds McClintock JB, Baker BJ. CRC press.227-265 pp.

Pawlak JR, Amsler CD, Ritson-Williams R, McClintock JB, Baker BJ, Paul VJ (2013). Marine Chemical Ecology: A science born of scuba.In: Research and discoveries: The revolution of Science through Scuba (Ed:Lanf MA, Marinelli RL, Roberts SJ, Taylor PR. Vol 30:53-69.

Pennings SC, Paul VJ (1992). Effects of plant toughness, calcification, and chemistry on herbivory by *Dolabella auricularia*. *Ecology*, 73:1606-1619.

Pennings SC, Masatomo TM, Paul VJ (1993). Selectivity and growth of the generalist herbivore *Dolabella auricularia* feeding upon complimentary resources. *Ecology*, 74(3):879-890.

Pennings SC, Puglisi MP, Pitlik TJ, Himaya AC, Paul VJ (1996). Effects of secondary metabolites and CaCO₃ on feeding by surgeonfishes and parrotfishes: within-plant comparisons. *Mar Ecol Prog Ser*, 134:49-58.

Peterson CH, Renaud RE (1989). Analysis of feeding preference experiments. *Oecologia*, 80:82-86.

Poore AGB, Steinberg PD (1999). Preference-performance relationships and effects of host plant choice in a herbivorous marine amphipod. *Ecol Monogr*, 69:443-464.

Poore AGB, Campbell HA, Coleman AR, Edgar GJ, Jormalainen V, Reynolds L, Sorka EE, Stachowicz JJ, Taylor RB, Vanderklift MA, Duffy JE (2012). *Ecol Lett*, 15:912-922.



- Rico V** (1989). Contribution a l'étude des préférences alimentaires et du comportement moteur de l'oursin régulier *Paracentrotus lividus*. Dipl Etudes Approf Oceanogr, Univ Aix-Marseille 2.
- Roa R** (1992). Design and analysis and multiple-choice feeding-preference experiments. *Oecologia*, 89:509-515.
- Sangil C** (2011). La vegetación sublitoral de sustratos rocosos en las Islas Canarias: estructura, composición y dinámica de las comunidades de macroalgas..PhD Thesis. Universidad de La Laguna 321pp.
- Sangil C**, Sansón M, Clemente S, Afonso-Carrillo J, Hernández JC (2014). Contrasting the species abundances, species density and diversity as a driver of biotic homogenization. *J Sea Res*, 85:92-103.
- Schupp PJ**, Paul VJ (1994). Calcium carbonate and secondary metabolites in tropical seaweeds: variable effects on herbivorous fishes. *Ecology*, 75:1172–1185.
- Shurin JB**, Borer ET, Seabloom EW, Anderson K, Blanchette BB, Cooper SD, Halpern BS (2002). A cross-ecosystem comparison of the strength of trophic cascades. *Ecol Lett*, 5:785-791.
- Slansky F Jr**, Wheeler GS (1992). Caterpillars' compensatory feeding response to diluted nutrients leads to toxic allelochemical dose. *Entomol Exp Appl*, 65(2):171-186.
- Solandt JL**, Campbell A (2001). Macroalgal feeding characteristics of the sea urchin *Diadema antillarum* Philippi at Discovery Bay, Jamaica. *Caribb J Sci*, 37(3-4):227-238.
- Steneck RS**, Graham MH, Borque BJ, Corbett D, Erlandson JM, Estes JA, Tegner MJ (2002). Kelp forest ecosystems: biodiversity, stability, resilience and future. *Environ Conserv*, 29:436-459.
- Strom SL** (2008). Microbial ecology of ocean biogeochemistry: a community perspective. *Science*, 320:1043–1045.
- Tomas F**, Abbot JM, Steinberg C, Balk M, Williams SL, Stachowicz JJ (2011). Plant genotype and nitrogen loading influence seagrass productivity, biochemistry, and plant-herbivore interactions. *Ecology*, 92(9):1807-1817.
- Tuya F**, Martín J A, Reuss G.M., Luque A (2001). Food preferences of the sea urchins *Diadema antillarum* in Gran Canaria (Canary Islands, central-east Atlantic Ocean). *J Mar Biol Ass*, 81:845-849.
- Valentine JF**, Duffy JE (2006). The central role of grazing in seagrass ecology- In: Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation (Eds Lsrkum, A.W.D., Orth, R.J. and Duarte, C.M.). Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 463-501.
- Vergés A**, Becerro MA, Alcoverro T, Romero J (2007a). Experimental evidence of chemical deterrence against multiple herbivores in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Mar Ecol Progr Ser*, 343:107-114.
- Vergés A**, Becerro MA, Alcoverro T, Romero J (2007b). Variation in multiple traits of vegetative and reproductive seagrass tissues influences plant-herbivore interactions. *Oecologia*, 151(4):675-686.

CAPÍTULO 1

Vergés A, Steinberg PD, Hay ME, Poore AGB, Campbell AH, Ballesteros E, Heck JrK, Figueira W, Langlois T, Marzinelli EM, Mizereck T, Mumby PJ, Nakamura Y, Roughan M, Sebille E, Gupta AS, Smale DA, Tomas F, Wernberg T, Wilson SK (2014). The tropicalization of temperate marine ecosystems: climate-mediated changes in herbivory and community phase shifts. *Proc R Soc B*, 281:20140846.

Verlaque M (1987). Contribution a l'etude du phytobenthos d'un ecosystème photophile thermophile marin en Méditerranée occidentale. Etude structurale et dynamique du phytobenthos et analyse des relations faune-flore. These Doct, Univ Aix-Marseille 2.

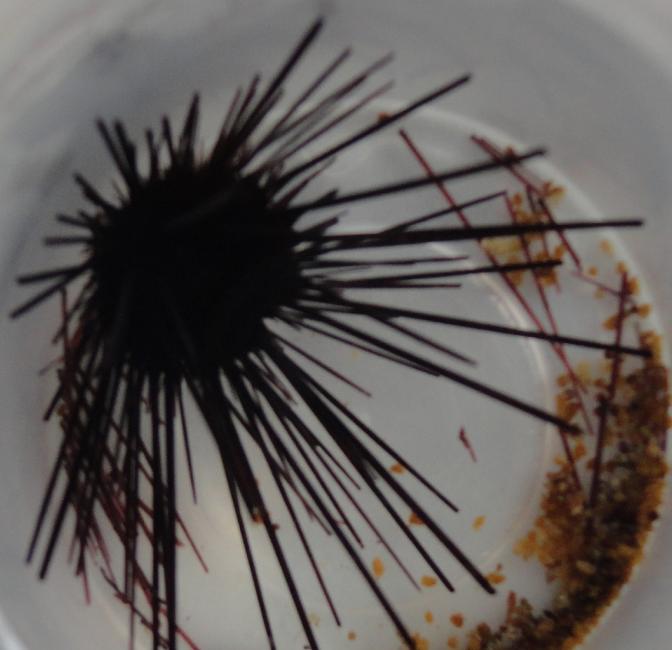
Williamson J, Carson DG, Rocky de Nys, Steinber PD(2004). Demographic consequences of an ontogenetic shift by a sea urchin response to host plant chemistry. *Ecology*, 85:1355-1371.

HERBIVORÍA



Capítulo 2

“Efecto de la acidificación del océano sobre las tasas de herbivoría de los juveniles de erizos de mar *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum*”



Rodríguez A, Hernández JC, Brito A, & Clemente S. Ocean acidification effects on feeding rates of the juveniles of sea urchins *Paracentrotus lividus* and *Diadema africanum* (in preparation)

ÍNDICE

1. RESUMEN	81
2. INTRODUCCIÓN	82
3. MATERIAL Y MÉTODOS	86
3.1. Recolección de organismos	86
3.2. Efecto del pH en las tasas de consumo de juveniles de erizos	87
3.3. Efecto del pH en el crecimiento de las algas	88
3.4. Efecto del pH en la calcificación de las algas	89
3.5. Efecto del pH en la estructura interna de las algas	90
3.6. Análisis estadístico	90
4. RESULTADOS	91
4.1. Parámetros físico-químicos del agua	91
4.2. Efecto del pH en las tasas de consumo de juveniles de erizos	92
4.2.1. Experimento de tasas de consumo de juveniles de <i>Paracentrotus lividus</i>	92
4.2.2. Experimento de tasas de consumo de juveniles de <i>Diadema africanum</i>	95
4.3. Efecto del pH en el crecimiento de las algas	97
4.4. Efecto del pH en la calcificación de las algas	97
4.5. Efecto del pH en la estructura interna de las algas	102
5. DISCUSIÓN	106
6. BIBLIOGRAFÍA	110



1. RESUMEN

El reciente descenso del pH del agua de mar, como consecuencia del incremento del CO₂ en la atmósfera, ha hecho que muchas investigaciones se centren en los efectos de la acidificación del océano sobre diversos organismos. Estos organismos incluyen desde invertebrados calcáreos a macroalgas y fanerógamas marinas, ya que de la concentración de CO₂ depende la formación de sus esqueletos calcáreos y la tasa fotosintética en el caso de las algas. La mayoría de los estudios se han centrado en los efectos directos de la acidificación sobre los organismos, sin embargo, los efectos sobre las interacciones entre especies han sido muy poco estudiados, por lo que en este trabajo nos hemos centrado en determinar los efectos de la acidificación sobre la herbivoría de juveniles de dos especies de erizos presentes en las islas Canarias. Mediante experimentación en el laboratorio con dos tratamientos de pH (pH control de 8,1 unidades y pH ácido de 7,6) se evaluó, durante 7 días, las tasas de consumo de los erizos en las distintas condiciones. Paralelamente, se valoraron las diferencias en el crecimiento y la calcificación de 9 especies de algas predominantes en los fondos sublitorales canarios, sometidas a los dos tratamientos de pH durante 17 días, a fin de detectar cambios en la morfología con potencial de afectar a su vulnerabilidad a la herbivoría. Nuestros resultados mostraron que cada especie de erizo respondió de manera distinta a la acidificación. Por un lado los juveniles de *P. lividus* mostraron tasas de consumos mayores en algas previamente sometidas a tratamientos de pH de 7,6 unidades; por otro, los juveniles de *D. africanum* sólo variaron significativamente sus tasas de consumo entre tratamientos de pH en una única especie de alga, registrándose un mayor consumo en el tratamiento control. En el caso de las algas, el crecimiento en todas las especies fue mayor en el tratamiento control que en el ácido. La concentración de carbonato cálcico también siguió esta misma tendencia en cada especie de alga analizada, presentando mayores concentraciones en condiciones control que en el tratamiento ácido. Sin embargo, no se observaron cambios estructurales internos en ninguna de las especies algales estudiadas. En conclusión, en este estudio demostramos los efectos negativos de la acidificación sobre diversas especies de algas y, de forma indirecta, en las tasas de herbivoría de los erizos. Los cambios en el comportamiento alimenticio de estas especies, sobretodo de *P. lividus*, podrían causar modificaciones de la estructura de las comunidades bentónicas.

2. INTRODUCCIÓN

El progresivo incremento del CO₂ en la atmósfera ha provocado un aumento de la *pCO₂* en los océanos en las últimas décadas, que desencadena una serie de cambios en la química del agua de mar. El exceso de CO₂, al entrar en contacto con el agua de mar se disocia en ácido carbónico (HCO₃⁻) y H⁺, lo que conlleva una disminución del pH. Las predicciones sugieren que para el año 2100 el pH se situará en rangos entorno a las 7,6 unidades (IPCC 2013). Estos desequilibrios en la química del agua tendrán mayor repercusión en aquellos organismos que utilicen formas de carbono disuelto (DIC) para constituir sus estructuras calcáreas, como el caso de invertebrados marinos como corales, gasterópodos y erizos de mar (Gattuso et al 1999; Kleypas & Langdon 2003; Anthony et al 2008; Andersson et al 2011), o el de las algas y fanerógamas que lo utilizan para la realización de la fotosíntesis (ver revisión de Koch et al 2013).

Es especialmente importante entender cómo las especies formadoras de hábitat se verán afectados por el cambio climático. Las algas facilitan el funcionamiento de la totalidad del ecosistema, sin embargo sus coberturas dependen en gran medida de la presión de la herbivoría. Por ello, se esperan impactos indirectos de las condiciones de cambio climático por interacciones algas-herbívoros y subsecuentemente en niveles superiores de la cadena trófica. La acidificación del océano puede cambiar la composición bioquímica y calidad nutricional de los productores primarios (Rossoll et al 2012), afectando a la demanda de recursos para el crecimiento de los herbívoros y alterando la composición y dominancia de especies de las comunidades en futuros escenarios de cambio climático.

Las macroalgas presentan diversas respuestas al incremento de la temperatura y acidificación del océano (Hall-Spencer et al 2008; Nelson 2009; Martin & Gattuso 2009; Connell & Russell 2010; Cornwall et al 2011), incluso la propia distribución de las especies se ve afectada principalmente por la acidificación y el calentamiento de las aguas (Harley et al 2012; Bijma et al 2013). Las algas calcáreas (Coralináceas) tienden a ser las más vulnerables a la acidificación del océano, afectando de forma negativa a su reclutamiento (Kuffner et al 2008), crecimiento (Jokiel et al 2008), calcificación (Gao et al 1993; Anthony et al 2008; Ragazzola et al 2012) y estructura morfológica (Ragazzola et al 2013). Sin embargo, también hay que destacar que



trabajos previos con algas no calcáreas han mostrado un incremento en su crecimiento (Kübler et al 1999; Russell et al 2009; ver Andersson et al 2011 para más detalle) y calcificación (Iglesias-Rodríguez et al 2008) en respuesta a la elevada $p\text{CO}_2$. Adicionalmente, también se han constatado efectos negativos indirectos sobre algas calcáreas debido a un aumento en la competencia con las algas no calcáreas, favorecidas en estos escenarios de cambio climático (Hall-Spencer et al 2008; Kuffner et al 2008; Cornwall et al 2011).

La variabilidad en las respuestas biológicas de las macroalgas ante la acidificación del océano, como la tasa fotosintética y el crecimiento, depende en gran medida del mecanismo que tengan las especies para la asimilación del carbono en la fotosíntesis, es decir, del tipo de sustrato de carbono que necesiten para realizar dicho proceso. Muchas algas pardas y verdes pueden asimilar, indistintamente, por transporte activo a través de sus membranas, HCO_3^- y/o CO_2 del medio mediante los mecanismos de concentración de carbono (CCM) y utilizar en el interior celular el HCO_3^- ; directa o indirectamente, como sustrato para la fotosíntesis. Aquellas macroalgas que pueden adquirir también CO_2 , disponen de una enzima (anhidrasa carbónica) que convierte el CO_2 en HCO_3^- . Esto no sucede en muchas de las algas rojas, en las que la adquisición de carbono inorgánico o CO_2 se realiza por difusión pasiva desde el exterior al interior celular, donde es utilizado directamente para la fotosíntesis (Hurd et al 2009; Gómez & Huovinen 2012; Gordillo 2012). Todo esto se traduce en que las algas presentan una amplia gama de respuestas ante la acidificación del medio (Hein & Sand-Jensen 1997; Badger et al 1998; Tortell et al 2000; Rost et al 2003; Riebesell 2004; Fu et al 2008), y en la necesidad de realizar estudios que consideren las peculiaridades de las especies, ya que el mecanismo de la adquisición del carbono y la eficiencia de los CCM difieren entre ellas (Giordano et al 2005). Principalmente, las algas rojas que utilizan el CO_2 como sustrato para la fotosíntesis serán las más beneficiadas en pHs ácidos, pues es la forma de carbono que más aumenta con la acidificación (Raven & Geider 2003). A estas algas les siguen aquéllas con CCM (utilizan el HCO_3^- como sustrato), que no se verán igual de beneficiadas que las anteriores, pues el aumento de HCO_3^- en condiciones de acidificación no es tan marcado como el aumento del CO_2 . De hecho, diversos estudios han constatado que las algas con CCM no presentan una respuesta generalizada de mayor crecimiento significativo para la mayoría de las especies analizadas, siendo indiferentes a los cambios en la concentración y proporción de compuestos de carbono inorgánico (Giordano et al 2005).

CAPÍTULO 2

En general, la sensibilidad de las algas a la acidificación del océano tiene un importante componente específico, ya que sus respuestas variarán dependiendo no sólo de la fisiología del carbono, sino también del modo de calcificación, de la morfología y contenido en carbonato, y del ciclo de vida. Un trabajo reciente apunta a que las algas filamentosas, que presentan cortos tiempos generacionales, podrían aclimatarse y adaptarse a los cambios ambientales de forma más rápida que otras especies como las laminariales o Kelps, que presentan ciclos de vida más largos, lo que limita su potencial de adaptación (Roleda & Hurd 2012). Muchas algas dependen del CO_3^{2-} y el Ca^{2+} para formar sus estructuras y esqueletos de carbonato cálcico. En condiciones normales de pH ambos compuestos se encuentran saturados en el medio marino, cubriendo las necesidades de construcción de estructuras carbonatadas (Raven & Giordano 2009). Sin embargo, cuando el pH disminuye, también disminuye el CO_3^{2-} , bajando el nivel de saturación de este ion, de forma que las algas empiezan a encontrar dificultades para calcificar sus talos (Cao & Caldeira 2008). Estudios realizados con el género *Corallina*, ponen de manifiesto un descenso significativo en la calcificación a medida que el pH desciende y un cese de la calcificación a niveles de pH inferiores a 7,6 unidades (Gao et al 1993; Hofmann et al 2012). Las respuestas de la calcificación de macroalgas a la acidificación es también muy variable a nivel específico (Martin et al 2013), debido principalmente a que las distintas especies depositan diferentes formas de carbonato cálcico, bien calcita (con alta o baja proporción de magnesio, conocidas como HMC o LMC respectivamente) o aragonito. Ambas formas presentan diferentes solubilidades, siendo la calcita HMC más soluble y más difícil de depositar en condiciones de acidez. Esta HMC es sintetizada por las algas rojas coralíneas, siendo, por lo tanto, las que presentan procesos de calcificación más susceptibles a condiciones de acidificación (ver revisión de McCoy & Kamenos 2015). Otro aspecto a tener en cuenta es dónde se deposita el carbonato cálcico; aquellas macroalgas que lo exponen al medio, depositándolo en las células superficiales de sus talos (por ejemplo *Padina pavonica*) o las que lo depositan en sus paredes celulares (coralinales) tendrán más problemas para retenerlo que aquellas que lo depositan en sus utrículos (por ejemplo el género *Halimeda*) (Stanley 2008; Raven & Giordano 2009; Nelson 2009; Ries 2009,2010).

Los erizos son generalmente los herbívoros bentónicos más efectivos en áreas costeras (Ruitton et al 2000; Hernández et al 2008; Sangil et al 2014). Sus altas abundancias como consecuencia



directa o indirecta de factores antrópicos (ej; sobre pesca, Clemente et al 2010; incremento de temperatura, Hernández et al 2010) pueden causar cambios drásticos en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas, limitando el crecimiento algal debido a su potente actividad ramoneadora y pasando de comunidades dominadas por macroalgas erectas a comunidades de algas costosas (Villouta et al 2001; Behrens & Lafferty 2004; Hernández et al 2008; Sangil et al 2014). Como invertebrados calcáreos, estos organismos también son sensibles a los procesos de acidificación del océano y muchos estudios se han centrado en su impacto sobre las fases larvarias (Cohen et al 2013; Byrne et al 2013, García 2014; ver revisión Dupont & Thornyde 2013 para más detalle). Más escasos son los estudios sobre las fases juveniles (Shirayama & Thornton 2005; Byrne et al 2011; Albright et al 2012; Dupont et al 2012; Asnaghi et al 2013a, b; Woolf et al 2013; Byrne et al 2014;), a pesar de que son consideradas como fases sensibles a la acidificación del océano (Dupont & Thorndyke 2013) y constituyen un cuello de botella en la dinámica de las poblaciones de erizos clave. Hasta el momento, ningún estudio ha evaluado el efecto indirecto de la acidificación en la alimentación de juveniles de erizos; y tan sólo el trabajo de Asnaghi et al (2013a) analizó el efecto del pH sobre la linterna de Aristóteles de juveniles de *P. lividus*, relacionándolo con las algas (calcificadas o no) de las que se alimentaban.

A pesar de la importancia de las interacciones alga-erizo como relaciones bióticas clave que determinan la estabilidad de los ecosistemas bentónicos (Ling et al 2015), muy pocos estudios han evaluado los efectos de la disminución del pH en escenarios futuros de cambio climático sobre estas interacciones inter-específicas. La mayoría de estudios de acidificación se han desarrollado en condiciones de laboratorio, centrándose en el “fitness” y fisiología de determinadas especies y sólo unos pocos estudios han comenzado a evaluar recientemente las interacciones entre organismos en el medio natural (Johnson et al 2012; Porzio et al 2011), en experimentos de mesocosmos (Alstenberg et al 2013) o en el laboratorio simulando condiciones naturales (Diaz-Pulido et al 2011; Doropoulos et al 2012; Asnaghi et al 2013a). Debido a la complejidad de las interacciones que suceden en el medio natural, se hace necesario un mayor esfuerzo para estudiar interacciones entre múltiples especies, incluyendo relaciones de competencia, depredación y/o herbivoría (Wernberg et al 2012, Connell et al 2013).

CAPÍTULO 2

Por todo lo expuesto anteriormente, en este estudio nos hemos centrado en evaluar los efectos de la acidificación del océano en el comportamiento alimenticio de las fases juveniles de dos especies de erizos, *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum*, que ejercen un papel clave en los ecosistemas de fondos rocosos de las islas Canarias (Hernández et al 2013). Así pues, el objetivo principal es entender en profundidad cualquier cambio en las preferencias y tasas de herbivoría de los equinoideos. Para ello, también hemos estudiado el efecto de la disminución del pH del mar sobre el crecimiento, calcificación y estructura interna de 9 de las especies de algas más características de estos hábitats. Como hipótesis de partida planteamos que las especies de algas más vulnerables a las condiciones de acidificación del medio serán más susceptibles a la herbivoría por parte de los equinoideos, esperándose cambios significativos en las preferencias de consumo y en las tasas de alimentación de estos organismos en las condiciones de acidificación previstas en escenarios futuros de cambio climático.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Recolección de organismos

86

Se seleccionaron 9 especies de algas, incluyendo aquellas que presentaron las mayores y menores tasas de consumo para los juveniles de las dos especies de erizos estudiadas: *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum* (ver capítulo 1 para más detalle). En el caso de los juveniles de *D. africanum*, las especies seleccionadas fueron: *Cladophora lieberthii*, *Colpomenia sinuosa*, *Cystoseira abies-marina*, *Dictyota dichotoma*, *Ellisolandia elongata*, *Lobophora variegata* y *Padina pavonica*. Las algas seleccionadas para juveniles de *P. lividus* fueron: *C. lieberthii*, *C. abies-marina*, *E. elongata*, *Halopteris socoparia*, *L. variegata*, *P. pavonica* y *Styropodium zonale*. Estas algas fueron recolectadas mediante buceo sin botella en la localidad de Punta del Hidalgo ($28^{\circ} 34' 23.4''$ N, $16^{\circ} 32' 47.87''$ W) en los meses de abril y octubre del 2013, respectivamente. En cuanto a los erizos, 50 juveniles de *D. africanum* (7-10 mm de diámetro horizontal del caparazón) fueron capturados de la localidad de Abades ($28^{\circ} 8' 31.05''$ N, $16^{\circ} 26' 12.49''$ W) en abril del 2013 y 50 juveniles de *P. lividus* (6-12,5 mm) en Punta Prieta (28°



16° 20.33'' N, 16° 23' 4.43'' W) en octubre del 2013. Ambas localidades presentan una alta tasa de reclutamiento de las correspondientes especies de equinoideos (Hernández 2006; Girard et al 2008; Hernández et al 2010).

3.2. Efecto del pH en las tasas de consumo de juveniles de erizos

Se realizaron dos experimentos de tasas de consumo en diferentes tratamientos de pH; un experimento se realizó con juveniles de *P. lividus* en octubre del 2013 y otro con juveniles de *D. africanum* en abril del 2013. En ambos casos, los organismos fueron sometidos a dos tratamientos de pH, un tratamiento control ($\text{pH}=8.1$) y un tratamiento ácido ($\text{pH}=7.6$) que simula las previsiones para el próximo centenario (IPCC 2013). La temperatura del agua se mantuvo constante a 20 °C mediante el uso de enfriadores – calentadores (ECHEIM AQUATIC, 50W). Para cada una de las especies de algas analizadas se establecieron 5 réplicas por tratamiento de pH en recipientes de 100 ml con su pH correspondiente. Tres réplicas adicionales por especie de alga se utilizaron como controles sin erizos, necesarios para estimar los cambios de biomasa algal en ausencia de herbivoría (Roa, 1992). Los recipientes experimentales se sumergieron en un baño de agua, a una temperatura constante de 20 ± 0.3 °C. El agua utilizada en los vasos fue filtrada a través de filtros de carbono y de poliamida de 200 micras, y esterilizada con filtros UV (Figura 1A). En el tratamiento ácido ($\text{pH}=7.6$) el pH se mantuvo mediante un sistema de inyección de CO₂ (AquaMedic) (Figura 1B).

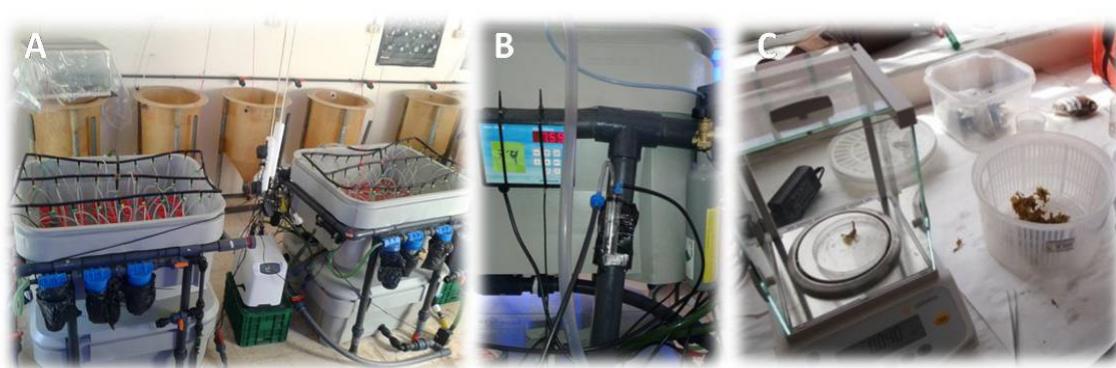


Figura 1. A. Detalle del sistema de mesas de agua utilizado en cada uno de los tratamientos de pH para la experimentación en el laboratorio. B. Consola de pH con sistema de inyección de CO₂. C. Centrífuga de mano y balanza de precisión utilizadas en los experimentos.

CAPÍTULO 2

El pH, la temperatura y la salinidad fueron medidos diariamente durante el experimento. La alcalinidad fue medida por valoración una vez por semana en cada tratamiento. El resto de parámetros químicos del agua de mar: pCO₂, concentración de calcita -Ωc- y concentración de aragonito -Ωa- fueron calculados a partir de la alcalinidad total (A_T) y del pH usando el software CO2SYS (Lewis & Wallace 1998). Los cálculos se basaron en las constantes K1 y K2 de Mehrbach et al (1973), modificados por Dickson & Millero (1987).

Una porción de cada alga, que osciló entre los 0,084 g y los 1,498 g, fue introducida en cada una de los vasos experimentales, previamente centrifugadas (con una centrífuga de mano) para eliminar el exceso de agua y pesadas en una balanza de precisión, registrándose el peso inicial ($\pm 0,001$ g). Tras diez días de cultivo en los correspondientes tratamientos, las algas de cada réplica se pesaron de nuevo y los juveniles de erizos fueron introducidos en el experimento, registrándose previamente el diámetro horizontal de los ejemplares mediante un calibrador digital ($\pm 0,01$ mm). Los herbívoros permanecieron 7 días alimentándose en cada una de las especies de algas, de forma que a los 17 días de experimento se tomó el peso final de cada una de las réplicas de algas (ver Figura 1C). Para estimar el consumo relativo de cada una de las algas analizadas utilizamos la siguiente ecuación:

$$C_{tot} = T_i * \left(\frac{C_f}{C_i} \right) - T_f$$

88

C_{tot} es el consumo total en gramos, T_i es el peso inicial en gramos en tratamientos con erizos, T_f es el peso final en gramos en tratamientos con erizos, C_i es el peso inicial en los controles (sin erizos) y C_f es el peso final en los controles (sin erizos).

3.3. Efecto del pH en el crecimiento de las algas

Las algas de los controles sin erizos del experimento anterior fueron utilizadas también para estimar el crecimiento de cada una de las especies en las diferentes condiciones de pH. Por lo tanto, teníamos un total de 3 réplicas por cada especie de alga y tratamiento de pH. Cada fragmento de alga fue pesado mediante una balanza de precisión al inicio del experimento, a los 10 días y a los 17 días, registrándose su peso en cada periodo de tiempo. Para evitar el exceso



de agua, las algas fueron previamente centrifugadas durante 10 segundos con una centrífuga de mano, evitando así un error en el peso debido al agua superficial retenida en los talos. El crecimiento de cada especie de alga se estimó con un índice de crecimiento relativo (ICR), siguiendo la siguiente ecuación (Gao et al 1993):

$$ICR = \frac{\left(100 \ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right)\right)}{t}$$

N_t es el peso húmedo final en un tiempo determinado (10 ó 17 días) y N_0 es el peso fresco inicial. La variable t representa el tiempo de exposición a las condiciones experimentales (10 ó 17 días).

3.4. Efecto del pH en la calcificación de algas

Una cantidad que osciló entre los 1,178 g y 6,607 g de cada una de las especies de alga fue depositada en pequeñas bolsas de malla rígida (luz de malla: 2 mm) en cada mesa de agua, a su correspondiente tratamiento de pH desde el inicio del experimento hasta el final (17 días). Se establecieron 3 réplicas de cada alga por tratamiento de pH, que fueron pesadas al inicio y al final del experimento con una balanza de precisión ($\pm 0,001$ g). Tras los 17 días de experimento, y una vez tomados los pesos húmedos de las algas, cada una de las réplicas se secó en estufa a 60 °C durante al menos 48 horas para obtener el peso seco en una balanza de precisión. A continuación, las algas fueron descalcificadas con ácido clorhídrico (1N) durante la noche. Tras la descalcificación, las algas fueron secadas de nuevo en la estufa durante 36 horas hasta que su peso se estabilizó, siguiendo la metodología de Martone (2010) y Johnson et al (2012). El porcentaje de contenido de CaCO₃ fue calculado como la diferencia entre los pesos secos sin descalcificar y los pesos de las algas descalcificadas (Martone 2010).

3.5. Efecto del pH en la estructura interna de las algas

De los controles de cada una de las especies de algas cultivadas en los distintos tratamientos de pH para el experimento de tasas consumo, se realizaron cortes transversales a mano alzada, bajo una lupa binocular y con una cuchilla de mano. Los cortes se realizaron antes y después del experimento con el objetivo de ver si la estructura interna de cada una de las especies se veía modificada en función del tratamiento de pH al que fueron sometidas, siguiendo la metodología de Bradassy et al (2013). Los cortes se fotografiaron posteriormente mediante una cámara LEICA asociada al microscopio. Con las fotografías obtenidas de cada una de las algas se estudiaron los posibles cambios en la estructura interna de las algas procedentes de los dos tratamientos de pH analizados.

3.6. Análisis estadístico

Las tasas de consumo de cada una de las especies de erizo en cada tratamiento de pH fueron analizadas con ANCOVAs de dos vías ejecutados por permutaciones (Anderson 2004). En los modelos, el ‘tratamiento de pH’ se trató como factor fijo con 2 niveles: ácido ($\text{pH}= 7.6$) y control ($\text{pH}= 8.1$); y el factor ‘alga’ como factor fijo con 7 niveles en cada uno. En el caso del erizo *P. lividus* estos niveles fueron *C. liebetruthii*, *C. abies-marina*, *E. elongata*, *H. scoparia*, *L. variegata*, *P. pavonica* y *S. zonale*; en el caso de *D. africanum* los niveles para este factor fueron *C. liebetruthii*, *C. sinuosa*, *C. abies-marina*, *D. dichotoma*, *E. elongata*, *L. variegata*, *P. pavonica*. En ambas especies el tamaño del erizo (diámetro horizontal del caparazón) se trató como covariante en los modelos, con el fin de controlar cualquier influencia de la tallas de los erizos sobre las tasas de consumo.

El índice de crecimiento relativo de las algas fue analizado a través de un ANOVA de 3 vías por permutaciones (Anderson 2004), con 3 factores fijos: ‘Tratamiento de pH’, con 2 niveles: Ácido ($\text{pH}= 7.6$) vs. Control ($\text{pH}= 8.1$); ‘alga’, con 9 niveles: *C. liebetruthii*, *C. sinuosa*, *C. abies-marina*, *D. dichotoma*, *E. elongata*, *H. scoparia*, *L. variegata*, *P. pavonica* y *S. zonale*; y ‘tiempo de exposición’, con 2 niveles: 10 días y 17 días de experimento.



Para evaluar las diferencias en la calcificación de las algas, el porcentaje de CaCO_3 en peso seco se analizó con un ANOVA de dos vías ejecutada por permutaciones (Anderson 2004) con 2 factores fijos: ‘tratamiento de pH’, con 2 niveles: ácido ($\text{pH}= 7,6$) vs. Control ($\text{pH}= 8,1$); y ‘alga’, con 8 niveles: *C. liebetruhii*, *E. elongata*, *C. abies-marina*, *D. dichotoma*, *H. scoparia*, *L. variegata*, *P. pavonica* y *S. zonale*. El alga *C. sinuosa* no pudo incluirse en el análisis, pues en la fecha en la que se realizó el experimento de calcificación no se encontraba en el medio natural, ya que es un alga estacional.

En todos los análisis de la varianza realizados se utilizó la distancia euclídea (Anderson 2004) de los datos brutos sin transformar y 4999 permutaciones. Cuando el número de permutaciones no fue suficiente para obtener p-valores razonables se recurrió a la corrección de Montecarlo (Anderson & Robinson 2003). Cuando fue necesario, los términos significativos en los modelos se analizaron mediante comparaciones *a posteriori* por permutaciones (Anderson 2004). Todos estos análisis se realizaron con el programa PRIMER6 & PERMANOVA+.

4. RESULTADOS

4.1 Parámetros físico-químicos del agua

El pH en cada uno de los tratamientos, $\text{pH}= 8,1$ (tratamiento control) y $\text{pH}= 7,6$ (tratamiento ácido), permaneció relativamente constante en ambos experimentos de tasas de consumo. Los valores de alcalinidad variaron entre tratamientos, mientras que la temperatura se mantuvo constante a 20°C (Tabla 1).

CAPÍTULO 2

Tabla 1. Detalle de los parámetros de la química del agua en cada uno de los tratamientos (ácido -pH= 7,6- y control -pH= 8,1-) de los experimentos de herbivoría con erizos: **A.** Experimento de herbivoría de *Paracentrotus lividus*, **B.** Experimento de herbivoría de *Diadema africanum*. Los valores mostrados corresponden a las medias (\pm SD) de: pH total (pH_T), alcalinidad total (AT) y temperatura durante los 17 días de experimento. El resto de parámetros, presión parcial de CO₂ (pCO₂), saturación de calcita (Ω_c), saturación de aragonito (Ω_a) fueron calculados usando el programa CO₂Sys (Lewis & Wallace 1998) a partir del pH y la temperatura.

Sp	pH _T	pCO ₂ (μatm)	A _T (mmol kg ⁻¹)	CO ₂ ₃ (mmol Kg ⁻¹)	HCO ₃ (mmol Kg ⁻¹)	Ω _c	Ω _a	T(°C)
A. <i>P.lividus</i>	7,60±0,1	1349,0±82	2,507±0,012	0,086±0,020	2,301±0,023	1,99±0,21	1,29±0,12	19,4±0,4
	8,10±0,1	413,2±42	2,854±0,011	0,258±0,089	2,237±0,061	6,12±0,54	3,97±0,21	19,5±0,3
B. <i>D. africanum</i>	7,60±0,1	1349,0±82	2,507±0,012	0,086±0,020	2,301±0,023	1,99±0,21	1,29±0,12	19,4±0,4
	8,10±0,1	413,2±42	2,854±0,011	0,258±0,089	2,237±0,061	6,12±0,54	3,97±0,21	19,5±0,3

4.2. Efecto del pH en las tasas de consumo de juveniles de erizos

La supervivencia de erizos en los experimentos con ambas especies fue muy alta. Sólo un juvenil de *P. lividus* murió en el tratamiento ácido, el resto de los tratamientos tuvieron una supervivencia del 100%.

4.2.1. Experimento de tasas de consumo de juveniles de *P. lividus*

92

Las tasas de consumo de juveniles de *P. lividus* variaron entre tratamientos de pH ($F= 17,47$; $p<0,001$) y entre especies de algas ($F= 2,40$; $p<0,05$) (ver Tabla 2A y Figura 2). En general, el consumo fue mayor sobre las algas cultivadas a pH= 7,6 que sobre las cultivadas a pH= 8,1. Sin embargo, estas tasas de consumo fueron también diferentes entre las especies de algas estudiadas, independientemente del tratamiento de pH al que estuvieran sometidas, registrándose consumos significativamente mayores en las especies *C. liebetruthii*, *C. abies-marina* y *E. elongata* que en *L. variegata*, que fue el alga que presentó un menor consumo por parte de *P. lividus* (ver Tabla 2B).



Tabla 2. Resultado del ANCOVA de dos vías por permutaciones de las tasas de consumo de juveniles del erizo *Paracentrotus lividus* en dos tratamientos de pH (pH= 8,1 vs. pH= 7,6) y sobre 7 especies de algas diferentes (*C. liebetruthii*, *C. sinuosa*, *E. elongata*, *C. abies-marina*, *D. dichotoma*, *L. variegata*, *P. pavonica*). El tamaño del erizo, medido como el diámetro horizontal del caparazón, se seleccionó como covariante. Los resultados significativos se muestran en negrita.

A. Fuente de variación	df	SS	MS	Pseudo-F	p (perm)
Tamaño(Ta)	1	0,001	0,009	1,99	0,163
Tratamiento pH(Tr)	1	0,095	0,095	17,47	0,001
Algas (Al)	6	0,078	0,013	2,40	0,048
Ta * Tr	1	0,001	0,001	0,06	0,796
Ta*Al	6	0,047	0,079	1,45	0,230
Tr*Al	6	0,022	0,037	0,69	0,658
Ta*Tr*Al	6	0,012	0,002	0,38	0,860
Residual	42	0,228	0,005		
Total	69	0,495			
B. Comparaciones <i>a posteriori</i>		Alga	T	p (perm)	
		<i>C. liebetruthii</i> vs. <i>E. elongata</i>	0,107	0,911	
		<i>C. liebetruthii</i> vs. <i>C. abies-marina</i>	0,107	0,918	
		<i>C. liebetruthii</i> vs. <i>H. scoparia</i>	1,357	0,191	
		<i>C. liebetruthii</i> vs. <i>L. variegata</i>	2,848	0,010	
		<i>C. liebetruthii</i> vs. <i>P. pavonica</i>	1,409	0,183	
		<i>C. liebetruthii</i> vs <i>S. zonale</i>	1,581	0,130	
		<i>E. elongata</i> vs. <i>C. abies-marina</i>	0,024	0,980	
		<i>E. elongata</i> vs. <i>H. scoparia</i>	1,316	0,201	
		<i>E. elongata</i> vs. <i>L. variegata</i>	2,883	0,013	
		<i>E. elongata</i> vs. <i>P. pavonica</i>	1,379	0,184	
		<i>E. elongata</i> vs. <i>S. zonale</i>	1,564	0,133	

CAPÍTULO 2

<i>C. abies-marina</i> vs. <i>H. scoparia</i>	1,044	0,313
<i>C. abies-marina</i> vs. <i>L. variegata</i>	2,231	0,001
<i>C. abies-marina</i> vs. <i>P. pavonica</i>	0,982	0,366
<i>C. abies-marina</i> vs. <i>S. zonale</i>	1,116	0,291
<i>H. scoparia</i> vs. <i>L. variegata</i>	1,245	0,235
<i>H. scoparia</i> vs. <i>P. pavonica</i>	0,265	0,794
<i>H. scoparia</i> vs. <i>S. zonale</i>	0,114	0,910
<i>L. variegata</i> vs. <i>P. pavonica</i>	1,859	0,082
<i>L. variegata</i> vs. <i>S. zonale</i>	1,692	0,108
<i>P. pavonica</i> vs. <i>S. zonale</i>	0,206	0,837

94

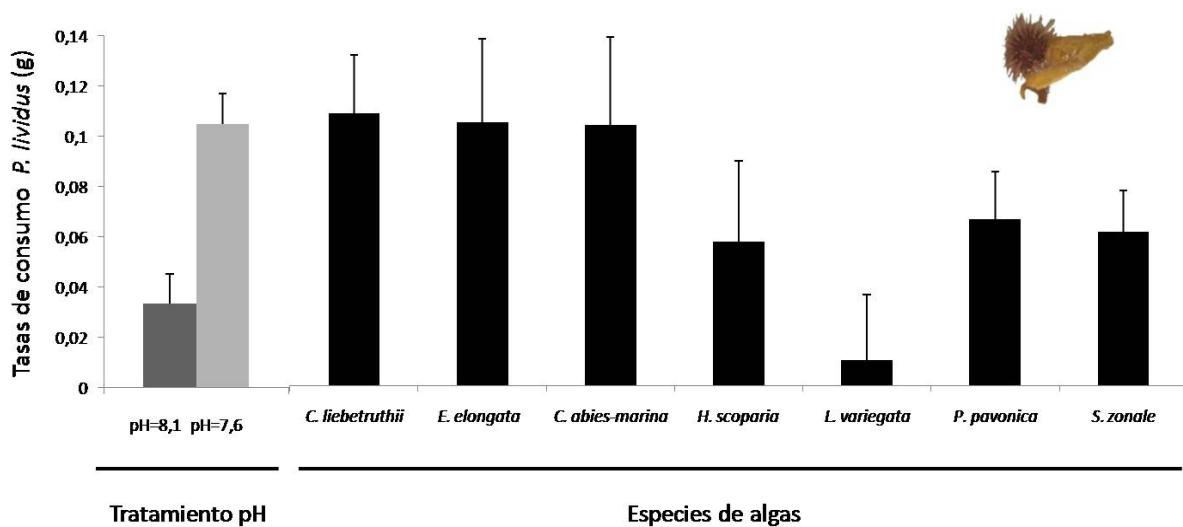


Figura 2. Medias (\pm ES) de las tasas de consumo (g) de juveniles del erizo *Paracentrotus lividus* en cada uno de los tratamiento de pH (Control -pH= 8,1- y ácido -pH= 7,6-) y, de forma independiente al pH, en cada una de las especies de algas utilizadas en los experimentos de alimentación.



4.2.2. Experimento de tasas de consumo de juveniles de *Diadema africanum*

En el caso de *D. africanum*, el análisis de las tasas de consumo mostró una interacción ‘tratamiento de pH x alga’ significativa ($F=3,13$; $p<0,05$), de forma que el consumo varió entre tratamientos de pH de forma diferente para las distintas algas estudiadas (Tabla 3A). Los test *a posteriori* mostraron diferencias significativas entre los niveles de pH sólo en el alga *D. dichotoma*, donde los erizos del tratamiento control presentaron un mayor consumo que en el tratamiento a pH=7,6 ($F=3,343$; $p<0,05$). Para el resto de las algas no se encontraron diferencias significativas en las tasas de consumo según el pH, si bien existió una tendencia hacia mayores consumos en los tratamientos controles de la mayoría de las especies, excepto en *C. liebetruthii* y *C. sinuosa*, donde la tendencia fue a la inversa, con mayores consumos de *D. africanum* en el tratamiento ácido (ver Tabla 3B y Figura 3).

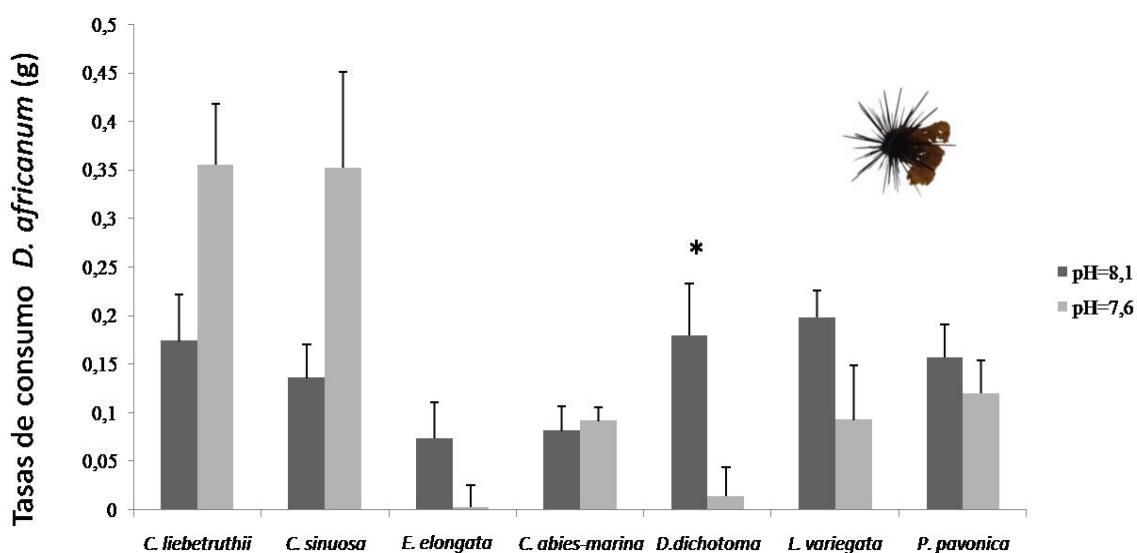


Figura 3. Medias (\pm ES) de las tasas de consumo (g) de juveniles del erizo *D. africanum* en los dos tratamientos de pH (Control -pH= 8,1- y ácido -pH= 7,6-) analizados para cada una de las especies de algas seleccionadas.*; $p< 0,05$.

CAPÍTULO 2

Tabla 3. Resultados del ANCOVA de dos vías por permutaciones de las tasas de consumo de juveniles del erizo *Diadema africanum* en dos tratamientos de pH (pH= 8,1 vs. pH= 7,6) y sobre 7 especies de algas diferentes (*C. liebetruthii*, *C. sinuosa*, *E. elongata*, *C. abies-marina*, *D. dichotoma*, *L. variegata*, *P. pavonica*). Los resultados significativos se muestran en negrita.

A. Fuente de variación	df	SS	MS	Pseudo-F	p (perm)
<i>Tamaño (Ta)</i>	1	0,060	0,060	5,34	0,026
<i>Tratamiento de pH (Tr)</i>	1	0,004	0,004	0,38	0,542
<i>Alga (Al)</i>	6	0,372	0,062	5,52	0,001
<i>Ta * Tr</i>	1	0,001	0,017	1,50	0,230
<i>Ta * Al</i>	6	0,211	0,023	2,07	0,082
<i>Tr*Al</i>	6	0,211	0,035	3,13	0,014
<i>Ta* Tr*Al</i>	6	0,048	0,008	0,71	0,633
<i>Residual</i>	42	0,472	0,011		
<i>Total</i>	69	1,325			

B. Comparaciones <i>a posteriori</i>		Tratamiento pH	T	p (MC)
Alga	<i>C. liebetruthii</i>	Ácido vs. Control	1,240	0,257
	<i>C. sinuosa</i>	Ácido vs. Control	1,469	0,193
	<i>E. elongata</i>	Ácido vs. Control	1,389	0,209
	<i>C. abies-marina</i>	Ácido vs. Control	0,040	0,968
	<i>D. dichotoma</i>	Ácido vs. Control	3,343	0,015
	<i>L. variegata</i>	Ácido vs. Control	1,602	0,156
	<i>P. pavonica</i>	Ácido vs. Control	0,993	0,358



4.3. Efecto del pH en el crecimiento de las algas

El crecimiento de las algas varió entre los diferentes tratamientos de pH ($F= 9,10$; $p<0,01$), entre las diferentes algas ($F= 23,24$; $p<0,001$) y entre los diferentes tiempos de exposición ($F= 22,618$; $p<0,001$) analizados (ver Tabla 4A). La tasa de crecimiento de las algas fue, en general, mayor en el tratamiento control que en el tratamiento ácido (Figura 4A). Además, las distintas especies de algas difirieron entre sí en sus tasas de crecimiento, independientemente del pH y del tiempo de exposición empleados. El alga que presentó un mayor crecimiento fue *S. zonale*, frente a *C. liebetruthii* y *H. scoparia* que fueron las que menor crecimiento presentaron, seguidas de *C. sinuosa*, *D. dichotoma* y *L. variegata*. El segundo grupo de algas con mayor crecimiento estuvo constituido por las algas *E. elongata*, *C. abies-marina* y *P. pavonica*. (Figura 4B y Tabla 4B). En cuanto al tiempo de exposición a los distintos niveles de pH, el crecimiento de las algas fue mayor durante los primeros 10 días que en los siguientes días restantes (Figura 4 B).

4.4. Efecto del pH en la calcificación de las algas

El contenido en carbonato cálcico en peso seco varió significativamente entre los tratamientos de pH ($F= 24,07$; $p<0,001$) y entre las algas ($F= 15,98$; $p<0,001$) (ver Tabla 5A). Las algas mantenidas en el tratamiento control tuvieron un mayor porcentaje de carbonato cálcico que aquellas cultivadas en pH ácido (ver Figura 5). Las algas que presentaron un mayor porcentaje de carbonato cálcico en peso seco fueron *P. pavonica*, *D. dichotoma*, *C. liebetruthii*, seguidas de *C. abies-marina*, *L. variegata*, *H. scoparia* y *S. zonale* (Ver Tabla 5B). El alga que menor porcentaje de CaCO_3 en peso seco mostró fue *E. elongata*, con independencia del tratamiento de pH al que fueran sometidas. En las algas calcáreas (*E. elongata* y *P. pavonica*) los porcentajes de CaCO_3 en el tratamiento ácido fueron del 5,93 y 31,29%, respectivamente, y en el tratamiento control del 22,07 y 53,52% (Figura 5).

CAPÍTULO 2

Tabla 4. Resultados del crecimiento de las algas en diferentes condiciones de pH, analizados mediante un ANOVA por permutaciones de tres vías, con 3 factores fijos: ‘tratamiento de pH’ (2 niveles: pH=8,1 vs. pH=7,6), ‘alga’ (9 niveles: *C. liebetruthii*, *C. sinuosa*, *E. elongata*, *C. abies-marina*, *D. dichotoma*, *H. scoparia*, *L. variegata*, *P. pavonica*, *S. zonale*) y ‘tiempo de exposición’ (2 niveles: 10 días y 17 días de experimento). Los resultados significativos se muestran en negrita.

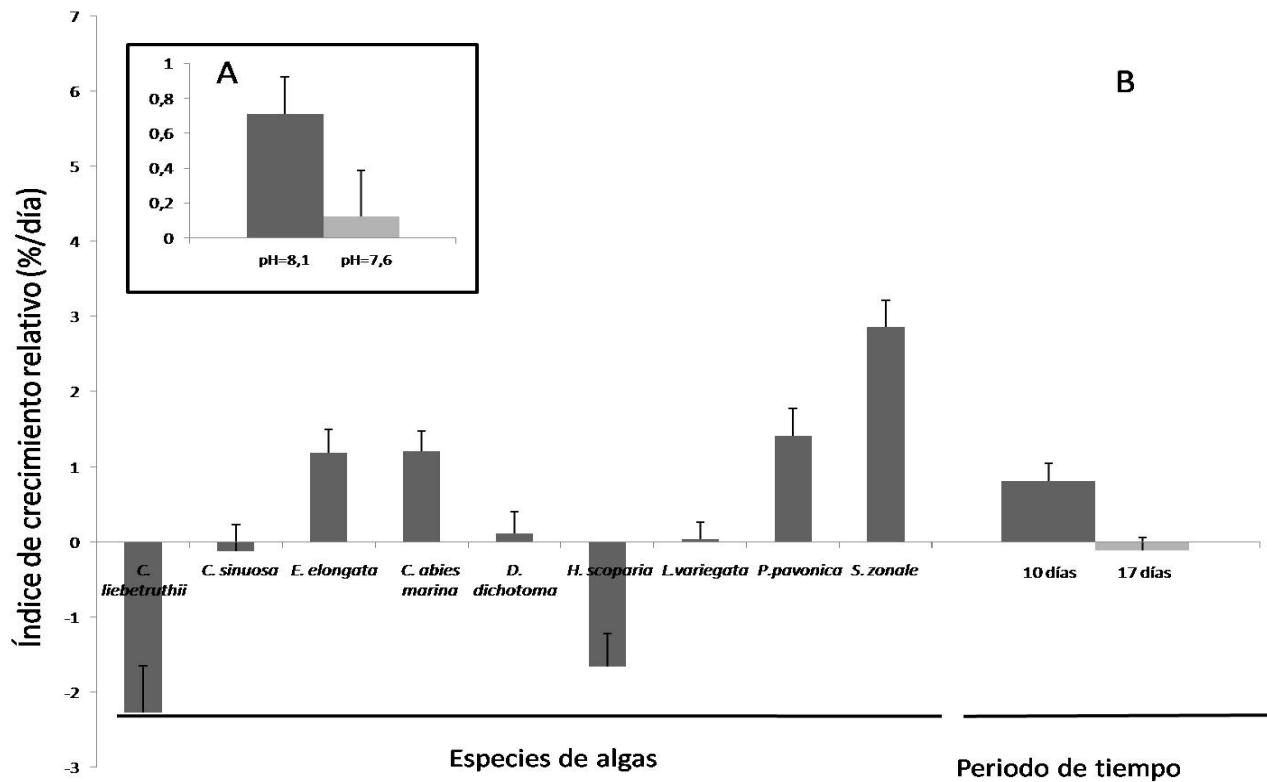
A. Fuente de variación	df	SS	MS	Pseudo-F	p (perm)
<i>Tratamiento pH(Tr)</i>	1	14,503	14,503	9,10	0,004
<i>Algas (Al)</i>	8	296,38	37,047	23,26	0,001
<i>Tiempo (T)</i>	1	36,056	36,056	22,62	0,045
<i>Tr * Al</i>	8	17,471	2,1838	1,37	0,218
<i>Tr*T</i>	1	0,1846	0,1846	0,12	0,741
<i>Al*T</i>	8	0,022	1,4115	0,88	0,531
<i>Tr*Al*T</i>	8	0,012	1,3591	0,85	0,566
<i>Residual</i>	102	162,6	1,5941		
<i>Total</i>	137	552,08			
B. Comparaciones <i>a posteriori</i>	Alga		T	p (MC)	
	<i>C. liebetruthii</i> vs. <i>C. sinuosa</i>		3,162	0,007	
	<i>C. liebetruthii</i> vs. <i>E. elongata</i>		6,232	0,001	
	<i>C. liebetruthii</i> vs. <i>C. abies-marina</i>		6,126	0,001	
	<i>C. liebetruthii</i> vs. <i>D. dichotoma</i>		3,878	0,001	
	<i>C. liebetruthii</i> vs. <i>L. variegata</i>		4,731	0,001	
	<i>C. liebetruthii</i> vs. <i>P. pavonica</i>		6,428	0,001	
	<i>C. liebetruthii</i> vs. <i>H. scoparia</i>		0,873	0,393	
	<i>C. liebetruthii</i> vs. <i>S. Zonale</i>		9,231	0,001	
	<i>C. sinuosa</i> vs. <i>E. elongata</i>		2,965	0,007	
	<i>C. sinuosa</i> vs. <i>C. abies-marina</i>		2,866	0,009	
	<i>C. sinuosa</i> vs. <i>D. dichotoma</i>		0,289	0,772	

HERBIVORÍA Y ACIDIFICACIÓN



<i>C. sinuosa</i> vs. <i>L. Variegata</i>	0,265	0,793
<i>C. sinuosa</i> vs. <i>P. pavonica</i>	3,078	0,006
<i>C. sinuosa</i> vs. <i>H. scoparia</i>	2,471	0,026
<i>C. sinuosa</i> vs. <i>S. zonale</i>	6,879	0,001
<i>E. elongata</i> vs. <i>C. abies-marina</i>	0,004	0,965
<i>E. elongata</i> vs. <i>D. dichotoma</i>	2,862	0,010
<i>E. elongata</i> vs. <i>L. variegata</i>	3,589	0,001
<i>E. elongata</i> vs. <i>P. pavonica</i>	0,588	0,569
<i>E. elongata</i> vs. <i>H. scoparia</i>	5,5321	0,001
<i>E. elongata</i> vs. <i>S. zonale</i>	4,614	0,001
<i>C. abies-marina</i> vs. <i>D. dichotoma</i>	2,799	0,007
<i>C. abies-marina</i> vs. <i>L. variegata</i>	3,513	0,001
<i>C. abies-marina</i> vs. <i>P. pavonica</i>	0,533	0,603
<i>C. abies-marina</i> vs. <i>H. scoparia</i>	5,463	0,001
<i>C. abies-marina</i> vs. <i>S. zonale</i>	4,408	0,001
<i>D. dichotoma</i> vs. <i>L. variegata</i>	0,098	0,912
<i>D. dichotoma</i> vs. <i>P. pavonica</i>	3,134	0,003
<i>D. dichotoma</i> vs. <i>H. scoparia</i>	3,098	0,006
<i>D. dichotoma</i> vs. <i>S. zonale</i>	7,107	0,001
<i>L. variegata</i> vs. <i>P. pavonica</i>	3,914	0,001
<i>L. variegata</i> vs. <i>H. scoparia</i>	3,728	0,001
<i>L. variegata</i> vs. <i>S. zonale</i>	8,758	0,001
<i>P. pavonica</i> vs. <i>H. scoparia</i>	5,854	0,001
<i>P. pavonica</i> vs. <i>S. zonale</i>	3,598	0,001
<i>H. scoparia</i> vs. <i>S. zonale</i>	8,761	0,001

CAPÍTULO 2



100

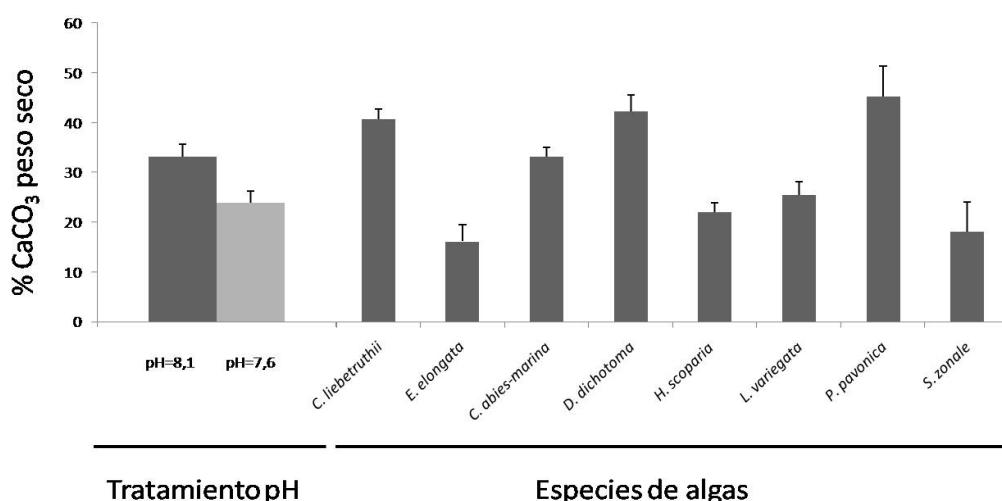


Figura 5. Medias (\pm ES) del porcentaje de carbonato cálcico presente en las algas mantenidas en cada uno de los tratamientos de pH (Control -pH= 8,1- y ácido -pH= 7,6-), así como específicamente en cada una de las especies de algas utilizadas en la experimentación en el laboratorio.



Tabla 5. Resultados de la descalcificación de las algas en diferentes condiciones de pH, analizados a través de un ANOVA por permutaciones de dos vías, con 2 factores fijos: tratamiento de pH (2 niveles: pH=8,1 vs. pH=7,6) y alga (8 niveles: *C. liebetruthii*, *E. elongata*, *C. abies-marina*, *D. dichotoma*, *H. scoparia*, *L. variegata*, *P. pavonica*, *S. zonale*). Las diferencias significativas se muestran en negrita.

A. Fuente	df	SS	MS	Pseudo-F	p (perm)
<i>Tratamiento pH(Tr)</i>	1	1043	1043	24,06	0,001
<i>Algas (Al)</i>	7	4848,1	692,58	15,98	0,001
<i>Tr * Al</i>	7	590,11	84,301	1,94	0,093
<i>Residual</i>	32	1387,1	43,346		
<i>Total</i>	47	7868,3			
B. Comparaciones <i>a posteriori</i>		Alga		T	p (perm)
		<i>E. elongata</i> vs. <i>D. dichotoma</i>		7,132	0,001
		<i>E. elongata</i> vs. <i>L. variegata</i>		6,323	0,001
		<i>E. elongata</i> vs. <i>C. abies-marina</i>		7,288	0,001
		<i>E. elongata</i> vs. <i>S. zonale</i>		0,361	0,722
		<i>E. elongata</i> vs. <i>C. liebetruthii</i>		22,572	0,001
		<i>E. elongata</i> vs. <i>P. pavonica</i>		8,277	0,001
		<i>E. elongata</i> vs. <i>H. scoparia</i>		2,776	0,025
		<i>D. dichotoma</i> vs. <i>L. variegata</i>		4,365	0,002
		<i>D. dichotoma</i> vs. <i>C. abies-marina</i>		2,151	0,065
		<i>D. dichotoma</i> vs. <i>S. zonale</i>		3,725	0,006
		<i>D. dichotoma</i> vs. <i>C. liebetruthii</i>		0,423	0,676
		<i>D. dichotoma</i> vs. <i>P. pavonica</i>		0,600	0,565
		<i>D. dichotoma</i> vs. <i>H. scoparia</i>		4,905	0,002
		<i>L. variegata</i> vs. <i>C. abies-marina</i>		2,93	0,020
		<i>L. variegata</i> vs. <i>S. zonale</i>		1,325	0,219

<i>L. variegata</i> vs. <i>C. liebetruthii</i>	9,463	0,001
<i>L. variegata</i> vs. <i>P. pavonica</i>	5,334	0,001
<i>L. variegata</i> vs. <i>H. scoparia</i>	1,435	0,193
<i>C. abies-marina</i> vs. <i>S. zonale</i>	2,572	0,033
<i>C. abies-marina</i> vs. <i>C. liebetruthii</i>	3,132	0,013
<i>C. abies-marina</i> vs. <i>P. pavonica</i>	2,943	0,019
<i>C. abies-marina</i> vs. <i>H. scoparia</i>	3,689	0,007
<i>S. zonale</i> vs. <i>C. liebetruthii</i>	4,135	0,003
<i>S. zonale</i> vs. <i>P. pavonica</i>	4,240	0,002
<i>S. zonale</i> vs. <i>H. scoparia</i>	0,676	0,517
<i>C. liebetruthii</i> vs. <i>P. pavonica</i>	1,279	0,242
<i>C. liebetruthii</i> vs. <i>H. scoparia</i>	8,486	0,001
<i>P. pavonica</i> vs. <i>H. scoparia</i>	5,809	0,001

4.5. Efecto del pH en la estructura interna de las algas

102

Las macroalgas seleccionadas para este estudio pertenecen a Chlorophyta o algas verdes, Rhodophyta o algas rojas y Phaeophyceae o algas pardas. Cada uno de estos grupos de macroalgas muestran formas, crecimientos y estructuras particulares, y la correcta interpretación de estos caracteres es imprescindible para valorar sus posibles variaciones después de ser sometidas a tratamientos como los analizados en este apartado (Steneck & Dethier 1993).

Cladophora liebetruthii (Cladophorales) se caracteriza por sus talos erectos, filamentosos, de color verde brillante, ramificados irregularmente, con ramas que se fusionan entre sí configurando una red laxa y tridimensional. Presentan una estructura sifonocladal, con filamentos de células plurinucleadas que muestran un cloroplasto reticulado provisto de numerosos pirenoides.



Ellisolandia elongata (Coralinaceae) muestra talos constituidos por numerosos ejes erectos, que surgen a partir de una base incrustante, en los que se alternan genículos (zonas no calcificadas) e intergenículos (zonas con abundante carbonato cálcico), de color rosa blanquecino a violáceo, con ramificación pinnada. Los intergenículos son comprimidos y distalmente ensanchados. Presentan una estructura pseudoparenquimatosa multiaxial, con numerosos filamentos medulares dispuestos longitudinalmente de los que se forman filamentos corticales de pequeñas células pigmentadas que los recubren.

Cystoseira abies-marina (Fucales) se caracteriza por presentar talos erectos arborescentes, de color pardo amarillento o verdoso, sin disco basal diferenciado, con abundantes ramas cilíndricas que portan ramas cortas en forma de apéndices espinosos laxamente dispuestos. Presentan una estructura parenquimatosa de tipo hística, en la que se diferencia una médula compacta central de pequeñas células hialinas, un córtex grueso de grandes células redondeadas hialinas, y una meristodermis externa uniestratificada de células pigmentadas dispuestas en empalizada.

Halopteris scoparia (Sphacelariales) muestra talos arborescentes, de color pardo oscuro, abundantemente ramificados de forma alterna radial, constituidos por ejes cilíndricos estrechos y segmentados, que crecen a partir de una gran célula apical muy oscura. Presentan una estructura parenquimatosa, en la que se diferencian células medulares hialinas grandes y angulosas, rodeadas por un córtex uniestratificado de pequeñas células pigmentadas.

103

Dictyota dichotoma (Dictyotales) se caracteriza por sus talos erectos acintados, de color pardo amarillento, en ocasiones con iridiscencia verde-azulada, abundantemente ramificados de forma dicótoma en un plano. Presentan una estructura parenquimatosa simple, formada a partir del crecimiento por una sola célula apical lenticular. La médula es uniestratificada y está constituida por grandes células subcuadradas hialinas. El córtex, también uniestratificado, está formado por pequeñas células subcuadradas y pigmentadas.

Lobophora variegata (Dictyotales) presenta talos postrados o erectos, con morfología laminar flabelada, de color marrón oscuro, pardo o amarillento. El crecimiento es marginal, por medio de grandes células oscuras dispuestas en empalizada. La estructura es parenquimatosa,

constituida en sección transversal por 5-7 estratos de células medulares rectangulares dispuestas ordenadamente, con las células del estrato central de mayor tamaño y oscuras, y un estrato de células corticales pigmentadas, la mitad de ancho que las medulares.

Padina pavonica (Dictyotales) se caracteriza por presentar talos erectos laminares, de color pardo blanquecinos, flabelados, en forma de embudo, y con bandas concéntricas y radiales en su superficie debidas a la presencia de depósitos de carbonato cálcico y pelos de feoficeas. El crecimiento es marginal y está localizado en el interior del margen involuto. Presentan una estructura parenquimatosa, constituida por 2-4 estratos de células, generalmente 3 en la zona media de la lámina, sin diferenciación entre médula y córtex.

Por último, *Styropodium zonale* (Dictyotales) presenta talos erectos arborescentes, laminares, de color pardo oscuro, ramificados de forma irregular, con segmentos terminales laciniados, y con bandas concéntricas oscuras en su superficie. El crecimiento es marginal y la estructura parenquimatosa, formada por una médula pluriestratificada de células hialinas cuadrangulares dispuestas ordenadamente, y un córtex uniestratificado de pequeñas células pigmentadas, en número de 3-5 por célula medular en sección transversal.

Tanto el hábito como la morfología de los talos de las ocho especies de macroalgas estudiadas no mostraron diferencias tras ser sometidas a los tratamientos de pH analizados (ver Figura 6). Todas mantuvieron sus características vegetativas externas e internas durante los 17 días de duración del experimento. Los filamentos cilíndricos de *Cladophora liebetruthii* mostraron en sus células los característicos plastos reticulados, sin observarse modificación aparente en condiciones ácidas. En *Ellisolandia elongata* tampoco se observaron cambios asociados a los distintos valores de pH. En los intergenículos calcificados no se detectó variación significativa en su grosor. *Cystoseira abies-marina* no mostró ningún cambio notable en los tres estratos celulares característicos de su estructura (médula, córtex y meristodermis). *Halopteris scoparia* y todas las especies de Dictyotales analizadas tampoco presentaron variación en las características de sus talos a lo largo del tiempo.



Especie	Alga	pH=8,1	pH=7,6
<i>Cladophora liebetruthii</i>			
<i>Ellisolandia elongata</i>			
<i>Cystoseira abies-marina</i>			
<i>Dictyota dichotoma</i>			
<i>Halopteris scoparia</i>			
<i>Lobophora variegata</i>			
<i>Padina pavonica</i>			
<i>Styropodium zonale</i>			

Figura 6. Detalle de la estructura interna de cada una de las especies de algas cultivadas en dos tratamientos de pH (pH=8,1 “control” y pH=7,6 “ácido”).

La única modificación detectada durante el experimento fue una ligera pérdida de los depósitos de carbonato cálcico (descalcificación) en la superficie de los talos de *Padina pavonica* en condiciones ácidas. Por último, los talos presentaron en general una menor rigidez después del tratamiento ácido, mostrando una fragilidad mayor que la habitual al realizar las preparaciones microscópicas para su observación en visión superficial o en sección transversal.

5. DISCUSIÓN

Las respuestas de las tasas de consumo de los juveniles de erizos a las condiciones de acidificación oceánica variaron entre las especies de equinoideos estudiadas. Mientras que los juveniles de *Paracentrotus lividus* experimentaron un efecto directo del pH en sus tasas de alimentación, incrementando el consumo de algas en condiciones de acidificación, la respuesta de *Diadema africanum* fue diferente, alimentándose de forma similar en los tratamientos ácido y control, excepto en el alga *D. dichotoma*, que fue consumida en tasas más altas en condiciones de pH control.

El erizo *P. lividus* es una especie que se encuentra distribuida tanto en zonas submareales como intermareales, teniendo un mayor grado de adaptación a las oscilaciones de pH que suceden de forma natural a lo largo del día en las franjas intermareales (García 2014), tal y como sucede en otras especies de equinoideos (Byrne 2011). Probablemente, esta adaptación suponga una ventaja para la especie en escenarios futuros de acidificación oceánica, ya que puede mantener altas tasas de consumo de algas, e incluso incrementarlas, a pH ácidos. En cambio, *D. africanum* se distribuye exclusivamente en la zona submareal, donde las oscilaciones diarias de pH no son tan acusadas, lo que puede estar determinando su limitada capacidad de respuesta a las condiciones de acidificación. En contraposición, estudios recientes sobre los efectos de la erupción del volcán submarino de la isla de El Hierro (Clemente et al 2013,) revelaron una alta tasa de reclutamiento de *D. africanum* en zonas que sufrieron una drástica disminución de pH, llegando a valores de hasta 6,4 unidades (Fraile de la Nuez et al 2013). Sin embargo, en este proceso natural el pH no fue el único parámetro físico-químico alterado del agua de mar,



pues se produjeron otros cambios tales como el aumento de la temperatura, enriquecimiento en nutrientes y metales, etc., que pueden haber favorecido el éxito del reclutamiento de la especie, bien de forma directa o indirecta por alteraciones en las comunidades planctónicas.

Nuestros resultados están en concordancia con los obtenidos en el capítulo anterior de esta tesis (Rodríguez et al enviado), donde juveniles de *D. africanum* prefirieron algas que mantenían la estructura, frente a los de *P. lividus* cuyo consumo se vio limitado por la estructura, incrementando el consumo de algas en las que ésta había sido eliminada. La exposición de algas al tratamiento ácido en el diseño experimental de este estudio provocó descalcificación de los talos, con una disminución significativa en su contenido en carbonato cálcico. Este efecto de la disminución del pH no se restringió a las especies calcificadas, sino que también las no calcificadas vieron modificada su concentración en carbonato cálcico, posiblemente por un efecto sobre los epífitos que portaban. Esto las hizo más vulnerables a la herbivoría de juveniles de *P. lividus*, cambios que podrían provocar importantes alteraciones en el ecosistema en futuros escenarios cercanos de acidificación, donde la presión por herbívoros como *P. lividus* podría aumentar sobre comunidades algales expuestas a una disminución del pH. Otros estudios en el campo (Hall-Spencer et al 2008; Porzio et al 2011; Johnson et al 2012) muestran un descenso de las coberturas de especies de algas y una menor presencia de herbívoros tales como *P. lividus* o *Arbacia lixula* en zonas con pH próximos a 7,8 y 6,7, a pesar de que trabajos recientes muestran la alta resistencia de juveniles de *P. lividus* a condiciones de pH de 7,6 unidades en el laboratorio (capítulos 5 y 7 de esta tesis). Otros resultados obtenidos por Burnell et al (2013) ponen de manifiesto el incremento de la herbivoría del erizo *Amblypneustes pallidus* sobre la fanerógama *Amphibolis antartica* bajo condiciones ligeras de acidez ($\text{pH}=7,9$) e incremento de temperatura ($+5^\circ \text{C}$).

Los bajos índices de crecimiento de las algas registrados en el tratamiento ácido apoyan los resultados obtenidos por Israel & Hopi (2002) para la especie *Hypnea musciformis*. Sin embargo, Asnaghi et al (2013a) no encontraron diferencias significativas en el crecimiento de *Ellisolandia elongata*, *Dictyota dichotoma* y *Cystoseira amentacea* entre diferentes tratamientos de pH administrados durante un periodo de un mes. Nuestros resultados tampoco concuerdan con los obtenidos por Roleda & Hurd (2012), quienes registraron un mayor crecimiento de

CAPÍTULO 2

L. variegata en pH ácido, incluso en valores próximos a 7,6. Esta diferencia con los bajos índices de crecimiento de *L. variegata* registrados en nuestro estudio pueden ser probablemente consecuencia de no añadir nutrientes en el medio de los experimentos por lo que, en nuestro caso, el crecimiento pudo verse limitado por la disponibilidad de nutrientes como nitrógeno, fósforo y hierro y no por el incremento del pH *per se* (Andersson et al 2011; Falkenberg et al 2013). Otros estudios también muestran que no existe una relación clara constante entre el pH y el crecimiento de las algas, encontrándose especies que no limitaron su crecimiento en pH ácidos y otras (p. ej. *Hypnea musciformis*) que sí vieron su crecimiento mermado como consecuencia de un pH más ácido (pH= 7,8) (Israel & Hopi 2002).

Estudios de campo realizados en gradientes naturales de pH en fumarolas volcánicas (Hall-Spencer et al 2008; Porzio et al 2011) han mostrado que ciertas especies de algas toleran bien pH ácidos y se han adaptado a estas condiciones extremas, presentando un mayor crecimiento y un mayor éxito reproductor. Por ejemplo, en estos ecosistemas *D. dichotoma* reemplazó a comunidades de algas calcáreas articuladas dominadas por especies como *E. elongata* (Porzio et al 2011). En Canarias, *P. pavonica* y *C. liebetruthii* predominaron en aquellas zonas donde se alcanzaron los pH más bajos durante la erupción volcánica submarina de El Hierro (Sangil 2013). En nuestros resultados encontramos que, en general, todas las algas presentaron un menor crecimiento a pH 7,6 que a pH 8,1. De forma similar, Diaz-Pulido et al (2011) mostraron una reducción en el crecimiento, a partir de 560 ppm, en experimentos de laboratorio donde *Lobophora papenfussii* fue sometida a diferentes tratamientos de pH.

108

Los mayores contenidos de CaCO₃ obtenidos en el tratamiento control fueron debidos a que las algas cultivadas en el tratamiento ácido ya mostraron, en un periodo de 17 días, problemas relacionados con la descalcificación sugeridos por otros autores, como en el caso de *P. pavonica* (Johnson et al 2012; Betancor et al 2013) o de *E. elongata* (Martin & Gattusso 2009) a pH ácidos. Obtuvimos concentraciones significativamente mayores de CaCO₃ en el tratamiento control para la totalidad de algas estudiadas, incluyendo tanto especies carbonatadas como no carbonatadas. La fuerte descalcificación sufrida por algas con carbonato cálcico, como *P. pavonica*, puede estar influenciada por la descalcificación de los epífitos presentes en los talos de ambos tipos de especies. A pesar de la tendencia general a la descalcificación de algas en



condiciones de acidificación señalada en la literatura (Gao et al 1993; Cao & Caldeira 2008; Hofmann et al 2012,), estudios de laboratorio realizados con *E. elongata* no mostraron cambios en el contenido de carbonato entre diferentes tratamientos de pH (Egilsdottir et al 2012). Los autores sugieren que esto puede ser debido a que las muestras de *E. elongata* fueron recolectadas de zonas intermareales, expuestas a un amplio rango de oscilación del pH durante el día y la noche, siendo más tolerantes y resilientes a cambios del pH que ejemplares de ambientes submareales con regímenes de pH más estables. Por lo tanto, dependiendo de la franja litoral en la que habiten, submareal o intermareal, las algas podrán presentar diferentes respuestas de la calcificación a la acidificación (Egilsdottir et al 2012), tal y como sucede en otros organismos (Bray et al 2014).

Nuestros resultados ponen de manifiesto las respuestas de las macroalgas a las condiciones futuras de acidificación, así como los posibles efectos indirectos en las tasas de herbivoría de los erizos que se alimentan de ellas, a través de experimentos de laboratorio de corta duración. Sin embargo, se hace necesario incrementar los tiempos de exposición para evitar una sobreestimación o subestimación de estos efectos sobre las variables, como por ejemplo el crecimiento y/o la calcificación de las especies (Hendricks et al 2010; Dupont & Thornyde 2013; Ragazzola et al 2013). Las respuestas de las macroalgas, y de forma indirecta el comportamiento alimenticio de los equinoideos, podrían verse modificados por procesos de aclimatación a las nuevas condiciones de pH, como demuestran otros autores al comparar diferentes tiempos de exposición (1 mes-1 año) (ver Martin & Gattusso 2009; Ragazzola et al 2013). Los cambios observados en el comportamiento alimenticio de las especies en condiciones de acidificación, sobretodo en juveniles de *P. lividus*, podrían transformar de forma importante las comunidades algales en escenarios futuros, efecto que se podría ver potenciado por el bajo crecimiento de las algas observado en condiciones de acidificación. No obstante, la combinación de otros factores de cambio climático, como la temperatura o la radiación UV, pueden también modificar las respuestas de las especies cuando actúan de forma simultánea (Martin & Gatusso 2009; Alstenberg et al 2013; Duarte 2014), siendo necesario realizar experimentos a largo plazo y con diferentes estresores ambientales que representen la mayor similitud con las condiciones naturales previstas para el próximo centenario.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Albright R**, Bland C, Gillette P, Serafy JE, Langdon C, Capo TR (2012). Juvenile growth of the tropical sea urchin *Lytechinus variegatus* exposed to near-future ocean acidification scenarios. *J Exp Mar Biol Ecol*, 426-427:12–17.
- Alstenberg C**, Eklöf J, Gamfeldt L, Havenhand JN, Sundbäck K (2013). Consumer mediate the effects of experimental ocean acidification and warming on primary producer. *P Natl Acad Sci USA*, 110(21):8603-8608.
- Anderson MJ** (2004) PERMANOVA 2factor: a FORTRAN computer program for permutational multivariate analysis of variance using permutation tests. University of Auckland, Auckland.
- Anderson MJ**, Robinson J (2003) Generalized discriminant analysis based on distances. *Aust NZ J Stat*, 45:301-318.
- Andersson AJ**, Mackenzie FT, Gattuso JP (2011). Effects of ocean acidification on benthic processes, organisms, and ecosystems. In: Gattuso J-P, Hansson L, editors. Ocean Acidification. Oxford University Press, Oxford. pp. 122–153.
- Anthony KRN**, Kline DI, Diaz-Pulido G, Hoegh-Guldberg O (2008). Ocean acidification causes bleaching and productivity loss in coral reef builders. *P Natl Acad Sci USA*, 105:17442–17446.
- Asnaghi V**, Chiantore M, Mangialajo L, Gazeau F, Francour P, Alliouane S, Gatusso JP (2013a). Cascading effects of Ocean Acidification in a Rocky subtidal community. *PLoS ONE*, 8(4): e61978. doi:10.1371/journal.pone.0061978.
- Asnaghi V**, Mangialajo L, Gatusso JP, Francour P, Privitera D, Chiantore M (2013b). Effects of ocean acidification and diet on thickness and carbonate elemental composition of the test of juvenile sea urchins. *Mar Env Res*, 93:78-84.
- Badger MR**, Andrews TJ, Whitney SM, Ludwig M, Yellowlees DC, Leggat W, Price GD (1998). The diversity and co-evolution of Rubisco, plastids, pyrenoids and chloroplast-based CCMs in the algae. *Can J Bot*, 76: 1052-1071.
- Behrens MD**, Lafferty KD (2004). Effects of marine reserves and urchin disease on southern Californian rocky reef communities. *Mar Ecol Prog Ser*, 279:129-139.
- Betancor S**, Tuya F, Gil-Díaz T, Figueroa FL, Haroun R (2014). Effects of a submarine eruption on the performance of two brown seaweeds. *J Sea Res*, 87: 68-78.
- Bijma J**, Portner H-O, Yesson C, Rogers AD (2013). Climate change and the oceans: What does the future hold? *Mar Pollut Bull*, 74:495-505.



Bradassy F, Cumani F, Bressan G, Supont S (2013). Early reproductive stages in the crustoce coralline alga *Phymatolithon lenormandii* are strongly affected by mild ocean acidification. *Mar Biol*, DOI 10.1007/s00227-013-2260-2.

Bray L, Pancucci-Papadopoulou MA, Hall-Spencer JM (2014). Sea urchin response to rising $p\text{CO}_2$ shows ocean acidification may fundamentally alter the chemistry of marine skeletons. *Medit Mar Sci*, 15(3):510-519.

Burnell OW, Bayden RD, Irving AD, Connell SD (2013). Eutrophication offsets increased sea urchin grazing on seagrass caused by warming and acidification. *Mar Ecol Prog Ser*, 485:37-46.

Byrne M (2011). Impact of Ocean warming and Ocean Acidification on marine invertebrate life history stages: vulnerabilities and potential for persistence in a changing ocean. *Oceanogr Mar Biol: An Annual Review*, 49: 1-42.

Byrne M, Ho M, Wong E, Soars NA, Selvakumaraswamy P, Shepard-brennand H, Dwoejany SA, Davis AR (2011). Unshelled abalone and corrupted urchins, development of marine calcifiers in a changing ocean. *P Roy Soc B-Biol Sci*, 278: 2376–2383.

Byrne M, Lamare M, Winter D, Dworjany SA, Uthicke S (2013) The stunning effect of a high CO_2 ocean on calcification and development in sea urchin larvae, a synthesis from the tropics to the poles. *Phil Trans R Soc B*, 368: 20120439.

Byrne M, Smith AM, West S, Collard M, Dubois P, Graba-landry A, Dwoejany A (2014). Warming influences Mg^{2+} content, while warming and acidification influence calcification and test strength of a sea urchin. *Environ Sci Technol*, DOI:dx.doi.org/10.1021/es5017526.

Cao L, Caldeira K (2008). Atmospheric CO_2 stabilization and ocean acidification. *Geophys Res Lett*. doi:10.1029/2008GL035072.

Clemente S, Hernández JC, Rodríguez A, Brito A (2010). Identifying keystone predators and the importance of preserving functional diversity in sublittoral rocky bottoms. *Mar Ecol Prog Ser*, 413:55-67

Clemente S, Mendoza JC, Hernández JC (2013). Underwater volcanic eruption weakens trophic cascades. IN: Climate Change Perspectives from the Atlantic: Past, Present and Future (Fernández-Palacios JM, Nascimento L, Hernández JC, Clemente S, González A, Díaz-González JP (Eds) 1º edc. La Laguna: Servicio de Publicaciones, Universidad de La Laguna. 727 pp.

Cohen-Rengifo M, García E, Hernández CA, Hernández JC ,Clemente S (2013). Global warming and ocean acidification affect fertilization and early development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Cah Biol Mar*, 54:667-675.

Connell SD, Russell BD (2010). The direct effects of increasing CO_2 and temperature on non-calcifying organisms: increasing the potential for phase shifts in kelp forests. *Proc R Soc B*, 277:1409-1415.

CAPÍTULO 2

- Connell SD**, Kroeker KJ, Fabricius KE, Kline DI, Russell BD (2013). The other ocean acidification problem: CO₂ as a resource among competitors for ecosystem dominance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368:20120442.
- Cornwall CE**, Hepburn CD, Pritchard D, Currie KI, McGraw CM, Hunter KA, Hurd CL (2011). Carbon-use strategies in macroalgae: differential responses to lowered pH and implications for ocean acidification. *J Phycol*, 48:137-144.
- Diaz-Pulido G**, Gouezo M, Tilbrook B, Dove S, Anthony KRN (2011). High CO₂ enhances the competitive strengths of seaweeds over coral. *Ecol Lett*, 14: 156-162
- Dickson AG**, Millero FJ (1987). A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep-Sea Res*, 34:1733-1743.
- Doropoulos C**, Ward S, Diaz-Pulido, Hoegh-Guldberg O, Mumby PJ (2012). Ocean acidification reduces coral recruitment by disrupting intimate larval-algal settlement interactions. *Glob Chan Biol*, 15: 338-346.
- Duarte CM** (2014). Global change and the future ocean: a grand challenge for marine sciences. *Frontiers in marine science*. doi: 10.3389/fmars.2014.00063.
- Dupont S**, Thorndyke M (2013). Direct impacts of near-future ocean acidification on sea urchins. In: Fernández-Palacios JM, de Nacimiento L, Hernández JC, Clemente S, González A, Díaz-González JP (eds). Climate Change Perspectives from the Atlantic: Past, Present and Future. Servicio de publicaciones de La Universidad de La Laguna, La Laguna, Spain.
- Dupont S**, Dorey N, Stumpp M, Melzner F, Thorndyke M (2012). Long-term and trans-life-cycle effects of exposure to ocean acidification in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Mar Biol*, 160:1835-1843.
- Egilsdottir H**, Noisette F, Noël LMLJ, Olafsson J, Martin S (2012). Effects of pCO₂ on phisiology and skeletal mineralogy in a tidal pool coralline alga *Corallina elongata*. *Mar Biol*, 160:2103-2112.
- Falkenberg LJ**, Russell BD, Connell SD (2013). Contrasting resource limitations of marine primary producers: implications for competitive interactions under enriched CO₂ and nutrient regimes. *Oecologia*, 172:575-583.
- Fraile-Nuez E**, González-Dávila M, Santana-Casiano JM, Arístegui J, Alonso- González IJ, Hernández- León S, Blanco MJ, Rodríguez-Santana A, Hernández-Guerra A, Gelado-Caballero MD, Eugenio F, Marcelo J, De Armas D, Domínguez-Yanes JF, Montero MF, Laetsch DR, Vélez-Velchí P, Ramos A, Ariza AV, Comas-Rodríguez I, Benítez-Barrios VM (2012). The submarine volcano eruption at the island of el Hierro: physical-chemical perturbation and biological response. *Scientific Reports* 2:486.doi:10.1038/srep00486.
- Fu F-X**, Zhang Y, Warner ME, Feng Y, Sun J, Hutchins DA (2008). A comparison of future increased CO₂ and temperature effects on sympatric *Heterosigma akashiwo* and *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae* 7: 76-90.



- Gattuso JP**, Allemand D, Frankignoulle M (1999). Photosynthesis and calcification at cellular, organismal and community levels in coral reefs: a review on interactions and control by carbonate chemistry. *Am Zool*, 39 (1):160–183.
- Gao K**, Aruga Y, Asada K, Ishihara T, Akano T, Kiyohara M (1993). Calcification in the articulated coralline alga *Corallina pilulifera*, with special reference to the effect of elevated CO₂ concentration. *Mar Biol*, 117:129-132.
- García E** (2014). Effects of global warming and ocean acidification on fertilization, larvae development and settlement of the sea urchins in the Canary Islands. Tesis doctoral, Universidad de La Laguna.252pp.
- Giordano M**, Beardall J, Raven JA (2005). CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation and evolution. *Annu Rev Plant Biol*, 56:99-131.
- Girard D**, Herrero A, Mora J, Hernández JC, Brito A, González N, Catoire JL (2008). Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) in its southern population limit (Canary Islands - eastern Atlantic). *Gulf Mex Sci*, 26: 149.
- Gómez I**, Huovinen P (2012). Morpho-functionality of carbon metabolism in seaweeds. IN: Seaweed biology Novel INsights into Ecophysiology, Ecology and Utilization (Wiencke C, Bischof K (Eds).Springer Heidelberg New York Dordrecht London.508pp.
- Gordillo FJL** (2012). Environment and algal nutrition. In: Wiencke C. & Bischof K(eds.), *Seaweed Biology Ecological Studies*. pp: 67- 86. Springer-Verlag, Berlin.
- Hall-Spencer JM**, Rodolfo-Metalpa JM, Martin S, Ransome E, Fine M, Turner SM, Rowley SJ, Tedesco D, Buia M-C (2008). Volcanic carbon dioxide events show ecosystem effects of ocean acidification. *Nature*, 454: 96-93.
- Harley CDG**, Anderson KM, Demes KW, Jorve JP, Kordas RL, Coyle TA (2012). Effects of climate change on global seaweed communities. *J Phycol*, 48:1064-1078.
- Hein M**, Sand-Jensen K (1997). CO₂ increases oceanic primary production. *Nature* 388: 526-527.
- Hendriks IE**, Duarte CM, Álvarez M (2010). Vulnerability of marine biodiversity to ocean acidification: A meta-analysis. *Estuar Coast Shelf S*, 86:157-164.
- Hernández JC**, Clement S, Sangil C, Brito A (2008). The key role of the sea urchin *Diadema* aff. *antillarum* in controlling macroalgae assemblages throughout the Canary Islands (eastern subtropical Atlantic): An spatio-temporal approach. *Mar Environ Res*, 66: 259-270
- Hernández JC**, Clemente S, Girard D, Pérez-Ruzafa A, Brito A (2010). Effect of temperature on settlement and postsettlement survival in a barrens-forming sea urchin. *Mar Ecol Prog Ser*, 413:69-80.

CAPÍTULO 2

- Hernández JC**, Clemente S, Tuya F, Pérez-Ruzafa A, Sangil C, Moro-Abad L and Bacallado-Aránega JJ (2013). Echinoderms of the Canary Islands, Spain IN: "Echinoderm Research and Diversity in Latin America"Eds:Alvarado J.A, Solís-Marín F.Springer Heidelberg New York Dordrecht London. ISBN 978-3-642-20020-2.
- Hofmann LC**, Yildiz G, Hanelt D, Bischof K (2012). Physiological responses of the calcifying rhodophyte, *Corallina officinalis* (L.), to future CO₂ levels. *Mar Biol*, 159:783-792.
- Hurd CL**, Hepburn CD, Currie KI, Raven JA, Hunter KA (2009). Testing the effects of ocean acidification on algal metabolism: considerations for experimental designs. *J Phycol* 45:1236–1251
- Iglesias-Rodriguez MD**, Halloran PR, Rickaby REM, Hall IR, Colmenero-Hidalgo E, Gittins JR, Green DRH, Tyrrel T, Gibbs SJ, von Dassow P, Rehm E, Armbrust EV, Boessenkool KP (2008). Phytoplankton calcification in a high-CO₂ world. *Science* 320, 336-340.
- IPCC** (2013). Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Stocker TF, Qin D, Plattner GK, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM (eds.)] Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Israel A**, Hopi M (2002). Growth, photosynthetic properties and Rubisco activities and amounts of marine macroalgae grown under current and elevated seawater CO₂ concentrations. *Global Change Biol*, 8:831-840.
- Johnson V**, Russell BD, Fabricius KE, Brownlee C, Hall-Spencer JM (2012). Temperature and tropical brown macroalgae thrive, despite decalcification, along natural CO₂ gradientes. *Global Change Biol*, 18:2792-2803.
- Jokiel PL**, Rodgers KS, Kuffner IB, Andersson AJ, Cox EF, Mackenzie FT (2008). Ocean acidification and calcifying reef organisms: a mesocosm investigation. *Coral Reefs*, 27:473–483.
- Kleypas JA**, Langdon C (2006). Coral reefs and changing seawater carbonate chemistry. *Coast estuar stud* ,61:73-110.
- Koch M**, Bowes G, Ross C, Zhang X-H (2013). Climate change and ocean acidification effects on seagrasses and marine macroalgae. *Global Change Biol*, 19:103-132.
- Kübler JE**, Johnston AM, Raven JA (1999).The effects of reduced and elevated CO₂ and O₂ on the seaweed *Lomentaria articulata*. *Plant Cell Environ*, 22:1303-1310.
- Kuffner IB**, Andersson AJ, Jokiel PL, Rodgers KS, Mackenzie FT (2008). Decreased abundance of crustose coralline algae due to ocean acidification. *Nat Geosci*, 1:114–117.
- Lewis E**, Wallace D (1998). Program developed for CO₂ system calculations. ORNL/CDIAC-105. Oak Ridge, Tennessee:Carbon Dioxide Information Analysis Center.

HERBIVORÍA Y ACIDIFICACIÓN



- Ling SD**, Scheibling RE, Rassweiler A, Johnson CR, Shears N, Connell SD, Salomon AK, Norderhaug KM, Pérez-Matus A, Hernández JC, Clemente S, Blamey LK, Hereu B, Ballester E, Sala E, Garrabou J, Cebrina E, Zabala M, Fujita D, Johnson E (2015). Global regime shift dynamics of catastrophic sea urchin overgrazing. *Phil Trans R Soc B*, 370:20130269.
- Martin S**, Gattuso JP (2009). Response of Mediterranean coralline algae to ocean acidification and elevated temperature. *Global Change Biol*, 15:2089-2100.
- Martin S**, Cohu S, Zimmerman G, Gattuso JP (2013). One-year experiment on the physiological response of the Mediterranean crustose coralline alga, *Lithophyllum cabiochae*, to elevated $p\text{CO}_2$ and temperature. *Ecol Evol*, 3(3):676-693
- Martone PT** (2010). Quantifying growth and calcium carbonate deposition of *Calliarthron cheilosporioides* (Corallinales, Rhodophyta) in the field using a persistent vital stain. *J Phycol*, 46, 13-17.
- McCoy S**, Kamenos NA (2015). Coralline algae (Rhodophyta) in a changing world: integrating ecological, physiological, and geochemical responses to global change. *J Phycol*, 51:6-24.
- Mehrbach C**, Culberson CH, Hawley JE, Pytkowicz RM (1973). Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in sea water at atmospheric pressure. *Limnol Oceanogr*, 18:897-907.
- Nelson WA** (2009). Calcified macroalgae- critical to coastal ecosystems and vulnerable to change: a review. *Mar Freshwater Res* 60:787–801.
- Porzio L**, Buia MC, Hall-Spencer JM (2011). Effects of ocean acidification on macroalgal communities. *J Exp Mar Biol Ecol*, 400:278-287.
- Ragazzola F**, Foster L, Form A, Anderson PSL, Hansteen TH, Fietzke J (2012). Ocean acidification weakens the structural integrity of coralline algae. *Global Change Biol*, 18:2804-2812.
- Ragazzola F**, Foster L, Form AU, Büscher J, Hansteen TH, Fietzke J (2013). Phenotypic plasticity of coralline algae in a high CO_2 world. *Ecol Evol*, 3:3436-3446.
- Raven JA**, Geider RD (2003). Adaptation, acclimation and regulation of photosynthesis in algae. Pp. 385–412 in A. W. D. Larkum, S. E. Douglas and J. A. Raven, eds. *Photosynthesis in Algae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Raven JA**, Giordano M (2009). Biomineralization by photosynthetic organisms: evidence of coevolution of the organisms and their environment? *Geobiology*, 7:140-154.
- Riebesell U** (2004). Effects of CO_2 enrichment on marine phytoplankton. *J Oceanogr*, 60: 719-729.

CAPÍTULO 2

Ries JB (2009). Effects of secular variation in seawater Mg/Ca ratio (calcite-aragonite seas) on CaCO₃ sediment production by the calcareous algae *Halimeda*, *Penicillus* and *Udotea* –evidence from recent experiments and the geological record. *Terra Nova*, 21:323-339.

Ries JB (2010). Review: geological and experimental evidence for secular variation in seawater Mg/Ca (calcite-aragonite seas) and its effects of marine biological calcification. *Biogeosciences* 7:2795–2849.

Roa R, (1992). Design and analysis and multiple-choice feeding-preference experiments. *Oecologia*, 89:509-515.

Roleda MY, Hurd CL (2012). Seaweed responses to ocean acidification. In: Wiencke C. & Bischof K(eds.), *Seaweed Biology. Ecological Studies*. pp: 407- 431. Springer-Verlag, Berlin.

Rossoll D, Bermúdez R, Hauss H, Schulz KG, Riebesell U, Sommer U, Winswe M (2012). Ocean Acidification-Induced food quality deterioration constrains trophic faster. PLoS one. DOI: 10.1371/journal.pone.0034737

Rost B, Riebesell U, Burkhardt S (2003). Carbon acquisition of bloom-forming marine phytoplankton. *Limnol Oceangr*, 48: 55-67

Ruitton S, Francour P, Boudouresque C (2000). Relationships between algae, benthic herbivorous invertebrates and fishes in rocky sublittoral communities of a temperate sea (Mediterranean). *Estuar Coast Shelf Sci* 50(2):217-230.

Russell B D, Thompson J A I, Falkenberg L J, Connell S D (2009). Synergistic effects of climate change and local stressors: CO₂ an nutrient-driven change in subtidal rocky habitats. *Global Change Biol*, 15(9):2153-2162.

Sangil C (2013). Cambios en la biodiversidad vegetal submarina del Mar de Las Calmas tras la erupción volcánica de La Restinga: una oportunidad para profundizar en el conocimiento de los ecosistemas marinos de Canarias. IN: El Hierro Nacimiento de un volcán. Actas VIII Semana Científica Telesforo Bravo Instituto de Estudios Hispánicos de Canarias. Julio Afonso, eds.55-82pp.

Sangil C, Sansón M, Díaz-Villa T, Hernández JC, Clemente S, Afonso-Carrillo J (2014). Spatial variability, structure and composition of crustose algal communités in *Diadema africanum* barrens. *Helgol Mar Res*, 68:451-464.

Shirayama Y, Thornton H (2005). Effect of increased atmospheric CO₂ on shallow water marine benthos. *J Geophys Res*, 110(C9):C09S08.

Stanley SM (2008). Effects of global seawater chemistry on biomineralization: past, present and future. *Chem Rev* 108:4483–4498.

Steneck RS, Dethier MN (1993). A functional group approach to the structure of algal-dominated communities. *Oikos*, 69(3):476-498.

HERBIVORÍA Y ACIDIFICACIÓN



Tortell PD, Rau GH, Morel FMM (2000). Inorganic carbon acquisition in coastal Pacific phytoplankton communities. *Limnol Oceanogr*, 45: 1485-1500.

Villouta E, Chadderton WL, Pugsley CW, Hay CH (2001). Effects of sea urchin (*Evechinus chloroticus*) grazing in Dusky Sound, Fiordlands, New Zealand. *NZ J Mar Freshw Res*, 35:1007-1024.

Wernberg T, Smale DA, Thomsen MS (2012). A decade of climate change experiments on marine organisms: procedures, patterns and problems. *Global Change Biol*, 18:1491-1498

Wolfe K, Dwoejanyn S, Byrne M (2013). Effects of ocean acidification on survival, growth and skeletal development in the early benthic juvenile sea urchin (*Helicidaris erythrogramma*). *Global Change Biol*, 19:2698-2707.



Sección II: Crecimiento de juveniles de erizos de mar y efecto de la acidificación

Capítulo 3

“Efficiency on calcein tagging on juveniles of the sea urchins
Diadema africanum and
Paracentrotus lividus”



Rodríguez A, Hernández JC, & Clemente S. Efficiency on calcein tagging on juveniles of the sea urchins *Diadema africanum* and *Paracentrotus lividus*
Mar Ecol (in press)

ÍNDICE

1. ABSTRACT	123
2. INTRODUCTION	124
3. MATERIAL AND METHODS	125
4. RESULTS	126
5. DISCUSSION	132
6. REFERENCES	133



1. ABSTRACT

We evaluated the effectiveness of chemical tagging with calcein on two key species of herbivorous sea urchins, *Diadema africanum* and *Paracentrotus lividus*, to facilitate medium and long term ecological experiments. A total of 98 juveniles of *D. africanum* and 98 *P. lividus* were tagged with the fluorescent marker, using 12 possible combinations of different tagging techniques (chemical bath or injection), concentrations of calcein (2 mg/l, 10 mg/l and 20 mg/l), and soak times (2, 4 and 24 hours). Respective control treatments were conducted by means of seawater injection and bathing. The success of tagging was assessed after a month of feeding individuals *ad libitum* with the algae *Dyctiota* sp. Sea urchins were dissected and their Aristotle's lanterns cleaned with sodium hypochlorite 10% to observe these structures under UV light using a binocular microscope. Each species was evaluated in terms of survival, percentage of tagged individuals, and intensity of the resulting tag. Results showed that soaking individuals of both species for 24 hours at concentrations of calcein of 10 and 20 mg/l had the highest survival (100%) and the tags appeared clearly visible.

2. INTRODUCTION

To study sea urchin dynamics and understand the growth of sea urchin populations, several tagging techniques have been developed for various echinoid species (Ebert 1965; Kobayashi & Taki 1969; Pearse & Pearse 1975; Gage 1992; Lamare 2000; Rogers-Bennet 2003; Russel & Meredith 2000; Russel & Urbaniak 2004). These tagging procedures have used internal markers introduced into the coelomic cavity (Hagen 1996; Kalvas et al 1998) or external ones anchored by piercing the test (Ebert 1965; Neill 1987; Clemente et al 2007), as well as chemical markers such as fluorochrome-staining (Ebert 1977, 1980a, 1980b, 1992; Schroeter 1978; Russell 1987; Rowley 1990). In the latter case, various studies focused on calcein and tetracycline markers demonstrated that these fluorochromes have a minimal effect on long-term growth in echinoids (Ebert 1988; Russell & Urbaniak 2004; Ellers & Johnson 2009; Sonnernholzner et al 2010) and do not affect their survival or mortality (Lamare & Maldenov 2000; Russell & Urbaniak 2004). However, little is known about the specific suitability of these techniques with juvenile stages of echinoids, except from the studies with the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* (Haag et al 2013; Johnson et al 2013). In other taxa, optimal calcein treatments for successfully tagging individuals have already been tested (Purcell et al 2006; Purcell & Blockmans 2009).

For *Paracentrotus lividus* and *Diadema africanum*, only external tagging techniques with perforation of the test have been applied in order to perform short-term ecological experiments (Dance 1987; Tuya et al 2004; Hereu 2005; Sala & Zabala 1996; Clemente et al 2007). However, fluorochromes have not been previously tested with these species. In this study we have chosen calcein as chemical marker because several previous studies has shown a less toxic effect of this fluorochrome than tetracycline in some marine organisms as brachiopods (Rowley & Mackinnon 1995), fishes (Monaghan 1993) or abalone (Day et al 1995). Calcein is incorporated into calcified structures, such as Aristotle's lantern, and under ultra-violet light with a filter FITC cube, this mark is observable as a fluorescent mark. We, therefore aimed to evaluate the efficiency of chemical tagging with calcein on two species of sea urchins, *D. africanum* and *P. lividus*, in order to facilitate medium and long term ecological experiments. We specifically assessed sea urchin survival, percentage of tagged individuals, and intensity of mark of individuals subject to different tagging procedures.



3. MATERIAL AND METHODS

A total of 98 juveniles of *D. africanum* (ranging 5.94-10.69 mm in test diameter) and 98 juveniles of *P. lividus* (5.00-10.10 mm) were collected by SCUBA diving at two sites off the southeastern coast of Tenerife (Canary Islands, Spain). Individuals were kept in the laboratory for one week and measured with calipers. Each specimen was randomly chosen and placed in a 100 ml beaker with air bubbling and then tagged with the fluorescent marker. Different tagging techniques (chemical bath or injection), concentrations of calcein (2 mg/l, 10 mg/l and 20 mg/l), and different soak times (2, 4 and 24 hours when using chemical baths) were used, providing a total of 12 treatments with the possible combinations. In the case of injection treatments, the volume injected was 1-2 ml depending on the size of sea urchins. Respective control treatments were conducted by means of seawater injection and bathing of 7 individuals respectively for each species. All individual were feeding *ad libitum* in the laboratory with the algae *Dyctiota sp.* The success of tagging was assessed after a month. Every day, the water in each beaker was replaced. During the experiments, salinity, temperature and pH were kept constant at $36.2 \pm 0.2\text{‰}$, $20.5^\circ\text{C} \pm 0.5$, and 8.0 ± 0.1 respectively (mean \pm SD).

After one month, all individuals were dissected and their Aristotle's lanterns cleaned with sodium hypochlorite (10% household bleach diluted in seawater) for 6 hours and observed under UV light using a binocular microscope (NIKON AZ 100 with FITC filter cube).

We assessed sea urchin survival, percentage of tagged individuals, and intensity of the mark (not tagged, diffuse, faint and bold), see Figure 1.

Statistical analyses of sea urchin survival and percentage of tagged individuals consisted of 3-way permutational ANOVAs with Euclidean distances of raw data and 4999 permutations of the appropriate exchangeable units (Anderson 2004), using PRIMER6 & PERMANOVA+ software. These ANOVAs used the fixed factors 'species' (2 levels: *Diadema africanum*, and *Paracentrotus lividus*), 'tagging treatment' (6 levels: inject control, soak control, soak 2h, soak 4 h, soak 24h, and injection), and 'calcein concentration' (3 levels: 2 mg/l, 10 mg/l, and 20 mg/l). When necessary, pairwise *a posteriori* comparisons were executed using permutations

CAPÍTULO 3

(Anderson 2004). Tag intensity was analyzed using a Chi square test of the frequency of individuals showing bold, faint, diffuse or no tag.

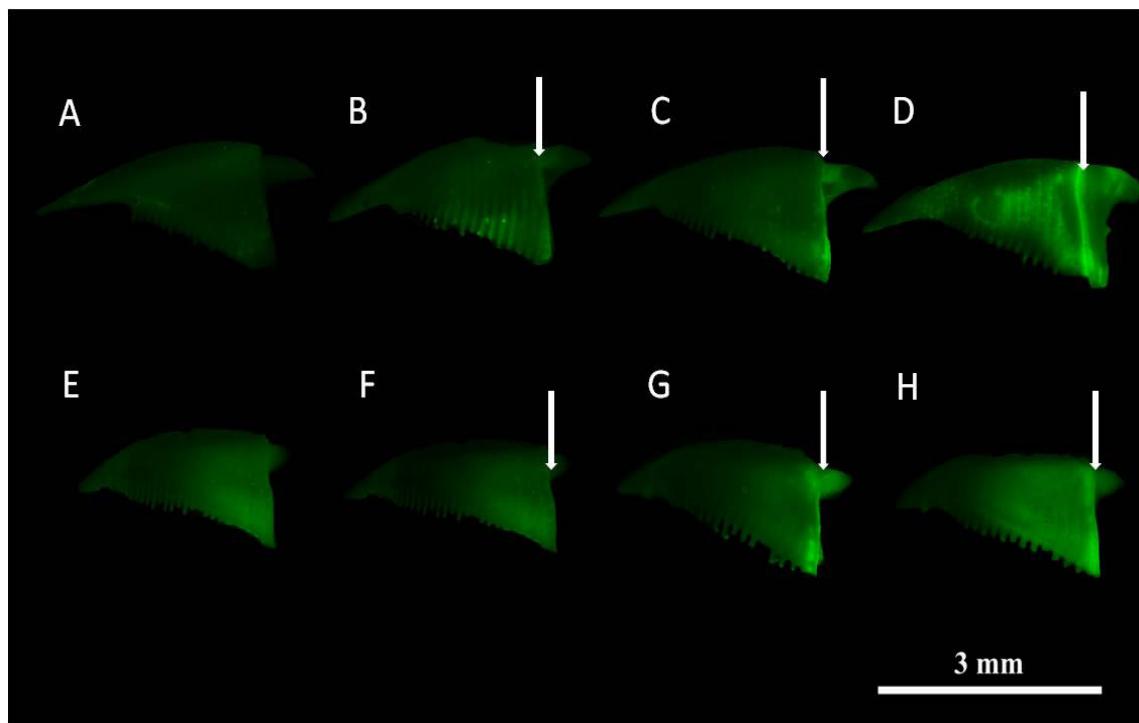


Figure 1. Photographs of calcein marked sea urchins' demipyramids viewed using a FITC filter cube on a fluorescence compound microscope showing the four categories assigned to calcein tag intensity for *D. africanum* (A-D) and *P. lividus* (E-H): A and E. Untagged; B and F. Diffuse tag; C and G. Faint tag; D and H. Bold tag. Arrows show the calcein tag in sea urchins' demipyramids. Scal bar is included.

4. RESULTS

The percentage of surviving individuals at the end of the experiment was 92% of *D. africanum* and 88% of *P. lividus* individuals, with no significant differences between species in survival ($F= 0.41$, $p=0.87$) (see Table 1 and Figure 2). Also no significant differences in sea urchin survival were detected between tagging treatments ($F= 2.03$, $p= 0.09$) or concentrations ($F= 0.53$, $p= 0.72$) or any interaction of factors ($F= 1.33$, $p= 0.24$) (see Table 1 and Figure 2).



Table 1. Results of the three-way permutational ANOVA for survival, with 3 fixed factors, species (*D. africanum* vs. *P. lividus*), treatment (soak 2h vs. soak 4h vs. soak 24 h vs. injection vs. control soak vs. control injection) and concentration (2 mg vs. 10 mg vs. 20 mg), in experiments assessing the efficiency of calcein tagging.

Survival	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
<i>Species (Sp)</i>	1	22.7	22.68	0.41	ns
<i>Treatment (T)</i>	4	429.9	107.47	2.03	ns
<i>Concentration (Co)</i>	2	158.7	79.36	1.50	ns
<i>Sp*T</i>	4	112.4	28.11	0.53	ns
<i>Sp*Co</i>	2	52.9	26.45	0.50	ns
<i>T*Co</i>	6	423.3	70.54	1.33	ns
<i>Sp*T*Co</i>	6	423.3	70.54	1.33	ns
<i>Residual</i>	168	8888.9	52.91		
<i>Total</i>	195	10544			

When assessing the percentage of tagged individuals, significant interactions of the factors species, tagging treatment and calcein concentration were obtained (Table 2A). In general, the techniques of soaking 24 h and 12 h at concentrations of 20 mg/l produced higher percentage of tagging than the other treatments. The percentage of tagged individuals varied according to treatment, concentration and the species studied. Pairwise interactions between species and treatment showed significant differences in the percentage of tagged sea urchins (Table 2B). For example, soaking for 4 h in a 2mg/l of calcein resulted in 0% of tagging in *D. africanum*, but 45% in *P. lividus* (Figure 2). In *P. lividus* the percentage tagged was higher than in *D. africanum*: 70% and 15% respectively in treatments of 2h at 2 mg/l (Table 2B, Figure 2). Furthermore, the percentage of tagged *D. africanum* was significantly different after all soaking times and between concentrations, with lower percentage of tagged individuals at 2 mg/l than at 10 or 20 mg/l (Figure 3A and Table 2C). In *P. lividus* there were significant differences in the percentage of tagged sea urchins between calcein concentrations of 2 and 20 mg/l only in

the 4 h soaking treatment (Table 2C, Figure 3B). Within the injection treatments there were no significant differences in the proportion of tagged sea urchins between calcein concentrations in both studied species (Table 2C, Figure 3B).

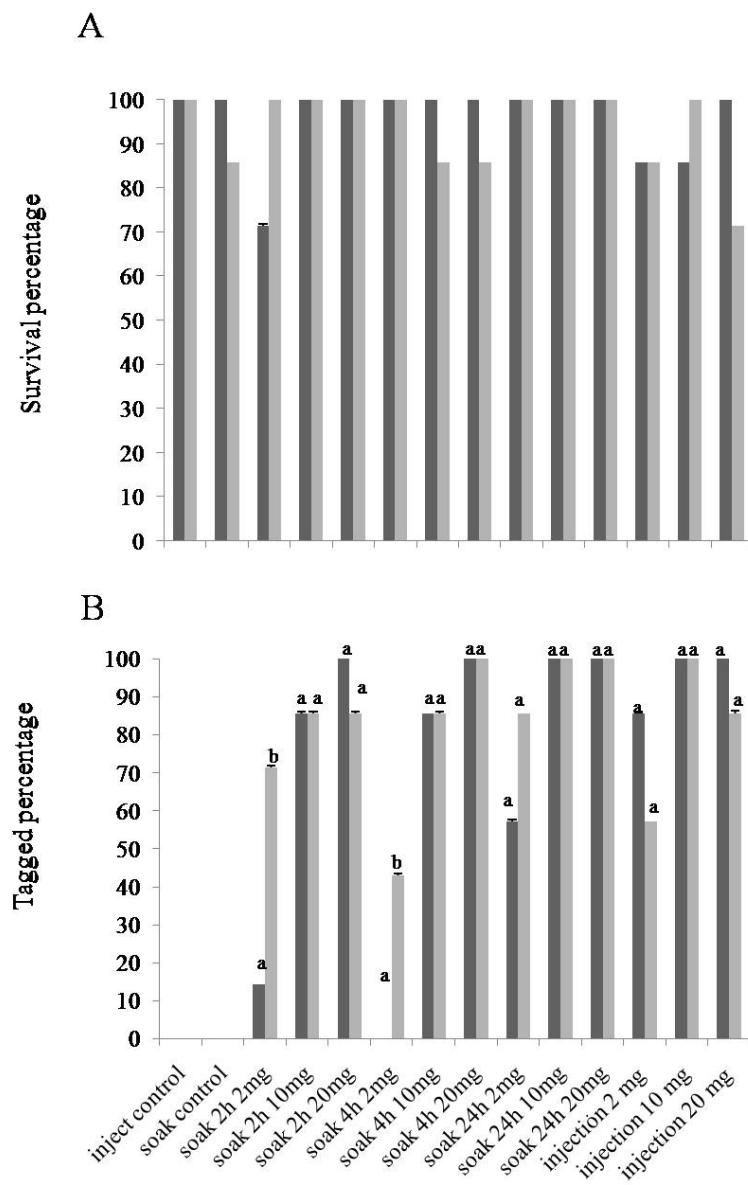


Figure 2. (A) Survival percentage and (B) percentage of tagged individuals of two sea urchin species, *Diadema africanum* and *Paracentrotus lividus*, for each treatment in experiments assessing the efficacy of calcein tagging. *D. africanum* as dark gray and *P. lividus* as light gray. Bars with different letters are significantly different within each treatment ($p < 0.05$).

TÉCNICA DE MARCAJE



Table 2. (A) Results of the three-way permutational ANOVA for percentage of tagged individuals, with 3 fixed factors, species (*D. africanum* vs. *P. lividus*), treatment (soak 2h, soak 4h, soak 24 h, injection, control soak and control injection) and concentration (2 mg vs. 10 mg vs. 20 mg) in experiments. (B, C) Estimates for pairwise comparisons of significant interaction of the factors species, treatment and concentration are shown for comparisons between (B) species and (C) calcein concentrations. Only significant pairwise test are shown for comparisons among sea urchins; * p < 0.05; ** p < 0.01; ns: not significant.

A)	Tag percentage	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
<i>Species (Sp)</i>	1	22.6	22.68	0.10		ns
<i>Treatment (T)</i>	4	2830.7	707.67	8.51		**
<i>Concentration (Co)</i>	2	2156.1	1078.00	12.97		**
<i>Sp*T</i>	4	2195.8	548.94	6.61		**
<i>Sp*Co</i>	2	251.3	125.66	1.51		ns
<i>T*Co</i>	6	859.8	143.30	1.72		ns
<i>Sp*T*Co</i>	6	2129.6	354.94	4.27		**
<i>Residual</i>	168	8888.9	52.91			
<i>Total</i>	195	10544				
<i>Pairwise analyses</i>				<i>t</i>	<i>P(MC)</i>	
B)	<i>Diadema</i> vs. <i>Paracentrotus</i>		Soak 2h 2mg	3.87	**	
			Soak 4h 2mg	2.83	*	
C)			2mg vs. 10mg	2.83	*	
	<i>Diadema Soak 2h</i>		2mg vs. 20mg	6	**	
			10mg vs. 20mg	1.15	ns	
			2mg vs. 10 mg	4.31	**	
	<i>Diadema Soak 4h</i>		2mg vs. 20 mg	2.51	*	
			10mg vs. 20mg	0.91	ns	

CAPÍTULO 3

		2mg vs. 10 mg	
<i>Diadema Soak 24h</i>		6	**
	2mg vs. 20 mg	6	**
	10mg vs. 20mg	6.26e ⁻⁹	ns
<i>Diadema Injection</i>		5.65	ns
	2mg vs. 20 mg	7.64	ns
	10mg vs. 20mg	6.93	ns
<i>Paracentrotus Soak 2h</i>		1.84	ns
	2mg vs. 20mg	0.90	ns
	10mg vs. 20mg	1.37	ns
<i>Paracentrotus Soak 4h</i>		1.73	ns
	2mg vs. 20mg	2.83	*
	10mg vs. 20mg	1	ns
<i>Paracentrotus Soak 24h</i>		1.23	ns
	2mg vs. 20mg	1.11	ns
	10mg vs. 20mg	1.09	ns
<i>Paracentrotus Injection</i>		2.12	ns
	2mg vs. 20mg	1.15	ns
	10mg vs. 20mg	1	ns

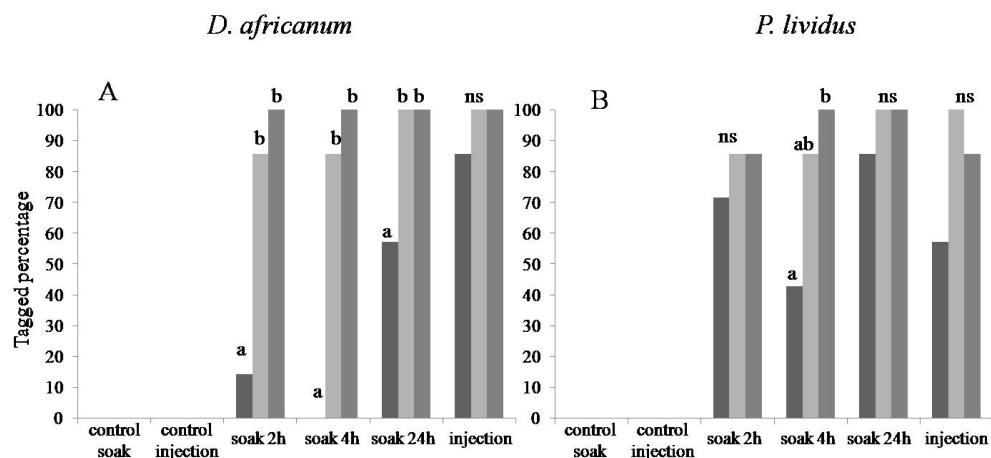


Figure 3. Percentages of tagged individuals of (A) *Diadema africanum* and (B) *Paracentrotus lividus*, in each treatment in experiments assessing the efficacy of calcein tagging. Concentration of 2 mg/l as dark gray bar, 10 mg as light gray bar, and 20 mg as medium gray. Bars with different letters are significantly different within each treatment ($p < 0.05$), ns indicates no significant differences.



When analyzing the intensity of the mark, we found significant differences between species ($\chi^2= 24.343$; $p< 0.001$), tagging treatments, and calcein concentrations. In *D. africanum*, these differences were between tagging treatments ($\chi^2= 89.74$; $p< 0.001$) and between calcein concentrations ($\chi^2= 95.02$; $p< 0.001$).

We found similar differences between soaking times ($\chi^2= 82.78$; $p< 0.001$) and between calcein concentrations ($\chi^2= 93.05$; $p< 0.001$) in *P. lividus*. Best results of tag intensity in *D. africanum* were obtained in the soaking treatment for 24 hours and in the injection treatment regardless of the calcein concentration used. In these treatments we found 12 and 8 individuals bold marked respectively (Figure 4A). In general, the higher calcein concentrations showed faint and bold tags, while at the lowest concentrations, tags were diffuse or individuals were untagged (Figure 4A). In *P. lividus* the intensity of the mark was more intense in the soaking treatment for 24 hours than in the rest of treatments (Figure 4B). We found 10 individuals with faint marks in this treatment while in the soaking treatment for 4h or injection we found only 3 individuals with faint marks in each case. In *P. lividus*, higher calcein concentrations resulted in higher tag intensity, producing faint and bold tags (Figure 4B). Only those *P. lividus* individuals that were soaked for 4hours in 2mg/l calcein were untagged. In both species calcein injection produced diffuse marks at low concentration (2mg/l) and faint marks at 10 and 20 mg/l.

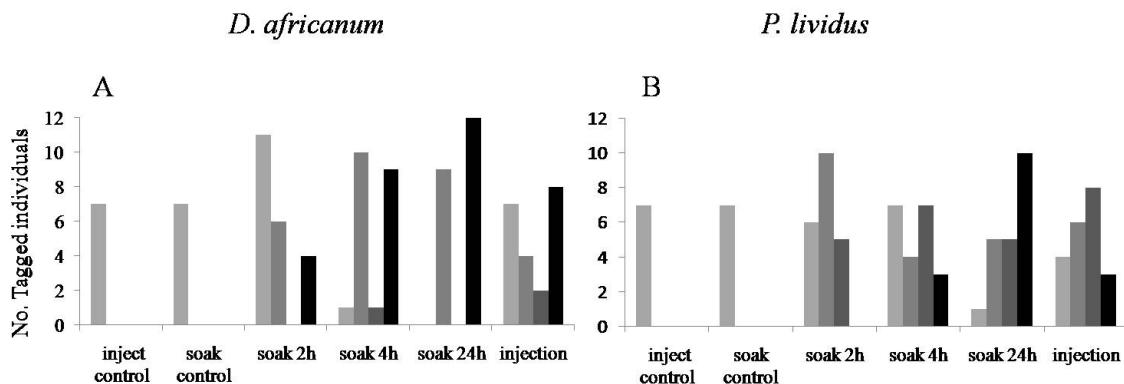


Figure 4. Intensity of the tag in (A) *D. africanum* and (B) *P. lividus* in each treatment assessing the efficacy of calcein tagging in laboratory experiments. Untagged individuals are indicated by light gray bars, diffuse marked individuals are indicated by medium gray bars, faint marked individuals are indicated by dark gray bars and bold marked individuals are indicated by black bars.

5. DISCUSSION

Our results show that tagging with calcein is an effective technique for both, *Diadema africanum* and *Paracentrotus lividus*, with 92 % and 88 % of survival rates, respectively, after one month. Despite these high survival rates, the percentage of tagged individuals and intensity of the mark, varied depending on the technique and concentration of calcein used.

After a soaking time of 24 hours at concentrations of 10 and 20 mg/l, marks were sufficient for use in tag and recapture studies. However, these results varied between species, with *D. africanum* requiring longer soaking times and higher concentrations to produce a sufficient mark. *P. lividus* was more sensitive to calcein than *D. africanum* with the latter species needing longer soaking times or higher calcein concentration. However, when both species are subjected to long soak times and high calcein concentrations, *D. africanum* shows more intense marks than *P. lividus*. Comparisons can be made with previous studies tagging juveniles of other sea urchins species, where concentrations of fluorochrome used were greater. For example, in experiments with 24 h calcein baths, concentrations of 125 mg/l (Russel et al 1998) and 75 mg/l (Ellers & Johnson 2009; Johnson et al 2013) have been used to tag *Strongylocentrotus droebachiensis*. Further, an injection study with *Evechinus chloroticus* used 500 mg/l (Lamare & Mladenov 2000). However, in our study, lower calcein concentrations of 10 mg/l or 20 mg/l were enough to produce a high percentage of tagged individuals in soaking treatments for 24 h, with good clearly visible marks. We found that the best results were at higher calcein concentrations (10-20 mg/l) and longer soaking times, similar to the results in Haag et al (2013). Our study also reveals that the injection technique produces good results at 10 and 20 mg/l for *P. lividus* and at 2, 10 and 20 mg/l for *D. africanum* despite the small size range of individuals tested (5.00-10.69 mm in test diameter), which may simplify field studies allowing a fast and simple tagging procedure to be performed *in situ*.

In conclusion, in this study we established calcein tagging protocols to successfully mark juvenile sea urchins of two different species using appropriate fluorochrome concentrations and tagging treatments to ameliorate costs and treatment effects of the procedure for these sea urchin species. Calcein is a relatively cheap product and large numbers of individuals can now



be tagged in this way to perform long-term experiments in the field and in the laboratory, which may improve the wide usage of the method.

6. REFERENCES

- Anderson MJ** (2004). *PERMANOVA 2factor: a FORTRAN computer program for permutational multivariate analysis of variance using permutation tests*. University of Auckland, Auckland:35 pp.
- Clemente S**, Hernández JC, Brito A (2007). An external tagging technique for the long-spined sea urchin *Diadema aff antillarum*. *J Mar Biol Assoc UK*, 87:777-779.
- Dance C** (1987). Patterns of activity the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Bay Port-Cros (Var, France, Mediterranean). *PSZN I: Mar Ecol*, 8:131-142.
- Day RW**, Williams MC, Hawkes GP (1995). A comparison of fluorochromes for marking abalone shells. *Mar Freshw Res*, 46:599-605.
- Ebert TA** (1965). A technique for the individual marking of sea urchins. *Ecology* , 46:193-194.
- Ebert TA** (1988). Calibration of natural growth lines in ossicles of two sea urchins, *Strongylocentrotus purpuratus* and *Echinometra mathaei*, using tetracycline. In: R.D. Burke, P. Mladenov, P. Lambert & R.L. Parsley (Eds). *Proceedings of the Sixth International Echinoderm Conference*. A.A. Balkema, Rotterdam: 435-444.
- Ebert TA** (1977). An experimental analysis of sea urchin dynamics and community interactions on a rock jetty. *J Exp Mar Biol Ecol*, 27: 1-22.
- Ebert TA** (1980a). Relative growth of sea urchin jaws: an example of plastic resource allocation. *B Mar Scie*, 30: 467-474.
- Ebert TA** (1980b). Estimating parameters in a flexible growth equation, the Richards function. *Can J Fish Aquat Sci*, 37:687-692.
- Ebert TA**, Russell MP (1992). Growth and mortality estimates for red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*, from San Nicolas Island, California. *Mar Ecol Progr Ser*, 81:31-41.
- Ellers O**, Johnson AS (2009). Polyfluorochrome marking slows growth only during the marking month in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Invertebr Biol*, 128:126-144.
- Gage JD** (1992). Growth bands in the sea urchin *Echinus esculentus*: results from tetracycline-mark recapture. *J Mar Biol Assoc UK*, 72:257-260.

CAPÍTULO 3

- Haag N**, Russell MP, Hernández JC, Dollahon N (2013). Assessing fluorochrome-staining efficacy in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis* (Müller, 1776). *Cah Biol Mar*, 54:625- 631.
- Hagen NT** (1996). Tagging sea urchins: a new technique for individual identification. *Aquaculture*, 139:271-284.
- Hereu B** (2005). Movement patterns of the sea urchins *Paracentrotus lividus* in a marine reserve and an unprotected area in the NW Mediterranean. *Mar Ecol*, 26:54-62.
- Johnson AS**, Salyers JM, Alcorn NJ, Ellers O, Allen JD (2013). Externally visible fluorochrome marks and allometries of growing sea urchins. *Invertebr Biol*, 132(3):251-269.
- Kalvass PE**, Hendrix JM, Law PM (1998). Experimental analysis of 3 internal marking methods for red sea urchins. *Calif Fish Game*, 84:88-99.
- Kobayashi S**, Taki J (1969). Calcification in sea urchins - I. A tetracycline investigation of growth of the mature test. *Calcified Tissue Intl*, 4:210-223.
- Lamare MD**, Mladenov PV (2000). Modelling somatic growth in the sea urchin *Evechinus chloroticus* (Echinoidea: Echinometridae). *J Exp Mar Biol Ecol*, 243:17-43.
- Monaghan JP** (1993). Comparison of calcein and tetracycline as chemical markers in summer flounder. *T Am Fish Soc*, 122:298-301.
- Neill JB** (1987). A novel technique for tagging sea urchins. *B Mar Sci*, 41:92-94.
- Pearse JS**, Pearse VB (1975). Growth zones in echinoid skeleton. *Am Zool*, 15:731-753.
- Purcell SW**, Blockmans BF, Nash WJ (2006). Efficacy of chemical markers and physical tags for large scale release of an exploited holothurian. *J Exp Mar Biol Ecol*, 334:283-293.
- Purcell SW**, Blockmans BF (2009). Effective fluorochrome marking of juvenile sea cucumbers for sea ranching and restocking. *Aquaculture*, 296:263-270.
- Rogers-Bennett L** (2003). Modeling red sea urchin growth using six growth functions. *Fish B-NOAA*, 101:614-626.
- Rowley RJ** (1990). Newly settled sea urchins in a kelp bed and urchin barren ground: a comparison of growth and mortality. *Mare Ecol*, 62:229-240.
- Rowley RJ**, Mackinnon DI (1995). Use of the fluorescent marker calcein in biominerilisation studies of brachiopods and other marine organisms. *Bulletin de l'Institut Oceanographique (Monaco)*, Special Issue:111-120.
- Russell MP** (1987). Life history traits and resource allocation in the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson). *J Exp Mar Biol Ecol*, 108:199-216.
- Russell MP**, Ebert TA, Petraitis PS (1998). Field estimates of growth and mortality of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Ophelia*, 48:137-153.



- Russell MP**, Urbaniak LM (2004). Does calcein affect estimates of growth rate in sea urchins? In: T.Heinzeller & J.Nebelsick. (Eds). *Echinoderms*. München, Balkema, Leiden: 53-57.
- Russell MP**, Meredith RW (2000). Natural growth lines in echidnoid ossicles are not reliable indicators of age: a test using *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Invertebr Biol*, 119:410-420.
- Sala E**, Zabala M (1996). Fish predation and structure of the sea urchin *Paracentrotus lividus* populations in the NW Mediterranean. *Mar Ecol Progr Ser*, 140:71-81.
- Schroeter SC** (1978). Experimental studies of competition as a factor affecting the distribution and abundance of purple sea urchins, *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson). PhD. thesis. University California: 555pp.
- Sonnenholzner JI**, Montano-Moctezuma G, Searcy-Bernal R (2010). Effect of three tagging methods on the growth and survival of the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Panam J Aquatc Sci*, 5:414-420.
- Tuya F**, Martín JA, Luque A (2004). Patterns of nocturnal movement of the long-spined sea urchin *Diadema antillarum* (Philippi) in Gran Canaria (Canary Islands, central east Atlantic Ocean). *Helgoland Mar Res*, 58:36-31.

Capítulo 4

“Crecimiento de dos especies de juveniles de erizos de mar en las islas Canarias”



Rodríguez A, Clemente S, Brito A & Hernández JC. Growth rates in two juvenile sea urchins species in the Canary Islands (in preparation)

ÍNDICE

1. RESUMEN	139
2. INTRODUCCIÓN	140
3. MATERIAL Y MÉTODOS	142
3.1. Crecimiento de <i>P. lividus</i> y <i>D. africanum</i> en el medio natural	142
3.2. Crecimiento de <i>P. lividus</i> y <i>D. africanum</i> en diferentes monodietas algales	144
3.3. Estimación del crecimiento de <i>P. lividus</i> y <i>D. africanum</i>	146
3.4. Análisis estadístico	147
4. RESULTADOS	148
4.1. Crecimiento de <i>P. lividus</i> y <i>D. africanum</i> en el medio natural	148
4.2. Crecimiento de <i>P. lividus</i> y <i>D. africanum</i> en diferentes monodietas algales	150
5. DISCUSIÓN	156
6. BIBLIOGRAFÍA	159



1. RESUMEN

En el presente trabajo estudiamos el crecimiento de las fases juveniles de dos erizos en los fondos sublitorales de las islas Canarias, *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum*, mediante experimentos de campo y de laboratorio. Para ello, marcamos erizos con el marcador químico calceína y evaluamos la influencia de 15 monodietas de algas frente a la alimentación en el medio natural en un periodo de 105 días. Se marcaron 304 juveniles de *P. lividus* y 302 de *D. africanum* en el medio natural, recapturándose un 5% y un 3% respectivamente de individuos marcados. En el laboratorio, los erizos marcados fueron sometidos a 15 monodietas de algas diferentes. Los índices de crecimiento, en diámetro de caparazón, fueron extrapolados del crecimiento observado en una de las demipiramides de la linterna de Aristóteles. En ambos experimentos se comparó el índice de crecimiento entre especies, además de la importancia de la dieta en la supervivencia durante los experimentos de laboratorio. Los resultados muestran diferencias significativas del crecimiento entre las dos especies de erizos y también entre dietas. En ambos experimentos *D. africanum* presentó índices de crecimiento significativamente mayores que *P. lividus*, lo que puede suponer una ventaja durante fases tempranas de vida. No se encontró ninguna clara relación entre el crecimiento de los juveniles y la concentración nutricional de las algas en ninguna de las especies estudiadas.

2. INTRODUCCIÓN

Moore (1935) fue uno de los pioneros en el estudio del crecimiento en equinoideos y estimó por primera vez el crecimiento de *Echinus esculentus* a partir de las líneas de crecimiento en las placas del caparazón. Estas líneas de crecimiento se forman en las épocas de crecimiento somático y reproductivo, llegándose a distinguir líneas de alta y baja densidad respectivamente. Sin embargo, estas líneas a veces son difíciles de visualizar cuando el crecimiento es muy lento, porque son tan finas que llegan a solaparse (Ebert 1988; Gage 1991, 1992; Russell & Meredith 2000). Además, en especies como *Strongylocentrotus purpuratus* (Ebert 1988) o *S. droebachensis* se ha visto que los individuos pueden incorporar más de una línea por año (Russell & Meredith 2000). También en estudios con *Paracentrotus lividus*, Turón et al (1995) detectaron la presencia de anillos translúcidos suplementarios por estrés, pudiendo llevar a una sobreestimación del crecimiento en los ejemplares de mayor tamaño. Por ello, se han desarrollado multitud de técnicas de marcaje que permiten una estima más precisa del crecimiento, (ver revisión de Hagen 1996 y capítulo 3 para más detalle), incluyendo desde marcadores externos anclados al caparazón por perforación del mismo (Ebert 1965; Neill 1987; Clemente et al 2007a), marcadores internos que son introducidos en la cavidad celómica (Hagen 1996; Kalvas et al 1998), hasta el uso de marcadores químicos, como la tetraciclina o la calceína, que señalan la talla de las estructuras esqueléticas en el momento del marcaje para estimar su crecimiento en un periodo de tiempo conocido (Ebert 1988; Russell & Urbaniak 2004; Ellers & Johnson 2009; Sonnernholzner et al 2010).

El crecimiento de los erizos depende de múltiples factores, como la calidad de los recursos alimenticios consumidos y/o de la disponibilidad de alimento en el medio (Ebert 1980; Black et al 1982; Fernández & Bourdesque 2000), de la estructura del sustrato (Hernández & Russell 2010), de la presencia de depredadores (Selden et al 2009), del hábitat (Ebert 1968; Agatsuma 2007; Andrew & Byrne 2007) e incluso de las densidades en las que se encuentre la población (Siikavuopio et al 2007; Richardson et al 2011; Ouréns et al 2013). También se ha constatado que un aumento de temperatura incrementa el crecimiento de los individuos (Moore et al 1963; Agatsuma 2007). Por todo ello, es difícil establecer un parámetro de crecimiento general para una especie determinada, ya que, como hemos comentado, existen variaciones



temporales, locales y ambientales. Incluso en una misma especie el parámetro de crecimiento no es el mismo para individuos juveniles que para adultos, teniendo los primeros una mayor tasa de crecimiento que los individuos adultos. Numerosos trabajos han abordado el estudio de los modelos de crecimiento de diversas especies de erizos (ver revisión de Ebert 2012), centrados la mayor parte de ellos en la población total. Sin embargo, muy pocos son los que han evaluado el crecimiento exclusivamente en las fases tempranas post-reclutamiento. Estas fases tempranas se caracterizan por un rápido crecimiento (Ebert 2012) y una alta tasa de mortalidad por depredación (Clemente et al 2007b, 2010, 2013), siendo fases críticas en la dinámica poblacional de los equinoideos (Hernández et al 2010; Bonaviri et al 2012).

En este capítulo nos hemos centrado en el estudio del crecimiento de las fases tempranas de juveniles de dos especies de erizos de mar en las islas Canarias, *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum* (Hernández et al 2013). El aporte de reclutas mantiene las altas densidades de estas especies de equinoideos (Girard et al 2008; Hernández et al 2010), a pesar del control que ejerce la depredación natural. Estas densidades pueden originar extensiones empobrecidas en macroalgas frondosas (Palacín 1998; Hernández et al 2013), blanquizales, de tal forma que la supervivencia de los reclutas y su crecimiento es fundamental para conocer la dinámica de las poblaciones.

Varios autores han estudiado el crecimiento de *P. lividus* en el medio natural (Crapp & Willis 1975; Allain 1978; Fenaux et al 1987; Cellario & Fenaux 1990; Haya de la Sierra 1990; Turón et al 1995; Tomas et al 2004; González-Irusta 2009; Tomsic' et al 2010; Oréns et al 2013). En el caso de *D. africanum*, Hernández (2006) estimó el crecimiento de juveniles de *D. africanum* en blanquizales de Canarias. Todos estos estudios citados se han realizado con métodos de mediciones de anillos en placas del caparazón o mediante el estudio de la distribución de tallas. Únicamente Toledo et al (2014) empleó recientemente un método de marcaje químico con calceína para la estimación del crecimiento de una única población de *P. lividus* en Canarias.

El objetivo de este capítulo es estimar las tasas de crecimiento de juveniles de las especies de erizos *P. lividus* y *D. africanum*. Concretamente estudiamos el crecimiento de estas dos especies en función de diferentes dietas de especies de algas características de los fondos sublitorales de

las islas Canarias, combinando experimentos de monodieta en el laboratorio con experimentos de crecimiento *in situ* en diferentes localidades de la isla de Tenerife. Como vimos en el capítulo 1, los contenidos nutricionales de las algas y las preferencias de consumo de los erizos varían en función de la especie de erizo y del alga utilizada, por ello cabe esperar que las diferentes especies de equinoideos tengan diferentes índices de crecimiento en función del alimento que consuman y los nutrientes que asimilen (Lawrence & Lane, 1982).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Crecimiento de *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum* en el medio natural

Se seleccionaron dos localidades en la isla de Tenerife para desarrollar los experimentos de crecimiento *in situ*. Estas localidades fueron Abades y Mesa del Mar, que se eligieron por la abundancia de juveniles de erizos de las especies *P. lividus* y *D. africanum* (Ver Figura 1). Los sitios seleccionados en cada una de estas localidades para llevar a cabo el experimento se caracterizaron por encontrarse bien delimitadas, con barreras naturales en los bordes que mantenían a las poblaciones “aisladas” del resto del sustrato y aseguraban su fácil localización (Ver Figura 1B y 1C). El hábitat de la localidad de Abades se caracterizó por una alta cobertura de algas costosas y una baja cobertura de macroalgas de las especies *Styropodium zonale* y *Dictyota dichotoma* en el sitio elegido para *Diadema*, y por una alta cobertura de macroalgas tipo *S. zonale*, *D. dichotoma*, *Padina pavonica*, *Lobophora variegata*, *Cladophora liebetrichii* y *Asparagopsis taxiformis* en el sitio elegido para *P. lividus*. El hábitat de la localidad de Mesa del Mar se caracterizó por la alta cobertura de algas costosas, en el caso del sitio donde se colocaron los juveniles de *Diadema*, y por la presencia de *S. zonale*, *P. pavonica*, *A. taxiformis*, *L. variegata*, *Halopteris scoparia*, *Ellisolandia elongata*, en el caso de los juveniles de *Paracentrotus*.

En diciembre del 2012, coincidiendo con uno de los meses de mayor reclutamiento de juveniles de *D. africanum* (Hernández 2006) y *P. lividus* (González et al 2007; Girard et al 2008), se



recolectaron del medio natural juveniles de *D. africanum* y *P. lividus* en Abades y La Caleta-Punta Prieta respectivamente (ver Figura 1). Ambas localidades se caracterizaron por tener altas tasas de reclutamiento de las especies de equinodermos seleccionadas. Los juveniles fueron trasladados al laboratorio en seco, donde se procedió al marcaje en baños de calceína, durante 24 horas, a una concentración de 20 mg/l. Estudios previos (Rodríguez et al 2015) demostraron que esta técnica de marcaje es una de las más eficaces en términos de supervivencia de individuos, porcentaje de marcaje e intensidad de la marca. En total, se marcaron 304 *P. lividus* con tallas que oscilaron entre los 2.0-11.5 mm de diámetro horizontal del caparazón y 302 ejemplares (2.0-12.0 mm) de *D. africanum*. Tras las 24 horas de marcaje los ejemplares fueron devueltos a las zonas elegidas, sobre el sustrato natural, de las localidades de estudio y recapturados tras 15 semanas en el medio natural. Un total de 132 juveniles de *D. africanum* y 197 juveniles de *P. lividus* marcados fueron liberados en la localidad de Abades y 170 *D. africanum* y 158 *P. lividus* en la localidad de Mesa del Mar. Tras 105 días en el medio natural todos los ejemplares observados en las zonas experimentales fueron recapturados por medio de buceo con escafandra autónoma, y transportados al laboratorio. En el laboratorio cada individuo se midió con un calibrador digital, registrándose el diámetro horizontal del caparazón de los erizos recapturados. Con la ayuda de un bisturí se extrajo la linterna de Aristóteles de cada uno de los ejemplares. Posteriormente, la linterna se limpió mediante un baño de lejía doméstica diluida al 10% en agua dulce durante 24 horas y se dejó secar al aire durante otras 24 horas para su posterior observación. Las linternas fueron observadas bajo una lupa de fluorescencia NIKON AZ100 Multizoom con un filtro de fluorescencia FITC: Ex.482/35, 506 DM, EM.536/40 (Figura 2A). Aquellos individuos que presentaron marca en la demipirámide de la linterna de Aristóteles fueron medidos a través de un ocular milimetrado, tomando las medidas de la longitud de la demipirámide y la distancia de la marca a la epífisis de la demipirámide (ver Figura 2B). En todas las medidas las linternas se dispusieron de la misma manera, para que existiera el menor error posible en las mediciones (Ebert et al 2008).

CAPÍTULO 4

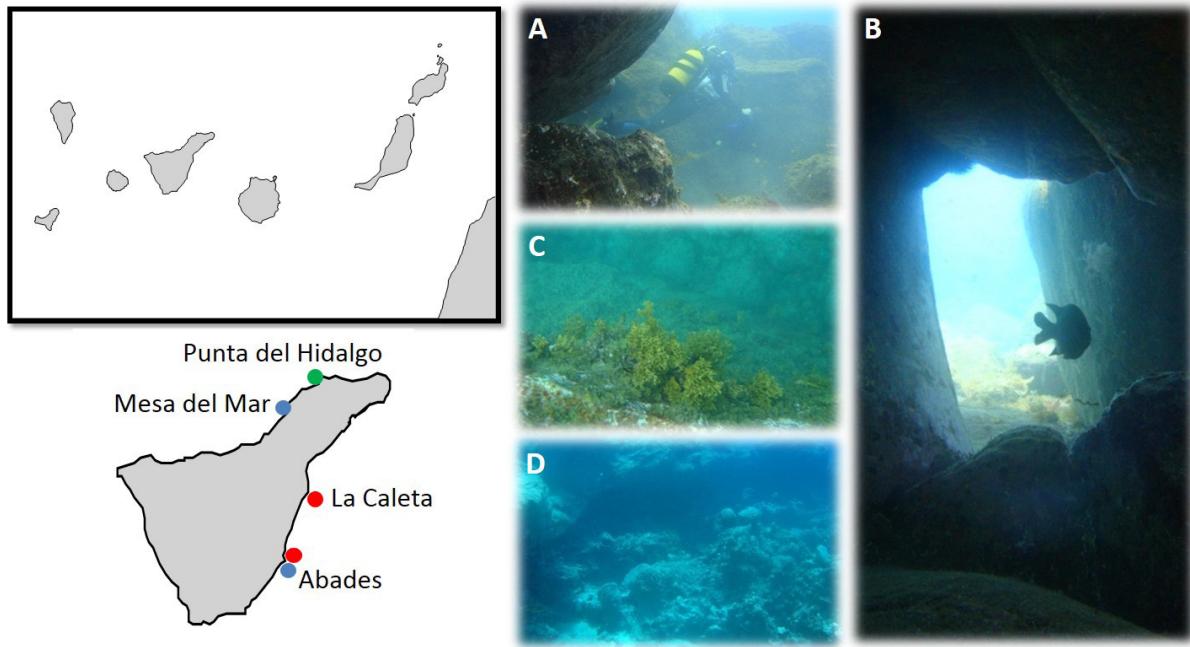


Figura 1. Localización de las localidades seleccionadas para los estudios de crecimiento in situ en el medio natural (puntos azules), para la captura de juveniles (puntos rojos) y para la recolección de algas (puntos verdes). En las localidades donde se llevaron a cabo los experimentos de crecimiento in situ se observa también el detalle de los sitios seleccionados para cada uno de las especies de juveniles de erizo: (A) Localidad de Mesa del Mar, hábitat *P. lividus* (B) Localidad Mesa del Mar, hábitat *D. africanum* (C) Localidad de Abades, hábitat *P. lividus* y (D) Localidad de Abades, hábitat *D. africanum*.

3.2. Crecimiento de *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum* en diferentes monodietas algales

Para la realización de los experimentos de crecimiento de erizos en monodietas se recolectaron un total de 15 especies de algas: 7 especies de algas pardas (*Colpomenia sinuosa*, *Cystoseira abies-marina*, *Dictyota dichotoma*, *Halopteris scoparia*, *Lobophora variegata*, *Padina pavonica* y *Styropodium zonale*), 4 algas rojas (*Asparagopsis taxiformis*, *Ellisolandia elongata*, *Gelidium canariense*, *Lophocladia trichoclados*) y 4 algas verdes (*Cladophora liebetruthii*, *Codium intertextum*, *Ulva compressa* y *Ulva rigida*). Estas algas fueron las mismas especies que se utilizaron en los experimentos del capítulo 1, por su alta abundancia y frecuencia en los ecosistemas marinos canarios (Sangil 2011), donde habitan estas dos especies de equinoideos.



Las algas fueron recolectadas en la localidad de la Punta del Hidalgo, en marzo del 2012, por medio de snorkel. Posteriormente, una vez en el laboratorio, se eliminaron los posibles epífitos de los talos y se congelaron para su posterior uso en los experimentos de alimentación con monodieta, en los que se establecieron 15 tratamientos de monodieta (15 especies de algas diferentes) para los juveniles de cada una de las dos especies de erizos. A cada recipiente se le asignó una especie de alga y se le añadieron al azar 10 juveniles de erizos, cada dieta fue duplicada para cada una de las especies de erizos. Los juveniles añadidos se encontraban previamente marcados con calceína siguiendo la metodología citada anteriormente. Cada uno de los erizos fue medido al inicio del experimento y al final, registrándose el diámetro horizontal del caparazón mediante un calibrador digital ($\pm 0,01$). Los recipientes empleados eran de 1 litro y se dispusieron en un soporte que los mantuviera sobre una mesa de agua con agua filtrada a través de filtros de 200 micras y en condiciones de iluminación que simulaban el día y la noche (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad). Estos recipientes disponían de una maya de 200 micras en el fondo para que los juveniles estuvieran en el baño de la mesa de agua. Los recipientes permanecieron cerrados para evitar el riesgo de que los juveniles se salieran (ver Figura 2C). Dos veces en semana, los recipientes fueron limpiados de los acumulos orgánicos que se pudieran ir acumulando en sus paredes. La alimentación en cada tratamiento se hacía *ad libitum* con la especie de alga correspondiente en cada tratamiento experimental. El experimento se llevó a cabo entre los meses de abril y julio del 2012, pero manteniéndose a una temperatura que simulara las temperaturas de los meses de diciembre-marzo, época de mayor reclutamiento de las especies de erizos estudiadas. La temperatura del agua y la salinidad fueron parámetros que se midieron mediante un termómetro-salinómetro todos los días del experimento. Estos parámetros se mantuvieron constantes durante toda la duración del experimento ($T= 19.5 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ y $S\% = 36.5 \pm 0.2$). El agua total de la mesa de agua era reemplazada una vez al mes. Tras las 15 semanas de alimentación en monodieta, los erizos fueron medidos con ayuda de un calibrador digital y diseccionados siguiendo la misma metodología citada en el apartado anterior.

CAPÍTULO 4

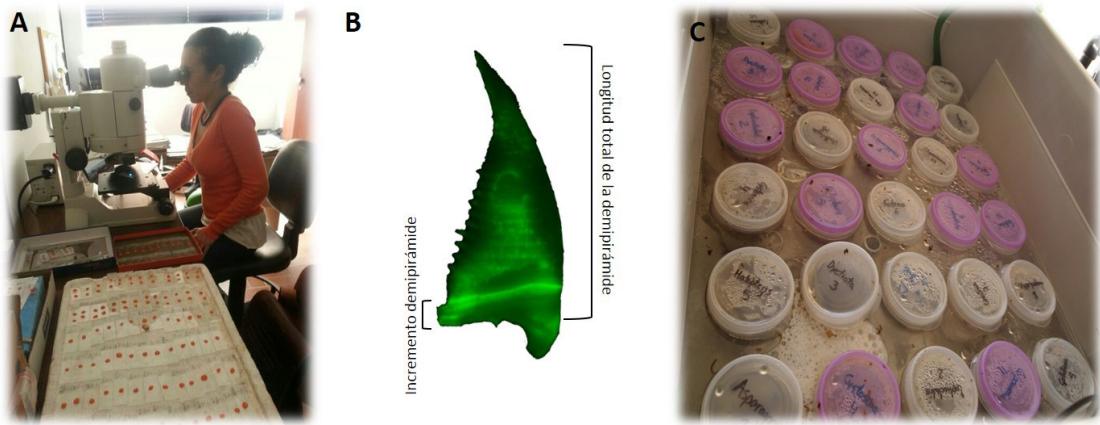


Figura 2. A. Lupa de fluorescencia utilizada para la observación de las demipiramides de las linternas de Aristóteles de los erizos marcados con calceína para la estima de su crecimiento. B. Detalle de las medidas realizadas sobre la demipirámide bajo la lupa de fluorescencia. C. Detalle del diseño experimental del experimento de crecimiento de erizos en monodietas algales en el laboratorio y de los recipientes utilizados.

3.3. Estimación del crecimiento de *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum*

Para la estimación del crecimiento, se tomó el dato del desplazamiento de la marca de calceína a lo largo de la demipirámide de la linterna, midiéndose bajo una lupa de fluorescencia con ayuda de un ocular micrométrico. Una vez obtenido el valor del incremento de la demipirámide, éste fue extrapolado a incremento de caparazón mediante modelos de regresión que calcularon la pendiente y la intercepción, parámetros que posteriormente fueron aplicados en la siguiente ecuación para conocer el incremento en mm del diámetro horizontal del caparazón (Ebert & Russell 1994):

$$AC = EXP \text{ intercepción} \times [(longitud \text{ linterna final}^{pendiente}) - (longitud \text{ linterna inicial}^{pendiente})]$$

donde AC es el crecimiento medido como incremento del diámetro horizontal, EXP intercepción y pendiente son los valores calculados a través de los modelos de regresión.



3.4. Análisis estadísticos

Una vez estimado el crecimiento del caparazón (incremento en diámetro horizontal, AC) en el medio natural, este fue comparado entre especies de erizos a través de un ANCOVA de una vía ejecutado por permutaciones, donde el factor fijo fue ‘especie’ (2 niveles: *P. lividus* vs. *D. africanum*) y el tamaño del erizo fue introducido como covariante.

En el caso del experimento de monodieta algales en el laboratorio, las diferencias en el crecimiento de los erizos se analizaron con un ANCOVA de 2 vías por permutaciones, con los factores fijos ‘especie’ (2 niveles: *P. lividus* vs. *D. africanum*) y ‘alga’ (15 niveles: *A. taxiformis*, *C. liebetrichii*, *C. sinuosa*, *C. intertextum*, *C. abies-marina*, *D. dichotoma*, *E. elongata*, *G. canariense*, *H. scoparia*, *L. variegata*, *L. trichoclados*, *P. pavonica*, *S. zonale*, *U. compressa* y *U. rigida*), y el tamaño del erizo como covariante. Para relacionar los contenidos nutricionales de cada una de las especies algales estudiadas con el crecimiento de cada juvenil de erizo se realizó un análisis de ordenación de Componentes Principales (PCA), donde todas las variables fueron transformadas (raíz cuadrada). La supervivencia de los erizos en las condiciones experimentales del laboratorio se analizó mediante un ANOVA de una vía por permutaciones con factor fijo ‘especie’ (2 niveles: *P. lividus* vs *D. africanum*).

En los análisis de la varianza, cuando el número de permutaciones no fue suficiente para obtener un análisis fiable, se recurrió a la corrección de Montecarlo, obteniéndose el nivel de significación corregido (pMC) (Anderson & Robinson 2003). Los factores que fueron significativos en los modelos se exploraron con más detalle mediante comparaciones a pares realizadas por permutaciones (Anderson 2004). Todas los análisis estadísticos se realizaron con el programa PRIMER6 & PERMANOVA+.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS

4.1. Crecimiento de *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum* en el medio natural

Tras 105 días en los que los erizos permanecieron en el medio natural se recapturaron un total de 28 ejemplares de *D. africanum* y 90 de *P. lividus* de los 197 y 132 ejemplares respectivamente marcados en la localidad de Abades. En la localidad de Mesa del Mar tan solo se recapturaron *P. lividus*, cuyo número ascendió a 14 ejemplares. Tras la limpieza de los esqueletos con lejía y la observación de las linternas bajo la lupa de fluorescencia registramos que el número de ejemplares marcados ascendía a 14 *P. lividus* (50% éxito de recaptura) y 9 *D. africanum* marcados (10% éxito de recaptura) en la localidad de Abades. En la localidad de Mesa del Mar ningún *P. lividus* presentó marca de calceína. Tras dos semanas de finalizar el experimento se volvieron a recapturar juveniles en la zona de marcaje en ambas localidades, pero ninguno presentó marca, descartando así la probabilidad de que quedaran en el medio juveniles marcados que no habían sido capturados.

En todos los individuos marcados se observó claramente la banda de calceína en la base de la demipirámide de Aristóteles. Las ecuaciones utilizadas para el crecimiento en el medio natural para *P. lividus* (A) y *D. africanum* (B) fueron las siguientes:

(A)

$$AC_{\left(\frac{P. \text{ } lividus}{\text{medio natural}}\right)} = 1,711 \times [(longitud \text{ } linterna \text{ } final^{1,500}) - (longitud \text{ } linterna \text{ } inicial^{1,500})]$$

(B)

$$AC_{\left(\frac{D. \text{ } africanum}{\text{medio natural}}\right)} = 2,127 \times [(longitud \text{ } linterna \text{ } final^{1,216}) - (longitud \text{ } linterna \text{ } inicial^{1,216})]$$



Tras la conversión realizada del incremento en linterna a incremento del caparazón, obtuvimos diferencias significativas en el crecimiento entre las especies de equinodermos estudiadas ($F=31,444$; $p<0,001$). Los juveniles de *D. africanum* presentaron un mayor crecimiento medio que los juveniles de *P. lividus* en la localidad de Abades durante el periodo de estudio (diciembre 2012-marzo 2013), registrando un incremento medio del diámetro del caparazón de 4,574 mm ($\pm 0,634$) y 0,945 mm ($\pm 0,118$) respectivamente. En ambas especies el incremento en el caparazón estuvo correlacionado con el incremento en la linterna, lo que nos indica un buen ajuste de las correlaciones obtenidas, obteniéndose valores de $R^2=0,980$ para el caso de *D. africanum*, y $R^2=0,975$ para el caso de juveniles de *P. lividus* (Figura 3).

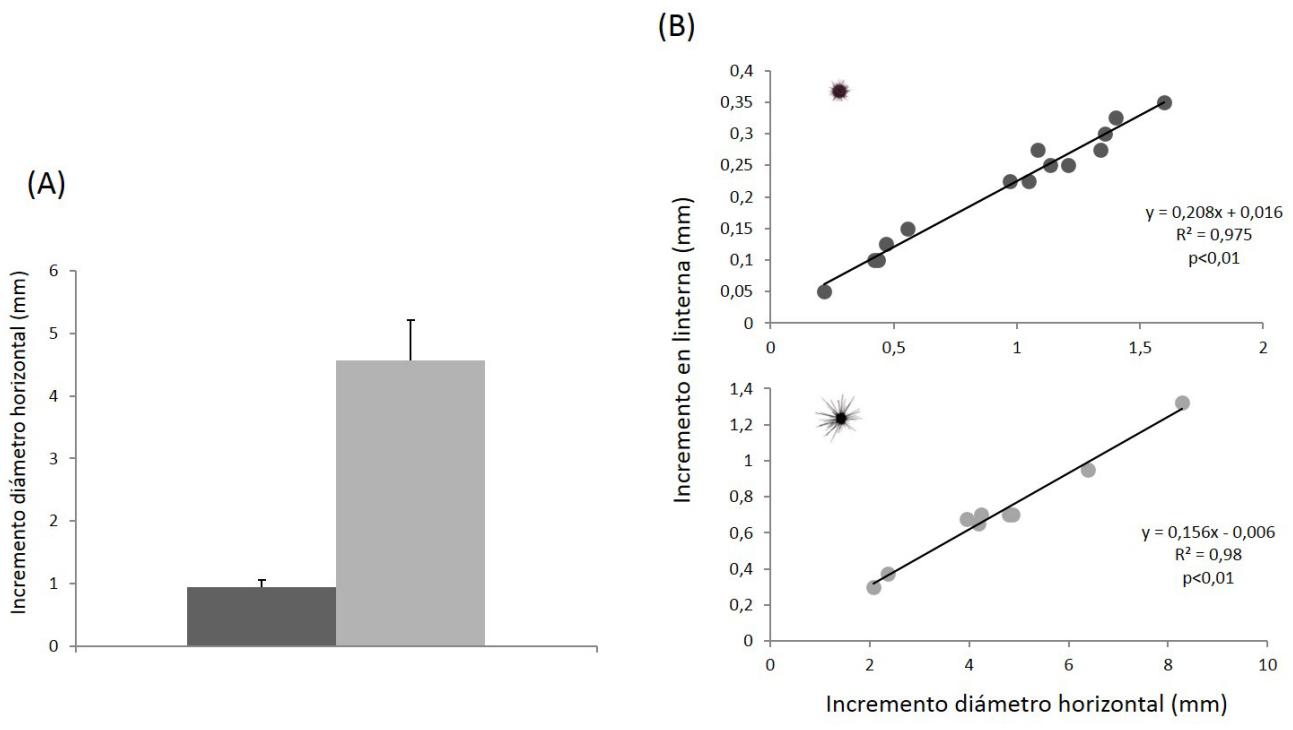


Figura 3. (A) Media ± ES del incremento en el diámetro horizontal del caparazón registrado por los juveniles de las especies de erizos *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum* en los 105 días de experimento de crecimiento en el medio natural en la localidad de Abades. La barra gris oscuro corresponde a *P. lividus* y la barra gris clara a *D. africanum*. (B). Correlaciones del incremento en diámetro horizontal del caparazón con el incremento en la demipirámide de la linterna de Aristóteles para *P. lividus* y *D. africanum* (de arriba abajo) en los experimentos de crecimiento en el medio natural. Los valores de R^2 y la ecuación que describe los respectivos modelos son mostrados.

4.2. Crecimiento de *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum* en diferentes monodietas algales

Al analizar la supervivencia de los equinoideos en las diferentes monodietas algales se obtuvo una interacción significativa entre las especies de erizos y las dietas suministradas ($F= 2,052$; $p<0,05$) (Tabla 1), de forma que el porcentaje de individuos que sobrevivieron en cada uno de los tratamientos de dietas algales varió de forma significativa según la especie de erizo considerada. Las comparaciones *a posteriori* mostraron diferencias significativas en la supervivencia de juveniles de las dos especies de equinodermos en las monodietas de 9 especies de algas: *C. abies marina*, *H. scoparia*, *P. pavonica*, *E. elongata*, *G. canariense*, *C. intertextum*, *C. sinuosa* y *C. liebetruhii*, encontrándose en todos los tratamientos de alimentación un mayor porcentaje de supervivencia de juveniles de *P. lividus* que de *D. africanum* (ver Figura 4 y Tabla 1). Sin embargo, para el resto de las 6 especies de algas, la supervivencia fue similar entre especies de erizos.

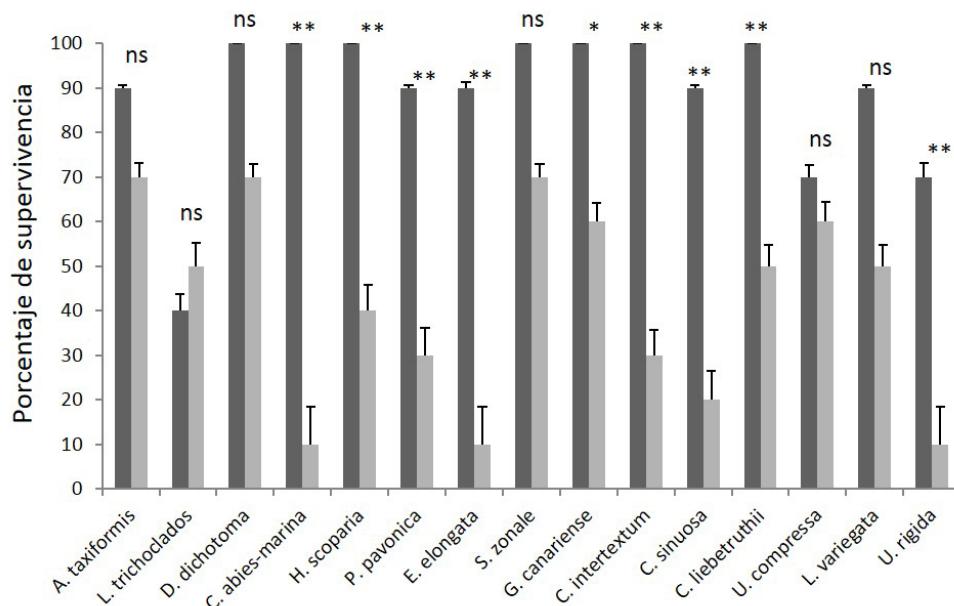


Figura 4. Porcentaje de supervivencia media ± ES de juveniles de las especies de erizos *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum* en cada una de las monodietas algales empleadas en los experimentos de crecimiento en el laboratorio. Las barras gris oscura representan a *P. lividus* y las barras gris clara a *D. africanum* (*= $p<0,05$; **= $p<0,01$; ns =no significativo).



Tabla 1. A. Resultados del ANOVA de 2 vías por permutaciones analizando la supervivencia de los juveniles de dos especies de erizos, *P. lividus* vs. *D. africanum*, alimentadas con diferentes monodiетas algales en el laboratorio. Los factores “especie” (*D. africanum* vs. *P. lividus*) y “dieta” (*Asparagopsis taxiformis*, *Cladophora liebetruthii*, *Codium intertextum*, *Colpomenia sinuosa*, *Cystoseira abies-marina*, *Dictyota dichotoma*, *Ellisolandia elongata*, *Gelidium canariense*, *Halopteris scoparia*, *Lobophora variegata*, *Lophocladia trichoclados*, *Padina pavonica*, *Stylopodium zonale*, *Ulva compressa* y *Ulva rigida*) se trataron como factores fijos en el modelo. B. Comparaciones *a posteriori* de la interacción significativa ‘especie x dieta’; se muestran las diferencias entre las dos especies de equinoideos para cada una de las algas incluidas como dietas de los erizos. Los resultados significativos ($p < 0,05$) se muestran en negrita.

A. Fuente de variación	Df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
Especie (Sp)	1	19200	19200	114,92	0,001
Dieta (D)	14	5688,9	406,35	2,4321	0,004
Sp*D	14	4800	342,86	2,0521	0,014
Residual	270	45111	167,08		
Total	299	74800			

B. Test a posteriori por dietas (Sp*D)	Alga	T	P (MC)
	<i>A. taxiformis</i>	1,0954	0,293
	<i>L. trichoclados</i>	0,4285	0,667
	<i>D. dichotoma</i>	1,964	0,063
	<i>C. abies-marina</i>	9	0,001
	<i>H. scoparia</i>	3,6742	0,002
	<i>P. pavonica</i>	3,2863	0,004
	<i>E. elongata</i>	5,6569	0,001
<i>P. lividus</i> vs. <i>D. africanum</i>	<i>S. zonale</i>	1,964	0,069
	<i>G. canariense</i>	2,4495	0,025
	<i>C. intertextum</i>	4,5826	0,001
	<i>C. sinuosa</i>	4,2	0,001
	<i>C. liebetruthii</i>	3	0,007
	<i>U. compressa</i>	0,4472	0,649
	<i>L. variegata</i>	2,058	0,054
	<i>U. rigida</i>	3,2863	0,004

CAPÍTULO 4

En la estimación del crecimiento experimentado por los erizos en las condiciones experimentales, existió una buena relación entre el incremento en el caparazón y el incremento en la linterna para ambas especies, obteniendo valores de $R^2= 0,988$ para *P. lividus* y de $R^2= 0,969$ para *D. africanum* (Figura 5). Las ecuaciones utilizadas para la estimación del crecimiento en el experimento de monodieta para *P. lividus* y *D. africanum* fueron las siguientes (**C** y **D** respectivamente):

(C)

$$AC_{\substack{(P. \text{ } \textit{lividus}) \\ \text{dietas}}} = 4,771 \times [(longitud \text{ } linterna \text{ } final^{0,587}) - (longitud \text{ } linterna \text{ } inicial^{0,587})]$$

(D)

$$AC_{\substack{(D. \text{ } \textit{africanum}) \\ \text{dietas}}} = 1,052 \times [(longitud \text{ } linterna \text{ } final^{1,762}) - (longitud \text{ } linterna \text{ } inicial^{1,762})]$$

El crecimiento varió de forma significativa en la interacción de factores “especie x dieta” ($F= 8,350$; $p<0,001$) (Tabla 2). Además, el tamaño del erizo influyó en el crecimiento en cada una de las especies alimentadas con las diferentes dietas ($F= 7,125$; $p<0,001$) (Tabla 2). Los análisis *a posteriori* dos a dos nos indican que las únicas dietas en las que no hubo diferencias en el crecimiento entre especies fueron las de *H. scoparia*, *E. elongata*, *C. liebetrauhi* y *U. rigida*. En el resto de las dietas algales se registraron diferencias en el crecimiento entre ambas especies de juveniles de erizos (Tabla 2 y Figura 5). El máximo incremento en el diámetro horizontal registrado en *P. lividus* fue de 1,73 mm en un ejemplar que se encontraba alimentándose de *H. scoparia* y de 7 mm en *D. africanum* en la dieta de *P. pavonica*. De hecho, los juveniles de *P. lividus* que mayor incremento en diámetro presentaron fueron aquellos que estuvieron en las dietas de *H. scoparia* ($1,082 \pm 0,112$ mm), *C. abies-marina* ($1,029 \pm 0,129$ mm) y *A. taxiformis* ($1,027 \pm 0,110$ mm). Sin embargo, los juveniles que presentaron un menor crecimiento fueron aquellos que se alimentaron de *U. compressa* ($0,270 \pm 0,042$ mm) y *U. rigida* ($0,194 \pm 0,052$ mm) (ver Figura 6). En el caso de *Diadema*, los juveniles que presentaron un mayor crecimiento fueron aquellos que se alimentaron de *P. pavonica* ($4,536 \pm 1,337$ mm) seguidos de *A. taxiformis* ($1,976 \pm 0,052$ mm), *C. abies marina* (1,905 mm) y *L. variegata* (1,753 $\pm 0,209$ mm). Por el



contrario, los que presentaron un menor crecimiento fueron los alimentados con *E. elongata* (0,807 mm) (Figura 6). Los resultados del PCA, en el que ambos ejes representaron un 92,2 % de la variación total de la distribución de las algas en función de sus contenidos nutricionales y el crecimiento de cada uno de los juveniles de equinodermos, no mostraron una tendencia clara en ambas especies de juveniles (Figura 7). En juveniles de *P. lividus*, los mayores crecimientos registrados fueron en algas con una alta concentración lipídica y con alta concentración de cenizas (Figura 7A), pero no se observó ningún patrón bien diferenciado, pues el mismo crecimiento también fue observado en algas con un alto contenido en carbohidratos, como es el caso del alga *G. canariense*. Juveniles de *D. africanum* tampoco presentaron un patrón definido en relación al crecimiento y contenidos nutricionales de las algas (Figura 7B), observándose los mayores crecimientos en algunas algas con una alta concentración de cenizas (*P. pavonica*, *C. liebetruhii*, *A. taxiformis*, *C. intertextum*) y en algunas algas con un alto contenido lipídico, como *C. abies-marina* o *L. variegata*.

Sólo se detectó un ejemplar de *D. africanum* y un ejemplar de *P. lividus* con crecimiento nulo. En estos casos la marca de calceína en la demipirámide fue observada justo en el borde de la misma.

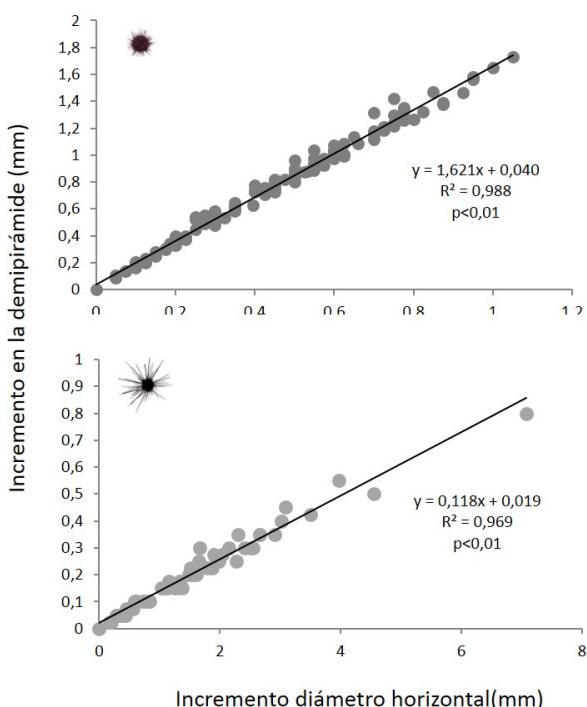


Figura 5. Correlaciones del incremento en diámetro horizontal del caparazón con el incremento en la demipirámide de la linterna de Aristóteles para los juveniles de las especies de erizos de mar *P. lividus* y *D. africanum* en las monodiетas suministradas en los experimentos de crecimiento en el laboratorio. El valor de R^2 y la ecuación que la describe es mostrada.

CAPÍTULO 4

Tabla 2. A. Resultados del ANCOVA de 2 vías por permutaciones del incremento del diámetro horizontal del caparazón de juveniles de erizos de mar en experimentos en el laboratorio, analizando el efecto de la ‘especie’ de equinoideo (*D. africanum* vs. *P. lividus*) y las diferentes ‘dietas’ algales a las que fueron sometidos (*Asparagopsis taxiformis*, *Cladophora liebetrichii*, *Codium intertextum*, *Colpomenia sinuosa*, *Cystoseira abies-marina*, *Dictyota dichotoma*, *Ellisolandia elongata*, *Gelidium canariense*, *Halopteris scoparia*, *Lobophora variegata*, *Lophocladia trichoclados*, *Padina pavonica*, *Styropodium zonale*, *Ulva compressa* y *Ulva rigida*). El tamaño del erizo (diámetro horizontal del caparazón) se ha introducido como covariable, B. Comparaciones *a posteriori* de la interacción significativa ‘especie x dieta’; se muestran las diferencias entre las dos especies de equinoideos para cada una de las algas incluidas como dietas de los erizos. Los resultados significativos ($p < 0,05$) se muestran en negrita.

A. Fuente de variación	Df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
<i>Tamaño(T)</i>	1	10,443	10,443	57,875	0,001
<i>Especie (Sp)</i>	1	43,588	43,588	241,57	0,001
<i>Dieta (D)</i>	14	13,684	0,97741	5,417	0,001
<i>T * Sp</i>	1	7,0286	7,0286	38,954	0,001
<i>T * D</i>	14	5,593	0,3995	2,214	0,022
<i>Sp*D</i>	14	21,093	1,5066	8,350	0,001
<i>T* Sp*D</i>	11	14,141	1,2855	7,125	0,001
<i>Residual</i>	139	25,08	0,18043		
<i>Total</i>	195	140,65			

B. Test a posteriori por dietas (Sp*D)	Alga	T	P (perm)
	<i>A. taxiformis</i>	2,556	0,024
	<i>L. trichoclados</i>	3,056	0,024
	<i>D. dichotoma</i>	6,881	0,001
	<i>C. abies-marina</i>	3,662	0,039
	<i>H. scoparia</i>	1,478	0,165
	<i>P. pavonica</i>	6,850	0,001
	<i>E. elongata</i>	2,341	0,061
<i>P. lividus vs D. africanum</i>	<i>S. zonale</i>	2,986	0,011
	<i>G. canariense</i>	3,406	0,001
	<i>C. intertextum</i>	5,1868	0,001
	<i>C. sinuosa</i>	14,828	0,001
	<i>C. liebetrichii</i>	0,8368	0,425
	<i>U. compressa</i>	7,5736	0,001
	<i>L. variegata</i>	4,9734	0,001
	<i>U. rigida</i>	7,3155	0,072

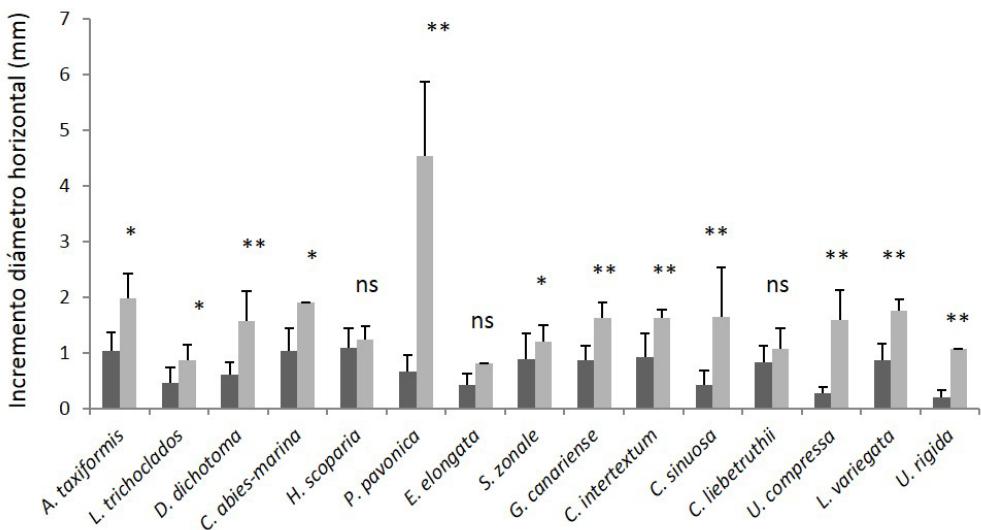


Figura 6. Media \pm ES del incremento en el diámetro horizontal del caparazón registrado por los juveniles de las especies de erizos *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum* en cada una de las monodiетas asignadas en los experimentos de crecimiento en el laboratorio. La barra gris oscura representa a *P. lividus* y la gris clara a *D. africanum* ($*=p<0,05$; $**=p<0,01$; ns=no significativo).

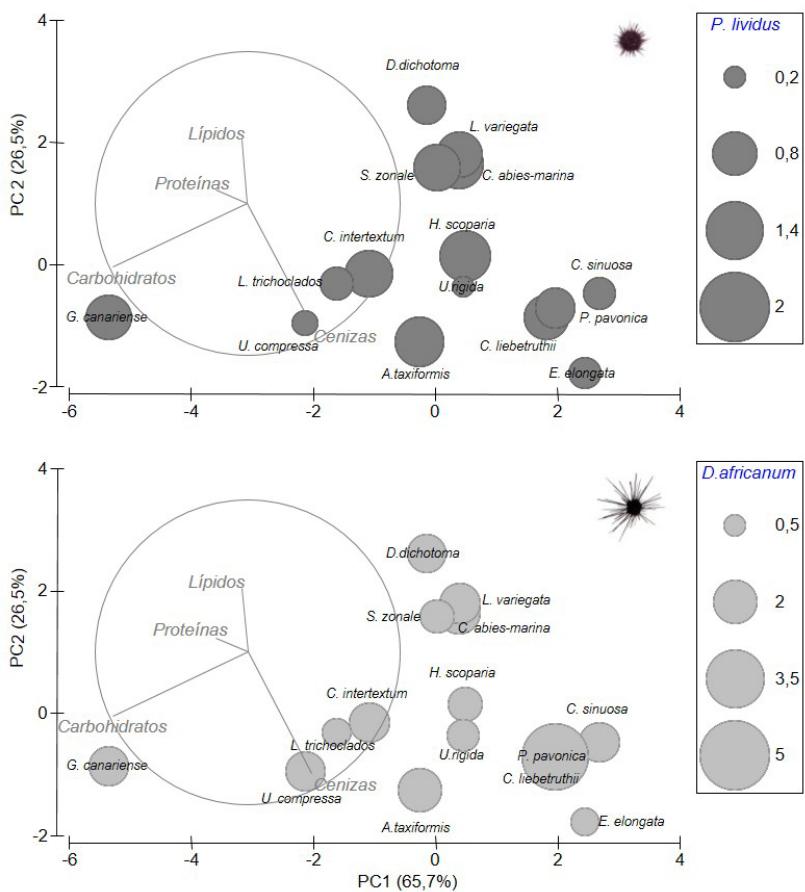


Figura 7. Análisis de componentes principales (PCA) mostrando los 2 ejes que explican el 92,2% de la variabilidad de los datos (65,7 eje 1 y 26,5 eje 2) de contenidos de carbohidratos, lípidos, proteínas y cenizas de cada una de las especies de algas utilizadas como dietas en los experimentos de crecimiento de juveniles de erizos en el laboratorio, junto al crecimiento mm/105días de (A) *P. lividus* y (B) *D. africanum* en cada una de esas especies de algas, representado como tamaño de bubble .

5. DISCUSIÓN

Las diferentes tasas de crecimiento registradas en los erizos de mar *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum* corroboran las diferentes estrategias de vida encontradas para distintas especies de equinoideos (Ebert 1975, Lawrence & Bazhin 1998). Mientras en *D. africanum* nos encontramos con mayores tasas de crecimiento en las fases juveniles, del orden de 0,043 mm/día, *P. lividus* responde como una especie tipo K, con incrementos del diámetro del caparazón más reducidos 0,009 mm/día, tanto en los experimentos realizados en el mar como en el laboratorio. Las especies K se caracterizan por tener un crecimiento lento y pueden ser más tolerantes a condiciones de estrés (Ebert 1975, Lawrence & Bazhin 1998), invirtiendo más energía en mantenerse y con una madurez sexual tardía. En cambio, las especies estrategas de la R se caracterizan por invertir mucha energía en el crecimiento somático y presentan una madurez sexual temprana (Lawrence & Bazhin 1998). Esto sugiere que el rápido crecimiento de *Diadema* en el medio natural frente al lento crecimiento de *Paracentrotus*, pueden ser estrategias relacionadas a especies tipo R y especies tipo K, respectivamente. Hernández (2006) y Girard et al (2008) dan tallas de primera madurez de 25 mm y 35 mm para *D. africanum* (en hábitats de blanquinal y borde o frontera entre blanquinal y zonas algales) y de 45 mm para *P. lividus*.

Estudios previos muestran que el máximo crecimiento de *P. lividus* ocurre en los meses de primavera y verano, coincidiendo con un aumento de la temperatura del agua (Idrisi et al 2003, González-Irusta 2009, Ouréns et al 2013.). Nuestro experimento se llevó a cabo entre los meses de invierno y principios de primavera, por lo que es de esperar que en meses de verano, debido a una aceleración del metabolismo el crecimiento de las estructuras calcáreas se pueda ver favorecido.

Los bajos índices de crecimiento presentados por *P. lividus* en el experimento de monodieta pueden deberse a procesos de competición intraespecífica, tal y como propone Grosjean et al (1996) en su estudio con juveniles de *P. lividus*, pero, en nuestro caso, el valor obtenido en el campo fue similar al encontrado en la mayoría de las dietas. Sin embargo, en *D. africanum* el valor medio de crecimiento en el medio natural fue de $4,57 \pm 0,36$ mm en un periodo de 105



días, tasas que no se corresponden con las registradas en la mayoría de las dietas utilizadas como alimento en el laboratorio. Aunque en el experimento de monodietas algales utilizamos una estrategia de alimentación *ad libitum* de los erizos, los juveniles de *D. africanum* nunca alcanzaron los rangos de tasa de crecimiento que se registró en el medio natural, excepto en la dieta de *P. pavonica*. Probablemente el menor crecimiento de los juveniles de esta especie registrado en el laboratorio, así como la baja supervivencia de individuos, pueden haber estado influenciados por una mayor competencia intraespecífica en condiciones de laboratorio, como sugieren Grosjean et al (1996) en experimentos con *P. lividus*, donde juveniles de menor tamaño inhiben su crecimiento por competencia con juveniles de mayor talla.

Un estudio previo realizado por Fernández & Bourdesque (2000) en el que utilizaron diferentes dietas con *P. lividus*, observaron que los erizos crecían más en las dietas de origen animal y en las mixtas que en las vegetales exclusivamente, por lo que es posible también que los parámetros de crecimiento mayores en el campo puedan estar influenciados por consumos no sólo de vegetales sino también material de origen animal en ambas especies, ya que aunque predominantemente se consideran herbívoros también podrían estar actuando como omnívoros como ocurre en otras especies de equinoideos (Wangesteen et al 2011).

Estudios previos sobre el crecimiento *D. africanum* realizados con juveniles muestran una fase exponencial de crecimiento en los primeros meses de vida, de forma que los juveniles recién asentados podrían aumentar hasta 20 mm de diámetro de caparazón en el primer año de vida, teniendo su fase más acusada de crecimiento en los primeros 10 mm de diámetro del caparazón (Hernández 2006). Este trabajo propone incrementos de caparazón de ~6 mm cada 3 meses para individuos de talla inicial de 5 mm de diámetro, basándose en las mediciones de los diámetros de los reclutas durante un periodo de 3 años en el medio natural. Nuestros datos de crecimiento en el medio natural de *D. africanum* no se alejan de los propuestos por Hernández (2006), aunque son ligeramente inferiores. Estos valores inferiores pueden deberse a la mayor precisión de la técnica de marcaje con fluorocromos (Ebert 2012) para la medición del crecimiento, ya que la medida del diámetro horizontal puede conllevar errores por la presencia de púas que dificultan la toma de medidas exactas. Estudios de crecimiento de su congénere en el Caribe, *D. antillarum*, han propuesto diversos índices de crecimientos estudiados en el medio natural y

laboratorio, para diferentes clases de tallas de juveniles y regímenes alimenticios, desde valores de 0,045 mm/día hasta 0,22 mm/día (Randall 1961, Randall et al 1964, Bauer 1976 a y b, Hawkins & Lewis, 1982, Bak 1985, Idrisi et al 2003). Los resultados de nuestro estudio sugieren índices similares al inferior propuesto por estos autores, de 0,043 mm/día, posiblemente por la metodología elegida de marcadores químicos frente a la utilizada por estos autores; líneas de crecimiento y distribución de tallas.

Algunos autores sugieren que el crecimiento está altamente relacionado con la cantidad de proteínas ingeridas, más que con otras variables (Lilly 1975, Lowe & Lawrence 1976). Sin embargo, Frantzis (1992) encontró que la cantidad de materia orgánica absorbida era más determinante en el crecimiento de *P. lividus*. Los resultados de este estudio no parecen acompañar la primera hipótesis ya que al comparar los valores de las algas que poseen una alta concentración de proteínas (Capítulo 1) (*G. canariensis*, *L. trichoclados*, *C. intertextum*, *D. dichotoma*, *L. variegatta*) no coinciden con las algas que aportaron un crecimiento significativamente mayor en *P. lividus* o en *D. africanum*. No se observó ninguna tendencia clara entre los contenidos nutricionales y el crecimiento de ambas especies de juveniles.

Algunas dificultades inherentes a nuestro trabajo es que los estudios de marcaje de erizos para estimar el crecimiento a largo plazo, en el submareal, son difíciles de llevar a cabo por la alta movilidad de los individuos, lo que dificulta su recaptura. Por otro lado, nuestros resultados recogen el crecimiento en una determinada época del año y no podemos descartar que las tasas de crecimiento varíen de forma estacional. Además, se sabe que el crecimiento de los equinoideos se ve influenciado por variables externas como la temperatura (Ebert 2012) o el tipo del hábitat en el que se encuentran los individuos (Ebert 1968; Agatsuma 2007; Andrew & Byrne 2007), e incluso en función de los depredadores que se encuentren en el hábitat determinado (Selden et al 2009). Por todo ello, es indispensable realizar más estudios a largo plazo, para tener datos de crecimiento relacionados con las variables ambientales de las diferentes estaciones del año. De esta forma, sería más fácil interpretar las relaciones entre el crecimiento de los erizos y las algas que consumen.



6. BIBLIOGRAFÍA

- Agatsuma Y** (2007). Ecology of *Strongylocentrotus nudus*. In J.M. Lawrence. (ed.) *Edible sea urchins: biology and ecology*. 2nd edition. Amsterdam: Elsevier Science, pp. 443-457.
- Allain JY** (1978). Âge et croissance de *Paracentrotus lividus* et de *Psammechinus miliaris* des côtes nord de Bretagne. *Cah Biol Mar*, 19:11-21.
- Anderson MJ** (2004). PERMANOVA 2factor: a FORTRAN computer program for permutational multivariate analysis of variance using permutation tests. University of Auckland, Auckland:35 pp.
- Anderson MJ**, Robinson J (2003). Generalized discriminant analysis based on distances. *Aust NZ J Statist*, 45:301-318.
- Andrew N L**, Byrne M (2007). Ecology of *Centrostephanus*. In J.M. Lawrence. (ed.) *Edible sea urchins: biology and ecology*. 2nd Edition. Amsterdam: Elsevier Science, pp. 191–204.
- Bak RPM** (1985). Recruitment patterns and mass mortalities in the sea urchin *Diadema antillarum*. *Proc. 5th Int. Coral Reef Congr*, 5:267-272.
- Bauer JC** (1976a). Growth, aggregation, and maturation in the echinoid *Diadema antillarum*. *Bull Mar Sci*, 26(2):273-277.
- Bauer JC** (1976b). On the growth of a laboratory-reared sea urchin, *Diadema antillarum* (Echinodermata: Echinoidea). *Bull Mar Sci*, 32(2): 643-645.
- Black R**, Johnson MS, Trendall JT (1982). Relative size of Aristotle's lantern in *Echinometra mathaei* occurring at different densities. *Mar Biol*, 71:101-106.
- Bonaviri C**, Gianguzza P, Pipitone C, Hereu B (2012). Micropredation on sea urchins as a potential stabilizing process for rocky reefs. *J Sea Res*, 73:18-23.
- Cellerio C**, Fenaux L (1990). *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in culture (larval and benthic phases): parameters of growth observed during two years following metamorphosis. *Aquaculture*, 84:173-188.
- Clemente S**, Hernández JC, Brito A (2007a). An external tagging technique for the long-spined sea urchin *Diadema aff. antillarum*. *J Mar Biol Assoc UK*, 87:777-779.
- Clemente S**, Hernández JC, Toledo K, Brito A (2007b). Predation upon *Diadema aff. antillarum* in barren grounds in the Canary Islands. *Sci Mar*, 71(4):745-754.
- Clemente S**, Hernández JC, Rodríguez A, Brito A (2010). Identifying keystone predators and the importance of preserving functional diversity in sublittoral rocky-bottom areas. *Mar Ecol Prog Ser*, 413:55-67.

CAPÍTULO 4

Clemente S, Hernández JC, Montaño-Moctezuma G, Russell MP, Ebert TA (2013). Predator of juveniles sea urchins and the effect of habitat refuges. *Mar Biol*, 160:579-590.

Crapp GB, Willis ME (1975). Age determination in the sea urchin *Paracentrotus lividus* with notes on the reproductive cycle. *J Exp Mar Biol Ecol*, 20:157-178.

Ebert TA (1965). A technique for the individual marking of sea urchins. *Ecology*, 46:193-194.

Ebert TA (1968). Growth rates of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* related to food availability and spine abrasion. *Ecology*, 49:1075-1091.

Ebert TA (1975).Growth and mortality in postlarval echinoids. *Am Zool*,15:755-775.

Ebert TA (1980). Relative growth of sea urchin jaws: an example of plastic resource allocation. *Bull Mar Sci*, 30:467-474.

Ebert TA (1988). Allometry, design and constraint of body components and of shape in sea urchins. *J Nat Hist*, 22: 1407-1425.

Ebert TA (2012). Growth and Survival of Postsettlement Sea Urchins. En: Edible Sea Urchins: Biology and Ecology. Lawrence J.M. 95-134. Corvallis, OR, USA.

Ebert TA, Russell MP, Gamba G, Bodnar A (2008). Growth, Survival and Longevity estimates for the rock-boring sea urchin *Echinometra lucunter lucunter* (Echinodermata, Echinoidea) in Bermuda. *B Mar Sci*, 82:381-403.

Ebert TA, Russell MP (1994). Allometry and model II nonlinear regresion. *J Theor Biol*, 168:367-372.

Ellers O, Johnson AS (2009). Polyfluorochrome marking slows growth only during the marking month in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Invertebr Biol*, 128:126-144.

Fenauix, L, Etienne M, Quelart G (1987). Suivi ecologique d'un peuplement de *Paracentrotus lividus* (Lamark) dans la baie de Villerfranche sur Mer. En: Boudouresque, C.F. (Ed.), Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles. GIS Posidonie publ, Marseille, France, pp. 187–197.

Fernández C, Bourdesque C (2000).Nutrition of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fed different artificial food. *Mar Ecol Prog Ser*, 204:131-142.

Frantzis A (1992). Etude expérimentales des niveaux de consommation et d'utilisation des macrophytes et des détritus dérivés par deux invertébrés benthiques: *Paracentrotus lividus* (Echinoideo, herbivore) et *Abra ovata* (Bivalve, dépositivore). PhD thesis, Univ Aix-Marseille II.

Gage JD (1991) Skeletal growth zones as age-markers in the sea urchin *Psammechinus miliaris*. *Mar Biol*, 110:217-228.

Gage JD (1992). Growth bands in the sea urchin *Echinus esculentus*: results from tetracycline-mark/recapture. *J Mar Biol Ass UK*, 72:257-260.



- Girard D**, Herrero A, Mora J, Hernández JC, Brito A, González N, Catoire JL (2008). Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) in its southern population limit (Canary Islands eastern Atlantic). *Gulf Mex Sci*, 26(2): 149.
- González JM**, Canteras JC, Ansorena FJ (2007). El erizo de mar común (*Paracentrotus lividus*) en Cantabria: Estudio para una explotación sostenible. *Locustella*, 5:58-67.
- González-Irusta J** (2009). Contribución al conocimiento del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) en el Mar Cantábrico: ciclo gonadal y dinámica de poblaciones, PhD Thesis, Universidad de Cantabria, Spain.
- Grosjean P**, Spirlet Ch, Jangoux M (1996). Experimental study of growth in the echinoid *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata). *J Exp Mar Biol Ecol*, 201:173-184.
- Hagen NT** (1996). Tagging sea urchins: a new technique for individual identification. *Aquaculture*, 139:271-284.
- Hawkins CM**, Lewis JB (1982). Ecological energetics of the tropical sea urchin *Diadema antillarum* Philippi in Barbados, West Indies. *Estuarine Coast Shelf Sci*, 15: 645-669.
- Haya de la Sierra D** (1990). Biología y ecología de *Paracentrotus lividus* en la zona intermareal, PhD Thesis, Universidad de Oviedo, Spain.
- Hernández JC**, 2006. Estrategia reproductiva de la población canaria del erizo *Diadema aff. antillarum* Philippi,1845: maduración gonadal, asentamiento larvario y reclutamiento. Universidad de la Laguna, PhD. Thesis,261pp.
- Hernández JC**, Russell MP (2010). Substratum cavities affect growth-plasticity, allometry, movement and feeding rates in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Jour Exp Biol*, 213:520-525.
- Hernández JC**, Clemente S, Girard D, Pérez-Ruzafa A, Brito A (2010). Effect of temperature on settlement and postsettlement survival in a barrens-forming sea urchin. *Mar Ecol Prog Ser*, 413:69-80.
- Hernández JC**, Clemente S, Tuya F, Pérez-Ruzafa A, Sangil C, Moro-Abad L and Bacallado-Aránega JJ (2013). Echinoderms of the Canary Islands, Spain IN: "Echinoderm Research and Diversity in Latin America"Eds:Alvarado J.A, Solís-Marín F.Springer Heidelberg New York Dordrecht London. ISBN 978-3-642-20020-2.
- Idrisi N**, Capo TR, Serafy JE (2003). Postmetamorphic growth and metabolism of the long-spined black sea urchin (*Diadema antillarum*) reared in the laboratory. *Mar Fresh Behav Physiol*, 36:87-95.
- Kalvass PE**, Hendrix JM, Law PM (1998). Experimental analysis of 3 internal marking methods for red sea urchins. *Calif Fish Game*, 84:88-99.
- Lawrence JM**, Lane JM (1982). The utilization of nutrients by postmetamorphic echinoderms. In Jangoux M,Lawrence JM (eds) ,*Echinoderm nutrition*. Rotterdam, The Netherlands: A.A. Balkema,pp. 331-371.

CAPÍTULO 4

- Lawrence JM**, Bazhin A (1998). Life history strategies and the potential of sea urchins for aquaculture. *J Shellfish Res*, 17:1515-1522.
- Lilly GR** (1975). The influence of diet on the growth and bioenergetics of the tropical sea urchin, *Tripneustes ventricosus* (Lamarck). PhD Thesis, Univ of British Columbia, Vancouver.
- Lowe EF**, Lawrence JM (1976). Absorption efficiencies of *Lytechinus variegatus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea) for selected marine plants. *J Exp Mar Biol Ecol*, 21:223-234.
- Moore HB** (1935). A comparison of the biology of *Echinus esculentus* in different habitats. *J Mar Biol Assoc UK*, 20:52-54.
- Moore H**, Jutare T, Bauer JC, Jones JA (1963). The biology of *Lytechinus variegatus*. *Bull Mar Sci*, 13:23-53.
- Neill JB** (1987). A novel technique for tagging sea urchins. *Bull Mar Sci*, 41, 92-94.
- Ouréns R**, Flore L, Fernández L, Freire J (2013). Habitat and density-dependent growth of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in Galicia (NW Spain). *J Sea Res*, 76:50-60.
- Palacín C**, Turon X, Ballesteros M, Giribet G, López S (1998). Stock evaluation of three littoral 538 echinoid species on the Catalan coast (North-Western Mediterranean). *Mar Ecol*, 19:163-177.
- Randall JE** (1961). Overgrazing of algae by herbivorous marine fishes. *Ecology*, 42:812.
- Randal JE**, Schroeder RE, Starck WA (1964). Notes on the biology of the echinoid *Diadema antillarum*. *Carib J Sci*, 4:421-433.
- Richardson CM**, Lawrence JM, Watts SA (2011). Factors leading to cannibalism in *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea) held in intensive culture. *J Exp Mar Biol Ecol*, 399: 68-75.
- Rodríguez A**, Hernández JC, Clemente S (2015). Efficiency of calcein tagging on two juveniles of sea urchins, *Diadema africanum* and *P. lividus*. *Mar Ecol* (en prensa).
- Russell MP**, Meredith RW (2000). Natural growth lines in echinoid ossicles are not reliable indicators of age: a test using *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Invertebr Biol*, 119:410-420.
- Russell MP**, Urbaniak LM (2004). Does calcein affect estimates of growth rate in sea urchins? In: Heinzeller T, Nebelsick J (eds) *Echinoderms*: München. Balkema, London, pp 53–57.
- Sangil C** (2011). La vegetación sublitoral de sustratos rocosos en las Islas Canarias: estructura, composición y dinámica de las comunidades de macroalgas. PhD Thesis, Universidad de La Laguna.321pp.
- Selden R**, Johnson AS, Ellers O (2009). Waterborne cues from crabs induce thicker skeletons, smaller gonads and size-specific changes in growth rate in sea urchins. *Mar Biol*, 156:1057-1071.
- Siikavuopio SI**, Dale T, Mortensen A (2007). The effects of stocking density on gonad growth, survival and feed intake of adult green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquaculture*, 262:78-85.



Sonnenholzner JI, Montano-Moctezuma G, Searcy-Bernal R (2010). Effects of three tagging methods on the growth and survival of the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Panam J Aquat Sci*, 5:414-420.

Toledo H, Clemente S, Hernández JC (2014). Estimación del crecimiento del erizo de mar *Paracentrotus lividus*. *Revi Acad Canar Cienc*, (XXVI):263-279.

Tomas F, Romero J, Turon X (2004). Settlement and recruitment of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in two contrasting habitats in the Mediterranean. *Mar Ecol Progr Ser*, 282:173-184.

Tomšić S, Conides A, Dupčić Radić I, Glamuzina B (2010). Growth, size class frequency and reproduction of purple sea urchin, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) in Bistrina Bay (Adriatic Sea, Croatia). *Acta Adriat*, 51(1):65-74.

Turón X, Giribet G, López S, Palacín C (1995). Growth and population structure of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Mar Ecol Prog Ser*, 122:193-204.

Wangensteen OS, Turon X, García-Cisneros A, Recasens M, Romero J, Palacín C (2011). A wolf in sheep's clothing: Carnivory in dominant sea urchins in the Mediterranean. *Mar Ecol Prog Ser*, 441:117-128.

Capítulo 5

“Efecto de la acidificación del océano sobre el crecimiento de los juveniles de erizos *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum*”



Rodríguez A, Clemente S, Brito A & Hernández JC. Effects of Ocean Acidification on growth of juvenile sea urchins *Paracentrotus lividus* and *Diadema africanum* (in preparation)

ÍNDICE

1. RESUMEN	167
2. INTRODUCCIÓN	168
3. MATERIAL Y MÉTODOS	169
3.1. Experimento de crecimiento	169
3.2. Estimación del crecimiento	172
3.3. Análisis estadístico	172
4. RESULTADOS	173
4.1. Química del agua	173
4.2. Supervivencia	174
4.3. Crecimiento	175
5. DISCUSIÓN	178
6. BIBLIOGRAFÍA	182



1. RESUMEN

El incremento de emisiones de CO₂ a la atmósfera ha provocado un descenso del pH del agua de mar. Las predicciones para el 2100 sugieren que el agua de mar puede llegar a alcanzar un pH de 7,6 unidades. Como consecuencia de este descenso del pH, el número de estudios científicos acerca de los efectos de la acidificación sobre los organismos calcificantes ha aumentado exponencialmente en los últimos años. Sin embargo, la mayor parte de estos estudios se han centrado en las fases larvarias y muy pocos en las fases postlarvarias; tan solo 8 estudios han evaluado los efectos de la acidificación sobre juveniles de equinoideos y 4 han estudiado el crecimiento en las condiciones previstas para el 2100. Por ello, en este capítulo nos centramos en evaluar el efecto de la acidificación del océano sobre el crecimiento de dos especies de equinoideos en los fondos sublitorales rocosos de las islas Canarias, *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum*. Mediante marcaje químico con el fluorocromo calceína se procedió a evaluar el crecimiento y la supervivencia en dos tratamientos de pH, un tratamiento control (pH= 8,1) y otro ácido (pH= 7,6), durante 100 días. Los resultados obtenidos muestran una clara relación negativa entre el crecimiento y la disminución del pH para ambas especies, obteniéndose crecimientos significativamente menores en el tratamiento ácido que en el control.

2. INTRODUCCIÓN

El aumento del CO₂ en la atmósfera en la última década ha desencadenado en un aumento de la presión del CO₂ ($p\text{CO}_2$) en el océano. Desde la revolución industrial el océano ha absorbido aproximadamente entre un 28-34% de las emisiones CO₂ (Sabine et al 2004; Sabine & Feely 2007). Este CO₂ atmosférico, al entrar en contacto con el agua de mar, se descompone en ácido carbónico, el cual se disocia en iones hidrógeno, bicarbonato y carbonato. Por lo tanto, el continuo aporte de CO₂ al océano hace que el número de iones hidrógeno se incremente, disminuyendo el pH del agua de mar y acidificándose el océano (Caldeira & Wickett 2003). Las predicciones futuras del IPCC (2013) y los estudios de Caldeira & Wickett (2003, 2005) sugieren un incremento de hasta 200 ppm de $p\text{CO}_2$ para el año 2100. Esto se traduce en un descenso del pH de hasta 0,4-0,5 unidades, pudiendo alcanzar el agua de mar un pH de 7,6 unidades. Como consecuencia de este descenso del pH, en los últimos años el número de estudios sobre el efecto de la acidificación en la química y la biota marina se ha incrementado notablemente (ver revisiones de Hendricks et al 2010; Dupont & Thornyde 2013; Dupont & Pörtner 2013). Estos estudios se han centrado principalmente en las fases larvarias de invertebrados calcáreos (Dupont et al 2008, 2010a, 2010b; Byrne et al 2013; Cohen et al 2013; García et al 2014) y muy pocos han explorado el efecto sobre las fases juveniles, caracterizadas por una alta vulnerabilidad a estresores ambientales (Gosseling & Quian 1997) y que constituyen verdaderos cuellos de botella para la perdurabilidad de las poblaciones. Diversos trabajos, como los de Shirayama & Thornton (2005), Byrne et al (2011), Albright et al (2012), Dupont et al (2012), Wolfe et al (2013), Asnaghi et al (2013a, b), Byrne et al 2014 y Rodríguez et al (enviado), han evaluado los efectos de la acidificación sobre estas fases tempranas de diferentes especies de erizos o en otros invertebrados (Gooding et al 2009; Duarte et al 2013; Basso et al 2015). Estos estudios se han centrado en los efectos de la acidificación sobre la supervivencia, modificación de estructuras externas, metabolismo, alimentación, etc., y 5 de los 8 estudios realizados con juveniles de erizos se han centrado en el crecimiento, estimado mediante ganancia de peso (Shirayama & Thornton 2005) o incremento en diámetro horizontal (Albright et al 2012; Wolfe et al 2013; Asnaghi et al 2013b).



Sin embargo, ninguno de los estudios sobre el efecto de la acidificación en el crecimiento de invertebrados calcáreos ha utilizado marcadores químicos como metodología de estimación de tasas o índices de crecimiento, por lo que la precisión no ha sido la adecuada. En este sentido, estudios recientes además ponen de manifiesto la importancia del uso de marcadores químicos, como la calceína, para el desarrollo de estudios de crecimiento en juveniles de equinodermos (Haag et al 2013; Rodríguez et al 2015). De igual forma, en los estudios previos el tiempo de exposición en los diferentes tratamientos de pH es muy variable, encontrándose con estudios de muy poca duración (5 días-2 semanas; Byrne et al 2011, Wolfe et al 2013) hasta de 6 meses de duración (Shirayama & Thornton 2005), factor que determina en gran medida los resultados obtenidos principalmente por procesos de aclimatación de los organismos (Dupont et al 2012; Suckling et al 2014).

A fin de clarificar algunas de estas cuestiones, en este capítulo nos hemos centrado en valorar los efectos de la acidificación sobre el crecimiento en juveniles de dos especies de equinoideos, *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum*. El objetivo principal del estudio fue determinar, de forma precisa, el efecto de la acidificación del océano a consecuencia de los procesos de cambio climático sobre las tasas de crecimiento de los juveniles de estas dos especies de erizos, contrastando el crecimiento experimentado por los organismos durante un periodo de 3 meses, en condiciones actuales de pH (pH=8,1) y en condiciones previstas para el año 2100 (pH=7,6).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Experimento de crecimiento

En diciembre del 2012 se recolectaron del medio natural un total de 200 ejemplares de *P. lividus* y 200 de *D. africanum*, de entre 4-11mm de diámetro horizontal del caparazón, en las localidades de Punta Prieta y Abades respectivamente, en la isla de Tenerife (ver Figura 1). Ambas localidades se caracterizaron por tener una alta tasa de reclutamiento para cada una de las especies durante el mes seleccionado (Hernández 2006; Clemente et al 2007; Girard et al

CAPÍTULO 5

2008). Los juveniles fueron transportados en seco hasta el laboratorio, donde se procedió a su marcaje con el marcador químico calceína, mediante un baño de 24 horas a una concentración de 20 mg/l, siguiendo la metodología descrita en el capítulo 3 de esta tesis (Rodríguez et al 2015).

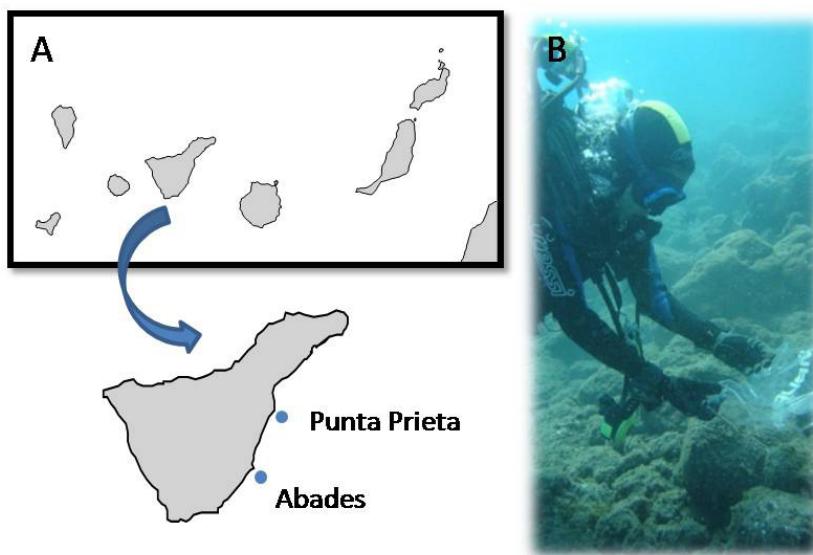


Figura 1. A. Localización de las localidades donde se capturaron los juveniles de erizos en la isla de Tenerife. B. Detalle del proceso de recolección de juveniles de erizos mediante buceo con escafandra autónoma.

Para llevar a cabo los experimentos de crecimiento de los erizos, se eligieron dos tratamientos de pH, uno de pH= 8.1, que se corresponde con las condiciones actuales (ver Mc Elanhy & Busch 2012), y otro de pH= 7,6, escenario previsto para el año 2100 (IPCC 2013). Cien juveniles de cada una de las especies fueron asignados al azar a los tratamientos, con un total de 100 individuos por tratamiento de pH y especie. Se registró el diámetro horizontal ($\pm 0,01$) de cada individuo antes de comenzar el experimento y al final del mismo mediante un calibrador digital, verificando que no existieron diferencias significativas entre las tallas inicialmente seleccionadas para cada uno de los tratamientos (*D. africanum*: $F= 3,156$; $p= 0,092$ y *P. lividus*: $F=3,425$; $p=0,098$). El experimento se realizó en dos tanques de 130 litros de forma cónica, provistos en su parte inferior de una malla de 1 mm de luz de malla y lateralmente de una separación vertical de malla del mismo diámetro, que permitió el cultivo de cada especie por separado en cada uno de los tanques. Las mallas inferiores sirvieron para facilitar la limpieza de los tanques, ya que



las acumulaciones de desechos caían al fondo, no estando en contacto directo con los erizos (Figura 2A). En el cono de tratamiento ácido, el pH fue mantenido con un sistema de ordenador (AquaMedic) que reguló el pH por medio de inyección de CO₂ directamente en el agua, con una resolución de ± 0.01 unidades de pH (Figura 2B). La temperatura se mantuvo constante a 19.4 ± 0.4 °C en el tratamiento ácido, y 19.5 ± 0.3 °C en el control, mediante el uso de enfriadores (ECHEIM AQUATIC, 50W). La circulación, aireación y filtración del agua se hizo a través de una bomba de inmersión provista de filtros de carbono, filtros UV y de biofiltros.

Para el seguimiento de los parámetros físico-químicos durante el experimento, la salinidad, temperatura y pH se registraron cinco veces en semana con un salinómetro, termómetro y una consola de pH, respectivamente. El pH-metro de mano fue calibrado cada semana con 3 patrones de escala NBS (pH= 4, 7 y 9). La alcalinidad total (A_T) del agua de mar fue medida por valoración en cada uno de los tratamientos mensualmente (ver figura 2C). El resto de los parámetros de la química del agua: presión de CO₂ (pCO₂), saturación de calcita (Ωc) y de saturación de aragonito (Ωa), fueron calculados a partir de la A_T y el pH, a través del sistema CO₂Sys (Lewis & Wallace 1998). Los cálculos se basaron en un set de constantes, K1 y K2, de Mehrbach et al (1973), modificado por Dickson & Millero (1987). Cada semana dos tercios del volumen del tanque fueron reemplazados por agua filtrada a la correspondiente salinidad, temperatura y pH, que provenía de los depósitos de agua adyacentes.

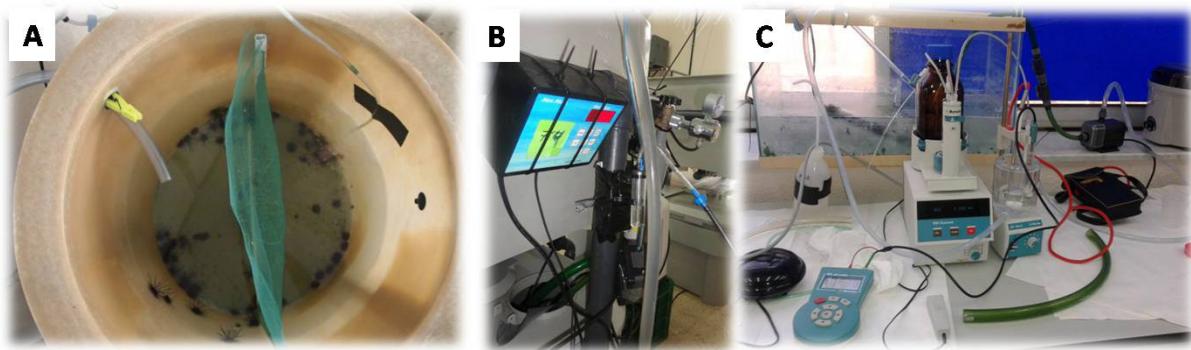


Figura 2. A. Tanques donde se realizaron los experimentos de crecimiento de erizos *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum* en el laboratorio. B. Consola de inyección de CO₂ por burbujeo colocada en el tanque del tratamiento ácido. C. Detalle del método de valoración utilizado para las medidas de alcalinidad total (A_T).

CAPÍTULO 5

Durante el experimento los erizos fueron alimentados *ad libitum* con una mezcla de *Ulva compressa* y *Dictyota sp.*, algas palatables. Transcurridos 100 días de experimento, se cuantificó el número de juveniles supervivientes por cada especie y tratamiento de pH considerados. De los individuos que sobrevivieron al experimento, una parte fue utilizada para los experimentos que se describen en el capítulo 7, quedándonos con 39 ejemplares procedentes del tratamiento ácido y 32 del control para *P. lividus*, y 7 del tratamiento ácido y 5 del control en el caso de *D. africanum* para la estimación del crecimiento. Estos individuos fueron sacrificados y congelados para su posterior disección.

Los erizos fueron diseccionados con ayuda de un bisturí, extrayéndose la linterna de Aristóteles, que se limpió de tejidos blandos con la misma metodología empleada en los capítulos 3 y 4 de esta tesis. Finalmente, las muestras se etiquetaron y se observaron bajo una lupa con luz UV NIKON Zoom AZ100 para registrar el crecimiento experimentado como incremento de la linterna de Aristóteles (ver metodología en el capítulo 4 de esta tesis).

3.2. Estimación del crecimiento

Tras la observación de las linternas bajo la lupa de fluorescencia y registrado el crecimiento en la linterna como incremento de la misma, se procedió a la estimación del crecimiento en diámetro horizontal del caparazón (ver capítulo 4 para más detalle).

3.3. Análisis estadístico

La supervivencia de ambas especies de erizos en los diferentes tratamientos de pH fue evaluada al final del experimento mediante un ANOVA ejecutada por permutaciones. Se utilizó un diseño de dos vías, tomando como factores fijos el “tratamiento” de pH (ácido vs. control) y la “especie” (*P. lividus* vs. *D. africanum*).

Para analizar el efecto del pH del agua en el incremento del caparazón de las dos especies de erizos, se realizó un ANCOVA de dos vías por permutaciones, con “especie” (*P. lividus* vs. *D. africanum*) y “tratamiento” de pH (Ácido vs. Control) como factores fijos, y tomando el



diámetro horizontal del caparazón como covariante. En todas las ANOVAs por permutaciones ($n=4999$) realizadas se utilizó la distancia euclídea de los datos brutos (Anderson 2004) y cuando el número de permutaciones no fue suficiente para obtener un análisis razonable se recurrió a la corrección de Montercarlo (Anderson & Robinson 2003). Cuando fue necesario se realizaron comparaciones *a posteriori* dos a dos de los niveles de los factores significativos en los modelos mediante permutaciones (Anderson & Robinson 2003). Todas las ANOVAs fueron realizadas con el programa estadístico PRIMER6 & PERMANOVA+.

4. RESULTADOS

4.1. Química del agua

El pH en el tratamiento ácido se mantuvo constante en niveles de $7,6 \pm 0,1$ unidades y en el tratamiento control en valores de $8,1 \pm 0,1$ unidades. La alcalinidad total varió entre tratamientos, obteniendo valores de $2,507 \pm 0,012 \mu\text{atm}$ en el caso del tratamiento ácido y de $2,854 \pm 0,011 \mu\text{atm}$ en el tratamiento control. Las concentraciones de aragonito y calcita fueron de $1,29 \pm 0,12 \Omega_a$ y $1,99 \pm 0,21 \Omega_c$ respectivamente en el tratamiento ácido, y de $3,97 \pm 0,21 \Omega_c$ y $6,12 \pm 0,54 \Omega_a$ en el tratamiento control (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros físico-químicos del agua en cada uno de los tratamientos del experimento (ácido -pH= 7,6- y control -pH= 8,1-). Los valores mostrados corresponden a las medias ($\pm DS$) de las medidas realizadas cada mes de pH (pH_T), temperatura (T (°C)) y alcalinidad total (A_T) durante los 100 días que duró el experimento. El resto de parámetros, presión parcial de CO₂ (pCO_2), saturación de calcita (Ω_c), saturación de aragonito (Ω_a) fueron calculados usando el programa CO₂Sys (Lewis & Wallace 1998) a partir del pH y la temperatura.

Trat	pH _T	pCO ₂ (μatm)	A _T (mmol kg ⁻¹)	CO ₃ (mmol kg ⁻¹)	HCO ₃ (mmol kg ⁻¹)	Ω _{calcita}	Ω _{aragonito}	T(°C)
Ácido	7,60±0,1	1349,0±82	2,507±0,012	0,086±0,020	2,301±0,023	1,99±0,21	1,29±0,12	19,4±0,4
Control	8,10±0,1	413,2±42	2,854±0,011	0,258±0,089	2,237±0,061	6,12±0,54	3,97±0,21	19,5±0,3

CAPÍTULO 5

4.2. Supervivencia

Los juveniles de *P. lividus* presentaron una mayor supervivencia en ambos tratamientos de pH que los juveniles de *D. africanum*: 98% en el control y 79% en el tratamiento ácido para *P. lividus*, frente al 52% en tratamiento control y 54% en el ácido para *D. africanum*, ver Figura 3). Los resultados del ANOVA mostraron una interacción significativa de los factores “tratamiento x especie”, de forma que la supervivencia de los juveniles varió con los niveles de pH de forma diferente en las dos especies de erizos consideradas (Tabla 2). Las comparaciones *a posteriori* mostraron diferencias significativas entre tratamientos de pH solamente en el caso de *P. lividus*, donde se registró una supervivencia significativamente mayor en condiciones control de pH 8,1 (ver Tabla 2 y Figura 3). La supervivencia de *D. africanum* no varió entre los tratamientos de pH empleados.

Tabla 2. A. Resultados del ANOVA de dos vías por permutaciones analizando el efecto del “tratamiento” de pH (control: pH= 8,1 vs. ácido: pH= 7,6) y de la “especie” de erizo (*P. lividus* vs. *D. africanum*) en la supervivencia de los individuos. B. Comparaciones *a posteriori* de la interacción significativa “tratamiento x especie”; se muestran las diferencias entre los niveles de pH para cada una de las especies de erizos estudiadas. Los resultados significativos se muestran en negrita.

A. Fuente de variación	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
Tratamiento (T)	1	802,78	802,75	4,19	0,044
Especie (Sp)	1	14003	14003	73,01	0,001
T * Sp	1	1225	1225	6,39	0,011
Residual	396	75994	191,78		
Total	399	91975			
B. Pair-wise T*Sp	Especies	Tratamiento	T	P (MC)	
Supervivencia	<i>P. lividus</i>	Ácido vs. control	4,389	0,001	
Supervivencia	<i>D. africanum</i>	Ácido vs. control	0,282	0,782	

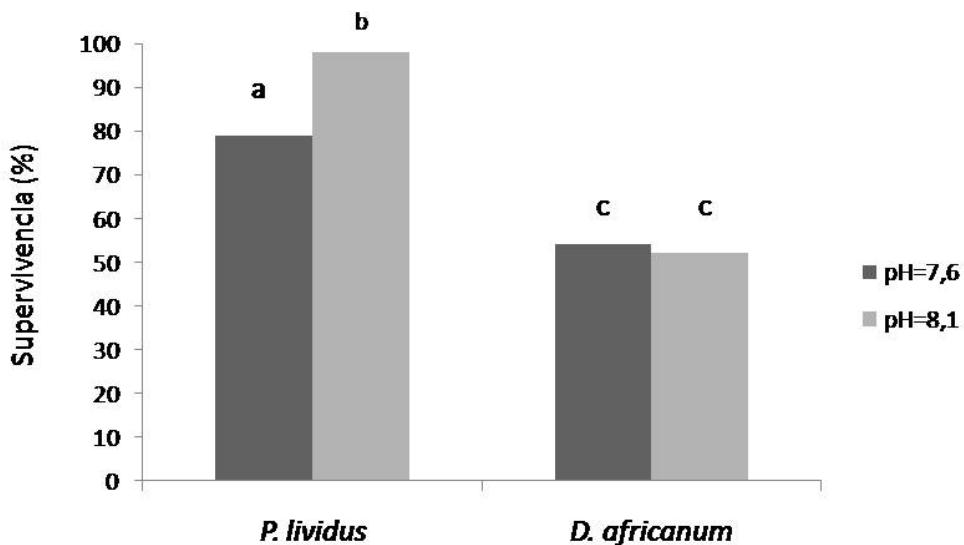


Figura 3. Porcentaje de supervivencia media \pm ES de juveniles de las especies de erizos *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum* en cada uno de los tratamientos de pH (Control pH= 8,1 y ácido pH= 7,6) utilizados en los experimentos de crecimiento en el laboratorio.

4.3. Crecimiento

En ambas especies el incremento en el tamaño del caparazón se correlacionó de forma significativa con el incremento en la linterna, lo que nos indica un buen ajuste de los modelos obtenidos, tanto en condiciones de pH control como en condiciones de acidificación del medio. Obteniéndose valores de $R^2=0,990$ y $R^2=0,992$ para *P. lividus* en los tratamientos ácido y control respectivamente (Figuras 4A y 4B) y valores de $R^2=0,995$ y $R^2=0,999$ para *D. africanum* en tratamiento ácido y control respectivamente (Figuras 4C y 4D).

CAPÍTULO 5

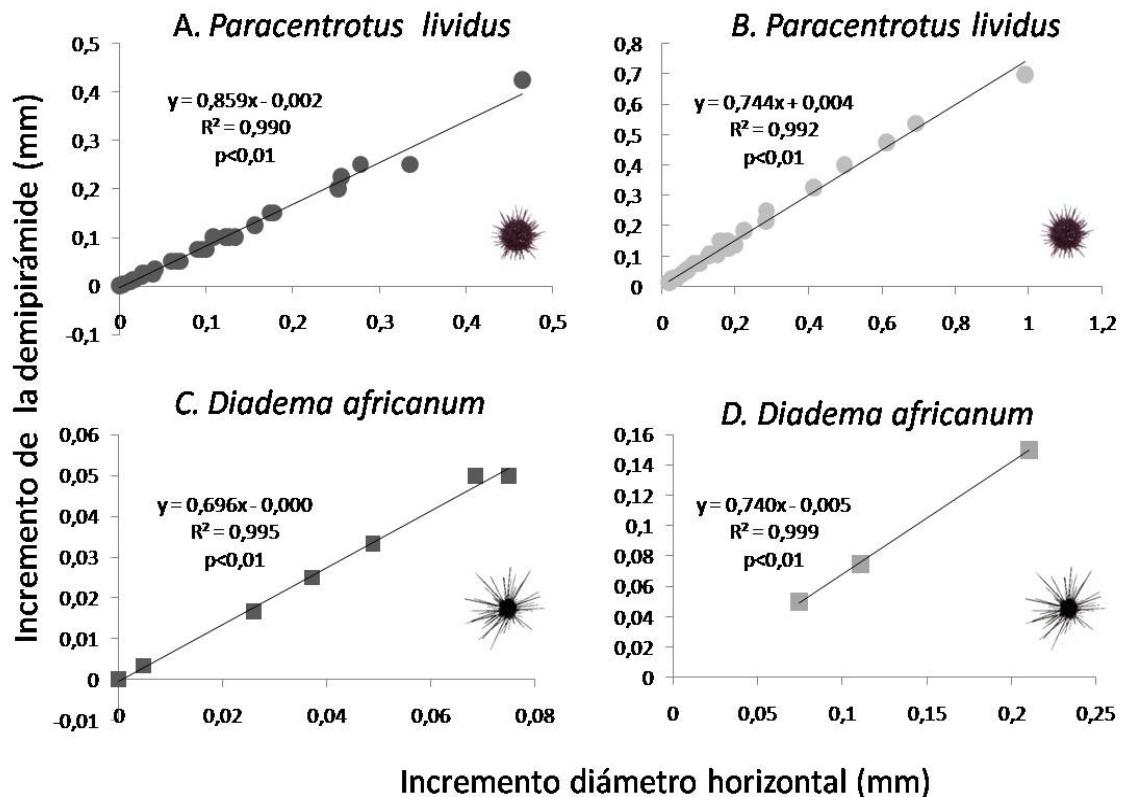


Figura 4. Correlaciones del incremento en diámetro horizontal del caparazón con el incremento en la demipirámide de la linterna de Aristóteles en cada uno de las especies de erizos estudiadas (**A-B**: *Paracentrotus lividus*; **C-D**: *Diadema africanum*) y tratamientos de pH utilizados en los experimentos en el laboratorio. En color gris oscuro se representa el tratamiento ácido (pH= 7,6) y en color gris claro el tratamiento control (pH= 8,1). Se muestra el valor de R^2 , la ecuación de la recta, y la significación de cada uno de los modelos.

Las ecuaciones utilizadas para estimar el crecimiento de los juveniles de *P. lividus* y *D. africauum* como incremento en el diámetro horizontal del caparazón (AC) a partir de las medidas iniciales y finales de las demipirámides de la linterna de Aristóteles, fueron las siguientes:

(A)

$$AC_{(P. \text{ } lividus)} = 4,807 \times [(\text{longitud linterna final}^{0,460}) - (\text{longitud linterna inicial}^{0,460})]$$

(B)

$$AC_{(D. \text{ } africanum)} = 3,964 \times [(\text{longitud linterna final}^{0,624}) - (\text{longitud linterna incial}^{0,624})]$$



El crecimiento de los juveniles, estimado como incremento en diámetro horizontal, varió significativamente entre tratamientos de pH ($F= 12,386$; $p<0,001$; Tabla 3). Los juveniles de ambas especies de erizos estudiadas registraron un incremento en diámetro significativamente mayor en condiciones control de pH que en condiciones de acidificación del agua (Figura 4). Sin embargo, en los resultados del ANOVA no encontramos ningún efecto significativo de la especie de erizo ($F= 1,189$; $p= 0,265$) ni de la interacción de factores “tratamiento x especie” ($F=0,001$; $p=0,962$) (Tabla 3). El tamaño o diámetro horizontal de los erizos, introducido como covariable en el análisis, no presentó un efecto significativo en el crecimiento de los individuos ($F= 3,58$; $p=0,063$), ni interacciones significativas con el resto de factores analizados (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados del ANCOVA de dos vías por permutaciones del crecimiento de juveniles de erizos de mar en experimentos en el laboratorio, analizando el efecto del “tratamiento” de pH (control: pH= 8,1 vs. ácido: pH= 7,6) y de la “especie” de erizo (*P. lividus* vs. *D. africanum*). Los resultados significativos están destacados en negrita.

Fuente de variación	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
<i>Tamaño (T)</i>	1	8,750 e ⁻²	8,750 e ⁻²	3,58	0,063
<i>Tratamiento (Tr)</i>	1	0,3023	0,302	12,39	0,001
<i>Especie (Sp)</i>	1	2,904e ⁻²	2,904e ⁻²	1,19	0,265
<i>T * Tr</i>	1	7,069e ⁻³	7,069e ⁻³	0,29	0,588
<i>T*Sp</i>	1	8,549 e ⁻⁵	8,549 e ⁻⁵	3,50e ⁻³	0,942
<i>Tr*Sp</i>	1	3,584 e ⁻⁵	3,584 e ⁻⁵	1,46 e ⁻³	0,962
<i>T*Tr*Sp</i>	1	9,216 e ⁻³	9,216 e ⁻³	0,38	0,437
<i>Residual</i>	74	1,8066	2,441 e ⁻²		
<i>Total</i>	81	2,2419			

CAPÍTULO 5

Se registraron mayores crecimientos de ambas especies de equinoideos en el tratamiento control que en condiciones ácidas, con valores medios de 0,20 mm en *P. lividus* y 0,14 mm en *D. africanum* frente a los obtenidos en el tratamiento ácido de 0,09 mm y 0,08 mm respectivamente (Figura 5). No todos los ejemplares marcados con calceína al inicio del experimento presentaron marca; de los 45 ejemplares marcados hubo 7 ejemplares de *P. lividus* del tratamiento ácido y 5 del control que no presentaron ningún bandeados de calceína en su linterna. En *D. africanum* también encontramos 2 ejemplares del tratamiento ácido sin marca y 3 ejemplares del tratamiento control sin marca. El resto de los ejemplares presentaron una banda clara de calceína en su linterna (ver figura 2B del capítulo anterior).

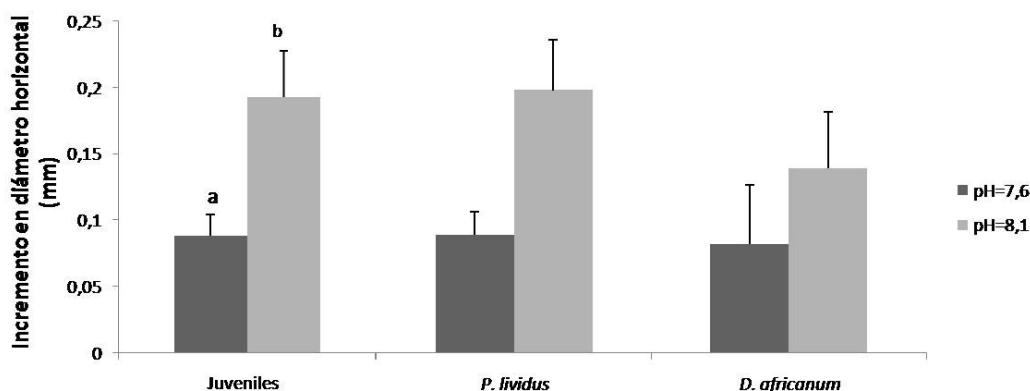


Figura 5. Media (\pm ES) del incremento en el diámetro horizontal del caparazón registrado por los juveniles de las especies de erizos *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum* durante 100 días de exposición a cada uno de los tratamientos de pH (Control -pH=8,1- y ácido -pH=7,6-) utilizados en los experimentos de crecimiento en el laboratorio. Las letras representan diferencias significativas a nivel de $p<0,05$.

5. DISCUSIÓN

En este estudio destacamos el efecto negativo de la acidificación del océano sobre el crecimiento de juveniles de dos especies de erizos de mar, *P. lividus* y *D. africanum*, que desempeñan un papel clave en los ecosistemas bentónicos de fondos rocosos de Canarias (Hernández et al



2013; Sangil et al 2014). Los efectos negativos de la acidificación sobre el crecimiento de las fases tempranas de estos equinodermos fueron consistentes en ambas especies estudiadas, en concordancia con trabajos previos de Shirayama & Thornton (2005), Albright et al (2012), Dupont et al (2012), Wolfe et al (2013) que muestran efectos similares de la disminución del pH en el crecimiento de juveniles de las especies *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Echinometra mathaei*, *Lytechinus variegatus* y *Helicidaris erythrogramma*. En el caso de *H. pulcherrimus* y *E. mathaei*, los individuos estuvieron expuestos durante 6 meses a rangos de pH entre 7,90-7,95, encontrando diferencias en el crecimiento y en la supervivencia de ambas especies en este rango tan estrecho de pH (Shirayama & Thornton 2005). Aunque el periodo de tiempo en que estuvieron expuestos los juveniles a las condiciones de pH fue menor en nuestro estudio (100 días), el rango de variación de pH al que fueron sometidos fue bastante más amplio, (7,6-8,1) al tratar de simular condiciones más realistas para un escenario futuro (año 2100), según las previsiones en el actual contexto de cambio climático global (IPCC 2013). La temporalidad utilizada fue suficiente para traducirse en respuestas claramente perjudiciales de la acidificación sobre el crecimiento de las fases juveniles de los equinoideos estudiados. Otros estudios de menor duración, como en el caso de los desarrollados por Byrne et al (2011), con 5 días de exposición a pH ácido (7,6-8,2 unidades de pH), y los llevados a cabo por Wolfe et al (2013), de 2 semanas de duración, con rangos de pH entre 8,1 y 7,4 unidades, no encontraron diferencias significativas en el crecimiento.

En el caso de *P. lividus*, estudios previos de Asnaghi et al (2013b) no mostraron relación entre el descenso de pH (7,70-8,1 unidades) y el crecimiento, sólo encontraron diferencias en la tasa de crecimiento en función de la dieta a la que eran sometidos. Sin embargo, este estudio tuvo una duración de un mes y es posible que con tiempos mayores de exposición la respuesta en el crecimiento de la especie sea diferente, tal y como sugieren también otros autores (Dupont et al 2010c; Hendricks et al 2010; Suckling et al 2014).

Estudios realizados con otras clases de equinodermos ponen de manifiesto una relación positiva entre el incremento de CO₂ y las tasas de crecimiento, por ejemplo en juveniles de asteroideos de las especies *Crossaster papposus* (ver Dupont et al 2010b) y *Pisaster ochraceus* (Gooding et al 2009), donde el crecimiento no estuvo afectado por el descenso del pH e incluso encontraron

CAPÍTULO 5

mayor crecimiento en el tratamiento ácido. Bajo condiciones estresantes de acidificación, los organismos pueden responder al estrés aumentando su tasa de crecimiento, fenómeno conocido como “hormesis”, descrito ya por otros autores anteriormente (Calabrese & Baldwin 2001; Calabrese 2005). Esto demuestra la amplia gama de respuestas que pueden darse entre los diferentes organismos ante las previsiones futuras de descenso de pH (Ries et al 2009; Dupont et al 2010a, c; Hall-Spencer & Rodolfo-Metalpa 2012), donde cada especie responde de una forma determinada a la acidificación del océano, encontrándose con especies con mayor resiliencia y especies más vulnerables a la acidificación (Ries et al 2009; Dupont et al 2010c; Hendricks et al 2010; Rodríguez et al enviado).

Las bajas tasas de supervivencias encontradas en *D. africanum* no pueden ser atribuidas al descenso de pH, ya que esta especie también vio mermada su supervivencia en el tratamiento control, y son debidas probablemente a que se trata de una especie complicada para mantener en el laboratorio. Sin embargo, las diferencias en la supervivencia de los individuos de *P. lividus* sí pueden ser atribuidas a la acidificación del agua de mar, ya que el número de individuos que sobrevivieron se vio disminuido en el tratamiento ácido con respecto al control. Otros estudios también han encontrado resultados similares tanto en el laboratorio (Shirayama & Thornton 2005), como en el medio natural, observando, por ejemplo, una disminución en la abundancia de la población por disminución de la supervivencia de *Arbacia lixula* y *P. lividus* en zonas con regímenes de pH <7,7 (Hall-Spencer et al 2008). Por el contrario, otros trabajos realizados con juveniles de *P. lividus* no encontraron diferencias en la supervivencia entre diferentes tratamientos de pH (Asnaghi et al 2013b), pero, como comentamos anteriormente, estos estudios tuvieron una duración de 1 mes, periodo que puede ser insuficiente para detectar diferencias (Dupont et al 2010).

El índice de crecimiento de ambas especies obtenido en condiciones control en el laboratorio, se aleja del obtenido en el capítulo anterior de esta tesis también bajo condiciones de laboratorio (Capítulo 4). Aunque en el capítulo anterior los datos obtenidos en el laboratorio correspondieron a 105 días de experimentos, los resultados obtenidos en erizos alimentados con dietas de *D. dichotoma* y *U. compressa* fueron muy diferentes a los obtenidos en este capítulo, donde los individuos se alimentaron de una dieta mixta de estas dos especies de algas. Esto puede ser



debido a las densidades relativas de erizos en que se realizaron los experimentos. Mientras que en el capítulo anterior los experimentos se realizaron en tanques de más de 400 litros y fueron un máximo de 150 individuos de cada especie, en este experimento trabajamos con densidades de 100 individuos de cada especie en 110 litros. Es posible que la mayor competición intraespecífica del tanque control de este experimento haya disminuido el crecimiento experimentado por los individuos, al igual que su supervivencia, tal y como mostró Grosjean et al (1991).

A modo de conclusión, nuestros resultados demuestran que la acidificación del océano esperada en un escenario futuro de cambio climático afectará al crecimiento de los juveniles de las especies de erizos de mar estudiadas, presentando tasas más bajas de crecimiento que las encontradas en condiciones de pH actuales. En cambio, los efectos de estas condiciones de cambio climático sobre la supervivencia de los individuos dependen de la especie en cuestión. A parte de la consecuencia directa de la disminución del crecimiento para la estabilidad de la biomasa de las poblaciones de erizos, menores tasas de crecimiento pueden alterar, de forma indirecta, la estabilidad y perdurabilidad de las mismas. Una disminución del crecimiento de los individuos podría favorecer una mayor tasa de depredación de los mismos, ya que las tallas menores, al crecer de forma más lenta, estarían más tiempo expuestas a la depredación y requiriendo de más tiempo para alcanzar “tallas refugio” (Sala & Zabala 1996), como ocurre con otros invertebrados (Gaylord et al 2011). De igual forma, como consecuencia de una menor tasa de crecimiento, la talla de madurez se alcanzaría más tarde en el tiempo, con repercusiones potenciales en las dinámicas reproductivas de la especie. Sin embargo, es necesario realizar experimentos combinados que incluyan otros factores como la temperatura, o el incremento de la radiaciones UV para comprobar la validez de estos resultados en condiciones de cambio climático más realistas (Hendriks et al 2010). En este sentido, varios estudios han visto que el aumento de la temperatura podría estimular el crecimiento y la calcificación de estos invertebrados, actuando como un factor antagónico a la acidificación (Sheppard Brennand et al 2010; Byrne & Przeslawski 2013; Wolfe et al 2013) o simplemente podría existir un efecto aditivo y perjudicial de ambos factores, de forma que también disminuyera el crecimiento, como es el caso de larvas de molusco (Parker et al 2010, 2011; Byrne et al 2011; Talmage & Glober 2011) o el de cangrejos del Ártico (Zittier et al 2012). Es necesario, además, realizar investigaciones en cada una de las fases del ciclo de vida de estos organismos, ya que la respuesta

CAPÍTULO 5

a la acidificación puede ser diversa en los diferentes estadios (Dupont et al 2010a, c; Hendricks et al 2010, Suckling et al 2014), como los recientes resultados obtenidos por Moulin et al (2015) en adultos de *E. mathaei*, donde el crecimiento no se vio afectado por la disminución del pH, así como estudiar diferentes poblaciones de la misma especie con diferentes características genéticas (Dupont et al 2010c; Hendricks et al 2010; Sunday et al 2011).

6. BIBLIOGRAFÍA

- Albright R**, Bland C, Gillette P, Serafy JE, Langdon C, Capo TR (2012). Juvenile growth of the tropical sea urchin *Lytechinus variegatus* exposed to near-future ocean acidification scenarios. *J Exp Mar Biol Ecol*, 426-427:12-17.
- Anderson MJ** (2004). PERMANOVA 2factor: a FORTRAN computer program for permutational multivariate analysis of variance using permutation tests. University of Auckland, Auckland:35 pp.
- Anderson MJ**, Robinson J (2003). Generalized discriminant analysis based on distances. *Aust NZ J Statist*, 45:301-318.
- Asnaghi V**, Chiantore M, Mangialajo L, Gazeau F, Francour P, Alliouane S, Gatusso JP (2013a). Cascading Effects of Ocean Acidification in a Rocky Subtidal Community. *PLoS ONE*. 8(4):e61978. doi:10.1371/journal.pone.0061978
- Asnaghi V**, Mangialajo L, Gatusso JP, Francour P, Privitera D, Chiantore M (2013b). Effects of ocean acidification and diet on thickness and carbonate elemental composition of the test of juvenile sea urchins. *Mar Env Res*, 93:78-84.
- Basso L**, Hendriks IE, Rodriguez-Navarro AB, Gambi MC, Duarte CM (2015). Extreme pH conditions at a natural CO₂ vent system (Italy) affect growth, and survival of juvenile pen shells (*Pinna nobilis*). *Estuaries Coast*. DOI 10.1007/s12237-014-9936-9.
- Byrne M**, Ho M, Wong E, Soars NA, Selvakumaraswamy P, Shepard-brennan H, Dwoejanyn SA, Davis AR (2011). Unshelled abalone and corrupted urchins, development of marine calcifiers in a changing ocean. *Proceedings of the Royal Society B*, 278: 2376–2383.
- Byrne M**, Przeslawski R (2013). Multistressor studies of the impacts of warming and acidification of the ocean on marine invertebrates' life histories. *Integr Comp Biol*, 53(4):582-596.

CRECIMIENTO Y ACIDIFICACIÓN



- Byrne M**, Smith AM, West S, Collard M, Dubois P, Graba-landry A, Dwoejany A (2014). Warming influences Mg²⁺ content, while warming and acidification influence calcification and test strength of a sea urchin. *Environ Sci Technol*;DOI:dx.doi.org/10.1021/es5017526.
- Calabrese EJ** (2005) Toxicological awakenings: the rebirth of hormesis as a central pillar of toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol*, 204:1-8.
- Calabrese EJ**, Baldwin LA (2001). Hormesis: A generalizable and unifying hypothesis. *Crit Rev Toxicol* 31:353-424.
- Caldeira K**, Wickett ME (2003). Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, 425:365.
- Caldeira K**, Wickett M (2005). Ocean models predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *J Geophys Res*, 110: C09S04.
- Clemente S**, Hernández JC, Toledo K, Brito A (2007). Predation upon *Diadema aff. antillarum* in barren grounds in the Canary Islands. *Sci Mar* 71(4):745-754.
- Cohen-Rengifo M**, García E, Hernández CA, Hernández JC , Clemente S(2013). Global warming and ocean acidification affect fertilization and early development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Cah Biol Mar*, 54:667-675.
- Dickson AG**, Millero FJ (1987). A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep-Sea Res*, 34:1733–1743.
- Duarte C**, Navarro JM, Acuña K, Torres R, Manríquez PH, Lardies MA, Vargas CS, Lagos NA, Aguilera V (2013). Combined effects of temperature and ocean acidification on the juvenile individuals of the mussel *Mytilus chilensis*. *J Sea Res*, 85:308-314.
- Dupont S**, Havenhand J, Thorndyke W, Peck L, Thorndyke M (2008). CO₂-driven ocean acidification radically affects larval survival and development in the brittlestar *Ophiothrix fragilis*. *Mar Ecol Progr Ser*, 373:285-294.
- Dupont S**, Dorey N, Thorndyke M (2010a). What meta-analysis can tell us about vulnerability of marine biodiversity to ocean acidification?. *Estuar Coast Shelf Sci*, 89:182-185.
- Dupont S**, Lundve B, Thorndyke M (2010b). Near future ocean acidification increases growth rate of the lecithotrophic larvae and juveniles of the sea star *Crossaster papposus*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 314B:382-389.
- Dupont S**, Ortega-Martínez O, Thorndyke M (2010c). Impact of near-future ocean acidification on echinoderms. *Ecotoxicology*, 19:449-462.
- Dupont S**, Dorey N, Stumpp M, Melzner F, Thorndyke M (2012). Long-term and trans-life-cycle effects of exposure to ocean acidification in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Mar Biol*, 160:1835-1843.

CAPÍTULO 5

Dupont S, Pörtner HO (2013). A snapshot of ocean acidification research. *Mar Biol* 160:1765-1771.

Dupont S, Thorndyke M (2013). Direct impacts of near-future ocean acidification on sea urchins. In: Fernández-Palacios JM, de Nacimiento L, Hernández JC, Clemente S, González A, Díaz-González JP (eds). Climate Change Perspectives from the Atlantic: Past, Present and Future. Servicio de publicaciones de La Universidad de La Laguna, La Laguna, Spain.

García E, Clemente S, Hernández JC (2014). Global warming ameliorates the negative effects of ocean acidification on *Paracentrotus lividus* larvae development and settlement. *Mar Biol (submitted)*.

Gaylord B, Hill TM, Sanford E, Lenz EA, Jacobs LA, Sato KN, Russell AD, Hettinger A (2011). Functional impacts of ocean acidification in an ecologically critical foundation species. *J Exp Biol*, 214:2586-2594.

Girard D, Herrero A, Mora J, Hernández JC, Brito A, González N, Catoire JL (2008). Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) in its southern population limit (Canary Islands eastern Atlantic). *Gulf Mex Sci*, 26: 149.

Gooding RA, Harley CDG, Tang E (2009). Elevated water temperature and carbon dioxide concentration increase the growth of a keystone echinoderm. *Proc Nat Acad Sci USA*, 106:9316-9321.

Gosselin LA, Qian PY (1997). Juveniles mortality in benthic marine invertebrates. *Mar Ecol Progr Ser*, 146:264-282.

Grosjean P, Spirlet CH, Jangoux M (1996). Experimental study of growth in the echinoid *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata). *J Exp Mar Biol Ecol*, 201:173-184.

Haag N, Russell MP, Hernández JC, Dollahon N (2013). Assessing fluorochrome-staining efficacy in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis* (Müller, 1776). *Cah Biol Mar*, 54:625- 631.

Hall-Spencer JM, Rodolfo-Metalpa R, Martin S, Ransome E, Fine M, Turner SM, Rowley SJ, Tedesco D, Buia M-C (2008). Volcanic carbon dioxide vents show ecosystem effects of ocean acidification. *Nature* 454 (7200), 96e99.

Hall-Spencer JM, Rodolfo-Metalpa R (2012). Effects of ocean acidification on Mediterranean coastal habitats:lessons from carbon dioxide vents off Ischia. In: Life in the Mediterranean Sea: A Look at habitat changes. Ed:Noga Stambler.ISBN:671-684pp.

Hendriks IE, Duarte CM, Álvarez M (2010). Vulnerability of marine biodiversity to ocean acidification: A meta-analysis. *Estuar Coast Shelf S*, 86:157-164.

Hernández JC (2006). Estrategia reproductiva de la población canaria del erizo *Diadema aff. antillarum* Philippi,1845: maduración gonadal, asentamiento larvario y reclutamiento. Universidad de la Laguna, PhD Thesis,261pp.

CRECIMIENTO Y ACIDIFICACIÓN



- Hernández JC**, Clemente S, Tuya F, Pérez-Ruzafa A, Sangil C, Moro-Abad L, Bacallado-Aránega JJ (2013). Echinoderms of the Canary Islands, Spain In: Alvarado J.A, Solís-Marín (ed)Echinoderm Research and Diversity in Latin America, F.Springer. Heidelberg New York Dordrecht London, pp 471-510.
- IPCC** (2013). Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Stocker TF, Qin D, Plattner GK, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM (eds.)] Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Lewis E**, Wallace D (1998). Program developed for CO₂ system calculations. ORNL/CDIAC-105. Oak Ridge, Tennessee: Carbon Dioxide Information Analysis Center.
- McElhany P**, Busch DS (2012). Appropriate pCO₂ treatments in ocean acidification experiments. *Mar Biol*, 160:1807-1812.
- Mehrbach C**, Culberson CH, Hawley JE, Pytkowicz RM (1973). Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in sea water at atmospheric pressure. *Limnol Oceanogr*, 18:897–907.
- Moulin L**, Grosjean P, Leblud J, Batigny A, Collard M, Dubois P (2015). Long-term mesocosmos study of the effects of ocean acidification on growth and physiology of the sea urchin *Echinometra mathaei*. *Mar Env Res*, 103:103-114.
- Parker LM**, Ross PM, O'Connor WA (2010). Comparing the effect of elevated pCO₂ and temperature on the fertilisation and early development of two species of oysters. *Mar Biol*, 157:2435-2452.
- Parker LM**, Ross PM, O'Connor WA (2011). Populations of the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, vary in response to ocean acidification. *Mar Biol*, 158:689-697.
- Ries JB**, Cohen AL, McCorkle DC (2009). Marine calcifiers exhibit mixed responses to CO₂-induced ocean acidification. *Geol Soc Am*, 37: 1131-1134.
- Rodríguez A**, Hernández JC, Clemente S (2015). Efficiency of calcein tagging on juveniles of the sea urchins *Diadema africanum* and *Paracentrotus lividus*. *Mar Ecol* (in press).
- Sabine CL**, Feely RA, Gruber N, Key RM, Lee K, Bullister JL, Wanninkhof R., Wong CS, Wallace, DWR, Tilbrook B, Millero FJ, Peng TH, Kozyr A, Ono T, Rios AF (2004). The oceanic sink for anthropogenic CO₂. *Science*, 305: 367-371.
- Sabine CL**, Feely RA (2007). The oceanic sink for carbon dioxide. In: Reay D, Hewitt N, Grace J, Smith J (eds) Greenhouse gas sinks. CABI Publishing, Oxfordshire.
- Sala E**, Zabala M (1996). Fish predation and the structure of sea urchin *Paracentrotus lividus* populations in the NW Mediterranean. *Mar Ecol Prog Ser*, 140:71-81.

CAPÍTULO 5

Sangil C, Sansón M, Díaz-Villa T, Hernández JC, Clemente S, Afonso-Carrillo J (2014). Spatial variability, structure and composition of crustose algal communités in *Diadema africanum* barrens. *Helgol Mar Res*, 68:451-464.

Shirayama Y, Thornton H (2005). Effect of increased atmospheric CO₂ on shallow water marine benthos. *J Geophys Res* 110(C9):C09S08.

Sheppard-Brennan H, 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: e11372.

Suckling CC, Clark MS, Richard J, Morley SA, thorne MA, Harper EM, Peck LS (2014) Adult acclimation to combined temperature and pH stressors significantly enhances reproductive outcomes compared to short-term exposures. *J Anim Ecol*, doi: 10.1111/1365-2656.12316.

Sunday JM, Crim RN, Harley CDG, Hart MW (2011). Quantifying rates of evolutionary adaptation in response to ocean Acidification. *PLoS ONE*, 6(8):e22881. doi:10.1371/journal.pone.0022881

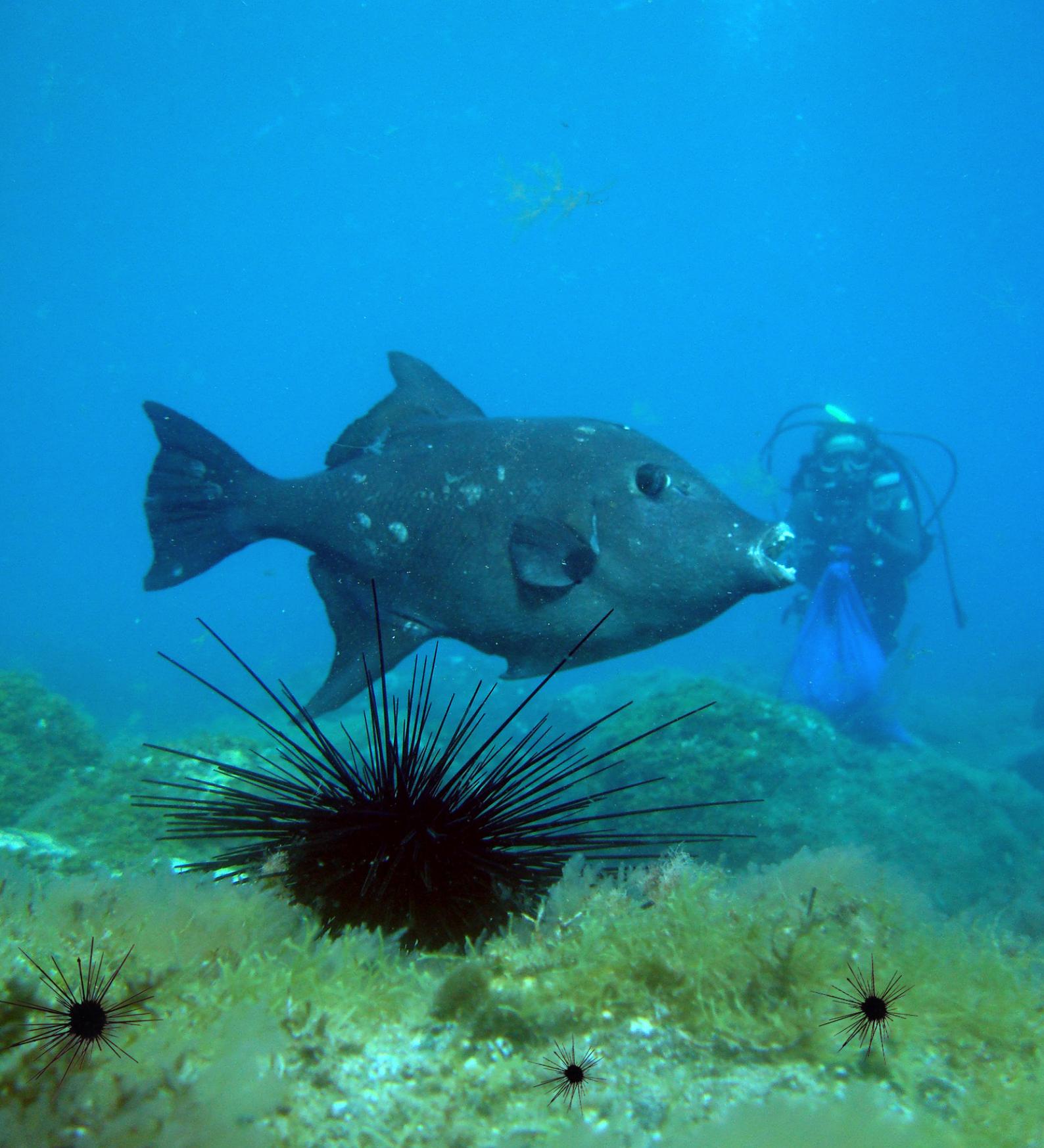
Talmage SC, Gobler CJ (2011). Effects of elevated temperature and carbon dioxide on the growth and survival of larvae and juveniles of three species of northwest Atlantic bivalves. *PLoS ONE*, 6: e26941.

Wolfe K, Dworjanyn S, Byrne M (2013). Effects of ocean acidification on survival, growth and skeletal development in the early benthic juvenile sea urchin (*Heliocidaris erythrogramma*). *Global Change Biol*, 19:2698-2707.

Zittier ZMC, Hirse T, Pörtner H-O (2012). The synergistic effects of increasing temperature and CO₂ levels on activity capacity and acid-base balance in the spider crab, *Hyas araneus*. *Mar Biol*, 160:2049-2062.

CRECIMIENTO Y ACIDIFICACIÓN

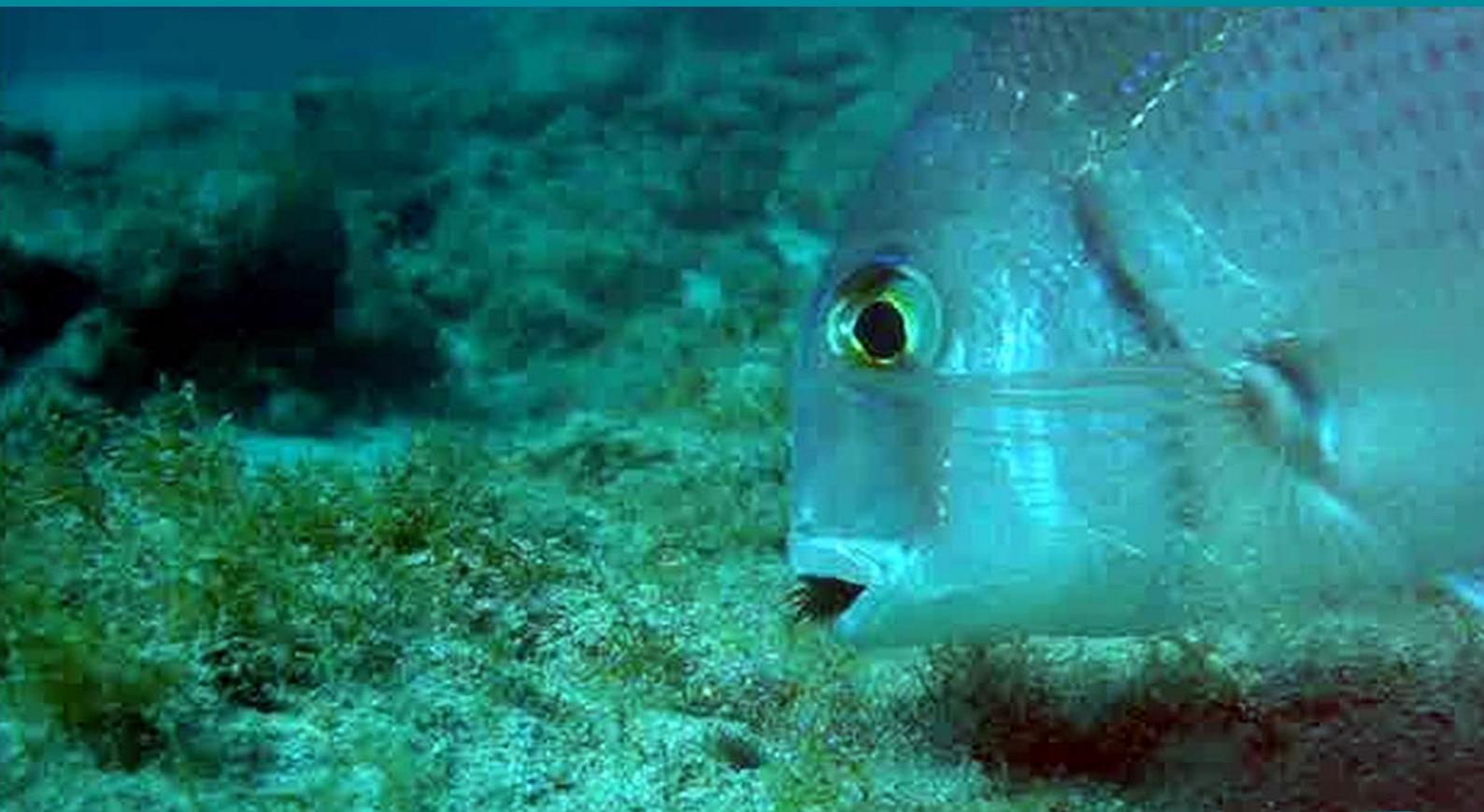




Sección III: Depredación de juveniles de erizos de mar y efecto de la acidificación

Capítulo 6

“Depredación sobre juveniles de erizos de mar: *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum*”



Rodríguez A, Hernández JC, Brito A & Clemente S. Predation on juveniles sea urchins:
Paracentrotus lividus and *Diadema africanum* (in preparation)

ÍNDICE

1. RESUMEN	193
2. INTRODUCCIÓN	194
3. MATERIAL Y MÉTODOS	196
3.1. Área de estudio y recolección de organismos	196
3.2. Experimentos de depredación <i>in situ</i>	197
3.3. Análisis estadístico	198
4. RESULTADOS	199
4.1. Experimentos de depredación de juveniles de <i>P. lividus</i>	199
4.2. Experimentos de depredación de prioridad de presas (<i>P. lividus</i> vs. <i>D. africanum</i>)	205
5. DISCUSIÓN	209
6. BIBLIOGRAFÍA	216



1. RESUMEN

La depredación sobre los juveniles de erizos es un proceso ecológico importante que determina la estructura y funcionamiento de los ecosistemas marinos, y constituye un auténtico cuello de botella para sus poblaciones. En las islas Canarias, solo un estudio ha valorado la depredación sobre fases tempranas de erizos de mar aunque este trabajo estuvo centrado en el erizo *Diadema africanum*. En el caso de *Paracentrotus lividus* ningún estudio ha valorado hasta la fecha la depredación mediante estudios de observación directa en el medio natural. En el presente trabajo se identificaron los depredadores naturales de juveniles de *P. lividus* y se cuantificó, mediante observaciones directas, la selección de presas por parte de depredadores cuando ambos erizos se encuentran simultáneamente en el hábitat. Nuestros resultados identificaron como depredadores principales de juveniles de *P. lividus*, menores de 7 mm de diámetro de caparazón, a las especies de peces *Thalassoma pavo*, *Diplodus sargus* y *Pagrus pagrus*, mientras que los mayores de 7 mm fueron depredados por *D. sargus* y *P. pagrus*. Los experimentos de prioridad de presas no mostraron diferencias significativas en la supervivencia de las dos especies, pero sí se observó un mayor número de especies depredadoras de *P. lividus* que de *D. africanum*, sugiriendo que la vulnerabilidad de los juveniles de *P. lividus* a ser depredados es mayor. Así se concluye que las diferencias morfológicas interespecíficas de los equinoideos suponen ventajas adaptativas, para evitar la depredación, frente a determinadas especies de depredadores de hábitos consumidores más específicos.

2. INTRODUCCIÓN

La depredación es uno de los procesos biológicos más importantes que afectan a la estructura y funcionamiento de los ecosistemas marinos (Hairston et al 1960; Menge 2000; Duffy & Hay 2001). La estructura poblacional y el comportamiento alimenticio de los erizos de mar parecen estar, en gran medida, relacionados con los niveles de depredación que experimentan (Carpenter 1981; Tegner & Dayton 1981; McClanahan & Mutiga 1989; McClanahan & Safir 1990; Sala & Zabala 1996; Sala 1997; McClanahan 2000; Pinneagar et al 2000; Guidetti et al 2003; Tuya et al 2004a; Clemente et al 2011), lo que resalta la importancia funcional de los depredadores como controladores de las poblaciones de estos herbívoros (Sala & Zabala 1996; Clemente et al 2010) y, en consecuencia, de toda la comunidad de los fondos rocosos sublitorales.

En los equinoideos, la vulnerabilidad a los depredadores depende de la fase de vida en la que se encuentren los individuos. La fase juvenil se caracteriza por una alta vulnerabilidad (Gosselin & Qian 1997; Hunt & Scheibling 1997), siendo el control poblacional por depredación sobre estas fases uno de los mayores cuellos de botellas en la dinámica de las poblaciones (Tegner & Dayton 1981; Highsmith 1982; McClanahan & Mutiga 1989; Scheibling & Hamm 1991; Sala & Zabala 1996; Sala 1997; López et al 1998; Fagerli et al 2014). Sin embargo, dada la dificultad inherente de estudiar y experimentar con las primeras etapas de vida de los equinoideos, este fenómeno ha recibido menor atención y gran parte de la investigación sobre la influencia de la depredación en el control de las poblaciones de erizos se ha centrado en las interacciones entre adultos y sus depredadores (McClanahan & Muthiga 1989; Sala et al 1998; Shears & Babcock 2002; Clemente et al 2009).

En las islas Canarias, *Diadema africanum* y *Paracentrotus lividus* constituyen las dos especies de erizos de mar más importantes en los ecosistemas de fondos rocosos (Hernández et al 2013), debido a sus altas abundancias poblacionales y sus efectos ecológicos en los ecosistemas. Por lo tanto, el estudio de la depredación como factor de control de la organización de las poblaciones de estos equinoideos resulta clave para entender el funcionamiento de los ecosistemas que habitan. La especie *D. africanum* es un herbívoro clave que es capaz de dejar los fondos desprovistos de algas (Hernández et al 2008), pasando de fondos dominados por algas erectas a



fondos dominados por algas calcáreas, conocidos localmente como blanquizales (Hernández et al 2013). La especie *P. lividus* se distribuye en el intermareal y submareal de los fondos rocosos de Canarias, pudiendo llegar a formar también comunidades constituidas por algas calcáreas como consecuencia de su intensa herbívora (Girard et al 2008). En el Mediterráneo, esta especie es el principal herbívoro clave, formando auténticos blanquizales desprovistos de macroalgas erectas (Vukovic 1982; Verlaque 1987; Sala 1996; Hereu et al 2009).

En Canarias los estudios de depredación de erizos se han centrado mayoritariamente en adultos de *D. africanum* (Clemente et al 2007, 2010), y en menor medida con juveniles de esta especie (Clemente et al 2007, 2010), pero ninguno se ha realizado con *P. lividus*. Con esta última especie sí se han llevado a cabo numerosos estudios de depredación en el Mediterráneo, valorándose la presión depredadora que presenta en diferentes tipos de hábitats e identificando los depredadores naturales de las fases juveniles, mediante observaciones directas en el medio natural (Sala 1997; Guidetti 2004; Guidetti & Mori 2005; Hereu et al 2005; Guidetti & Dulčić 2007) o mediante experimentos de laboratorio centrados en la microdepredación de postlarvas (Bonaviri et al 2010, 2012). Los resultados de estos estudios sobre juveniles destacan como depredadores principales de juveniles de *P. lividus* las especies de espáridos *Diplodus sargus*, *D. vulgaris*, y los lábridos *Thalassoma pavo* y *Coris julis*. Sin embargo, en Canarias se desconocen sus depredadores naturales, tan sólo estudiados por métodos indirectos de análisis de contenidos estomacales por Clemente (2007), resultando los lábridos *Bodianos scrofa* y *T. pavo* y los espáridos *D. cervinus* y *D. sargus*, junto con el tetraodóntido *Sphoeroides marmoratus*, los consumidores de juveniles de *P. lividus* identificados hasta el momento. Estos tipos de estudios por análisis de dietas cuantifican la importancia de los consumidores en condiciones naturales pero no determinan el papel de las especies como depredadores o carroñeros (Sala 1997), haciéndose necesaria la experimentación directa para la correcta identificación de los depredadores naturales de *P. lividus* en las islas Canarias. En el caso de juveniles de *D. africanum*, estudios de depredación mediante observación directa han identificado como principales depredadores a los peces *D. sargus* y *T. pavo*, en blanquizales de las islas Canarias (Clemente 2007, 2010). Sin embargo, estos estudios identificaron a otras especies depredadores en las reservas marinas, como *Balistes capriscus* y *Bodianus scrofa*, que consumieron juveniles entre 10-20 mm de diámetro de caparazón. Hasta la actualidad no se ha realizado ningún estudio que cuantifique la prioridad de los depredadores

CAPÍTULO 6

por una u otra especie. Por ello, en este trabajo se plantea identificar, a través de observaciones directas en el mar, los principales depredadores y carroñeros de juveniles de ambas especies, así como cuantificar el índice de depredación al que se encuentran sometidas en los hábitats donde existen, y evaluar la selección de presas de ambas especies por parte de los distintos depredadores, cuando son ofrecidas simultáneamente.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio y recolección de organismos

En enero del 2012 se recolectaron juveniles de *P. lividus*, de 4-12 mm diámetro de caparazón (DC), mediante buceo con escafandra autónoma a una profundidad comprendida entre los 7 y los 2 m en la localidad de La Caleta (Tenerife; 28° 16' 20.33'' N, 16° 23' 4.43'' W), donde normalmente se registra un alto reclutamiento en esa época del año (Girard et al 2008). Los juveniles fueron trasladados al laboratorio y mantenidos allí hasta que se utilizaron para los experimentos de depredación *in situ*. Durante el periodo en el que estuvieron en el laboratorio (3 días), fueron alimentados *ad libitum* con las macroalgas *Dictyota* sp. y *Taonia atomaria*.

Para la realización de los experimentos de prioridad de presas en el campo, en febrero del 2012 se recolectaron juveniles de *P. lividus* y *D. africanum* mediante buceo autónomo en las localidades de La Caleta y Abades (Tenerife; 28° 8' 31.05'' N, 16° 26' 12.49'' W), respectivamente. Los juveniles fueron trasladados al laboratorio, alimentados y mantenidos en mesas de agua con agua filtrada hasta su utilización.

Para llevar a cabo los experimentos de observación directa se seleccionaron 3 localidades de la vertiente este de la isla de Tenerife, caracterizadas por blanquizales de *D. africanum* (Boca Cangrejo, La Caleta y Abades: Figura 1 A). Estas localidades fueron elegidas por presentar una alta abundancia de juveniles de erizos < 10 mm (DC) habitando en blanquizales o en sus bordes, donde existe una mayor cobertura de algas erectas (Clemente et al 2007). Los experimentos de depredación se realizaron en el borde de estos blanquizales.



3.2. Experimentos de depredación *in situ*

Para evaluar la presión depredadora sobre juveniles de *P. lividus* se realizaron observaciones diurnas de los eventos de depredación en el mes de enero del 2012. Seis juveniles de erizos fueron agrupados en dos clases de tallas (3 individuos <7 mm de DC y 3 individuos >7 mm de DC) y expuestos a los depredadores (modificado de Hereu et al 2005; Clemente et al 2010). En cada localidad se realizaron 6 réplicas de este procedimiento. El diámetro horizontal o DC de cada uno de los juveniles fue medido mediante calibradores de precisión ($\pm 0,01$ mm) y cada juvenil fue puesto en posición natural, con la cara oral sobre el sustrato, a una profundidad de 12-3 m. Se usaron dos videocámaras SONY provistas de carcasa submarina sobre un trípode lastrado (Figura 1B-C) para filmar los eventos de depredación que pudieran ocurrir durante 20 minutos. Antes de comenzar las filmaciones se dejó un tiempo de unos 3 minutos para que los individuos se aclimataran al medio y se fijaran al sustrato. El buceador observador se colocó a una distancia prudencial, mayor de 2 m, para obstaculizar lo menos posible la actividad de los depredadores y los posibles eventos de depredación. Las grabaciones fueron visualizadas en el laboratorio, registrándose el número de erizos depredados, las frecuencias de depredación, la especie y talla del depredador, así como el tiempo requerido para la ingestión de la presa. A las especies de peces depredadores se les asignó diferentes categorías de consumo (Mc Clanahan 1995; Clemente et al 2010): (1) depredadores (especies que pueden romper el caparazón del erizo), (2) depredadores truncados (especies que golpean el caparazón del erizo sin éxito) y (3) carroñeros (especies que se alimentan una vez que el caparazón del erizo ya se encuentra abierto).

También se registraron el tiempo de supervivencia de cada ejemplar de erizo (± 1 s), el número de observaciones de depredación, las especies de depredadores, las tallas de los depredadores (± 2 cm) y el tiempo de ingestión (± 1 s).

Los experimentos de prioridad de presas se realizaron durante el mes de Febrero del 2012. Se expusieron a los depredadores 3 juveniles de *P. lividus* y 3 juveniles de *D. africanum* de forma simultánea, siguiendo la misma metodología descrita anteriormente y realizando 6 réplicas en cada una de las 3 localidades de estudio (Fig. 1A). Se registraron las mismas variables descritas en los experimentos de depredación *in situ* de juveniles de *P. lividus*.

CAPÍTULO 6

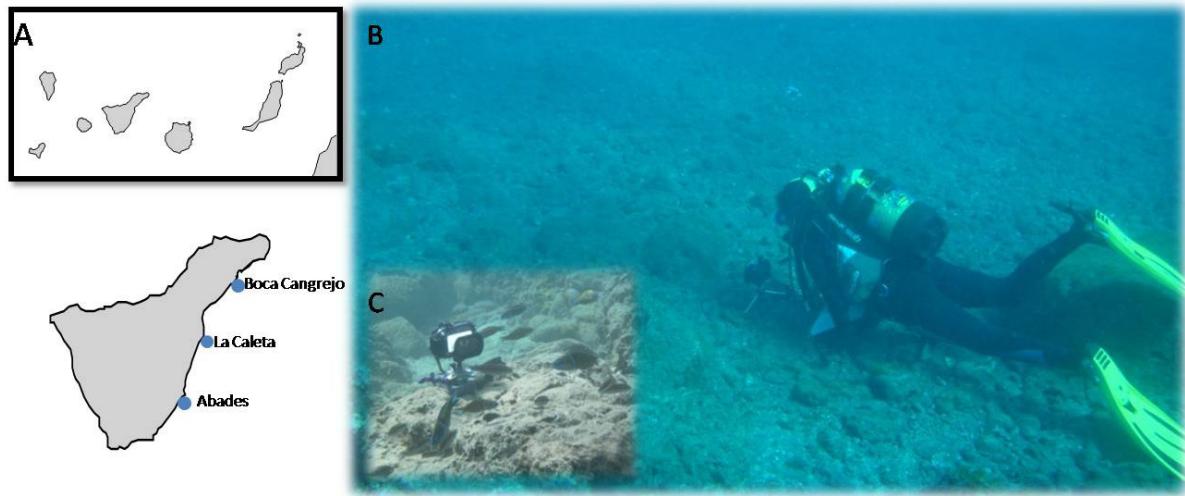


Figura 1. Detalle de la metodología llevada a cabo para las observaciones directas de los eventos de depredación sobre juveniles de erizos de mar, con cámara submarina provista de trípode. **A.** Localidades de estudio seleccionadas en la isla de Tenerife. **B.** Buceador en los momentos previos al comienzo de la filmación de los experimentos. **C.** Detalle de la cámara lastrada con plomo filmando los eventos de depredación.

3.3 Análisis estadísticos

Las supervivencias de los juveniles de *P. lividus* en el medio natural fueron comparadas entre localidades mediante un ANOVA de 2 vías ejecutado por permutaciones (Anderson 2004). En este modelo se eligió como factor fijo la “clase de talla” (2 niveles: <7 mm y >7 mm de DC) y como factor aleatorio la “localidad” (3 niveles: Abades, La Caleta, Boca Cangrejo).

La supervivencia de juveniles del experimento de prioridad de presas en el medio natural fue comparada entre las especies de erizos y entre localidades, a través de un ANOVA de dos vías por permutaciones. En este diseño el factor “especie” fue utilizada como factor fijo (2 niveles: *P. lividus* vs. *D. africanum*) y el factor “localidad” fue aleatorio (3 niveles: Abades, La Caleta, Boca Cangrejo).



En aquellos peces que depredaron sobre las dos clases de tallas, la longitud total del depredador (talla), así como los tiempos de ingestión, fueron comparados entre categorías de tallas de juveniles de *P. lividus* a través de un ANOVA de 1 vía por permutaciones con “clase de talla” (2 niveles: <7 mm y >7 mm de DC) como factor fijo.

En el caso de los experimentos de prioridad de presa, la talla y tiempo de ingestión de los depredadores que consumieron las dos especies fueron comparados entre especies de equinodermos a través de un ANOVA de 1 vía por permutaciones con “especie” (2 niveles: *P. lividus* vs. *D. africanum*) como factor fijo.

En todas las ANOVAs por permutaciones realizadas se utilizó la distancia euclídea de los datos brutos (Anderson 2004), y cuando el número de permutaciones no fue suficiente se recurrió al test de Montecarlo con (n=4999) (Anderson & Robinson 2003). Cuando fue necesario se realizaron las comparaciones a posteriori mediante permutaciones (Anderson 2004). Todas las ANOVAs por permutaciones fueron realizadas con el programa estadístico PRIMER6 & PERMANOVA+. El porcentaje de observaciones de depredación, la estadística descriptiva de las categorías de los depredadores, de la talla de los depredadores, y del tiempo de ingestión, fueron calculadas con el software SPSS 18.0.

4. RESULTADOS

4.1. Experimentos de depredación de juveniles de *Paracentrotus lividus*

La supervivencia de los juveniles de *P. lividus* en el medio natural, durante los 20 minutos en los que se encontraron expuestos a los depredadores, varió significativamente entre localidades pero no entre las tallas de erizos consideradas (ver Tabla 1). La localidad de Abades presentó una menor supervivencia de juveniles de erizos (30,55 %), que las localidades de La Caleta y Boca Cangrejo, donde las supervivencias fueron del 50 % y 70 % respectivamente (Figura 2).

CAPÍTULO 6

Tabla 1. Resultados del ANOVA de dos vías por permutaciones de la supervivencia de juveniles de *Paracentrotus lividus* en experimentos de depredación en el medio. Se eligió como factor fijo la “talla” (2 niveles: < 7 mm y > 7 mm de diámetro de caparazón) y la “localidad” como factor aleatorio (3 niveles: Abades, La Caleta, Boca Cangrejo). Los resultados significativos se muestran en negrita.

Fuente de variación	Df	SS	MS	Pseudo-F	P(MC)
Talla (T)	1	1,333	1,333	6,857	0,117
Localidad(Lo)	2	3,167	1,583	7,304	0,001
T * Lo	2	0,388	0,194	0,897	0,421
Residual	102	22,111	0,216		
Total	107	27			

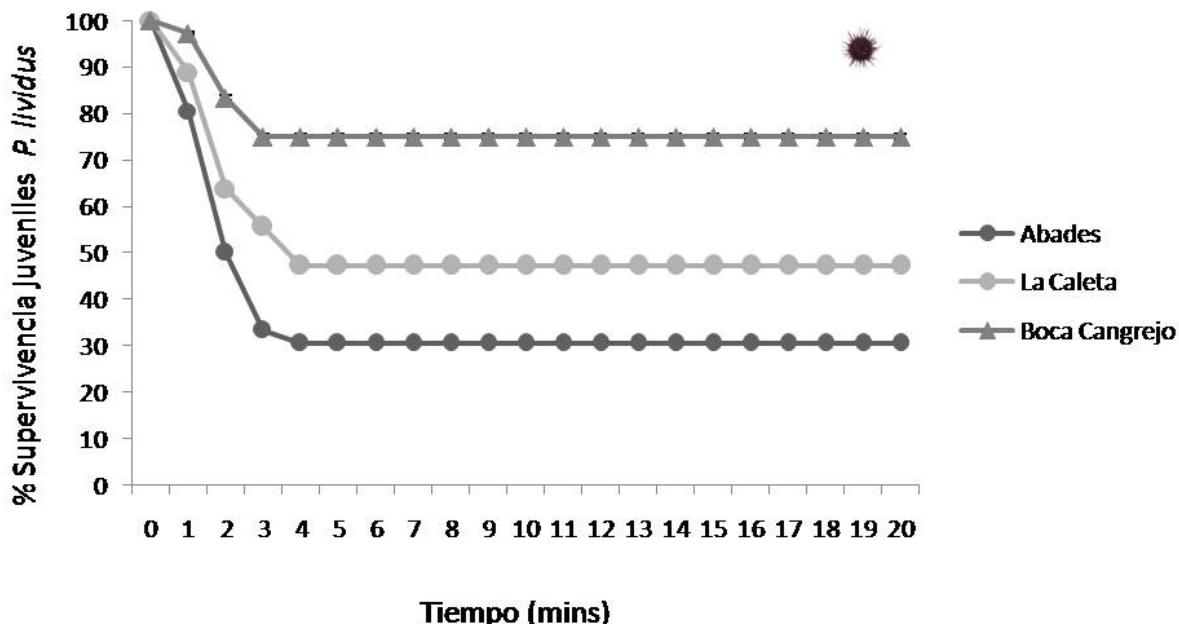


Figura 2. Porcentaje de supervivencia (media ±ES) de los juveniles del erizo de mar *Paracentrotus lividus* durante las observaciones de depredación *in situ* en tres localidades de estudio de la isla de Tenerife (Abades, La Caleta y Boca Cangrejo), consistentes en un total de 20 minutos de observación por réplica experimental.



En total se registraron 67 eventos de depredación, de los cuales el 62,7 % de las observaciones correspondieron a la clase de talla de juveniles de *P. lividus* comprendida entre los 4-7 mm de DC y el 37,3 % a la clase de talla de 7-12 mm, observándose una tendencia hacia una mayor frecuencia de depredación sobre los juveniles de menor tamaño, a pesar de que estas diferencias no fueron significativas. Se registraron dos especies depredadoras que sólo consumieron juveniles de la menor clase de talla pero no individuos de más de 7 mm de DC; estas especies fueron *Thalassoma pavo* (41,66 % de las observaciones de depredación en la clase de talla) y *Stephanolepis hispidus* (11,11 %) (Figura 3 A). Al asignar los depredadores a categorías de consumidores, se observó un mayor número de especies depredadoras de tallas inferiores a 7 mm que de depredadores de tallas superiores a 7 mm, en concreto 6 especies frente a 4 respectivamente. Las especies que depredaron sobre las tallas menores fueron, en orden de importancia, *T. pavo* (41,60 %), *D. sargus* (22,22 %), *Pagrus pagrus* (13,90 %), *S. hispidus* (11,11 %), *Sphoeroides marmoratus* (8,33 %) y *Sparisoma cretense* (2,77 %). Como depredadores de juveniles de entre 7 -12 mm se registraron sólo 4 de las especies de peces anteriormente citadas: *D. sargus* (57,14 %), *P. pagrus* (33,33 %), *S. marmoratus* (4,76 %) y *S. cretense* (4,76 %) (ver figura 3A). Como depredadores truncados, aquellos que intentaron abrir el caparazón de los juveniles sin éxito, se registró una única especie para cada clase de talla de erizo estudiada: *S. hispidus*, para los juveniles inferiores a 7 mm de DC y *T. pavo* para los de más de 7 mm de DC (Figura 3B). En el caso de los carroñeros también se observaron diferencias significativas entre las clases de tallas estudiadas, encontrándose 4 especies para los juveniles de menor tamaño, *T. pavo* (40 %), *S. marmoratus* (20%), *D. sargus* (20 %) y *C. capistrata* (20 %); y 3 especies en los de mayor tamaño, *T. pavo*, *S. marmoratus* y *S. hispidus* con la misma frecuencia de observación para todas las especies (33,33 %) (Figura 3C).

CAPÍTULO 6

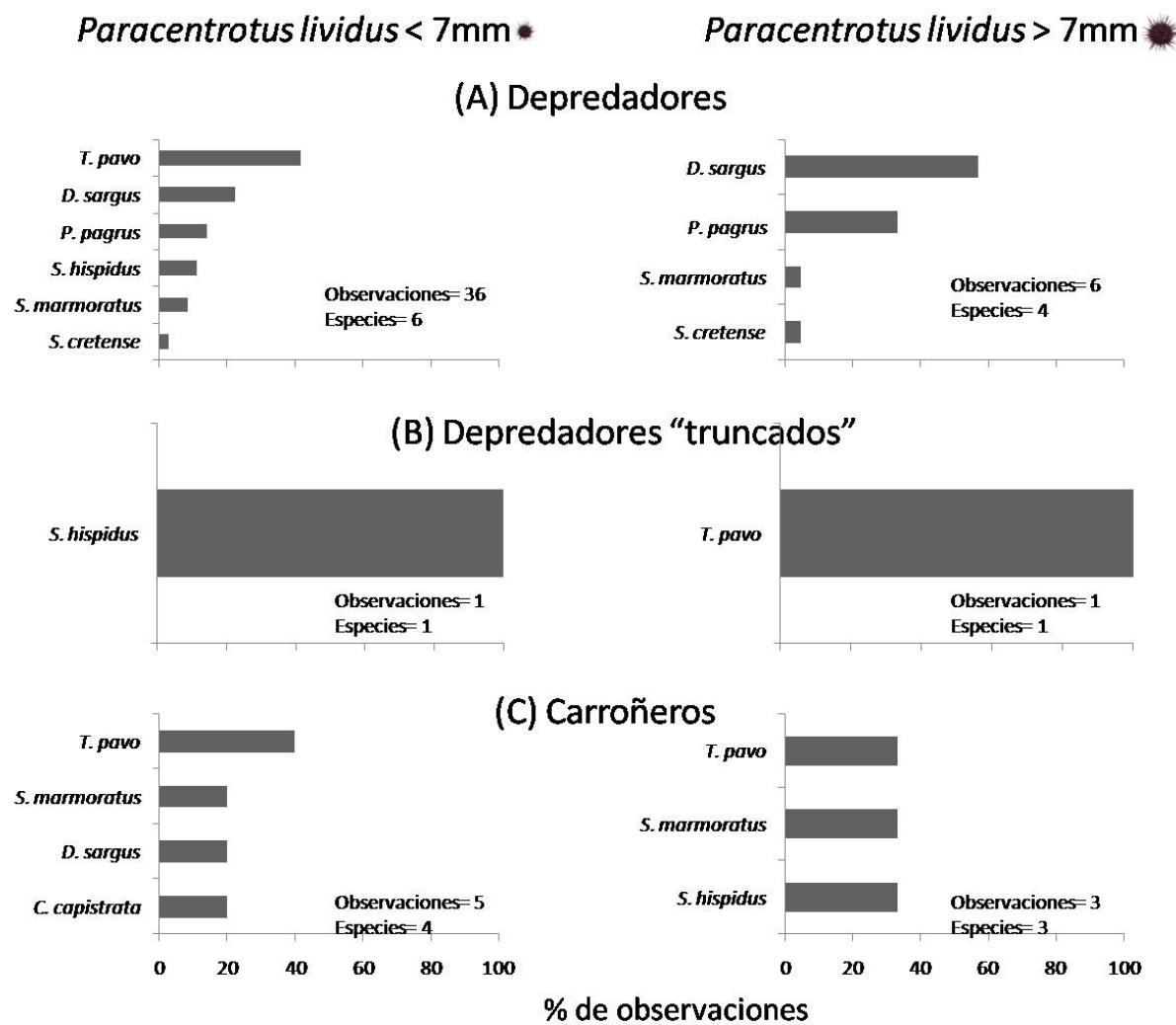


Figura 3. Porcentaje de observación de eventos de depredación sobre dos categorías de tallas de juveniles de *Paracentrotus lividus* (pequeños: < 7 mm y grandes: > 7mm de diámetro de caparazón) por parte de distintas especies de peces que A. mordieron y abrieron el caparazón (depredadores), B. intentaron abrir el caparazón sin éxito (depredadores truncados) y C. mordieron un caparazón previamente abierto (carroñeros). Se presenta el número total de observaciones y el número de especies registradas.



Para aquellas especies que depredaron sobre las dos clases de tallas de juveniles de erizo, encontramos diferencias significativas entre las tallas de los depredadores únicamente en el espárido *D. sargus* ($F= 8,471$; $p< 0,01$), de forma que los peces que consumieron los juveniles de mayor talla fueron significativamente más grandes ($24,25 \pm 0,62$ cm de longitud total, LT) que los que depredaron sobre juveniles de menor talla ($21,75 \pm 0,49$ cm de LT) (Figura 4A). Sin embargo, en el resto de las especies que depredaron sobre las dos clases de tallas de juveniles no se encontraron diferencias significativas en la LT de los depredadores. En el caso de *P. pagrus*, el mismo ejemplar (27 cm) depredó en ambas clases de tallas de juveniles. Los ejemplares de *S. cretense* que depredaron sobre juveniles grandes registraron una talla de 30 cm frente los 27 cm de LT de los que depredaron sobre juveniles pequeños. En el caso de *S. marmoratus*, las tallas que depredaron sobre juveniles mayores de 7 mm fueron de 12 cm de LT, mientras que las que consumieron juveniles inferiores a 7 mm fueron de $10 \pm 2,64$ cm (Figura 4A).

Los tiempos de ingestión variaron significativamente entre las clases de tallas de juveniles consumidos para la especie depredadora *P. pagrus* ($F= 7,631$; $p< 0,05$). Los juveniles de menor talla requirieron un menor tiempo para ser consumidos por esta especie ($6,01 \pm 1,58$ s) que aquellos con un DC superior a 7mm ($9,8 \pm 2,79$ s) (Figura 4B). En el resto de las especies, *S. cretense*, *S. marmoratus* y *D. sargus*, existió una tendencia clara, aunque no significativa, en los tiempos de ingestión, observándose que el tiempo requerido para el consumo de los juveniles de menor talla tiende a ser menor que para la ingesta de los de mayor talla (Figura 4B).

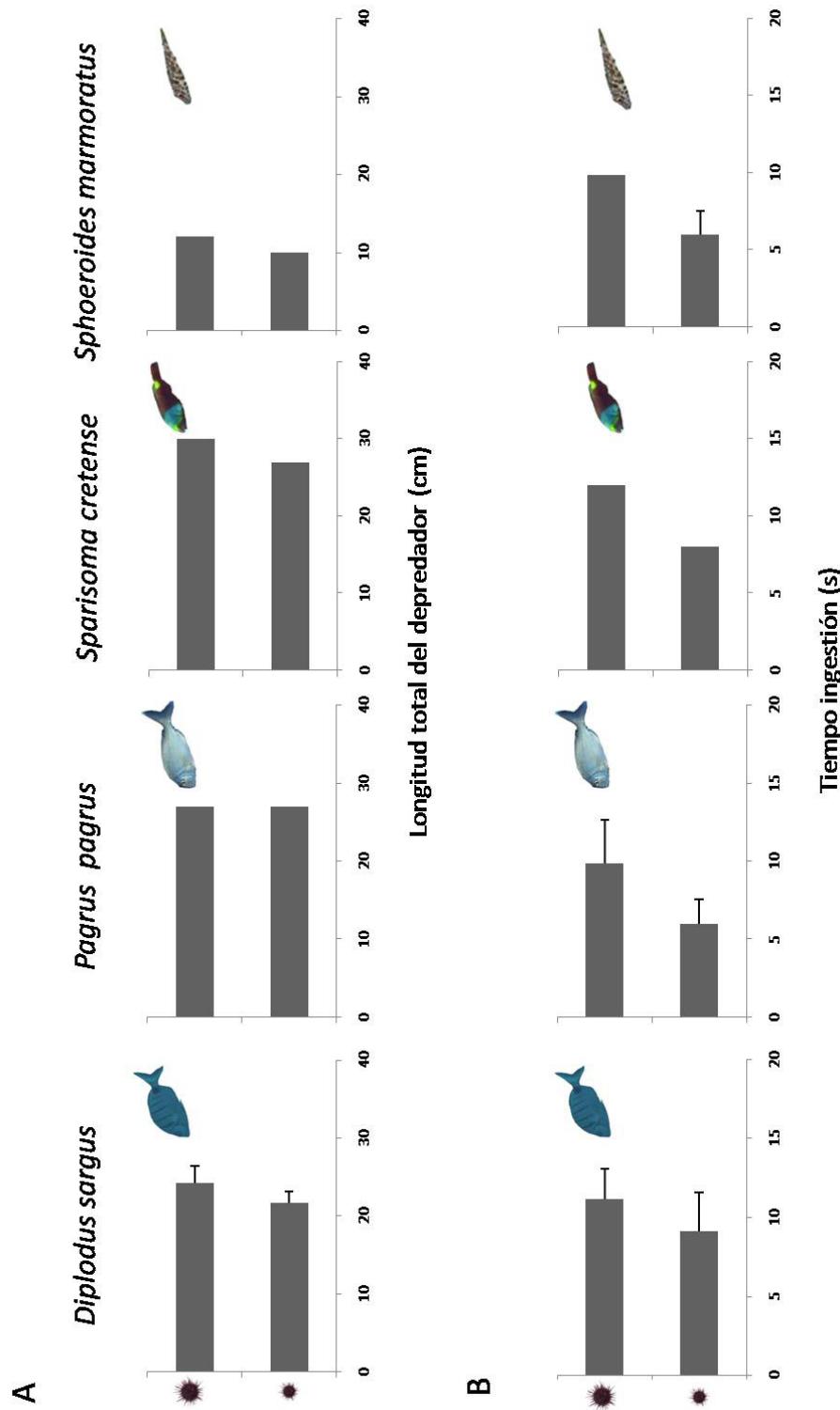


Figura 4. A. Longitud total (media ± DS) de las especies de peces que depredaron sobre las dos clases de tallas de juveniles del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (pequeños: < 7 mm y grandes: > 7 mm de diámetro de caparazón) en experimentos de observación de la depredación en el medio. B. Tiempo de ingesta (media ± DS) de las dos categorías de tallas de juveniles de *Paracentrotus lividus* registrado para las distintas especies de peces depredadores. De izquierda a derecha: *Diplobodus sargus*, *Pagrus pagrus*, *Sparisoma cretense* y *Sphoeroides marmoratus*.



4.2. Experimentos de depredación de prioridad de presas (*P. lividus* vs. *D. africanum*)

La supervivencia de juveniles de erizos, en los experimentos de prioridad de presas realizados *in situ* no varió significativamente entre las dos especies de erizos estudiadas, *P. lividus* y *D. africanum* ($F= 0,124$; $p= 0,840$), pero sí ligeramente entre las localidades analizadas ($F= 3,142$; $p<0,05$). Se registró una mayor presión de depredación de ambas especies de juveniles en las localidades de Abades y la Caleta, y una menor presión en la localidad de Boca Cangrejo (ver Tabla 2, Figura 5).

Tabla 2. Resultados del ANCOVA de dos vías por permutaciones de la supervivencia de juveniles de *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum* en experimentos de prioridad de presas en el medio. Se eligieron como factor fijo “especie” (2 niveles: *P. lividus* vs. *D. africanum*) y “localidad” como factor aleatorio (3 niveles: Abades, La Caleta, Boca Cangrejo). La talla del erizo (diámetro horizontal del caparazón) fue seleccionada como covariante. Los resultados significativos se muestran en negrita.

A. Fuente de variación	Df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
Talla (<i>T</i>)	1	0,1916	0,1916	1,623	0,117
Especie (<i>Sp</i>)	1	0,021	0,1238	0,124	0,840
Localidad(<i>Lo</i>)	2	0,674	3,1424	3,142	0,049
<i>T</i> * <i>Sp</i>	2	0,145	1,2958	1,295	0,262
<i>T</i> * <i>Lo</i>	1	0,326	1,5215	1,521	0,227
<i>Sp</i> * <i>Lo</i>	2	0,402	1,8748	1,874	0,164
<i>T</i> * <i>Sp</i> * <i>Lo</i>	2	0,121	0,5650	0,563	0,569
Residual	96	10,302			
Total	107	12,185			

CAPÍTULO 6

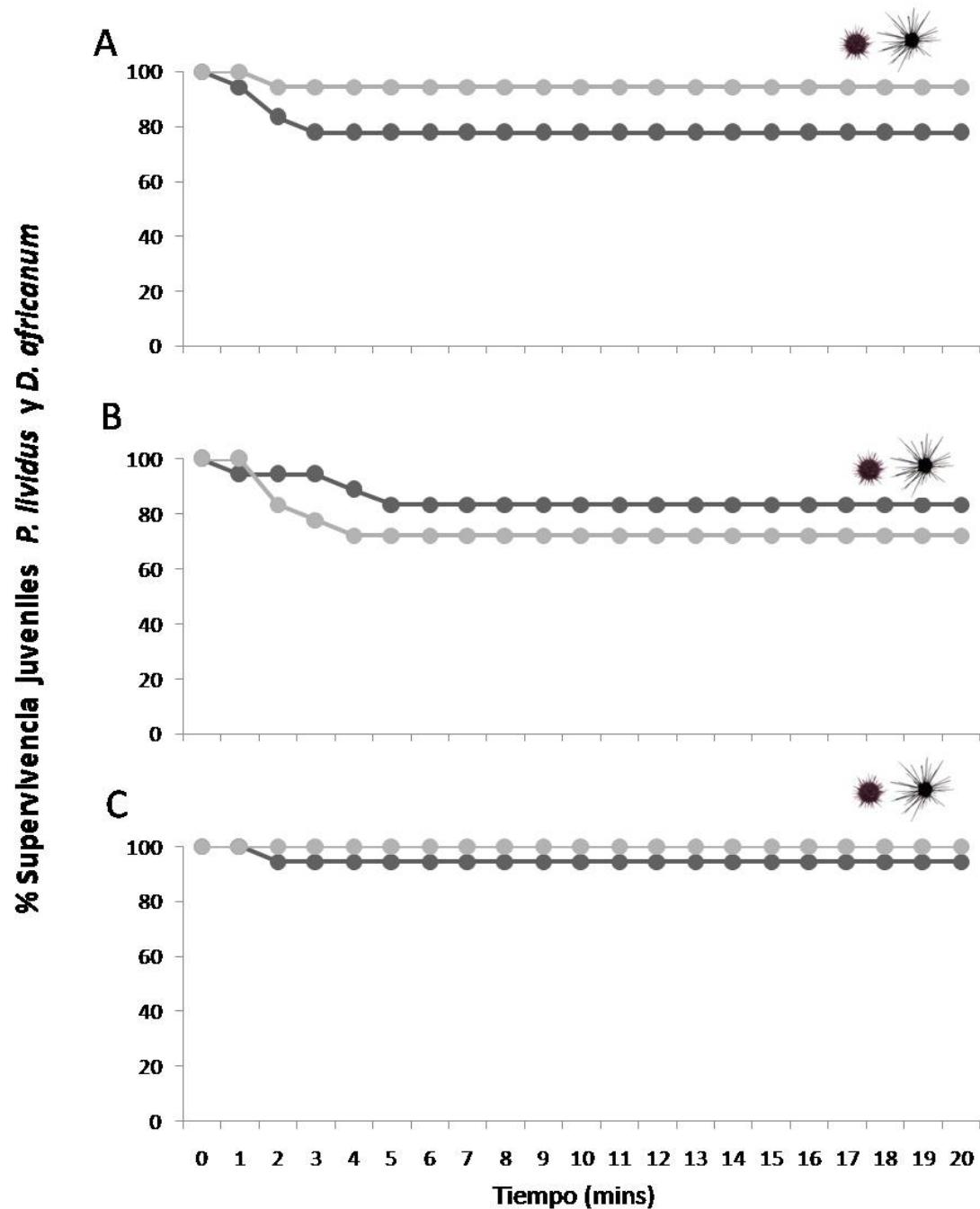


Figura 5. Porcentaje de supervivencia (media ± DS) de los juveniles de *Paracentrotus lividus* (círculos grises oscuros) y *Diadema africanum* (círculos grises claros) durante los experimentos de prioridad de presas realizados *in situ* en tres localidades de estudio de la isla de Tenerife (A. Abades, B. La Caleta y C. Boca Cangrejo), consistentes en un total de 20 minutos de observación por réplica experimental.



En total se observaron 33 eventos de depredación en las 3 localidades seleccionadas, 14 sobre juveniles de *P. lividus* y 19 sobre juveniles de *D. africanum*. Los depredadores principales de los juveniles variaron entre especies de erizos, siendo los juveniles de *P. lividus* consumidos, en orden de importancia, por *C. capistrata* (37,50 % de las observaciones de depredación), *P. pagrus* (37,50 %), *S. marmoratus* (12,50 %) y *T. pavo* (2,50 %); y los de *D. africanum* por *T. pavo* (66,66 %) y *C. capistrata* (33,33 %) (Figura 6A). El número de especies categorizadas como depredadores truncados fue superior en *D. africanum* (5 especies), con *T. pavo* y *S. lurida* apareciendo con la misma frecuencia de observación (33,33 %), *S. marmoratus*, *P. pagrus* y *C. capistrata* con frecuencias del 11,11 %. Para la especie *P. lividus* únicamente se registraron 2 especies como depredadores truncados, *C. capistrata* (66,66 %) y *S. hispidus* (33,33 %) (Figura 6B). Para ambas especies de erizos se obtuvo el mismo número de especies de peces carroñeros (2 especies), pero éstas difirieron según el equinoideo considerado. *T. pavo* y *S. lurida* fueron carroñeros de juveniles de *P. lividus*, con un porcentaje de observación de 66,66 % y 33,33 % respectivamente, mientras que *S. lurida* (75 %) y *C. capistrata* (25 %) fueron carroñeros de *D. africanum* (Figura 6C).

Los peces que depredaron sobre las dos especies de juveniles de erizos estudiadas fueron *C. capistrata* y *T. pavo*. Sin embargo, sus tallas no variaron según la especie depredada, ni para los ejemplares de *C. capistrata* que depredaron sobre los juveniles, que presentaron siempre la misma talla (7 cm de LT), ni para los ejemplares de *T. pavo*, aunque en este último caso se observó que los individuos de mayor tamaño ($18 \pm 2,81$ cm de LT) depredaron sobre juveniles de *P. lividus* y los de menor tamaño ($13,5 \pm 5,45$ cm de LT) sobre juveniles de *D. africanum*, si bien las diferencias no resultaron significativas ($F= 0,546$; $p= 0,105$) (Figura 7A). Los tiempos de ingestión de las presas fueron significativamente diferentes para *C. capistrata*, que requirió un mayor tiempo para consumir juveniles de *D. africanum* ($52,5 \pm 3,53$ s) que para ingerir juveniles de *P. lividus* ($30 \pm 6,24$ s). En el caso de *T. pavo*, aunque se observó la misma tendencia, registrándose tiempos de ingestión inferiores al consumir juveniles de *P. lividus* ($30 \pm 6,24$ s) frente a juveniles de *D. africanum* ($52,5 \pm 3,53$ s), ésta no resultó significativa, (Figura 7B).

CAPÍTULO 6

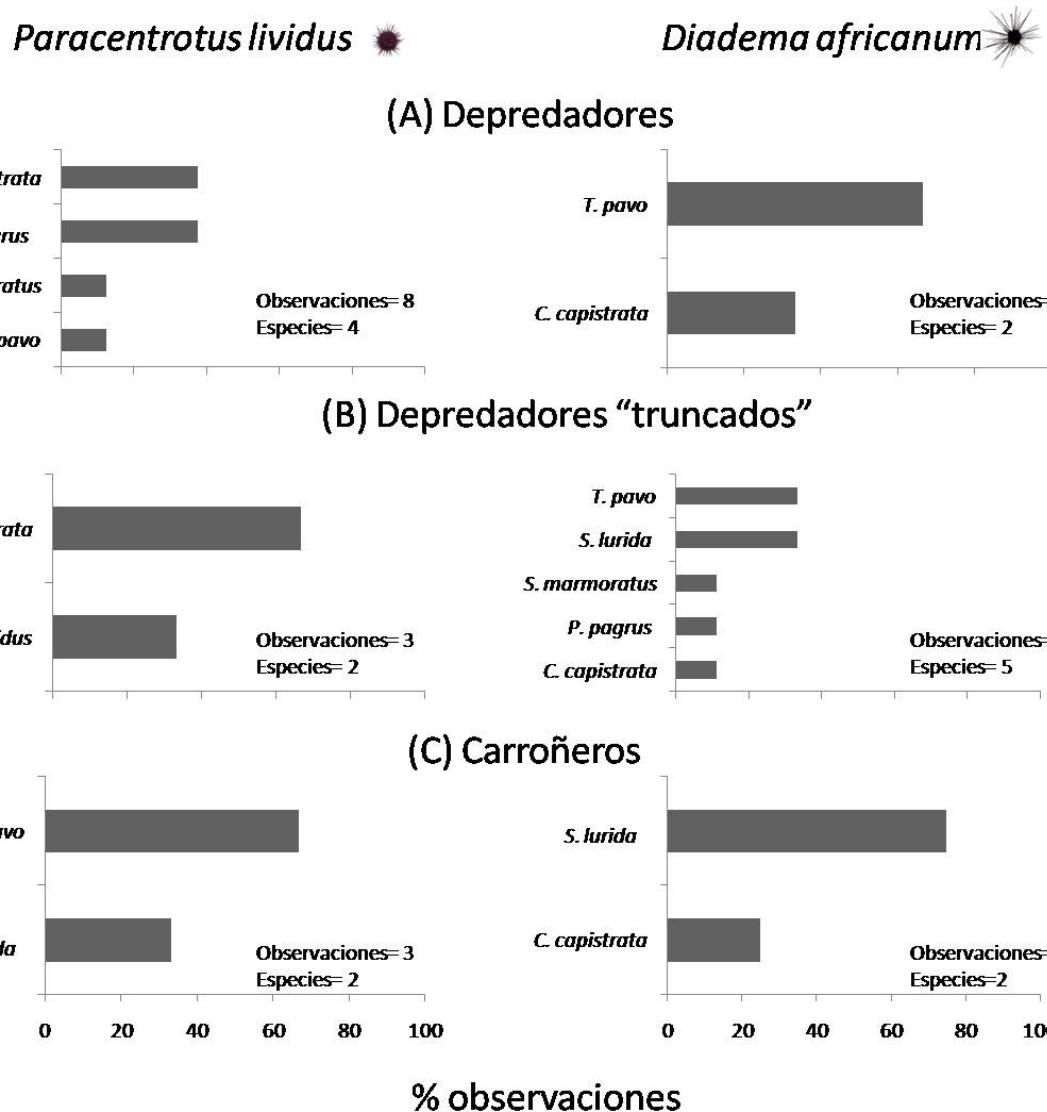


Figura 6. Porcentaje de observación de eventos de depredación sobre juveniles de *Paracentrotus lividus* y de *Diadema africanum* por parte de las distintas especies de peces que A. mordieron y abrieron el caparazón (depredadores), B. intentaron abrir el caparazón sin éxito (depredadores truncados) y C. mordieron un caparazón previamente abierto (carroñeros). Se presenta el número total de observaciones y el número de especies registradas.

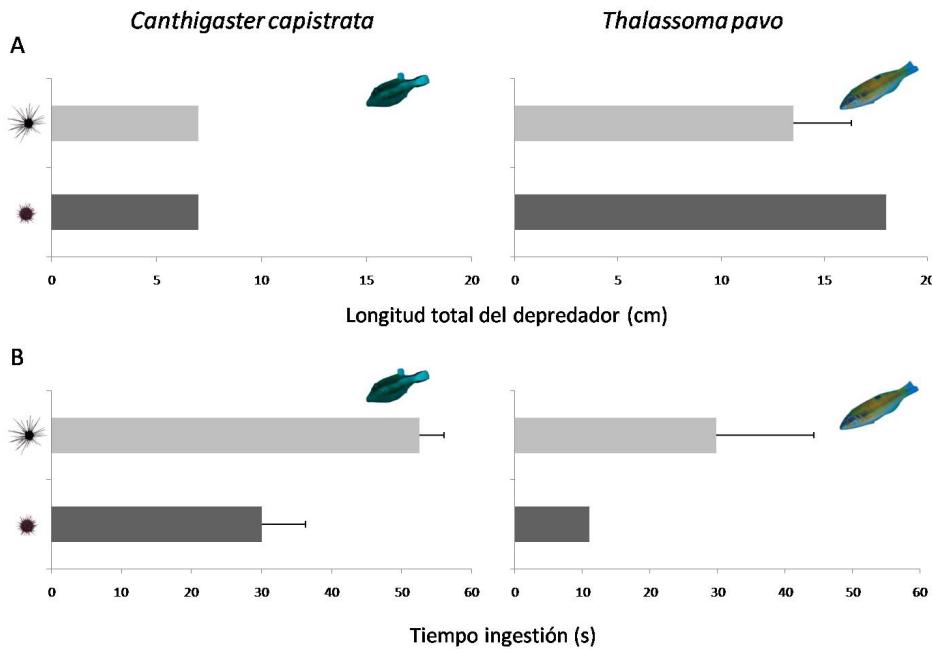


Figura 7. A. Longitud total (media ± DS) de las especies de peces que depredaron sobre los juveniles de *Paracentrotus lividus* y de *Diadema africanum*. B. Tiempo de ingestión (media ± DS) de los juveniles de *P. lividus* y de *D. africanum* registrado para las distintas especies de peces depredadores. De izquierda a derecha: *Canthigaster capistrata* y *Thalassoma pavo*.

5. DISCUSIÓN

En este estudio identificamos, por primera vez, las especies de peces capaces de consumir fases juveniles del erizo de mar *P. lividus*, una especie clave en los sistemas bentónicos de fondos rocosos costeros, mostrando que sólo unas pocas especies son capaces de actuar como depredadores y abrir los caparazones de los erizos de ambas especies estudiadas. Además, se ponen de manifiesto procesos de sustitución funcional de especies depredadoras entre las islas subtropicales del Atlántico oriental y el Mediterráneo, que deben ser considerados a la hora de analizar las implicaciones de los niveles efectivos de depredación para el mantenimiento de la función y organización de los sistemas bentónicos. Se obtuvo una riqueza de especies depredadoras mayor para juveniles de *P. lividus* que de *D. africanum*, lo que pone de manifiesto cómo las diferencias morfológicas interespecíficas de los equinoideos suponen ventajas adaptativas para evitar la depredación frente a determinadas especies de depredadores de hábitos consumidores más específicos.

CAPÍTULO 6

Los depredadores diurnos de juveniles *P. lividus* constituyeron un grupo de seis especies de peces (Figura 8), dominado principalmente por los espáridos *Diplodus sargus* y *Pagrus pagrus*, y por el lábrido *Thalassoma pavo*.

Nuestros experimentos se llevaron a cabo únicamente en zonas sobreexplicadas de bordes de blanquizales de la isla de Tenerife, por lo que es probable que en zonas protegidas, donde las comunidades ícticas están mejor estructuradas (Clemente et al 2011), el número de depredadores de juveniles de *P. lividus* aumente, tal y como se ha visto en otros estudios previos (Sala 1997; Clemente et al 2010). Las especies aquí descritas no coinciden completamente con los depredadores conocidos para el Mediterráneo, donde diversos trabajos citan a *C. julis* y a los espáridos *D. sargus* y *D. vulgaris* como los principales depredadores de juveniles de *P. lividus* (ver Sala 1997; Guidetti 2004; Hereu et al 2004). La composición de especies en las comunidades ícticas varía de forma marcada entre sitios, de forma que incluso dentro del mismo hábitat pueden existir cambios en las especies depredadoras (Sala 1997; Clemente et al 2011; Farina et al 2014). Tal es el caso de Cabrera, donde el principal depredador de juveniles de *P. lividus* fue *T. pavo*, mientras que en otras áreas del Mediterráneo donde la densidad de esta especie es baja (Francour 1991; García-Rubies 1997) fue sustituida por otras especies depredadoras como *D. vulgaris* o *D. sargus* (Sala 1997; Hereu et al 2004; Farina et al 2014).

Sin embargo, existen importantes similitudes entre los resultados de nuestro estudio y otros realizados en comunidades también dominadas por algas calcáreas, como describen Hereu et al (2005), quienes sugieren que, en función de la talla del juvenil y del hábitat en el que se encuentre, las supervivencias de los mismos así como sus depredadores naturales variarán, siendo los juveniles inferiores a 4 mm consumidos principalmente por *C. julis* y los mayores a esta talla principalmente por *D. sargus*. En nuestros resultados observamos que los juveniles entre 4-7 mm fueron principalmente consumidos por *T. pavo*, mientras que los juveniles mayores a 7 mm fueron consumidos por *D. sargus*, de forma análoga a lo que sucede en el Mediterráneo.

Estos hallazgos constituyen un ejemplo más de sustitución funcional de especies asociada a contextos ambientales (Micheli et al 2005; Shears et al 2008; Clemente et al 2011). La sustitución funcional de la especie del lábrido *C. julis*, descrita como depredador de fases tempranas de *P.*



lividus en el Mediterráneo, por *T. pavo* en las islas subtropicales del Atlántico Oriental parece ser consecuencia directa de la baja abundancia natural que presenta *C. julis* en las Canarias occidentales (Falcón et al 1996; Brito et al 2002; Milazzo et al 2011). Esta especie es más abundante en las islas orientales del Archipiélago, de aguas ligeramente más templadas, por lo que cabe esperar que allí *C. julis* sí pueda jugar un papel clave en la depredación de juveniles de *P. lividus* que no se observa en las islas occidentales. De hecho, Herrera (1998) y Llinás et al (1990) encontraron restos de *P. lividus* al estudiar contenidos estomacales de *C. julis*. En este sentido, Clemente et al (2011) ya señalaron la importancia de factores idiosincrásicos que afectan a las comunidades biológicas, y de la variabilidad del contexto ambiental a escalas locales y regionales para determinar la magnitud de las interacciones depredadoras en las comunidades bentónicas. El caso de las diferencias en los depredadores de juveniles de *P. lividus* entre zonas templadas del Mediterráneo y subtropicales del Atlántico constituye, por tanto, un ejemplo claro de estas variaciones en las dinámicas de depredadores-presa, donde la identidad e importancia relativa de los depredadores varía en función de las condiciones ambientales y de la composición de las comunidades biológicas, con potencialidad para afectar tanto a los niveles efectivos de depredación, como a su función relativa en los ecosistemas y, en consecuencia, a la organización de los diferentes sistemas.

Los carroñeros citados hasta ahora para juveniles de *P. lividus* coinciden con los observados en este estudio en *D. sargus* y *T. pavo*, especies ya registradas anteriormente como carroñeros de juveniles de *P. lividus* en el Mediterráneo (Sala 1997; Sala et al 1998a). Sin embargo, en la latitud de Canarias, la presencia y mayor abundancia de especies subtropicales como *C. capistrata*, *P. pagrus* y *S. marmoratus* (Clemente et al 2010) parecen determinar en gran medida su función como carroñeros de juveniles de *P. lividus* y/o como depredadores principales, teniendo una importante función en el control de la poblaciones de *P. lividus* (ver figura 3 y 6). La especie *S. hispidus* también tuvo un papel relevante como carroñero de juveniles de erizos mayores a 7 mm, siendo esta función desconocida hasta el momento.

Nuestros resultados identificaron como depredadores de juveniles de *D. africanum* únicamente a las especies *T. pavo* y *C. capistrata*, resultados que contrastan con los obtenidos por Clemente et al (2010), donde el número de especies registrado fue más alto. Estas diferencias pueden

CAPÍTULO 6

deberse a distintos comportamientos de competencia y/o exclusión entre depredadores, difíciles de controlar en los experimentos, y, principalmente, a la naturaleza de la experimentación, consistente en nuestro caso en experimentos de selección de presas entre *D. africanum* y *P. lividus*, lo que nos permite ver otros patrones de alimentación de las especies en condiciones más realistas de disponibilidad de alimento. En este sentido, Clemente et al (2010) describió a *D. sargus*, junto a *T. pavo*, como el principal depredador de juveniles de *D. africanum*, sin embargo, la primera especie no fue responsable de ninguno de los eventos de depredación observados en nuestros experimentos. Las especies de peces obtenidas como carroñeros de *D. africanum* siguen las propuestas en estudios previos (Clemente et al, 2010), incluyendo *S. lurida*, *C. capistrata* y *T. pavo* principalmente, quienes se benefician de los restos que dejan los depredadores principales, aunque también algunas presentan capacidades para depredar de forma directa, como es el caso de *T. pavo* y *C. capistrata*.

Las supervivencias en los experimentos *in situ*, tanto en el experimento de juveniles de *P. lividus* como en el de prioridad de presas, fueron altas, similares a las encontradas para *P. lividus* en zonas de no protegidas del Mediterráneo dominadas por algas calcáreas (Sala 1996; Hereu et al 2005), a las de *Echinometra mathaei* en sistemas tropicales (McClanahan 1998) y a las de *D. africanum* (Clemente et al 2007; 2010) en estudios previos en blanquizales sin ningún tipo de protección de las islas Canarias. Sin embargo, tal y como sugieren otros autores, estas supervivencias podrían estar sobreestimadas, pues en el presente estudio se evaluaron en un corto periodo de tiempo (20 minutos), y la presión por otros microdepredadores posiblemente sea causa de una mortalidad adicional que se produce en un periodo mayor de tiempo (Sala & Zabala 1996; Hereu et al 2004, 2005). Por otra parte, depredadores de hábitos nocturnos pueden ejercer un control adicional sobre las poblaciones, como ocurre con el asteroideo *Marthasterias glacialis* sobre *P. lividus* (Clemente 2007), que presenta su mayor actividad depredadora durante la noche (Dance & Savy 1987), o con depredadores de *D. africanum* como *Chylomycterus reticulatus* (Brito & Falcón 1990; Brito et al 2002) y las langostas (*Panulirus echinatuss* y *Scyllarides latus*) que presentan patrones de actividad nocturnos.

Nuestros resultados no demuestran una prioridad de presas entre juveniles de las dos especies de erizos de mar analizadas (Figura 9), pero sí es de destacar el mayor número de especies registradas



que depredaron sobre juveniles de *P. lividus* (4 especies) frente a aquellas que depredaron sobre *D. africanum* (2 especies) bajo un similar número de observaciones. Así, se pone de manifiesto cómo las diferencias morfológicas entre las dos especies de erizos estudiadas, suponen ventajas adaptativas frente a determinadas especies de depredadores. *P. lividus* se caracteriza por un caparazón más robusto pero dotada de púas mucho más cortas y lisas que *D. africanum*. Por lo tanto, ciertos depredadores muestran hábitos consumidores más específicos y habilidades para ejercer una depredación determinada en relación a caracteres morfológicos específicos de las presas. También es llamativo la mayor cantidad de especies de depredadores truncados para juveniles de *D. africanum*, mostrada ya en estudios previos (Clemente 2007; Clemente et al 2010), que en el caso de juveniles de *P. lividus*, probablemente debido también a la existencia de estructuras más eficientes para evitar la depredación por parte de los juveniles de *D. africanum*. Otros estudios sí han observado una clara prioridad de presas de juveniles de *P. lividus* frente a los de *Arbacia lixula*, bien mediante métodos de observaciones directas (Guidetti 2004) o mediante el estudio de contenidos estomacales (Guidetti 2006). Aunque los resultados de nuestro estudio no fueron tan claros en términos de supervivencia relativa, la comparación entre la riqueza de especies depredadoras para ambas especies, los menores tiempos de ingestión de *P. lividus* frente a *D. africanum* como consecuencia de su anatomía externa, y el hecho de que las especies ícticas identificadas como depredadores de *P. lividus* sean más abundantes en blanquizales que aquellas identificadas como depredadores de juveniles de *D. africanum* (Clemente et al 2010), apuntan a que la falta de una prioridad significativa de depredación entre ambas especies se debe al bajo número de observaciones registradas.

Algunos autores sugieren que ciertas épocas del año, como el verano, se caracterizan por una mayor actividad depredadora que los meses de invierno (Heck & Valentine 1995; Sala & Zabala 1996; Vanderklift et al 2007), estación en la que se realizaron los experimentos *in situ* de este capítulo. Esto es lógico teniendo en cuenta la alta estacionalidad y variabilidad temporal que experimentan las comunidades ícticas. Sin embargo, dado el patrón anual característico del ciclo de vida de los equinoideos en aguas canarias, con épocas de asentamiento en octubre-diciembre para el caso de *D. africanum* (Hernández et al 2010) y en agosto-noviembre para *P. lividus* (Girard et al 2008), en la época de verano los juveniles presentarán tallas mayores y serán menos susceptibles a los depredadores pudiendo actuar sobre ellos sólo aquellos depredadores capaces de consumir tallas superiores a los 7 mm, pues han alcanzado una talla refugio frente a la depredación por parte de peces especializados en consumir juveniles de tallas menores.



Figura 8. Imágenes extraídas de los videos de los experimentos de depredación de juveniles de *Paracentrotus lividus*. Se muestran los principales depredadores de juveniles de *P. lividus* que depredaron sobre las dos clases de tallas del erizo en blanquizales de la isla de Tenerife. De izquierda a derecha, *Diplodus sargus*, *Thalassoma pavo*, *Pagrus pagrus*, *Stephanolepis hispidus*, *Sphoeroides marmoratus* y *Spantisoma cretense*.

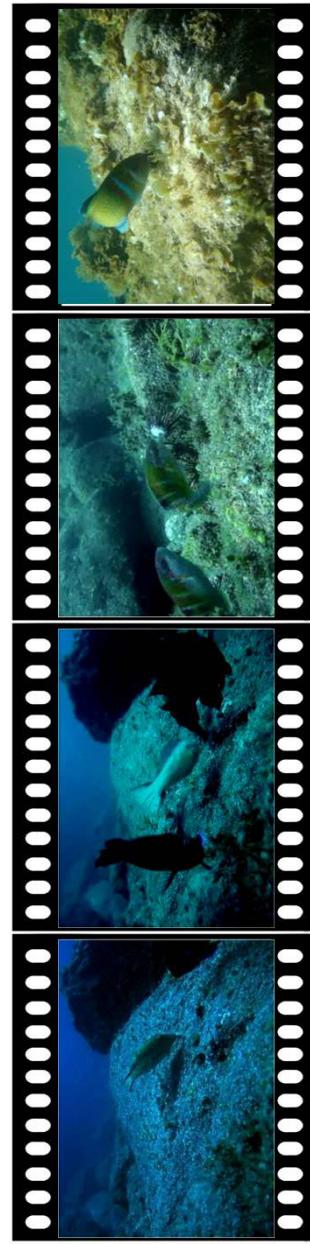


Figura 9. Secuencia de imágenes extraídas de los videos de los experimentos de prioridad de presas. Se muestran los principales depredadores que consumieron juveniles de las dos especies de erizos estudiadas, *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum*, al ser ofrecidos simultáneamente. De izquierda a derecha, *Canthigaster capistrata* (consumiendo *P. lividus*), *C. capistrata* (consumiendo *D. africanum*), *Thalassoma pavo* (consumiendo *D. africanum*) y *T. pavo* (consumiendo *P. lividus*).



La mayoría de los juveniles de erizos, incluidos *P. lividus* y *D. africanum*, se protegen de los depredadores en refugios del sustrato tales como grietas, oquedades y bajo piedras debido a su alta vulnerabilidad a ser consumidos. Así, los juveniles permanecen la mayor parte del tiempo refugiados durante el día (Tuya et al 2004b; Clemente et al 2007; Sala 1997; Hereu et al 2005), hasta que alcanzan una talla en la que son ya menos vulnerables. Estudios de Hernández (2006) han mostrado una clara relación positiva entre el número de reclutas de *D. africanum* y la complejidad del sustrato, posiblemente debido al refugio que presta a las fases tempranas de la especie. También estudios recientes de Kintzing & Bulter (2014) ponen de manifiesto la importancia del refugio y de las pistas químicas de sus depredadores y congéneres de *D. antillarum*, encontrando agregaciones entre individuos en zonas de refugio cuando el índice de depredación es alto, aunque esto suponga una mayor competencia intraespecífica cuando las densidades de depredadores disminuyen. Por lo tanto, no sólo los depredadores naturales determinan la abundancia de juveniles, otros factores como la disponibilidad de refugio son factores a tener en cuenta (Sala et al 1998b), ya que pueden determinar los rangos de depredación (Roberts & Ormond 1987; Hixon & Beets 1993; Beck 1995; Clemente et al 2007). Es probable que los factores anteriores determinen las diferencias significativas que encontramos en los niveles de depredación de ambas especies entre las localidades de estudio, siendo importante considerar tanto variables bióticas como abióticas relacionadas con las características del hábitat para interpretar de forma correcta las complejas relaciones depredador-presa y los niveles efectivos de depredación. La utilización de refugios decrece con el incremento de la talla porque los juveniles de erizos son más vulnerables a la depredación por peces que erizos de gran tamaño (Sala & Zabala 1996; Shears & Babcock 2002; Clemente et al 2007). Por todo lo anterior, son necesarios estudios futuros que se centren en la depredación de juveniles en otro tipo de hábitats, en los depredadores nocturnos y en las condiciones de cambio climático previstas para escenario futuros. De forma trasversal, la acidificación de los océanos podría también afectar a la depredación incrementando la vulnerabilidad de los juveniles de erizos, como ya apuntan algunos estudios recientes (Asnagui et al 2013a, b; Rodríguez et al enviado), y a su vez el calentamiento global favorecerá la llegada de nuevas especies de afinidades tropicales que pueden estar más especializadas en la depredación de los equinoideos. En este contexto, el conocimiento de los depredadores naturales de las fases más vulnerables de los erizos de mar, como son las fases juveniles, así como de los patrones de selección de presas en

CAPÍTULO 6

condiciones naturales, resultan primordiales para predecir el alcance de cualquier cambio futuro en las comunidades biológicas y sus implicaciones en los niveles efectivos de depredación para el mantenimiento de la adecuada función y organización de los sistemas bentónicos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson MJ** (2004). PERMANOVA 2factor: a FORTRAN computer program for permutational multivariate analysis of variance using permutation tests. University of Auckland, Auckland:35 pp.
- Anderson MJ**, Robinson J (2003). Generalized discriminant analysis based on distances. *Aust NZ J Statist*, 45:301-318.
- Asnaghi V**, Chiantore M, Mangialajo L, Gazeau F, Francour P, Alliouane S, Gatusso JP (2013a). Cascading Effects of Ocean Acidification in a Rocky Subtidal Community. *PLoS ONE* 8(4): e61978. doi:10.1371/journal.pone.0061978
- Asnaghi V**, Mangialajo L, Gatusso JP, Francour P, Privitera D, Chiantore M (2013b). Effects of ocean acidification and diet on thickness and carbonate elemental composition of the test of juvenile sea urchins. *Mar Env Res*, 93:78-84.
- Beck MW** (1995). Size-specific shelter limitation in stone crabs: a test of the demographic bottleneck hypothesis. *Ecology*, 76:968-980.
- Bonaviri C**, Gianguzza P, Pipitone C, Hereu B (2012). Micropredation on sea urchins as a potential stabilizing process for rocky reefs. *J Sea Res*, 73:18-23.
- Brito A**, Falcón JM (1990). Contribución al conocimiento de la distribución y ecología de *Chilomycterus atringa* (pires, Diodontidae) en las Islas Canarias. *Vieraea*, 19:271-275.
- Brito A**, Pascual JP, Falcón JM, Sancho A, González-Lorenzo G (2002). Peces de las islas Canarias. Catálogo comentado e ilustrado. Francisco Lemus Editor. La Laguna, 419 pp.
- Carpenter RC** (1981). Grazing by *Diadema antillarum* (Philippi) and its effects on the benthic algal community. *J Mar Res*, 39(4):749-765.
- Clemente S** (2007). Evolución de las poblaciones del erizo *Diadema aff. antillarum* en Canarias y valoración de la depredación como factor de control. PhD Thesis, Universidad de La Laguna. 433pp.
- Clemente S**, Hernández JC, Toledo K, Brito A (2007). Predation upon *Diadema aff. antillarum* in barren grounds



in the Canary Islands. *Sci Mar*, 71(4):745-754.

Clemente S, Hernández JC, Rodríguez A, Brito A (2010). Identifying keystone predators and the importance of preserving functional diversity in sublittoral rocky-bottom areas. *Mar Ecol Prog Ser*, 413:55-67.

Clemente S, Hernández JC, Brito A (2011). Cotext-dependent effects of marine protected areas on predatory interactions. *Mar Ecol Prog Ser*, 437:119-133.

Dance C, Savy S (1987). Predation on *Paracentrotus lividus* by *Marthasterias glacialis*: an in-situ experiment at Port-Cros (France, Mediterranean). *Posidonia Newsletter*, 1: 35-41.

Duffy JE, Hay ME (2001). The ecology and evolution of marine consumer-prey interactions. In: Bertness MD, Gaines SD, Hay ME (eds) Marine community ecology. Sinauer, Sunderland, Mass, pp 131–157.

Fagerli CW, Norderhaug KM, Christie H, Pendersen MF, Fredriksen S (2014). Predators of the destructive sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* on the Norwegian coast. *Mar Ecol Prog Ser*, 502:207-218.

Falcón JM, Bortone SA, Brito A, Bundrick CM (1996). Structure of and relationships within and between the littoral, rock-substrate fish communities off four islands in the Canarian Archipelago. *Mar Biol*, 125:215-231.

Farina S, Arthur R, Pagès JF, Prado P, Romero J, Vergés A, Hyndes G, Heck K, Sybil G, Acoverro T (2014). Differences in predator composition alter the direction of structure-mediated predation risk in macrohypoth communities. *Oikos*, 123:1311-1322.

Francour P (1991). The effect of protection level on coastal fish community at Scandola, Corsica. *Rev Ecol (Terre Vie)*, 46:65–81.

Garcia-Rubies A (1996). Estudi ecològic de les poblacions de peixos sobre substrat rocós a la Mediterrània Occidental: Efecte de la fondària, el substrat, l'estacionalitat i la protecció. PhD Thesis, Univ. Barcelona.

Girard D, Herrero A, Mora J, Hernández JC, Brito A, González N, Catoire JL (2008). Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) in its southern population limit (Canary Islands eastern Atlantic). *Gulf Mex Sci*, 26: 149.

Gosselin LA, Qian PY (1996). Juvenile mortality in benthic marine invertebrates. *Mar Ecol Progr Ser*, 146:265-282.

Guidetti P (2004). Consumer of sea urchins, *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* in shallow Mediterranean rocky reefs. *Helgol Mar Res*, 58:110-116.

Guidetti P (2006). Estimatin body size of sea urchins, *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*, from stomach contents of *Diplodus sargus*, a Mediterranean predatory fish. *J Appl Ichthyol*, 22:91-93.

Guidetti P, Mori M (2005). Morpho-functional defenses of Mediterranean sea urchins, *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*, against fish predators. *Mar Biol*, 147:797-802.

CAPÍTULO 6

Guidetti P, Dulčić J (2007). Relationships among predatory fish, sea urchins and barrens in Mediterranean rocky reefs across a latitudinal gradient. *Mar Environ Res*, 36:168-184.

Guidetti P, Fraschetti S, Terlizzi A, Boeri F (2003). Distribution patterns of sea urchins and barrens in shallow Mediterranean rocky reefs by the illegal fishery of the rocky-boring mollusk *Lithophaga lipophaga*. *Mar Biol*, 143:1135-1142.

Hairson NG, Smith FE, Slobodkin LB (1960). Community structure population control and competition. *Am Nat*, 94:421-425.

Heck KL, Valentine JF (1995). Sea-urchin herbivory, evidence for long-lasting effects in subtropical seagrass meadows. *J Exp Mar Biol Ecol*, 189: 205-217.

Hereu B, Zabala M, Linares C, Sala E (2004). Temporal and spatial variability in settlement of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in the NW Mediterranean. *Mar Biol*, 144:1011-1018.

Hereu B, Zabala M, Linares C, Sala E (2005). The effects of predator abundance and habitat structural complexity on survival of juvenile sea urchins. *Mar Biol*, 146:293-299.

Hereu B, Zamala M, Sala E (2009). Multiple controls of community structure and dynamics in a sublittoral marine environment. *Ecology*, 89(12):3423-3435.

Hernández JC, Brito A, Cubero E, García N, Girard D, González-Lorenzo G, Falcón JM (2006). Temporal patterns of larval settlement of *Diadema antillarum* (Echinodermata: Echinoidea) in the Canary Islands using an experimental larval collector. *Bull Mar Sci*, 78 (2): 271-279.

Hernández JC, Clemente S, Sangil C, Brito A (2008). The key role of the sea urchin *Diadema* aff. *antillarum* in controlling macroalgae assemblages throughout the Canary Islands (eastern subtropical Atlantic): a spatio-temporal approach. *Mar Environ Res* 66:259–270.

Hernández JC, Clemente S, Girard D, Pérez-Ruzafa A, Brito A (2010). Effect of temperature on settlement and postsettlement survival in a barrens-forming sea urchin. *Mar Ecol Prog Ser*, 413:69-80.

Hernández JC, Clemente S, Tuya F, Pérez-Ruzafa A, Sangil C, Moro-Abad L and Bacallado-Aránega JJ (2013). Echinoderms of the Canary Islands, Spain IN: "Echinoderm Research and Diversity in Latin America" Eds: Alvarado J.A, Solís-Marín F. Springer Heidelberg New York Dordrecht London. ISBN 978-3-642-20020-2.

Herrera R (1998). Dinámica de las comunidades bentónicas de los arrecifes artificiales de Arguineguín (Gran Canaria) y Lanzarote. PhD Thesis. Universidad de La Laguna, 355pp.

Highsmith RC (1982). Induced settlement and metamorphosis of sand dollar (*Dendraster excentricus*) larvae in predator-free sites: adult sand dollar beds. *Ecology*, 51:1046-1051.



Hixon MA, Beets JP (1993). Predation, prey refuges, and the structure of coral-reef fish assemblages. *Ecol Monogr*, 63:77-101.

Hunt HL, Scheibling RE (1997). The role of early post-settlement mortality in recruitment of benthic marine invertebrates. *Mar Ecol Prog Ser*, 55:269-301.

Kintzing MD, Butler MJ (2014). The influence of shelter, conspecifics, and threat of predation on the behavior of the long-spines sea urchins (*Diadema antillarum*). *J Shellfish Res*, 33(3):781-785.

Llinás OE, Moreno E, Rueda MJ (1990). Estudio de la participación de los vegetales en la dieta de la vieja *Sparisoma cretense* (L, 1758). *Homenaje al Prof. Dr. Telesforo Bravo*, I:509-516.

Lopez S, Turon X, Montero E, Palacin C, Duarte CM, Tarjuelo I (1998). Larval abundance, recruitment and early mortality in *Paracentrotus lividus* (Echinoidea). Interannual variability and plankton-benthos coupling. *Mar Ecol Prog Ser*, 172:239-251.

McClanahan TR (1995). Fish predator and scavengers of the sea urchin *Echinometra mathaei* in Kenyan coral-reef marine parks. *Environ Biol Fish*, 43:187-193.

McClanahan TR (1998). Predation and the distribution and abundance of tropical sea urchin populations. *J Exp Mar Biol Ecol*, 221: 231-255.

McClanahan TR (2000). Coral reef use and conservation. IN: McLanahan TR, Sheppard CRC, Obura CO (eds). Coral reef of the Indian Ocean. Their ecology and conservation, pp.39-80. Oxford University Press. New York.

McClanahan TR, Muthiga NA (1989). Patterns of predation on a sea urchin, *Echinometra mathaei* (de Blainville), on Kenyan coral reefs. *J Exp Mar Biol Ecol*, 126:77-94.

McClanahan TR, Shafir SH (1990). Causes and consequences of sea urchins abundance and diversity in Kenyan coral reef lagoons. *Oecologia*, 83:362-370.

Menge, BA (2000). Top - down and bottom -up community regulation in marine rocky intertidal habitats. *J Exp Mar Biol Eco*, 250: 257- 289.

Micheli F, Benedetti-Cecchi L, Gambaccini S, Bertocci I, Borsini C, Osio GC, Romano F (2005). Cascading human impacts, marine protected areas, and the structure of Mediterranean rocky-reef assemblages. *Ecol Monogr*, 75: 81-102.

Milazzo M, Palmeri A, Falcón JM, Badalamenti F, García-Charton JA, Sinopoli M, Chemello R, Brito A. Vertical distribution of two sympatric labrid fishes in the Western Mediterranean and Eastern Atlantic rocky subtidal: local shore topography does matter (2011). *Mar Ecol*, 32:521-531.

CAPÍTULO 6

Pinnegar JK, Polunin NVC, Francour P, Badalamenti F, Chemello ML, Harmelin-Vivien ML, Hereu B, Milazzo M, Zabala M, D'Anna G, Pipitone C (2000). Trophic cascades in benthic marine ecosystems: lessons for fisheries and protected-area management. *Environ Conserv*, 27:179-200.

Roberts CM, Ormond RFG (1987). Habitat complexity and coral reef fish diversity and abundance on Red Sea fishing reefs. *Mar Ecol Prog Ser*, 41:1-8.

Sala E (1996). The role of fishes in the organization of a Mediterranean subtidal community. PhD Thesis. Université d'Aix-Marseille II, France. 180pp.

Sala E (1997). Fish predators and scavengers of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in protected areas of the north-west Mediterranean Sea. *Mar Biol*, 129:531-539.

Sala E, Zabala M (1996). Fish predation and the structure of sea urchin *Paracentrotus lividus* populations in the NW Mediterranean. *Mar Ecol Prog Ser*, 140:71-81.

Sala E, Ribes M, Hereu B, Zabala M, Alva V, Coma R, Garrabou J (1998a). Temporal variability in abundance of the sea urchins *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* in the northwestern Mediterranean: comparison between a marine reserve and an unprotected area. *Mar Ecol Prog Ser*, 168:135-145.

Sala E, Boudouresque CF, Harmelin-Vivien M (1998b). Fishing, trophic cascades, and the structure of algal assemblages: evaluation of an old but untested paradigm. *Oikos*, 82:425-439.

Scheibling RE, Hamm J (1991). Interactions between sea urchins (*Strongylocentrotus droebachensis*) and their predator in field and laboratory experiments. *Mar Biol*, 110:105-116.

Shears NT, Babcock R (2002). Marine reserves demonstrate top-down controls of community structure on temperate reefs. *Oecologia*, 132:131-142.

Shears NT, Babcock RC, Salomon AK (2008). Context-dependent effects of fishing: variation in trophic cascades across environmental gradients. *Ecol Appl*, 18:1860-1873.

Tegner MJ, Dayton PK (1981). Population structure, recruitment and mortality of two sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus* and *S. purpuratus*) in a kelp forest. *Mar Ecol Prog Ser*, 5: 255-268.

Tuya F, Boyra A, Sánchez-Jérez P, Barbera C, Haroun R (2004a). Relationships between rocky-reef fish assemblages, the sea urchin *Diadema antillarum* and macroalgae throughout the Canarian Archipelago. *Mar Ecol Prog Ser*, 278:157-169.

Tuya F, Martín JA, Luque A (2004b). Patterns of nocturnal movement of the long-spined sea urchin *Diadema antillarum* (Philippi) in Gran Canaria (the Canary Islands, central East Atlantic Ocean). *Helgoland Mar Res*, 58:1-26.



Vanderklift MA, How J, Wernberg T, MacArthur LD, Heck KL, Valentine JF (2007). Proximity to reef influences density of small predatory fishes, while type of seagrass influences intensity of their predation on crabs. *Mar Ecol Prog Ser*, 340:235 -243.

Verlaque M (1987). Contribution à l'étude du phytobenthos d'un écosystème photophile thermophile marin en Méditerranée occidentale. PhD Thesis, Université d'Aix-Marseille II, France

Vukovic A (1982). Florofaunistic changes in the infralitoral zone after the sea urchin *Paracentrotus lividus* (L.) population explosion. *Acta Adriat*, 23:237-241.

Capítulo 7

“The effects of ocean acidification on predation of *Paracentrotus lividus* and *Diadema africanum* in urchin barrens off the Canary Islands”



Rodríguez A, Hernández JC, Brito A & Clemente S. The effects of ocean acidification on predation of *Paracentrotus lividus* and *Diadema africanum* juveniles in urchin barrens off the Canary Islands. *Mar Biol* (submitted).

ÍNDICE

1. ABSTRACT	225
2. INTRODUCTION	226
3. MATERIAL AND METHODS	50
3.1. Experimental set up	227
3.2. Predation experiments	228
3.3. External structure (spines, test, plate thickness and robustness)	229
4. RESULTS	232
4.1. Laboratory experiments	232
4.2. Predation experiments	232
4.3. External structure	239
5. DISCUSSION	243
6. REFERENCES	246



1. ABSTRACT

Increasing CO₂ concentration in the atmosphere during the last decades has led to a significant decrease in ocean pH. A decrease of 0.4 pH units is predicted for the end of the century. Organisms that need carbonate to build their calcareous skeletons could be severely affected, as a consequence of the high solubility of CaCO₃. Sea urchin growth, or calcification rates, could be reduced. Many studies about the effects of ocean acidification have been conducted on larval stages of sea urchins, however only a few have focused on juvenile forms. In this study, we focused on the effects of ocean acidification on juveniles of the sea urchins *Paracentrotus lividus* and *Diadema africanum*, combining both laboratory and field experiments. We assessed the physical effects of decreased pH on two external skeletal structures, spines and test, and their implications in the species performance to avoid predation events in the field. Juveniles of both studied species were exposed for 100 days to two treatments of pH: a control pH of 8.1 units and an acidic pH of 7.6. After this period, the external structures and vulnerability to predation were evaluated in each treatment. Our results showed that altering the pH of the seawater induced changes in spines shape, as well as in the robustness and thickness of sea urchin tests, in both species. *D. africanum* juveniles incubated in the acid treatment were also more heavily predated than those kept in the control treatment. No difference in predation rate was observed between treatments in *P. lividus*. This led us to conclude that *D. africanum* may be more sensitive to the indirect effects of ocean acidification on predator avoidance than *P. lividus*.

CAPÍTULO 7

2. INTRODUCTION

In recent decades there has been increase in CO₂ levels in the atmosphere. This increase in atmospheric CO₂, caused mainly by human emissions, has led to global modification of the seawater carbonate system, and has caused a decrease in ocean pH of up to 0.1 between the years 1750 and 2000 (Gatusso & Hansson 2011). It is predicted that there will be a further decrease of ~0.4 pH units before the end of the century (IPCC 2013). By the end of the 23rd century, there may have been a decrease of ~0.7 units (Caldeira & Wicket 2003; Orr et al 2005). When the concentration of CO₂ is raised in seawater, it changes the equilibrium between bicarbonate and carbonate ions, and increases the concentration of hydrogen ions in the water. The acidic environment then causes an increase in the dissolution rate of deposited calcium carbonates. Organisms that need carbonate to build their calcareous shells and skeletons, such as corals, sea urchins, and gastropods, are well known to be particularly sensitive to acidic conditions (Gatusso et al. 1999; Kleypas & Langdon 2003; Anthony et al 2008; Andersson et al 2011). Seawater with increased acidity has been found to limit growth and calcification rates of many organisms (Asnaghi et al 2013a; Courtney et al 2013; Wolfe et al 2013).

Sea urchins are the most studied invertebrate models in the field of ocean acidification research. In recent years, an increasing number of studies have investigated the effects of ocean acidification on sea urchin species (see Dupont & Thorndyke 2013). However, most existing studies have focused their research on the effects on larval stages of echinoderms (e.g. Dupont et al 2010b, 2011, 2012; Byrne 2012; Byrne et al 2013; Cohen-Rengifo et al 2013). There is still a scarcity of research on juvenile stages; with only 8 papers to date published about the effects of ocean acidification on juvenile sea urchins (see Shirayama & Thornton 2005; Byrne et al 2011; Albright et al 2012; Dupont et al 2012; Asnaghi et al 2013a, b; Wolfe et al 2013; Byrne et al 2014). Adult sea urchin sensitivity to ocean acidification has also been reported, in records collected both *in situ*, in naturally acidified areas (Hall-Spencer et al 2008; Calosi et al 2013; Uthicke et al 2013; Bray et al 2014; Collard et al 2015), and in laboratory experiments (Kurihara et al 2013; Courtney et al 2013; Hazan et al 2014; Moulin et al 2015; Collard et al 2015).



Juveniles of sea urchins are thought to be highly susceptible to ocean acidification (Shirayama & Thornton 2005; Byrne 2011; Albright et al 2012; Dupont et al 2012; Asnaghi et al 2013a, b; Wolfe et al 2013; Byrne et al 2014) due to the high growth rates at this stage of their life cycle. Growth and calcification are both processes that are affected by changes in water pH. It is thought that the external structure, and skeletal mineralogy of spines and tests, can be modified by acidification (Bray et al 2014). These changes in skeletal structure and composition can increase the vulnerability of certain echinoids to predation; potentially leading to a decrease in the abundance of species that play key roles in maintaining ecosystem structure (Hernández et al 2008). Ocean acidification can therefore have indirect effects on the whole ecosystem (Shirayama & Thornton 2005; Asnaghi et al 2013a, b).

We aimed to address the gap in knowledge about the effects of climate change on juvenile stages of echinoids, and the potential indirect influence on key trophic relationships within benthic food webs. We focused our study on juvenile stages of two key sea urchin species, *Diadema africanum* and *Paracentrotus lividus*, which are the most important sea urchins in rocky habitats off the Canary Islands (Hernández et al 2013). The effects of ocean acidification on juvenile *D. africanum* and *P. lividus* have not been investigated before, except in one single study carried out in the Mediterranean Sea. In that study, Asnaghi et al (2013b) found a direct relationship between acidification, growth, vulnerability to predation (test robustness), and fitness in juvenile *P. lividus*. Our study is the first, to our knowledge, that combines laboratory and field experiments and investigates the effects of ocean acidification on juvenile sea urchins. Our specific aims were to: 1) determine whether predation pressure differed between groups of juvenile sea urchins exposed to two different levels of pH, in their natural environment; 2) assess differences in the external physical structure of the sea urchins between groups of sea urchins incubated at different seawater pH levels in the laboratory; and 3) elucidate how these morphological changes, driven by ocean acidification, effects the two species' predator avoidance abilities in the field.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1. Experimental set up

Juveniles of the sea urchins *Paracentrotus lividus* and *Diadema africanum* (4-11 mm in test diameter) were collected by scuba diving at two localities around Tenerife Island: La Caleta ($28^{\circ} 16' 20.33''$ N, $16^{\circ} 23' 4.43''$ W) for *P. lividus* collections in October 2012, and Abades ($28^{\circ} 8' 31.05''$ N, $16^{\circ} 26' 12.49''$ W) for *D. africanum* in September 2012. Both localities are known to experience high recruitment of the two species during September and October (Hernández et al 2010; Girard et al 2008). Juveniles were measured with calipers on collection (± 0.10 mm), and then kept in the laboratory for 10 days acclimatization period. During this time, sea urchins were fed with a mixture of *Ulva compressa* and *Dictyota sp*, highly palatable algal species. To mark the start of the experiment, 200 juveniles of each species were divided between two different pH treatments: half were incubated in current environmental pH conditions (pH= 8.1, control treatment), and the other half at a lower pH to represent the future predicted scenario (pH= 7.6, acid treatment). The system consisted of two 130 l tanks, one the control (pH= 8.1), and the other the acid treatment (pH= 7.6). In the acid treatment, seawater pH was maintained with a computerized system (AquaMedic), that regulated pH by bubbling pure CO₂ directly into the water, to a resolution of 0 ± 0.01 pH units. The temperature was kept constant using thermostat coolers (ECHEIM AQUATIC, 50W). The same seawater conditions were maintained at a constant level in each tank until the end of the experiment, with a duration of 100 days. Every 15 days throughout the experiment, the water was completely replaced with fresh filtered and sterilized seawater. Salinity, temperature and pH were measured three times per week, using a temperature salinometer and pH sensors. The pH console was calibrated on a weekly basis, with three standards (NBS scale). Seawater total alkalinity (TA) was measured by titration in each treatment on three separate occasions over the course of the experiment. Other seawater carbonate chemistry parameters (*pCO₂*, calcite saturation state (Ω_c) and aragonite saturation state (Ω_a)) were calculated from TA and pH results, using CO2sys software (Lewis & Wallace 1998). Calculations for *pCO₂*, Ω_c and Ω_a , were based on a set of constants K1 and K2 from Mehrbach et al (1973), refitted by Dickson & Millero (1987). During the experiment, all sea urchins were fed *ad libitum* with a mix of *U. compressa* and *Dictyota sp*.



At the end of the experiment, the survival of each species was compared between pH treatments by means of a two-way permutational ANOVA (Anderson 2004), in which ‘pH treatment’ and ‘species’ were fixed factors, using Euclidean distances of raw data.

3.2. Predation experiments

At the end of the initial 100 day experiment, a subset of 36 *P. lividus* and 36 *D. africanum* (18 from each pH treatment), were transported back to their natural environment for *in situ* predation experiments. Two localities were selected, along the southern coast of Tenerife, Abades and Boca Cangrejo ($28^{\circ} 24' 24.25''$ N, $16^{\circ} 18' 44.99''$ W). Both localities were chosen due to the high abundance of juvenile urchins already in barren ground habitats in the vicinity, with test diameters (TD) <10 mm (Clemente et al 2007). At each locality, six replicates of six sea urchins (3 from the control treatment, and 3 from the acid treatment) were set up in exposed rocky bottom habitats (modified from Hereu et al 2005; Clemente et al 2010). All individuals were placed in a natural position, with the oral side facing the rocky substratum, at a depth from 4-12 m. The TDs of the juvenile sea urchins were measured with calipers at the start of the predation experiment.

Daytime observations of predation events were made while SCUBA diving, between January 2013 and February 2013. After initial introduction to the reef, all sea urchins were given ~ 3 min to adapt to the field conditions, and firmly attach the substratum. Submarine video camera was then used to film all potential instances of predation on individuals for 20 minutes. Recordings were later visualized in the laboratory for data extraction. Predators were divided into 3 consumer categories (McClanahan 1995; Clemente et al 2010): (1) Predator guild (species that can break open the sea urchin test); (2) attempted predators (species that bite but fail to open the test); or (3) scavenger guild (species that bite an already opened test). We recorded the length of time survived for each individual sea urchin (± 1 s), the number of predation observations, the species of predator, size of predator (± 2 cm), and time of ingestion (± 1 s). The size of predators was estimated from a small rule that was placed in the experimental site as a reference during recordings. The survival of juveniles in the field was compared between treatments, species and localities using a three way-permutational ANOVA, with Euclidean

distances of raw data and 4999 permutations of the appropriate exchangeable units (Anderson 2004). In this model, we used the fixed factors ‘species’ (2 levels: *P. lividus* and *D. africanum*) and ‘treatment’ (2 levels: acid and control), and the random factor ‘locality’ (2 levels: Abades and Boca Cangrejo). When necessary, pairwise *a posteriori* comparisons were executed using permutations (Anderson 2004). Whenever there were not enough possible permutations to obtain a reasonable test, corrected p-values were obtained through Monte Carlo random draws from asymptotic permutation distribution (Anderson & Robinson 2003). The percentages, descriptive statistics for each category of predator, sizes of predators, and ingestion times, were calculated using SPSS 18.0. Where enough data had been obtained, the size and ingestion times of different predators were compared between pH treatments using 1-way permutational ANOVAs with ‘treatment’ (2 levels: acid and control) as a fixed factor.

3.3. External structure (spines, test plate thickness and robustness)

A subset of 10 *P. lividus* and 10 *D. africanum* (5 individuals of each species per pH treatment) were dissected and cleaned with 10% sodium hypochlorite for 2 min, to remove organic matter and facilitate the separation of skeletal elements. Five test plates for each specimen, from the ambitus region, were mounted on stubs, covered with gold, and observed under a Scanning Electron Microscope (SEM). Test thickness was measured on SEM pictures using the software Image J. The thicknesses of the test plates were then compared, between species and treatments, by means of a two-ways permutational ANOVA with 2 fixed factors, ‘species’ (2 levels: *P. lividus* and *D. africanum*) and ‘treatment’ (2 levels: Acid and control).

For the study of spines, a subset of 10 *P. lividus* and 10 *D. africanum* were dissected (5 individuals of each species from each pH treatment). Three spines per individual were removed from the ambitus region, measured, coated with silver, and observed under SEM. The methodology used, taking transverse sections from the spines, was modified from Rodríguez et al (2013). Each spine was cut lengthways into three equal slices, making it possible to view the total length of the spine’s shaft (distal, medium and proximal). All slices were embedded in Agar 100 resin, and allowed to harden for four days. Transverse sections of 10-30 μm were then cut from each of the three slices using an Ultracut microtome. Sections were mounted in agar 100 resin and



dried on a hot plate for two days. The slides were examined using a binocular light microscope. Four measurements were taken, and analyzed using Image J software: horizontal diameter, axial cavity diameter (% spine diameter), % of spine diameter comprised by solid wedges, and % of spine diameter comprised by foraminated rings. The presence of external tissue or axial cavity tissue, and the number of solid wedges, was also recorded. Multidimensional Scaling analysis (MDS) was applied to spine measurements, to assess the similarity of morphological measurements between pH treatments. Morphological differences between treatments were tested using the ANOSIM procedure (Clarke, 1993).

Test robustness was measured on another subset of juveniles. A total of 52 *P. lividus* specimens were examined from the acid treatment, and 33 from the control treatment. Only 8 specimens of *D. africanum* from the acid treatment and 6 juveniles from the control treatment were examined. For a quantitative assessment of the variability in test robustness, we used a custom made device to measure the weight required to crush a sea urchin test (modified from Guidetti & Moori 2005; Asnaghi et al 2013a). Each sea urchin was placed upside down in a precision balance (± 0.001), positioned beneath the piston of the crushing device. Lead pellets were added progressively from above, to increase the weight pressing down the piston. The weight necessary to crush each test was recorded using the precision balance. The static force required to crush sea urchin tests was measured as the weight recorded by the precision balance. We explored the relationship between sea urchin TD and the force necessary to crush the test. The force measurements necessary to crush tests, were compared between species and treatments, with a 2-way permutational ANOVA using 2 fixed factors, ‘species’(2 levels: *P. lividus* and *D. africanum*) and ‘treatments’ (2 levels: acid and control).

All permutational ANOVAs, MDS and ANOSIM tests were calculated using PRIMER6 & PERMANOVA+ software.

CAPÍTULO 7

4. RESULTS

4.1. Laboratory experiments

The seawater parameters measured during the course of the laboratory experiments are shown in Table 1. The mean (\pm SD) pH value for the control treatment was 8.1 ± 0.01 and the mean pH for the acidic treatment was 7.6 ± 0.01 . At the end of experiment, the survival of sea urchins differed between both studied species and pH treatments ($F=6.39$; $p<0.05$, see Table 2A). *P. lividus* juveniles had higher survival rates than *D. africanum* in both treatments. Of those kept in the acid treatment, 79% of *P. lividus* survived compared to 54% of *D. africanum*. From the control treatment, 98% of *P. lividus*, survived compared to 52% of *D. africanum*). Pairwise comparisons showed significant differences between treatments only in *P. lividus* (Table 2B). Survival in *D. africanum* did not differ between pH treatments (see Table 2B).

Table 1. Seawater parameters measured in the laboratory in two different pH treatments. Values reported are means (\pm SD): pH_{Total} (pH_T), Total Alkalinity (A_T), and temperature, calculated from measurements taken over the course of the experiment (100 days). Partial pressure of CO₂ (pCO₂), calcite saturation state (Ω_c), aragonite saturation state (Ω_a), carbonic (CO₃²⁻), and carbonic acid (HCO₃⁻), were calculated using CO2SYS.

Treat	pH _T	pCO ₂ (μatm)	A _T (mmol kg ⁻¹)	CO ₃ ²⁻ (mmol kg ⁻¹)	HCO ₃ ⁻¹ (mmol kg ⁻¹)	Ω _c	Ω _a	T(°C)
Acid	7.60 ± 0.1	1349.0 ± 82	2.507 ± 0.012	0.086 ± 0.020	2.301 ± 0.023	1.99 ± 0.21	1.29 ± 0.12	19.4 ± 0.4
Control	8.10 ± 0.1	413.2 ± 42	2.854 ± 0.011	0.258 ± 0.089	2.237 ± 0.061	6.12 ± 0.54	3.97 ± 0.21	19.5 ± 0.3

4.2. Predation experiments

When analyzing the survival of juveniles during field experiments, we found a significant interaction between the factors species, treatment and locality (Table 3 and Figure 1). In Abades, the survival of juveniles was different between treatments and between species. However, the survival of *P. lividus* was not different between pH treatments alone (Table 3B); 35% from the



control treatment survived compared to 30% from the acid treatment (Figure 1A). In the same locality, survival of *D. africanum* did differ between pH treatments though (Table 3B, Figure 1B). Among *D. africanum*, 85% of juveniles survived from the control treatment compared to 50% from the acid treatment. In Boca Cangrejo, the same pattern was observed in the results. For *P. lividus* there were no significant differences in survival between treatments (Table 3B, Figure 1C), whereas for *D. africanum* we found 100% of the control group survived in contrast to 0% of from the acid treatment group (Table 3B, Figure 1D).

Table 2. **A.** Results of the two-way permutational ANOVA to test survival of echinoid species (*Paracentrotus lividus* vs. *Diadema africanum*) during laboratory experiments carried out in two different seawater pH treatments, (control vs. acid treatments). **B.** Estimates for pairwise comparisons of significant interaction of factors ‘treatment x species’, allowing comparison between pH treatments for each species. Significant results ($p < 0.05$) are shown in bold.

A. Source of variation	Df	SS	MS	Pseudo-F	P(MC)
<i>Treatment (T)</i>	1	0.722	0.722	4.19	0.042
<i>Species (Sp)</i>	1	12.603	12.603	73.01	0.001
<i>T * Sp</i>	1	1.102	1.102	6.39	0.012
<i>Residual</i>	396	68.38	0.173		
<i>Total</i>	399				

B. Pair-wise T*Sp	Species	Treatment	T	P (MC)
<i>Survival</i>	<i>P. lividus</i>	Acid vs control	4.3893	0.001
<i>Survival</i>	<i>D. africanum</i>	Acid vs control	0.2819	0.783

CAPÍTULO 7

Table 3. **A.** Results of the three-way permutational ANOVA design, comparing survival of juvenile sea urchins in predation experiments carried out in the field. Specimens of two echinoid species (*Paracentrotus lividus* vs. *Diadema africanum*), pre-incubated indifferent pH treatments (control vs. acid), were studied at two localities of Tenerife (Abades vs. Boca Cangrejo). **B.** Estimates for pairwise comparisons, of significant interaction of factors ‘treatment x species x locality’, provide a comparison between pH treatments for each species and locality. Significant results ($p < 0.05$) are shown in bold.

A. Source of variation	Df	SS	MS	Pseudo-F	P(MC)
<i>Treatment (T)</i>	1	4.5	4.5	4.31	0.290
<i>Species (Sp)</i>	1	0.746	0.746	0.54	0.597
<i>Location (Lo)</i>	1	0.005	0.005	0.29	0.590
<i>T * Sp</i>	1	2.722	2.722	3.64	0.304
<i>T * Lo</i>	1	1.043	1.043	5.53	0.021
<i>Sp * Lo</i>	1	1.389	1.389	7.36	0.007
<i>T * Sp * Lo</i>	1	0.747	0.747	3.96	0.046
<i>Residual</i>	124	23.389	0.189		
<i>Total</i>	131	32.992			

B. Pairwise analyses by species	Locality	Treatment	T	P (MC)
<i>P. lividus</i>	Abades	Acid vs Control	0.352	0.722
	Boca Cangrejo	Acid vs Control	0.739	0.517
<i>D. africanum</i>	Abades	Acid vs Control	0.076	0.034
	Boca Cangrejo	Acid vs Control	3.829	0.001

DEPREDACIÓN Y ACIDIFICACIÓN

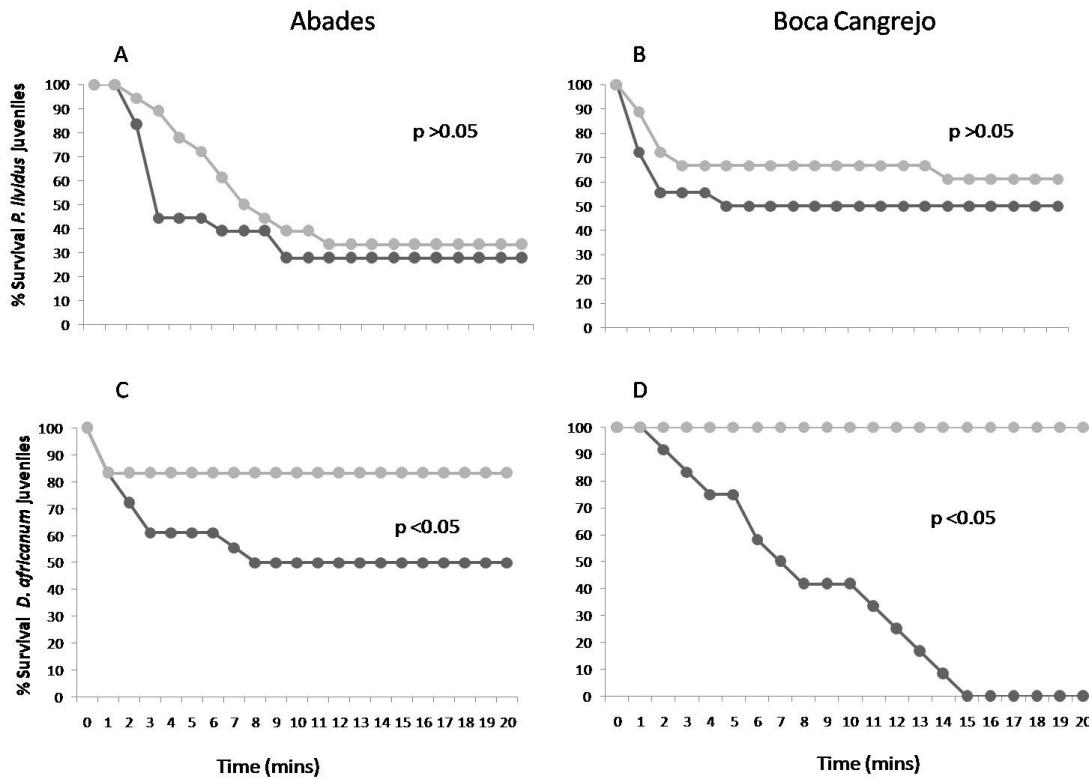


Figure 1. Sea urchin survival during predatory experiments in the field (20 min of observation per replicate). Juveniles of two different species were pre-incubated for 100 days in different pH treatments. Light gray circles represent the control group ($\text{pH}=8.1$), and dark gray circles represent the acid group ($\text{pH}=7.6$). **A.** *Paracentrotus lividus* in the locality of Abades; **B.** *P. lividus* in Boca Cangrejo; **C.** *Diadema africanum* in Abades; and **D.** *D. africanum* in Boca Cangrejo.

In total, 44 predation events were directed at *P. lividus*; 21 on specimens from the acid treatment group, and 23 on the control group. Juveniles of *P. lividus* from the acid treatment group were mainly attacked by *Sphoeroides marmoratus* (43.48% of the observations), *Diplodus sargus* (30.43%), and *Thalassoma pavo* (21.74%). The same three species of predators attacked from the control group, but their relative frequencies were different: *D. sargus* (42.85%), *S. marmoratus* (38.10%) and *T. pavo* (19.05%) (Figure 2A). Of the attacks on the acid treatment group, 4 species of consumer were allocated to the attempted predator guild (*T. pavo* (44.40%), *S. marmoratus* (22.20%), *Canthigaster capistrata* (22.20%) and *Stephanolepis hispidus* (11.10%)). Attacks observed on the control group led to 5 species being allocated to the attempted predator guild:

CAPÍTULO 7

S. marmoratus (54.40%), *C. capistrata* (18.18%), *T. pavo* (13.63%), *S. hispidus* (4.54%) plus *Similiparma lurida* (9.09%) (Figure 2B). In the acid treatment group, two species of predator were allocated to the scavenging consumer group (*T. pavo* and *C. capistrata*), as they were observed feeding on carcasses already opened by other predators. In the control pH group, 3 species of scavenger were observed (*T. pavo*, *C. capistrata* and *S. lurida*) (Figure 2C).

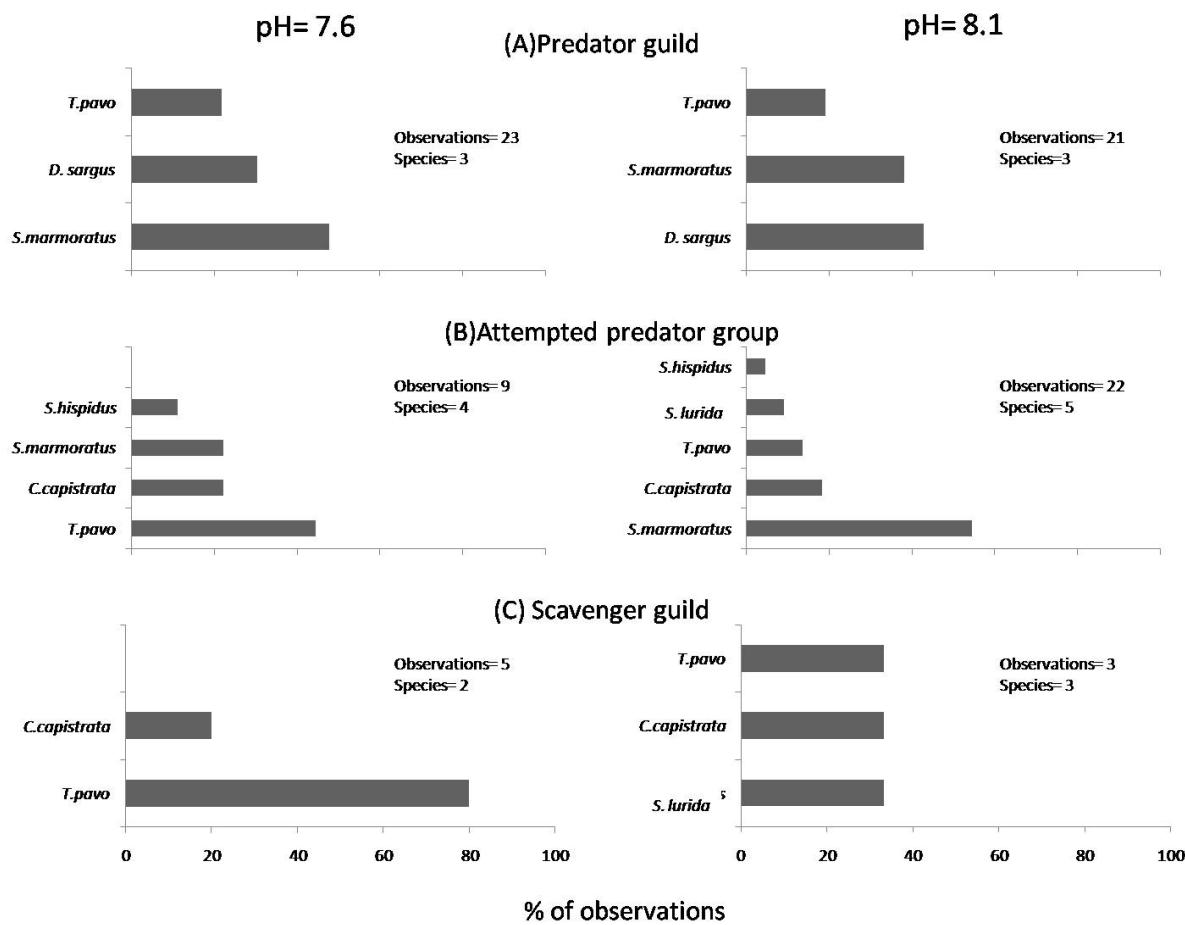


Figure 2. Percentages of predatory events initiated on juvenile *Paracentrotus lividus*, by predatory fish from three consumer categories: **A.** predators; **B.** attempted predators; and **C.** scavengers. Data are shown for *P. lividus* individuals reared in acid (pH= 7.6) and control (pH= 8.1) seawater treatments respectively. Total number of predation events and total number of different species observed acting as predators are shown in summary.

DEPREDACIÓN Y ACIDIFICACIÓN



In *D. africanum* a total of 16 incidences of predation were counted. Fifteen attacks were directed at sea urchins from the acid pH group and only 1 was directed at individuals from the control group. The main species of fish preying on *D. africanum* from the acid treatment group, were *T. pavo* (40% of observations), followed by *C. capistrata* (26.6%), *S. marmoratus* (20%), *S. lurida* (6.6%) and *D. sargus* (6.6%), while one species preyed on juveniles from control treatment (*S. marmoratus* 100%) (Figure 3A) When we allocated these predators to their consumer categories, we found 6 species were in the attempted predator guild (*C. capistrata*, *T. pavo*, *S. marmoratus*, *S. lurida*, *S. hispidus* and *D. sargus*). Based on attacks on the control group, there were only 3 species in the attempted predator guild (*C. capistrata*, *S. marmoratus* and *T. pavo*) (Figure 3B). In the acid treatment group, 4 fish species were scavengers (*T. pavo*, *S. lurida*, *C. capistrata*, *S. marmoratus*). In contrast, just one species was found to scavenge on juveniles from the control treatment (*S. marmoratus*) (Figure 3C).

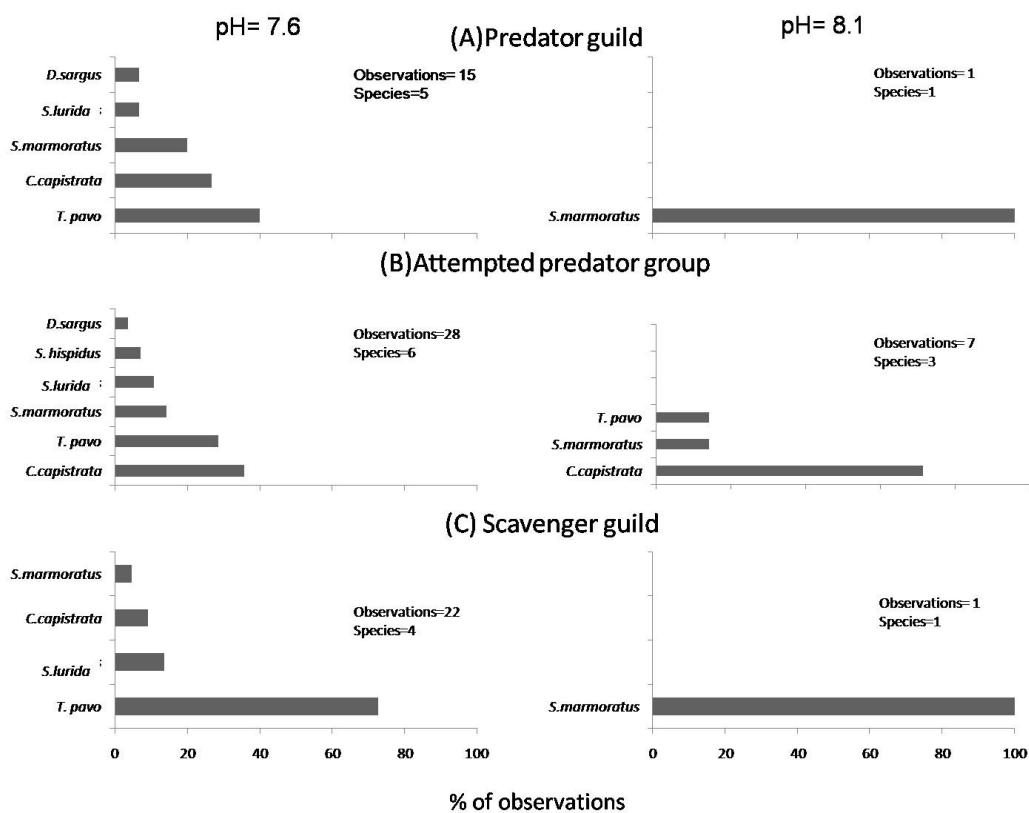


Figure 3. Percentages of predatory events initiated on juveniles of *Diadema africanum* by predatory fish species three categories of consumers: **A.** predators, **B.** attempted predators and **C.** scavengers. Data are shown for *D. africanum* individuals reared in acid (pH= 7.6) and control (pH= 8.1) seawater treatments. Total number of predatory events observed and total number of species recorded acting as predators are given in summary

CAPÍTULO 7

For *P. lividus* there was no difference in main predator size between treatments for any of the predator species; *D. sargus* ($F=2.886$; $p>0.05$), *S. marmoratus* ($F=0.001$; $p>0.05$) and *T. pavo* ($F=0.331$; $p>0.05$) (Figure 4A). However, we found ingestion times differed significantly between pH treatments. In the acidic group *P. lividus* were ingested faster than in the control group by both *T. pavo* ($F=8.008$; $p<0.05$) and *D. sargus* ($F=4.674$; $p<0.05$) (Figure 4B). Ingestion times in *S. marmoratus* did not differ between pH treatments ($F=0.1577$; $p>0.05$).

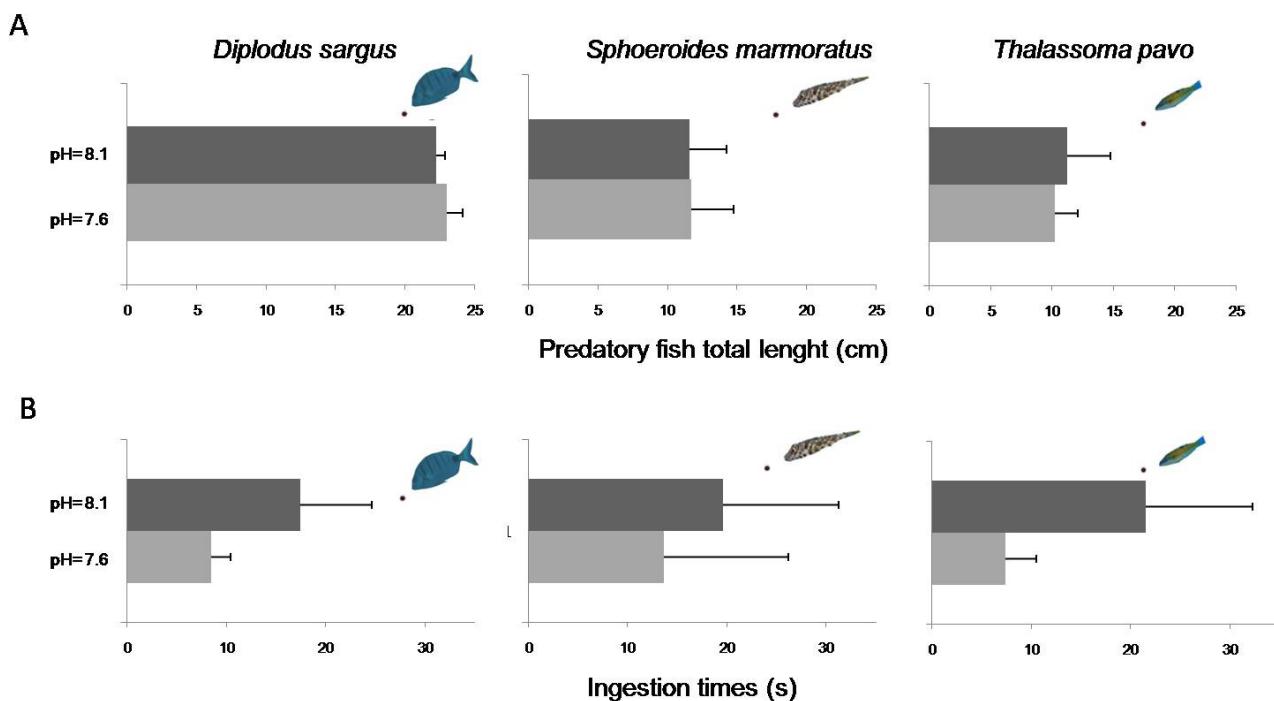


Figure 4. Predatory performance variables for predatory fish *Diploodus sargus*, *Sphoeroides marmoratus* and *Thalassoma pavo* (from the left to right). Predation on juvenile *Paracentrotus lividus* reared in control (pH= 8.1; dark grey bar) and acidic conditions (pH= 7.6; light gray bars): A. total body length of predatory fish (mean \pm SD); and B. time taken to ingest *P. lividus* juvenile (mean \pm SD).



Predation events on *D. africanum*, were carried out by *T. pavo* that were 10.66 ± 1.03 cm in size, *C. capistrata* of 5.5 ± 1.73 cm and *S. marmoratus* that were 11.66 ± 2.89 cm. The ingestions times for these three species were 8.6 ± 1.86 s, 36.5 ± 6.35 s and 10.33 ± 0.70 s, respectively. The *S. marmoratus* that preyed on *D. africanum* specimens from the control group, measured 10 cm and consumed the whole sea urchin in 29 s. For *D. africanum*, no further statistical analyses could be performed with regard to predator size and ingestion time since only one predation event was recorded for the control group.

4.3. External structure

Test thickness differed significantly between pH treatments. Sea urchins from the pH control treatment had thicker test plates than sea urchins from the acid treatment (see Table 4 and Figure 5). There was no difference in test thickness between *P. lividus* and *D. africanum* (Table 4).

Table 4. **A.** Results of the two-way permutational ANOVA design, comparing test robustness of juvenile sea urchins, between different pH treatments (control vs. acid) and echinoid species (*Paracentrotus lividus* vs. *Diadema africanum*). **B.** Estimates for pairwise comparisons of significant interaction of the factors ‘treatment x species’ provide comparison between pH treatments for each sea urchin species. Significant results ($p < 0.05$) are shown in bold.

A. Source of variation	Df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
<i>Treatment (T)</i>	1	$4.38e^6$	$4.38e^6$	46.59	0.001
<i>Species (Sp)</i>	1	$3.9e^5$	$3.9e^5$	4.16	0.042
<i>T * Sp</i>	1	$8.22e^5$	$8.22e^5$	9.39	0.003
<i>Residual</i>	93	$8.74e^6$	94013		
<i>Total</i>	96	$1.46 e^7$			

B. Pair-wise T*Sp	Species	Treatment	T	P (MC)
<i>Robustness</i>	<i>P. lividus</i>	Acid vs control	4.6483	0.001
<i>Robustness</i>	<i>D. africanum</i>	Acid vs control	8.6593	0.001

CAPÍTULO 7

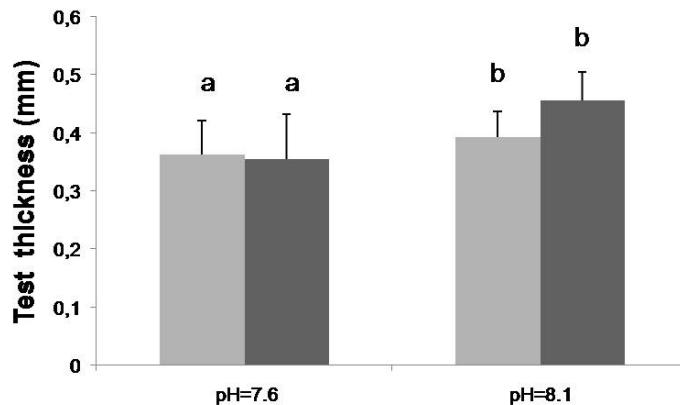


Figure 5. Sea urchin test plate thickness for two species reared in two different seawater pH conditions (pH= 7.6 and pH= 8.1). Light gray bars correspond to *Paracentrotus lividus*, and dark gray bars to *Diadema africanum*. Different letters show significant statistical differences ($p<0.05$) between treatments.

External ornamentation of the spines differed between pH treatments in one of the species studied. In *D. africanum*, we found differences in the shape of verticilium between treatments (Figure 6A-B). *D. africanum* from the acid treatment group had spines with dissolved tip and middle regions. No differences were found within the spines, between *P. lividus* pH groups (Figure 6C-D).

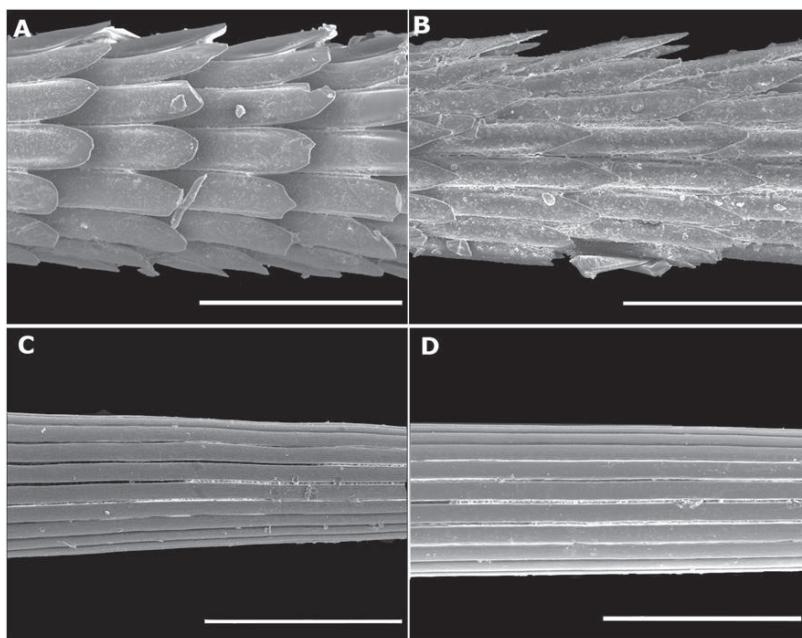


Figure 6. Scanning electron microscopy of spines from juvenile *Paracentrotus lividus* and *Diadema africanum* specimens, pre-incubated in two different experimental pH treatments for 100 days. **A**. Spines of *D. africanum* from acid treatment (pH= 7.6); **B**. Spines of *D. africanum* from control treatment (pH= 8.1); **C**. Spines of *P. lividus* from the acid treatment (pH= 7.6); and **D**. Spines of *P. lividus* from control treatment (pH= 8.1). Scale bars in A and B correspond to 400 μm and in C and D to 700 μm .



The results of ANOSIM transverse sections of spines, showed measurements of spine internal structure were also different between treatments in *D. africanum* ($R= 0.056$; $p< 1.2\%$). These patterns can be visualized in the MDS plot, where samples from the control treatment appear largely lumped together in a more homogenous group of samples, compared to samples from the acidic treatment group (Figure 7A). In the case of *P. lividus*, there were no differences in spine internal structure between the two pH groups ($R= 0$; $p>5\%$) (Figure 7B), and the MDS did not show any ordination of samples based on pH treatment (Figure 7B).

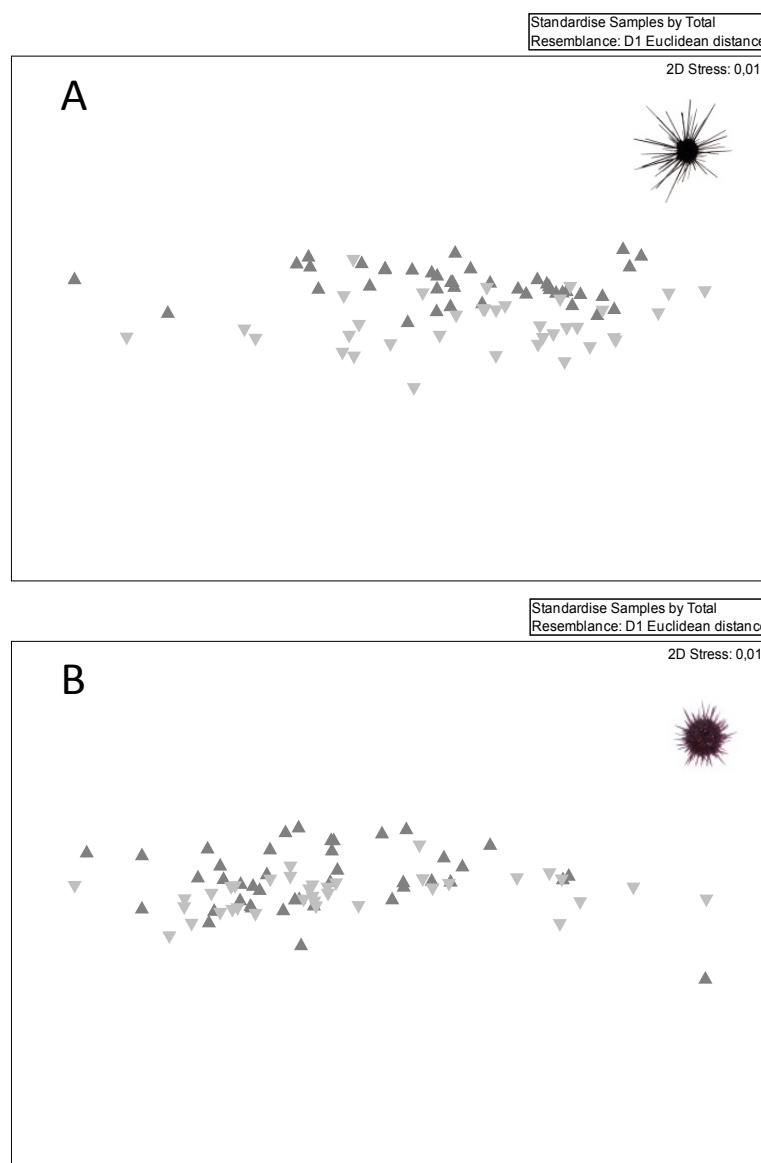


Figure 7. Multidimensional scaling of measurements of spine transverse sections from juvenile sea urchins pre-incubated in two different pH conditions in the laboratory. **A.** *Diadema africanum*; and **B.** *Paracentrotus lividus*. Dark gray triangles represent spines from juveniles from the control treatment, and light gray triangles represent spines from the acid treatment.

The fragility of sea urchins, or the weight needed to crush their tests, was significantly related to the size of the test, in individuals from the control treatment, in both species ($R^2= 0.382$, $p<0.05$ for *P. lividus*, and $R^2= 0.485$, $p< 0.05$ for *D. africanum*). Larger-sized individuals required more weight to break them, than smaller-sized individuals (Figure 8). In the acid treatment group however, individuals were crushed by the same weight, regardless of test size (Figure 8). The permutational ANOVA used to analyze the weight required to crush sea urchins tests, also showed a significant interaction between the factors species and pH treatment (Table 5A). When the results were analyzed using pairwise tests, again we found significant differences between treatments in both species (Table 5B): samples from the acid treatment were more fragile, and their tests broke under less weight, compared to samples from the pH control group (Figure 8).

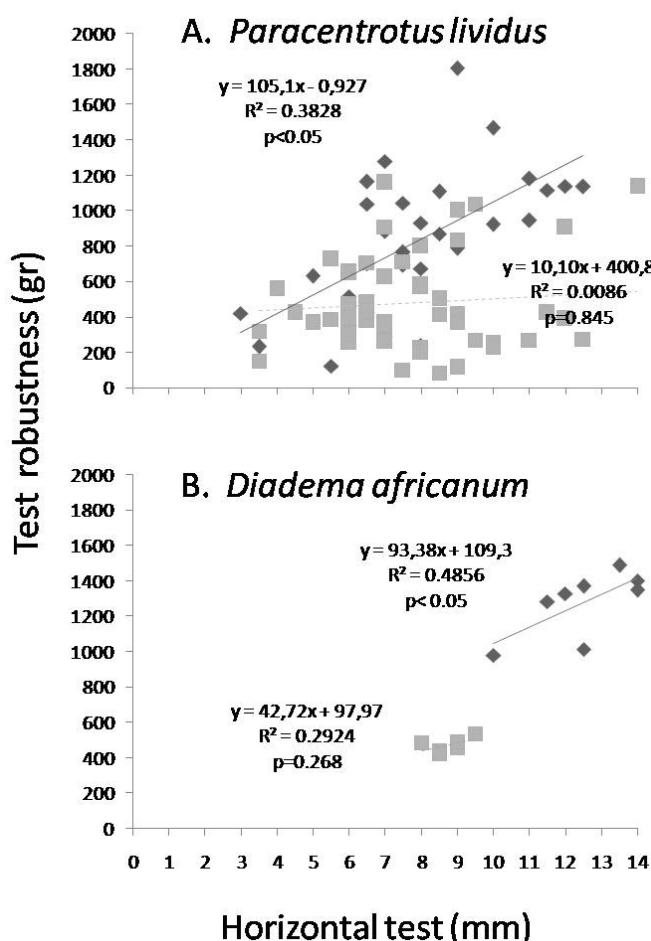


Figure 8. Relationships between sea urchin test robustness, and horizontal test diameter, from juvenile sea urchins: **A.** *Paracentrotus lividus*; and **B.** *Diadema africanum*. Light gray squares represent juveniles pre-incubated in acid water treatment ($\text{pH}= 7.6$), and dark gray rhomboids represent juveniles preincubated in control treatment ($\text{pH}= 8.1$).



5. DISCUSSION

We have revealed that acidic seawater, at a pH level that may be commonplace in the natural environment by the turn of the century, can affect the capacity of juvenile sea urchins to avoid predation. The present study also identified interspecific responses to ocean acidification. *D. africanum* juveniles reared in low pH conditions for 100 days, displayed damage to their external skeletal structure, such as dissolved spines and more fragile tests, and were also more sensitive to predation, when compared to juveniles of the same species reared under control pH conditions. However, juveniles of the species *P. lividus* showed an external structure modified by pH conditions, but individuals reared in acidic conditions did not account for a higher susceptibility to predation in the field. These findings show that environmental conditions can directly affect morphology in marine organisms, such as sea urchins, by means of impacting calcification processes, but also, and more importantly, their potential to indirectly control predatory interactions and top-down driven effects on benthic ecosystems.

Acidic seawater conditions affected test plate thickness in either of the sea urchin species we studied, which is in line with previous results reported by Shirayama & Thornton (2005) and Byrne et al (2014) for *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Echinometra mathaei* and *Tripneustes gratilla* respectively. In contrast, on studying *P. lividus* juveniles, Asnaghi et al (2013b) found that the test thickness was strongly correlated with test diameter in juveniles of *P. lividus*, but not with seawater pH. However, they performed short-term experiments in which sea urchins were exposed to contrasting pH conditions only for one month; therefore results obtained could be a consequence of the short exposure times of experiments and longer periods of times of at least 3 months, as used in our experimental set-up, would be needed to account for acidification-driven structural differences in sea urchin morphology, as previously suggested by Dupont et al (2012) and Dupont & Pörtner (2013).

We found spines dissolution, or vetricilian dissolution, in juveniles of *D. africanum* under acidic seawater conditions. Another study also found dissolution of spines at low pH (7.4-7.8), in juvenile *Lytechinus variegatus* and *Heliocidaris erythrogramma* (Albright et al 2012; Wolfe et al 2013). However, we did not observe any spine dissolution in *P. lividus* and neither did Asnaghi

et al (2013b) in their study of morphological features conducted on the same species. *P. lividus* is distributed throughout the intertidal and subtidal zones (Hernández et al 2013), making it a species that is well adapted to fast and abrupt changes in environmental conditions, including seawater pH. The differences observed between the two species of sea urchins we studied, constitutes a clear example of how ocean acidification exerts different adaptive pressures on different species. Some species are thought to be more vulnerable to the acidification process than others (Dupont et al 2010a, b, c, 2013; Hendricks et al 2010).

The decreased robustness of sea urchins tests, and the reduced thickness of test plates, made the sea urchins we incubated in a low pH environment, less resistant to static loads and to attacks by crushing predators (Sala 1997; Guidetti et al 2005). In this sense, our results are in agreement with the findings of Hall-Spencer et al (2008) who also found tests were less robust in sea urchins from naturally acidified seawater areas (pH_T values of 7.7-7.8), making individuals more susceptible to predation. From laboratory experiments, Asnaghi et al (2013a) obtained similar results, finding that *P. lividus* juveniles kept at pH_{Total} 7.7, had less robust tests than those maintained at pH_T 8.1. Byrne et al (2014) had similar results in test of *T. gratilla* juveniles, where individuals kept to at pH 7.6 showed less robustness than those kept at pH 8.1 and 7.8.

Decreasing external robustness of a sea urchin test, by thinning the plates and causing dissolution of spines, is known to result in increased susceptibility to predation in the natural environment (Guidetti & Moori 2005). Due to their small sizes, the juvenile stage of an echinoids' life cycle constitutes *per se* the most vulnerable stage to predation, even at locations depleted of high biomasses of predators (Clemente et al 2007). Therefore, juveniles with less robust tests and more fragile spines due to increased $p\text{CO}_2$ are expected to be the most susceptible to predation by a larger number of fish species. In our study, we found this was the case with *D. africanum*. Only one species (*S. marmoratus*) preyed on *D. africanum* specimens reared at pH 8.1, compared with 5 fish species (*T. pavo*, *C. capistrata*, *S. marmoratus*, *S. lurida* and *D. sargus*) that preyed on members of the same species kept at pH 7.6 for 100 days. Importantly, some of the species that were observed attacking *D. africanum* juveniles from the low pH group, were not species that had previously been considered as predatory guild of *D. africanum*. Results by Clemente et al (2010) showed that key predators of juveniles of *D. africanum* in urchins barren of Tenerife



Island were *D. sargus* and *T. pavo*, and less importantly *C. capistrata*. However, within our study, we reported predation events on juveniles from acid conditions also by *S. lurida* and *S. marmoratus*. This increase in the number of species that have the potential to prey on this sea urchin species in future scenarios, resulting from prolonged ocean acidification conditions, can indirectly modify trophic interactions. Therefore, the functional roles of different components within the ecosystems can be significantly altered by climate related variables (Widdicombe & Spicer 2008).

Juveniles of *P. lividus* resulted were more resistant to acidification of seawater than *D. africanum*. Daily pH fluctuations of about 0.2 units have been reported in shallow coastal areas typically inhabited by this species around the Canary Islands (C.A. Hernández, unpubl data), which may explain some of the species' tolerance to acidic stress. Damage to spines in *P. lividus* specimens in the low pH treatment group, was less noticeable than for *D. africanum*. We found significant thinning of the tests in the low pH group, but unlike *D. africanum*, these morphological differences did not reduce survival rates among individuals from acidic group, when they were later tested in predatory experiments. Only one measure of predatory performance was significantly increased by incubating *P. lividus* at a low pH; ingestion times by some species of fish predators were faster, specifically *T. pavo* and *D. sargus*. This result suggestd that *P. lividus* from the acid treatment were more easily consumed, as a consequence of pH driven modifications that had weakened the structure of their tests. However, as previously stated, these effects did not significantly alter the survival of *P. lividus* in its natural environment.

In conclusion, we have shown that juveniles of the sea urchin *D. africanum* may be more vulnerable to the effects of seawater acidification than *P. lividus*. The strength of these effects needs to be addressed with longer term experiments, and in combination with other climate related stressors. The present study has focused on two key herbivores that are widespread throughout the Canary Islands, and in other Eastern Atlantic Archipelagos. By highlighting the susceptibility of *D. africanum*, a competitive and dominant species (Hernández et al 2013), to ocean acidification, our results demonstrate the potential ecosystem-wide effects of climate change. In future scenarios, *P. lividus* may be considered a “winning species”, and *D. africanum* a “losing species” in the climate change stake. In this sense, the effects of synergistically

CAPÍTULO 7

interactions between anthropogenic factors, such as ocean warming and ocean acidification, must be considered in order to better predict future changes in ecosystems structure, as well as to establish adequate plans to mitigate anthropogenic activities, if we want to successfully conserve the marine environment.

6. REFERENCES

- Albright R**, Bland C, Gillette P, Serafy JE, Langdon C, Capo TR (2012) Juvenile growth of the tropical sea urchin *Lytechinus variegatus* exposed to near-future ocean acidification scenarios. *J Exp Mar Biol Ecol*, 426-427:12–17.
- Anderson MJ** (2004). PERMANOVA 2factor: a FORTRAN computer program for permutational multivariate analysis of variance using permutation tests. University of Auckland, Auckland:35 pp.
- Anderson MJ**, Robinson J (2003). Generalized discriminant analysis based on distances. *Aust NZ J Statist*, 45:301–318.
- Andersson AJ**, Mackenzie FT, Gattuso JP (2011). Effects of ocean acidification on benthic processes, organisms, and ecosystems. In: Gattuso J-P, Hansson L (ed) Ocean Acidification. Oxford University Press, Oxford, pp 122–153.
- Anthony K**, Kline D, Diaz-Pulido G, Dove S, Hoegh-Guldberg O (2008). Ocean acidification causes bleaching and productivity loss in coral reef builders. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105 (45):17442-17446.
- Asnaghi V**, Chiantore M, Mangialajo L, Gazeau F, Francour P, Alliouane S, Gatusso JP (2013a). Cascading effects of ocean acidification in a rocky subtidal community. *PLoS ONE* 8(4): e61978. doi:10.1371/journal.pone.0061978
- Asnaghi V**, Mangialajo L, Gatusso JP, Francour P, Privitera D, Chiantore M (2013b). Effects of ocean acidification and diet on thickness and carbonate elemental composition of the test of juvenile sea urchins. *Mar Env Res*, 93:78–84.
- Bray L**, Pancucci-Papadopoulou MA, Hall-Spencer JM (2014). Sea urchin response to rising $p\text{CO}_2$ shows ocean acidification may fundamentally alter the chemistry of marine skeletons. *Medit Mar Sci*, 15(3):510-519.
- Byrne M** (2012). Global change ecotoxicology: identification of early life history bottlenecks in marine invertebrates, variable species responses and variable experimental approaches. *Mar Environ Res*, 76:3-15.
- Byrne M**, Ho M, Wong E, Soars NA, Selvakumaraswamy P, Shepard-brennand H, Dwoejany SA, Davis AR

DEPREDACIÓN Y ACIDIFICACIÓN



- (2011). Unshelled abalone and corrupted urchins, development of marine calcifiers in a changing ocean. *P Roy Soc B-Biol Sci*, 278: 2376–2383.
- Byrne M**, Przeslawski R (2013). Multistressor impacts of warming and acidification of the ocean on marine invertebrates' life histories. *Integr Comp Biol*, 53(4):582-596.
- Byrne M**, Smith AM, West S, Collard M, Dubois P, Graba-landry A, Dwoejany A (2014). Warming influences Mg²⁺ content, while warming and acidification influence calcification and test strength of a sea urchin. *Environ Sci Technol*, DOI:dx.doi.org/10.1021/es5017526.
- Caldeira K**, Wickett M (2003). Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, 425:365.
- Calosi P**, Rastrick SPS, Graziano M, Thomas SC, Baggini C, Carter HA, Clarke KR (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust J Ecol*, 18:117-143.
- Clemente S**, Hernández JC, Toledo K, Brito A (2007). Predation upon *Diadema* aff. *antillarum* in barren grounds in the Canary Islands. *Sci Mar*, 71(4):745-754.
- Clemente S**, Hernández JC, Rodríguez A, Brito A (2010). Identifying keystone predators and the importance of preserving functional diversity in sublittoral rocky bottoms. *Mar Ecol Prog Ser*, 413:55-67.
- Cohen-Rengifo M**, García E, Hernández CA, Hernández JC, Clemente S (2013). Global warming and ocean acidification affect fertilization and early development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Cah Biol Mar*, 54:667-675.
- Collard M**, Rastrick SP, Calosi P, Demolder Y, Dille J, Findlay HX, Hall-Spencer JM, Milazzo M, Moulin L, Widdicombe S, Dehairs F, Dubois P (2015). The impact of ocean acidification and warming on the skeletal mechanical properties of the sea urchin *Paracentrotus lividus* from laboratory and field observations. *Ices J Mar Sci*, doi:10.1093/icesjms/fsv018.
- Courtney T**, Westfield I, Ries JB (2013). CO₂-induced ocean acidification impairs calcification in the tropical sea urchin *Echinometra viridis*. *J Exp Mar Biol Ecol*, 440:169-175.
- Dickson AG**, Millero FJ (1987). A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep-Sea Res*, 34:1733-1743.
- Dupont S**, Dorey N, Thorndyke M (2010a). What meta-analysis can tell us about vulnerability of marine biodiversity to ocean acidification? *Estuar Coast Shelf Sci*, 89:182-185.
- Dupont S**, Lundve B, Thorndyke M (2010b). Near future ocean acidification increases growth rate of the lecithotrophic larvae and juveniles of the sea star *Crossaster papposus*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 314B:382-389.
- Dupont S**, Ortega-Martínez O, Thorndyke M (2010c). Impact of near-future ocean acidification on echinoderms. *Ecotoxicology*, 19:449-462.

CAPÍTULO 7

- Dupont S**, Dorey N, Stumpp M, Melzner F, Thorndyke M (2012). Long-term and trans-life-cycle effects of exposure to ocean acidification in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Mar Biol*, 160:1835-43.
- Dupont S**, Thorndyke M (2013). Direct impacts of near-future ocean acidification on sea urchins. In: Fernández-Palacios JM, de Nacimiento L, Hernández JC, Clemente S, González A, Díaz-González JP (eds). Climate Change Perspectives from the Atlantic: Past, Present and Future. Servicio de publicaciones de La Universidad de La Laguna, La Laguna, Spain.
- Dupont S**, Pörtner HO (2013). A snapshot of ocean acidification research. *Mar Biol*, 160:1765-1771.
- Gattuso JP**, Allemand D, Frankignoulle M (1999). Photosynthesis and calcification at cellular, organismal and community levels in coral reefs: a review on interactions and control by carbonate chemistry. *Am Zool*, 39 (1):160–183.
- Gattuso JP**, Hanson L (2011). Ocean acidification: background and history. In: Gattuso J-P, Hanson L, editors. Ocean Acidification. Oxford University Press, Oxford. pp.1-20.
- Girard D**, Herrero A, Mora J, Hernández JC, Brito A, González N, Catoire JL (2008). Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) in its southern population limit (Canary Islands eastern Atlantic). *Gulf Mex Sci*, 26: 149.
- Guidetti P**, Mori M (2005). Morpho-functional defences of Mediterranean sea urchins, *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*, against fish predators. *Mar Biol*, 147:797-802.
- Hall-Spencer JM**, Rodolfo-Metalpa JM, Martin S, Ransome E, Fine M, Turner SM, Rowley SJ, Tedesco D, Buia M-C (2008). Volcanic carbon dioxide events show ecosystem effects of ocean acidification. *Nature*, 454: 96-93.
- Hazan Y**, Wangensteen OS, Fine M (2014). Tough as a rock-boring urchin:adult *Echinometra sp.* EE from the Red Sea show high resistance to ocean acidification over long-term exposures. *Mar Biol*, 161:2531-2545.
- Hendriks IE**, Duarte CM, Álvarez M (2010). Vulnerability of marine biodiversity to ocean acidification: A meta-analysis. *Estuar Coast Shelf S*, 86:157-164.
- Hereu B**, Zabala M, Linares C, Sala E (2005). The effects of predator abundance and habitat structural complexity on survival of juvenile sea urchins. *Mar Biol*, 146:293-299.
- Hernández JC**, Clemente S, Sangil C, Brito A (2008). The key role of the sea urchin *Diadema* aff. *antillarum* throughout the Canary Islands (eastern Atlantic Ocean) in controlling macroalgae assemblages: a spatio-temporal approach. *Mar Environ Res*, 66: 259-270.
- Hernández JC**, Clemente S, Girard D, Pérez-Ruzafa A, Brito A (2010). Effect of temperature on settlement and postsettlement survival in a barrens-forming sea urchin. *Mar Ecol Prog Ser*, 413:69-80.

DEPREDACIÓN Y ACIDIFICACIÓN



- Hernández JC**, Clemente S, Tuya F, Pérez-Ruzafa A, Sangil C, Moro-Abad L, Bacallado-Aránega JJ (2013). Echinoderms of the Canary Islands, Spain In: Alvarado J.A, Solís-Marín (ed)Echinoderm Research and Diversity in Latin America, F.Springer. Heidelberg New York Dordrecht London, pp 471-510.
- IPCC** (2013). Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Stocker TF, Qin D, Plattner GK, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM (eds.)] Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Kleypas JA**, Langdon C (2006). Coral reefs and changing seawater carbonate chemistry. *Coast estuar stud*, 61:73-110.
- Kurihaya H**, Yin R, Nishihara GN, Soyano K, Ishimatsu A (2013). Effect of ocean acidification on growth, gonad development and physiology of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Aquat Biol*, 18:281-283.
- Lewis E**, Wallace D (1998). Program developed for CO₂ system calculations. ORNL/CDIAC-105. Oak Ridge, Tennessee:Carbon Dioxide Information Analysis Center.
- McClanahan TR** (1995). Fish predators and scavengers of the sea urchin *Echinometra mathaei* in Kenyan coral-reef marine parks. *Environ Biol Fishes*, 43:187-193.
- Mehrbach C**, Culberson CH, Hawley JE, Pytkowicz RM (1973). Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in sea water at atmospheric pressure. *Limnol Oceanogr*, 18:897-907.
- Moulin L**, Grosjean P, Leblud J, Batigny A, Collard M, Dubois P (2015). Long-term mesocosmos study of the effects of ocean acidification on growth and physiology of the sea urchin *Echinometra mathaei*. *Mar Env Res*, 103:103-114.
- Orr J**, Fabry V, Aumont O, Bopp L, Doney S, Feely R, Gnanadesikan A, Gruber N, Ishida A, Joos F, Key RM, Lindsay K, Maier-Reimer E, Matear R, Monfray P, Mouchet A, Najjar RG, Plattner GK, Rodgers KB, Sabine CL, Sarmiento JL, Schiltzter R, Slater RD, Totterdell IJ, Weirig MF, Yamanaka Y, Yool A (2005). Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, 437:681-686.
- Rodríguez A**, Hernández JC, Clemente S, Coppard S (2013) A new species of *Diadema* (Echinodermata:Echionidea:Diadematidae)from eastern Atlantic Ocean and a neotype designation of *Diadema antillarum* (Philippi,1845). *Zootaxa*, 3636(1):144-170.
- Sala E** (1997). Fish predators and scavengers of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in protected areas of the north-west Mediterranean Sea. *Mar Biol*,129:531-539.
- Shirayama Y**, Thornton H (2005). Effect of increased atmospheric CO₂ on shallow water marine benthos. *J Geophys Res*,110(C9):C09S08.

CAPÍTULO 7

Uthicke S, Soars N, Foo S, Byrne M (2013). Effects of elevated $p\text{CO}_2$ and the effects of parent acclimation on development in the tropical Pacific sea urchin *Echinometra mathaei*. *Mar Biol*, 160:1913–1926.

Wolfe K, Dwoejany S, Byrne M (2013). Effects of ocean acidification on survival, growth and skeletal development in the early benthic juvenile sea urchin (*Heliocidaris erythrogramma*). *Global Change Biol*, 19:2698–2707.

Widdicombe S, Spicer JI (2008). Predicting the impact of ocean acidification on benthic biodiversity: What can animal physiology tell us? *J Exp Mar Biol Ecol*, 366:187–197.

DEPREDACIÓN Y ACIDIFICACIÓN



Conclusiones



CONCLUSIONES



1. Los juveniles de los erizos *Paracentrotus lividus* y *Diadema africanum* mostraron estrategias alimenticias diferentes. Mientras *P. lividus* vio limitado su consumo principalmente por la estructura de las algas, con una tasa de consumo mayor en las algas que carecían de estructura, *D. africanum* mostró el patrón opuesto, prefiriendo algas con estructura y un alto contenido en minerales. Los extractos químicos de las algas parecen estar jugando también un papel clave en las tasas de consumo de los juveniles de ambas especies, actuando más como atrayentes que como repelentes.
2. La disminución del pH prevista como consecuencia del cambio climático tuvo un efecto negativo en el crecimiento de las 9 especies de macroalgas estudiadas, tanto calcáreas como no calcáreas. Sin embargo, aunque no se observaron cambios en las estructuras internas de dichas especies, todas presentaron una menor concentración de carbonato cálcico en el tratamiento ácido ($\text{pH}=7,6$).
3. Los juveniles de ambas especies de erizos presentaron diferentes respuestas en herbivoría bajo distintos regímenes de pH. Mientras *P. lividus* incrementó la tasa de consumo de las algas sometidas a condiciones de acidificación, *D. africanum* mantuvo la misma tasa de consumo de algas mantenidas en distintos tratamientos de pH, registrándose únicamente diferencias en la especie *Dyctiota dichotoma*, más consumida en condiciones de $\text{pH}=8,1$. Se pone de manifiesto un efecto indirecto de la acidificación, que podría repercutir en la estructura de las comunidades algales como consecuencia de las alteraciones en las interacciones de herbivoría, específicamente en aquellas comunidades algales con presencia de *P. lividus*.

CONCLUSIONES

4. Para ambas especies de erizos, la técnica de marcaje con calceína más eficiente, en cuanto a supervivencia, éxito del marcaje y definición de la marca, fue la de baños de 24 horas a concentraciones de 20 mg/l del marcador químico.
5. Los juveniles de *D. africanum* presentaron un mayor crecimiento que los de *Paracentrotus lividus*, tanto en el medio natural como en las diferentes monodietas algales utilizadas en el laboratorio. En condiciones naturales, *D. africanum* presentó una tasa de crecimiento de 0,043 mm/día frente a 0,009 mm/día de *P. lividus*. En cuanto a las monodietas, las mayores tasas de crecimiento de *D. africanum* se registraron con las algas *Padina pavonica*, *Asparagopsis taxiformis*, *Cystoseira abies-marina* y *Lobophora variegata*. En *P. lividus* el crecimiento fue mayor al alimentarse de las especies *Halopteris scoparia*, *C. abies-marina* y *A. taxiformis*.
6. El crecimiento de ambos juveniles de erizos se vio afectado negativamente por la disminución del pH, registrándose menores tasas en aquéllos que fueron mantenidos a pH= 7,6. Este resultado podría tener implicaciones negativas para la supervivencia de las poblaciones, puesto que prolonga la duración de las fases tempranas de vida, más susceptibles a diferentes fuentes de mortalidad.
7. Los principales depredadores naturales de las fases de juveniles de *P. lividus* fueron los peces *Thalassoma pavo*, *Diplodus sargus* y *Pagrus pagrus*. Este grupo de depredadores difiere del registrado en el Mediterráneo, sugiriendo una sustitución funcional de especies depredadoras entre ambos sistemas. El número de depredadores de juveniles de *P. lividus* fue mayor que el de *D. africanum*, lo que puede estar relacionado con las estructuras defensivas de ambas especies: las púas más largas y con tóxicos de *D. africanum* probablemente suponen una ventaja adaptativa frente a la depredación.



8. Las estructuras morfológicas externas de ambas especies de equinoideos, grosor y dureza del caparazón, se vieron directamente afectadas por la disminución del pH. Los principales cambios registrados fueron una disminución del grosor y de la dureza del caparazón. En cuanto a las púas, sólo *D. africanum* presentó variaciones en la estructura externa e interna, observándose un mayor desgaste en la ornamentación externa y un menor diámetro de la púa a pH bajos.
9. El efecto directo de la acidificación sobre las estructuras externas de los juveniles de erizos favoreció, de forma indirecta, a su susceptibilidad a la depredación. En el caso de los juveniles de *D. africanum* se registró un mayor número de eventos de depredación y de especies con capacidad para depredar sobre los individuos mantenidos a pH 7,6. Los juveniles de *P. lividus* procedentes del tratamiento ácido no registraron mayores tasas de depredación que los individuos del tratamiento control, aunque fueron vulnerables a un mayor número de especies de peces depredadores.
10. Esta tesis ha representado un salto cualitativo en cuanto a los estudios de acidificación llevados a cabo hasta el momento, puesto que ha pretendido no sólo estudiar los efectos directos sobre las especies, sino además, las posibles consecuencias indirectas sobre las poblaciones por efectos en la alimentación, crecimiento y depredación. Se ponen de manifiesto diferencias interespecíficas en la magnitud de los efectos de la acidificación en las fases tempranas de vida de estos equinoideos. En condiciones futuras de acidificación, las poblaciones de *D. africanum* se pueden ver claramente comprometidas. Sin embargo, *P. lividus*, a pesar de presentar un efecto negativo en el crecimiento, parece mostrar una mayor resistencia y adaptación al cambio.

**“Duda siempre de ti mismo, hasta que los datos no
dejen dudas”**

(Louis Pasteur)

