



UNIVERSIDAD DEL MAR

Campus Puerto Ángel

Biología reproductiva de *Holothuria* (Stauropora) *fuscocinerea* Jaeger, 1833 (Echinodermata: Holothuroidea) en Bahía La Entrega, Oaxaca. México.

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS
PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA MARINA

PRESENTA

ITANDEHUI SARAI GUTIÉRREZ MÉNDEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. FRANCISCO BENITEZ VILLALOBOS

Puerto Ángel, Oaxaca, México, marzo 2011.

RESUMEN

Holothuria fuscocinerea es considerada una especie de pepino de mar potencialmente explotable, sin embargo únicamente se han realizado estudios de distribución. En el presente trabajo se describen algunos patrones de la biología reproductiva de esta especie en la Bahía La Entrega, Oaxaca. México. En el periodo comprendido de abril de 2008 a mayo de 2009 se recolectaron en promedio 20 organismos mensuales, registrándose los parámetros ambientales en cada muestreo. Se calculó la proporción de sexos, el índice gonadosomático (IG) y mediante el análisis histológico se describió el desarrollo gonadal, la distribución de tallas de los ovocitos y la fecundidad. *Holothuria fuscocinerea* es una especie dioica sin dimorfismo sexual externo, con una proporción de sexos 1:1, pudiéndose identificar cinco estadios de desarrollo gonadal. El desove presentó mayor intensidad en el mes de junio de 2008 y en agosto de 2008. Los valores de IG fueron significativamente más altos en hembras que en machos. El ciclo gametogénico está influenciado principalmente por la salinidad. La talla promedio de los oocitos fue de $117.70 \pm 53.27 \mu\text{m}$. La fecundidad anual promedio calculada fue de $8'096,392 \pm 1'138,522$ oocitos vitelogénicos por hembra. Con base en los valores de fecundidad y el tamaño de los ovocitos se puede deducir que *H. fuscocinerea* tiene una larva planctotrófica. *Holothuria fuscocinerea* es un estratega "r" periódico, típico de ambientes predecibles y estacionales como Bahía La Entrega.

PALABRAS CLAVE: Reproducción, fecundidad, estacional, salinidad, holoturia.

DEDICATORIA

Con mucho amor y cariño a las dos grandes montañas que me vieron nacer, que desde la distancia me cuidan y hacen llegar con suaves vientos susurrantes sus consejos durante mi recorrido hacia el mar ya que sin ellos no sería el río intrépido en que me he convertido...

A mis hermanos ríos que han crecido conmigo y juntos hemos recorrido los más hermosos lugares que mis aguas jamás han vuelto a tocar y aunque la orografía nos separe por momentos, estoy segura que aún nos falta recorrer más...

A mis amigos los árboles que me han acompañado en todo este recorrido...

A las piedras que en momentos obstruyeron mi cause...

A la ola que con su vaivén baña con fresca brisa mis aguas dulces...

A los faunos que traviesamente se han acercado a mi cause tocando con sus flautas hermosas melodías de letras hipnotizantes, volviéndome inevitablemente un río que se fascina fácilmente por su alrededor.

AGRADECIMIENTOS

- A Francisco Benítez por apoyarme y compartirme sus conocimientos durante la realización de este trabajo y sobre todo por darme la oportunidad de unirme a su grupo de trabajo.
- A los revisores de esta tesis por aportar comentarios y sugerencias, los cuales fueron esenciales en la realización del manuscrito.
- A mis amigos y compañeros Sam, Bicho, Mary, Willy, Julia y Julio por el apoyo en el muestreo y convertir las salidas de campo en toda una aventura.
- A todos los cuarenta y tantos amigos que compartieron durante cinco años clases, salidas de campo, desvelos, etc. volviendo situaciones abrumadoras en diversión; especialmente a Sac.
- A Eladio y Andrés por el profesionalismo con el que desempeñan su trabajo.
- A los profesores que me brindaron su apoyo durante mis estudios en la Licenciatura.
- Al Proyecto “Patrones reproductivos de tres especies de equinodermos asociados a arrecife en la costa de Oaxaca” (21R0707) financiado por PROMEP.

CONTENIDO

	<i>Página</i>
RESUMEN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
LISTADO DE FIGURAS	vi
LISTADO DE TABLAS	vii
LISTADO DE ANEXOS	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Clase Holothuroidea	1
1.2 Reproducción en Holoturoideos	3
1.2.1 Reproducción asexual	4
1.2.2 Reproducción sexual	5
1.3 <i>Holothuria fuscocinerea</i>	6
2. ANTECEDENTES	7
3. JUSTIFICACIÓN	11
4. OBJETIVOS	12
5. HIPÓTESIS	12
6. ÁREA DE ESTUDIO	13
7. MATERIAL Y MÉTODOS	15
7.1 Recolección de Muestras	15
7.2 Morfometría	16
7.3 Índice gonadosomático y factores ambientales	16

	<i>Página</i>
7.4 Proceso histológico	17
7.4.1 Técnica histológica de rutina I	17
7.4.2 Técnica histológica de rutina II	19
7.5 Descripción histológica de la gónada	20
7.6 Análisis de Imágenes	21
7.7 Fecundidad	21
8. RESULTADOS	23
8.1 Proporción de sexos	24
8.2 Descripción del ciclo reproductivo	25
8.3 Índice gonadosomático	34
8.3.1 Índice gonadosomático y factores ambientales	36
8.4 Distribución de talla de los oocitos	38
8.5 Fecundidad	41
9. DISCUSIÓN	42
10. CONCLUSIONES	49
11. REFERENCIAS	51

LISTADO DE FIGURAS

FIGURA		Página
1.	Espécimen de <i>Holothuria fuscocinerea</i> sobre sustrato arenoso.	6
2.	Mapa georeferencial del área de estudio. Modificado de Google Earth.	13
3.	Disección de un ejemplar de <i>H.fuscocinerea</i> ; mostrando el posicionamiento de la gónada en el organismo.	24
4.	Comportamiento de las proporciones de hembras, machos e indiferenciados por mes. (abril 2008 a mayo 2009).	25
5.	Gónadas de <i>H. fuscocinerea</i> en estadio de Gametogénesis.	27
6.	Gónadas de <i>H. fuscocinerea</i> en estadio de Madurez.	30
7.	Gónadas de <i>H. fuscocinerea</i> en estadio de Desove.	31
8.	Gónadas de <i>H. fuscocinerea</i> en estadio de Post-Desove.	32
9.	Gónadas de <i>H. fuscocinerea</i> en estadio Indiferenciado o en Reposo.	34
10.	Comportamiento mensual del índice gonadosomático (IG) para ambos sexos de <i>H. fuscocinerea</i> durante el periodo de muestreo.	35
11.	Comportamiento mensual del Índice Gonadosomático (IG) de <i>H. fuscocinerea</i> para ambos sexos y la temperatura (T°C) registrada durante el periodo de muestreo.	36
12.	Comportamiento mensual del Índice Gonadosomático (IG) de <i>H. fuscocinerea</i> para ambos sexos y la precipitación pluvial (cm) registrada durante el periodo de muestreo.	37
13.	Comportamiento mensual del Índice Gonadosomático (IG) de <i>H. fuscocinerea</i> para ambos sexos y la salinidad (S) registrada durante el periodo de muestreo.	37
14.	Distribución de las frecuencias de tallas de oocitos de <i>H. fuscocinerea</i> en los meses muestreados.	40
15.	Fecundidad real mensual durante el periodo de muestreo.	41

LISTADO DE TABLAS

TABLA		<i>Página</i>
I.	Técnica de inclusión de rutina para Histokinetete.	18
II.	Técnica de tinción Hematoxilina Eosina.	19
III.	Resumen de la regresión lineal múltiple paso a paso.	38

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO		<i>Página</i>
I.	Características principales de los cinco estadios identificados para <i>H. fuscocinerea</i> .	61

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Clase Holothuroidea

Los equinodermos son organismos exclusivamente marinos que pertenecen al Phylum Echinodermata, el cual está dividido en cinco clases: Asteroidea, Ophiuroidea, Echinoidea, Holothuroidea y Crinoidea. La clase Holothuroidea, comúnmente conocidos como holoturias o pepinos de mar, está constituida por aproximadamente 1,400 especies actuales, distribuidas en 6 órdenes, 25 familias, y aproximadamente 200 géneros (Pawson 2007).

Se caracteriza por presentar una simetría bilateral, a diferencia de otros equinodermos que presentan una simetría pentaradial típica. Son equinodermos vermiformes, y se caracterizan por presentar un cuerpo en forma cilíndrica; en el extremo anterior se encuentra la boca, que está rodeada de un anillo de ocho a treinta tentáculos retractiles que son usados para la alimentación; el ano se sitúa en el extremo posterior o distal; su esqueleto está conformado por osículos microscópicos dispersos en la pared corporal (Pawson *et al.* 2010).

Viven con un lado del cuerpo apoyado en el sustrato que casi siempre es la superficie ventral o trivio y cuenta con tres áreas ambulacrales o radios y dos áreas interambulacrales o interradios, en tanto que la superficie dorsal o bivio solo presenta dos ambulacros y tres interambulacros. Sus tallas alcanzan desde poco milímetros como *Leptosynapta minuta*, hasta más de cinco metros de longitud total, tal es el caso de *Synapta maculata*. (Pawson *et al.* 2010).

Los pepinos de mar habitan desde las zonas intermareales hasta las grandes profundidades oceánicas. Dominan en las comunidades marinas, tanto en cantidad

de individuos como en biomasa (Billett 1991), ya que pueden llegar a formar hasta el 90% de la biomasa de megafauna en el ecosistema (Hendler *et al.* 1995).

Algunas especies de holoturoideos pueden expulsar filamentos delgados llamados túbulos de Cuvier, los cuales se encuentran en la base de los árboles respiratorios y son expulsados violentamente al exterior mediante la ruptura de la región anal en dirección a la zona donde se encuentra el depredador; estos túbulos pueden tener una sustancia tóxica llamada holoturina, pero es más común que posean sustancias adhesivas que envuelven al depredador y lo inmovilizan. En condiciones adversas algunas especies pueden eviscerar un tramo del sistema digestivo con los órganos asociados de otros sistemas, ya sea por la región anal o la bucal, regenerándolos en pocas semanas (Parker 1982).

Los holoturoideos desempeñan una función importante en la estabilidad del ambiente marino. Por sus hábitos alimenticios son los responsables de cambiar significativamente la composición del suelo marino (Abdel-Razek *et al.* 2005) al reducir las concentraciones de sulfatos volátiles e incrementar el potencial de oxidoreducción. Estos organismos influyen en el reciclamiento de los nutrientes inorgánicos, ya que la materia orgánica proveniente de sus heces puede ser resuspendida por el oleaje, cerrando así una parte del ciclo (Mahmoud y Ahmad 2006) e incrementando la productividad de los ecosistemas coralinos (Laboy-Nieves y Conde 2006).

Algunas especies de holoturoideos también poseen un alto valor económico debido a su potencial para las pesquerías y actividades de acuicultura (Ivy y Giraspy 2006), ya que en el mercado asiático se consumen alrededor de 28 especies de pepinos de mar, dentro de los cuales destaca *Holothuria fuscocinerea* (Chen 2004).

Desde el punto de vista nutricional, los alimentos elaborados con holoturoideos poseen un alto porcentaje de aminoácidos esenciales, elementos traza y bajas cantidades de grasa, en comparación a la mayoría de otros alimentos (Nguyen *et al.* 2006). La pared corporal de los pepinos de mar se compone de colágeno insoluble, el cual es similar al que se encuentra presente en otros fármacos que se han utilizado para el tratamiento de la anemia y como suplemento de nutrientes hematogénicos. Además en la pared corporal existen altos niveles de lisina, arginina y de triptófano (Chen 2004, Nguyen *et al.* 2006).

Otra característica de los pepinos de mar es la presencia de glucosaminoglicanos y fucanos propios de esta clase, en la pared corporal, encontrándose en niveles muy altos en todo el cuerpo. Por tal razón, los pepinos de mar han sido nominados como alimentos ricos en poli-aniones, con una función fisiológicamente activa en la inhibición de algunos tipos de cáncer (Chen 2004; Abdel-Razek *et al.* 2005, Nguyen *et al.* 2006).

1.2 Reproducción de Holoturoideos

El sistema reproductivo de los holoturoideos se diferencia del resto de los equinodermos por presentar una gónada localizada dorsalmente en el interambulacro (Sewell *et al.* 1997); la cual está constituida por tubos ramificados unidos al mesenterio dorsal, a través del cual pasa el gonoducto, y puede terminar en un gonoporo o bien en una papila genital (Giese *et al.* 1991; Sewell *et al.* 1997).

Los holoturoideos tienen la facultad de reproducirse sexual o asexualmente, existiendo algunas correlaciones entre los factores ambientales y una combinación de caracteres como el tamaño del organismo, la disponibilidad de alimento, la

estabilidad del hábitat, la mortalidad y el suministro de larvas. Estos factores interactúan entre si y forman parte de un modelo que predice el tipo de reproducción que presentan (Mackey 2001).

1.2.1 Reproducción Asexual

Actualmente existen varios estudios sobre la autotomía y la reproducción asexual en los holoturoideos, sin embargo la única forma de reproducción asexual que se ha reportado para estos organismos es la fisión. La reproducción asexual por fisión tiene como objetivo la producción de nuevos individuos y ocurre únicamente en aspidóquiroideos y dendroquiroideos. En sínquiroideos ocurre una división transversal del cuerpo, pero la parte posterior falla al momento de regenerarse haciendo esto más un proceso de autotomía que de fisión (Giese *et al.* 1991, Mladenov 1996).

Los holoturoideos se pueden reproducir por fisión mediante tres patrones. En el primero, el animal se sujeta al sustrato en la parte anterior y posterior por medio de sus pies ambulacrales. Los extremos comienzan suavemente a moverse en sentido contrario, estrechando y adelgazando la parte media del cuerpo hasta que ésta se rompe dejando a las dos partes separadas conectadas solamente por un intestino remanente, el cual se rompe después. El segundo patrón implica la división del cuerpo en tres partes. El animal gira, retuerce y constriñe su cuerpo en ambos extremos, mientras que la parte media se hincha, un extremo realiza una torsión vigorosa y constante hasta que solo queden tiras delgadas de la pared corporal en la zona de constricción. El tercer patrón es el menos común, en el cual el animal se estrecha bruscamente en la parte media. Esta constricción se profundiza hasta que el animal queda dividido en dos partes, las cuales quedan vinculadas por una

delgada pared corporal, el animal completa su división girando y contrayendo su pared corporal alrededor de la región de la constricción (Giese *et al.* 1991).

1.2.2 Reproducción sexual

La reproducción sexual se lleva a cabo mediante ciclos sincronizados regulados por condiciones ambientales y hormonales; los cuales se pueden dividir en dos fases principales: la gametogénesis y el desove (Giese *et al.* 1974). Durante la gametogénesis, el proceso esencial es la transformación de células somáticas en células especializadas: óvulos en la hembra y espermatozoides en los machos (Giese *et al.* 1974). La gametogénesis depende principalmente del gasto energético de cada especie y la óptima asignación de energía entre el crecimiento somático y la síntesis de material reproductivo (Ramírez-Llodra 2002).

La diferenciación de las células germinales en gametos femeninos o masculinos está controlada por una neurohormona conocida como factor androgénico, la ausencia de este factor incide en la generación de gametos femeninos, en tanto para la generación de gametos masculinos es necesaria la presencia de este factor (Giese *et al.* 1974).

En las hembras de pepinos de mar el desove y la fecundación de los óvulos ocurre como parte de una serie de acontecimientos interconectados, los cuales son impulsados por una hormona endógena que se encarga de madurar los ovocitos. Con relación a los machos, actualmente se conoce poco sobre la regularización endócrina de la gametogénesis. Para que se lleve a cabo el desove, los estímulos externos son traducidos a funciones fisiológicas por medio del sistema nervioso. Probablemente los nervios radiales integran las señales ambientales controlando el

estímulo de los órganos internos. La fecundación es más efectiva cuando estos eventos ocurren sincrónicamente en una población local (Giese *et al.* 1991).

1.3 *Holothuria fuscocinerea*

Holothuria (Stauropora) fuscocinerea es una especie que se caracteriza por presentar un cuerpo que mide longitudinalmente entre 6 y 30 cm aproximadamente. La boca y el ano están dirigidos hacia la superficie ventral y posee veinte tentáculos ventrales largos. Los pies ambulacrales son cilíndricos y se encuentran localizados en la superficie ventral y las papilas se ubican en la superficie dorsal (Fig. 1). Esta especie cuenta con dos vesículas de poli y cuatro canales pétreos, cada uno conectado a una madreporita. La pared del cuerpo es suave, su grosor varía entre uno y cuatro milímetros y presenta espículas en forma de tablas de disco redondo o cuadrado y reducido (Fig. 1a).



Figura 1. Especimen de *Holothuria fuscocinerea* sobre sustrato arenoso. Foto: Medina Pedro. a) Espículas (Tomado de Hickman 1998).

El anillo calcáreo sólido ostenta placas radiales aproximadamente del doble de largo de la placa interr radial (Deichmann 1941, Rowe 1969). Batimétricamente *H. fuscocinerea* se distribuye en profundidades de 0 a 130 m y generalmente se encuentra sobre sustrato arenoso o sobre rocas, ya que se alimenta de depósitos, por tal motivo se asocia generalmente a sistemas coralinos. *H. fuscocinerea* se distribuye en las provincias zoogeográficas de Panamá e Indopacífica y geográficamente desde el Golfo de California hasta las Islas Galápagos en el Pacífico oriental, Australia, Islas Filipinas, Tonga y Guam en el Pacífico Occidental (Hickman 1998, Solís Marín *et al.* 2009).

Clasificación taxonómica:

Orden Aspidochirotida Grube, 1840.

Familia Holothuriidae Ludwig, 1894.

Género *Holothuria* Linnaeus 1767.

Subgénero *Stauropora* Rowe, 1969.

Especie *H. (Stauropora) fuscocinerea* Jaeger, 1833.

2. ANTECEDENTES

Los estudios en biología reproductiva se centran en especies tanto tropicales como comerciales, las cuales comúnmente pertenecen a la familia Stichopodidae y Holothuriidae (Herrero-Pérezrul *et al.* 1999).

Chao *et al.* (1994), realizaron estudios de reproducción y crecimiento de dos poblaciones de *Holothuria atra* al suroeste de Taiwán, encontrando diferencias en el

tamaño de los organismos que constituían dichas poblaciones. La población de organismos relativamente grandes, presentaban el tipo de reproducción preferentemente sexual, mientras que los organismos pequeños se reproducen de manera asexual. Mackey (2001) efectuó un estudio similar en el cual describió los factores que influyen en la reproducción específicamente de pepinos de mar, encontrando que el fotoperiodo, el ciclo lunar, la comunicación química entre organismos y la disponibilidad de alimento son los factores que determinan el desove de los organismos. En Indonesia Tuwo (1999) realizó la descripción del ciclo reproductivo de *Holothuria scabra* y propuso que esta especie tiene dos periodos de desove, uno cuando la temperatura se incrementa al comienzo de la época de secas y otro cuando la temperatura disminuye por el comienzo de la época de lluvias. Hoareau y Conand (2001) describieron la reproducción sexual de *Stichopus chloronotus* en el indo pacífico, Purwati y Luong-van (2003), realizaron la descripción del ciclo reproductivo para *Holothuria leucospilota* en Australia, aunque anteriormente se había documentado que estos holotúridos tenían una reproducción asexual. En los dos últimos estudios se determinó que los túbulos gonadales de cada individuo crecen simultáneamente teniendo oportunidad de realizar un desove, posteriormente los túbulos son reabsorbidos y es cuando se presenta la reproducción asexual.

Abdel-Razek *et al.* (2005) realizaron la descripción de la biología reproductiva de *Holothuria atra* en las costas del Mar Rojo en Egipto y mediante el análisis de la distribución mensual del tamaño de los ovocitos y los estados de madurez para ambos sexos, determinaron que esta especie presenta cuatro estados de madurez en su ciclo reproductivo. Dichos autores observaron que las gónadas se encontraban maduras durante todo el año, con un valor máximo de los índices de junio a

noviembre para machos y de junio a diciembre para hembras. Durante la época de desove se observaron los diámetros máximos en ovocitos y la talla de madurez fue de 15.5 a 16.5cm.

Cameron y Fankboner (1986) realizaron un trabajo en Canadá, en el cual describieron la periodicidad reproductiva y el comportamiento del desove en *Parastichopus californicus*. Los autores proponen que esta especie presenta una reproducción estacional, los desoves ocurren al término de la primavera y verano, el desove es parcialmente sincrónico y puede estar influenciado por la intensidad y duración de la luz.

Por otra parte, Hamel y Mercier (1996b) describieron la biología reproductiva de *Cucumaria frondosa* en condiciones de laboratorio, relacionando la madurez gonádica con la transferencia de energía de la pared corporal a la gónada, mediante mediciones realizadas con un calorímetro, concluyendo que al inicio de la gametogénesis hay una alta transferencia de energía hacia la gónada, la cual disminuye cuando comienza el desove.

Guzmán *et al.* (2003), describieron el ciclo reproductivo de dos especies de holoturoideos (*Isostichopus badionotus* y *Holothuria mexicana*) con importancia económica en Panamá, estimando la talla mínima de reproducción, y la distribución de tallas y peso en machos y hembras. En este mismo estudio describieron del ciclo gametogénico, reportando que el desove en ambas especies ocurre durante todo el año, detectando que existen dos periodos de máxima reproducción: de julio a noviembre en *I. badionotus* y de febrero a julio en *H. mexicana*.

Toral-Granda y Martínez (2007) describieron la biología reproductiva y la estructura poblacional de *Isostichopus fuscus* en las Islas Galápagos, Ecuador; los

autores documentaron que esta especie tiene una reproducción continua independiente de los cambios de temperatura del mar y describieron tres estados de madurez gonadal estimando que la madurez se encuentra entre los 161 a 170.9 g de peso.

En México, la mayoría de los estudios realizados están enfocados a taxonomía y ecología. Los pocos estudios relacionados se han enfocado en la reproducción y análisis de pesquerías de pepinos de mar, específicamente en *I. fuscus* y *Parastichopus parvimensis*.

Tapia-Vásquez *et al.* (1996) realizaron la descripción mediante un análisis histológico de la madurez gonádica de *P. parvimensis* en Baja California, encontrando que el proceso de reproducción ocurre en los meses de marzo a abril, con desove de junio a agosto y la maduración sucede a finales del invierno. También estimaron el índice de madurez en organismos con talla de 25 a 29 cm.

En el sur del Golfo de California Herrero-Pérezrul *et al.* (1999), describieron el ciclo reproductivo y el crecimiento de *I. fuscus*, proponiendo cinco estados de madurez sexual y determinaron que este holotúrido se reproduce anualmente durante el verano cuando la temperatura del agua alcanza los 27°C. De acuerdo a la relación entre talla-peso, los autores determinaron que la especie tiene un crecimiento alométrico.

Fajardo-León *et al.* (2008) describieron la biología reproductiva de *P. parvimensis* en dos localidades de Baja California Sur, en el estudio se identificaron cinco estadios de madurez sexual, los periodos de reproducción fueron sincrónicos en ambos sitios. La variación del índice gonadosomático se relacionó con el desarrollo gonádico. Los autores proponen que se establezca una época de veda

para proteger el evento de reproducción y otra para salvaguardar el proceso de ausencia/atrofia de órganos internos.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia económica, médica y alimenticia que poseen los pepinos de mar en el mercado oriental, se ha causado un declive en varias poblaciones de holoturias a nivel internacional (Conand 2004). En la región del Indo-Pacífico, la pesquería de pepinos de mar se ha realizado por siglos, lo cual ha originado una disminución drástica e incluso extinciones locales de poblaciones (Toral-Granda y Martínez 2007). Debido a esta caída en Asia, se impulsó la pesquería en América para satisfacer las demandas del mercado oriental, causando que poblaciones de *I. fuscus* fueron llevadas a su estado crítico, lo cual ha originado la explotación de otras especies (Ivy y Giraspy 2006; Laboy-Nieves y Conde 2006; Toral-Granda y Martínez 2007). Esto obliga a reconocer que la desaparición o agotamiento de las poblaciones es un asunto que requiere la atención de la comunidad científica y académica, por lo que es necesario estudiar la biología, ecología y reproducción de las especies antes de ser explotadas, para poder contar con el conocimiento que posteriormente permita proponer medidas de aprovechamiento sustentables.

4. HIPÓTESIS

Debido a que *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea* es una especie tropical, se espera que tenga un patrón de reproducción continuo, presentando sus máximos en los meses más calurosos del año.

5. OBJETIVOS

- Describir y caracterizar patrones de la biología reproductiva de *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea* Jaeger, 1833 en la Bahía La Entrega, Oaxaca. México, de abril 2008 a marzo 2009.

Específicos

- Estimar la proporción de sexos de *Holothuria fuscocinerea*.
- Identificar y describir el ciclo de madurez gonádica.
- Definir la estacionalidad del proceso reproductivo.
- Relacionar el índice gonadosomático con factores ambientales (Temperatura de fondo, Salinidad y Precipitación pluvial) para evaluar su influencia en el ciclo reproductivo.
- Describir la distribución del tamaño de ovocitos a lo largo del ciclo reproductivo.
- Estimar la fecundidad real.

6. ÁREA DE ESTUDIO

La Bahía La Entrega, es una de las nueve playas que conforman el complejo Bahías de Huatulco ubicado en la costa del estado de Oaxaca. Ésta bahía se localiza entre los 15°44'34'' Lat. Norte y los 96°07'35'' Long. Oeste (Fig. 2).

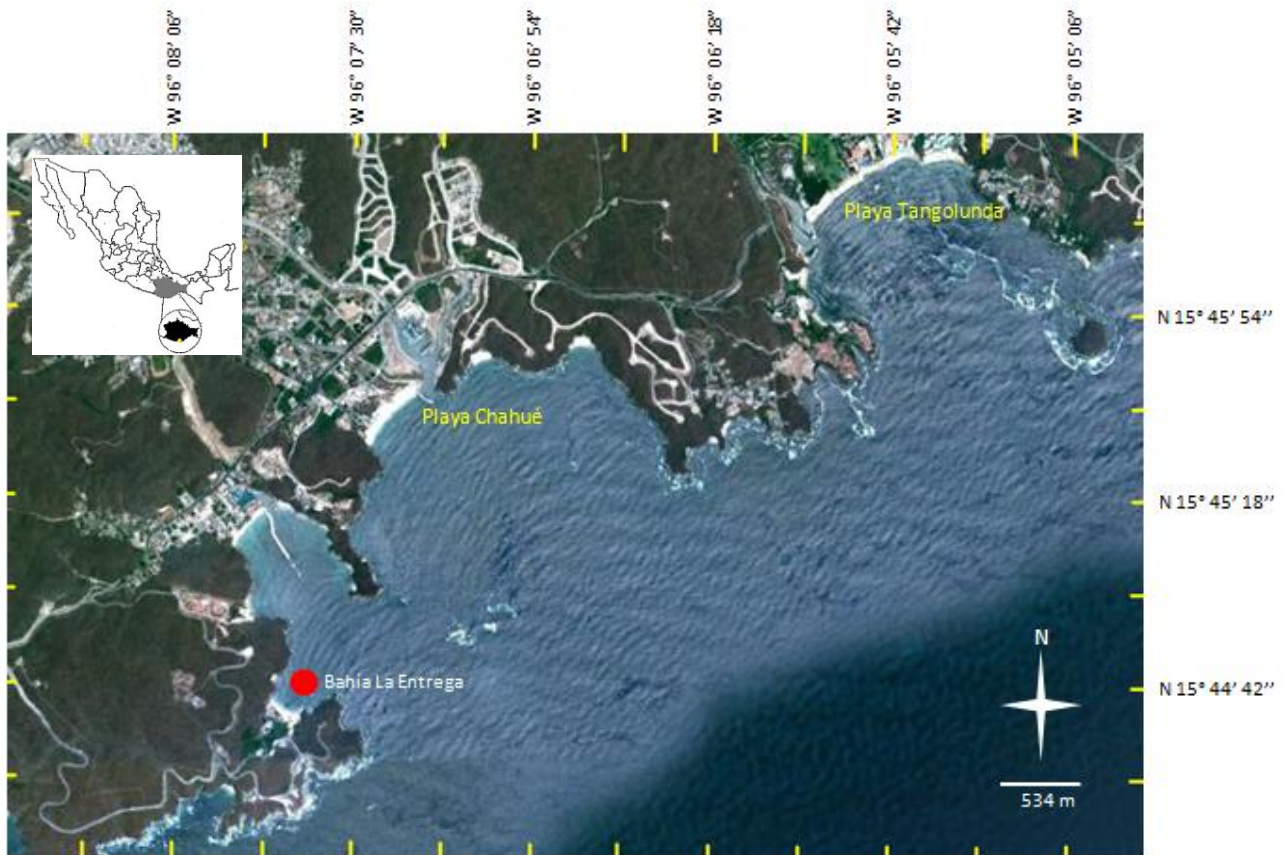


Figura 2. Mapa georeferencial del área de estudio. Modificado de Google Earth.

El clima que predomina en esta región según la clasificación Köppen modificada por García (1973) es del tipo cálido subhúmedo con lluvias en verano (Aw), la temperatura promedio anual varía de los 26° a 28° C. La precipitación promedio mensual durante la temporada de lluvias es de 1000 a 1500 mm., siendo la

precipitación promedio anual de 800 a 2000 mm. Los vientos dominantes van del sur hacia el este en forma anual (INEGI 2005).

El área de estudio está influenciada por diferentes corrientes oceánicas como la Corriente Costera de Costa Rica que fluye con dirección al Noroeste y la Corriente de California que fluye hacia el sur. Ésta última posee agua fría con baja salinidad (Fiedler 1992). La Bahía está conformada por tres tipos de agua: el agua tropical superficial que tiene como característica una temperatura mayor a 25° C y una salinidad de 35 ups, el agua subtropical superficial transportada por la Corriente de Costa Rica con una temperatura que varía de 15° a 28° C y una variación de salinidad de 33 a 36 ups y finalmente el agua de la Corriente de California con variaciones de temperatura de 12° a 18° C y salinidades de 24 ups (Wyrski 1965).

Dentro de la bahía se pueden diferenciar dos zonas: la zona arenosa y la zona coralina. La zona arenosa tiene una anchura entre 20 a 40 m y de 2 a 3 m de profundidad. En la zona de contacto entre esta zona y el comienzo del arrecife se encuentran fragmentos vivos y muertos de coral, procedentes de las estructuras principales (Leyte-Morales 2001). En la zona coralina el arrecife tiene una extensión de 324 m de largo por 233 m de ancho, posee una profundidad máxima de 13.3 m (Glynn y Leyte-Morales 1997) y está conformado por colonias de *Pocillopora damicornis*, *Porites* sp. y *Pavona* sp. El arrecife inicia con grandes colonias de coral que disminuyen a una profundidad de 1 m, posteriormente se continúa una plataforma que se hace más profunda hasta llegar a los 3 m en una extensión aproximada de 100 m. A partir de ahí se aumenta la profundidad hasta los 8 m donde termina el arrecife; en este punto hay una mayor cantidad de surcos y depresiones.

Después de la zona de arrecifes continua una plataforma de arena (Leyte-Morales 2001).

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Recolección de muestras

Se realizaron colectas mensuales de aproximadamente veinte organismos de *H. fuscocinerea* durante de abril 2008 a marzo 2008 en la bahía La Entrega, Huatulco, Oaxaca. La recolecta se realizó de forma manual por medio de buceo SCUBA, a una profundidad de 10 a 18 m, en la zona de la plataforma de arena adyacente al arrecife utilizando el método de búsqueda abierta (no se trazaron transectos, ni se utilizó una unidad de muestreo determinada). Los organismos se colocaron individualmente en bolsas de plástico marcadas con un número consecutivo y agua de mar para evitar que los órganos se mezclaran en caso de evisceración durante el traslado al laboratorio. En la Bahía se registró la salinidad con ayuda de un multiparámetros Mca. Hanna. Con un termógrafo sumergible (Data Logger) Mca. Onset Computer Corporation, se obtuvieron registros constantes de temperatura de fondo a intervalos de una hora. Los valores de precipitación pluvial para el área de estudio fueron proporcionados por el observatorio meteorológico, perteneciente a la Comisión Nacional del Agua, ubicado en la población de Puerto Ángel, Oaxaca.

7.2 Morfometría

En el laboratorio los organismos fueron colocados durante 12 hrs. en agua marina a 3° C para su relajación, posteriormente fueron disectados. Se registró el peso húmedo total (sin agua, incluyendo tegumento y órganos internos) y el peso húmedo de la gónada, mediante una balanza digital a 0.001 gr. de precisión. Estos datos se utilizaron para determinar el índice gonadosomático (IG) que se calculó a partir de la siguiente ecuación (Abdel-Razek *et al.* 2005):

$$IG = \left(\frac{P_{gonadal}}{P_{total}} \right) \times 100$$

Donde:

IG: Índice gonadosomático

P_{gonadal}: Peso gonadal total

P_{total}: Peso total del organismo

Los valores calculados del IG fueron analizados con pruebas estadísticas paramétricas una vez que cumplieron los supuestos de normalidad. Posteriormente se determinó si existía alguna diferencia significativa en los valores del índice gonadosomático considerando como factores el sexo (hembras y machos) y el tiempo (mes), mediante una prueba de ANDEVA de dos vías.

7.3 Índice gonadosomático y factores ambientales

Se realizó la cuantificación de la relación entre la variación mensual de la temperatura de fondo (Tf), salinidad (S) y precipitación pluvial mensual (Pp), (variables independientes), con la variación mensual del índice gonadosomático (IG)

de *H. fuscocinerea* (variable dependiente) mediante el modelo de regresión lineal múltiple paso a paso (Hair 1999), como se representa a continuación.

$$IG = \alpha + \beta_1 Tf + \beta_2 S + \beta_3 Pp$$

Donde:

IG: Índice gonadosomático calculado

α : Ordenada al origen en el modelo de regresión

β_1 , β_2 , y β_3 : Coeficientes que representan la contribución de cada una de las variables independientes en la predicción de la variable dependiente

Tf, *S* y *Pp*: Variables ambientales

7.4 Proceso histológico

Las gónadas recolectadas fueron procesadas mediante las técnicas histológicas de rutina I y II que se describen a continuación. La fijación de los tejidos se realizó por separado en solución de Bouin durante 72 horas y se preservaron en alcohol al 70% (Humason 1967, Muñeton-Gómez *et al.* 2000). Posteriormente se tomó una muestra de cada gónada, la cual se colocó en cajas para inclusión, debidamente etiquetadas.

7.4.1 Técnica Histológica de Rutina I.

Esta técnica abarca desde el momento posterior a la fijación de los tejidos (en este caso las gónadas), hasta que la pieza de tejido quedó embebida en algún material que sustituya completamente el agua. Existen varias técnicas para llevar a cabo dicho procedimiento, en el presente trabajo se utilizó la técnica de inclusión de rutina para Histokinette (Muñeton-Gómez *et al.* 2000).

Para llevar a cabo la deshidratación, las muestras fueron colocadas con alcohol etílico en sus diferentes concentraciones de manera consecutiva y posteriormente se incluyeron en parafina durante el tiempo indicado en la Tabla I.

Tabla I. Técnica de inclusión de rutina para Histokinette

Sustancia	Cambios	Tiempo
Alcohol etílico (R-OH) al 70%	2	1 hora cada uno
Alcohol etílico (R-OH) al 80%	1	1 hora
Alcohol etílico (R-OH) al 90%	2	1 hora cada uno
Alcohol etílico (R-OH) al 96%	2	1 hora cada uno
Alcohol etílico (R-OH) absoluto	2	1 hora cada uno
Hemo D	1	12 horas
Parafina fundida	2	3 horas cada uno

Una vez terminado el proceso de la última parafina las piezas se incluyeron con ayuda de cajas para inclusión. Una vez fríos y extraídos los bloques de parafina de los moldes, se conservaron en refrigeración hasta su corte. Posteriormente se cortaron a un grosor de 4 μm en un micrótopo semiautomático. Los cortes se realizaron cada 140 μm de manera que se realizaran al menos tres laminillas de cada gónada (Muñeton-Gómez *et al.* 2000).

7.4.2 Técnica Histológica de Rutina II

Los cortes obtenidos se colocaron sobre un portaobjetos al cual se le agregaron unas gotas de etanol al 70%, para facilitar el deslizamiento sobre la superficie del agua del baño de flotación, el cual se encontraba a una temperatura entre los 40 y 50°C. Una vez que el corte se extendió, se recuperó con otro portaobjetos debidamente rotulado para dejar secar a temperatura ambiente. Las laminillas obtenidas se llevaron a una estufa a 60°C durante 12 hrs con la finalidad que los cortes se adhirieran mejor al cristal. Las laminillas fueron teñidas utilizando la técnica Hematoxilina Eosina. En la tabla II se muestra los reactivos y tiempos utilizados para dicho procedimiento. Después de realizar la tinción, las laminillas fueron montadas con resina sintética (Muñeton-Gómez *et al.* 2000, Garrido-Fariña 2007).

Tabla II. Técnica de Tinción Hematoxilina Eosina

Sustancia	Cambios	Tiempo
Hemo-D	1	5 minutos
Alcohol etílico (R-OH) al 100%	2	5 minutos
Alcohol etílico (R-OH) al 96%	2	5 minutos
Alcohol etílico (R-OH) al 80%	1	5 minutos
Alcohol etílico (R-OH) al 70%	1	5 minutos
Agua Destilada	1	2 minutos
Hematoxilina de Harris	1	5 minutos
Agua Corriente	1	15 minutos
Alcohol ácido	Lavar	

Agua Destilada		Lavar
Carbonato de Litio		Lavar
Eosina	1	5 minutos
Agua corriente	1	2 minutos
Alcohol etílico (R-OH) al 96%	2	5 minutos
Alcohol etílico (R-OH) al 100%	2	5 minutos
Hemo-D	2	5 minutos

7.5 Descripción histológica de la gónada.

La estructura de las gónadas se examinó al microscopio óptico. Las fases o estadios de desarrollo gonádico se establecieron con base en las características celulares distintivas del núcleo, el citoplasma, la pared del epitelio folicular y el germinal. El ciclo reproductivo se definió con base en el reconocimiento y descripción de los tipos celulares de las gónadas, de acuerdo con los criterios utilizados por Kanatani y Nagahama 1983; Cameron y Fankboner 1986; Hamel *et al.* 1993, Herrero-Pérezrul *et al.* 1999; Abdel-Razek *et al.* 2005; Tehranifard *et al.* 2006; Asha y Muthiah 2008.

Con la información generada se crearon bases de datos, las cuales se analizaron con pruebas estadísticas para cerciorarse que los valores cumplieran con los supuestos de normalidad. Se estimó la proporción de machos y hembras en cada mes y durante el periodo de muestreo mediante una prueba de chi cuadrada (χ^2).

7.6 Análisis de Imágenes

Una vez identificados los tipos celulares en cada gónada, se midieron al menos 100 ovocitos seccionados a través del núcleo (diámetro Feret) usando el paquete de análisis de imágenes ImageJ. Con los datos obtenidos se elaboraron diagramas de frecuencia de talla de ovocitos para compararlos con los resultados obtenidos por el IG y comprobar una posible estacionalidad en la reproducción, estos datos también se utilizaron para calcular el volumen de los ovocitos de acuerdo con lo descrito por Ramírez-Llodra (2001).

7.7 Fecundidad

La fecundidad se determinó con base en el método utilizado por Ramírez-Llodra (2001), estimándose a partir de la relación del volumen medio de los ovocitos y el volumen de la gónada para cada hembra. Para establecer las diferencias significativas en los valores de la fecundidad entre los meses muestreados se aplicó un análisis de varianza de dos vías (sexo y mes como factores)

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

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

Donde:

VO: Volumen de los ovocitos.

R: Radio de los ovocitos.

El volumen de las gónadas se determinó mediante el método de desplazamiento de fluido de Mohr-Westphal (Scherle 1970). Estos datos fueron utilizados para calcular la fecundidad, relacionando el volumen de los ovocitos y el volumen de las gónadas.

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

Donde:

P : Relación entre ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos.

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

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

Si se asume que P medido en una muestra de la gónada es el mismo que P en el ovario completo, entonces

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

Donde:

F_{pvo} : Número total de ovocitos

F_{vo} : Número total de ovocitos vitelogénicos

El volumen de la gónada es equivalente al número de ovocitos multiplicado por su volumen

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

Reemplazando F_{pvo} en la ecuación 2 con su definición en la ecuación 1, se obtiene:

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

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

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

8. RESULTADOS

H. fuscocinerea es un organismo gonocórico; sin presencia de dimorfismo sexual externo. Posee una gónada impar unida al mesenterio dorsal, localizada en la parte anterior derecha entre la pared corporal y el intestino, quedando libre en el celoma (Fig.3a). La gónada está constituida por numerosos tubos ramificados de diferentes tamaños unidos a una base gonadal compuesta principalmente de tejido conectivo (Fig.3b).

Durante el ciclo gametogénico las gónadas presentaron cambios paulatinos en la intensidad de color y tamaño. Los ovarios mostraron una coloración de naranja brillante a naranja pálido. A su vez en los testículos se observó una coloración que varía de crema a transparente. Los valores máximos de índice gonadosomático se alcanzaron cuando la gónada aparentemente estaba madura, mientras que en el periodo de reposo se absorbió casi en su totalidad, presentando los valores más bajos de IG.

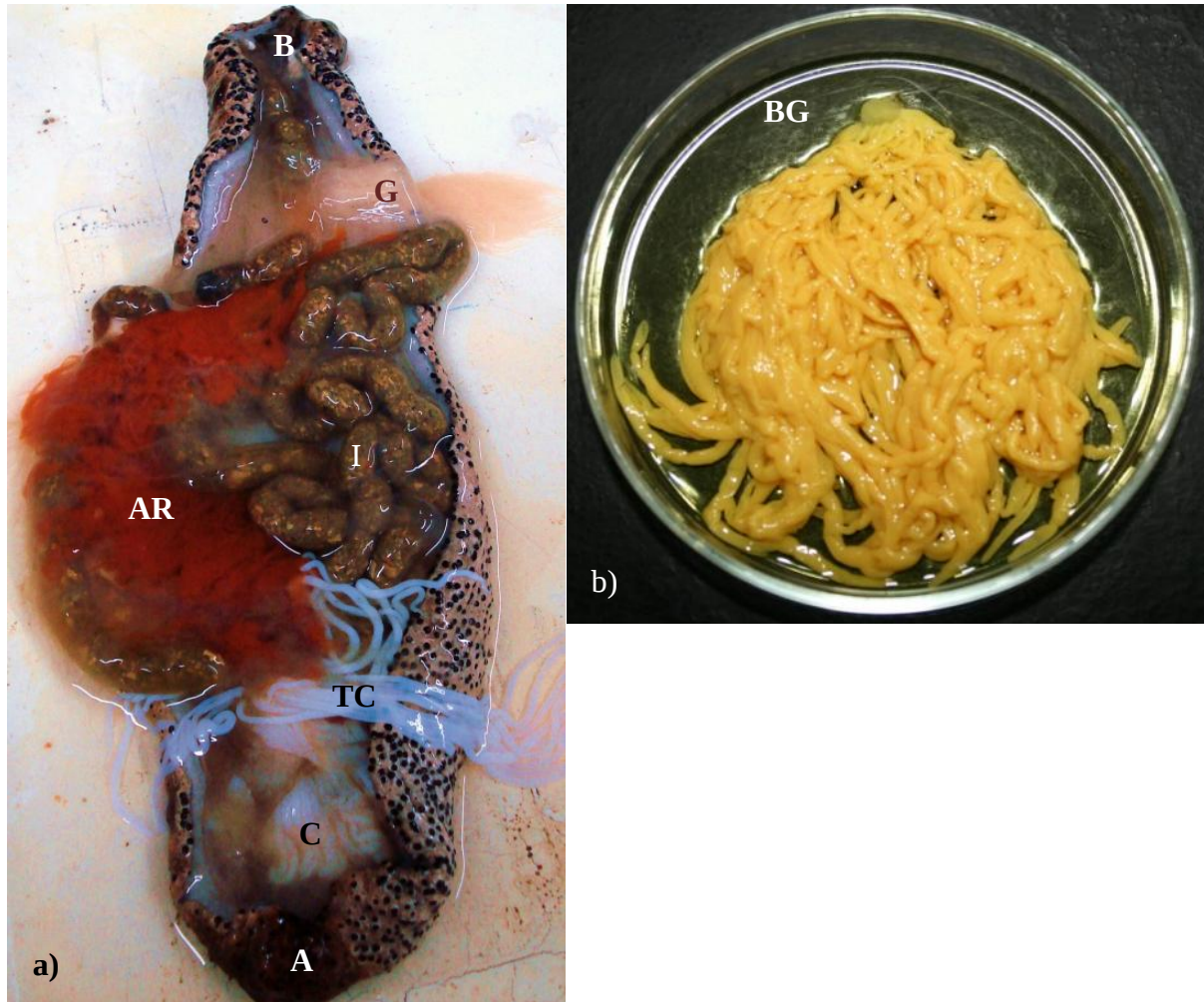


Figura 3. a) Disección de un ejemplar de *H.fuscocinerea*; mostrando el posicionamiento de la gónada en el organismo, A) Ano, AR) Árbol Respiratorio, B) Boca, C) Cloaca, G) Gónada, I) Intestino, TC) Túbulos de Cuvier.; b) Estructura externa de la gónada, BG) Base Gonadal.

8.1 Proporción de sexos

Se examinaron 267 individuos, de los cuales el 46.44% fueron machos, el 45.32% fueron hembras y el 8.24% fueron indiferenciados (Fig. 4). En la proporción mensual de organismos sexados, la proporción sexual total obtenida durante el periodo de muestreo no fue significativamente diferente de la distribución esperada ($\chi^2=20.492$, g.l.=13, $P=0.084$), por lo tanto la proporción de sexos no difiere de 1:1.

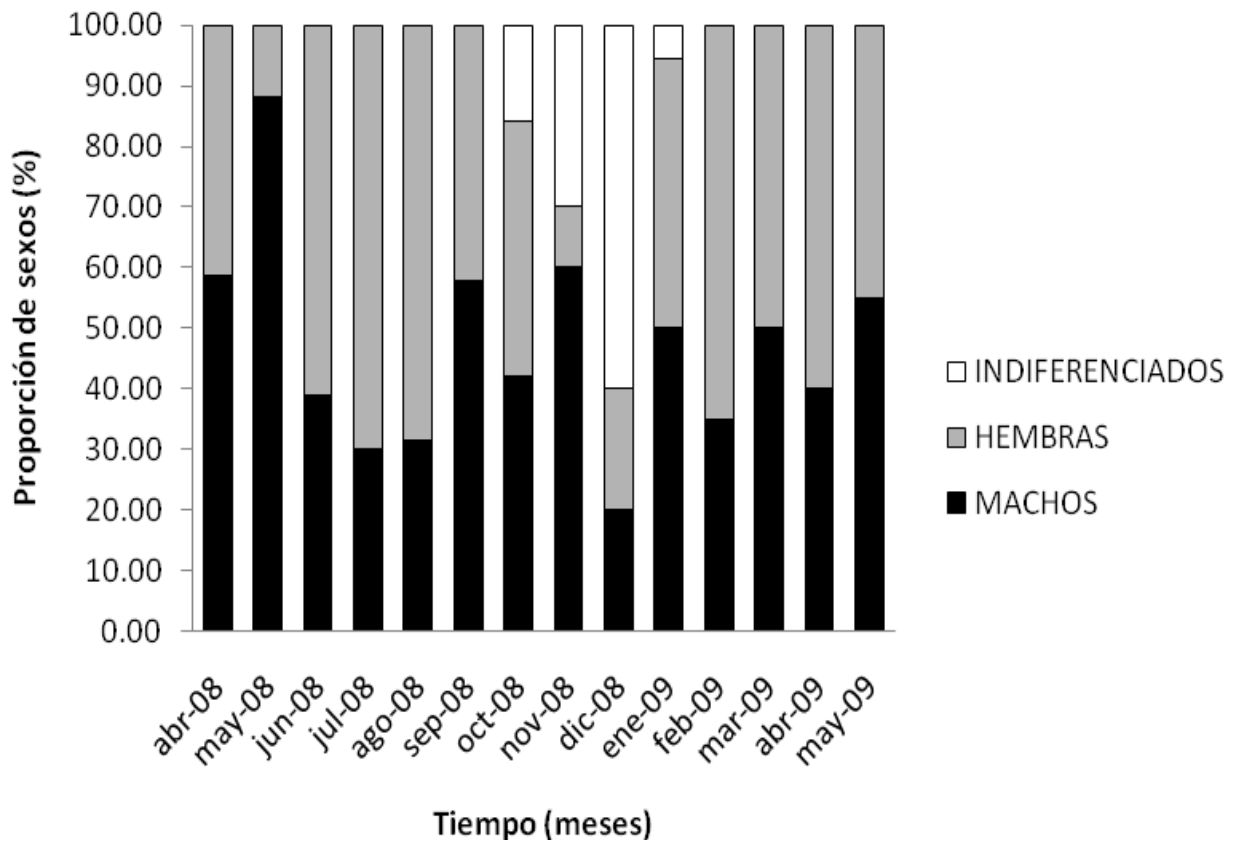


Figura 4. Proporción de hembras, machos e indiferenciados por mes (abril 2008 a mayo 2009).

8.2 Descripción del ciclo reproductivo

El ciclo reproductivo de *H. fuscocinerea* presentó un patrón anual para ambos sexos, distinguiéndose un ciclo completo y el comienzo de otro. Con base en las características morfológicas e histológicas observadas se identificaron y describieron cinco estadios de desarrollo gonadal para ambos sexos: en desarrollo (espermatogénesis y ovogénesis), madurez, desove, post desove e indiferenciado.

Estadio I. En desarrollo:

Este estadio comenzó para ambos sexos en enero y terminó en mayo de 2009. El porcentaje máximo de organismos machos en esta etapa (18.37%) se presentó en enero y marzo de 2009 y en el caso de las hembras se presentó en febrero 2009 (26.00%). Conforme avanzó esta etapa el IG comenzó a aumentar.

- Espermatogénesis: La gónada presentó una coloración blanquecina. El peritoneo era grueso por la presencia de tejido conjuntivo y presentó invaginaciones (vellosidades). En la periferia de los folículos se pudo diferenciar una línea fuertemente teñida, constituida por una alta concentración de espermatogonias. Posteriormente se observaron los espermatocitos primarios de forma ovoide con una consistencia grumosa y finalmente se encontraban en el lumen las espermátidas, las cuales son más pequeñas. Conforme avanzó éste estadio se pudo observar al centro del lumen concentración de espermatozoides, incrementando conjuntamente la talla de la gónada (Fig. 5a).

Ovogénesis: La gónada presentó túbulos de color naranja pálido, el peritoneo era grueso por la presencia de tejido conjuntivo que gradualmente se fue absorbiendo. En la periferia folicular hubo presencia de ovogonias, las cuales eran células esféricas que formaban el epitelio germinal y se encontraban unidas a éste, pudiéndose distinguir claramente su material nuclear. En los ovocitos previtelogénicos, el núcleo era grande y poseía un nucléolo periférico. La maduración celular como en el caso de machos ocurre hacia el centro del lumen (Fig. 5b).

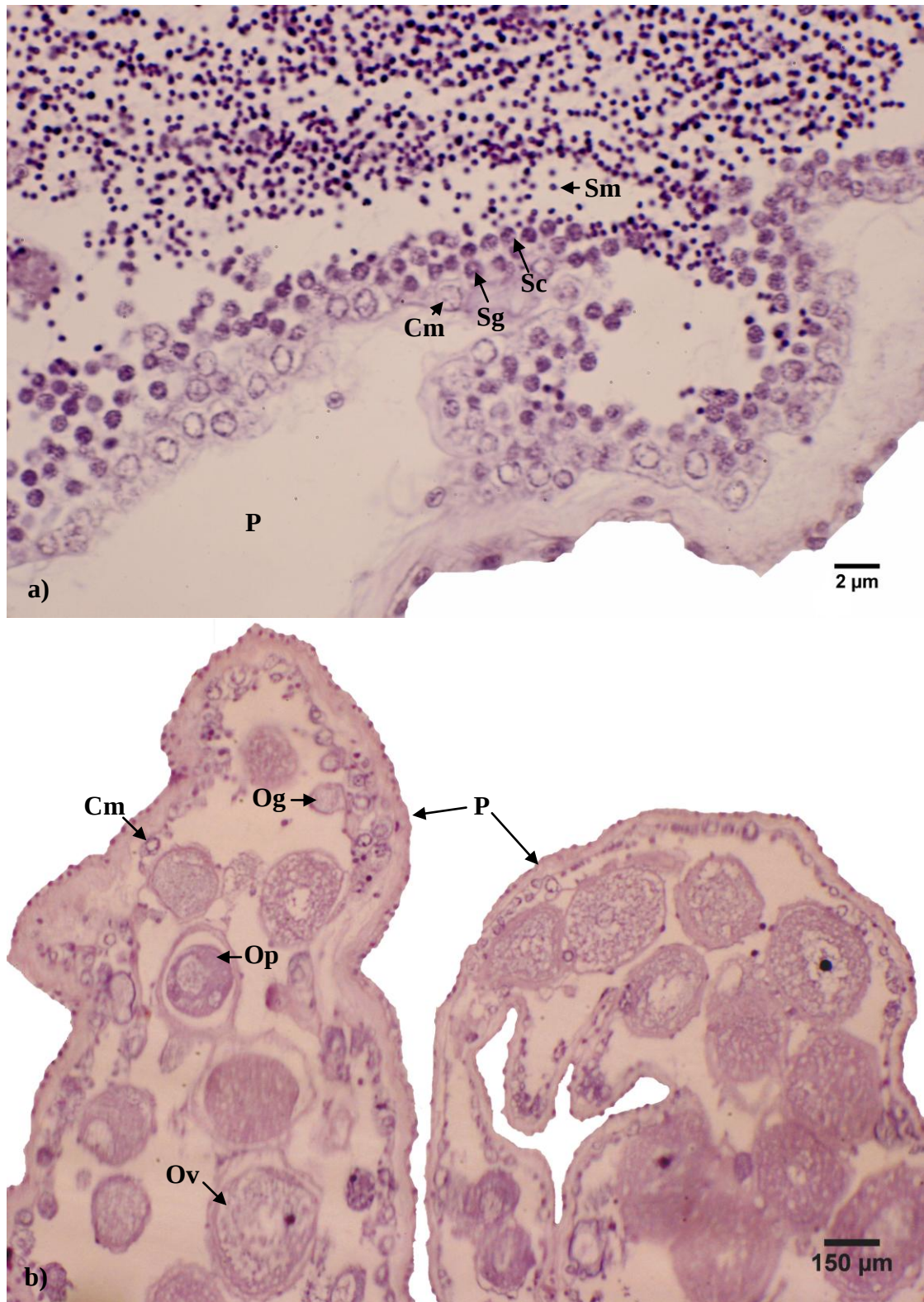


Figura 5. Gónadas de *H. fuscocinerea* en estadio de Gametogénesis. a) Macho, b) Hembra. Cm. Célula Madre; Og. Oogonia; Op. Ovocito previtelogénico; Ov. Ovocito vitelogénico; P. Peritoneo; Sc. Espermatocito; Sg. Espermatogonia; Sm. Espermátida; Sz. Espermatozoide.

Estadio III. Madurez:

La gónada se caracterizó por ser turgente y alcanzó su talla máxima durante esta etapa, presentó una coloración intensa, crema en machos y naranja en hembras. Las paredes de los túbulos se observaban muy delgadas. En los machos el lumen se encontraba completamente lleno de espermatozoides, sin embargo en la periferia se pudo observar una línea delgada de espermatoцитos y espermátidas (Fig. 6a). El IG alcanzó su valor máximo durante esta etapa.

Los ovarios presentaron ovocitos previtelogénicos en menor proporción, orientados hacia la periferia de los túbulos. En el lumen se observó gran cantidad de ovocitos vitelogénicos, los cuales no dejaban espacios vacíos, el núcleo de dichos ovocitos presentó un nucléolo periférico (Fig. 6b).

La madurez comenzó primero en machos en el mes de abril y terminó en junio del 2008, posteriormente se volvió a presentar de marzo a mayo de 2009. El máximo porcentaje de gónadas masculinas (40.91%) en este estadio ocurrió en mayo de 2009. En el caso de las hembras el estadio de madurez abarcó de mayo a septiembre de 2008 y de marzo a mayo de 2009, con un porcentaje máximo de ocurrencia en junio de 2008 (38.67%).

Estadio IV. Desove:

La gónada poseía una coloración menos intensa y semitransparente. Durante esta etapa tanto en machos como en hembras, las paredes de los túbulos se fueron engrosando y formando pliegues, el lumen presentó espacios vacíos debido a la liberación de gametos y hubo una proliferación de fagocitos en las paredes de los túbulos. En esta etapa se puede observar en

la pared gonadal la presencia de estereocilios, los cuales posiblemente facilitaban la expulsión de gametos al momento del desove. Los gametos no liberados durante el desove perdieron paulatinamente su tamaño y forma característica, ocurriendo una aparente lisis celular (Fig.7). Debido a la liberación de gametos el IG disminuyó considerablemente.

El desove en machos ocurrió en los meses de abril a septiembre de 2008, con un porcentaje máximo del 29.73% en agosto del mismo año. Para las hembras, la liberación de gametos comenzó en junio y concluyó en octubre de 2008. El máximo de ocurrencia de individuos (36.67%) en esta etapa fue en julio de 2008.

Estadio V. Post-Desove:

Para ambos sexos, la coloración de las gónadas se volvió más tenue y transparente, los túbulos presentaron una disminución notable en diámetro y longitud. Este estadio se caracterizó por la presencia de una gran cantidad de fagocitos reabsorbiendo los gametos no desovados y por la presencia de atresias que aparecieron como aglomeraciones de células esféricas de color marrón. La capa de tejido conectivo se hizo más evidente y dentro del mismo se alcanzaron a distinguir concentraciones de células que aparentemente eran granulocitos eosinófilos (Fig.8). La fase de post desove en algunos machos se presentó en julio 2008. Posteriormente se presentó de octubre a noviembre del mismo año, con un porcentaje máximo (66.67%) en noviembre de 2008. En el caso de las hembras, ocurrió en los meses de octubre a diciembre del 2008. Las gónadas femeninas alcanzaron un máximo porcentaje de ocurrencia (75.00%) en esta etapa en octubre de 2008.

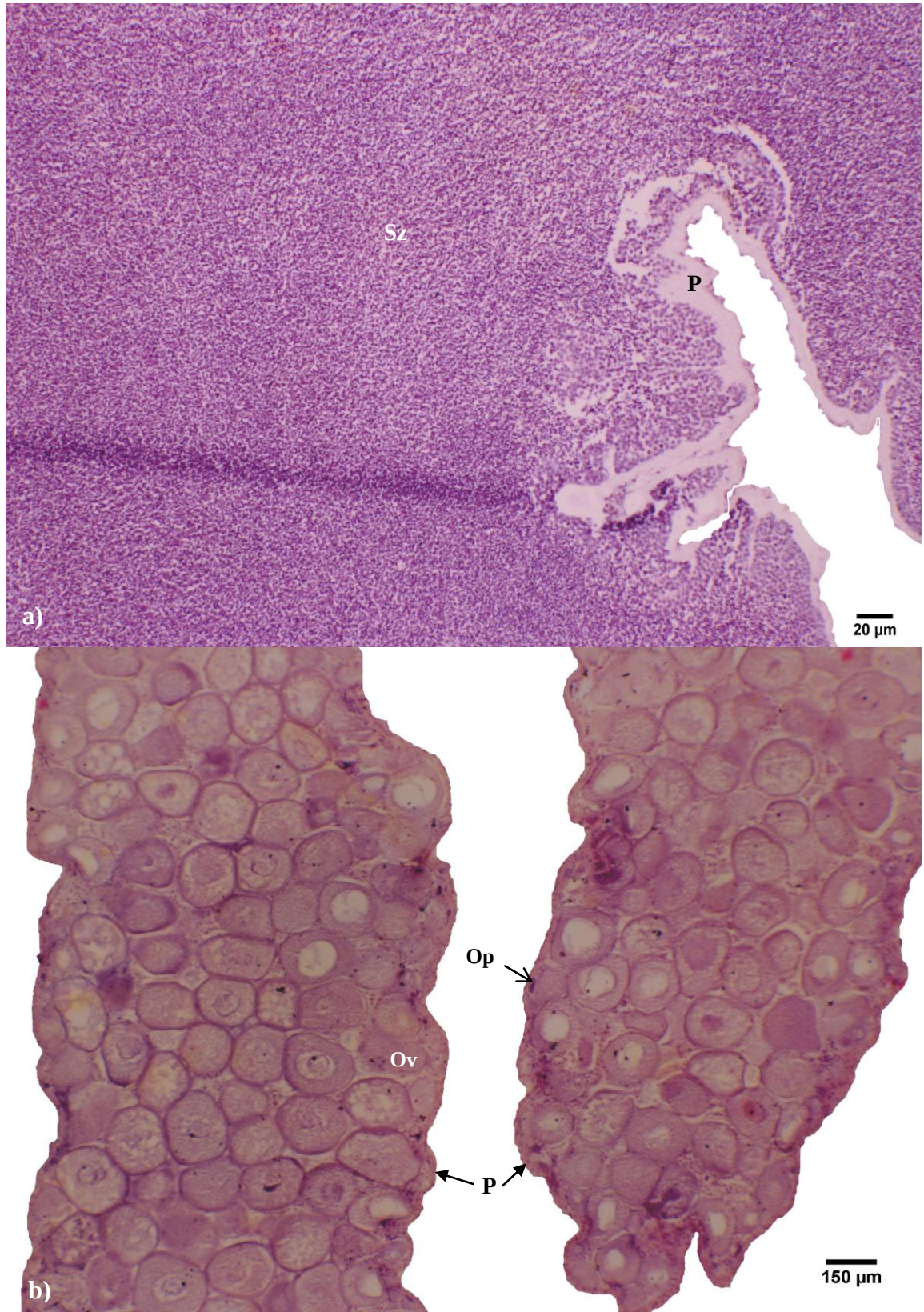


Figura 6. Gónadas de *H.fuscocinerea* en estadio de Madurez. a) Macho, b) Hembra. O. Ovocito vitelogénico; Op. Ovocito previtelogénico; P. Peritoneo; Sz. Espermatozoide.

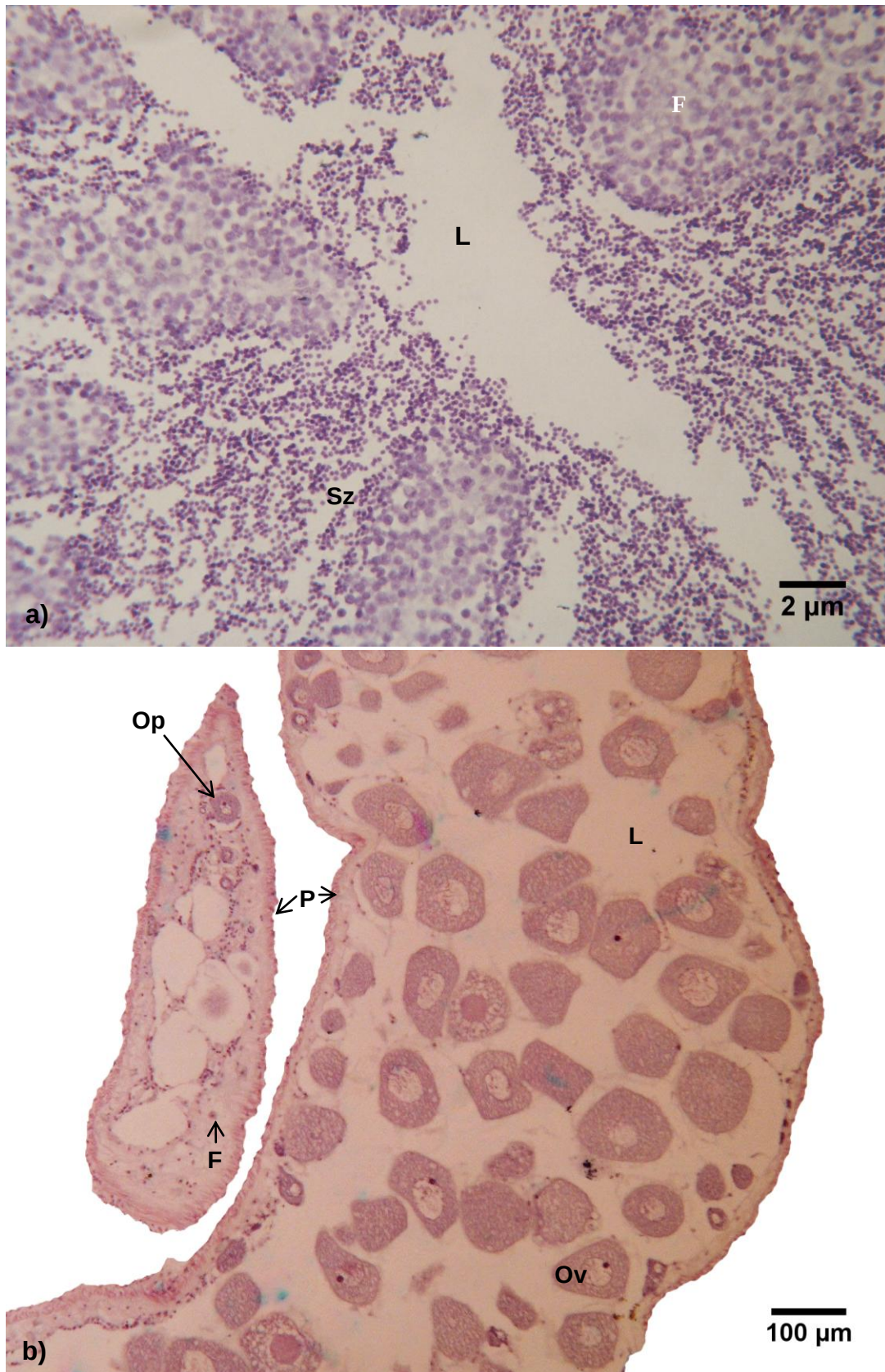


Figura 7. Gónadas de *H.fuscocinerea* en estadio de Desove. a) Macho, b) Hembra. F. Fagocitos; L. Lumen; Op. Ovocito previtelogénico; O. Ovocito vitelogénico; P. Peritoneo; Sz. Espermatozoide.

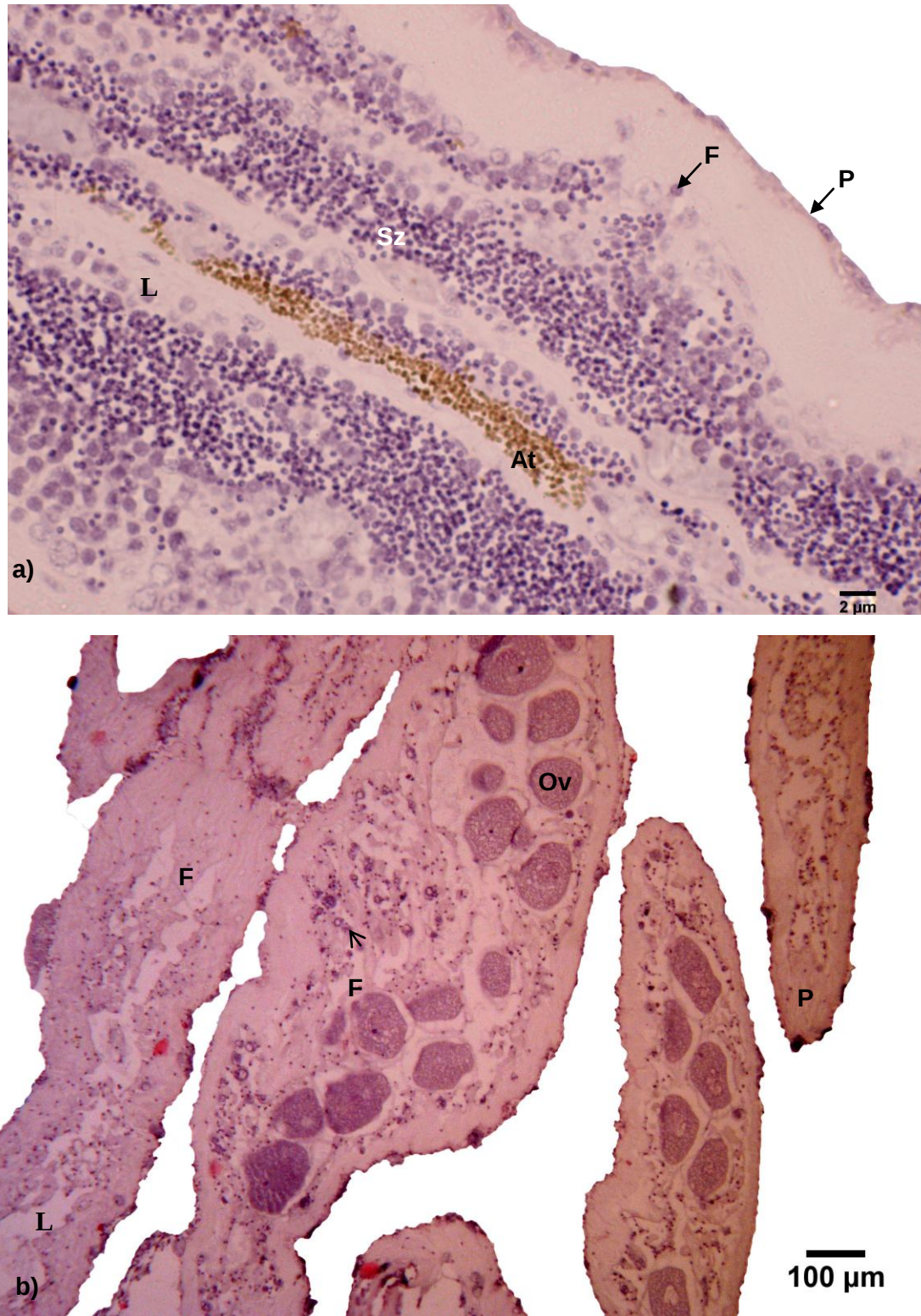


Figura 8. Gónadas de *H.fuscocinerea* en estadio de Post-Desove. a) Macho, a) Hembra. At. Atresia; F. Fagocitos; L. Lumen; O. Ovocito vitelogénico; P. Peritoneo; Sz. Espermatozoide.

Estadio VI. Indiferenciado o en reposo:

La gónada alcanzó los valores más bajos de longitud y peso y mostró una coloración transparente. En algunos casos se observaron manchones color marrón, los cuales probablemente representaban concentración de pigmentos característica del estadio. Las paredes de los túbulos se observaron muy gruesas debido a la gran cantidad de tejido conectivo que se hizo más evidente. Dentro de este tejido aumentó la concentración de fagocitos y las concentraciones de posibles granulocitos eosinófilos (com. pers. Garrido-Fariña). No hubo presencia de células germinales, sin embargo se observó una alta proliferación de atresias (Fig. 8). Finalmente en los meses de octubre 2008 a enero de 2009 se presentó el estadio indiferenciado el cual es la última etapa del ciclo reproductivo dando lugar a un nuevo ciclo. El mayor porcentaje de organismos indiferenciados (52.63%) se presentó en diciembre.

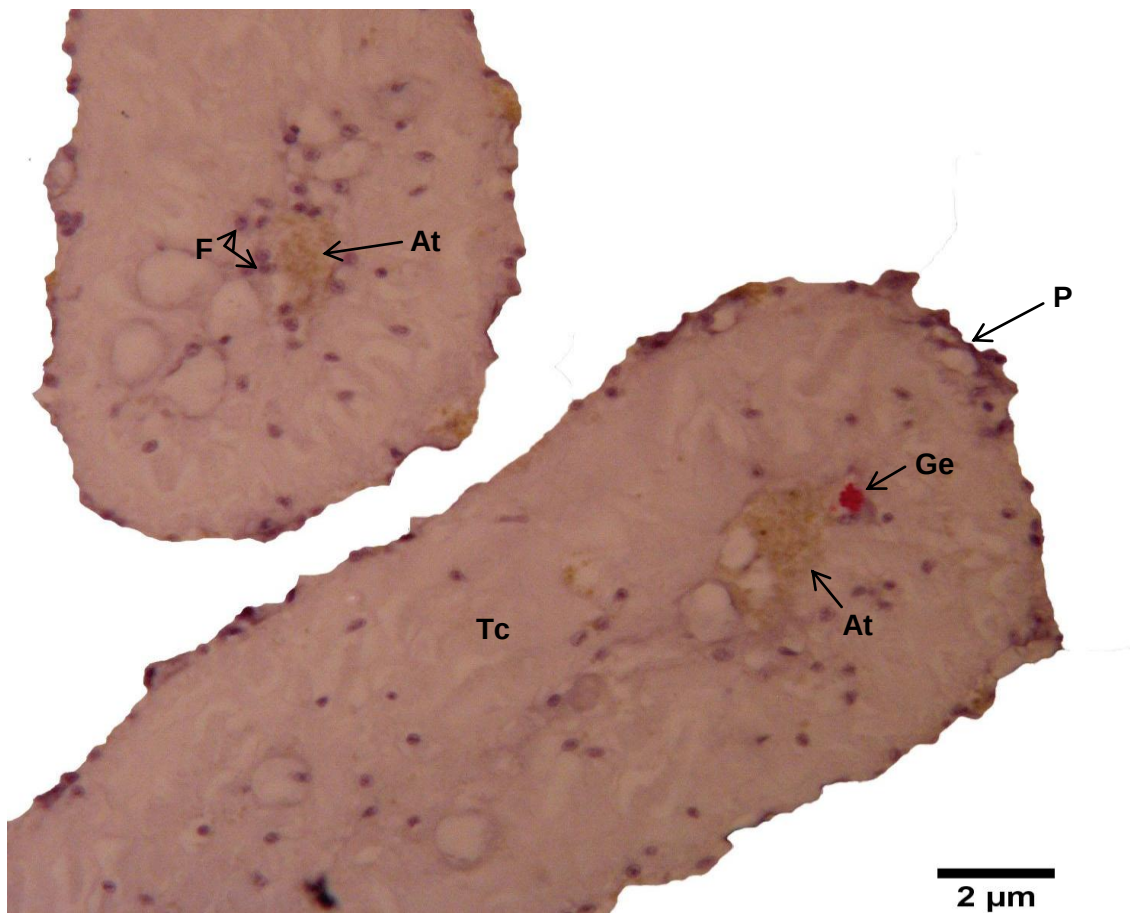


Figura 9. Gónadas de *H. fuscocinerea* en el estadio indiferenciado o en reposo. At. Atresia; F. Fagocitos; Ge. Granulocito eosinófilo; P. Peritoneo; Tc. Tejido conectivo

8.3 Índice Gonadosomático

El índice gonadosomático presentó una tendencia similar en ambos sexos. Los machos presentaron IG con valores de 0.568 a 9.980 y las hembras valores en un intervalo de 0.560 a 16.845. Al analizar los valores por sexos y mes se encontraron diferencias significativas ($F_{(1,232)}=33.857$; $P<0.05$) entre machos y hembras. Los valores de IG de las hembras se observaron más altos en los meses de mayo y junio de 2008 y marzo a mayo de 2009, principalmente cuando las gónadas se encontraban en los estadios I y II. Así mismo, los valores del IG mostraron diferencias significativas entre meses ($F_{(13,232)}=56.340$; $P<0.05$). La

caracterización del ciclo reproductivo comenzó en abril de 2008, cuando los valores del IG incrementaron sus valores hasta alcanzar un máximo en junio de 2008, posteriormente decreció abruptamente en el mes de julio, aumentando su valor en agosto. En el periodo comprendido de septiembre a diciembre de 2008 los valores disminuyeron considerablemente. Cabe destacar que en diciembre se presentaron los niveles más bajos de IG debido a la reabsorción de las gónadas. En enero de 2009 los valores de los índices comenzaron a incrementarse debido al inicio de la producción de gametos (Fig.10).

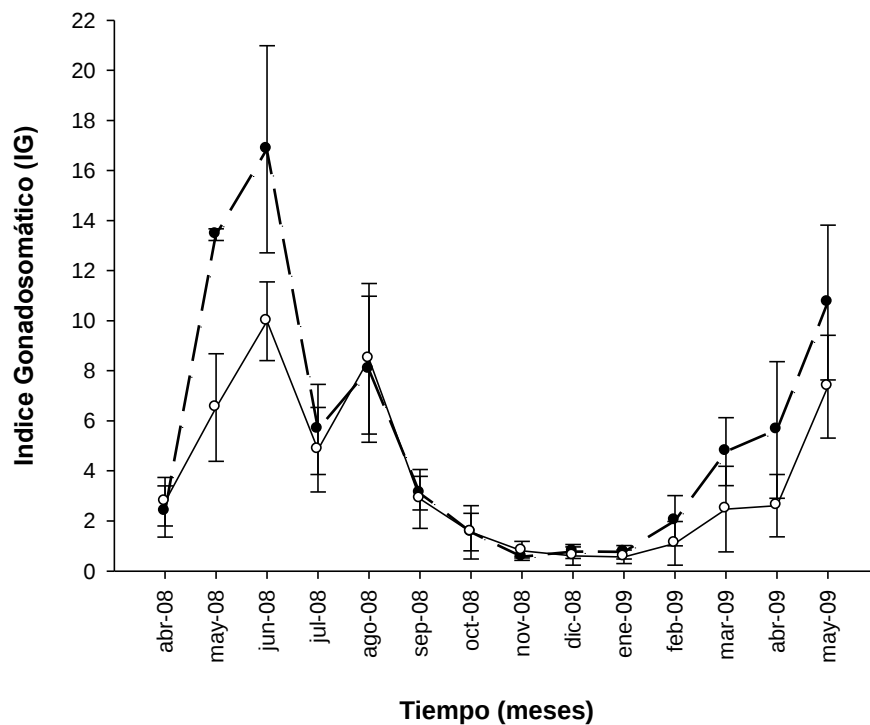


Figura 10. Comportamiento mensual del índice gonadosomático (IG) de hembras (línea discontinua con punto negro) y machos (línea solida con punto blanco) de *H. fuscocinerea* durante el periodo de muestreo.

8.3.1 Índice gonadosomático y factores ambientales

Durante el tiempo de muestreo la temperatura promedio ($\pm$ DE) fue de $26.7 \pm 2.2^\circ\text{C}$. El valor más alto (29.9°C) se registró en el mes de junio de 2008 y el más bajo (23.5°C) fue registrado en abril de 2009 (Fig.11). La precipitación pluvial (Pp) media fue de $97.7 \text{ mm} \pm 146.0 \text{ mm}$. En el mes de julio 2008 se presentó el nivel máximo con un valor de 448.9 mm mientras que en los meses de noviembre 2008 a abril 2009 hubo ausencia total de lluvia (Fig. 12). En el caso de la salinidad (S) la media registrada ($\pm$ DE) fue de 31.5 ± 3.1 , siendo 34.5 el valor más alto registrado en diciembre 2008 y el más bajo 25.4 en junio 2008 (Fig.13).

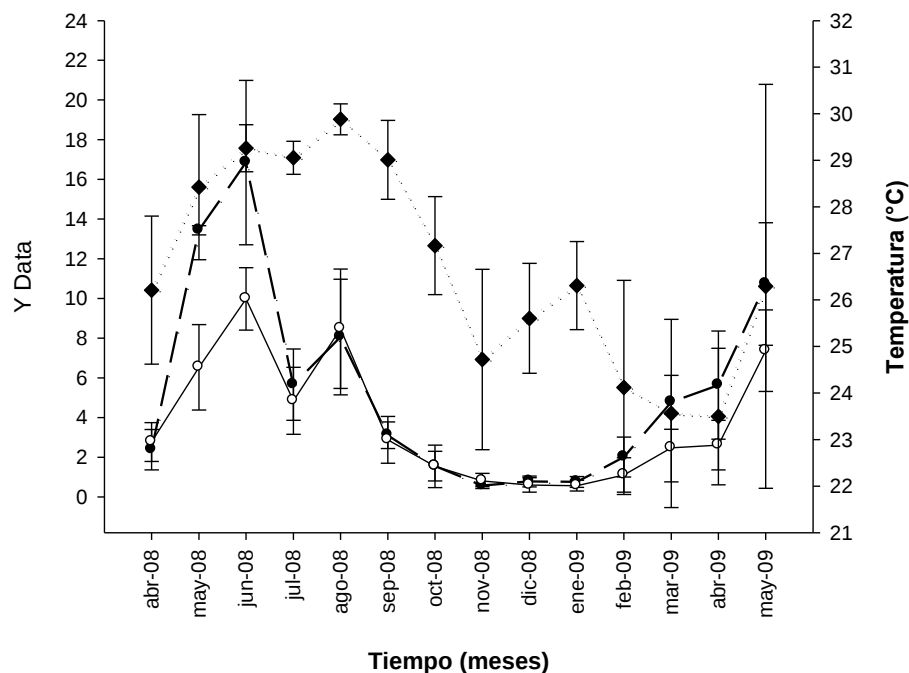


Figura 11. Comportamiento mensual del Índice Gonadosomático (IG) de *H. fuscocinerea* de hembras (línea discontinua con punto negro), machos (línea sólida con punto blanco) y la temperatura ($T^\circ\text{C}$) (línea punteada con rombos negros) registrada durante el periodo de muestreo.

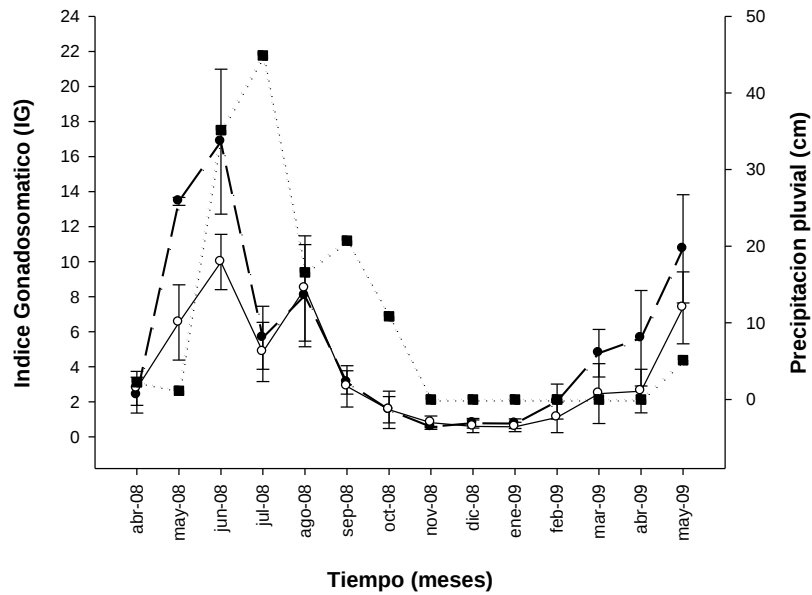


Figura 12. Comportamiento mensual del Índice Gonadosomático (IG) de *H. fuscocinerea* de hembras (línea discontinua con punto negro), machos (línea sólida con punto blanco) y la precipitación pluvial (cm) (línea punteada con cuadros negros) registrada durante el periodo de muestreo.

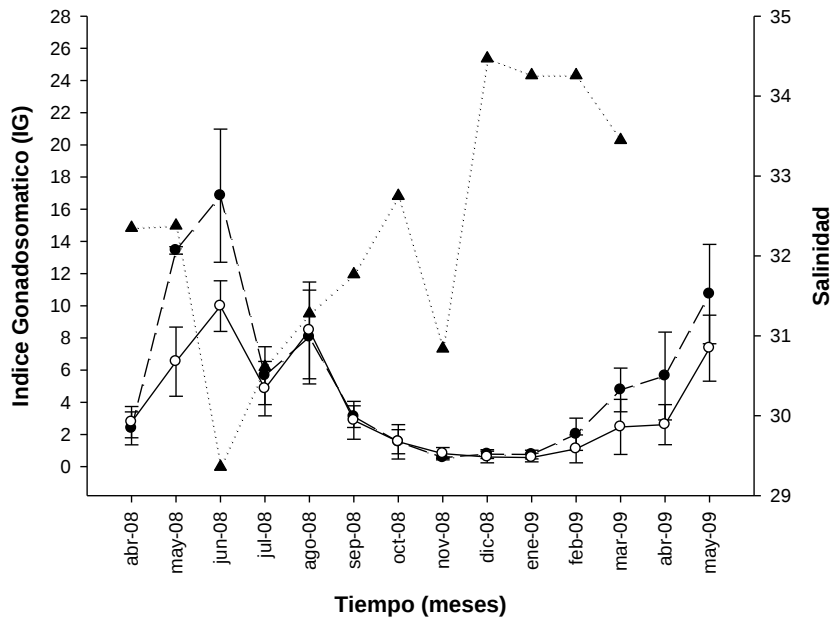


Figura 13. Comportamiento mensual del Índice Gonadosomático (IG) de *H. fuscocinerea* de hembras (línea discontinua con punto negro), machos (línea sólida con punto blanco) y la salinidad (S) (línea punteada con triángulos) registrada durante el periodo de muestreo.

El modelo de regresión lineal múltiple a dos pasos ($IG = 180.44 - 1.5 S - 0.83 Pp$) indicó que la variación total explicada sobre el IG en términos de las variables ambientales seleccionadas (S y Pp) fue de 94.10%, con un valor de correlación múltiple de 0.83 y un p múltiple <0.05 . La varianza total explicada incrementó 66.49% (con un $r = 0.8154$, $p < 0.05$) en un primer paso al adicionar el predictor S . la contribución parcial del predictor Pp para explicar la variación en el IG fue de 22.06% (Tabla III).

Tabla III. Resumen de la regresión lineal múltiple paso a paso.

Variable	Variable	R múltiple (R_m)	R^2 múltiple (R^2_m)	Incremento de R^2_m	p-level	Variables incluidas
1	S	0.815455	0.664967	0.664967	0.025373	1
2	Pp	0.941077	0.885625	0.220658	0.049923	2
3	Tf	0.923077	0.923077	0.037452	0.313399	3

8.4 Distribución de tallas de los ovocitos

Durante el periodo de muestreo, la distribución de tallas siguió una tendencia similar al patrón de comportamiento del índice gonadosomático y al estadio gametogénico en que se encontraban los organismos. La talla promedio de los ovocitos fue de $117.70 \pm 53.27 \mu m$ siendo la talla mínima $1.5 \mu m$ y la máxima alcanzada $408.30 \mu m$. Los ovocitos inmaduros obtuvieron una talla promedio de $61.46 \pm 9.83 \mu m$ y los ovocitos vitelogénicos un diámetro promedio de $121.49 \pm 31.37 \mu m$.

La talla de ovocitos desovados se encuentra dentro de la clase de tallas de 245.30 a 285.30 μm .

Los ovocitos inmaduros se presentaron durante la gametogénesis en el mes de abril y mayo de 2008, con la mayor frecuencia de tallas (35.4% y 46.27% respectivamente) en la clase de 41.85 a 82.53 μm . Cuando las gónadas se encontraron maduras (junio de 2008) la mayor frecuencia de tallas (27.10%) se ubicó de 123.22 a 163.90 μm , posteriormente en el estadio de desove que se presentó en los meses de julio, agosto, septiembre y octubre de 2008, la clase de tallas más frecuentes fueron de 82.53 a 123.21 μm para julio y agosto (53.24% y 55.24% respectivamente) y 123.22 a 163.90 μm para septiembre y octubre (63.45% y 53.24% respectivamente). En el mes de noviembre de 2008 comenzó la etapa de post desove con una mayor frecuencia (55.40%) de ovocitos en degeneración, con tallas de 82.53 a 123.21 μm . En diciembre se obtuvieron las tallas más pequeñas con una mayor frecuencia de la clase de 1.15 a 41.84 μm (49.28%). Posteriormente en enero y febrero de 2009 comenzó nuevamente la gametogénesis, los ovocitos más frecuentes (58.21%) midieron entre 123.22 y 163.90 μm y 41.85 a 82.53 μm (37.62%) respectivamente. En una fase más avanzada de la gametogénesis presente en marzo, abril y mayo de 2009 el mayor porcentaje de frecuencia de tallas (42.20%, 37.20% y 46%) se movió a la clase de 123.22 a 163.900 μm (Fig.14).

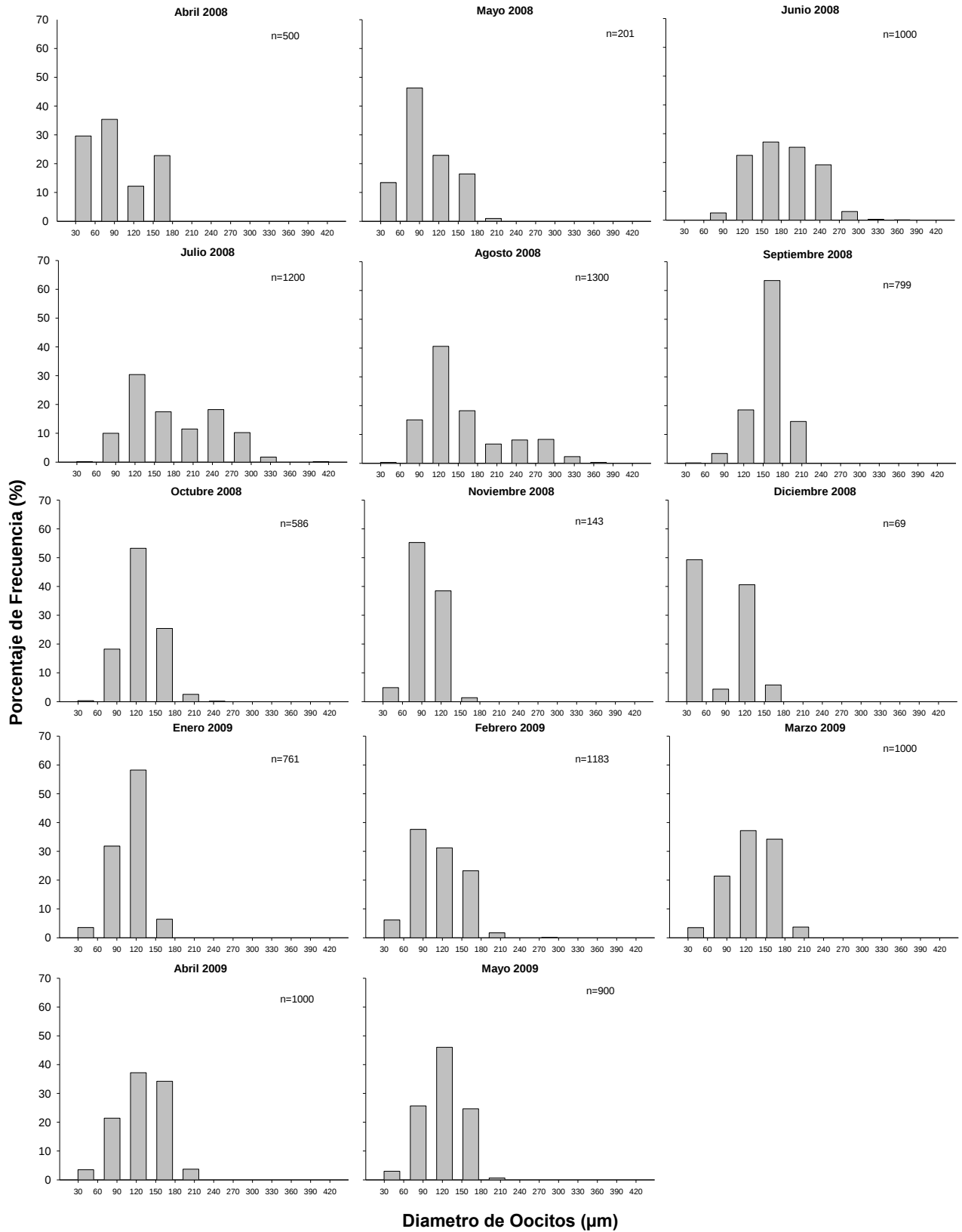


Figura 14. Distribución de las frecuencias de tallas de ovocitos de *H. fuscocinerea* en los meses muestreados.

8.5 Fecundidad

La fecundidad anual promedio fue de $8'096,392 \pm 1'138,522$ ovocitos vitelogénicos por hembra. El valor máximo de fecundidad se obtuvo en mayo de 2009 ($25'617,600$) y el mínimo se presentó en abril de 2008 ($200,032$). En el mes de junio se observó un valor alto en la fecundidad, disminuyendo en julio. En agosto los valores se incrementaron nuevamente y disminuyeron drásticamente en el mes de septiembre, manteniéndose bajos hasta el mes de febrero, cuando los valores volvieron a incrementar y continuaron en aumento los meses siguientes (Fig. 15).

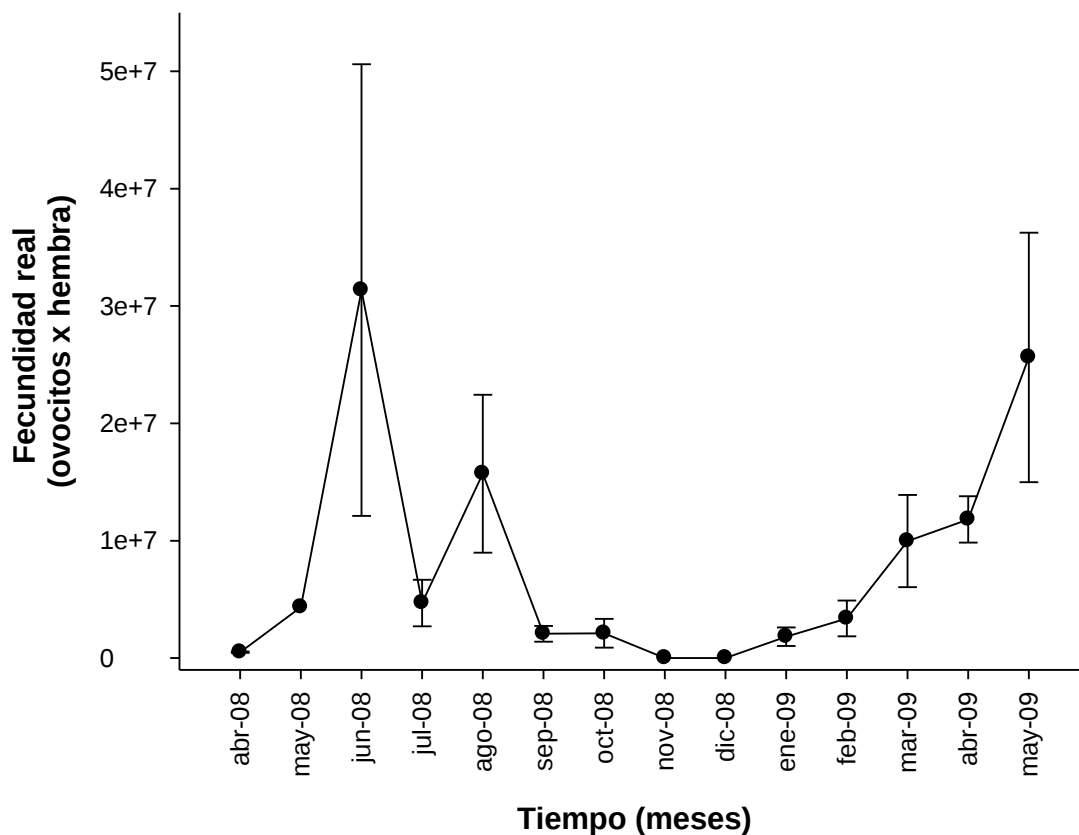


Figura 15. Oscilación de la Fecundidad real mensual durante el periodo de muestreo.

9. DISCUSIÓN

La coloración que presentaron las gónadas maduras de los especímenes ha sido reportada frecuentemente para holotúridos (Cameron y Frankboner 1986, Herrero-Pérezrul *et al.* 1999, Abdel-Razek *et al.* 2005, Tehranifard *et al.* 2006, Toral-Granda y Martínez 2007, Fajardo-León *et al.* 2008) y puede deberse a la ingestión de fitodetritus que contiene compuestos bioquímicos como los pigmentos carotenoides, los cuales son vitales para la reproducción e influyen en el crecimiento gonadal, producción, contenido energético y fotoprotección de los ovocitos, además de la supervivencia de las larvas (Matsuno *et al.* 1969, Hudson *et al.* 2003).

Durante el periodo de muestreo la proporción de sexos estimada para *H. fuscocinerea* no difirió de manera significativa de 1:1, coincidiendo con lo reportado para *Parastichopus californicus* (Cameron y Frankboner 1986), *Psolus fabricii* (Hamel *et al.* 1993), *Actinopyga echinites*, *A. mauritiana*, *Holothuria nobilis*, *H. fuscogilva*, *H. fuscopunctata*, *H. scabra*, *Telenota ananas*, *Stichopus variegatus* (Conand 1993), *P. parvimensis* (Tapia-Vásquez *et al.* 1996, Fajardo-León *et al.* 2008) *Isostichopus fuscus* (Herrero-Pérezrul *et al.* 1999) y *H. spinifera* (Asha y Muthiah 2008). Esta proporción es característica de especies con reproducción sexual (Pennington 1985, Hamel y Mercier 1996a) y aparentemente es una característica conservativa del phylum Echinodermata, ya que se ha observado en otras clases con reproducción sexual y asexual como Asteroidea (Alves *et al.* 2002, Karako *et al.* 2002, Rubilar *et al.* 2005, Ooka *et al.* 2010, Pasoto y Ventura 2010).

En holotúridos la duración de cada estadio de desarrollo varía entre especies, sexos o poblaciones de la misma especie, dependiendo de las estrategias

reproductivas, condiciones oceanográficas, factores ambientales, distribución latitudinal y distribución geográfica (Fajardo-León *et al.* 2008). El periodo de desove en holoturoideos es muy variable y puede durar entre dos y cinco meses, como ha sido documentado por Cameron y Fankboner (1986), Tapia-Vásquez *et al.* (1996), Rasolofonirina *et al.* (2005), Tehranifard *et al.* (2006), Asha y Muthiah (2008) y Fajardo-León *et al.* (2008), pudiéndose determinar el grado de estacionalidad de la especie y la sincronía de la población.

El ciclo gametogénico descrito para *H. fuscocinerea* es similar a los registrados para otros holotúridos con reproducción estacional sincrónica (Conand 1993, Tapia-Vásquez *et al.* 1994, Rasolofonirina *et al.* 2005, Tehranifard 2006, Asha y Muthiah 2008, Fajardo-León *et al.* 2008). Las hembras fueron las primeras que comenzaron la etapa I (en desarrollo) la cual, fue más prolongada que la etapa de madurez, debido a que la primera es considerada el proceso más largo y energéticamente más costoso del ciclo gametogénico (Ramírez-Llodra 2002). En los machos la etapa de madurez se concretó más rápido en comparación con las hembras, sin embargo el crecimiento de los ovocitos y espermatozoides ocurrió simultáneamente. El desove de *H. fuscocinerea* se llevó a cabo en los meses de junio, julio y agosto, coincidiendo con lo reportado para *P. parvimensis* en Baja California (Tapia-Vásquez *et al.* 1996). Sin embargo, se pudo observar que los machos desovaron antes que las hembras, lo cual aparentemente evidencia una estrategia reproductiva en la cual los machos mediante diversas señales estimulan a las hembras a realizar la liberación de sus gametos (Hamel y Mercier 1996a). También se identificaron dos periodos de desove, el primero ocurrió en el mes de junio y el segundo en el mes de agosto. El análisis histológico de las gónadas

proporciona evidencia que durante el mes de julio se presenta un periodo de maduración de los gametos inmaduros que quedaron en la gónada después del primer desove.

En el 60% de los organismos recolectados en diciembre no se pudo determinar el sexo, debido a que la mayoría de las gónadas ya estaban reabsorbidas casi en su totalidad y únicamente se identificaron fagocitos como células reconocibles. Este proceso de reabsorción prácticamente total de la gónada, ya ha sido reportado para diversas especies de holoturoideos por Tyler *et al.* (1985), Hamel *et al.* (1993), Herrero-Pérezrul *et al.* (1999), Tapia-Vásquez *et al.* (1996), Hoareau y Conand (2001) y Rasolofonirina *et al.* (2005). También, se ha reportado que las variaciones en la proporción mensual de atresias indican un vínculo cercano con la actividad reproductiva, siendo esta variación inversamente proporcional al índice gonadosomático, ya que los fagocitos se encargan de degradar todos los gametos que no fueron liberados para reutilizar la energía, dando como resultado la degeneración de la gónada y por consiguiente la disminución del IG (Smiley y Cloney 1985, Walker *et al.* 2007). Aunque en el presente estudio no se cuantificó las variaciones de la proporción mensual de los fagocitos, se pudo observar ésta relación inversa entre la proporción de los fagocitos y el IG.

Las hembras registraron valores de IG significativamente más elevados que los machos, debido a que los ovarios poseen ovocitos cuyos volúmenes son mayores en comparación con los espermatozoides, los cuales a pesar de estar en mayor cantidad en la gónada, ocupan un volumen menor como lo observado en *H. fuscocinerea*, aunque esto no quiere decir que siempre las hembras tienen IG altos, ya que para algunas especies como *Parastichopus californicus* (Cameron y

Frankboner 1986) y *Psolus fabricii* (Hamel *et al.* 1993) se han calculado IG más altos en machos. Debido a que los ambientes en los cuales habitan determinan bajas densidades poblacionales, lo cual provoca que los machos necesiten producir siempre una alta concentración de espermatozoides para asegurar la fertilización en esas poblaciones con baja densidad de individuos (Ramírez-Llodra 2002).

Se considera que el IG es un buen indicador del estadio de madurez para *H. fuscocinerea*, ya que si se realiza una comparación e integración de la información obtenida a partir de la caracterización del desarrollo gonádico y las variaciones del IG, se puede observar una tendencia similar y cercanamente relacionada de ambos parámetros.

El comportamiento reproductivo estacional documentado en el presente trabajo, no correspondió a la expectativa de que esta especie mantendría un esfuerzo reproductivo constante en esta localidad tropical. Cameron y Fankboner (1985) señalan que los ciclos reproductivos estacionales son característicos de la mayoría de las especies templadas, las cuales desovan en respuesta al incremento de la duración e intensidad de luz del día, lo que implica el incremento de la biomasa del fitoplancton y ambos factores pueden ser los posibles inductores del desove latitudinal. Por otra parte Conand (1993) afirma que para las mismas latitudes, la reproducción ocurre durante todo el verano (tres meses) y se encuentra sincronizada con las variaciones de temperatura.

En el área de estudio, las variaciones de los factores ambientales se encuentran fuertemente influenciadas por la dinámica de los vientos Tehuanos y la marcada diferencia entre la época de lluvias y secas. Durante la época de lluvias la salinidad del agua disminuye y la temperatura se incrementa. Contrariamente, la

ausencia de lluvias provoca un aumento en la salinidad del agua y la disminución de la temperatura es originada por la temporada en que circulan los vientos Tehuanos (noviembre a mayo), provocando surgencias en el Golfo de Tehuantepec. Sin embargo, se ha reportado que en el mes de noviembre hay una etapa de transición entre la terminación de la época de lluvias y el inicio del periodo de surgencias (Lavin *et al.* 1992, Tapia-García *et al.* 2007).

Las variaciones temporales de la salinidad y la precipitación pluvial tuvieron efectos importantes sobre los patrones observados en el ciclo reproductivo de *H. fuscocinerea*, ya que el desove estuvo evidentemente influenciado por una alta productividad, asociada a la precipitación pluvial, la cual por medio de escorrentías incrementa el aporte de nutrientes al océano, favoreciendo el incremento del fitoplancton, el cual generalmente se desarrolla después de que la capa de la superficie se estabiliza meses después (Hamel *et al.* 1993, Asha y Muthiah 2008). Este fenómeno ya se ha registrado anteriormente para *H. leucospilota* (Jayasree y Bhavanarayana, 1994), *H. scabra* (Rasolofonirina 2005) y *H. spinifera* (Asha y Muthiah, 2008)

Una liberación masiva de gametos durante un período corto de tiempo sugiere que el desove está controlado por factores externos (Asha y Muthiah, 2008). Se supone que la dinámica de factores ambientales afecta indirectamente al ciclo gametogénico, ya que como se mencionó anteriormente, determina la variación en la disponibilidad de alimento y cambios en el tipo de comida en los organismos larvales, juveniles y adultos. El primer evento de liberación de gametos de *H. fuscocinerea* está aparentemente ligado a la influencia de los vientos Tehuanos y su relación con la productividad primaria, sugiriendo que probablemente los organismos desovan con

anticipación para asegurar que las larvas se desarrollen, y al presentarse los incrementos significativos de fitoplancton exista abundante alimento disponible. Así mismo, los organismos adultos durante esta temporada pueden experimentar una etapa de recuperación y almacenamiento de energía para el siguiente ciclo de producción de gametos, ya que el detritus del cual se alimentan, también se enriquece con las depositaciones de productos del plancton y material orgánica al fondo marino (Hamel y Mercier 1996b).

El diámetro máximo de los ovocitos de *H. fuscocinerea* fue de 408.3 μm y el promedio 117.7 μm . Generalmente los pepinos de mar de las familias Holothuriidae, Stichopodidae y Synaptidae, tienen huevos pequeños (85-250 μm), los cuales indican desarrollo indirecto, es decir a través de un estadio larval planctotrófico, a diferencia de las especies que tienen huevos muy grandes, los cuales se desarrollan directamente en juveniles o en larvas lecitotróficas (Giese *et al.* 1991; Hamel *et al.* 1993, Sewell y Young 1997). Generalmente los holoturoideos con desarrollo larval planctotrófico tienden a reproducirse durante las estaciones cálidas, aunque existen especies cuya reproducción está influenciada por otros factores que inducen al desove, como la duración del día, salinidad, fases lunares, disponibilidad de alimento y aporte de nutrientes por ríos (Toral-Granda y Martínez 2007). En este caso, para *H. fuscocinerea* se evidenció la influencia de múltiples factores ambientales, determinados por las características particulares del área de estudio.

La fecundidad estimada en el presente trabajo es mayor a la reportada para otras especies como *Holothuria atra*, la cual produce de 12,110 a 1'342,278 ovocitos por hembra (Abdel-Razek *et al.* 2005), *Stichopus herrmanni* con valores de 8,000

(Tehranifard *et al.* 2006) y *H. spinifera* con valores promedio de 7,938 (Asha y Muthiah 2008).

De acuerdo con la fecundidad estimada en el presente trabajo y el tamaño del ovulo, se puede afirmar que *H. fuscocinerea* tiene una estrategia reproductiva “r”, la cual se caracteriza porque los organismos que la presentan no ejercen cuidado parental y poseen alta fecundidad con producción de óvulos pequeños, dando origen a larvas planctotróficas, caracterizadas por tener mecanismos de natación y alimentación bien desarrollados que le sirven principalmente para obtener su alimento de fuentes externas mediante órganos especializados (Strathmann *et al.* 1992, Ramírez-Llodra 2002).

Las larvas planctotróficas dependen principalmente de la disponibilidad del alimento y la temperatura, debido a que los huevos están provisionados con pocas reservas energéticas. Debido a esto, los organismos adultos desovan principalmente en épocas de lluvias porque hay un aumento de productividad primaria, garantizando de esta forma que las larvas puedan alimentarse y subsistir (McEdward y Miner 2003; Reitzel *et al.* 2004), como aparentemente ocurre con *H. fuscocinerea* en la Entrega.

Finalmente se recomienda realiza más estudios biológicos y ecológicos en *H. fuscocinerea*, los cuales complementen el ciclo biológico detallado del organismo, mediante estudios o experimentos que documenten los procesos que se llevan a cabo una vez que los gametos son liberados al medio, ya que la descripción de la biología de desarrollo de una especie proporciona información importante que permite dilucidar los procesos ecológicos que se llevan a cabo en una población en

la etapa de desarrollo temprano de los individuos para garantizar su supervivencia en el ecosistema.

10. CONCLUSIONES

- *Holothuria fuscocinerea* no presenta dimorfismo sexual externo. Posee una gónada constituida por una base gonadal a la cual está unido un grupo de filamentos que se bifurcan en la parte distal.
- La proporción entre machos y hembras no presentó diferencias de la proporción 1:1 durante el periodo de muestreo.
- *H. fuscocinerea* presentó un ciclo reproductivo anual, iniciándose en enero y concluyendo en diciembre.
- Durante el ciclo reproductivo se identificaron cinco estadios de desarrollo gonadal: en desarrollo (inicio y mantenimiento de la actividad gametogénica), madurez (mayor concentración de gametos maduros), desove (lumen vacío y no se observan células en desarrollo), post desove (gran concentración de atresias, gónada en reabsorción) y reposo (no se diferencian células sexuales, presencia de concentraciones de fagocitos).
- El desove presentó un máximo en el mes de junio de 2008 y otro en agosto de 2008, éste último probablemente ocurre como una consecuencia de la maduración de ovocitos remanentes durante el mes de julio.
- Los valores de IG registrados para hembra fueron significativamente más altos que en machos, así mismo se encontraron diferencias significativas durante los estadios de desarrollo y maduración de las gónadas.

- El ciclo gametogénico se encuentra estrechamente relacionado con las fluctuaciones en la precipitación pluvial y la salinidad del agua de mar.
- La talla promedio de los ovocitos fue de $117.70 \pm 53.27 \mu\text{m}$ siendo la talla mínima $1.5 \mu\text{m}$ y la máxima $408.3 \mu\text{m}$.
- La fecundidad anual promedio fue de $8'096,392 \pm 1'138,522$ ovocitos vitelogénicos por hembra.

11. REFERENCIAS

- Abdel-Razek, F.A., Abdel-Rahman, S.H., El-Shimy, N.A. y Omar, H.A. 2005. Reproductive Biology of the Tropical Sea Cucumber *Holothuria Atra* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Red Sea Coast of Egypt. *Egyptian J. Aqua. Res.* 31(2):383-402.
- Alves, S.L.S., Pereira, A.D. y Ventura, C.C. 2002. Sexual and asexual reproduction of *Coscinasterias tenuispina* (Echinodermata: Asteroidea) from Rio de Janeiro, Brazil. *Marine Biology*. 140: 95-101.
- Asha, P.S. y Muthiah, P. 2008. Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Holothuria spinifera* (Echinodermata: Holothuroidea) from Tuticorin, Tamil Nadu, India. *Aquacult International* 16:231-242.
- Billett, D.S.M. 1991. Deep Sea Holothurians. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* .(Oceanography and Marine Biology). 29, 259-317.
- Byrne M. 1999. Echinodermata. *In Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 1. Academic Press. 940-954 pp.
- Cameron, L. y Fankboner, P. V. 1986. Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Parastichopus californicus* (Stimpson) (Echinodermata: Holothuroidea). I. Reproductive periodicity and spawning behavior. *Can.J.Zool.* 64:168-175.
- Conand, C. 1993. Reproductive biology of the holothurians from the major communities of the New Caledonian Lagoon. *Marine Biology*. 116: 439-450.
- Conand, C. 2004. Present Status of world sea cucumber resources and utilisation: a international overview. *In Advances in sea cucumber aquaculture and management*. FAO Fisheries Technical Paper. 463:13-23.

- Chao, S.M., Chen, P.S. y Alexander P.S. 1994. Reproduction and growth of *Holothuria atra* (Echinodermata: Holothuroidea) at two contrasting sites in southern Taiwan. *Marine Biology* 119:565-570.
- Deichmann, E. 1941. The holothurioidea collected by the velero III during the years 1932-1938. Part II, Aspidochirota. Allan Hancock Pacific expeditions. The University of Southern California Press. California. 11(2): 300-303.
- Fajardo-León, M.C., Suárez-Higuera, M.C.L., del Valle-Manríquez, A. y Hernández-López, A. 2008. Reproductive biology of the sea cucumber *Parastichopus parvimensis* (Echinodermata: Holothuroidea) at Isla Natividad and Bahía Tortugas, Baja California Sur, México. *Ciencias Marinas*, 34(2): 165-177.
- Fiedler, P.C. 1992. Seasonal Climatologies and Variability of Eastern Tropical Pacific Surface Waters. NOAA. Technical Report. NMFS109 South fisheries Science Center. California. 65 pp.
- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen para adaptarla a las condiciones de la Republica Mexicana. Instituto de Geografía. UNAM. México.
- Garrido-Fariña G.I. 2007. Metodologías Generales y Avances en Microtécnia Aplicadas a las Ciencias Biológicas. Curso Teórico Práctico. UMAR Puerto Ángel, Oaxaca.
- Giese, A.C., Pearse, J.S. y Pearse, V.I. 1974. Reproduction of Marine Invertebrates. Vol. III. The Mollusca. Academic Press. 1-38 pp.
- Giese, A.C., Pearse, J.S. y Pearse, V.I. 1991. Reproduction of Marine Invertebrates. Vol. VI. Echinoderms and Lophophorates. The Boxwood Press. 808 pp.

- Glynn, P.W y Leyte-Morales, G.E. 1997. Coral reefs of Huatulco, West Mexico: reef development in upwelling Gulf of Tehuantepec. *Rev. Biol. Trop* 45(3):1003-1047.
- Guzmán, H.M., Guevara, C.A. y Hernández, L.C. 2003. Reproductive cycle of two commercial species of the sea cucumber (Echinodermata: Holothuroidea) from Caribbean Panama. *Marine Biology* 142:271-279.
- Hamel, J.F., Himmelman J.H. y Dufresne L. 1993. Gametogenesis and Spawning of the Sea Cucumber *Psolus fabricii* (Duben and Koren). *Biological Bulletin*. 184: 125:143(April, 1993).
- Hamel, J.F. y Mercier A. 1996a. Evidence of Chemical Communication During the Gametogenesis of Holothuroids. *Ecology*. 77(2):1600-1616.
- Hamel, J.F. y Mercier, A. 1996b. Studies on the Reproductive Biology of the Atlantic Sea Cucumber *Cucumaria frondosa*. SPC Beche-de-mer Information. Secretariat of the Pacific Community. 8:22-33.
- Hendler, G., Miller, J. E., Pawson, D. L. & P. M. Kier. 1995. Sea Stars, sea urchins and Allies: Echinoderms of Florida and the Caribbean. Smithsonian Institution Press., 390 pp.
- Herrero-Pérezrul M.D. 1994. Estudio comparativo de la reproducción de *Isostichopus fuscus* (Ludwing, 1875) y *Neothyone gibbosa* Deichmann, 1941(Echinodermata: Holothuroidea), en la Bahía de la Paz, Baja California Sur, México. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de ciencias marinas. Instituto Politécnico Nacional. 100 pp.
- Herrero-Pérezrul, M. D., Reyes Bonilla, H., García Domínguez, F. y Cintra-Buenrostro, C.E. 1999. Reproduction and growth of *Isostichopus fuscus*

- (Echinodermata: Holothuroidea) in the southern Gula of California, Mexico. *Marine Biology*.135:521-532.
- Hickman, C.P. 1998. A Field Guide to Sea Stars and other Echinoderms of Galápagos. Galápagos Marine Life Series. Sugar Spring Press. Virginia. 83 pp.
- Hoareau, T. y Conand, C. 2001. Sexual reproduction of *Stichopus chloronotus*, a fissiparous sea cucumber, on Reunion Island, Indian Ocean. SPC Beche-de-mer Information Bulletin. Secretariat of the Pacific Community. 15:04-11.
- Hudson, I. R., Wigham, B. D., Billett, D. S.M. y Tyler, P. A. 2003. Seasonality and selectivity in the feeding ecology and reproductive biology of deep-sea bathyal holothurians. *Progress in Oceanography* 59:381-407.
- Humason, G.L. 1967. Animal Tissue Techniques. Second Edition. WH Freeman And Company. 569 pp.
- INEGI. 2005. Censo General de Población y Vivienda Primer Reporte. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. <http://inegi.gob.mx>. 12 de noviembre de 2007.
- Ivy, G. y Giraspy, B.D.A. 2006. Development of large-scale hatchery production techniques for the commercially important sea cucumber *Holothuria scabra* var. Versicolor (Conand, 1986) in Queensland, Australia. SPC Beche-de-mer information Bulletin. Secretariat of the Pacific Community. 24:28-34.
- Jayasree V. y Bhavanarayana P. V. 1994. Reproduction in *Holothuria* (Mertensiothuria) *leucospilota* (Brandt) from Anjuna, Goa. *Bull. Cent. Mar. Fish. Res. Inst.* 46. 57-62.

- Kanatani, H. y Nagahama, Y. 1983. Echinodermata. 611-654pp *in* Adiyodi. G. (Ed) Reproductive Biology of Invertebrates. Volumen I: Oogenesis, Ovoposition and Oosorption.
- Karako, S., Achituv, Y., Perl-Treves, R y Kratcoff, D. 2002 *Asteroidea burtoni* (Asteroidea: Echinodermata) in the Mediterranean and the Red Sea: does asexual reproduction facilitate colonization?. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 234:139-145.
- Laboy-Nieves, E.N. y Conde, J.E. 2006. A new approach for measuring *Holothuria mexicana* and *Isostichopus badionotus* for stock assesments. SPC Beche-de-mer Information Bulletin. Secretariat of the Pacific Community. 24:39-44.
- Lavín, M. F., Robles, J. M., Argote, J. M., Barton, E. D., Smith, R., Brown, J., Kosro, M., Trasviña, A., Vélez, H. S. y García J. 1992. Física del Golfo de Tehuantepec. *Ciencia y Desarrollo*. Vol. XVIII. Num:103. CONACyT: 96-108.
- Leyte-Morales, G.E. 2001. Estructura de la comunidad de corales y características geomorfológicas de los arrecifes coralinos de bahías de Huatulco, Oaxaca, México. Tesis de Maestría. UMAR. 94 pp.
- Chen, J. 2004. Present status and prospects of sea cucumber industry of China. 25-38 pp. *in* Lovatelli A (ed). Advances in sea cucumber aquaculture and management. FAO Fisheries Technical Paper 463. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Mackey, A. 2001. Factors That Influence the Reproduction of Sea Cucumbers. Biol 515 at SDSU, Fall 2001. Apuntes de Marine Invertebrate Biology. College of Sciences. San Diego State University. Fecha de consulta: 13 de agosto 2008.

Enlace:[http://www.sci.sdsu.edu/classes/biology/bio515/hentschel/PDFs/Mackey\(2001\).pdf](http://www.sci.sdsu.edu/classes/biology/bio515/hentschel/PDFs/Mackey(2001).pdf)

- Mahmoud A. Dar y Hamdy O. Ahmad. 2006. The feeding selectivity and ecological role of shallow water holothurians in the Red Sea. SPC Beche-de-mer Information Bulletin #24 – July 2006. Secretariat of the Pacific Community. 11-21 pp.
- Matsuno, T., Ishida, T., Ito, T. y Sakushima, A. 1969. Gonadal pigment of Sea-Cucumber (*Holothuria leucospilota* Brant). *Cell. Mol. life sci. Spe.* 25(12): 12-53.
- McEdward L.R. y Miner, B.G. 2003. Fecundity-time models of reproductive strategies in marine benthic invertebrates: fitness differences under fluctuating environmental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 256:111-121.
- Mitchell-Arana L. M. 1994. Perfil del Coral y Especies Asociadas en La Entrega, Bahías de Huatulco, Oaxaca. Tesis de Licenciatura. UNAM. México DF. 74pp.
- Mladenov, P.V. 1996. Environmental factors influencing asexual reproductive processes in echinoderms. *Oceanologica Acta* 19(34):227-235.
- Muñeton-Gómez, M.S., Vallejo F. M. y García M.G. 2000. Manual de Técnicas Histológicas Aplicadas a Organismos Marinos. Primera Edición. México. 81 pp.
- Moosleitner H. 2006. Observation of natural spawning of *Holothuria tubulosa*. SPC Beche-de-mer Information Bulletin #24 – July 2006. Secretariat of the Pacific Community. 53pp
- Nguyen V.T., Nguyen H.D., Phan V.K., Nguyen X.C., Hoang T.H. y Chau V.M. 2006. A new triterpene glycoside from the sea cucumber *Holothuria scabra* collected in Vietnam. *AJSTD.* 23(4):253-259.

- Ooka, S., Takeda, M. y Komatsu, M. 2010. Sexual reproduction of the small fissiparous seastar *Aquilonastra conandae* (Asteroidea: Asterinidae) in La Réunion Island. 467-472 pp. *In*: Echinoderms: Durham. Harris, L.G., Böttger, A.S., Walker, C. W. y Lesser M. P. (eds.). London. Taylor & Francis Group. U.S.A.
- Parker, S. P. 1982. Synopsis and Clasification of living organisms. Holothuroidea. New York. Ed. McGraw-Hill. 813-818.
- Pawson, D. L. 2007. Phylum Echinodermata. *Zootaxa*. 1668: 749-764.
- Pawson, D. L., Pawson, D. J. y King, R. A. 2010. A taxonomic guide to the Echinodermata of the South Atlantic Bight, USA: 1. Sea Cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea). *Zootaxa*. 2449:1-48.
- Pazoto, C. E. M. y Ventura, C. R. R. 2010. Genetic contribution of sexual and asexual reproduction to the recruitment of a sexually unbalanced population of *Coscinasterias tenuispina* (Echinodermata: Asteroidea) in Rio de Janeiro, Brazil. *In*: 473-478. Echinoderms: Durham. Harris, L.G., Böttger, A.S., Walker, C. W. y Lesser M. P. (eds.). London. Taylor & Francis Group. U.S.A.
- Pennington, J.T. 1985. The ecology of fertilization of echinoid eggs: The consequences of sperm dilution, adult aggregation, and synchronous spawning. *Biological Bulletin*. 169:417-430.
- Purwati, P. y Luong-van J.T. 2003. Sexual reproduction in a fissiparous holothurians species, *Holothuria leucospilota* Clack 1920 (Echinodermata: Holothuroidea). *SPC Beche-de-mer Information Bulletin*. Secretariat of the Pacific Community. 18:33-38.

- Ramírez-Llodra, E.. 2001. Reproductive patterns of deep-sea invertebrates related to energy availability. P.hD. dissertation. University of Southampton. 203 pp.
- Ramírez-Llodra, E. 2002. Fecundity and Life-history Strategies in Marine Invertebrates. *Adv. Mar. Biol.* 43:87-169.
- Ramofafia C. y Byrne M. 2001. Assessment of the "tubule recruitment model" in three tropical Aspidochirote holothurians. SPC Beche-de-mer Information Bulletin #15 – September 2001. Secretariat of the Pacific Community. 13-16 pp.
- Rasolofonirina, R., Vaïtilingon, D., Eeckhaut, I. y Jangoux M. 2005. Reproductive cycle of edible echinoderms from the Southwestern Indian Ocean. II: The sandfish *Holothuria scabra* (Jaëger, 1833). *Western Indian Ocean J. Mar. Sci.* 4(1): 61-75.
- Reitzel, A.M., Miner, B.G. y McEdward L.R. 2004. Relationships between spawning date and larval development time for benthic marine invertebrates: a modeling approach. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 280:13-23.
- Rowe, F.W.E. 1969. A review of the family holothuriidae (Holothuroidea: Aspidochirotida). *Bull. British Museum (Nat.Hist)*. 18(4):119-170.
- Rubilar, T., Pastor de Ward, C. T. y Diaz de Vivar, M. E. 2005. Sexual and asexual reproduction of *Allostichaster capensis* (Echinodermata: Asteroidea) in Golfo Nuevo. *Marine Biology*. 146:1083-1090.
- Salgado-Ugarte I.H., Gómez-Márquez J.L. y Peña-Mendoza B. 2005. Métodos Actualizados para Análisis de Datos Biológico-Pesqueros. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. México. 240 pp.

- Scherle, W. 1970. A Simple Method for Volumetry of Organs in Quantitative Stereology. *Mikroskopie Bd.* 26:57-60.
- Secretaría de Marina. 1978. Temperatura y Salinidad de los Puertos de México en el Océano Pacífico. Secretaría de Marina. Dirección General de Oceanografía. México, DF. 45 pp.
- Sewell, M.A., Tyler, P.A., Young, C.M. y Conand, C. 1997. Ovarian Development in the Class Holothuroidea: a Reassessment of the "Tubule Recruitment Model". *Biological Bulletin.* 192:17-26.
- Sewell M.A. y Young C.M. 1997. Are Echinoderm Egg Size Distributions Bimodal?. *Biological Bulletin.* 193:297-305.
- Smiley S. y Cloney R.A. 1985. Ovulation and fine structure of the *Stichopus californicus* (Echinodermata: Holothuroidea) fecund ovarian tubules. *Biological Bulletin.* 169:342-364.
- Solís-Marín, F.A., Arriaga-Ochoa, J.A., Laguarda-Figueras, A., Frontana-Urbe, S.C. y Durán-González, A. 2009. Holoturoideos (Echinodermata: Holothuroidea) del Golfo de California. Primera Edición. Consejo Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 177 pp.
- Strathmann, R.R., Fenaux, L. y Strathmann, M.F. 1992. Heterochronic Developmental Plasticity in Larval Sea Urchins and Its Implications for Evolution of Nonfeeding Larvae. *Evolution*, 48(4): 972-986.
- Tapia-García M., García A. M. C., Carranza E. A. y Vázquez G. F. 2007. Environmental characterization of the continental shelf of the Gulf of Tehuantepec, Mexico. *Geofisical International.* 46 (4):249-260.

- Tapia-Vázquez O., Castro G. J. J. y Valles R. C. 1996. Madurez gonádica del pepino de mar *Parastichopus parvimensis* en la costa occidental de Baja California, México, en 1994. INP. SEMARNAP. *Ciencia Pesquera*. 12: 5-12.
- Tehranifard, A., Uryan, S., Vosoghi, G., Faterry, S.M. y Nikoyan. 2006. Reproductive cycle of *Stichopus herrmanni* from Kish Island, Iran. SPC Beche-de-mer Information Bulletin. Secretariat of the Pacific Community. 24:22-27.
- Toral-Granda, M.V y Martínez, P.C. 2007. Reproductive biology and population structure of the sea cucumber *Isostichopus fuscus* (Ludwing, 1875) (Holothuroidea) in Caamaño, Galapagos Islands, Ecuador. *Mar. Biol. Res.* 151(6):2091-2098.
- Tuwo, A. 1999. Reproductive cycle of the holothurian *Holothuria scabra* in Saugi Island, Spermonde Archipelago, Southwest Sulawesi, Indonesia. SPC Beche-de-mer Information Bulletin. Secretariat of the Pacific Community. 11:09-12.
- Tyler, P.A., Gage, J.D. y Billett, D.S.M. 1985. Life-history biology of *Peniagone azorica* and *P. diaphana* (Echinodermata: Holothuroidea) from the north-east Atlantic Ocean. *Marine Biology*. 89(1):71-81.
- Walker C. W., Unuma T. y Lesser M. P. 2007. Gametogenesis and Reproduction of Sea Urchins. 11-53 pp. Edible Sea Urchins: Biology and Ecology. J. M. Lawrence (ed.). Elsevier Science.
- Wyrski, K. 1965. Corrientes Superficiales del Océano Pacifico Oriental Tropical. *Bull. Biol. Trop.* 295-304.

Anexo I. Características principales de los cinco estadios identificados para *H. fuscocinerea*.

ETAPA O ESTADIO	CARACTERISTICAS				PERIODO
	MACHOS		HEMBRAS		
	Coloración	Morfológicas	Coloración	Morfológicas	
I.- En desarrollo	Blanquecina	-Peritoneo grueso -Alta concentración espermatogonias en la periferia folicular. -Presencia de pocos espermatozoides en el lumen.	Naranja pálido	-Peritoneo grueso - Alta concentración ovogonias en la periferia folicular. -Presencia de pocos ovocitos previtelogenicos en el lumen	ene-may.
II.- Madurez	Crema	-Peritoneo delgado -Valor de IG máximo - Alta concentración de espermatozoides en el lumen -Lumen sin espacios vacios	Naranja intenso	-Peritoneo delgado -Valor de IG máximo - Presencia de alta concentración de ovocitos vitelogénicos -Lumen sin espacios vacios -Núcleo con nucléolo periférico	jun.
III.- Desove	Blanquecina y semitransparente	-Peritoneo grueso -Disminución del IG -Lumen con espacios vacios -Presencia de estereocilios -Proliferación de fagocitos	Naranja y semitransparente	-Peritoneo grueso -Disminución del IG -Lumen con espacios vacios -Proliferación de fagocitos	jul-sep.
IV.- Post desove	Tenue y transparente	-Peritoneo grueso -Disminuye el IG -Alta concentración de fagocitos -Alta concentración de atresias	Tenue y transparente	-Peritoneo grueso -Disminuye el IG -Alta concentración de fagocitos -Alta concentración de atresias	nov-dic.
V.- Indiferenciado	Transparente con manchones marrones	-Peritoneo grueso -Sin presencia de células germinales -Máxima concentración de fagocitos -Presencia de granulocitos eosinofilos -Máxima concentración de atresias			dic.