



# UNIVERSIDAD DEL MAR

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN REPRODUCTIVO DEL  
ERIZO ROSA *Toxopneustes roseus* (A. AGASSIZ, 1863)  
(ECHINODERMATA: ECHINOIDEA) Y SU RELACIÓN CON LA  
TEMPERATURA Y CLOROFILA *a* EN LA COSTA CENTRAL DE  
OAXACA

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS: ECOLOGÍA MARINA**

PRESENTA

**Biol. Mar. Leobarda Margarita Mejía Gutiérrez**

DIRECTOR

**Dr. Francisco Benítez Villalobos**

Puerto Ángel, Oaxaca, México, 2020

## DEDICATORIA ♥

Este trabajo lo dedico a las olas más grandes de mi vida, mis padres Gabriel Mejía y Francisca Gutiérrez, GRACIAS por impulsarme a cada momento y ser unos ángeles en mi vida, por dejarme ser yo. Me quedo corta al intentar demostrar todos los sentimientos que provocan en mí. LOS AMO ♥

A mis queridos hermanos Isa y Paco, por siempre estar ahí y pese a nuestras diferencias siempre habrá algo que nos unirá; nuestra raíz, somos del mismo árbol. Hermanos gracias por todo 😊

A la pequeña morita, desde que supe que llegarías a nuestras vidas fui y soy tan feliz, que anhelo tanto conocerte pequeñ@ muñec@ 😊

A l@s mounstr@s (sobrín@s) por todas las travesuras, ocurrencias, amor y cariño que transmiten, los quiero mucho pequeñ@s. A la pequeña Alo, Tita eres ese pedacito de gente que hace que mi mundo se llene de alegría con tus pequeñas ocurrencias ♥

A mis prim@s gracias por todo, por las buenas bromas, risas, anécdotas, peleas, etc., sigamos como hasta ahora que vendrán tiempos mejores.

A mis tí@s gracias por todos los ánimos, porras, consejos, regaños, por ser una maravilla de familia.

A mis amados abuelos Sofi y Francisco, gracias por darme a una gran madre, por ser cariñosos y por siempre llevar a flote a nuestra familia

A mis estrellas en el infinito Julio† y Dorita† (abuelos) por darme un gran padre, y Blanquita† (tíita querida) siempre los extraño, gracias por los buenos momentos y por darme la mejor familia.

A mi perruno Haku, porque las mejores cosas no se planean y tú eres una de ellas, has llenado de alegría mis días con tus travesuras, mi Haki nos faltan muchas por vivir.

A PS por llegar y empezar a cambiar mi vida, gracias por estar formando parte de mi pequeña vida, hoy sé que todo llega en el momento indicado.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado durante la maestría.

No hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que me acompañaron durante el desarrollo de este trabajo.

A mi director de tesis Dr. Francisco Benítez Villalobos que con su amplia experiencia y conocimientos me orientó al correcto desarrollo y finalización de este trabajo, por confiar en mí y apoyarme incondicionalmente a cada momento que lo necesité, por introducirme al maravilloso mundo de los equinodermos por allá del 2010. Gracias Por compartir parte de su vida familiar con los del ECODES.

Sin duda, a una gran investigadora y persona Dra. Julia Patricia Díaz Martínez, no tengo palabras por lo agradecida que estoy con usted. Gracias infinitas por la confianza, por compartir sus grandes experiencias y conocimientos. Por la amistad, consejos y grandes pláticas. Por ser una increíble persona y ser humano. Gracias por todo el apoyo que me ha brindado.

Al Dr. Miguel Ángel Ahumada Sempoal por las correcciones y por el tiempo dedicado para mejorar este trabajo. Muchas gracias!

A la Dra. María del Carmen Alejo Plata por haber aceptado ser revisor de este proyecto, por las correcciones que hicieron de este, un mejor trabajo.

Al M. en C. Pablo Torres Hernández muchas gracias por todas las correcciones y comentarios en el escrito, por la disposición para atender las dudas que surgieron. Por la pasión que le tiene a su trabajo. Estoy agradecida con usted por haber aceptado ser parte de los revisores de este escrito.

Al Dr. Pedro Cervantes Hernández por su valiosa ayuda y paciencia en las imágenes satelitales y obtención de datos. Muchas gracias!

A los laboratorios de Histología y Biología de la Universidad del Mar campus Puerto Ángel, por haber permitido la realización de este proyecto. A los técnicos Pau y Sairi por facilitarme el préstamo de material solicitado.

A mis compañeros del ECODES Karen, Malú, Isa, Penny, Juan por compartir la misma pasión por los maravillosos Equinodermos, en especial a Wally gracias por todas las risas y ocurrencias, porque llegaste justo a tiempo y cambiaste el panorama de las cosas.

Al equipo LUTJANIDOS, muchas gracias por permitirme formar parte de este proyecto y pasar grandes momentos de aprendizaje, experiencias y risas; Marino,

Lili, Aurora, Arenas, Ixchel, Roberto, Adán. De manera especial a Susy Lu, muchas gracias por ser una maravillosa persona y amiga, por los buenos momentos y dar sabios consejos, por todas las cosas que faltan.

A Mafer y Lili por seguir presentes, por todas las risas, salidas y por siempre llevar los buenos ánimos. Gracias por siempre sacar de los malos momentos una sonrisa, por todas las anécdotas que solo de recordarlas provocan sonrisas

A grandes personas que conocí en el posgrado Gis, Naty Lili Margot y Ale Leyva por ser personas increíbles, es un gusto conocerlas chicas.

A Pau, por pasar horas en el Lab. de histo con buenas charlas y trabajo, por ser una gran chica. Pd. quedan pendientes muchos cafés.

A mis grandes y entrañables amig@s que la Umar me pudo dar: Male, Gaby, Karen, Esme, Nancy, Sairi, Evass y Ame por seguir formando parte de mi vida. Gracias por dejar grandes recuerdos y enseñanzas.

A mis preciadas amigas Lety, Cecy y Nancy chicas muchas gracias por todas la porras y ánimos a cada momento tanto profesional como personal, gracias por el apoyo en mis peores momentos. Pd. Lety nos estamos quedando jeje

A mis personas favoritas Mary, Male y Lety amigas mías muchas gracias por todo, no puedo expresar todo lo que significan para mí. Por ser las pilas que me recargaron a cada momento de desesperación y locura. Por dejar huella y brillar en su caminar.

A Chris, muchas gracias por todas las porras durante gran parte de este escrito, y por tu valiosa ayuda en el abstract.

A grandes personas que he conocido en el pequeño pero maravilloso Puerto Ángel, Yareli, Edilia, Pedro y las familias Rodríguez, Cevada, Martínez por permitirme entrar en su hogar, y por haberme hecho sentir siempre en casa.

A mi familia que, aunque estén lejos de mí, siempre han sido mi motor impulsor. Sin su comprensión y cariño nada de esto sería posible. Sé que están orgullosos de cada uno de los logros en mi vida y dan cada paso conmigo,

**Y a todas aquellas personas especiales que han formado parte de mi vida, de este viaje y gran aventura, acompañándome y aportando a mi formación tanto profesional como ser humano.**

**GRACIAS POR TODO...por fin he llegado al principio... 😊😊**

# ÍNDICE

<b>GLOSARIO</b> .....	<b>i</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>2</b>
2.1. Regulación de la reproducción en invertebrados marinos.....	3
2.2. Reproducción en equinoideos.....	5
2.3. Generalidades de <i>Toxopneustes roseus</i> .....	6
2.4. Distribución y hábitat de <i>Toxopneustes roseus</i> .....	7
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	<b>7</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>6. HIPÓTESIS</b> .....	<b>12</b>
<b>7. OBJETIVO</b> .....	<b>12</b>
7.1. Objetivo general.....	12
7.2. Objetivos particulares .....	12
<b>8. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
8.1. Área de estudio.....	13
8.2. Trabajo de campo.....	14
8.3. Trabajo de laboratorio.....	14
8.3.1. Morfometría .....	14
8.3.2. Proceso histológico .....	15
8.3.2.1. Técnica de rutina I.....	15
8.3.2.2. Técnica de rutina II.....	16
8.3.3. Análisis histológico .....	17
8.4. Cálculos de los índices .....	18
8.4.1. Índice gonadosomático.....	18
8.4.2. Índice de madurez gonadal.....	18
8.4.3. Distribución de talla de ovocitos.....	18
8.4.4. Fecundidad real .....	19
8.5. Variables ambientales.....	20
8.6. Análisis estadísticos.....	21
<b>9. RESULTADOS</b> .....	<b>22</b>

9.1. Fases del desarrollo gonádico .....	24
9.1.1. Hembras .....	24
9.1.1.1. Reposo .....	24
9.1.1.2. Crecimiento .....	24
9.1.1.3. Premadurez .....	25
9.1.1.4. Madurez .....	25
9.1.1.5. Desove .....	26
9.1.2. Machos.....	28
9.1.2.1. En este estudio la etapa de reposo fue inexistente .....	28
9.1.2.2. Crecimiento .....	28
9.1.2.3. Premadurez .....	28
9.1.2.4. Madurez .....	28
9.1.2.5. Desove .....	28
9.2. Organismos hermafroditas.....	30
9.2.1. Descripción de organismos hermafroditas .....	31
9.2.2. Crecimiento .....	32
9.2.3. En maduración.....	32
9.2.4. Liberación de gametos .....	32
9.3. Distribución de tallas de ovocitos .....	34
9.4. Índice gonadosomático (IGS).....	35
9.4.1. Índice gonadosomático hermafroditas .....	38
9.5. Índice de madurez (IM) .....	39
9.6. Ciclo de desarrollo gonádico.....	40
9.6.1. Ciclo reproductivo poblacional .....	43
9.7. Fecundidad.....	44
9.8. Variables ambientales.....	46
<b>10. DISCUSIÓN .....</b>	<b>48</b>
10.1. Proporción sexual .....	48
10.2. Desarrollo gonádico, frecuencia de tallas de ovocito e IGS.....	51
10.3. Fecundidad .....	55
10.4. Variables ambientales.....	56
<b>11. CONCLUSIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>12. REFERENCIAS.....</b>	<b>58</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Macrolocalización del área de estudio.....	14
<b>Figura 2.</b> Frecuencia relativa (%) del diámetro de la testa de <i>T. roseus</i> durante el periodo de muestreo.....	22
<b>Figura 3.</b> Proporción de sexos (%) de <i>T. roseus</i> durante el periodo de muestreo.....	23
<b>Figura 4.</b> Fases de desarrollo gonádico en hembras de <i>Toxopneustes roseus</i> . A) reposo B) crecimiento C) premadurez, D) madurez y E) desove.....	27
<b>Figura 5.</b> Fases del desarrollo gonádico en machos de <i>Toxopneustes roseus</i> . A) crecimiento, B) premadurez, C) madurez y D) desove.....	29
<b>Figura 6.</b> Sección de gónada de organismos con presencia de hermafroditismo, A) sección de gónada con mayor presencia de gametos masculinos (espermatozoides), B) sección de gónada con mayor presencia de gametos femeninos (ovocitos) y C) gónada con una proporción similar de ambos gametos.....	30
<b>Figura 7.</b> A) Proporción ovárica B) proporción testicular C) proporción con gametos masculinos y femeninos de gónada de <i>Toxopneustes roseus</i> .....	31
<b>Figura 8.</b> Organismos hermafroditas: A, B) hermafrodita crecimiento, C) en maduración, D) hermafrodita en desove.....	33
<b>Figura 9.</b> Distribución de los diámetros de los ovocitos de <i>T. roseus</i> .....	35
<b>Figura 10.</b> Comportamiento mensual del índice gonadosomático (media $\pm$ SE ) de hembras de <i>Toxopneustes roseus</i> durante el tiempo de muestreo los * indican los valores extremos.....	37
<b>Figura 11.</b> Comportamiento mensual del índice gonadosomático (media $\pm$ SE) de machos de <i>Toxopneustes roseus</i> durante el tiempo de muestreo.....	38
<b>Figura 12.</b> Comportamiento mensual del índice gonadosomático (media $\pm$ SE) de organismos hermafroditas de <i>Toxopneustes roseus</i> durante el tiempo de muestreo.....	39

<b>Figura 13.</b> Variaciones mensuales del (IM) de hembras y machos de <i>T. roseus</i> . Los niveles de IM son: Etapa I-reposo; Etapa II-crecimiento; Etapa III-premadurez; Etapa IV: madurez; Etapa V-desove.....	40
<b>Figura 14.</b> Frecuencias de las etapas reproductivas A) hembras, B) machos y C) hermafroditas de <i>Topxopneustes roseus</i> .....	42
<b>Figura 15.</b> Frecuencias de las etapas reproductivas de la población de <i>Toxopneustes roseus</i> .....	44
<b>Figura 16.</b> Fluctuación mensual de la fecundidad real (media $\pm$ ES) de <i>T. roseus</i> registrada a lo largo del tiempo de muestreo.....	45
<b>Figura 17.</b> Variación de los valores promedios de la temperatura y clorofila <i>a</i> a lo largo de los meses de muestreo.....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Técnica de rutina I.....	16
<b>Tabla II.</b> Técnica de rutina II.....	17
<b>Tabla III.</b> Proporción de sexos de <i>T. roseus</i> en playa Tijera Oaxaca.....	23
<b>Tabla IV.</b> Análisis de pruebas pareadas de la fecundidad real en <i>T. roseus</i> .....	45

## **GLOSARIO**

**Androdioecia:** Coexistencia de machos junto con hermafroditas funcionales en la misma población discreta.

**Ciclo gametogénico o gonádico:** Evento repetitivo dentro de las gónadas y que conducen a la producción de gametos.

**Ciclo reproductivo:** Frecuencia de aparición de los diferentes estadios de desarrollo gonádico a través del año y que en general es cíclico.

**Folículo gonádico:** Se considera como unidad básica de la biología reproductiva y se caracteriza por ser una estructura en forma de saco rodeado por tejido conectivo transparente, que en sus paredes se localizan células germinales que a medida que maduran se desarrollan en gametos. El conjunto de estos folículos componen la gónada.

**Gameto residual:** Célula sexual (ovocito maduro o espermatozoide) que no fue expulsada durante el desove.

**Ginodioecia:** Coexistencia de hembras con hermafroditas funcionales en la misma población discreta.

**Gonocóricas:** Especies con sexos separados genotípicamente, es decir que existen machos y hembras.

**Hermafrodita:** Es un individuo que posee órganos reproductivos masculinos y femeninos.

**Larvas planctotróficas:** Son larvas cuyo desarrollo ocurre en la columna de agua, formando parte del plancton, al terminar el desarrollo se fijan en el sustrato en donde ocurre la metamorfosis a etapa juvenil.

**Trioecia:** Coexistencia de hembras, machos y hermafroditas funcionales en la misma población discreta.

**Lumen:** Cavity dentro de un órgano, en este caso de un folículo, el cual va disminuyendo a medida que proliferan y crecen los gametos.

## RESUMEN

Los equinoideos presentan una alta relevancia ecológica en los ecosistemas marinos debido a que la variación en su densidad puede llegar a alterar la composición y abundancia relativa de los grupos funcionales bentónicos. En el caso particular de *T. roseus*, debido a que se alimenta principalmente de algas costrosas y calcáreas a diferencias de sus congéneres, desempeña un papel muy importante en el sistema de carbonatos y se convierte en un importante promotor de bioturbación. El objetivo de este trabajo consistió en describir el ciclo reproductivo de *T. roseus* y evaluar su relación con la temperatura y Clorofila-*a* en la playa Tijera. Los muestreos se realizaron de marzo de 2015 a marzo de 2016 y se recolectó un promedio de 20 organismos mensualmente, a los cuales se les extrajeron las gónadas para posteriormente caracterizar la proporción sexual, el ciclo gonádico, tamaño de ovocitos, índice de madurez y fecundidad real. Se obtuvo un total de 224 organismos durante todo el periodo de muestreo. Se determinaron organismos con hermafroditismo en la mayoría de los meses de muestreo acompañados de organismos machos y hembras en la misma población discreta (Trioecia). En consecuencia, la proporción sexual entre machos, hembras y hermafroditas fue de 0.8M:1.2H:0.3Hr ( $X^2 > 5.99$ ). El desarrollo gonádico para hembras se caracterizó en cinco estadios (Reposo, crecimiento, premadurez, madurez y desove) y para machos se registraron cuatro (crecimiento, premadurez, madurez y desove). La ovogénesis fue asincrónica, la talla promedio de los ovocitos fue de  $62.2 (\pm 27.2) \mu\text{m}$  y la fecundidad real (Fr) promedio fue de  $6.7 \pm 5.7$  millones de ovocitos vitelogénicos por hembra. El valor promedio del índice gonadosomático en hembras fue de  $3.31 \pm 1.71$  y para machos de  $3.30 \pm 1.62$ , el valor más alto del índice de madurez en hembras fue de 4.0 en diciembre de 2015 y para machos de 4.4 en agosto del mismo año. El ciclo reproductivo se caracterizó por ser semicontinuo, con liberación parcial de los gametos. Con base en el modelo de Regresión Lineal Múltiple aplicado, ninguna de las variables seleccionadas ( $T^{\circ}\text{C}$ , Cl-*a*) tuvo una relación significativa con los índices reproductivos, lo que indica que existen otros factores menos conspicuos o generalmente no considerados en la literatura que determinan el ciclo reproductivo

de *T. roseus*. Respecto a la presencia de trioecia, ésta condición no debería ocurrir en generaciones discretas de acuerdo con la teoría de asignación de sexos y en consecuencia aun no existen argumentos teóricos suficientes para explicarla.

**Palabras claves:** desarrollo gonádico, Echinoidea, hermafroditismo, trioecia, reproducción semicontinua.

## ABSTRACT

Echinoids have a high ecological relevance in marine ecosystems because the variation in their density can alter the composition and relative abundance of functional benthic groups. In the particular case of *T. roseus*, because it feeds mainly on crustos and calcareous algae, unlike their congeners, it has a very important role in the carbonate system and becomes an important promoter of bioturbation. The objective of this work was to describe the reproductive cycle of *T. roseus* and evaluate its relationship with temperature and Chlorophyll-a at Tijera Bay. Sampling was carried out from March 2015 to March 2016 and an average of 20 organisms was collected monthly, from which the gonads were extracted to later characterize the sexual ratio, gonad cycle, oocyte size variation, maturity index and actual fecundity. A total of 224 organisms were obtained during the entire sampling period. Organisms with hermaphroditism were found in most of the sampling months accompanying both male and female organisms in the same discrete population (Trioecy). Consequently, the sex ratio between males, females, and hermaphrodites was 0.8M: 1.2H: 0.3Hr ( $X^2 > 5.99$ ). The gonad development for females was characterized in five stages (Resting, growth, prematurity, maturity and spawning), whereas there were four for males (growth, prematurity, maturity and spawning). Oogenesis was asynchronous, the average oocyte size was  $62.2 (\pm 27.2) \mu\text{m}$ , and the average actual fecundity (AF) was  $6.7 \pm 5.7$  million vitellogenic oocytes per female. The average value of the gonadosomatic index for females was  $3.31 \pm 1.71$  and for males  $3.30 \pm 1.62$ . The highest value of the maturity index in females was 4.0 in December 2015 and for males 4.4 in August of the same year. The reproductive cycle was characterized by being semi-continuous, with partial release of gametes. Based on the Multiple Linear Regression model, none of the selected variables ( $T^\circ\text{C}$ , Cl-a) had a significant relationship with the reproductive indices, indicating that there are other less conspicuous factors or factors generally not considered in the literature that determine the reproductive cycle of *T. roseus*. Regarding the presence of trioecy, this condition should not occur in discrete generations according to the theory of

sex allocation and, consequently, there are still not enough theoretical arguments to explain it.

**Key words:** gonad development, Echinoidea, hermaphroditism, trioecy, semi-continuous reproduction.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los equinodermos son animales exclusivamente marinos que se caracterizan por poseer una simetría pentaradial (a veces enmascarada en una simetría bilateral), un esqueleto de carbonato de calcio (calcita) compuesto por placas intradérmicas independientes y articuladas o espículas calcáreas y un sistema vascular acuífero único que regula la alimentación, locomoción y otras funciones (Hyman 1955; Pawson 2007).

Los equinoideos o erizos de mar constituyen un grupo de equinodermos que forman parte de la epifauna del bentos y constituyen un componente importante de la biomasa béntica y de la productividad marina secundaria, pues son capaces de cambiar la distribución, abundancia relativa y composición algal (Heck & Valentine 1995; Rogers-Bennett *et al.* 1995; Witman & Dayton 2001; Uthicke *et al.* 2009), por lo tanto, tienen influencia en la estructura de la comunidad bentónica. La remoción de algas por parte de los erizos provoca espacios libres para el asentamiento de corales y otros organismos epibentónicos (Glynn *et al.* 1979).

Además de su importancia ecológica, los erizos de mar constituyen un alto potencial pesquero, pues sus gónadas son utilizadas como alimento para el consumo humano y juegan un papel importante en el ciclo del carbono (Caso 1978; Vadas *et al.* 2000; Lawrence 1987; Brown & Eddy 2015). Sus gónadas han sido explotadas desde tiempos inmemoriales en Europa, países del Mediterráneo el Pacífico norte y en décadas más recientes en los trópicos, Chile y Norte América (Conand & Sloan 1989).

Los equinoideos en general presentan una estructura que consiste en cinco gónadas bien delimitadas, envueltas por un peritoneo visceral y suspendidas por mesenterios a lo largo de la superficie aboral de los interambulacros (Hyman 1955; Pearse & Cameron 1991; Calvo *et al.* 1998; Walker *et al.* 2013). Las gónadas en estos organismos presentan dos funciones: reproducción y reserva de nutrientes (Hughes *et al.* 2006), ya que los nutrientes se acumulan en las células somáticas fagocitarias. La composición celular de las gónadas determina la textura y el

tamaño de la gónada, pues un alto contenido de fagocitos nutritivos le aportan peso y firmeza (Robinson *et al.* 2002; Pearce *et al.* 2002; McBride *et al.* 2004). El ciclo gametogénico es complejo, pues se inicia con el desarrollo de fagocitos nutritivos y cambios en el epitelio germinal de las gónadas, que se diferencian originando los gametos femeninos y masculinos que maduran hasta su liberación (Walker *et al.* 2007). Factores como la temperatura, fotoperiodo, disponibilidad de alimento y composición de la dieta pueden regular el ciclo reproductivo y el desarrollo de los equinoideos (Ridder & Lawrence 1982; McBride *et al.* 1997; Fernández & Pergent 1998; Spirlet *et al.* 2000; Lawrence 2001; Vařtilingon *et al.* 2005). La compleja interacción que se establece entre estos factores puede generar variabilidad espacial y temporal en los ciclos reproductivos de diferentes poblaciones (Pearse *et al.* 1986; Mercier & Hamel 2009).

## **2. MARCO TEÓRICO**

La reproducción y la manera en la que se reproduce cualquier organismo viviente es el objetivo fundamental en su historia de vida e importante para asegurar su permanencia en los ecosistemas (Bailey 2008). Por ello, el éxito biológico de cualquier especie, radica en que sus miembros se mantengan vivos el tiempo suficiente para poder llegar a reproducirse (Brusca & Brusca 2003; Bandaranayake 2006).

En la naturaleza existen dos tipos de reproducción: sexual y asexual, sin embargo en este trabajo solo se abordará sobre la reproducción sexual, la cual consiste en un mecanismo complejo y sofisticado, que implica la recombinación del material hereditario propio y el intercambio o fusión con el material hereditario de un individuo diferente. Este tipo de reproducción aumenta la variabilidad genética en la descendencia al producir combinaciones únicas de genes heredados por los progenitores, lo cual hace posible la evolución biológica continua de los seres vivos y su adaptación al medio (Arranz *et al.* 2003; Campbell & Reece 2005). Se lleva a cabo mediante ciclos sincronizados y regulados por condiciones ambientales y hormonales; los cuales se pueden dividir en dos fases: la gametogénesis y el desove. Durante la primera fase, el proceso principal

consiste en la transformación de células germinales en células especializadas: óvulos en el caso de la hembra y espermatozoides en los machos (Giese & Pearse 1974). La gametogénesis depende principalmente del gasto energético de cada especie y la asignación óptima de energía entre el crecimiento somático y la síntesis de material reproductivo (Ramírez-Llodra 2002). La segunda fase consiste en la liberación de los gametos en la columna de agua y en la que los espermatozoides se activan y comienzan a nadar al contacto con el agua de mar. Los óvulos completamente maduros que se liberan, se encontrarán con una nube de espermatozoides que nadan activamente (Walker *et al.* 2007).

Los ciclos reproductivos sexuales tienen diferentes niveles de complejidad, lo cual va a depender de los organismos y de sus estrategias de vida. En el ambiente marino, los invertebrados marinos han desarrollado sistemas relativamente simples, pero relacionados con condiciones ambientales del ecosistema donde habitan. Razón por la cual varios filos como Porifera, Cnidaria y Echinodermata dependen de la luz, temperatura del agua, abundancia de alimento, ciclo lunar y fotoperiodo para poder llevar a cabo sus procesos reproductivos (Chia & Walker 1991; Walker 2007; Giese & Pearse 1974).

### **2.1. Regulación de la reproducción en invertebrados marinos**

La temporada reproductiva de una especie, generalmente expresada en términos espaciales y temporales, se define como la época del año en que la mayoría de los individuos de una determinada población producen un elevado número de gametos maduros listos para la fecundación. La temporalidad de la reproducción ocurre en respuesta a las presiones selectivas, las cuales establecen las condiciones favorables para que esta sea exitosa y las variables ambientales que determinan esas condiciones son conocidas como factores o causas próximas (Giese & Pearse 1974).

Por otro lado, las causas últimas están asociadas a condiciones favorables que se han establecido a lo largo de la evolución de las especies y determinan los periodos más adecuados para el desarrollo y supervivencia de las larvas (planctotróficas) o los juveniles, con lo cual se asegura que la larva se desarrolle

durante la temporada en la que haya suficiente alimento y/o condiciones ambientales propicias para su protección (Giese & Pearse 1974).

Respecto a la estacionalidad en la reproducción, Thorson (1950) argumentó que la mayoría de las especies de aguas templadas se reproducen cuando la cantidad del plancton necesaria se encuentra disponible para la alimentación de las larvas. Sin embargo, adicionalmente a la disponibilidad de alimento, existen otras condiciones que son determinantes para su supervivencia, siendo la temperatura una de las más importantes, la cual tiene que ser la adecuada para el desarrollo de la larva.

Dentro de los parámetros reproductivos, el análisis de la fecundidad tiene gran relevancia, dado que esta tiene una estrecha relación con la inversión de energía y con otros aspectos reproductivos, como el tamaño del óvulo y/o la capacidad de incubación. La relación fecundidad – talla del óvulo es uno de los rasgos más importantes, ya que tiene relación directa con la inversión parental en la reproducción (Grange 2005). La evolución de la talla del óvulo en invertebrados ha sido relacionada con diferentes factores pre y postcigóticos. La talla óptima está determinada por la relación entre la cantidad de la progenie y el éxito de supervivencia de la misma. Las presiones selectivas pueden afectar la evolución de la talla del óvulo en diferentes momentos del ciclo de vida de una especie: 1) antes de que la larva o el embrión se libere a la columna de agua, 2) durante la fase planctónica y 3) justo antes de la metamorfosis y el asentamiento (Grange 2005).

Vance (1973) propuso un modelo teórico para predecir la talla óptima del óvulo, con una distribución bimodal con forma de U, que va de una escala de cero a uno y corresponde a los dos tipos de desarrollo larvario. Según el modelo, el contenido energético del óvulo está distribuido en un intervalo entre cero (óvulos de desarrollo planctotrófico) y uno (óvulos lecitotróficos) (McEdward & Janies 1997; Grange 2005).

En el caso de los equinodermos, entre la estrategia planctotrófica y la lecitotrófica existen óvulos que presentan intervalos de tallas que se traslapan (Sewell & Young 1997), lo que evidencia la existencia de un continuo, en el que los tamaños intermedios pueden ubicarse en una región en la que la transición de un estado reproductivo al otro podría ser direccionada por las fluctuaciones del medio (McEdward & Miner 2003). Este modelo ha sido modificado con el tiempo y se han incluido otras variables como la disponibilidad de alimento y el grado de dependencia del mismo (planctotrófico obligado, facultativo o lecitotrófico), debido a que las observaciones evidenciaban que las tallas exclusivas de cada una de las estrategias no se presentaban en los invertebrados marinos (McEdward & Janies 1997) y que los análisis filogenéticos indicaban que han ocurrido transiciones de un tipo de desarrollo al otro en repetidas ocasiones (McEdward & Miner 2003).

En equinodermos, el ciclo reproductivo generalmente muestra una periodicidad anual, estacional o mensual, que comprende la mayoría de los individuos de ciertas poblaciones (Fenaux 1970). El patrón reproductivo cíclico generalmente se asocia con hábitats donde los factores ambientales (duración del día, temperatura, fotoperiodo.) fluctúan de acuerdo con un régimen predecible. Sin embargo, se han propuesto patrones reproductivos continuos para algunas especies de equinodermos, particularmente aquellos con distribuciones cerca del ecuador o en aguas profundas (Hendler 1991).

## **2.2. Reproducción en equinoideos**

En general los erizos (Clase: Echinoidea) son especies dioicas y el dimorfismo sexual es raro, aunque existe evidencia de algunos casos, por ejemplo en *Lytechinus pictus* los poros genitales de los machos se encuentran localizados más al centro del organismo y son más pequeños que los de las hembras (Pearse & Cameron 1991). Los casos de dimorfismo sexual son escasos por lo que la forma más común y consistente de distinguir entre ambos sexos es la observación de la coloración de las gónadas frescas mediante disección o la preparación de

laminillas histológicas de las gónadas preservadas, observando los gametos (Walker *et al.* 2007).

Se ha observado que los ciclos reproductivos en las especies de erizos que se distribuyen en las zonas templadas presentan épocas de desove anuales bien marcadas, mientras que en las especies tropicales suelen presentar desoves continuos durante gran parte del año (Luna 2000).

En estos organismos, la sincronía en la liberación de los gametos es fundamental para mantener las poblaciones, por lo que sus ciclos reproductivos están fuertemente influenciados por factores externos (ambientales) como el alimento disponible, la temperatura o el ciclo lunar (Calvo *et al.* 1998; Lamare & Stewart 1998; Hernández-Pérez 2006).

En la mayoría de los erizos no existe la conducta de cuidado parental y producen una larva planctónica y planctotrófica conocida como equinopluteus, cuya forma es característica de la familia a la cual pertenece. En algunos erizos, especialmente en especies antárticas, el estado larval se reduce o se suprime completamente y el desarrollo de los embriones ocurre sobre o dentro del cuerpo de la hembra hasta que el juvenil se forma completamente. Algunas veces se presenta dimorfismo sexual de manera sutil, en el cual se observan diferencias en la forma de los gonoporos y de las papilas genitales entre machos y hembras (Hendler *et al.* 1995).

### **2.3. Generalidades de *Toxopneustes roseus***

Esta especie presenta una testa robusta y típicamente cónica. Las espinas primarias son cortas, robustas y afiladas terminando en punta roma. La coloración se caracteriza por ser notablemente variada e inconsistente, el color predominante es el rosado “palo de rosa” cuando los especímenes están vivos. Los especímenes preservados o secos muestran una coloración rosa amarillento y los caparazones desnudos son de color púrpura claro.

Los pedicelarios son globosos y existen grandes y pequeños, estos últimos son muy numerosos, formando una densa cubierta del caparazón y generalmente

se les observa abiertos. Las valvas están unidas entre sí por una membrana con bordes blanquizcos por el acúmulo de espículas. Los pedicelarios globosos grandes son poco abundantes y se encuentran con las valvas generalmente cerradas (Caso 1978).

#### **2.4. Distribución y hábitat de *Toxopneustes roseus***

Para esta especie se ha reportado una amplia distribución a lo largo de la costa oriental del Pacífico, que va desde el golfo de California, México, hasta el norte de Perú, incluyendo las Islas Galápagos, Ecuador (Solís-Marín *et al.* 1997; James 2000; Lawrence & Sonnenholzner 2004; Alvarado *et al.* 2010).

Es común encontrarlo sobre sustratos duros, asociado a estructuras de coral, lechos de algas coralinas no geniculadas (camas de rodolitos) y ambientes rocosos, a profundidades que van desde muy someras hasta aproximadamente 60 m. Estos organismos a menudo forman grandes agregaciones de hasta varias decenas de individuos, los cuales se cubren con fragmentos de rodolitos, conchas y algas foliosos (James 1998, 2000).

### **3. ANTECEDENTES**

Actualmente los trabajos sobre equinoideos de la familia toxopneustidae han aumentado debido al papel ecológico que desempeñan como controladores de la biomasa algal, así como de la abundancia y distribución de otros organismos, por ser recicladores de la materia orgánica y finalmente la importancia comercial que tienen las gónadas de algunas especies

En las investigaciones relacionadas con la descripción del ciclo reproductivo en diversos erizos de mar se incluye el trabajo de Espinoza *et al.* (2008), quienes estudiaron en el golfo de Cariaco, Venezuela, la actividad reproductiva de *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) y *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) y su relación con variables ambientales. Los autores reportan para ambas especies una proporción sexual 1:1. *Lytechinus variegatus* mostró una elevada proporción de individuos en desove (fase IV) o desovados (fase V) la mayor parte del año y en los primeros meses (enero-marzo 1993) predominaron

individuos en fase inmadura y en desarrollo gametogénico (fase I, II y III). En contraste, en *E. lucunter* el desove se concentró entre marzo y noviembre, particularmente en las hembras, existiendo siempre organismos inmaduros. Los valores registrados de temperatura y Cl-a presentaron un patrón inverso, con temperaturas máximas de 28-29°C en mayo y junio de 1993 y mínimas de 22-23°C en enero de 1994, asociadas con los valores mínimos (<0.2 µg/l) y máximos (> 5µg/l) de Cl-a, respectivamente. *E. lucunter* no presentó relación con ninguna de las variables ambientales evaluadas, ni evidencia de sincronía en la reproducción, mientras que en *L. variegatus* se presentó una relación significativa, lo que indica que las temperaturas elevadas favorecen su desarrollo y maduración gonádica.

González-Irusta *et al.* (2010) en el mar Cantábrico describieron el ciclo reproductivo de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1982) y evaluaron su relación con factores ambientales. En esta especie el final de la temporada de reproducción se observó entre julio y agosto, meses en los que las etapas III, IV y V fueron reemplazadas por gónadas en fases VI y I (desove e inicio de maduración). Los valores del índice gonadosomático (IGS) mostraron fluctuaciones inversas al patrón de la temperatura, ya que el proceso de recuperación del IGS (durante otoño y el invierno) coincidió con valores bajos de este factor ambiental. Respecto a la clorofila (Cl-a), se observó que en marzo de 2005, el inicio del desove coincidió con los valores más altos de concentración de Cl-a.

Wangensteen *et al.* (2013) describieron el ciclo reproductivo de *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) en el noreste del Mediterráneo y evaluaron la influencia de la temperatura y el fotoperiodo, con lo que evidenciaron una relación directa y significativa entre el valor medio mensual del IGS y el fotoperiodo durante tres de los cuatro ciclos analizados. En contraste el IGS tuvo ciclos retrasados respecto a la temperatura. A partir del análisis de las secciones histológicas de *A. lixula*, se diferenciaron cinco etapas de maduración gonadal (agotadas, recuperadas, en crecimiento, prematuras y maduras), tanto en machos como en hembras.

Bronstein & Loya (2015) estudiaron la relación del ciclo reproductivo de *Echinometra* sp. con el fotoperiodo, temperatura y disponibilidad de alimento en el golfo de Aqaba (mar Rojo). Como resultado se obtuvo que la reproducción de este erizo sigue un ciclo anual, en el que la gametogénesis comienza en junio y la máxima intensidad de desove ocurre entre septiembre y octubre. Los autores registraron una relación significativa positiva del IGS con la temperatura pero no con el fotoperiodo. Los meses posteriores al desove (octubre a enero), coincidieron con el aumento de las concentraciones de Cl-a, evidenciando que altas concentraciones implican un aumento en la disponibilidad de alimento para las larvas en desarrollo.

Respecto a investigaciones realizadas en el Pacífico mexicano, el registro más antiguo es el de Olivares-González (1986), quien realizó un estudio sobre la biología de *Diadema mexicanum* (A. Agassiz, 1863) en el golfo de California, del cual se registró un periodo de mayor intensidad reproductiva de abril a noviembre y se observó que el desove ocurre cuando la luna se encuentra en la transición de llena a nueva. Así mismo, se registró una relación positiva entre el IGS y la temperatura, incrementándose la actividad reproductiva a temperaturas superiores a 23°C.

Lara-Rueda (2004) describió el ciclo gametogénico de *Echinometra vanbrunti* (A. Agassiz, 1863) en Ensenada de Muertos, Baja California Sur. En el estudio se describieron seis estadios gonádicos para esta especie y se concluyó que el periodo de reproducción ocurre de agosto a octubre, con mayor intensidad reproductiva durante septiembre. Como resultado también se reporta una relación positiva entre la temperatura y el ciclo gonádico.

Álvarez-López (2017) describió el ciclo reproductivo de *Tripneustes depressus* (A. Agassiz, 1863) en Punta Arena, Baja California Sur. Para esta especie se registró una proporción sexual 1:1 y la presencia de cinco etapas de desarrollo gonádico (inmaduro, desarrollo, madurez, desove y post desove). Así mismo, se registraron dos periodos de desove intenso, uno de octubre a noviembre (2005) y otro de abril a junio (2006). Los desoves coincidieron con los

periodos en que la temperatura disminuyó de 29°C a 26°C (octubre a noviembre) y cuando aumentó de 16°C a 24°C (abril a mayo), por lo que se concluyó que la temperatura funciona como un disparador del evento de desove.

Díaz-Martínez *et al.* (2019) reportaron que en Punta Banda, Baja California *Arbacia stellata* es un erizo de mar gonocórico, clasificando la gametogénesis en seis fases para ambos sexos (inmaduro, crecimiento, madurez previa I, madurez II, maduración y desove) y una proporción sexual cercana a 1:1. El índice gonadosomático mostró diferencias significativas entre sexos y meses, observando los valores más altos en primavera, con una correlación positiva con la clorofila *a*. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el índice de madurez entre sexos, con una correlación positiva con la temperatura pero negativa con la clorofila *a*. La fecundidad real mostró amplia variación y una correlación positiva con la clorofila *a* y la temperatura. Se concluyó que el ciclo reproductivo de *A. stellata* tiene un patrón semicontinuo, con desoves parciales durante todo el año.

Respecto a la costa de Oaxaca, hasta el momento se tiene la investigación realizada por Benítez-Villalobos *et al.* (2015), quienes caracterizaron el ciclo reproductivo de *Diadema mexicanum* en Bahía La Entrega y registraron que la proporción sexual 1:1 no fue significativamente diferente durante el periodo de muestreo. Se describieron cinco etapas de desarrollo gonádico (desarrollo, madurez, desove, post desove, nutritivo). Así mismo, determinaron que esta especie tiene una sola temporada reproductiva anual (madurez/desove) de abril a octubre.

Existen pocas investigaciones sobre *T. roseus* y las que existen se concentran en parámetros poblacionales de la especie, su alimentación y el efecto del incremento de la temperatura en su desarrollo embrionario y larval. Estas investigaciones han sido realizadas para localidades de Baja California Sur y Oaxaca México (James 1998, 2000; Benítez-Villalobos & Abadia-Chanona 2015; Mejía-Gutiérrez *et al.* 2019).

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

La relevancia ecológica de *Toxopneustes roseus* se deriva principalmente del comportamiento que presenta de cubrirse con fragmentos de rodolitos, corales, conchas y algas foliosas; lo cual se ha hipotetizado que les proporciona camuflaje, así como alimento (corteza de rodolitos y coral muerto) (James 1998, 2000). La actividad de cubrirse beneficia a los rodolitos, transportándolos hacia otras zonas e influyendo en su distribución. Por ello, el desplazamiento, comportamiento de cubrirse y el tipo de alimentación *T. roseus* puede tener un efecto importante sobre la distribución y abundancia de las algas en mantos de rodolitos, lo cual puede constituir una de las causas de bioturbación sobre estas comunidades, afectando a la comunidad béntica general (James 2000). A pesar de lo anterior y de ser la especie con mayor distribución latitudinal del género *Toxopneustes*, actualmente no existe conocimiento suficiente sobre la especie.

Para el Pacífico mexicano, son nulos los trabajos que se han realizado acerca de la biología reproductiva y el efecto de las variaciones de la temperatura superficial del mar (TSM) y las concentraciones de clorofila *a* (Cl-*a*) para esta especie, por lo que es de alta relevancia realizar este tipo de estudios, debido a que se ha establecido que la TSM y concentración de Cl-*a* (la cual se usa como indicador de la disponibilidad de alimento) inciden en la sincronización del desarrollo gametogénico y el desove en otras especies de equinoideos. Por ello la importancia de este trabajo de investigación radica en que por primera vez se aportará información que contribuirá a evaluar la magnitud de la influencia de estas variables ambientales en la generación de los patrones reproductivos, así mismo, se generará información que permita conocer el desarrollo gonádico y época de desove de *T. roseus*.

#### **5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Qué tipo de patrón reproductivo presenta *T. roseus*?

¿Cómo afectan las variaciones de temperatura y Cl-*a* en el patrón reproductivo de *T. roseus*?

## 6. HIPÓTESIS

De acuerdo con trabajos previos realizados en la costa central de Oaxaca en otros equinodermos, *T. roseus* presentará un patrón reproductivo continuo, con un pico de desove durante el verano cuando se presentan valores altos de la TSM. Así mismo, el aumento de la concentración de Cl-a tendrá una influencia significativa en el desarrollo gametogénico, promoviendo la maduración y desove de los gametos.

## 7. OBJETIVO

### 7.1. Objetivo general

Comprender el patrón reproductivo del erizo rosa *Toxopneustes roseus* durante un ciclo anual en una población que se encuentra habitando la costa central de Oaxaca (playa Tijera) y evaluar la influencia de las variaciones de la temperatura superficial del mar y la concentración de Cl-a en el patrón reproductivo observado.

### 7.2. Objetivos particulares

- Determinar las variaciones temporales de la proporción sexual
- Caracterizar el ciclo de desarrollo gametogénico de *T. roseus* en la playa Tijera, Oaxaca.
- Analizar la distribución de tallas de ovocitos y la fecundidad real a lo largo del ciclo gametogénico de *T. roseus*.
- Evaluar las variaciones temporales y entre sexos de la intensidad reproductiva, mediante el análisis histológico y de los índices gonadosomático y de madurez gonadal.
- Evaluar el efecto de las variaciones de temperatura y Cl-a en el patrón reproductivo de la especie.

## 8. MATERIAL Y MÉTODOS

### 8.1. Área de estudio

La zona de estudio (playa Tijera), se localiza en el extremo occidental del golfo de Tehuantepec, México en las coordenadas 15° 43'08.55" N, 96 09'44.74" O, correspondiente a la región oceanográfica del Pacífico Oriental Tropical (Fig. 1). El clima que caracteriza a la región es de tipo cálido-subhúmedo (Aw) de acuerdo con la escala de Köppen y la modificación de García, (1973). La hidrodinámica del Golfo responde a dos condiciones climáticas estacionales: Durante el periodo de lluvias (mayo a octubre) el movimiento de los vientos hacia el norte son menos intensos y se da paso a los pulsos de vientos generados por huracanes y tormentas tropicales del Pacífico Tropical Oriental que se propagan a lo largo de la costa, la temperatura del mar varía entre 25°C y 30°C (Trasviña *et al.* 2003; Trasviña & Barton 2008). En contraste, en secas (diciembre a mayo), ocurren intensos vientos perpendiculares a la costa que soplan a través de pasos de montaña del sur de México y América Central ("Nortes") con una temperatura promedio superficial del mar de 18°C a 32°C (Trasviña & Barton 1997; Trasviña *et al.* 2003). Estos vientos causan fuertes surgencias de agua fría y alta salinidad (que emergen de las profundidades) y además provocan la mezcla de la capa superior del océano. Esto afecta la salinidad y el intercambio de agua oceánica con el agua costera, modificando la temperatura superficial, y transportando agua fría sub-superficial rica en nutrientes (Trasviña & Barton 1997; Flores-Vidal *et al.* 2011).

El fondo marino de playa Tijera presenta extensiones uniformes de arrecifes coralinos paralelos a la línea de costa y fondos arenosos con trozos de coral muerto. Asimismo, se caracteriza por la presencia de un sustrato arenoso grueso, de acantilados, de una pendiente moderada y una profundidad aproximada de 12 metros (Antonio-Sánchez 2019).

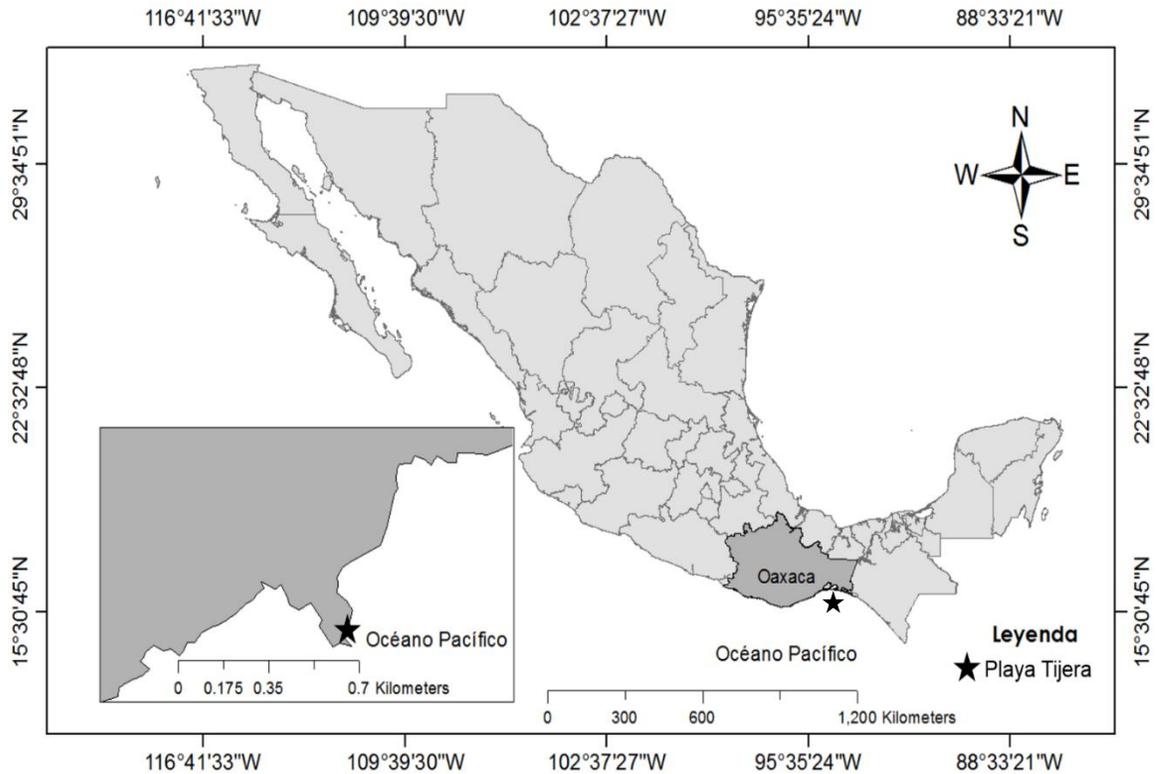


Figura 1. Macrolocalización del área de estudio.

## 8.2. Trabajo de campo

Las muestras usadas en este trabajo de tesis, fueron obtenidas durante el periodo de marzo de 2015 a marzo de 2016. Cada mes se recolectaron por medio de buceo autónomo con equipo SCUBA, un promedio de 20 ejemplares de *T. roseus*. Los especímenes se trasladaron al laboratorio de Histología de la Universidad del mar, donde se mantuvieron en recipientes con agua de mar a 4°C por 24 h para su relajación y sacrificio.

## 8.3. Trabajo de laboratorio

### 8.3.1. Morfometría

De cada espécimen se midió el diámetro y alto de la testa con un vernier digital (*Truper*) con una precisión  $\pm 0.1$  mm, así mismo se obtuvo el peso total húmedo con una balanza digital-(OHAUS) ( $\pm 0.001$  g). Posteriormente se abrió cada espécimen cortando la testa a lo largo de un interambulacro, desde la boca hasta el ano (Pérez *et al.* 2009). A cada organismo se le extrajeron los cinco pares de gónadas, las cuales fueron pesadas con una balanza digital y una vez pesadas, a

tres pares se les calculó el volumen mediante la técnica de desplazamiento de fluido y la variación del balance hidrostático, modificado de Mohr-Westphal (Scherle 1970).

### **8.3.2. Proceso histológico**

Los dos pares de gónadas restantes de cada espécimen se fijaron en solución de Bouin durante 72 h y pasado ese tiempo se lavaron con agua corriente y posteriormente fueron preservadas en alcohol al 70%. De cada gónada se tomó una muestra, la cual se colocó en histocassettes previamente etiquetados y se procesó utilizando la técnica de inclusión para Histokinette (procesador automático de tejidos) marca Leica (técnicas histológicas de rutina I) de Muñetón-Gómez *et al.* (2000).

#### **8.3.2.1. Técnica de rutina I**

El procedimiento consistió en deshidratar los tejidos en una serie de alcoholes partiendo del 80% hasta llegar al 100% (alcohol absoluto). Una vez concluida la deshidratación, los tejidos se pasaron por Citrisolv (aclarante) y finalmente fueron embebidas en parafina (Tabla I).

Tabla I. Técnica de rutina I

<b>Reactivo</b>	<b>Cambios</b>	<b>Tiempo (hrs)</b>
Alcohol etílico al 80%	2	1
Alcohol etílico al 90%	2	1
Alcohol absoluto	2	1
Citrisolv	2	1
Parafina	2	1h 30min

Al término de la técnica de rutina I, las muestras fueron incluidas en parafina en moldes de inclusión con ayuda de un dispensador de parafina semiautomático marca Leica. Una vez incluidas se colocaron en una placa de enfriamiento, después se mantuvieron en refrigeración hasta realizar los cortes.

#### **8.3.2.2. Técnica de rutina II**

Los cortes de las muestras (entre 5 y 8  $\mu\text{m}$  de grosor) se realizaron con ayuda de un micrótopo semiautomático (marca Leica) y se colocaron en un baño de flotación para extender el tejido. Una vez realizado este proceso se colocaron sobre portaobjetos debidamente etiquetados y se dejaron dentro de un horno a 50°C por 24 h hasta la tinción.

Las preparaciones histológicas fueron teñidas con la técnica de hematoxilina-eosina de Harris (tabla II), se les colocó resina sintética y se cubrió el tejido con un cubreobjetos para su preservación permanente.

Tabla II. Técnica de tinción de Hematoxilina-Eosina

Reactivo	Cambios	Tiempo (minutos)
Hemo D (Citri-Solv)	1	5
Alcohol 100%	1	2
Alcohol 70%	1	2
Hematoxilina	1	5
Agua corriente	1	15
Eosina	1	2
Agua corriente	1	0.5
Alcohol 70%	1	2
Alcohol 100%	1	2
Hemo D (Citri-Solv)	1	2

### 8.3.3. Análisis histológico

Las laminillas con los cortes histológicos se observaron con un microscopio óptico Zeiss con objetivos 10x y 40x para identificar la fase o estadio de madurez de cada individuo, así mismo se tomaron fotografías de secciones de los cortes para la posterior medición de los ovocitos, cálculo de la fecundidad y construcción de las gráficas de frecuencias de las tallas de los ovocitos.

Con base en el análisis de los cortes histológicos, se determinó la etapa reproductiva en la cual se encontraba cada organismo de acuerdo con los criterios propuestos por Pérez *et al.* (2009) y Benítez-Villalobos *et al.* (2015), que consisten en las características celulares distintivas del núcleo, citoplasma, pared del epitelio folicular y germinal, distribución y tamaño de los gametos en los folículos gonadales y para el caso específico de los ovocitos, se consideró también la relación núcleo-citoplasma así como la afinidad de estos por los colorantes. Posteriormente se calculó la frecuencia relativa de individuos en cada etapa reproductiva, para cada mes de muestreo. Finalmente se procedió a analizar el ciclo reproductivo de hembras, machos y total de la población a través de gráficas de frecuencia relativa.

## **8.4. Cálculos de los índices**

### **8.4.1. Índice gonadosomático**

Con los datos obtenidos del peso de los organismos y el peso de la gónada se calculó el índice gonadosomático (IGS) utilizando la siguiente ecuación:

$$IGS = \left( \frac{P_g}{P_t} \right) \times 100$$

Donde:

IGS= Índice gonadosomático

P<sub>g</sub>= Peso de la gónada

P<sub>t</sub>= Peso total del organismo

### **8.4.2. Índice de madurez gonadal**

Una vez definidas las etapas de maduración, estas se emplearon en el cálculo del índice de madurez gonadal, definido por la siguiente relación:

$$IMG = \frac{\Sigma(n \times F)}{N}$$

Donde:

IMG= índice de madurez gonadal

n= número de organismos en estado F

F= etapa de madurez gonadal (I-V)

N= número total de organismos analizados

### **8.4.3. Distribución de talla de ovocitos**

Una vez identificados los estadios en cada gónada, se midió el diámetro de Feret de 100 ovocitos seccionados a través del núcleo por cada hembra, utilizando el programa de análisis Image J®. Con los datos obtenidos se realizaron diagramas de frecuencia de tallas de ovocitos.

#### 8.4.4. Fecundidad real

La fecundidad real (número de ovocitos vitelogénicos próximos al máximo desarrollo) se calculó con base en el método utilizado por Ramírez-Llodra (2002). Este método se relaciona con el volumen de la gónada y el volumen de los ovocitos.

Primero se calculó el volumen de la gónada, el cual se determinó de acuerdo al método de desplazamiento de fluido y la variación del balance hidrostático de Mohr-Westphal (Scherle 1970). El volumen de los ovocitos ( $V_o$ ) se calculó asumiendo que poseen una forma esférica:

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

Donde:

$V_o$ = volumen medio de los ovocitos

$R$ = Radio medio de los ovocitos (calculado a partir del diámetro de Feret).

Usando los valores obtenidos en la submuestra de 100 ovocitos por hembra, se calculó la proporción ( $P$ ) entre los ovocitos previtelogénicos y los vitelogénicos:

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

Donde:

$N_{pvo}$ = número de ovocitos previtelogénicos contados en dicha submuestra.

$N_{vo}$ = número de ovocitos vitelogénicos contados en dicha submuestra.

Asumiendo que la  $P$  calculada en una submuestra de la gónada (100 ovocitos) es el mismo que  $P$  en la gónada completa, se obtiene que:

$$P = \frac{N_{pvo}}{N_{vo}} = \frac{F_{pvo}}{F_{vo}} \therefore F_{pvo} = P \times F_{vo} \quad (\text{ecuación1})$$

Donde:

$F_{pvo}$ = número total de ovocitos previtelogénicos

$F_{vo}$ = total de ovocitos vitelogénicos

Como el volumen del ovario ( $V_g$ ) es equivalente al número de ovocitos multiplicado por su volumen, entonces:

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

Donde:

$V_g$ = Volumen de la gónada

$V_{vo}$ = volumen de ovocitos vitelogénicos

$V_{pvo}$ = volumen de ovocitos previtelogénicos.

Se reemplaza  $F_{pvo}$  de la ecuación 2 en la ecuación 1, quedando:

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

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

Al acomodar los términos se obtendrá la ecuación de la fecundidad real, es decir, el número total de ovocitos vitelogénicos:

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

### 8.5. Variables ambientales

Del portal Ocean Color web se obtuvieron los datos de la temperatura superficial del mar (TSM) (°C) y la concentración de Cl-a ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) mediante compuestos mensuales de imágenes de satélite de marzo de 2015 a marzo de 2016, proveniente del sensor Modis a bordo del satélite Aqua a una resolución de 4km por pixel, en el formato HDF y con un nivel de Procesamiento completo L3 (en grados decimales Long-Lst). Las imágenes antes mencionadas se ubicaron en una estación “testigo” frente a la localidad de playa Tijeras entre los  $15^\circ 43'08.55''$  N,  $96 09'44.74''$  O y con la técnica desarrolla por Cervantes-Hernández &

Manzano-Sarabia (2017) se extrajo en los promedios mensuales de dichas variables en el programa Wim/Wam, ver 9.10 (Wim/Wam Inc.2016).

### **8.6. Análisis estadísticos**

La proporción sexual fue calculada estimando proporciones de machos, hembras y hermafroditas, posteriormente estas proporciones se analizaron mediante la prueba de Chi cuadrada ( $\chi^2$ ), para determinar si existía una desviación significativa de una proporción 1H: 1M: 1Hr. La regla de decisión se tomó con un intervalo de confianza del 95%, rechazando una proporción de 1:1:1 cuando el valor de  $\chi^2$  obtenido fue mayor a 5.99 (Ashcroft & Pereira 2003; Sokal & Rohlf 1979).

Se aplicó el análisis de Shapiro-Wilk a los datos del IGS para ver si seguían una distribución normal y el análisis de Levene para la homocedasticidad. Como los datos no cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad se realizó el análisis de Kruskal Wallis para detectar diferencias significativas del IGS entre sexos y se realizó el mismo análisis para determinar si existieron diferencias significativas entre meses. Para analizar las diferencias del índice de madurez entre sexos a lo largo de los meses de muestreo, se realizó un análisis T-Student (Zar 2010).

Las variaciones de la fecundidad real de las hembras a lo largo de los meses de muestreo fueron obtenidas mediante un análisis de varianza no paramétrico basado en permutaciones (PERMANOVA) de una vía, con el tiempo como el único factor, usando el programa PRIMER 6 (versión 6.1.16) & PERMANOVA + (versión 1.0.6)

Para determinar la relación entre el índice gonadosomático, índice de madurez y la fecundidad real con las variables ambientales: TSM y CI-a, se realizó un análisis de regresión lineal múltiple utilizando el programa SigmaPlot (versión 10.0).

## 9. RESULTADOS

Se analizaron 224 individuos con un intervalo de talla de 51 a 100 mm de diámetro de testa, con un diámetro promedio ( $\pm$  DS) de  $78 \pm 7$  mm. El 53% de la población muestreada presentó un diámetro de testa de 70 a 80 mm, seguido de organismos con diámetro de 80 a 90 mm, mientras que las demás tallas tuvieron un menor porcentaje de representación (Fig. 2). Del total de organismos analizados 106 fueron hembras (47.32%), 86 machos (38.39%) y 32 hermafroditas (14.28%) con diámetro de testa distribuidos en todos los intervalos de clase (Fig. 3), mostrando una proporción sexual anual (M: H: Hr) de 0.8:1.2:0.3, lo cual difiere de una proporción 1:1:1 ( $X^2 > 5.99$ ,  $df=11$ ,  $\alpha=0.05$ ) (Tabla III).

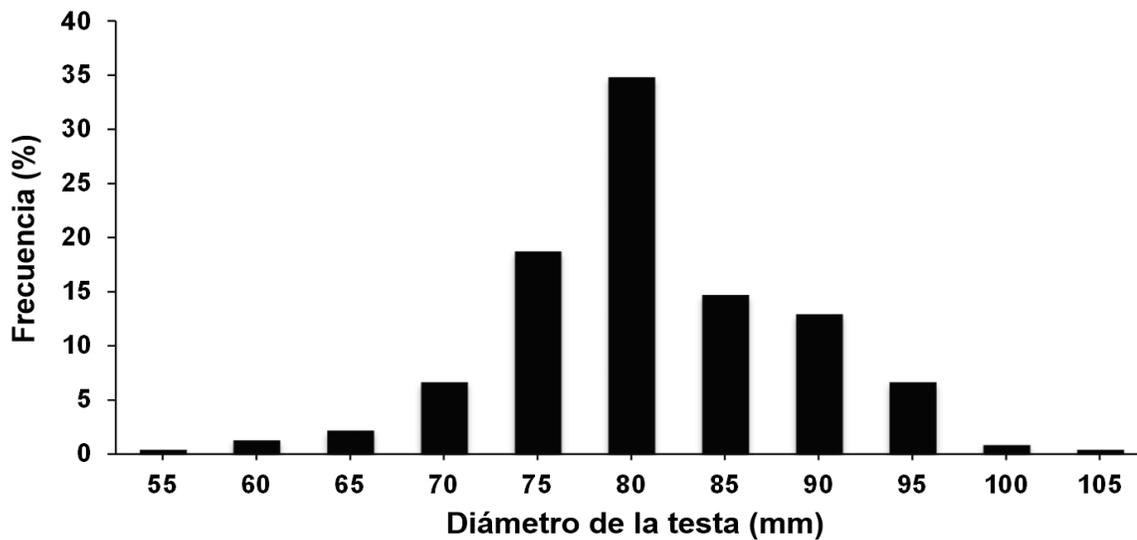


Figura 2. Frecuencia relativa (%) del diámetro de la testa de *T. roseus* durante el periodo de muestreo (n=224).

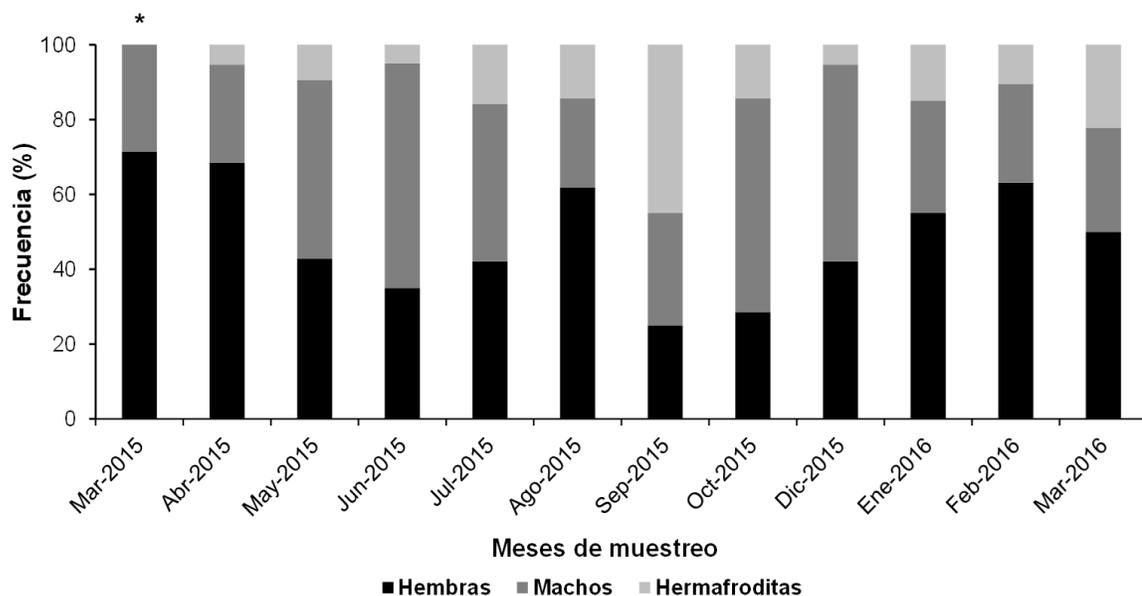


Figura 3. Proporción de sexos (%) de *T. roseus* durante el periodo de muestreo. El asterisco indica el mes en el que no se encontraron organismos hermafroditas.

Tabla III. Proporción de sexos mensual para *Toxopneustes roseus* en playa Tijera Oaxaca. M=Machos, H=Hembras, Hr= Hermafroditas, n=total de organismos analizados por mes.

Meses	M	H	Hr	n	$\chi^2$	M:H:Hr
Mar-2015	2	5	0	7	18.4	1:2.5:0
Abr-2015	5	13	1	19	62.0	1:2.6:0.07
May-2015	10	9	2	21	25.9	1:0.9:0.2
Jun-2015	12	7	1	20	45.5	1:0.6:0.08
Jul-2015	8	8	3	19	13.9	1:1:0.37
Ago-2015	5	13	3	21	38.1	1:2.6:0.6
Sep-2015	6	5	9	20	6.5	1:0.8:1.5
Oct-2015	12	6	3	21	28.6	1:0.5:0.25
Dic-2015	10	8	1	19	37.1	1:0.8:0.1
Ene-2016	6	11	3	20	24.5	1:1.8:0.5
Feb-2016	5	12	2	19	43.8	1:2.4:0.4
Mar-2016	5	9	4	18	13.0	1:1.8:0.8
<b>Total</b>	<b>86</b>	<b>106</b>	<b>32</b>	<b>224</b>	<b>357.2</b>	<b>0.8:1.2:0.3</b>

## **9.1. Fases del desarrollo gonádico**

Durante el proceso de gametogénesis se distinguieron cinco etapas reproductivas para hembras (reposo, crecimiento, premadurez, madurez y desove) y para machos cuatro etapas (crecimiento, premadurez, madurez y desove), las cuales se clasificaron de acuerdo a las características histológicas de las gónadas.

Tanto en hembras como en machos los folículos gonádicos se observaron en diferentes fases de desarrollo, persistiendo siempre algunas células germinales (ovogonias en el caso de las hembras y espermatogonias en el caso de los machos). Este tipo de desarrollo gonádico se conoce como asincrónico, debido a la presencia continua de las diferentes etapas de desarrollo indicando una producción constante de espermatozoides y ovocitos.

### **9.1.1. Hembras**

#### **9.1.1.1. Reposo**

En esta etapa, los folículos ováricos se encontraron reducidos en tamaño, el lumen gonadal estaba ocupado entre 50 y 100% por fagocitos nutritivos, en algunos casos se pudieron observar ovocitos remanentes, los cuales en ocasiones se encontraban en el centro del lumen y otras cerca de la periferia. La pared gonadal era gruesa y en la mayoría de los casos fue posible distinguir entre el saco externo y el interno (Fig. 4A).

#### **9.1.1.2. Crecimiento**

En esta fase se observaron ovocitos en diferentes fases de desarrollo, desde ovogonias hasta ovocitos vitelogénicos, siendo los ovocitos previtelogénicos (30-50  $\mu\text{m}$ ) los más abundantes, seguidos de las ovogonias (10-30  $\mu\text{m}$ ). Los ovocitos previtelogénicos presentaron una coloración morada oscura, debido a la afinidad con la hematoxilina y se caracterizaron por una forma más o menos esférica con un núcleo central grande teñido de morado claro. En el núcleo se pudo observar gran cantidad de cromatina en un nucléolo excéntrico bien definido.

Avanzada la fase de crecimiento los ovocitos próximos a la vitelogénesis migraron al centro de la gónada, ocupando espacio en el lumen, mientras que los

ovocitos previtelogénicos y ovogonias se observaron en la periferia de la gónada. El espacio entre el saco externo y el interno que había en la fase de reposo se reduce y la pared gonadal se empezó a adelgazar, los fagocitos siguen siendo numerosos, pero su frecuencia comienza a disminuir. Cuando los ovocitos previtelogénicos llegaron a medir 70  $\mu\text{m}$ , iniciaron la vitelogénesis convirtiéndose en ovocitos vitelogénicos (Fig. 4B).

#### **9.1.1.3. Premadurez**

Esta fase se caracterizó por presentar numerosos ovocitos previtelogénicos (30-50  $\mu\text{m}$ ) cerca de la pared gonadal y ovocitos vitelogénicos (50-80  $\mu\text{m}$ ) en el centro del lumen, aunque también fue posible observar la presencia de algún ovocito maduro en el centro del lumen. Fue evidente el aumento en dimensión y número de estos ovocitos pre y vitelogénicos en comparación con la fase anterior. Así mismo, la capa de fagocitos nutritivos se redujo y se observó en la periferia del folículo (Fig. 4C).

#### **9.1.1.4. Madurez**

Los ovocitos maduros (80-131  $\mu\text{m}$ ) se distinguieron por alcanzar su volumen máximo y el lumen se observó lleno de ovocitos cercanos al desarrollo máximo. El desarrollo de los ovocitos se evaluó teniendo como criterio que el diámetro fuera mayor a 80  $\mu\text{m}$ , ya que el tamaño máximo registrado fue 131.66  $\mu\text{m}$  en los cortes histológicos. Se consideraron en estadio de madurez aquellos organismos que tuvieran un porcentaje de sus ovocitos mayor o igual a 50% en este intervalo de talla.

La densa aglomeración de ovocitos maduros en el lumen ocasionó que su forma esférica tendiera a ovalarse, mientras que otros adquirieron formas poliédricas y/o poligonales. En esta etapa reproductiva se observó la pared gonádica más delgada (en algunos casos aún era posible observar las dos capas). Debido al aumento de tamaño de los ovocitos durante el proceso de vitelogénesis, el núcleo representa un menor tamaño respecto al tamaño total de la célula. Las ovogonias, ovocitos previtelogénicos y los fagocitos nutritivos (cuyas células proporcionan nutrientes a las células germinales durante el periodo reproductivo

y destruyen a las células residuales en las gónadas después de la reproducción) fueron poco comunes. Aunque aún fue posible encontrar ovocitos inmaduros desarrollándose en la pared gonadal, estos fueron muy escasos y la pared gonadal era delgada (Fig. 4D).

#### **9.1.1.5. Desove**

Las gónadas con desove parcial se caracterizaron por presentar espacios que antes habían sido ocupados por ovocitos vitelogénicos haciendo evidente los espacios en el lumen. Conforme avanzó la liberación, los ovocitos fueron menos abundantes, los espacios se incrementaron y los fagocitos nutritivos se encuentran nuevamente en gran cantidad observándose en todo el folículo. Así mismo, el tamaño de los folículos ováricos se comenzó a reducir. La pared gonádica continuó delgada pero se empezaron a notar algunas ondulaciones (Fig. 4E).

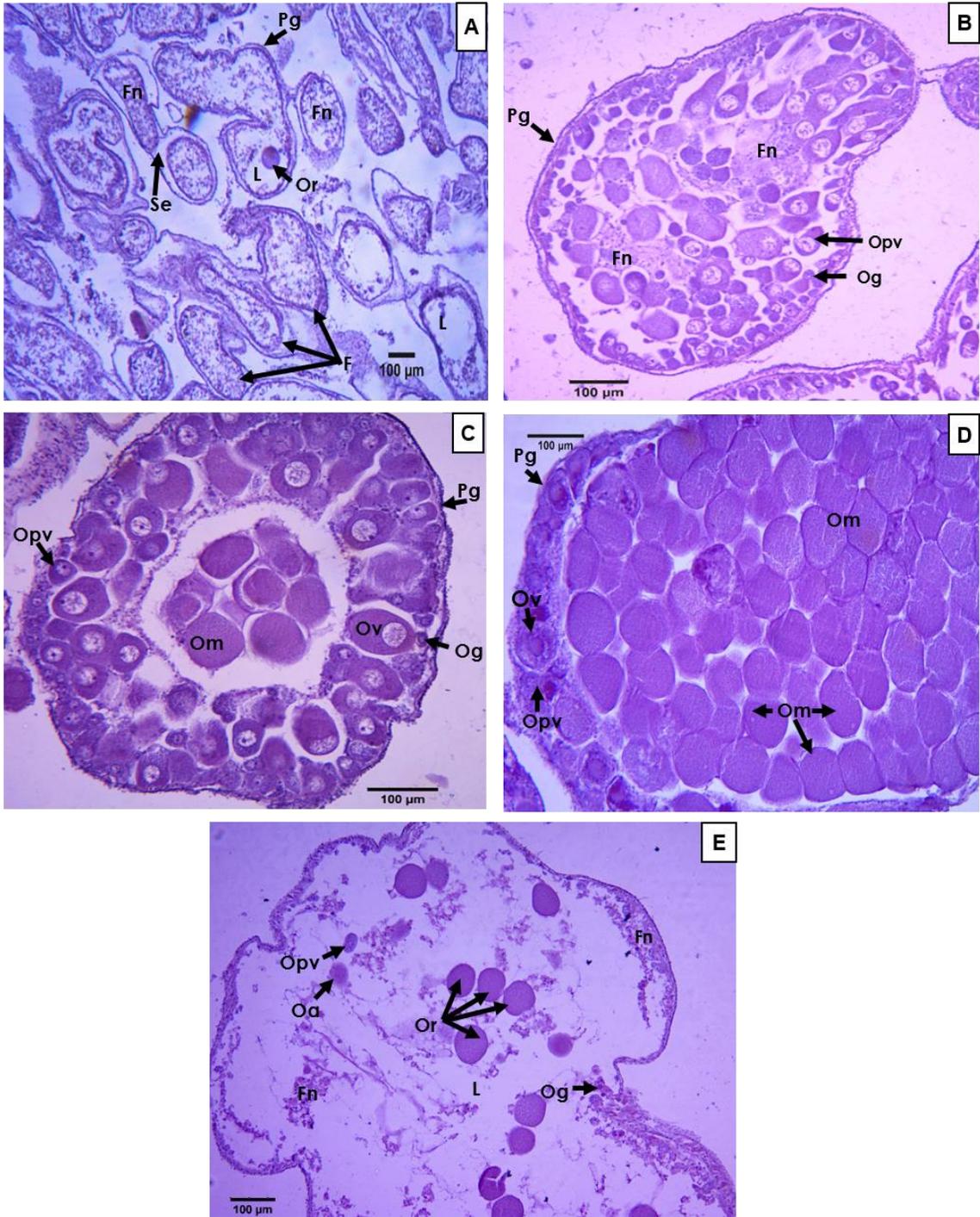


Figura 4. Fases de desarrollo gonádico en hembras de *Toxopneustes roseus*. A) reposo B) crecimiento C) premadurez, D) madurez y E) desove, Fn: fagocito nutritivo, Oa: ovocitos atrésicos, L: lumen, Se: saco externo, Pg: pared gonadal, Or: ovocito remanente, Om: ovocitos maduros, Ov: ovocitos vitelogénicos, Ovp: ovocitos previtelogénicos, Og: ovogonias, F: folículos.

## **9.1.2. Machos**

### **9.1.2.1. En este estudio la etapa de reposo fue inexistente**

#### **9.1.2.2. Crecimiento**

Las gónadas en desarrollo se caracterizaron por la presencia de una capa periférica continua de células sexuales primarias (espermatogonias y espermatoцитos) en las paredes del folículo. Estas células se distinguieron por su basofilia (color púrpura). El lumen se observó casi vacío al inicio del estadio, sin embargo se pudo observar la presencia de espermatozoides en el centro del lumen, así mismo, en algunos folículos se observaron fagocitos nutritivos (Fig. 5A).

#### **9.1.2.3. Premadurez**

La cantidad de fagocitos nutritivos disminuyó significativamente y estas células se observaron migrando a la periferia del acino al mismo tiempo que aumentó la cantidad de gametos maduros en el centro del lumen. Las células sexuales primarias se acumularon en forma de columnas que se extendían hacia el interior de la gónada (Fig. 5B).

#### **9.1.2.4. Madurez**

La gónada estaba llena de espermatozoides que se encontraban fuertemente teñidos, densamente empaquetados y listos para liberarse y se encontraba rodeada de una delgada capa de columnas espermatogénicas. No se pudieron observar las diferentes capas de la pared gonádica y los fagocitos nutritivos formaron una fina capa de células periféricas junto a las células primarias de la pared gonadal o simplemente no estaban presentes (Fig.5C).

#### **9.1.2.5. Desove**

En esta etapa se incluyeron aquellos folículos que estuvieran en liberación de espermatozoides de manera parcial y avanzada. Esta fase fue evidente por tener numerosas áreas vacías en forma de estrías entre los espermatozoides; las cuales aumentaban conforme avanzaba la liberación de gametos. La pared

gonadal era más evidente, sin embargo aparecieron algunos fagocitos (células de color café) entre las espermatogonias las cuales se observaron cerca de la pared gonadal (Fig.5D).

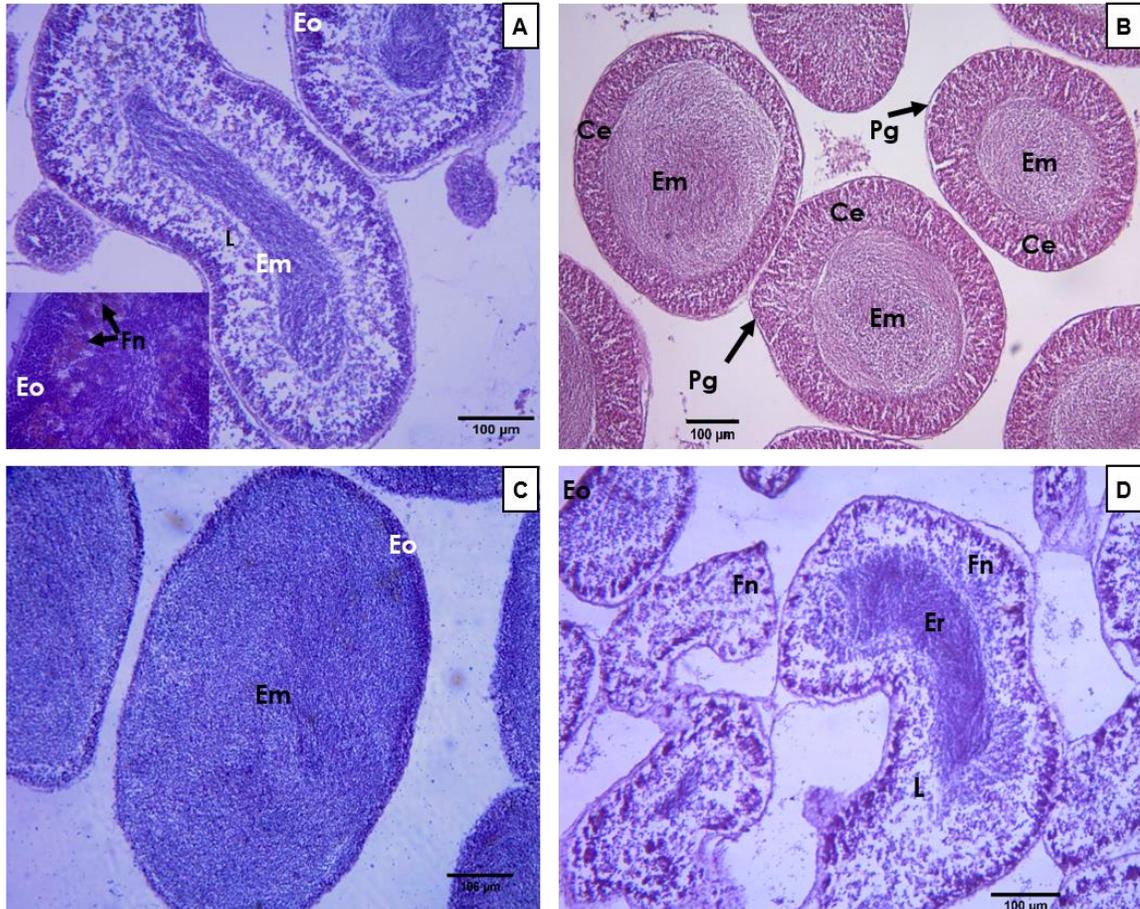


Figura 5. Fases del desarrollo gonádico en machos de *Toxopneustes roseus*. A) crecimiento, B) premadurez, C) madurez y D) desove. Fn: fagocito nutritivo, L: lumen, Er: espermatozoides remanentes, Em: espermatozoides maduros, Eo: espermatogonias, Pg: pared gonadal, Ce: columnas espermatogénicas.

## 9.2. Organismos hermafroditas

De los 224 individuos analizados, se encontraron 32 organismos con presencia de gametos de ambos sexos dentro o fuera de los folículos. Cabe resaltar que 27 de los organismos presentaron una mayor proporción de tejido gonádico masculino (Fig. 6A), mientras que tres de los organismos presentaron una mayor presencia de tejido gonádico femenino (Fig. 6B). Solo dos organismos presentaron la misma proporción de tejido gonádico masculino y femenino (Fig. 6C).

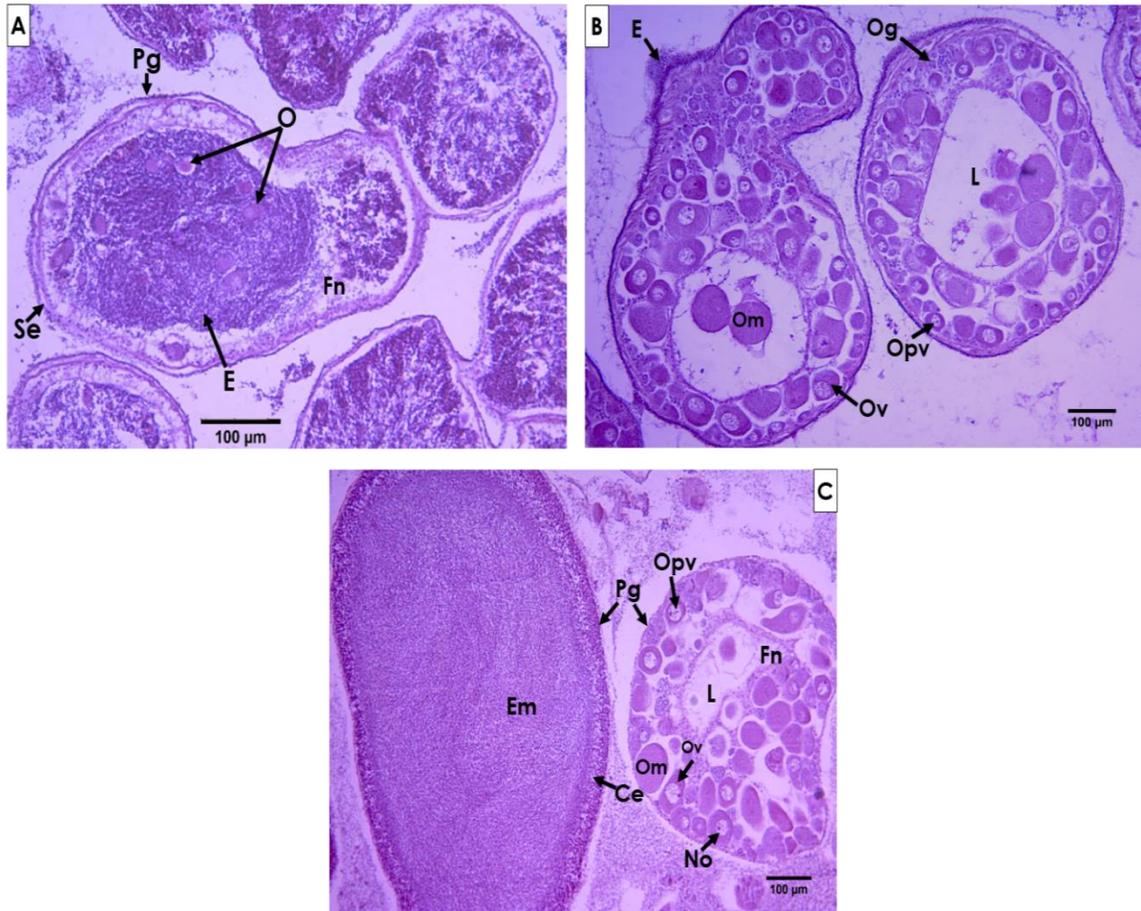


Figura 6. Sección de gónada de organismos con presencia de hermafroditismo, A) sección de gónada con mayor presencia de gametos masculinos (espermatozoides), B) sección de gónada con mayor presencia de gametos femeninos (ovocitos) y C) gónada con una proporción similar de ambos gametos. Ce: columnas de espermatogénicas, E: espermatozoides, Pg: pared gonadal, Om: ovocitos maduros, Ov: ovocitos vitelogénicos, Ovp: ovocito previtelogénicos, Og: ovogonias, Fn: fagocitos nutritivos, L: lumen.

### 9.2.1. Descripción de organismos hermafroditas

Las proporciones ováricas poseían todos los tipos de células que muestra la progresión normal de la formación de ovocitos a partir de ovogonias (Fig. 7A).

La pared gonadal de los ovarios era delgada y contenía ovogonias (<10 µm de diámetro) con núcleos basófilos. En los ovocitos previtelogénicos (30 a 50 µm de diámetro), se observaron núcleos bien definidos con uno o dos nucléolos excéntricos, estos ovocitos se distribuyeron dependiendo del estadio de madurez de la gónada. Así mismo, se pudo observar la fase de madurez y durante esta fase la pared folicular se observó más delgada con gran cantidad de ovocitos maduros en el lumen, mientras que los fagocitos, ovogonias y ovocitos previtelogénicos eran poco comunes en estos folículos (Fig. 7A). En la proporción testicular se pudo observar gametos maduros, dispersos alrededor de la proporción ovárica (Fig. 7B).

En algunos folículos se visualizaron tanto gametos masculinos como gametos femeninos, en estos folículos los gametos maduros se encontraban en el lumen y hubo espermatogonias en la periferia del folículo. En algunos folículos los gametos masculinos se encontraban en mayor cantidad, mientras que en otros folículos solo se observaron gametos masculinos en el lumen (Fig. 7C).

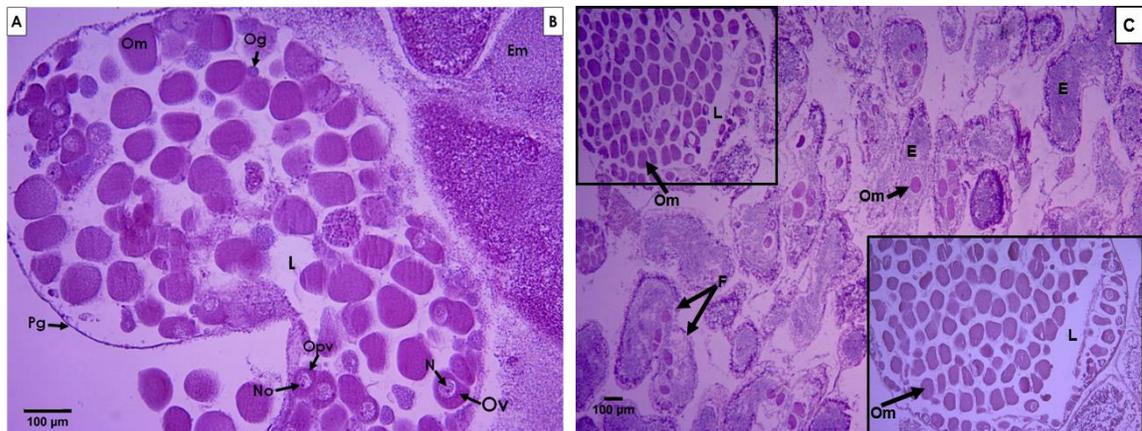


Figura 7. A) Proporción ovárica B) proporción testicular C) proporción con gametos masculinos y femeninos de gónada de *Toxopneustes roseus*. Pg: pared gonadal, Om: ovocitos maduros, Ov: ovocitos vitelogénicos, Ovp: ovocito previtelogénicos, Og: ovogonias, N: núcleo, No: nucléolo, L: lumen, Em: espermatozoides maduros, F: folículos.

### **9.2.2. Crecimiento**

En las gónadas que contenían gametos masculinos en desarrollo se observó la presencia de espermatogonias en la periferia de la pared folicular, donde se iniciaba la espermatogénesis dirigiéndose hacia el centro, lo cual concentró a los espermatozoides en el lumen del folículo. Los gametos que se observaron presentaban una coloración morada oscura. En algunos folículos se observó la presencia de ovocitos previtelogénicos, de los cuales algunos se ubicaban cerca de la periferia de la pared y otros en el centro del lumen (Fig. 8A).

En los folículos que contenían gametos femeninos, se observó la presencia de ovocitos en diferentes etapas de desarrollo. En el lumen se observaron ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos, así como la presencia de fagocitos nutritivos en el lumen. La pared gonadal era gruesa y se observaron ovocitos previtelogénicos y ovogonias cerca de la periferia del folículo (Fig. 8B).

### **9.2.3. En maduración**

Se presentaron hermafroditas en maduración, en los que se pudieron identificar folículos que solo contenían espermatozoides, mientras que en otros solo había ovocitos. Los folículos que contenían solo espermatozoides se caracterizaron por presentar espermatozoides maduros en el lumen y cerca de la pared del folículo se observaba una banda de células sexuales primarias (Fig. 8C).

En el caso de los folículos con ovocitos, se observaron ovocitos en diferentes fases de desarrollo, desde ovogonias hasta ovocitos maduros. Se observó la presencia de un nucléolo bien definido en ovocitos previtelogénicos y la mayoría de estos ovocitos se encontraban en la periferia del folículo (Fig. 8C).

### **9.2.4. Liberación de gametos**

Se examinaron organismos hermafroditas que presentaron folículos que estaban en liberación de espermatozoides. Estos se caracterizaron por presentar zonas vacías entre espermatozoides y en algunos casos la liberación fue parcial, la pared gonadal que se observó era delgada. Así mismo, en algunos folículos se

pudo observar la liberación de ovocitos, lo cual se caracterizó por presentar espacios que antes habían sido ocupados por ovocitos maduros en el lumen y también se registró la presencia de ovocitos remanentes (Fig. 8D).

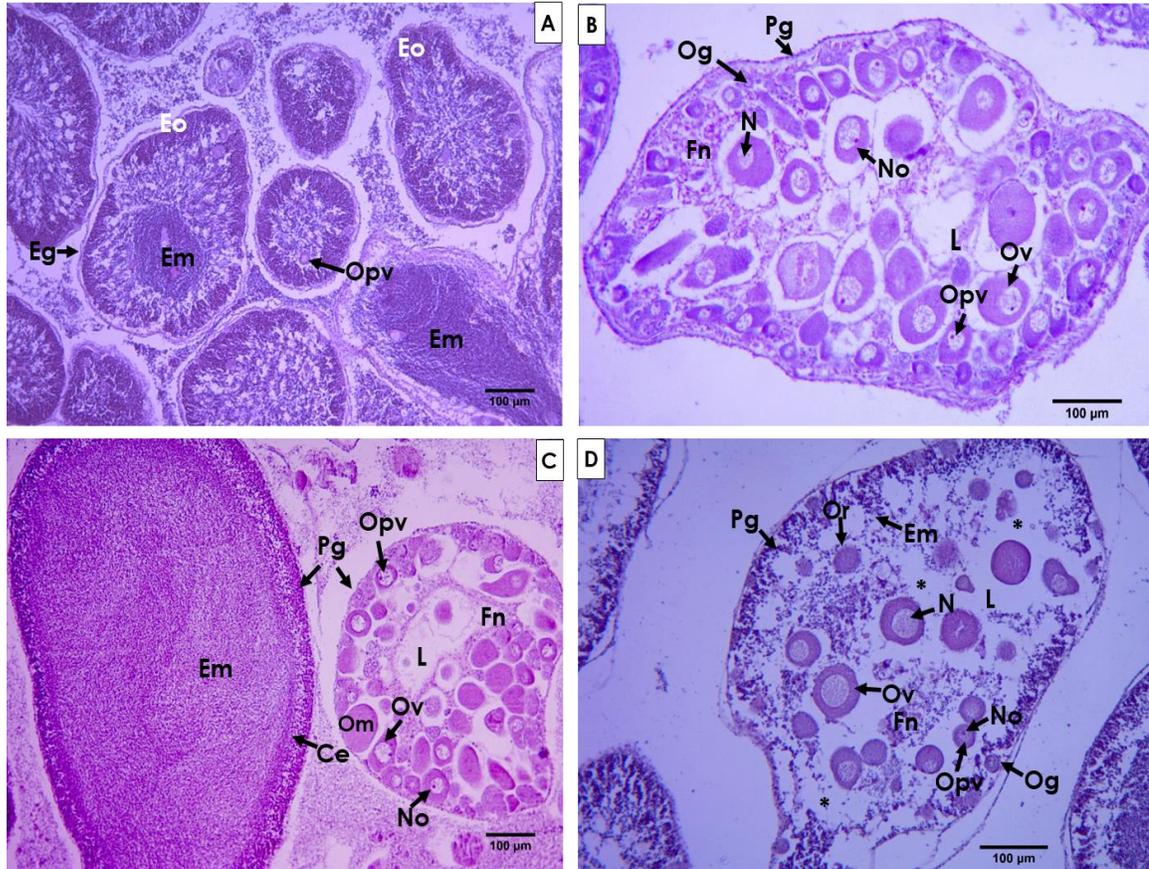


Figura 8. Organismos hermafroditas: A, B) hermafrodita crecimiento, C) en maduración, D) hermafrodita en desove. Ce: columnas de espermatogénicas, Em: espermatozoides maduros, Pg: pared gonadal, Om: ovocitos maduros, Ov: ovocitos vitelogénicos, Ovp: ovocito previtelogénicos, Og: ovogonias, N: núcleo, No: nucléolo, Fn: fagocitos nutritivos, L: lumen, Or: ovocitos remanentes. Los asteriscos (\*) indican espacios vacíos por la liberación de gametos

### 9.3. Distribución de tallas de ovocitos

Durante los meses de muestreo, entre las hembras de *T. roseus* se observó una ovogénesis asincrónica, presentando una producción de ovocitos vitelogénicos a lo largo del año. La talla promedio de los ovocitos fue de 62.2 ( $\pm$  27.2)  $\mu\text{m}$ , siendo la máxima de 131.6  $\mu\text{m}$ .

En marzo el porcentaje más elevado (49.3%) correspondió a ovocitos maduros (entre 80 y 130  $\mu\text{m}$ ) al igual que en abril (47.4%), mientras que el pico más alto se observó en mayo (56%). Posteriormente el porcentaje de ovocitos maduros disminuyó en junio (18%), julio (22.1%) y agosto (21.7%). En septiembre aumentó a 46.20% y casi se mantuvo constante el porcentaje de estos ovocitos hasta enero y febrero, cuando el porcentaje de ovocitos de la clase de 80 a 130  $\mu\text{m}$  disminuyó (10.6% y 10.5% respectivamente). En junio los ovocitos previtelogénicos (30-50  $\mu\text{m}$ ) fueron los más abundantes (33.5%), seguidos por un 26.2% de ovocitos vitelogénicos tempranos (50-70  $\mu\text{m}$ ). En julio los ovocitos previtelogénicos siguieron predominando con un porcentaje de 29.8%, seguido de ovocitos vitelogénicos tempranos (23.4%). En agosto continuaron predominando los ovocitos previtelogénicos (28.9%), mientras que el porcentaje de ovocitos vitelogénicos tempranos y ovocitos vitelogénicos disminuyó (15.5% y 9.1% respectivamente) (Fig. 9).

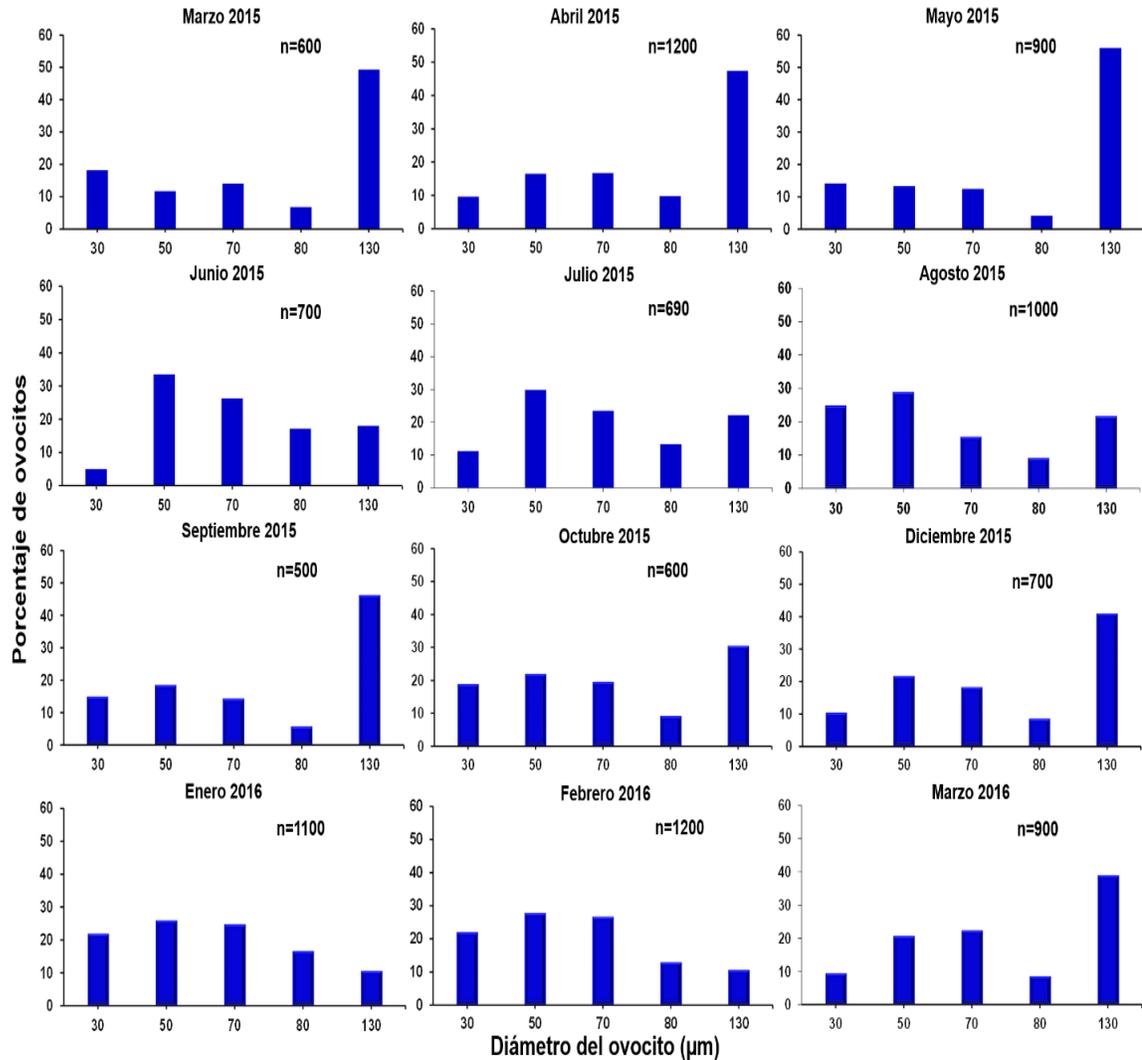


Figura 9. Distribución de los diámetros de los ovocitos de *T. roseus*.

#### 9.4. Índice gonadosomático (IGS)

Los valores del IGS global comienzan a incrementarse en marzo 2015, alcanzando su pico más alto en mayo con un valor de  $6.23 \pm 3.51$ . Posteriormente, los valores empiezan a descender en junio, alcanzando el valor más bajo en agosto ( $1.60 \pm 1.62$ ), lo cual puede indicar un periodo importante de desove. En septiembre nuevamente se presenta un valor elevado, aunque de menor magnitud que el de mayo, posteriormente los valores vuelven a decrecer, observándose al final un incremento del índice (Fig.10).

Los valores medios del IGS generalmente fueron mayores para las hembras que para los machos, siendo el valor promedio para hembras de  $3.31 \pm 1.71$  y  $3.30 \pm 1.62$  para machos. En ambos sexos los valores del índice gonadosomático incrementan al inicio del muestreo. En hembras el valor máximo se registró en mayo ( $7.73 \pm 3.87$ ), en septiembre se presentó un segundo pico de IGS ( $4.85 \pm 2.59$ ) y de octubre a febrero los valores son relativamente constantes, observándose un tercer pico en marzo de 2016. Los valores más bajos se presentaron en agosto de 2015 y febrero de 2016 (Fig.10). En machos se presentó un valor alto del IGS ( $5.84 \pm 3.09$ ) en junio, sin embargo el valor máximo de este índice ocurrió en marzo de 2016 con un valor de  $6.92 (\pm 1.81)$ , los valores bajos se observaron en marzo de 2015 y enero de 2016 (Fig. 11). De acuerdo con el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas del IGS entre sexos ( $K-W_{(1,192)}=0.262$ ,  $p>0.05$ ), sin embargo, al analizar el IGS a lo largo de los meses en hembras se evidenciaron diferencias significativas ( $K-W_{(11,106)}=50.8$ ,  $p<0.05$ ), así mismo, para los machos se evidenciaron diferencias significativas del IGS a lo largo de los meses de muestreo ( $K-W_{(11,86)}=40.32$ ,  $p<0.05$ ).

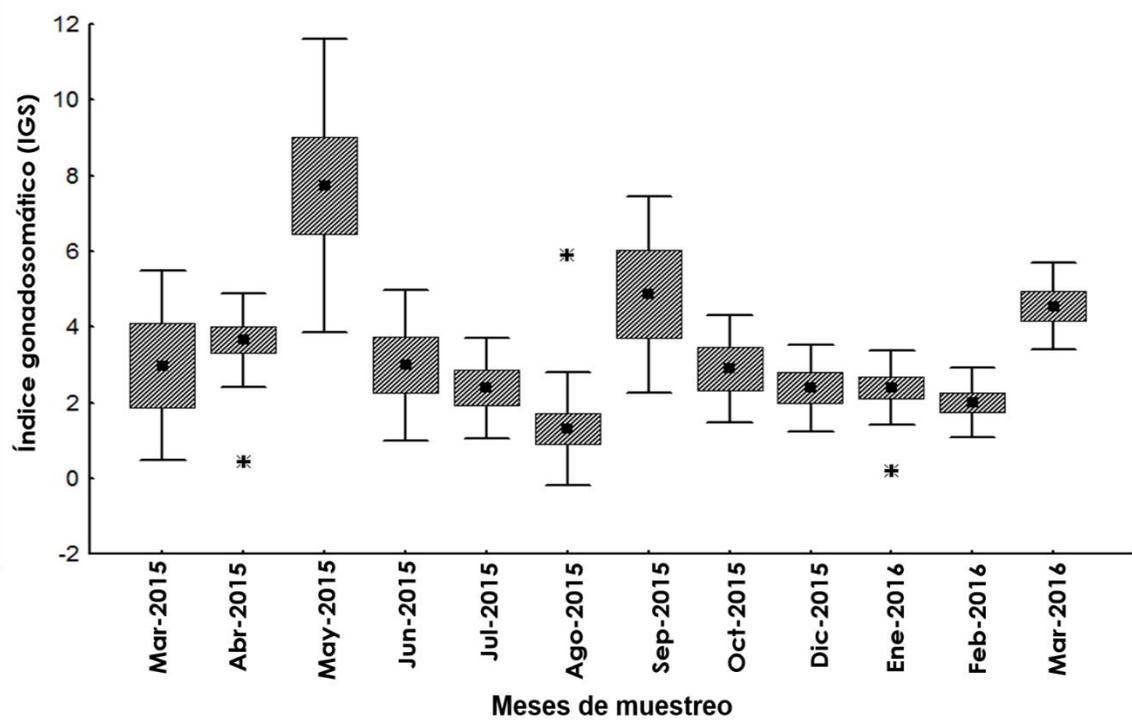


Figura 10. Comportamiento mensual del índice gonadosomático (media  $\pm$  SE) de hembras de *Toxopneustes roseus* durante el tiempo de muestreo los \* indican los valores extremos.

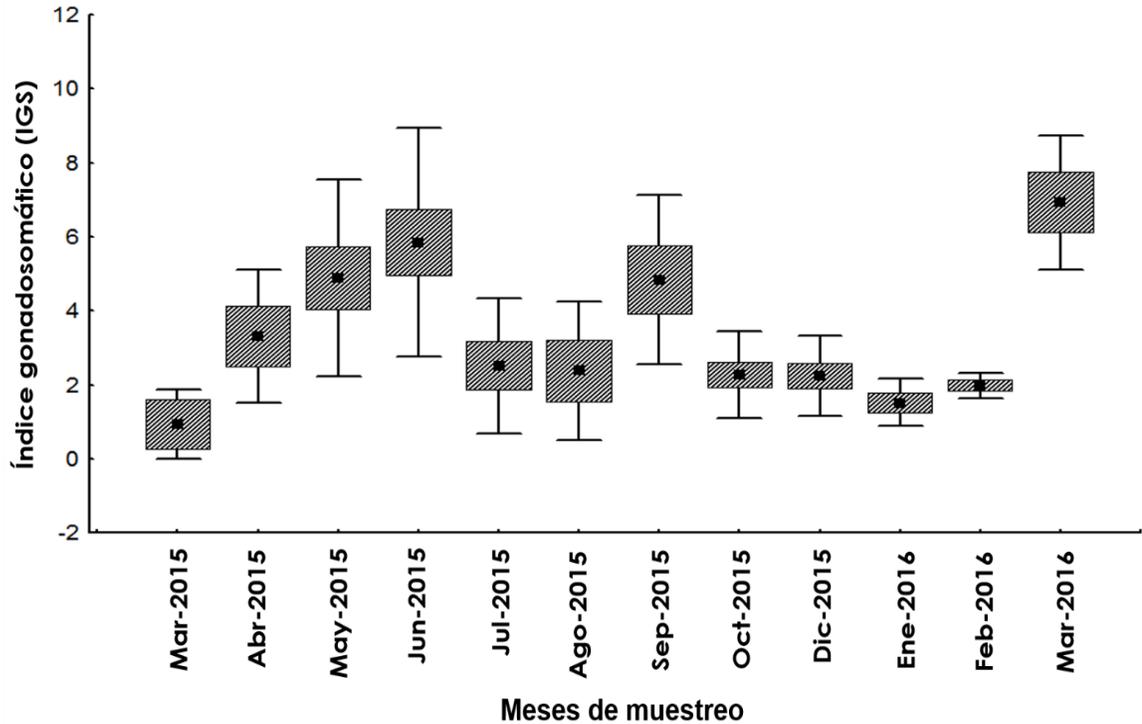


Figura 11. Comportamiento mensual del índice gonadosomático (media  $\pm$  SE) de machos de *Toxopneustes roseus* durante el tiempo de muestreo.

#### 9.4.1. Índice gonadosomático hermafroditas

El valor promedio del IGS fue de  $3.38 \pm 1.46$ , en mayo de 2015 se presentó un pico de este índice ( $5.03 \pm 1.56$ ); sin embargo, el valor máximo se observó en marzo de 2016 ( $6.22 \pm 0.88$ ), los valores más bajos de este índice se presentaron en agosto y diciembre de 2016 ( $1.25$  y  $2.09$  respectivamente) (Fig.12).

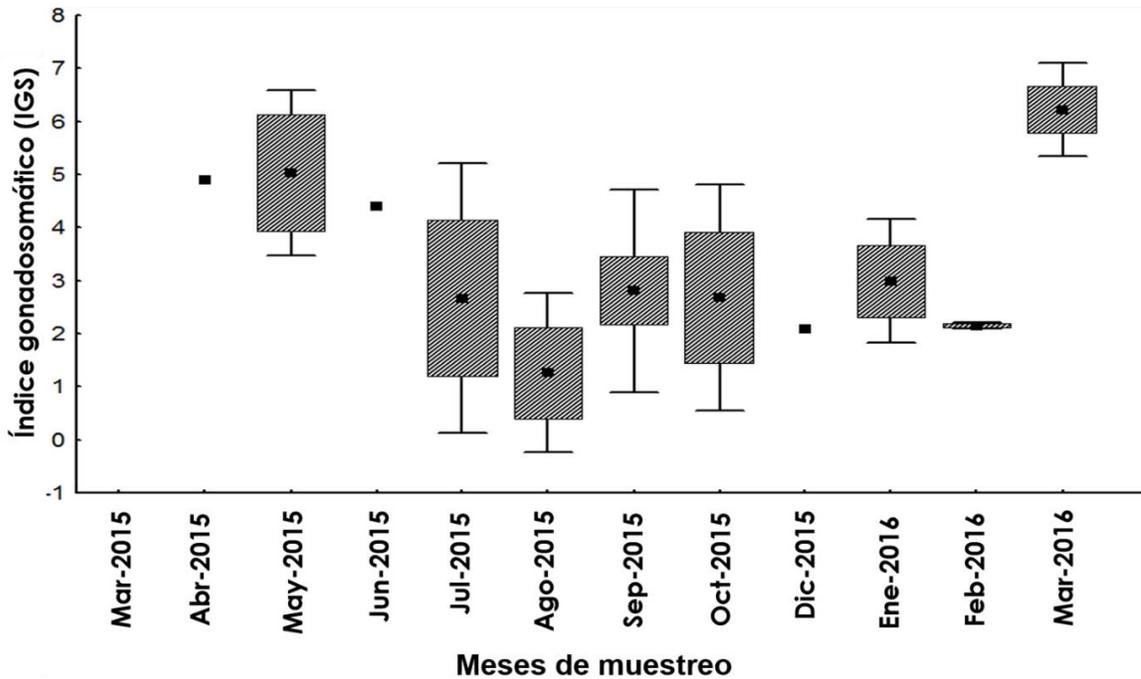


Figura 12. Comportamiento mensual del índice gonadosomático (media  $\pm$  SE) de organismos hermafroditas de *Toxopneustes roseus* durante el tiempo de muestreo.

### 9.5. Índice de madurez (IM)

La tendencia del IM durante los meses de muestreo fue similar tanto en hembras como en machos. Para machos, de agosto a diciembre se registraron los valores más altos y los valores más bajos se observaron en enero y febrero de 2016. En el caso de las hembras se registraron valores altos en mayo, septiembre y diciembre de 2015 y marzo de 2016, al igual que los machos los valores bajos para hembras se observaron en enero y febrero de 2016. Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas del IM entre sexos ( $T=-0.157$ ,  $df=22$ ,  $P=0.87$ ) (Fig. 13).

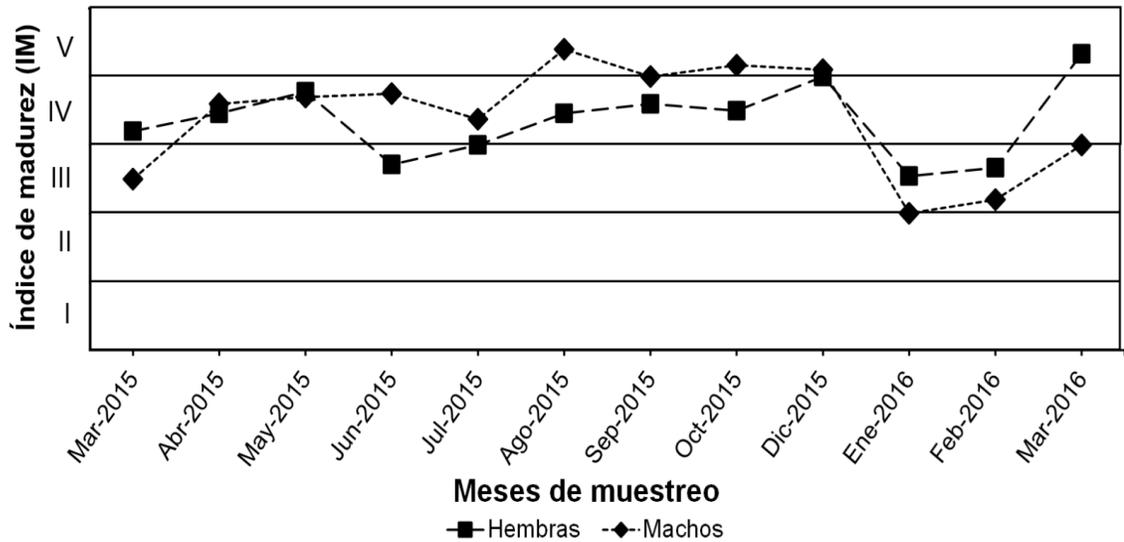


Figura 13. Variaciones mensuales del índice de Madurez (IM) de hembras y machos de *T. roseus*. Los niveles de IM son: Etapa I-reposo; Etapa II-crecimiento; Etapa III-premadurez; Etapa IV: madurez; Etapa V-desove.

### 9.6. Ciclo de desarrollo gonádico

Al analizar la fase gonádica por sexo, en hembras la fase de madurez se presentó en tres meses: marzo, abril y mayo (40%, 61.5% y 77.7% respectivamente) aumentando el porcentaje de organismos en esta fase. Posteriormente, esta fase se observó de julio-diciembre de 2015 y enero-febrero de 2016, pero con variaciones en la frecuencia de organismos maduros.

La fase de premadurez se presentó a lo largo del periodo de estudio, excepto en agosto. De marzo a julio 2015 el porcentaje de hembras en esta etapa tuvo variaciones y las hembras presentaron una menor frecuencia de esta etapa en mayo de 2015 y marzo de 2016, ambas con un 22.2%. En contraste, la mayor frecuencia se observó en junio (71.4%). En marzo de 2015 el 40% se encontraron en fase de madurez y progresivamente este porcentaje se incrementó observando en mayo la mayor frecuencia de hembras en esta etapa (77.7%). Posteriormente se encontró un segundo periodo de hembras en esta etapa de julio a enero, en el que se observó un alto porcentaje de hembras maduras en septiembre (60%), disminuyendo en los siguientes meses. Cabe mencionar que en junio de 2015 y febrero de 2016 no se encontraron organismos en etapa de madurez. Respecto a la fase de desove, se observó que en agosto el 23% de las hembras se

encontraban es esta fase, posteriormente se presentó un segundo evento de desove en diciembre con el 50% en este estadio y en marzo de 2016 se observó el mayor porcentaje (55.5%) (Fig. 14A).

En machos, la fase de reposo no se presentó. La fase de crecimiento inició en marzo 2015 con una frecuencia de 50%, en julio esta frecuencia disminuyó a 37.5% y en octubre se presentó el porcentaje más bajo (16.6%). En enero se observó la frecuencia más alta (83.3%) de machos en crecimiento, posteriormente, en febrero disminuyó a 80% (Fig. 14B).

La fase de premadurez prácticamente ocurrió de manera sincronica con el de las hembras. Esta fase Inició en marzo 2015 con un 50% ya partir de abril este porcentaje disminuyó gradualmente, hasta alcanzar la frecuencia más baja en octubre (8.3%). En diciembre se observó un aumento considerable a 40%, sin embargo, en enero y febrero nuevamente disminuyó a 16.6% y 20% respectivamente, alcanzando el máximo valor en marzo 2016 con un 100% de machos en esta fase. La fase de madurez comenzó en abril con un 60% de frecuencia, en mayo se determinó la mayor frecuencia, ya que el 70% de los organismos se encontraban en esta fase y en junio disminuyó a 58.3%, posteriormente, en julio y agosto este valor disminuyó a 25% y 20% respectivamente. En septiembre se observó una segunda frecuencia alta de machos en esta fase (66.6%), decreciendo en octubre a 16.6% y en diciembre únicamente el 10% de los machos estaban maduros. La fase de desove inició en julio con 25% de los organismos liberando gametos, en agosto se observó la mayor frecuencia (60%) y en septiembre se determinó la menor frecuencia (16.6%). En octubre el 58.3% de los organismos se encontraban en esta fase, disminuyendo en diciembre a 50%(Fig. 14B).

En organismos hermafroditas, la fase de reposo no se presentó. La fase de crecimiento se observó en los meses de julio, octubre 2015 y enero-febrero 2016 con una frecuencia de 66.6%, 100%, 66.6% y 50% respectivamente. La fase de premadurez solo se observó en el mes de febrero de 2016 con una frecuencia de 50%. La madurez en los primeros tres meses (marzo, abril y mayo de 2015) se

observó una frecuencia del 100%. La etapa de desove inicio en agosto con 33.3% aumentando a 66.6% en septiembre y posteriormente en diciembre de 2015 la frecuencia aumenta a un 100% de organismos en esta etapa, en marzo 2015 se observó un 75% de organismos en desove.

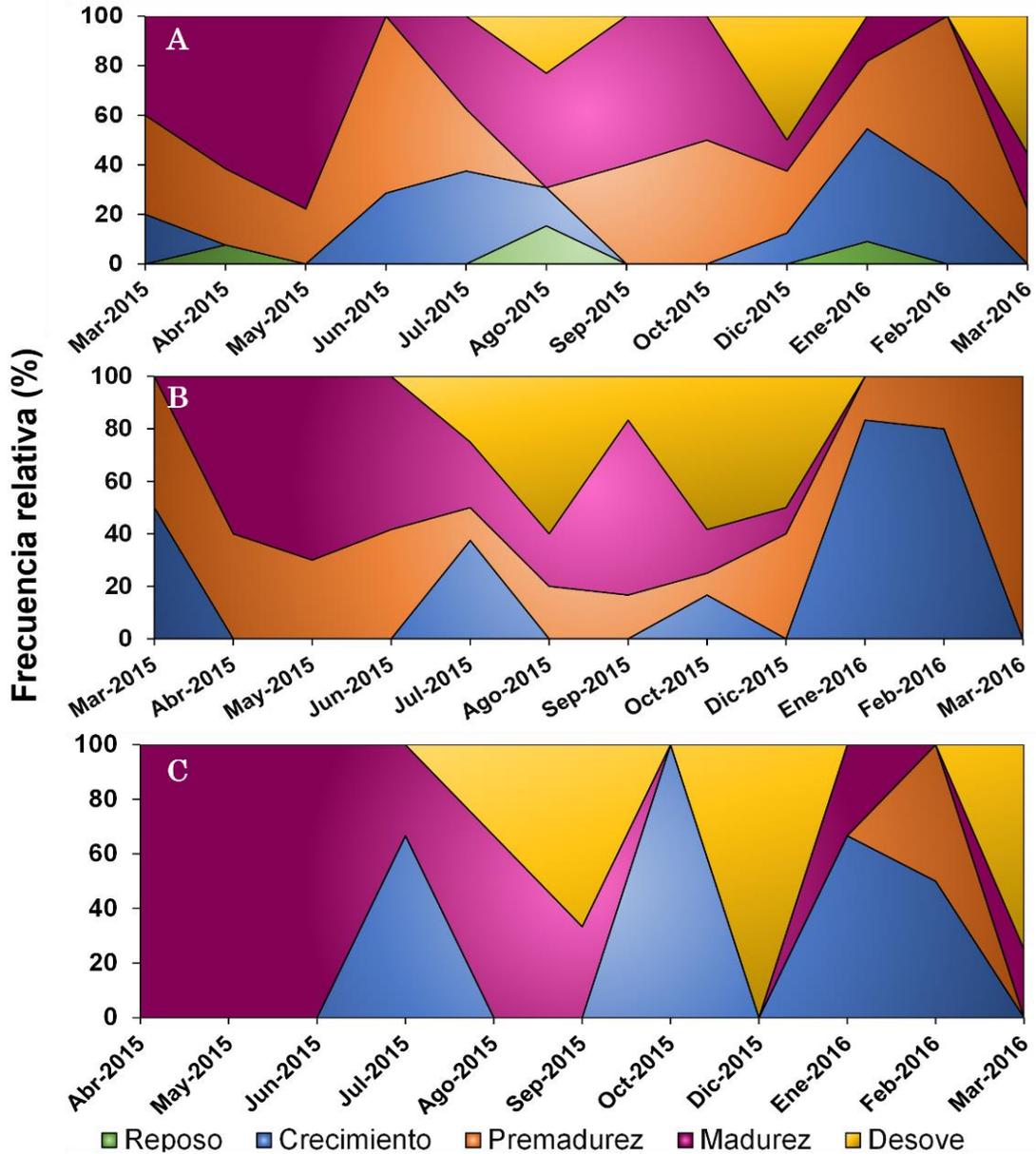


Figura 14. Frecuencias de las etapas reproductivas A) hembras, B) machos y C) hermafroditas de *Topxopneustes roseus*.

### **9.6.1. Ciclo reproductivo poblacional**

Considerando los ciclos gonádicos de ambos sexo se obtuvo el ciclo reproductivo poblacional de la especie. La fase de reposo se observó en abril con una baja frecuencia (5.5%), en agosto la frecuencia fue de 11.1% y en enero se presentó una frecuencia de 5.8%.

En marzo de 2015 el 28.5% de la población se encontraba en la fase de crecimiento, un segundo periodo se observó de junio a agosto y un tercero de octubre 2015 a febrero de 2016, siendo el mes de enero el que presentó la mayor frecuencia (58.8%). La fase de premadurez se registró en todos los muestreo, teniendo mayor frecuencia en junio de 2015 (52.6%) y febrero-marzo 2016 (52.9% y 50% respectivamente). La madurez fue casi constante en todos los muestreos excepto en febrero 2016. Esta fase inició en marzo de 2015, aumentó paulatinamente presentando dos frecuencias altas, la mayor en mayo (73.6%) y posteriormente septiembre (63.6%). Los organismos se encontraron en desove de julio a diciembre de 2015 y marzo de 2016 observándose la mayor frecuencia durante octubre y diciembre con 38.8% para ambos meses (Fig. 15).

Es importante resaltar que en cuatro muestreos (julio, agosto, octubre y diciembre) fue posible encontrar concomitantemente entre cuatro y cinco fases de desarrollo gonádico, lo cual evidencia que dentro de la misma población simultáneamente pueden encontrarse organismos que estén en las diferentes etapas de desarrollo (Fig. 15).

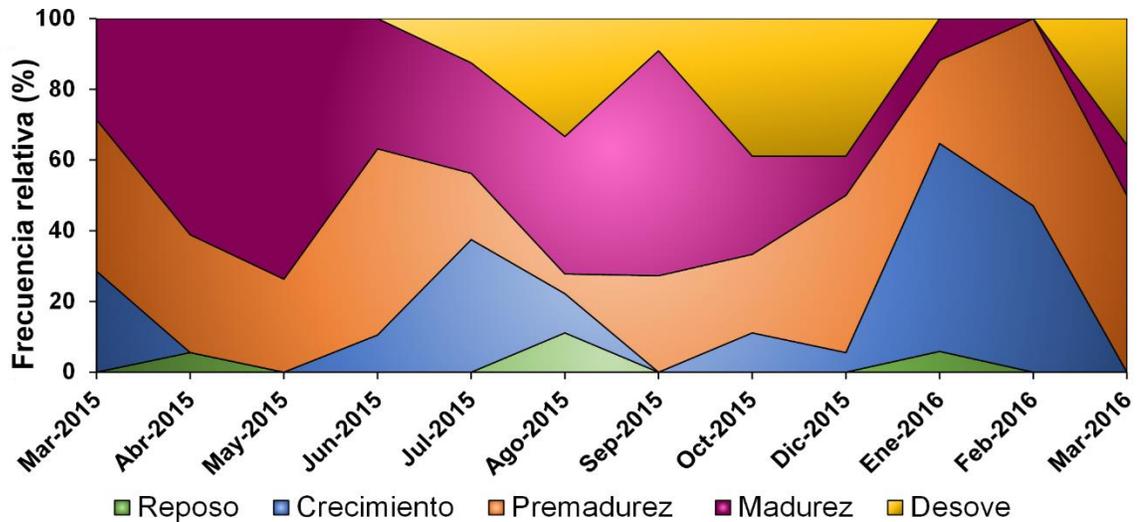


Figura 15. Frecuencias de las etapas reproductivas de la población de *Toxopneustes roseus*.

### 9.7. Fecundidad

La fecundidad anual promedio ( $\pm$  SD) de *T. roseus* fue  $6.7 \pm 5.7$  millones de ovocitos vitelogénicos por hembra.

De marzo a mayo de 2015 se observó un aumento de la fecundidad, con un valor máximo en mayo que alcanzó los  $19.8 \pm 8.2$  millones de ovocitos. A partir de junio la fecundidad decreció hasta observarse el valor mínimo de  $3.3 \pm 3.3$  millones de ovocitos en agosto y en este mes las hembras presentaron menos del 50% de ovocitos vitelogénicos (Fig. 16).

La diferencia de la fecundidad real de *Toxopneustes roseus* a lo largo de los meses de muestreo analizada mediante PERMANOVA resultó significativa (pseudoF=9.01, p=0.001). De acuerdo al análisis de pruebas pareadas, el mes que hizo esta diferencia fue mayo, ya que en este mes la fecundidad real fue marcadamente más alta que en los otros meses de muestreo (tabla IV).

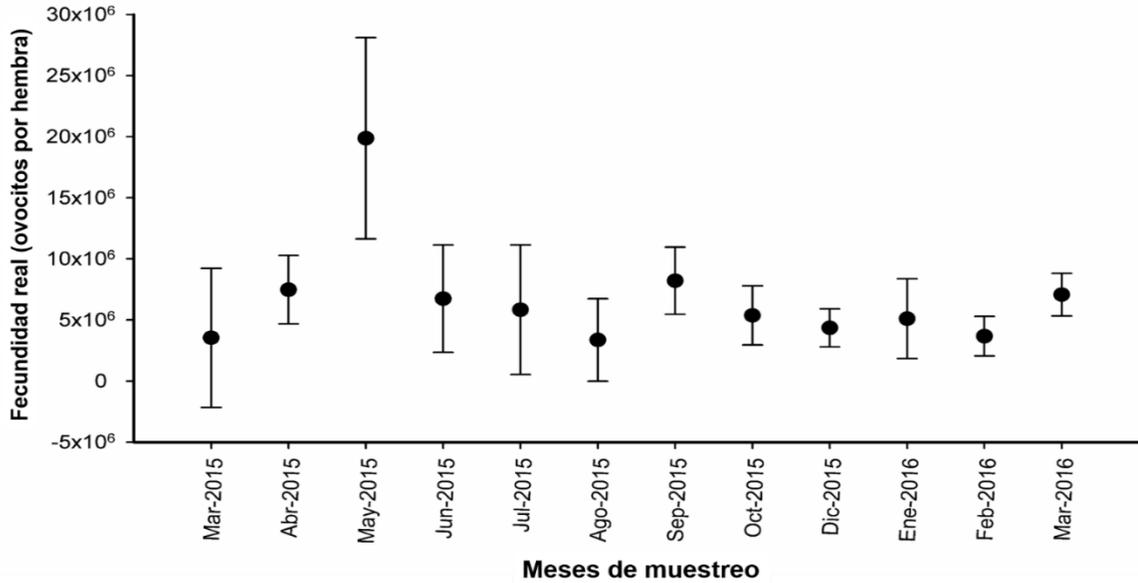


Figura 16. Fluctuación mensual de la fecundidad real (media ± ES) de *T. roseus* registrada a lo largo del tiempo de muestreo.

Tabla IV. Análisis de pruebas pareadas de la fecundidad real en *T. roseus*. En negrita se señala el mes que fue marcadamente diferente.

	Abr 2015	May 2015	Jun 2015	Jul 2015	Ago 2015	Sep 2015	Oct 2015	Dic 2015	Ene 2016	Feb 2016	Mar 2016
Mar 2015	0.0119	0.002	0.1094	0.2686	0.5202	0.086	0.1813	0.2211	0.1195	0.2264	0.0217
Abr 2015		0.0001	0.5135	0.1909	0.0042	0.6322	0.1296	0.0159	0.0532	0.0005	0.8185
May 2015			<b>0.0006</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0052</b>	<b>0.0003</b>	<b>0.0004</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>
Jun 2015				0.5506	0.06	0.4302	0.5811	0.2493	0.3709	0.05	0.6005
Jul 2015					0.3246	0.264	0.8633	0.8057	0.9921	0.4282	0.2545
Ago 2015						0.018	0.139	0.2798	0.1662	0.5225	0.0045
Sep 2015							0.123	0.0196	0.0759	0.0019	0.4318
Oct 2015								0.4729	0.7851	0.1358	0.1198
Dic 2015									0.7185	0.3699	0.006
Ene 2016										0.2416	0.0714
Feb 2016											0.0007

## 9.8. Variables ambientales

Los valores mensuales promedio de temperatura superficial del mar variaron entre los 27.7°C y 31.4°C, observándose los valores mínimos en abril de 2015 y marzo de 2016 (27.8°C y 27.7°C respectivamente). A partir de mayo de 2015 los valores de temperatura aumentaron con un valor máximo en septiembre de 2015 (31.4°C) (Fig. 17). Se observaron tres valores altos en los promedios de la clorofila a, uno en abril de 2015 (3.94 mg.m<sup>-3</sup>) y los otros en diciembre de 2015 (1.46 mg.m<sup>-3</sup>) y enero de 2016 (3.09 mg.m<sup>-3</sup>). En mayo los valores disminuyeron hasta alcanzar el valor mínimo en octubre (0.15 mg.m<sup>-3</sup>) (Fig. 17).

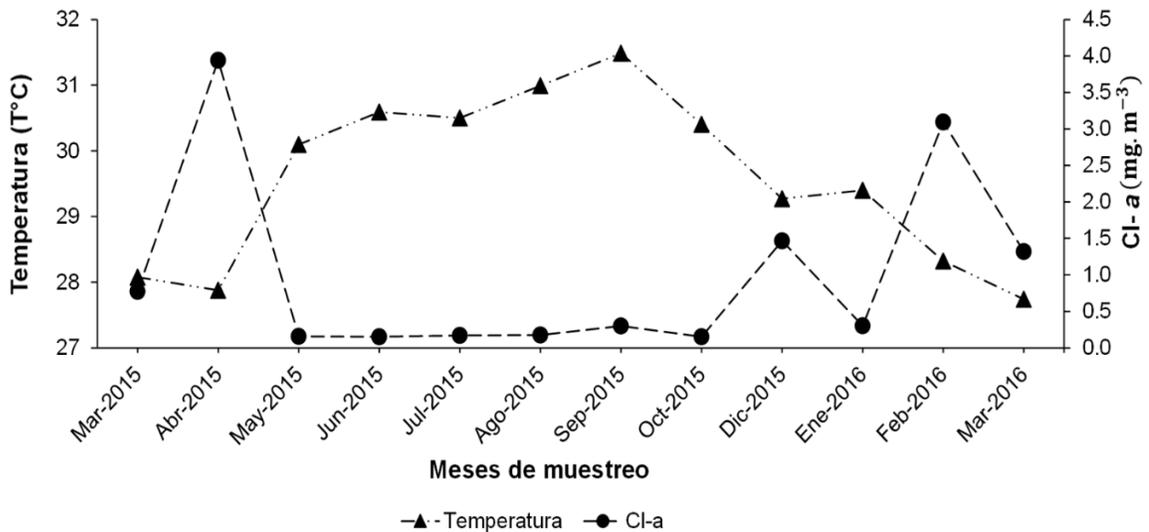


Figura 17. Variación de los valores promedios de la temperatura y clorofila a a lo largo de los meses de muestreo.

El análisis de regresión lineal múltiple (MLR) del IGS con los parámetros ambientales se resolvió en dos pasos ( $IGS = 5.745 - (0.0742 * \text{temperatura}) - (0.208 * \text{Cl-a})$ ) e indicó que la varianza total explicada para el IGS en términos de las variables seleccionadas fue del 13%, con un valor de correlación múltiple de 1.74% ( $R^2 = 0.132$ ,  $R = 0.0174$ ,  $p \text{ múltiple} > 0.05$ ). Debido a que el nivel de correlación es muy bajo, se considera que estas variables no influyen de manera significativa al índice gonadosomático de *T. roseus*. En el caso de IM, el modelo RLM se resolvió igual en dos pasos ( $IM = -0.656 + (0.136 * \text{temperatura}) + (0.0214 * \text{Cl-a})$ ). Indicando que la variación total explicada por las variables seleccionadas

fue del 30%, con un valor de correlación múltiple del 9.1% ( $R^2= 0.303$ ,  $R=0.0916$ ,  $p$  múltiple $>0.05$ ). Para la fecundidad real (Fr), el análisis de RLM también se resolvió en dos pasos: ( $Fr= -1, 858,547.467 + (302,968.111 * temperatura) - (381,219.459 * CI-a)$ ). La variación total explicada con las variables seleccionadas fue del 18.4%, con un valor de correlación múltiple de 3.3 ( $R^2= 0.132$ ,  $R=0.0174$ ,  $p$  múltiple $>0.05$ ).

## 10. DISCUSIÓN

### 10.1. Proporción sexual

De acuerdo con Pearson & Cameron (1991) la gran mayoría de las especies de equinoideos gonocóricos a las que se les ha estimado la proporción sexual no se desvía de 1:1, lo cual se ha confirmado más recientemente con *Tripneustes depressus* (González-Peláez 2001; Luna 2000) *Loxechinus albus* (Pérez *et al.* 2009), *Diadema mexicanum* (Benítez-Villalobos *et al.* 2015) y *Arbacia stellata* (Díaz-Martínez *et al.* 2019). Sin embargo, en este trabajo se encontró que la proporción sexual no cumplió esta característica (1:1) lo cual se atribuye a la presencia de organismos hermafroditas durante casi todo el periodo de muestreo, encontrando una proporción sexual anual (H:M:Hr) de 0.8:1.2:0.3. El aspecto importante a destacar de este resultado es que se determinaron organismos con hermafroditismo en la mayoría de los meses de muestreo, acompañados de organismos machos y hembras en la misma población discreta. La condición de coexistencia de machos, hembras y hermafroditas conocida como trioecia, es un raro sistema de apareamiento que había sido documentado solo en plantas y de acuerdo con la teoría de la asignación de sexos (Charnov, 1982) no debería ocurrir en metazoarios bajo generaciones discretas y teoría simple. Sin embargo, algunos trabajos han mostrado recientemente que existe evidencia de trioecia en dos especies de nematodos microscópicos del nuevo género *Auanema* (Chaudhuri *et al.* 2015; Kanzaki *et al.* 2017; Tandonnet *et al.* 2018; Anderson *et al.* 2020) y la anémona marina *Aiptasia diaphana* bajo condiciones de estrés en laboratorio (Armoza-Svuloni *et al.* 2014).

De acuerdo con la teoría de asignación de sexos abordada por Charnov (1982) se estableció un modelo para metazoarios en los que se muestra de manera gráfica las condiciones para androdioecia (coexistencia de machos y hermafroditas), dioecia (sexos separados) o hermafroditismo puro (solo individuos con ambos sexos); y en general solo se permite en la naturaleza la coexistencia de hermafroditas y un sexo puro. Es bastante difícil obtener los tres sexos y si ambas curvas de ganancia indicadas en el gráfico se inclinan hacia arriba

obtenemos dioecia, por lo tanto ninguno de los valores de los parámetros en el modelo da tres sexos. En complemento a ello Anderson *et al.* (2020) establecen que la trioecia es considerada como un estado evolutivamente transitorio y proponen que en nematodos, la androdioecia (machos /hermafroditas) que se ha registrado en *Caenorhabditis elegans* probablemente evolucionó de la dioecia (machos /hembras) a través de un intermedio trioico.

Así mismo Tandonnet *et al.* (2018) mencionan que las estrategias de apareamiento influyen mucho en la genética y en consecuencia la evolución de las poblaciones. Por ejemplo, la autofecundación debido a la ausencia de recombinación eficaz, promueve la reducción del tamaño efectivo de la población y por lo tanto conduce a una reducción general en el nivel de polimorfismo, mientras que en una escala macroevolutiva, puede causar aislamiento entre poblaciones y resultar en extinción, ya que disminuye la eficacia de la selección para eliminar alelos nocivos y la capacidad de adaptarse a nuevos entornos. Sin embargo, bajo ciertas condiciones (por ejemplo, baja densidad de población) ofrece garantía reproductiva, ya que los individuos autocompatibles pueden reproducirse sin un compañero de apareamiento. Por otro lado, el entrecruzamiento (gonocorismo o hermafroditismo autoincompatible) favorece la diversidad genética y ofrece un mayor potencial para adaptarse a entornos cambiantes a costa de la necesidad de encontrar pareja. Los autores establecen que los costos y las ventajas de la cruce frente a la autofecundación dependen de factores ambientales y, por lo tanto, la selección puede favorecer las transiciones entre sistemas de apareamiento, en consecuencia la androdioecia, la ginodioecia y la trioecia son estrategias intermedias evolutivamente inestables, pero ofrecen importantes sistemas para probar modelos de las causas y consecuencias del sistema de apareamiento en la evolución de poblaciones.

Respecto a la explicación de las causas de la trioecia, Anderson *et al.* (2020) estudiaron un modelo matemático de evolución reproductiva basado en la historia de vida única y la determinación del sexo del nematodo *Auanema freiburgensis*, una especie extremófila que vive en el lago Mono California, el cual

se caracteriza por ser hipersalino y con altos niveles de arsénico. Los autores desarrollaron el modelo en dos escenarios: uno en el que la producción relativa de hermafroditas y hembras depende por completo del medio ambiente y otro basado en mediciones empíricas de una población con dependencia ambiental incompleta o "permeable".

En el primer escenario, las condiciones ambientales pueden impulsar a la población a lo largo de un continuo evolutivo y dar como resultado el mantenimiento estable de múltiples sistemas reproductivos. El segundo escenario "con fugas" da como resultado el mantenimiento de tres sexos para todas las condiciones ambientales. Los autores mostraron que el sistema flexible de determinación de sexo de *A. freiburgensis* (en consecuencia su trioecia) puede contribuir a la resiliencia a nivel de la población en su hábitat natural efímero y estresante. Estos resultados demuestran entonces que la historia de vida, las interacciones tanto inter como intra específicas y el medio ambiente pueden desempeñar funciones definitorias en la evolución de los sistemas sexuales y determinan la presencia continua de trioecia en el nematodo.

En el caso de la trioecia observada en la población estudiada de *T. roseus*, entonces no hay fundamentos teóricos suficientes que puedan explicarla. La población estudiada no vive bajo condiciones ambientales extremas como en el caso del nematodo y tampoco presenta una densidad poblacional extremadamente baja que requiera condiciones particulares de asignación de sexos. Quizás las causas se encuentren en los patrones de estructura de edad /talla, la estructura espacial de la población estudiada o la plasticidad genotípica en la elección del sexo y quizá eso tenga relación con el patrón reproductivo semicontinuo de la especie a diferencia de los otros equinodermos estudiados en la zona, sin embargo esto requeriría estudios más complejos y amplios, inclusive a nivel molecular o análisis de cromosomas, para tratar de encontrar una respuesta satisfactoria.

## 10.2. Desarrollo gonádico, frecuencia de tallas de ovocito e IGS

Se encontraron cinco estadios gonádicos para hembras y cuatro para machos, a diferencia de lo observado por Byrne (1990); Pérez *et al.* (2009) & Benítez-Villalobos (2015) con otras especies de erizos, debido a que los machos de *T. roseus* no presentaron una fase de reposo, mientras que por otro lado, el porcentaje de organismos en estadio de reposo en hembras fue muy bajo. Estos resultados coinciden con los encontrados por Pearse & Phillips (1968); Díaz-Martínez *et al.* (2019) en *E. mathei* y *A. stellata* respectivamente, dichos autores mencionan que en estas especies, se puede presentar una etapa de reposo discreta, lo cual podría indicar que la producción de gametos requiere un breve período de reposo o que no ocurre en algunos individuos.

De acuerdo con McClanahan & Muthiga (2013), los ciclos reproductivos pueden ser continuos, estacionales o semicontinuos, dependiendo de la ubicación geográfica de las poblaciones, lo que indica que son varios los factores que influyen en estacionalidad de la reproducción de los organismos. Los análisis del IGS, talla de ovocitos y fecundidad real, así como la caracterización de los estadios de desarrollo gonadal mediante técnicas histológicas, muestran que *T. roseus* presenta madurez de los gametos en casi todos los meses de muestreo, excepto en febrero de 2016, lo que evidencia periodos de desove de julio a diciembre de 2015 y posteriormente en febrero de 2016. Sin embargo, se pudo observar que los organismos machos desovaron antes que las hembras, lo cual podría evidenciar una estrategia reproductiva en la cual los machos mediante diversas señales estimulan a las hembras a realizar la liberación de sus gametos (Hamel & Mercier 1996). En consecuencia se determinó que *T. roseus* tiene un ciclo reproductivo semicontinuo, lo cual difiere con lo encontrado por Benítez-Villalobos *et al.* (2015) para *Diadema mexicanum*, el cual es otro equinoideo regular de hábitat submareal en la costa de Oaxaca. En el caso de *D. mexicanum* se presentó un solo periodo de madurez de abril a agosto (comprendiendo el periodo de desove de julio a octubre) por lo que se evidenció un ciclo reproductivo

estacional, similar a lo reportado para las poblaciones de Panamá (Lessios 1981) y Colima, México (Espino-Barr *et al.* 1996).

Así mismo, el patrón reproductivo difiere del caracterizado por Vives-Pérez (2018) para otras especies de la familia Toxopneustidae, como *Tripneustes depressus*, en el que se reportó un periodo de desove intenso de enero a marzo y un evento menor en agosto. Por otro lado González-Peláez (2001) propuso un único periodo de desove al año (de mayo a agosto) en Punta Arena, Bahía de La Ventana, BCS, México. Para la misma localidad, Álvarez-López (2017) encontró desoves durante todo el año, a excepción de diciembre, aunque describe dos periodos de mayor intensidad, uno de octubre a noviembre y otro de abril a junio, mientras que en la población de *T. depressus* de Galápagos (Ecuador) se presentan entre dos y tres periodos de desove al año.

Se ha documentado que la estacionalidad de la reproducción en los ecosistemas marinos aumenta gradualmente de los trópicos hacia las latitudes polares que son altamente estacionales. Este patrón es modulado principalmente por el ciclo anual de la energía solar recibida y es exacerbado en el ambiente marino por el hielo oceánico de invierno (Priddle *et al.* 1986), y sugiere que existen patrones reproductivos comunes, relacionados con la distribución latitudinal de los organismos. Se ha observado que especies de erizos que se distribuyen en zonas templadas presentan un ciclo reproductivo definido, mientras que erizos de zonas tropicales no poseen periodicidad en sus patrones o simplemente no son evidentes (Luna 2000). Debido al hábitat de *T. roseus*, se esperaba que presentara un patrón característico de un ciclo reproductivo continuo, ya que a pesar de ser una especie de aguas someras, la zona tropical donde se distribuye la especie no presenta cambios estacionales tan marcados como en las regiones polares. Sin embargo, esta condición no siempre se cumple como es el caso de una población de erizos de hábitat templado (*Arbacia stellata*) en la que se documentó un ciclo semicontinuo, con un alto porcentaje de organismos maduros desde verano hasta invierno en Punta Banda, Baja California (Díaz-Martínez *et al.* 2019).

Tanto las hembras como los machos de *T. roseus* presentaron disponibilidad de gametos durante casi todo el año. Sin embargo, la temporada de liberación de gametos de machos y hembras no coincidió por completo, ya que las hembras presentaron disponibilidad de ovocitos maduros durante diez meses, mientras que los machos lo hicieron durante ocho meses. Al respecto, se ha documentado que además de que diferentes poblaciones de la misma especie tienen épocas de desove diferentes, también pueden existir diferencias interanuales dentro de la misma población (Pearse & Cameron 1991; Byrne *et al.* 1998). De acuerdo con diversos estudios, el no tener un patrón de desove definido parece ser una tendencia en las poblaciones cuando hay gran disponibilidad de alimento y condiciones ambientales favorables (Kennedy & Pearse 1975; Pearse *et al.* 1986; Bay-Schmith & Pearse 1987; Pearse & Cameron 1991; Guillou & Michel 1993), lo cual de nuevo hace difícil la explicación de la condición de trioecia en la población.

Respecto al desarrollo gametogénico y su relación con el IGS, se observó que durante marzo de 2016, los valores fueron altos, lo cual se podría interpretar como un periodo en el que los organismos se encontraban en etapa de madurez, sin embargo, la fecundidad, el IM y el análisis histológico no proporcionaron evidencia de una etapa madura en ese mes. En contraste, de marzo a mayo de 2015 y de agosto a octubre del mismo año, cuando se estableció la etapa de madurez, el diámetro promedio de ovocitos que predominó fue de 130 $\mu$ m, el cual corresponde a ovocitos maduros, mientras que la fecundidad promedio fue de alrededor de 2.4 millones de ovocitos vitelogénicos por hembra, definiendo así de manera inequívoca la etapa de madurez. Para explicar esta diferencia es importante tomar en cuenta que las gónadas de erizo de mar, a diferencia de otros organismos, desempeñan también un papel importante como órgano de reserva indistintamente del sexo. En ese sentido, de manera general varios autores utilizan el peso gonádico como un indicador del estado reproductivo, sin embargo, por su doble función como órgano de reserva, los valores del IGS pueden mantenerse altos fuera de la temporada reproductiva (Kenner & Lares 1991; Kelly

2000; Unuma & Walker 2009) como se encontró en este estudio, en el que los valores del IGS en marzo fueron altos en el caso de *T. roseus*. Por lo tanto, los cambios en el índice gonadosomático pueden depender de la cantidad de reservas acumuladas en lugar de la etapa de maduración, y por consiguiente, el IGS por sí solo no sería un buen parámetro para evaluar el estado gametogénico de estas especies.

De acuerdo con Walker *et al.* (2007), el aumento del tamaño de las gónadas no solo corresponde al aumento de tamaño y número de gametos maduros, sino también a las células somáticas y germinales inmaduras, dichas células mantienen una asociación inversa, es decir el aumento de células germinales es seguido de una disminución de células somáticas (Harrington 2007; Lamare *et al.* 2002). Dentro de las descripciones realizadas por Byrne (1990) se puede observar esta asociación, en las que es notable la disminución de fagocitos nutritivos y el aumento de ovocitos y espermatozoides a lo largo del ciclo reproductivo de *Paracentrotus lividus*. En el presente estudio no fue concisa esa asociación, debido probablemente a que el ciclo gonádico es semicontinuo por lo que los fagocitos mantienen una función y proliferación constante pero en pocas cantidades.

Se encontró una alta variabilidad intraindividual en el estadio de maduración de las gónadas de *T. roseus* y en consecuencia se presentaron ovocitos con desarrollo asincrónico. Se encontró en las hembras siempre la presencia de un estadio gonadal anterior o siguiente al predominante en un mismo folículo (en algunos folículos se pudieron encontrar varias etapas gonadales en los mismos individuos), sin embargo la predominancia de un estadio de desarrollo particular permitió establecer las fases de desarrollo gonádico que dominaron en periodos particulares. Lo anterior concuerda con lo reportado por Díaz-Martínez *et al.* (2019) para una población templada de *A. stellata* en la que no se observó sincronía en el desarrollo de las gónadas, observando de dos a cuatro etapas de desarrollo entre los individuos y dentro de la misma gónada en cualquiera de los meses estudiados y para ambos sexos. Así mismo, mencionan que los ovocitos

pre vitelogénicos y vitelogénicos estuvieron presentes en casi todos los meses de muestreo recalando que los vitelogénicos fueron los más frecuentes. En el caso de la población de *T. roseus* analizada en este estudio se pudo observar la presencia de ovocitos tanto pre como vitelogénicos en todos los meses de muestreo, siendo de igual modo los vitelogénicos los más frecuentes.

### **10.3. Fecundidad**

De acuerdo con la fecundidad y tamaño del ovocito estimados en el presente trabajo, se puede afirmar que *T. roseus* presenta una estrategia reproductiva tipo “r”, la cual se caracteriza porque los organismos que presentan esta estrategia 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-Llondra 2002).

Los modelos de fecundidad sostienen que si el alimento es escaso, el éxito reproductivo disminuye para las especies cuya estrategia consiste en óvulos de tamaño pequeño y que éste incrementa con el aumento de talla del óvulo. Sin embargo, cuando los niveles de alimento son altos, entonces el éxito reproductivo es alto para las especies con óvulos de tallas pequeñas (Grange *et al.* 2004; McEdward & Miner 2003). Esto implica que si la especie estudiada tiene una estrategia planctotrófica, en la que los óvulos de tamaño pequeño son producidos en grandes cantidades, es porque los niveles de alimento son suficientes para satisfacer los requerimientos de las larvas. Dado que la temporada de desove no coincide con el aumento de la productividad primaria se propone que las larvas de *T. roseus* aparentemente no dependen de esos pulsos de producción primaria para su supervivencia. Esto coincide con lo que obtuvieron Benítez-Villalobos *et al.* (2012), quienes reportaron para dos especies de ofiuroideos (*Ophicoma aethiops* y *O. alexandri*) que el tiempo de liberación con el aumento en la productividad primaria no coinciden y esta misma observación es mencionada por Hendler (1979) para las mismas dos especies de ofiuroideos pero en Panamá.

#### 10.4. Variables ambientales

Se ha documentado que la sincronización en la liberación de gametos puede estar determinada por varios factores físico y biológicos relacionados con señales ambientales (Soong *et al.* 2005). Espinoza *et al.* (2008) y González-Irustra (2009) refieren que temperaturas elevadas podrían favorecer el desarrollo y maduración gonádica, y las bajas temperaturas el inicio de la gametogénesis. Lara-Rueda (2004) encontró una correlación positiva entre la temperatura y el ciclo gonádico en *E. vanbrunti*; sin embargo, hay evidencia en otras especies de que el crecimiento coincide con la disminución de la temperatura, por ejemplo *P. lividus* y *S. droebachiensis* (Herrero-Barrencua, 2008; James & Siikavuopio, 2012), mientras que en otras especies como *S. purpuratus* y *T. depressus* no se encontró una correlación directa entre el ciclo gonadal y la temperatura (Cochran & Engelmann 1975; Vives-Pérez 2018). En el caso de *T. roseus* se encontró una correlación baja del ciclo reproductivo con la temperatura y la CI- a, ya que de acuerdo con el análisis aplicado, la varianza explicada del IGS a partir de estas variables, fue menor del 50%, a diferencia de estudios realizados en otras especies, como *A. stellata* en la que la relación con los factores ambientales fue fuerte, evidenciada por valores altos en la varianza explicada (Díaz-Martínez *et al.* 2019), así mismo, para otros equinodermos de la zona de estudio se han obtenido valores altos en la varianza explicada, en relación con los factores ambientales (Benítez-Villalobos & Martínez-García 2012; Benítez-Villalobos *et al.* 2013).

Por lo anterior, se podría considerar que las variables analizadas en este estudio no mostraron una influencia fuerte en la determinación del ciclo reproductivo de la especie. No obstante, Gil (2015) argumenta que aunque la temperatura no es un factor definitivo para el inicio de la gametogénesis o el desove, si es indispensable para que el ovocito alcance su máximo desarrollo durante la maduración invernal para *Pseudechinus magallanicus*.

## 11. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados encontrados en este trabajo, se determinó que la proporción entre machos, hembras y hermafroditas de *T. roseus* en playa Tijera, presentó diferencias significativas de la proporción 1:1:1 durante el periodo de muestreo. Se destaca la presencia de organismos con hermafroditismo en la mayoría de los meses de muestreo, acompañados de organismos machos y hembras en la misma población discreta, creando la condición conocida como trioecia, la cual había sido documentado solo en plantas y dos especies de nematodos extremófilos. En consecuencia aun no existen argumentos teóricos suficientes para explicarla.

Durante el ciclo reproductivo se distinguieron cinco estadios gonádicos para hembras y cuatro para machos: en reposo (solo en hembras), crecimiento, premadurez, madurez y desove. La especie estudiada presentó un patrón reproductivo semicontinuo, con un periodo de liberación de gametos de julio a diciembre de 2015. El desarrollo de las gónadas es asincrónico en ambos sexos.

La fecundidad promedio fue de  $6.7 \pm 5.7$  millones de ovocitos vitelogénicos por hembra, resaltando la máxima fecundidad en mayo de 2015 con  $19.8 \pm 8.2$  millones de ovocitos. La talla promedio de los ovocitos fue de  $62.2 (\pm 27.2) \mu\text{m}$ , y la talla máxima fue de  $131.6 \mu\text{m}$ , a lo largo de la ovogénesis se determinaron tallas de  $10\text{-}30 \mu\text{m}$  los cuales correspondían a ovogonias, de  $30\text{-}50 \mu\text{m}$  ovocitos previtelogénicos, vitelogénicos de  $50\text{-}80 \mu\text{m}$  y tallas de  $80$  a  $131 \mu\text{m}$  ovocitos maduros.

La forma en que las variables analizadas influyen en las variaciones del ciclo reproductivo de *T. roseus* aún no es clara, lo cual indica que son otros los factores que regulen dicha actividad, por lo cual es importante realizar más estudios que ayuden a discernir dicha relación.

## 12. REFERENCIAS

- Alvarado, J.J., F. A. Solís-Marín & C. G. Ahearn. 2010. Echinoderm (Echinodermata) diversity in the Pacific coast of Central America. *Marine Biodiversity*, 40: 45-56.
- Álvarez- López, I. 2017. Ciclo reproductivo de *Tripneustes depressus* (A. Agassiz, 1863) (Echinodermata: Echinoidea) en Punta Arena de la Ventana, Baja California Sur, México. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, 51 pp.
- Anderson, A. G., L. T. Bubrig & J. L. Fierst. 2020. Environmental stress maintains trioecy in nematode worms. *Society for the study of Evolution. International journal of organic evolution*. 74(3): 518-527.
- Antonio-Sánchez, J. M. 2019. Validación de especies formadoras de rodolitos (Rhodophyta: corallinophycidae) en las playas Tijera, La Entrega e isla Cacaluta, Huatulco, Oaxaca. Tesis de maestría Universidad del mar 86 Pp.
- Armoza-Zvuloni, R., E. Kramarsky-Winter, Y. Loya, A. Schlesinger & H. Rosenfeld. 2014. Trioecy, a Unique Breeding Strategy in the Sea Anemone *Aiptasia diaphana* and Its Association with Sex Steroids. *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, 90(6):122, 1–8. DOI 10.1095/biolreprod.113.114116.
- Arranz, J. A., X. Ariza, E. Riudor, L. Vilar, J. Salvadó, N. Galofré, S. Vendrell & J. M. Esquirol. 2003. Reflexiones preliminares sobre una aplicación científico-médica de actualidad: la clonación. *Acta Bioethica* 9(1): 81-91.
- Ashcroft, S. & C. Pereira. 2003. *Practical Statistical for the Biological Sciences, Simple Pathways to Statistical Analyses*. Palgrave mcmillan, 165 p.
- Bailey, R. 2008. *Reproduction in animals: sexual reproduction*. Consultado el 13 de abril del 2020.
- Bandaranayake, W. M. 2006. The nature and role of pigments of marine invertebrates. *Nat. Prod. Rep.* 23:223-255.

- Bay-Schmith, E. & J. S. Pearse. 1987. Effect of fixed day lengths on the photoperiodic regulation of gametogenesis in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 11: 287-294.
- Benítez-Villalobos, F. & Q. Y. Abadía-Chanona. 2015. Densidad poblacional, distribución espacial y mortalidad natural del erizo de mar *Toxopneustes roseus* (Camarodonta: Toxopneustidae) en tres sitios de Oaxaca, México. *Biologic Tropical* 63(2): 121-133.
- Benítez-Villalobos, F., C. Aguilar-Duarte & O.H. Ávila-Poveda. 2012. Reproductive biology of *Ophiocoma aethiops* and *O. alexandri* (Echinodermata: Ophiuroidea) from Estacahuite Bay, Oaxaca, Mexico. *Aquatic Biology* 17:119-128.
- Benítez-Villalobos, F., M. Martínez-García. 2012. Reproductive biology of the starfish *Pharia pyramidatus* (Echinodermata: Asteroidea) from the Mexican Tropical Pacific. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 92(6): 1409-1418.
- Benítez-Villalobos, F., O. H. Ávila-Poveda, I. S. Gutiérrez-Méndez. 2013. Reproductive biology of *Holothuria fuscocinerea* (Echinodermata: Holothuroidea) from Oaxaca, Mexico. *Sexuality and Early Development in Aquatic Organisms*. 1:13-24.
- Benítez-Villalobos, F., O. H. Avila-Poveda, J. P. Díaz-Martínez & A. B. Bravo-Ruíz. 2015. Gonad development stages and reproductive traits of *Diadema mexicanum* (Echinodermata: Echinoidea) from Oaxaca, Mexico. *Invertebrate Reproduction & Development* 59(4): 237-249.
- Bronstein, O. & Y. Loya. 2015. Photoperiod, temperature, and food availability as drivers of the annual reproductive cycle of the sea urchin *Echinometra* sp. from the Gulf of Aqaba (Red Sea). *Coral Reefs* 34:275–289.
- Brown, N. & S. Eddy. 2015. *Echinoderm Aquaculture*. John Wiley & Sons.

- Brusca, R. C. & G. J. Brusca. 1990. Invertebrates. Sinauer, Massachusetts, 992 p.
- Brusca, R. C. & G. J. Brusca. 2003. Invertebrates. 2a ed. Sinauer Associates. U.S.A. 936 pp.
- Byrne, M. 1990. Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the west coast of Ireland. *Marine Biology*, 104, 275–289.
- Byrne, M., N.L Andrew, D.G Worthington & P.A Brett. 1998. Reproduction in the diadematoid sea urchin *Centrostephanus rodgersii* in contrasting habitats along the coast of New South Wales, Australia. *Marine Biology*, 132: 305–318.
- Calvo, J., E. Morriconi & P.M. Orlor. 1998. Estrategias reproductivas de moluscos bivalvos y equinoideos. Bosschi (ed.), Argentina, 195-231p.
- Campbell, N. & J.B. Reece. 2005. Biología. 7a ed., Panamericana, Madrid. 1229 pp.
- Caso, M. E. 1978. Los equinoideos del Pacífico Mexicano; 2da. Parte. Ordenes Stiriodonta y Camarodonta. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología UNAM*, 1: 1-224.
- Cervantes-Hernández, P. & M. Manzano-Sarabia. 2017. Procesamiento y análisis satelital, Windows Image Manager. Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, México.
- Charnov, E.L., 1982. The theory of sex allocation. Princeton: Princeton University Press.
- Chaudhuri, J., N. Bose, S. Tandonnet, S. Adams, G. Zuco, V. Kache, M. Parihar, S. H. Von Reuss, F. C. Schroeder & A. Pires-daSilva. 2015. Mating dynamics in a nematode with three sexes and its evolutionary implications. *Sci. Rep.* 5, 17676; doi: 10.1038/srep17676.

- Chia, F. S. & C. W. Walker. 1991. Echinodermata: Asteroidea. In: Giese, A. C., J. S. Pearse & V. B. Pearse (Eds.). *Reproduction of Marine Invertebrates Vol. VI Echinoderms and Lophophorates*. The Boxwood Press. USA. 301-340 pp.
- Cochran, R. C. & F. Engelmann. 1975. Environmental regulation of the annual reproductive season of *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson). *Biol. BUN.*, Vol. 148. pp. 393-401.
- Conand, C. & N. A. Sloan. 1989. *World Fisheries for Echinoderms. Offprints from marine invertebrate fisheries: their assessment and management*. John Wiley & Sons, Inc. Canada. 647-663.
- Curtis, H., N. Sue Barnes, A. Schnek & A. Massarini. 2008. *Biología*. 7a ed., Panamericana, Buenos Aires. 1009 pp.
- Díaz-Martínez, J. P., E. de J. Carpizo-Ituarte & F. Benítez-Villalobos. 2019. Reproductive patterns of the black starry sea urchin *Arbacia stellata* in Punta Banda, Baja California, México. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 1–13. <https://doi.org/10.1017/S0025315419000316>
- Espino-Barr, E., R. R. Cibrián, A. García-Boa. 1996. Estructura y densidad de la población del erizo tinta *Diadema mexicanum* en el litoral rocoso del estado de Colima. *INP. SEMARNAP. Ciencia Pesquera*. 2: 60-67.
- Espinoza, G. R. A., J. L. Reyes, J. H. Himmelman & C. Lodeiros. 2008. Actividad reproductiva de los erizos *Lytechinus variegatus* y *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) con relación a factores ambientales en el golfo de Cariaco, Venezuela. *Revista de Biología Tropical* 56 (3): 341-350.
- Fenaux, L. 1970. Maturation of the gonads and seasonal cycle of planktonic larvae of the ophiuroid *Amphiura chiajei* Forbes. *Biología Bulletin*. 138: 262-271.

- Fernández, C. & G. Pergent. 1998. Effect of different formulated diets and rearing conditions on growth parameters in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Journal of Shellfish Research*, 17: 1571-1581.
- Flores-Vidal, X., R. Durazno, C. Chavanne & P. Flament. 2011. Coastal circulation in the absence of wind in the Gulf of Tehuantepec, Mexico: High-frequency radar observations. *Ciencias marinas* 37(3A):493-512.
- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen: (para adaptarla a las condiciones de la República Mexicana). Instituto de Geografía UNAM, México, 246 pp.
- Giese, A.C. & J.S. Pearse. 1974. Reproduction: general principles. Pp: 1-49, In: Giese AC, J.S. Pearse, (eds). *Reproduction of marine invertebrates*, Vol. 1. New York (NY): Academic Press.
- Gil, D. G. 2015. Biología y ecología del erizo de mar *Pseudechinus magellanicus* (Echinoidea: Temnopleuridae) en Patagonia Central. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Glynn, P. W., G. Wellington & C. Birkeland. 1979. Coral reef growth in the Galápagos: Limitation by Sea Urchin. *Science* 203: 47-49.
- González- Peláez, S. S. 2001. Biología poblacional del erizo café *Tripneustes depressus* A. Agassiz, 1863 (Echinodermata: Echinoidea), en el sur del Golfo de California, México. Tesis Licenciatura, UABCS, La Paz Baja California Sur, México. 71 Pp.
- González-Irusta, J. M., F. Goñi de Cerio & J.C. Canteras. 2010. Reproductive cycle of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Cantabrian Sea (northern Spain): environmental effects. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 90(4): 699-709.
- González-Irusta, J. M. 2009. Contribución al conocimiento del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) en el Mar Cantábrico: ciclo gonadal

y dinámica de poblaciones. *Tesis doctoral*, Dpto. deficiencias y técnicas del agua y del medio ambiente, área de ecología. Universidad de Cantabria.

Grange, L. J. 2005. Reproductive success in Antarctic marine invertebrates. Thesis PhD. University of Southampton, 397 pp.

Grange, L.J., P. A. Tyler, L. S. Peck & N. Cornelius. 2004. Long-term interannual cycles of the gametogenic ecology of the Antarctic brittle star *Ophionotus victoriae*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 278: 141–155

Guillou, M. & C. Michel. 1993. Reproduction and growth of *Sphaerechinus granularis* (Echinodermata: Echinoidea) in Southern Brittany. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 73: 179-192.

Hamel, J. F. & A. Mercier. 1996. Evidence of chemical communication during the gametogenesis of holothuroids. *Ecology*, 77(5), 1600-1616.

Harrington, L. H., C. W. Walker, & M. P. Lesser. 2007. Stereological analysis of nutritive phagocytes and gametogenic cells during the annual reproductive cycle of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Invertebrate Biology*, 126, 202–209.

Heck, K. L. & J. F. Valentine. 1995. Sea urchin herbivory: evidence for long-lasting effects in subtropical seagrass meadows. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 189: 205-217.

Hendler, G. 1979. Reproductive periodicity of Ophiuroids (Echinodermata: Ophiuroidea) on the Atlantic and Pacific coasts of Panama. En: Stancyk S E (Ed.). *Reproductive ecology of marine invertebrates*. University of South Carolina Press, pp. 145–156.

Hendler, G. 1991. Echinodermata: Ophiuroidea. Pp: 355-511, *In*: Giese A.C., J.S., Pearse & V.B. Pearse, (eds.). *Reproduction of marine invertebrates*, vol. 6, Echinoderms and Lophophorates, Boxwood Press: Pacific Grove, California.

- Hendler, G., J. Miller, D. Pawson & P. Kier. 1995. Sea stars, sea urchins, and allies echinoderms of Florida and the Caribbean. Smithsonian Institution Press, Washington and London, 390 pp.
- Hernández-Pérez, J. C. 2006. Estrategia reproductiva de la población canaria del erizo *Diadema aff. antillarum* Philippi, 1845: maduración gonadal, asentamiento larvario y reclutamiento Tesis doctoral, Ciencias Marinas. Universidad de la Laguna, Islas Canarias, 199 pp.
- Herrero-Barrencua, A. 2008. Aspectos reproductivos del erizo común (*Paracentrotus lividus*) en aguas del Este de Gran canaria. Tesis de licenciatura, Departamento de Biología. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Hyman, L. H. 1955. The invertebrates. Vol. 4. Echinodermata. The Coelomate Bilateria. McGraw-Hill. New York. 763 pp.
- James, D. W. 1998. The biology of *Toxopneustes roseus* in rhodolith beds in Baja California Sur, Mexico. Tesis de maestría, San Jose State University, San Jose, California.
- James, D. W. 2000. Diet, movement, and covering behavior of the sea urchin *Toxopneustes roseus* in rhodolith beds in the Gulf of California, México. Marine Biology 137: 913-923.
- James, P. & S. Siikavuopio. 2012. A Guide to the Sea Urchin Reproductive Cycle and Staging Sea Urchin Gonad Samples. Nofima, (ISBN 978-82-7251-976-5), 20.
- Kanzaki, N., K. Kiontke, R. Tanaka, Y. Hirooka, A. Schwarz, T. Müller-Reichert, J. Chaudhuri & A. Pires-daSilva. 2017. Description of two three-gendered nematode species in the new genus *Auanema* (Rhabditina) that are models for reproductive mode evolution. Sci Rep 7, 11135. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09871-1>.

- Kelly, M. S. 2000. The reproductive cycle of the sea urchin *Psammechinus miliaris* (Echinodermata: Echinoidea) in a Scottish sea loch. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 80: 909-919.
- Kennedy, B. & J. S. Pearse. 1975. Lunar synchronization of the monthly reproductive rhythm in the sea urchin *Centrostephanus coronatus* Verrill. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 17: 323-331.
- Kenner, M. C. & M. T. Lares. 1991. Size at first reproduction of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* in a central California kelp forest. *Marine Ecology Progress Series* Oldendorf, 76: 303-306.
- Lamare, M. D. & B. G. Stewart. 1998. Mass spawning by the sea urchin *Evechinus chloroticus* (Echinodermata: Echinoidea) in a New Zealand fiord. *Marine Biology* 132: 135–140.
- Lara-Rueda, G. N. 2004. Ciclo reproductivo del erizo de mar *Echinometra vanbrunti* (Agassiz, 1863), (Echinodermata: Echinoidea) en Ensenada de Muertos, Baja California Sur, México. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California Sur, México 66 pp.
- Lawrence, J. 1987. A functional biology of echinoderms. Croom Helm, London. 340 p.
- Lawrence, J. 2001. The edible sea urchin. 1-4. En: Lawrence J. M. (ed). *Edible sea urchins: Biology and Ecology* Elsevier Sci. Netherlands.
- Lawrence, J. M. & J. Sonnenholzner. 2004. Distribution and abundance of asteroids, echinoids and holothuroids in the Galapagos, *In*: Heinzeller, T. & J. H. Nebelsick, (eds). *Echinoderms: München*. 11th International Conference Echinoderms, Munich. 239-244 pp.
- Lessios, H. A. 1981. Reproductive periodicity of echinoids *Diadema* and *Echinometra* on the two coasts of Panamá. Elsevier/North Holland Biomedical Press. *J. exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol 50 pp. 47-61.

- Luna, S. 2000. Distribución poblacional y ciclo reproductivo del erizo de mar blanco *Tripneustes depressus* (Echinodermata: Echinoidea) en las islas Galápagos. Tesis de licenciatura, Área de Investigaciones Marinas y Conservación Costera de la estación Científica Charles Darwin, Universidad San Francisco de Quito.
- McBride, S. C., R. J. Price, P. D. Tom, J. M. Lawrence & A. L. Lawrence. 2004. Comparison of gonad quality factors: colour, hardness and resilience, of *Strongylocentrotus franciscanus* between sea urchins fed prepared feed or algal diets and sea urchins harvested from the Northern California fishery. *Aquaculture*, 233: 405-422.
- McBride, S., J. Lawrence, A. Lawrence & T. Mulligan. 1997. The effect of temperature on production of gonads by the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus* fed natural and prepared diets. *Journal of World Aquaculture Society*, 28 (4): 357-365.
- McClanahan, T. R., & N. A. Muthiga. 2013. Echinometra. In J. M. Lawrence (Ed.), *Sea Urchins: Biology and Ecology* (pp. 337-354). Amsterdam: Elsevier.
- McEdward, L. R. & B. G. Miner. 2003. Fecundity-time models of reproductive strategies in marine benthic invertebrates: Fitness differences under fluctuating environmental conditions. *Marine Ecology Progress Series*, 256: 111–121.
- McEdward, L. R. y D. A. Janies. 1997. Relationships among development, ecology and morphology in the evolution of Echinoderm larvae and life cycles. *Biological Journal of the Linnean Society*, 60: 381–400.
- Mejía-Gutiérrez, L. M., F. Benítez-Villalobos & J. P. Díaz-Martínez. 2019. Effect of temperature increase on fertilization, embryonic development and larval survival of the sea urchin *Toxopneustes roseus* in the Mexican south Pacific. *Journal of Thermal Biology* 83:157-164.

- Mercier, A. & J. F. Hamel. 2009. Endogenous and exogenous control of gametogenesis and spawning in echinoderms. *Advances in Marine Biology* 55. Londres: Academic Press.
- Muñetón-Gómez, M. S., M. Villalejo-Fuerte y G. García-Melgar. 2000. Manual de Técnicas Histológicas Aplicadas a Organismos Marinos. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, 81 pp.
- Olivares-González, E. 1986. Algunos aspectos sobre la biología del erizo de espina larga *Diadema mexicanum* (Echinoidea: Echinodermata). I. Periodos reproductivos y II. Parasitismo. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, México.
- Pawson, D. L. 2007. Phylum Echinodermata. *Zootaxa* 1668: 749–764.
- Pearce, C. M., T. L. Dagget & S. M. Robinson. 2002. Effect of protein source ratio and protein concentration in prepared diets on gonad yield and quality of the green sea urchins, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture*, 214: 307-332.
- Pearse, J. S. & R. A. Cameron. 1991. Echinodermata: Echinoidea. Pp: 513-662, *In*: A. C. Giese, J. S. Pearse, y V. B. Pearse, (eds.). *Reproduction of marine invertebrates*. The Boxwood Press, Pacific Grove, California.
- Pearse, J. S., V. B. Pearse & K. K. Davis. 1986. Photoperiodic regulation of gametogenesis and growth in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Journal of Experimental Zoology*, 237: 107-118.
- Pérez, A. F., C. Boy, E. Morriconi & J. Calvo. 2009. Reproductive cycle and reproductive output of the sea urchin *Loxechinus albus* (Echinodermata: Echinoidea) from Beagle Canel, Tierra del Fuego, Argentina. *Polar Biology*, 33, 271-280
- Priddle, J., I. Hawes, J. C. Ellis-Evans & T. J. Smith. 1986. Antarctic aquatic ecosystems as habitats for phytoplankton. *Biol. Rev.* 61: 199-238.

- Ramírez-Llodra, E. 2002. Fecundity and life-history strategies in marine invertebrates. *Advances in Marine Biology*, 43: 87-169.
- Ridder, J. & M. Lawrence. 1982. Food and feeding mechanisms: Echinoidea. 331-372. En: Jangoux, M. & J. M. Lawrence (eds). *Echinoderm nutrition*, AA Balkema Rotterdam, Netherland.
- Robinson, S. M., J. D. Castell & E. J. Kennedy. 2002. Developing suitable colour ingreen sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquaculture*, 206: 289-303.
- Rogers-Bennett, L., W. Bennett, H., Fastenau & C. Dewers. 1995. Spatial variation in red sea urchin reproduction and morphology: implication for harvest refugia. *Ecological Applications* 5(4): 1171-1180.
- Scherle, W. 1970. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*, 26:57-63.
- Sewell, M. A. & C. M. Young. 1997. Are echinoderm egg size distributions bimodal? *Biological Bulletin*, 193: 297–305.
- Sokal, R. R. & F. J. Rohlf. 1979. *Biometría: principio y métodos estadísticos en la investigación biológica*. H Blume Ediciones. Madrid. 832 p.
- Solís-Marín, F. A., H. Reyes-Bonilla, M. D. Herrero-Pérezrul, O. Arizpe-Covarrubias & A. Laguarda-Figueroa. 1997. Sistemática y distribución de los equinodermos de la Bahía de La Paz. México. *Ciencias Marinas*, 23(2): 249-263.
- Soong, K., D. Chang & S. M. Chao. 2005. Presence of spawn-inducing pheromones in two brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 292: 195-201.
- Spirlet, C., P. Grosjean & M. Jangoux. 2000. Optimization of gonad growth by manipulation of temperature and photoperiod in cultivated sea urchins, *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata). *Aquaculture*, 185: 85-99.

- Strathmann, R. R., L. Fenaux & M. F. Strathmann. 1992. Heterochronic Developmental Plasticity in larval sea urchins and its implications for evolution of nonfeeding larvae. *Evolution*, 48 (4): 972-986.
- Tandonnet, S., G. D. Koutsovoulos, S. Adams, D. Cloarec, M. Parihar, M. L. Blaxter & A. Pires-daSilva. 2018. Chromosome-wide evolution and sex determination in a nematode with three sexes. bioRxiv 466961; doi:<https://doi.org/10.1101/466961>.
- Thorson, G. 1950. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biological Reviews*, 25: 1-45.
- Trasviña A., E. Barton, H. Vélez & J. Brown. 2003. Frontal subduction of a cool surface water mass in the Gulf of Tehuantepec, Mexico. *Geofís. Int.* 42: 101–114.
- Trasviña, A. & E. D. Barton. 1997. Los “Nortes” del Golfo de Tehuantepec: La circulación costera inducida por el viento. En: F. Lavin Ed. *Contribuciones de la Oceanografía Física de México. Monografía No. 3 Unión Geofísica México.* 277 pp.
- Trasviña, A. & E. D. Barton. 2008. Summer circulation in the Mexican tropical Pacific Deep Sea Research I 55:587-607.
- Unuma, T. & C. W. Walker. 2009. Relationship between gametogenesis and food quality in sea urchin gonads. 45-53. En: *Aquaculture Technologies for Invertebrates: Proceedings of the 36th US-Japan Aquaculture Panel Symposium.*
- Uthicke, S., B. Schaffelke & M. Byrne. 2009. A boom-bust phylum? Ecological and evolutionary consequences of density variations in echinoderms. *Ecological Monographs*, 79: 3-24.
- Vadas, R. L., B. Beal, T. Dowling & J. C. Fegley. 2000. Experimental field tests of natural algal diets on gonad index and quality in the green sea urchin,

*Strongylocentrotus droebachiensis*: a case for rapid summer production in post spawned animals. *Aquaculture*, 182: 115-135.

Vaïtilingon, D., R. Rasolofonirina & M. Jangoux. 2005. Reproductive Cycle of Edible Echinoderms *Tripneustes gratilla* (Echinoidea: Echinodermata) from the Southwestern Indian Ocean. *The Western Indian Ocean Journal of Marine Science*, 4 (1): 47-60.

Vance, R. R. 1973. On reproductive strategies in marine benthic invertebrates. *American Naturalist*, 47: 337–371.

Vives-Pérez, A. 2018. Calidad de la gónada del erizo de mar *Tripneustes depressus* (Agassiz, 1863, Echinodermata: echinoidea) en la bahía de La Paz, BCS, México. Tesis de maestría, CICIMAR-IPN. La Paz BCS, México. 92 Pp.

Walker, C. W., T. Unuma & M. P. Lesser. 2013. Sea Urchin gametogenesis-structural, functional and molecular/genomic biology. 25-43. Chapter 3. En: Lawrence, J. M. (ed). *Sea Urchins: Biology and Ecology*, Third edn. Academic Press, San Diego.

Walker, C., U. Tatsuya & M. Lesser. 2007. Gametogenesis and reproduction of sea urchins. 11-33. En: Lawrence, J. M. (ed). *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology* Amsterdam: Elsevier.

Wangensteen, O. S., X. Turon, M. Caso & C. Palacín. 2013. The reproductive cycle of the sea urchin *Arbacia lixula* in northwest Mediterranean: potential influence of temperature and photoperiod. *Marine Biology* 160: 3157-3168.

Witman, J. D. & Dayton P. K. 2001. Rocky subtidal communities. *Marine Community Ecology*, 339-366.

Zar, J. H. 2010. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, New Jersey, 663pp.