

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**



**DESARROLLO DE LA BIOTECNOLOGÍA PARA EL CULTIVO DE  
PEPINO DE MAR *Apostichopus parvimensis* COMO  
ELEMENTO DE ACUACULTURA MULTITRÓFICA**

**T E S I S**

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS  
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

**PRESENTA**

**Christian Iván Vela Gallo**

**ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. Agosto de 2020**

## Resumen

Los pepinos de mar son organismos marinos de alto valor comercial y su pesquería es de gran importancia en México. En las últimas décadas, sus poblaciones se han visto afectadas a nivel nacional, por efectos de sobrepesca y cambio climático. En la costa occidental de la Península de Baja California existe una pesquería del pepino de mar, *Apostichopus parvimensis*, desde 1997. Sin embargo, a partir del 2011 se registraron decrementos significativos en los desembarques. A pesar de su enorme importancia comercial y ecológica, son pocos los estudios sobre su biología. Nos encontramos en un momento clave, para experimentar y promover estudios que favorezcan a las poblaciones naturales. Un ejemplo de gran potencial es la acuicultura. Por ello, este trabajo se enfoca en desarrollar la biotecnología y asentar las bases para el cultivo de *A. parvimensis*. Promover prácticas acuícolas para el pepino de mar no solamente es vital para continuar con su aprovechamiento, sino que va de la mano con prácticas ecológicas, como el repoblamiento, para ayudar a sus poblaciones naturales. Como primer paso para el desarrollo acuícola de cualquier invertebrado, debemos entender su desarrollo larval. El pepino de mar, *A. parvimensis*, presenta un desarrollo larval que se compone de 5 estadios con una duración de 26 días a partir de la fecundación, concluyendo con un organismo juvenil. Los juveniles obtenidos en este trabajo se

mantuvieron en condiciones de laboratorio por 3 meses y alcanzaron una talla de hasta 1 cm. Los organismos reproductores se mantuvieron en condiciones de laboratorio por 7 meses hasta su desove natural en los meses de marzo y abril del 2018. A su vez, se desarrolló una técnica de desove con inductores químicos, obteniendo una eficacia del 70%. Los organismos reproductores fuera de temporada reproductiva se sometieron a experimentos de multitrofia, con el fin de promover el desarrollo de prácticas acuícolas sostenibles.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA  
DESARROLLO DE LA BIOTECNOLOGÍA PARA EL CULTIVO DE PEPINO  
DE MAR *Apostichopus parvimensis* COMO ELEMENTO DE  
ACUACULTURA MULTITRÓFICA  
TESIS  
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

PRESENTA

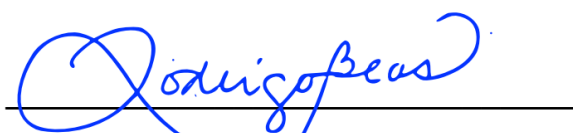
**CHRISTIAN IVÁN VELA GALLO**

APROBADO POR:




Dr. Eugenio Carpizo Ituarte

Director de tesis



Dr. Rodrigo Beas Luna

Sinodal



Dr. Zaúl García Esquivel

Sinodal

## **Agradecimientos**

A mi familia, por ser siempre una fuente de inspiración y soporte.

Dr. Eugenio Carpizo Ituarte, quien dirigió el presente estudio y compartió conmigo toda su experiencia, ayudando a forjar mi trayectoria y marcando un trabajo y una vida.

Dr. Rodrigo Beas Luna, quien me aconsejó y guió académica y personalmente durante toda la maestría.

Dr. Julio Lorda Solórzano, por su incondicional apoyo y contribuciones al trabajo. Permitiendo difundirlo a nivel internacional en congresos y obtener materiales e información críticos para la realización de algunos experimentos.

Dr. Saúl García Esquivel, por sus aportaciones al presente trabajo.

M.C. Marco González Gómez, quien me apoyó en todo momento con la parte técnica y me apoyó con su vasta experiencia en la reproducción y manejo de invertebrados.

Dr. Jeffrey, quien además de ser un leal amigo, siempre me apoyó a superarme académica y personalmente, sin ser este trabajo la excepción.

Daniel Díaz, que me ayudó de primera mano en la recolección de organismos y alimento para los organismos empleados en mi trabajo. Además de su amistad.

Paulina Pérez Salido y Julia Lara Navarrete, por ser las mejores ayudantes de laboratorio, comprometidas y eficaces.

Carlos Burgoin Castañeda, por su ayuda y aporte de conocimientos técnicos.

Dr. Christopher Lowe, por compartir conmigo invaluable información que fue la clave para la realización de algunos experimentos.

Dra. Fiorenza Micheli, por compartir conmigo su conocimiento, amistad y recibirme en las instalaciones de Hopkins Marine Station de la universidad de Stanford.

Dr. Charles Boch, por recibirme en las instalaciones de Monterey Bay Aquarium Research Institute (MBARI) y compartir conmigo su conocimiento.

Dra. María Teresa Viana, por proveer el alimento formulado para el experimento de multitrofia, así como su apoyo y conocimiento.

Dr. Fernando Díaz y Dra. Denise Re, quienes, en conjunto con su equipo e instalaciones en el CICESE, me apoyaron en la parte experimental de mi trabajo.

## Índice

Resumen .....	II
Agradecimientos .....	V
Introducción .....	1
ANTECEDENTES .....	5
JUSTIFICACIÓN .....	5
Objetivo General .....	6
Objetivos Específicos .....	6
MÉTODOS .....	7

Recolecta de los organismos .....	7
Mantenimiento de reproductores .....	7
Cultivo multitrófico .....	8
Desove natural 2018 .....	10
Fertilización .....	11
Desove con químico inductor 2019 .....	11
Preparación de organismos .....	11
Preparación del químico inductor .....	12
Desove con QI .....	12
Desarrollo embrionario .....	13
Larvicultura.....	13
Cultivo de larvas .....	13
Alimentación .....	14
Desarrollo larvario.....	14
Mantenimiento del cultivo .....	14
Asentamiento de larvas.....	15
Mantenimiento de juveniles .....	15
Resultados.....	16
Desove natural.....	16
Desove artificial .....	18
Desarrollo larval .....	24
Auricularia temprana.....	25
Auricularia media .....	28
Auricularia tardía.....	30

Doliolaria.....	31
Pentáctula.....	33
Juveniles de <i>Apostichopus parvimensis</i> .....	36
Multitrofía.....	38
Discusión .....	40
Desove natural .....	40
Desove artificial .....	41
Conclusiones .....	44
Agradecimientos .....	46
Referencias.....	47

### Índice de Tablas

Tabla I. Relación del número de desoves con la fecha, hora en que ocurrió el evento, así como el número de machos y hembras que desovaron y el porcentaje de organismos que se observaron desovando en cada evento. ....	17
Tabla II. Muestra las características de los organismos tratados con el neuropéptido inductor y los tratados con agua de mar filtrada con UV, así como la reacción al tratamiento. ....	20
Tabla III. Fases del desarrollo del pepino de mar <i>Apostichopus parvimensis</i> en un sistema de cultivo a 18° C. ....	25

### Índice de figuras

Figura 1. Montaje del experimento de maduración de pepino de mar <i>A. parvimensis</i> (p); donde: A) indica una condición de monocultivo con alimento	
--	--

formulado y B) condiciones de cultivo multitrófico con caracol <i>Megastrea undosa</i> (m) colocados en jaulas (j).....	9
Figura 2. Desove de pepino de mar <i>Apostichopus parvimensis</i> , donde se aprecia como levantaban la parte anterior del cuerpo (A), y en B y C se observan los gonoporos (gp) expulsando gametos masculinos.....	18
Figura 3. Cantidad de organismos desovados por grupos, donde Np laboratorio, Np campo, Placebo laboratorio y Placebo campo presentan 3, 4, 0 y 0 respectivamente.....	19
Figura 4. Huevo maduro del pepino de mar <i>Apostichopus parvimensis</i> en el proceso de fertilización. ....	21
Figura 5. Etapas del desarrollo embrionario del pepino de mar <i>Apostichopus parvimensis</i> , siendo A) la primera división, B) cuarta división, C) mórula, D) una blástula temprana, E) una blástula tardía ciliada y F) una gástrula tardía, presentando un blastoporo (bp) y la abertura de la cavidad oral (co) en formación. ....	22
Figura 6. Transición de una gástrula a una larva auricularia. Se parecía el blastoporo cerrado dando lugar a la formación del ano (a), así mismo, se observa la formación de la cavidad oral (co). También se aprecia el primer engrosamiento del epitelio (ee) donde se formará el primer par de esferas hialinas en formación. ....	23
Figura 7. Larva auricularia recién formada donde se aprecia la banda ciliada (bc), las esferas hialinas (eh); un sistema digestivo conformado por la cavidad oral (co) seguida por el esófago (es), el estómago (e), el intestino (i) y el ano (a).	26
Figura 8. Vista ventral de una larva representativa de Auricularia temprana donde se observa la banda ciliada, la formación de las esferas hialinas y el sistema digestivo (sd) compuesto por una cavidad oral, esófago, estómago, intestino y ano.....	27
Figura 9. Vista longitudinal de una larva auricularia media donde se aprecia un sistema digestivo compuesto por una cavidad oral (co), esófago (es), estómago (e), intestino (i) y finalmente el ano (a).....	28

Figura 10. Auricularia media en la cual se observa el desarrollo del somatoceloma (SC) junto al estómago, junto a la base del estómago se encuentra el axohidroceloma (ah). Asu vez, se observa una banda ciliada más ondulada y el desarrollo de esferas hialinas (eh) en la porción media de la misma. ....	29
Figura 11. Larva auricularia tardía con una banda ciliada con ondulaciones prominentes acompañada de hasta 10 esferas hialinas (eh).....	30
Figura 12. Larva doliolaria recién formada con un sistema digestivo (td) en reabsorción y esferas hialinas (eh). ....	32
Figura 13. Larva doliolaria tardía con 4 bandas ciliadas (bc), presencia de las esferas hialinas (eh) y la formación del primer tentáculo oral (to), que tiene una forma similar a un pie ambulacral. ....	33
Figura 14. Larva en la fase de pentáctula no metamorfoseada con la presencia de cinco bandas ciliada (bc). A su vez, se observan tres de los 5 tentáculos orales (to).....	34
Figura 15. Postlarva, con la presencia del primer pie ambulacral (pa) y cinco tentáculos orales (to). ....	35
Figura 16. Juvenil del pepino de mar <i>Apostichopus parvimensis</i> con el primer pie ambulacral (pa) y cinco tentáculos orales (to). También se puede apreciar la formación de los osículos (os). ....	37
Figura 17 Gráfica con los pesos promedios de cada tratamiento. Se presenta la media $\pm$ error estándar. Los tratamientos indican: multitrofia = tratamiento en el que los pepinos permanecieron en combinación con caracoles y se alimentaron de su excremento; monocultivo = los organismos fueron alimentados con alimento balanceado.....	39

## Introducción

Los pepinos de mar son equinodermos pertenecientes a la clase Holoturoidea. Son invertebrados marinos bentónicos de cuerpo blando con una forma tubular alargada. Se alimentan de los detritos del fondo marino, reciclando los componentes orgánicos de los sedimentos, lo que los convierte en un componente ecológico importante. A la fecha, más de 60 especies de holotúridos son explotadas como un recurso pesquero (Anderson *et al.*, 2011; Collard *et al.*, 2014; Zamora *et al.*, 2016).

El pepino de mar es un producto codiciado debido a sus características medicinales y ha sido extraído desde hace siglos, siendo un producto con alto valor nutricional y bajo en grasas (Chen 2003). Aun cuando la actividad extractiva tiene una larga historia, fue a partir de la década de los 90s, que la producción pesquera de holotúridos aumentó, gracias al incremento en la demanda en el mercado asiático durante los últimos años (Purcell *et al.*, 2013).

La pesquería de pepino de mar es una de las actividades económicas de mayor valor en la mayoría de las comunidades costeras que exploran este recurso. La disminución o pérdida de este recurso representa impactos económicos significativos. Globalmente el estatus de las poblaciones de las especies de holotúridos más capturadas es preocupante ya que debido a las características biológicas del organismo las poblaciones se pueden afectar de forma irreversible (Purcell *et al.*, 2013). Como consecuencia de la sobreexplotación, un creciente número de países han comenzado a desarrollar programas de acuicultura con pepinos de mar (Anderson *et al.*, 2011; Purcell *et al.*, 2013).

El mercado asiático ha tenido una creciente demanda del pepino de mar *Parastichopus parvimensis*, o comúnmente llamado en inglés “warty sea cucumber” (Salgado-Rogel *et al.*, 2009), el cual se distribuye desde Monterey Bay, E.U.A., hasta Baja California Sur, México (Hamel y Mercier, 2008). Por su

valor comercial el pepino de mar *A. parvimensis* es una de las especies de mayor interés en la costa del Pacífico mexicano de la Península de Baja California (Fajardo-León *et al.*, 2008).

El pepino de mar *A. parvimensis* es explotado como un recurso pesquero en las costas de la península de Baja California desde 1997. Sin embargo, en el 2011 la pesquería había decaído hasta un tercio y según los datos de la última evaluación realizada ese mismo año y pese a que el recurso no mostraba una condición de sobrepesca, tampoco se había recuperado (Chávez *et al.*, 2011). Recientemente, la asociación civil Comunidad y Biodiversidad (COBI) reportó que existe una vulnerabilidad de dicha especie hacia los posibles efectos del cambio climático, que podría causar grandes mortalidades en sus poblaciones (COBI, 2014).

A pesar de su importancia comercial, son pocos los estudios sobre la biología y dinámica poblacional de *A. parvimensis* (Cameron *et al.*, 1989; Chávez *et al.* 2011), por lo que la falta de conocimiento sobre la especie la hace propensa a un manejo pesquero deficiente que puede llevar al deterioro de sus poblaciones en el mediano y largo plazo. Recientemente, Fajardo-León y colaboradores (2008) reportaron que en las poblaciones asociadas a Isla Natividad y Bahía Tortugas en Baja California, *A. parvimensis* presenta un ciclo gonádico anual regulado por variaciones estacionales. Presentan gametogénesis en el mes de noviembre (44% de los organismos en fase de gametogénesis en la isla de Natividad), lo que se ha considerado como el inicio de la temporada reproductiva. Posteriormente se ha reportado que el desove se lleva a cabo en los meses de abril y mayo; el post-desove se registró en los meses de junio y julio (Fajardo-León *et al.*, 2008); posteriormente presenta una evisceración espontánea en los meses de octubre y noviembre, como ha sido reportado también para especies de pepino de mar en Asia (Hamel *et al.*, 2008; Yingst, 1982).

Se estima que *A. parvimensis* puede tardar 1 año en alcanzar la talla comercial, sin embargo, medir la talla del organismo no es trivial debido a la gran capacidad de contracción que tienen los pepinos. Por lo tanto, se sugiere evaluarlos utilizando el peso del organismo. En la actualidad, se considera que 122 gr en peso húmedo de tejidos sin órganos es una de las referencias más aceptada para estimar la talla comercial (Fajardo-León et al., 2008) y 40 gr del peso total del organismo para alcanzar la madurez sexual (Hamel et al., 2008).

Los pepinos de mar cumplen la importante función de detritívoros en las comunidades bentónicas, reciclando nutrientes y limpiando el ecosistema (Salgado-Rogel et al., 2009). Gracias a estas características, se han utilizado recientemente para integrarlos en modelos de acuicultura multitrófica integrada (IMTA, por sus siglas en inglés). En estos sistemas, los pepinos de mar contribuyen a reciclar los nutrientes del esquema trófico y con ello benefician la eficiencia del sistema de cultivo (Zamora et al., 2016).

La IMTA consiste en cultivar especies de diferentes niveles tróficos, de manera que los desperdicios metabólicos de una sean aprovechados por la otra, mejorando además la calidad de cultivo y de esta manera diferentes especies se ven beneficiadas de dicha interacción. Por otro lado, la IMTA nos facilita la posibilidad de integrar especies, como *A. parvimensis*, en los cultivos tradicionales de forma sencilla (Fang et al., 2016; Zamora et al., 2016).

En particular, los pepinos de mar del orden aspidóquiritidos ha sido empleados en sistemas de multitróficos integrados, mejorando así el rendimiento del cultivo, y a su vez, utilizando los desperdicios generados de otros organismos como alimento para el pepino de mar, lo cual se traduce en un aumento en el rendimiento económico y en un menor impacto al medio ambiente (Purcell et al., 2013; Zamora et al., 2016).

Esta idea de realizar el co-cultivo de pepino de mar ha sido desarrollada principalmente en países de oriente como China, Corea y Japón, ya que los

organismos representan estrategias tróficas complementarias, debido a que pueden compartir requerimientos ambientales sin competir por espacio ni alimento, con especies como el abulón (*Haliotis sp.*) que, al alimentarse de macroalgas, genera el detrito que, por otra parte, será utilizado como alimento por el pepino de mar (Shi, *et al.*, 2013; Zamora *et al.*, 2016).

Asimismo, esta interacción entre pepino y abulón, aunada a la presencia de macroalgas como alimento para los abulones, contribuye a mejorar la calidad del agua del cultivo, disminuyendo la tasa de mortalidad de ambos organismos, principalmente en etapas juveniles (Yoon *et al.*, 2014).

Desarrollar la biotecnología para el cultivo de *A. parvimensis* es vital no solo para promover prácticas acuícolas como IMTA, que benefician al sector productivo y al ecosistema. Al desarrollar el cultivo de esta especie se podrán promover programas para de repoblamiento y recuperar de poblaciones naturales degradadas por pesquerías o cambio climático. Este último factor, tiene un papel fundamental en las comunidades bentónicas, provocando expansión y contracción de la distribución de los holotúridos, entre otros equinodermos (Lonhart, *et al.*, 2019). Se reporta que *A. parvimensis* presenta migraciones verticales relacionadas con el aumento de la temperatura superficial del mar, por lo que los organismos pueden ausentarse casi por completo en aguas poco profundas (<30 m) durante los meses de agosto a noviembre (Hamel y Mercier, 2008).

En el caso de *A. parvimensis*, como cualquier holotúrido en general, presenta un desarrollo larval que se compone de 5 estadios, los primeros 3 son auricularias temprana, media y tardía según el nivel de desarrollo, lo cual requiere un mayor suministro de alimento según el estadio. El cuarto estadio se conoce como doliolaria o larva metamórfica. En este estadio la larva deja de alimentarse; finalmente el quinto y último estadio comprende a la pentáctula y

es el momento en que la larva se metamorfosea en un juvenil (Hu *et al.*, 2013; McEdward *et al.*, 2001; Pietrak *et al.*, 2014).

## **ANTECEDENTES**

Unos de los primeros esfuerzos en el estudio de la biología reproductiva del pepino de mar *Apostichopus parvimensis* en la región del Pacífico norte mexicano se remonta al trabajo de Espinoza-Montes (2000), en el cual, describe el ciclo reproductivo de dicha especie. Este autor documenta que la gametogénesis se inicia en el mes de noviembre y concluye con el desove en el mes de marzo.

Posteriormente Fajardo-León y colaboradores (2008) realizaron un estudio sobre la biología reproductiva para la misma especie, donde establecieron dos periodos de veda para esta especie, el primero de ellos en el periodo comprendido entre los meses de febrero a mayo y el otro en los meses de agosto a octubre, este último, con el fin de salvaguardar a los organismos durante su periodo de estivación. Posteriormente Vela-Gallo (2017) realizó la primera descripción del desarrollo embrionario y larval de *A. parvimensis* donde se documentó que la fase larval para esta especie tiene una duración de 26 días posteriores a la fecundación en condiciones de cultivo a una temperatura de 17 °C. En el mismo trabajo, se propone la realización de un co-cultivo de esta especie en conjunto con abulón.

## **JUSTIFICACIÓN**

Pese a la importancia comercial de *A. parvimensis* son pocos los estudios que se tienen sobre su biología reproductiva (Fajardo-León *et al.*, 2008). Aunque esta especie no se encuentra protegida por la NOM-059-ECOL-2001 (DOF, 2002), la Carta Nacional Pesquera menciona que las pesquerías de pepino de mar se encuentran en deterioro, y ha establecido cuotas de captura no mayores

al 10% de la biomasa explotable, mencionando incluso que es conveniente desarrollar la acuicultura de este (DOF, 2002)

Desarrollar la biotecnología para la reproducción y cultivo de *A. parvimensis* comprende el conocimiento de su biología reproductiva, su desarrollo larval, así como una técnica eficaz para su desove, el manejo de los reproductores en cautiverio y sus requerimientos biológicos, para así poder iniciar un proyecto piloto del cultivo de esta especie.

Asimismo, el desarrollo del ciclo completo de cultivo de *A. parvimensis*, es una condición fundamental para poder implementar estrategias de acuicultura multitrófica integrada y utilizar especies de la región del sistema de la Corriente de California, que permitan atenuar el impacto y las consecuencias del cambio global que está afectando los océanos.

## **Objetivo General**

- Documentar con mayor detalle al previamente descrito por Vela-Gallo (2017), el desarrollo larvario del pepino de mar *Apostichopus parvimensis* en un sistema de cultivo, para ayudar a desarrollar programas biotecnológicos de producción como estrategias para contribuir al aumento de la capacidad de adaptación de esta especie a los efectos del cambio climático y mejorar el aprovechamiento pesquero.

## **Objetivos Específicos**

- Desarrollar un protocolo de mantenimiento de reproductores de *Apostichopus parvimensis* en condiciones de laboratorio.
- Acondicionar los organismos reproductores de *Apostichopus parvimensis* para obtener un desove natural en condiciones de laboratorio.
- Evaluar y desarrollar un método de inducción artificial al desove de *Apostichopus parvimensis*.

- Completar y complementar la descripción del desarrollo embrionario y larval de *Apostichopus parvimensis* a partir de la fertilización y hasta el estadio juvenil.
- Producir juveniles de *Apostichopus parvimensis*.

## MÉTODOS

### Recolecta de los organismos

Durante el mes de septiembre, se realizaron tres salidas al campo para recolectar 80 ejemplares del pepino de mar (*Apostichopus parvimensis*), en Campo Kennedy, Baja California, México (31°42'5.37"N, 116°41'5.63"O). Por medio de buceo scuba, los organismos se recolectaron a una profundidad aproximada de 15 m en sustratos arenosos y rocosos durante los meses de julio y agosto del 2018. Posteriormente, se colocaron en bolsas herméticas de forma individual (para poder observar una posible evisceración) y se transportaron en hilera a las instalaciones del laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO-UABC). Se aclimataron en tanques con flujo de agua y aireación continua a una temperatura de 16-18°C durante seis meses para su posterior desove. Además, realizamos una confirmación taxonómica de la identidad de la especie con ayuda del Dr. Francisco Solís Marín (Laboratorio de Sistemática y Ecología de Equinodermos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM).

### Mantenimiento de reproductores

Tras la recolección, los organismos permanecieron en aclimatación por un plazo de seis meses hasta su desove. Durante este periodo, los organismos se colocaron en cuatro tanques de 450 L y uno de 1800 L a una densidad de un organismo por cada 45 L. Los tanques se prepararon con una cama de 1cm de sustrato arenoso, circulación abierta con un recambio del 200% diario, a una temperatura ambiente (17-18°C) y aireación constante. Cada segundo día, fueron

alimentados con una dieta formulada a base de *Macrocystis pyrifera* en polvo. Los parámetros de temperatura, pH y oxígeno disuelto fueron monitoreados diariamente por las mañanas.

### **Cultivo multitrófico**

Para el desove correspondiente a la temporada de primavera del 2019 se acondicionaron organismos de laboratorio (recolectados de Campo Kennedy durante los meses de julio y agosto del 2018). El acondicionamiento se inició el 19 de diciembre, tras haber concluido la temporada de estivación y se mantuvieron en cultivo multitrófico hasta abril, que corresponde al periodo reproductivo de la especie.

Los sistemas consistieron en 6 tanques circulares de 450 L, un flujo abierto de agua con una tasa de recambio equivalente al 300% diario, aireación constante, una temperatura ambiente que osciló entre los 18 y 19 °C y un periodo lumínico de 12:12 hrs (Luz:Oscuridad).

Para este experimento se emplearon un total de 30 pepinos de mar de la especie *A. parvimensis*, colocándolos en 6 tanques a una razón de cinco pepinos por cada tanque, de los cuales 3 tanques contaban con la presencia del caracol *Megastrea undosa* y los 3 tanques restantes permanecieron solo con pepino de mar. Se realizaron dos tratamientos con dos dietas diferentes y tres réplicas por cada tratamiento.

La primera dieta consistió en heces fecales del caracol *M. undosa*. Para esto, *M. undosa* fue alimentado *ad libitum* con frondas del alga *Macrocystis pyrifera*. Los excrementos producidos por los caracoles se precipitaron al fondo, donde fueron aprovechados por *A. parvimensis*. Para evitar la interacción entre *M. undosa* y *A. parvimensis* se empleó un diseño del cultivo con dos jaulas suspendidas de dos tubos de PVC. Cada jaula contenía cinco organismos de *M. undosa* como se muestra en la figura 1-B.

La segunda dieta con la que se alimentó a los pepinos de mar (figura 1-A) fue proporcionada por la Dra. María Teresa Viana Castrillón, quien realizó alimento formulado tipo pellet de 500  $\mu\text{m}$ . Dicha dieta se elaboró con un porcentaje de proteína de pescado del 49% y 10.3% de lípidos. Para simular la sombra producida por las jaulas suspendidas del otro tratamiento, se añadieron dos escondites que generaron una superficie de sombra similar.

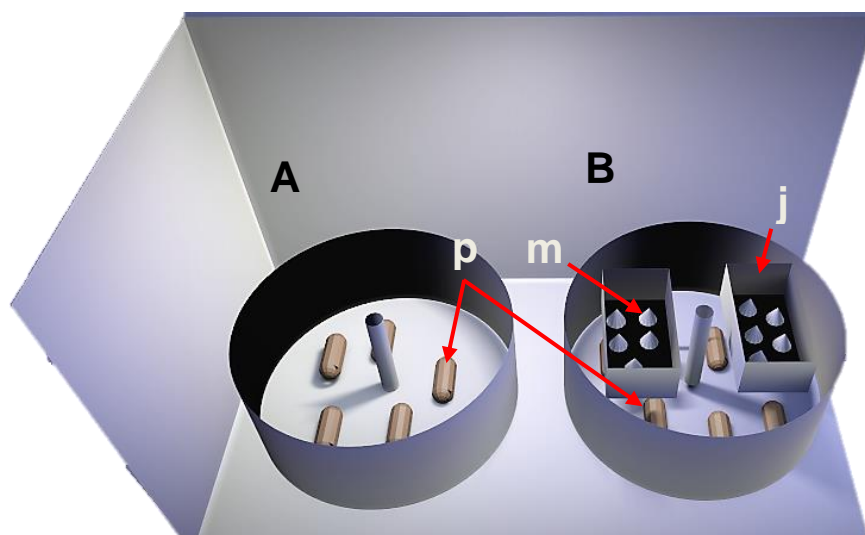


Figura 1. Montaje del experimento de maduración de pepino de mar *A. parvimensis* (p); donde: A) indica una condición de monocultivo con alimento formulado y B) condiciones de cultivo multitrófico con caracol *Megastrea undosa* (m) colocados en jaulas (j).

Para ambos tratamientos, el alimento fue suministrado cada dos días, retirando el alimento no consumido para asegurar que siempre hubiera alimento fresco en el fondo de los tanques. En el caso del alimento formulado se proporcionaron 5 g por cada tanque. En el caso del diseño con jaulas, el alimento suministrado a *M. undosa* fue de 2 a 4 láminas de *M. pyrifera* según fue necesario para que los caracoles siempre tuvieran alimento disponible. Los parámetros del agua (oxígeno disuelto, temperatura y pH) fueron monitoreados diariamente y los flujos de agua se revisaron cada 2 días.

## **Desove natural 2018**

Los organismos maduraron y desovaron de forma natural sin una manipulación directa o estimulación artificial. El desove se suscitó durante el mes de marzo con la primera y segunda luna menguante (5-6 días posteriores de la luna llena) durante el atardecer. Esto concuerda con lo reportado por Agudo (2006) y Purcell *et al.*, (2013), así como con las observaciones previas de Vela-Gallo (Obs. sin publicar) para esta misma especie.

Con el objetivo de preparar a los organismos para el desove, dos días anteriores al mismo, se dejó de suministrar alimento y se extrajo todo el sustrato de los tanques. El día anterior al desove se limpió completamente el tanque con agua dulce para eliminar agentes patógenos y el mismo día del desove se extrajo cualquier materia orgánica del tanque, formando un entorno limpio para el momento que los organismos liberaron los gametos.

El desove se suscitó en los mismos tanques en los que se encontraban los organismos, para lo cual se cerró el flujo de agua y con esto se evitó la pérdida de los gametos liberados. Durante el desove, la luz del laboratorio se mantuvo apagada, lo que mantuvo condiciones de luminosidad reducida. Se registró la cantidad de pepinos desovados y el sexo de estos, así como la temperatura, oxígeno disuelto y pH de los tanques al principio del desove. Asimismo, se documentó la fecha y la hora en la que ocurrió el evento y se realizó una estimación del número de huevos obtenidos por desove. Para esto se recolectaron por medio de sifoneo todos los gametos que se observaron en los tanques, se colocó el total de huevos en un volumen conocido, se homogeneizó y se tomaron seis muestras de 5 microlitros. Posteriormente, se contaron utilizando un microscopio Estereoscópico C. Zeiss®. Se sacó el promedio del número de huevos y se realizó la estimación total de huevos obtenidos.

## **Fertilización**

Tras finalizar el evento de desove, se esperó a que los óvulos se fecundaran dentro del mismo tanque. Transcurridos 15 min, se tomó una muestra para confirmar la fertilización mediante la presencia del cuerpo polar y se procedió a recolectar los cigotos del tanque. Una vez cuantificados se colocaron en cubetas de 22 L en condiciones estáticas, con agua de mar filtrada hasta 1  $\mu\text{m}$  e irradiada con luz UV (AMF-UV); en estas condiciones permanecieron por un periodo de 48hrs, tiempo previamente estimado del desarrollo embrionario para esta especie según Vela-Gallo (2017).

## **Desove con químico inductor 2019**

### Preparación de organismos

Se limpiaron y llenaron 40 cubetas con agua de mar filtrada y esterilizada con UV a temperatura ambiente de aproximadamente 18° C. Se emplearon en total 20 pepinos de mar adultos recolectados en Campo Kennedy, 10 de los cuales fueron de reciente recolección (tiempo en cautiverio menor a un mes) y 10 aclimatados por más de 7 meses en las instalaciones del laboratorio; durante este periodo los organismos fueron alimentados con detritos de moluscos.

Los organismos empleados presentaron un peso mayor a 120 g de peso húmedo, se pesaron individualmente y se registró su peso individual en la bitácora. Hecho esto, se colocó cada pepino en una cubeta de forma individual y se etiquetó dicha cubeta con el número y peso del organismo correspondiente. Se determinó el volumen equivalente al 0.1 v/w (volumen / peso del organismo) para cada pepino. También, se anotó en la bitácora y en la etiqueta de la cubeta correspondiente, con el objetivo de tener los organismos listos para el momento de la inyección con el inductor químico.

## Preparación del químico inductor

El químico inductor (QI) utilizado en este trabajo es una síntesis de un neuropéptido (NGIWYamide) extraído del anillo neural del organismo, según lo describe Kato y colaboradores (2009), el cual fue originalmente diseñado para *Apostichopus japonicus*.

El QI se mandó a sintetizar en un laboratorio privado a una pureza del 95%, se diluyó 1 miligramo del QI en agua de mar esterilizada con UV y filtrada adicionalmente por un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  de luz de malla. Se preparó una solución con una concentración al 1nM y se procedió a inyectar un volumen equivalente al 0.1% v/w del peso del organismo. La inyección se efectuó en la parte dorsal del organismo, a 3 cm de los tentáculos orales y se observó el comportamiento de los organismos por un lapso de 2 H.

Para asegurarnos que la incorporación de líquidos en la cavidad celómica no actuara como estimulante al desove, se tomaron 5 organismos de campo y 5 del laboratorio como control, en los que se inyectó agua de mar filtrada hasta 0.22  $\mu\text{m}$  e irradiada con UV, pero sin el QI.

## Desove con QI

Se registro la hora, el sexo y el número de cubeta de los organismos desovados. Asimismo, se contabilizó el número de óvulos expulsados por cada una de las hembras en las que se obtuvo el desove. El experimento se dio por concluido transcurridas dos horas tras la inyección del QI.

## Desarrollo embrionario

Una vez confirmada la fertilización, se llevó un registro del desarrollo embrionario, tomando muestras de los cigotos iniciales y observándolos con ayuda de un microscopio compuesto Axioscop200-Motorizado K. Zeiss®. El registro se llevó a cabo cada hora, y simultáneamente incluyó un monitoreo de los parámetros del cultivo de los embriones. Esto incluyó, fotografías de cada uno de los estadios embrionarios de desarrollo y su respectiva descripción hasta alcanzar la etapa de larva auricularia temprana, momento en el cual culmina el desarrollo embrionario y da inicio el desarrollo larvario.

## Larvicultura

### Cultivo de larvas

Para el cultivo larvario, se emplearon tanques cónicos, hechos de fibra de vidrio con capacidad de 45 L previamente sanitizados con cloro (dejándolos reposar por 24 hrs) y enjuagados con agua dulce y AMF-UV. Los tanques contaron con suministro de aire que, además de proveer de oxígeno al cultivo, permitieron mantener en suspensión a las larvas. Se utilizó un sistema estático y durante el desarrollo larvario se realizó un recambio de agua diario equivalente al 100%.

Las larvas fueron colocadas a una concentración aproximada de 3-5 individuos  $\text{ml}^{-1}$  según lo sugerido por Purcell y colaboradores (2013) para otras especies de holotúridos como *Apostichopus japonicus* e *Isostichopus fuscus*. Además, esta concentración es similar a la que se utiliza con base en la experiencia que se tiene con estos sistemas de cultivo para diversas especies de equinodermos en el Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (ECODEL)

## Alimentación

Durante el desarrollo larvario los organismos fueron alimentados con una mezcla 3:1 de *Rhodomonas lens* e *Isochrysis* sp. Para el primer estadio (auricularia temprana) se le suministró una la mezcla de microalgas a una concentración de 10,000 cel/ml. En la etapa de auricularia media la concentración de microalgas fue de 20,000 cel/ml. Finalmente, durante la etapa de auricularia tardía se alimentaron con una concentración de 30.000 cel/ml. Durante la etapa de doliolaria, se suspendió el suministro de alimento debido a que en esta etapa la larva no se alimenta. En el estadio de pentáctula, las larvas se alimentaron con la diatomea bentónica *Navícula incerta* manteniendo una concentración mayor a 200,000cells/ml para su correcto desarrollo, de acuerdo con lo sugerido por Ito *et al.* (1998) para *Apostichopus japonicus* (*Stichopus japonicus* en el texto original).

## Desarrollo larvario

Para documentar el desarrollo larvario hasta alcanzar la competencia y metamorfosis, se mantuvo un monitoreo de los cultivos y se realizaron observaciones con la ayuda de un microscopio compuesto Axioscop200 Motorizado C. Zeiss®. Se realizó un catálogo de imágenes que describen el desarrollo de la especie, acompañado de una descripción detallada de la morfología y las estructuras representativas de cada estadio de la larva.

## Mantenimiento del cultivo

Durante el cultivo larvario se realizó un recambio de agua diario del 100% del contenido del tanque. Para esto, se utilizó un tamiz de con una luz de malla de 150  $\mu\text{m}$  para limpiar los detritos. La temperatura del agua se mantuvo a un promedio de 18.24 °C (con una variación de  $\pm 1^\circ\text{C}$ ), y una salinidad de 33.6 ups.

## Asentamiento de larvas

Una vez que las larvas se encontraron en la fase de pentáctula se colocaron en recipientes cuadrados de fondo plano de 16 cm de ancho por 23 cm de largo y 10 cm de alto, con una capacidad de 3 L, en los cuales previamente se generó una biopelícula (biofilm) de la diatomea bentónica *Navícula incerta*, para estimular el asentamiento y metamorfosis de las larvas. Una vez asentadas y metamorfoseadas las larvas se mantuvieron en los mismos recipientes por tres meses, con el fin de evitar dañar los organismos con la manipulación.

Durante este periodo, se realizaron recambios de agua del 100% cada dos días y un fotoperiodo de 24 horas de luz constante; las larvas se consideraron como metamorfoseadas en el momento que perdieron la capacidad de nadar y como juveniles cuando ya fue visible el tracto digestivo completamente funcional (coloración amarilla producida por el alimento en el tracto digestivo), así como por la presencia del primer pie ambulacral. Las condiciones del cultivo fueron estáticas y sin aireación durante este periodo.

## Mantenimiento de juveniles

Los juveniles permanecieron en los mismos recipientes de cultivo donde se asentaron, hasta que alcanzaron una longitud aproximada de 10 mm, de acuerdo con las recomendaciones de Purcell y colaboradores (2013) para *Isostichopus fuscus*, *Holothuria scabra* y *Apostichopus japonicus*. Posteriormente fueron transferidos a tanques rectangulares con una capacidad de 200 L. Los tanques empleados para los juveniles cuentan con una profundidad de 20 cm, y se mantuvieron con un flujo abierto equivalente al 200% de recambio diario; la densidad inicial fue de 500 ind. m<sup>-2</sup>. Transcurridos dos meses, las densidades se redujeron a 300 ind. m<sup>-2</sup> de acuerdo con lo sugerido por Purcell *et al.* (2013) para las especies *I. fuscus*, *H. scabra* y *A. japonicus*.

Los tanques antes mencionados se prepararon previamente desarrollando en ellos una biopelícula (biofilm) de *Navícula inserta*, que sirvió de alimento para los juveniles. Dichos tanques se limpiaron conforme se agotaba la película de diatomeas o existía presencia de depredadores como copépodos. Así mismo, se añadieron inóculos de diatomeas (250 ml) cada semana para reponer la biopelícula consumida por las postlarvas y la que se perdía con la limpieza de los tanques.

Durante este periodo de cultivo, se mantuvo un flujo de agua abierto, haciéndola pasar por un filtro de 5  $\mu\text{m}$  de luz de malla. Se mantuvo un recambio diario del 200% y un fotoperiodo de 12:12 horas (Luz:Oscuridad) a una temperatura ambiente entre 18 - 19 °C; otros parámetros del agua como Oxígeno disuelto (g/ml), y pH fueron medidos diariamente.

El crecimiento de los juveniles se midió con la ayuda de una reglilla previamente calibrada y utilizando un microscopio Estereoscópico Marc C. Zeiss®. Se midieron 30 organismos y se sacó el promedio de las tallas con máximos y mínimos.

## Resultados

### Desove natural

El periodo reproductivo de *A. parvimensis* del 2018 para la localidad de Ensenada Baja California fue durante los meses de marzo y abril, y se registraron 3 eventos de desove. El primero se suscitó el 7 de marzo a las 18:00 hr durante el atardecer y a una temperatura de 18 °C. El segundo evento se registró el 5 de abril a las 18:00 hr durante el atardecer a una temperatura de 18.9 °C y finalmente, el último desove registrado sucedió el 11 de abril a las 15:00 hr, como se muestra en la tabla I. En este último evento, no se pudo cuantificar el desove, debido a que ocurrió en forma imprevista, no obstante, se estimó la hora del mismo considerando el estadio de desarrollo en el que se encontraban los embriones recolectados de los tanques.

Tabla I. Relación del número de desoves con la fecha, hora en que ocurrió el evento, así como el número de machos y hembras que desovaron y el porcentaje de organismos que se observaron desovando en cada evento.

<b>Desove</b>	<b>Fecha</b>	<b>Hora</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Machos</b>	<b>Hembras</b>	<b>porcentaje</b>
1	07/03/18	6:00pm	18 °C	5	2	8%
2	05/04/18	6:00pm	18.9 °C	29	7	41%
3	11/04/18	3:00pm	19 °C	NA	NA	NA

Durante este primer evento de desove los organismos desovaron naturalmente. Los organismos mostraron un comportamiento típico en holotúridos, mostrándose muy activos, trepando hasta la superficie del tanque y en algunos casos separando de la superficie del tanque hasta tres cuartas partes de su cuerpo (levantando siempre la parte oral) como se aprecia en la figura 2-A; no obstante, este comportamiento no se observó en todos los organismos, ni se observaron movimientos ondulatorios en todos los casos, los cuales son característicos en los holotúridos.

Los holotúridos expulsan los gametos mediante una estructura denominada gonoporo ubicada en la porción cefálica (figura 2-B y 2-C), siendo los machos los primeros organismos en comenzar a desovar en todos los casos, posteriormente, hasta con una hora de retraso desovaron las hembras.

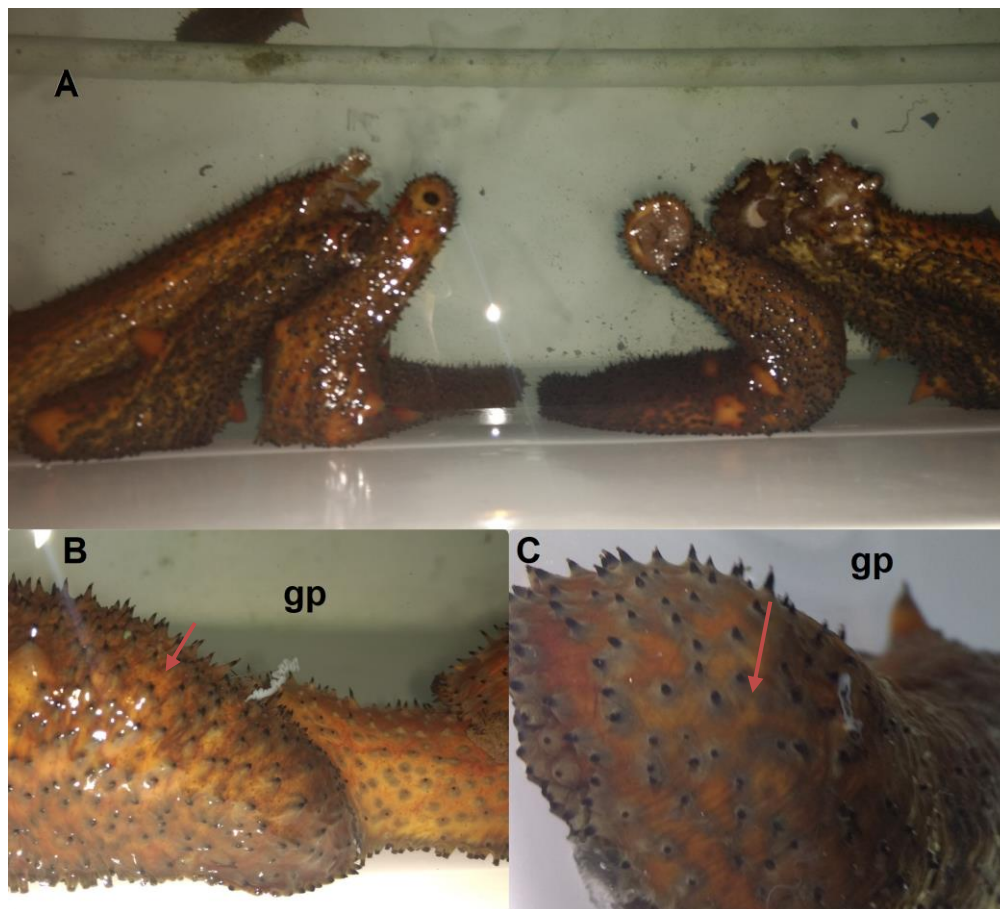


Figura 2. Desove de pepino de mar *Apostichopus parvimensis*, donde se aprecia como levantaban la parte anterior del cuerpo (A), y en B y C se observan los gonoporos (gp) expulsando gametos masculinos.

#### Desove artificial

De los organismos estimulados con el neuropéptido desovaron 6 machos y 1 hembra con un total de 7 pepinos. Al separar los organismos por grupos de acuerdo con su procedencia y al tratamiento suministrado, encontramos que 3 pepinos corresponden al grupo tratado con el neuropéptido (Np) procedentes del laboratorio y 4 al de Np procedentes del campo. Mientras que ningún organismo tratado con el placebo desovó, independientemente de su procedencia (figura 3). Los resultados fueron contundentes, con hasta un 70% de eficacia para el desove con el neuropéptido y un 0% para el tratamiento control.

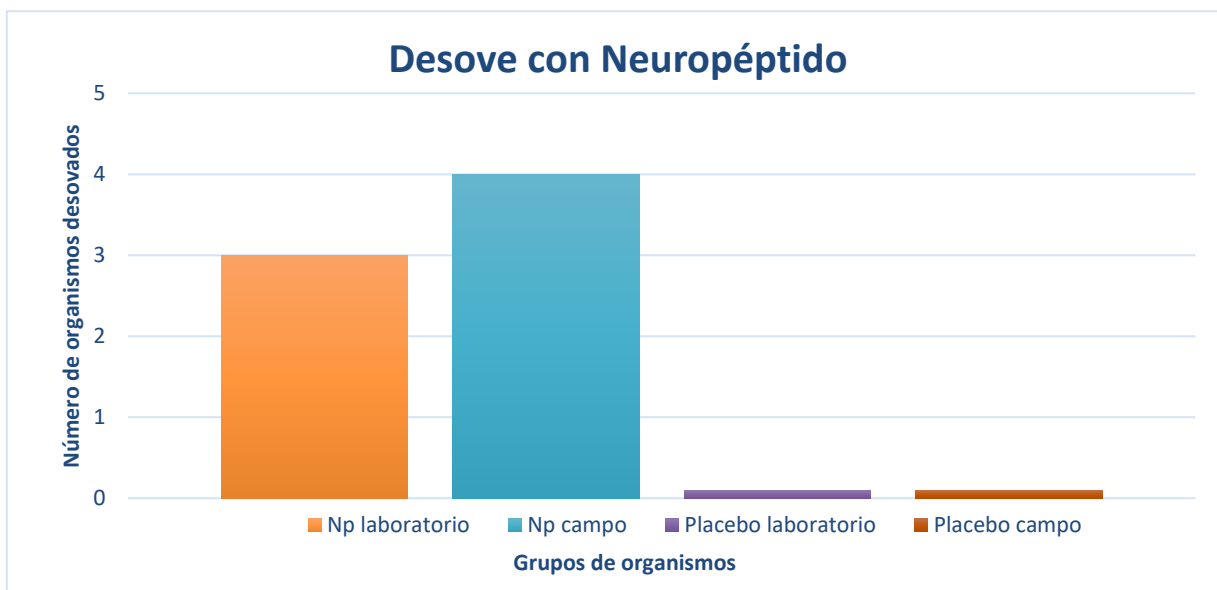


Figura 3. Cantidad de organismos desovados por grupos, donde Np laboratorio, Np campo, Placebo laboratorio y Placebo campo presentan 3, 4, 0 y 0 respectivamente.

Los organismos tratados con el neuropéptido desovaron en un promedio de 37.5 minutos después de aplicar la inyección, como se aprecia en la tabla II. Cabe mencionar, que los organismos que desovaron habían permanecido en el laboratorio por al menos 7 meses, lo que indica que las condiciones de mantenimiento de los adultos en el laboratorio fueron suficiente para que pudieran lograr la gametogénesis.

Tabla II. Muestra las características de los organismos tratados con el neuropéptido inductor y los tratados con agua de mar filtrada con UV, así como la reacción al tratamiento.

PEPINO #	PROCEDENCIA	PESO (g)	PÉPTIDO	Cantidad de Péptido (ml)	HORA	DESOVE	T PARA DESOVE	HORA DE DESOVE	SEXO
1	Laboratorio	396	sí	396	09:02 a. m.	sí	30	09:32 a. m.	macho
2	Laboratorio	301	sí	302	09:05 a. m.	sí	36	09:41 a. m.	macho
3	Laboratorio	226	sí	226	09:07 a. m.	sí	54	10:01 a. m.	hembra
4	Laboratorio	188	sí	188	09:09 a. m.	no	na	-	-
5	Laboratorio	223	sí	224	09:12 a. m.	no	na	-	-
6	Laboratorio	139	no	396	09:14 a. m.	no	na	-	-
7	Laboratorio	143	no	396	09:16 a. m.	no	na	-	-
8	Laboratorio	167	no	396	09:18 a. m.	no	na	-	-
9	Laboratorio	171	no	396	09:20 a. m.	no	na	-	-
10	Laboratorio	345	no	396	09:21 a. m.	no	na	-	-
11	Campo	210	sí	210	09:25 a. m.	sí	36	10:01 a. m.	macho
12	Campo	208	sí	208	09:27 a. m.	sí	36	10:06 a. m.	macho
13	Campo	280	sí	280	09:28 a. m.	sí	36	10:04 a. m.	macho
14	Campo	270	sí	270	09:29 a. m.	sí	35	10:04 a. m.	macho
15	Campo	203	sí	204	09:31 a. m.	no	na	-	-
16	Campo	195	no	280	09:33 a. m.	no	na	-	-
17	Campo	266	no	280	09:36 a. m.	no	na	-	-
18	Campo	246	no	280	09:37 a. m.	no	na	-	-
19	Campo	193	no	280	09:39 a. m.	no	na	-	-
20	Campo	210	no	280	09:41 a. m.	no	na	-	-

### Desarrollo Embrionario

El desarrollo embrionario concluyó en 48 h a partir de la fertilización (figura 4), en el cual cabe resaltar que la primera división ocurre a las dos horas, seguido por la morulación. La blastulación se presentó a las 15 horas con una blástula temprana (figura 5-D), una hora después apareció la blástula tardía (figura 5-E), cuya diferencia radica en la aparición de cilios, lo que se conoce como el momento de la eclosión, que es el momento en que el embrión se libera de la membrana de fertilización.

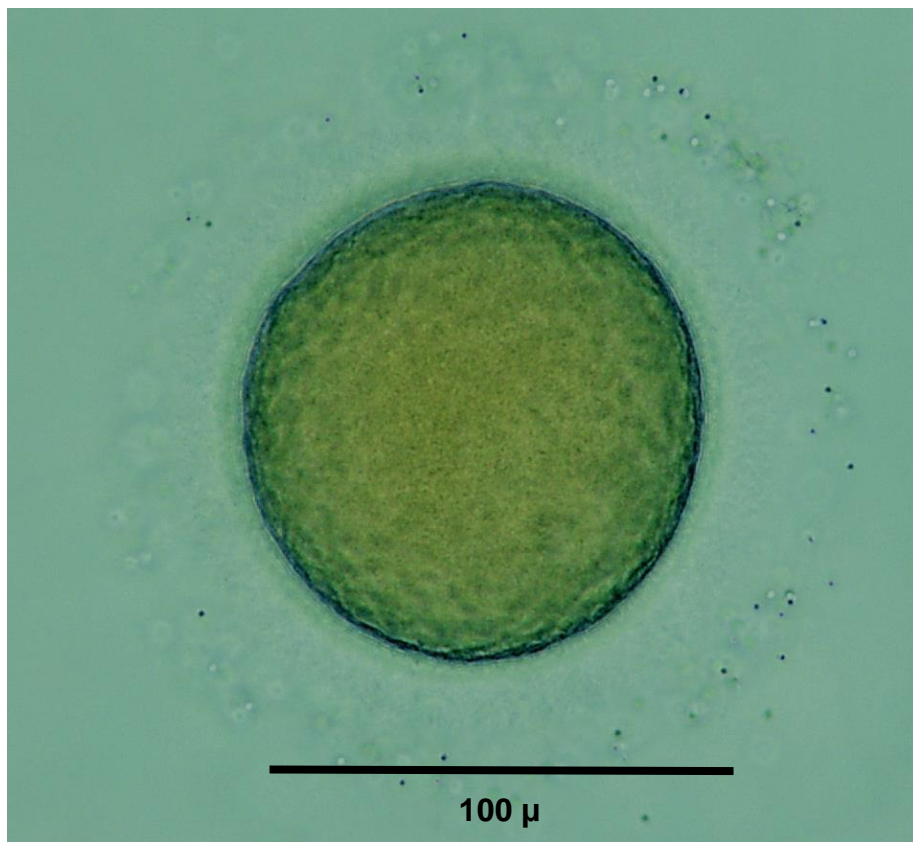


Figura 4. Huevo maduro del pepino de mar *Apostichopus parvimensis* en el proceso de fertilización.

La etapa de gastrulación se presentó a las 24 horas posteriores a la fertilización (HPF), que se caracteriza por presentar un blastoporo con un arquenteron, dicha gástrula preserva los cilios de la blástula tardía, siendo una activa nadadora. Conforme continuo el desarrollo se pudo distinguir la organogénesis, donde el blastoporo dio origen al ano. Posteriormente en la fase de gástrula tardía (figura 5-F) con 48 HPF, fue posible observar la abertura de la cavidad oral, a su vez, la gástrula comienza a mostrar una curvatura, marcando los esbozos de la futura larva auricularia.



Figura 5. Etapas del desarrollo embrionario del pepino de mar *Apostichopus parvimensis*, siendo A) la primera división, B) cuarta división, C) mórula, D) una blástula temprana, E) una blástula tardía ciliada y F) una gástrula tardía, presentando un blastoporo (bp) y la abertura de la cavidad oral (co) en formación.

Conforme el embrión concluye su desarrollo, cada vez más estructuras de la larva fueron visibles (figura 6); el desarrollo del sistema digestivo es

principalmente notorio con la formación del ano, seguido por el intestino y terminando en la cavidad oral. Junto al ano, se aprecia un engrosamiento en el epitelio donde se desarrollarán las primeras esferas hialinas. El desarrollo de dichas estructuras es clave para seguir el nivel de desarrollo de la futura larva y poder terminar el estadio en el que se encuentra.

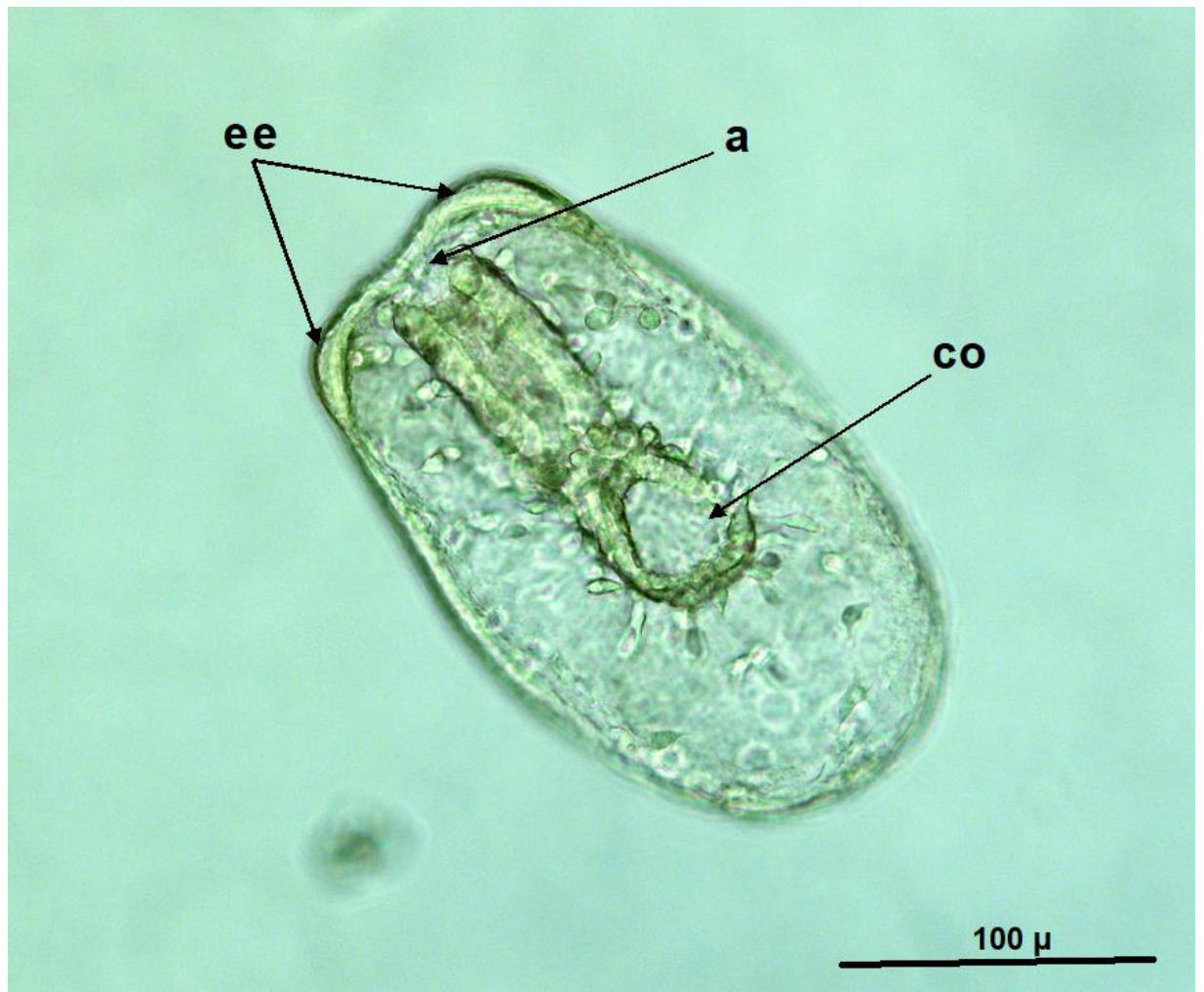


Figura 6. Transición de una gástrula a una larva auricularia. Se parecía el blastoporo cerrado dando lugar a la formación del ano (a), así mismo, se observa la formación de la cavidad oral (co). También se aprecia el primer engrosamiento del epitelio (ee) donde se formará el primer par de esferas hialinas en formación.

## Desarrollo larval

En este trabajo comprende la información obtenida del desarrollo larval durante dos años consecutivos en los que se obtuvo el desove de los organismos. El primero se llevó a cabo durante la primavera del 2018 en los meses de marzo y abril, el segundo se suscitó durante la primavera del 2019 en el mes de abril. El cultivo larval que se describe a continuación es correspondiente principalmente al periodo de primavera del 2018, el cual se mantuvo a una temperatura promedio de 18.24° C y tardó un total de 26 días en completarse hasta el estadio de postlarva o juvenil.

El pepino de mar *A. parvimensis* es una especie que presenta un desarrollo larval asincrónico, es decir que no todas las larvas se desarrollan a la misma velocidad, a pesar de que se encuentren en las mismas condiciones de temperatura, espacio y alimento. Por lo tanto, para definir la fase del desarrollo, se consideró que al menos el 30% de los embriones/larvas alcanzaran el mismo nivel de desarrollo.

En este trabajo se reconocieron cinco estadios larvales para esta especie, iniciando con la larva auricularia temprana, seguida por una auricularia media y una auricularia tardía, siendo esta la última de las fases de auricularia. En el cuarto estadio se encuentra la larva doliolaria, también conocida como metamórfica y se concluyó con la pentáctula, momento en que la larva lleva a cabo la metamorfosis para dar origen a un juvenil según se aprecia en la siguiente tabla del desarrollo (tabla III).

Tabla III. Fases del desarrollo del pepino de mar *Apostichopus parvimensis* en un sistema de cultivo a 18° C.

TEMPORALIDAD	ETAPA DEL DESARROLLO
0h	Fertilización
2h	Primera división
3h	Segunda división
5h	Mórula
15h	Blástula temprana
16h	Blástula ciliada
24h	Gástrula temprana
48h	Gástrula tardía (fin del desarrollo embrionario)
2d	Auricularia temprana
6d	Auricularia media
11d	Auricularia tardía
16d	Doliolaria
18d	Pentáctula
25d	Pentáctula metamorfoseada
26d	Postlarva

#### Auricularia temprana

Este estadio se presenta 48 HPF, los rasgos característicos son el inicio de la formación de las esferas hialinas, que se presentan como una especie de gota que puede incluso ser plana y se diferencia claramente del engrosamiento inicial de la banda ciliada en esa región, un sistema digestivo funcional, una banda ciliada y el desarrollo de una estructura llamada hidrocéloma, este último da lugar al sistema vascular acuífero del organismo y es visible desde el primer estadio.

En este estadio de larva auricularia, es posible notar que las larvas recién formadas presentan una forma más ovalada y un sistema digestivo poco desarrollado, además, una banda ciliada, tal y como se aprecia en la figura 7.

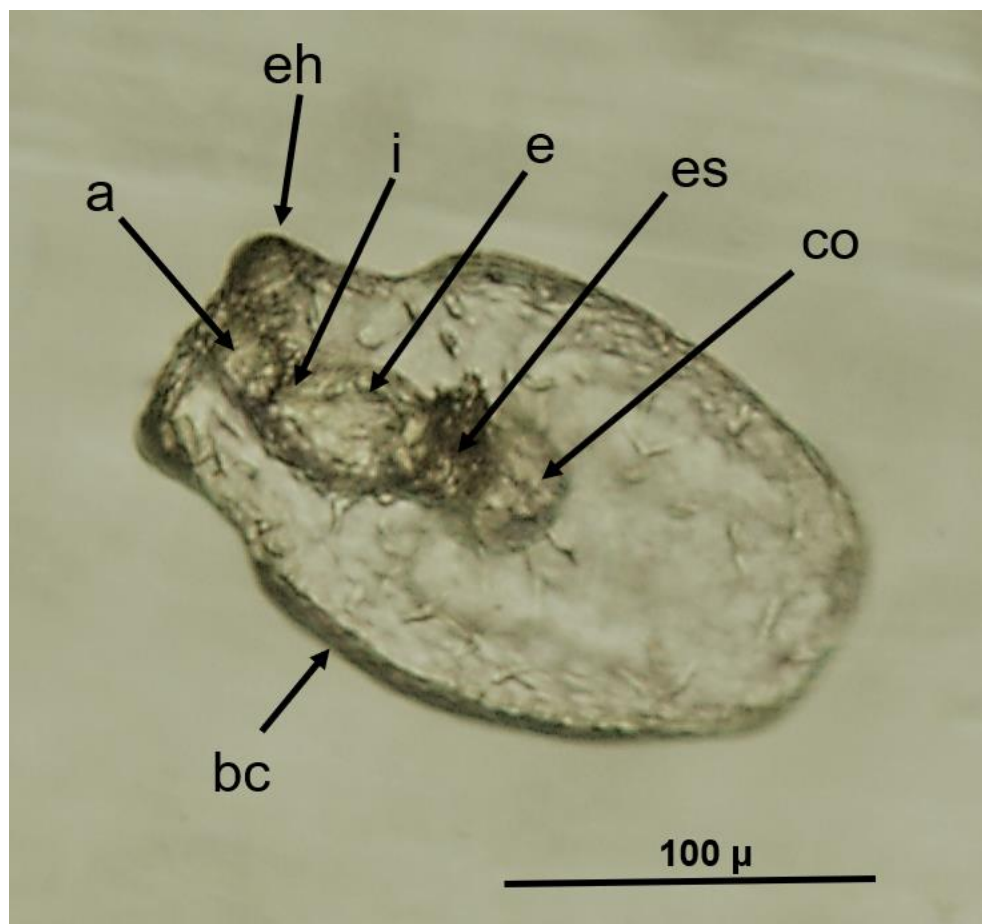


Figura 7. Larva auricularia recién formada donde se aprecia la banda ciliada (bc), las esferas hialinas (eh); un sistema digestivo conformado por la cavidad oral (co) seguida por el esófago (es), el estómago (e), el intestino (i) y el ano (a).

Transcurridos 3 días desde la fertilización las estructuras de la larva toman una forma mucho más definida, uno de los cambios más evidentes es un incremento en el tamaño de las larvas que alcanzan una longitud total de ~500 μm, además, la banda ciliada se observa más ondulada y un sistema digestivo completamente desarrollado como se aprecia en la figura 8.

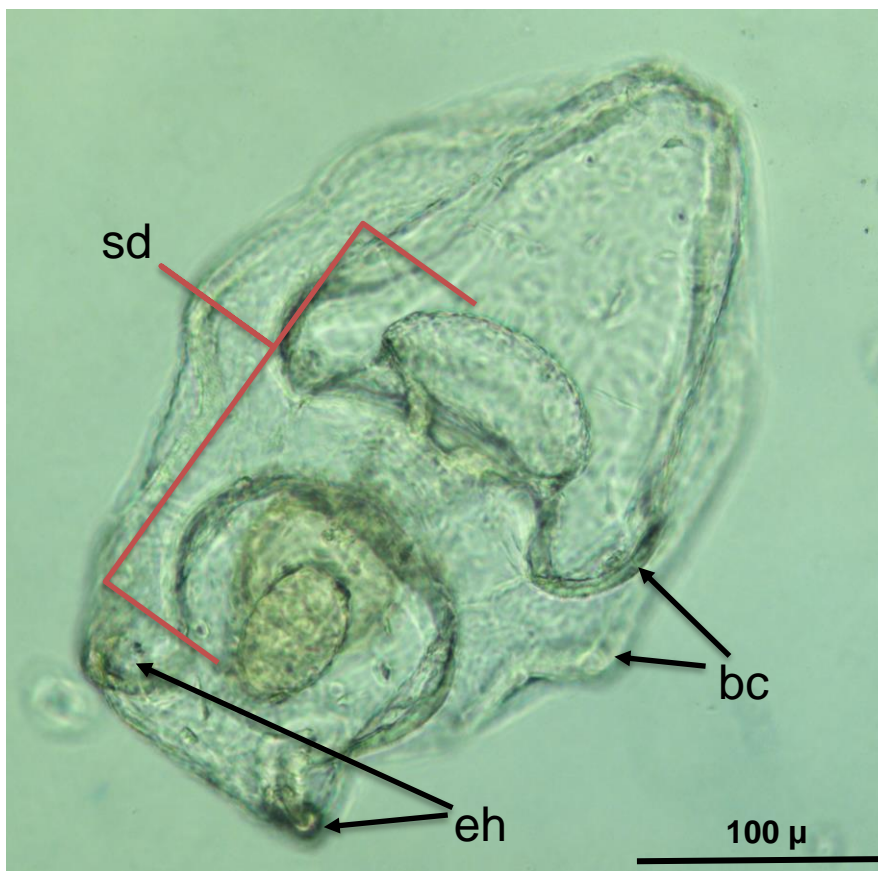


Figura 8. Vista ventral de una larva representativa de *Auricularia* temprana donde se observa la banda ciliada, la formación de las esferas hialinas y el sistema digestivo (sd) compuesto por una cavidad oral, esófago, estómago, intestino y ano.

El sistema digestivo de la larva es uno de los principales indicadores de su desarrollo. Para entenderlo, es importante recalcar que se compone de 5 partes básicas. La cavidad oral, que posee forma de sartén o cuchara, presenta una banda ciliada que transporta el alimento hacia el interior. El esófago presenta una forma tubular contraída que se expande para permitir el paso del alimento. El estómago es una cavidad globosa generalmente teñida por las microalgas cuando la larva está bien alimentada. Enseguida en la parte superior, se encuentra el intestino, que se caracteriza por ser un conducto delgado en comparación con el estómago y el cual desemboca en el ano (figura 9).

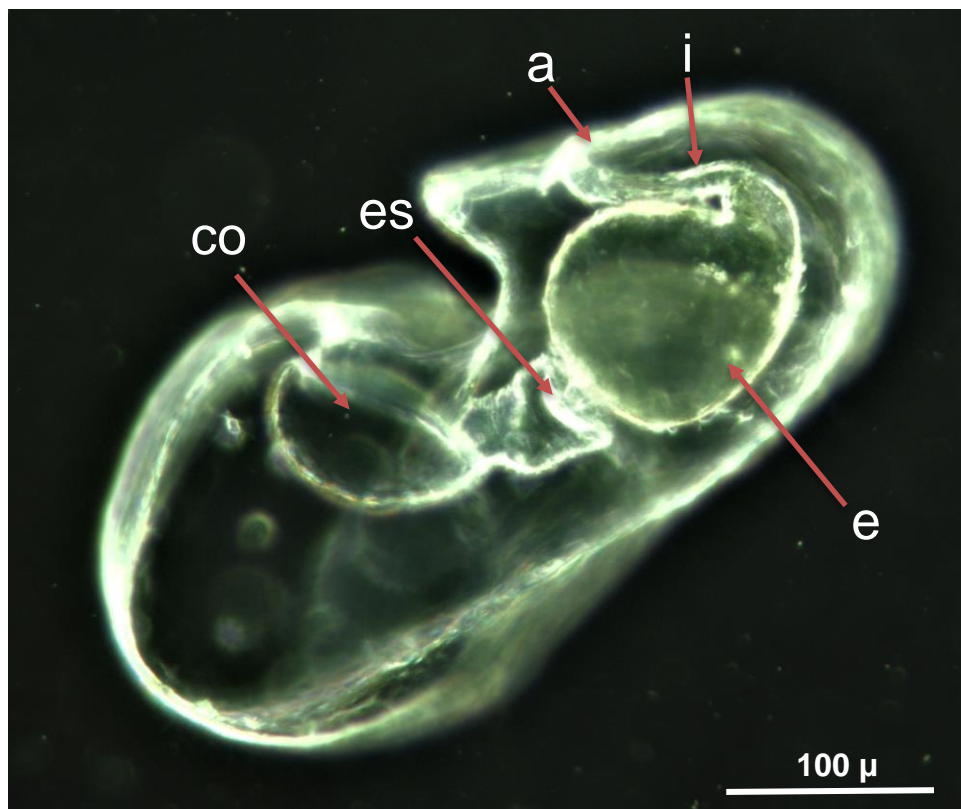


Figura 9. Vista longitudinal de una larva auricularia media donde se aprecia un sistema digestivo compuesto por una cavidad oral (co), esófago (es), estómago (e), intestino (i) y finalmente el ano (a).

#### Auricularia media

Este estadio se presenta a los 7 DPF. Uno de los principales indicadores de desarrollo para esta fase es la presencia del somatoceloma y el axohidroceloma, estas dos estructuras se comienzan a distinguir a finales de una auricularia temprana y son claramente visibles en la auricularia media (figura 10). Por esta razón, se consideró el desarrollo de otras estructuras como los son el incremento en la ondulación de la banda ciliada y el inicio de la formación de esferas hialinas en la porción media de dicha banda. Así mismo, se observó un sistema digestivo más desarrollado, con un estómago más globoso o de mayor diámetro y una cavidad oral con mayor apertura.

El conjunto de dichas cualidades identifica a la larva como una auricularia media, misma que alcanza un tamaño de hasta 900  $\mu\text{m}$  de largo total, siendo en esta fase en la que alcanzó el mayor tamaño durante el desarrollo larval.

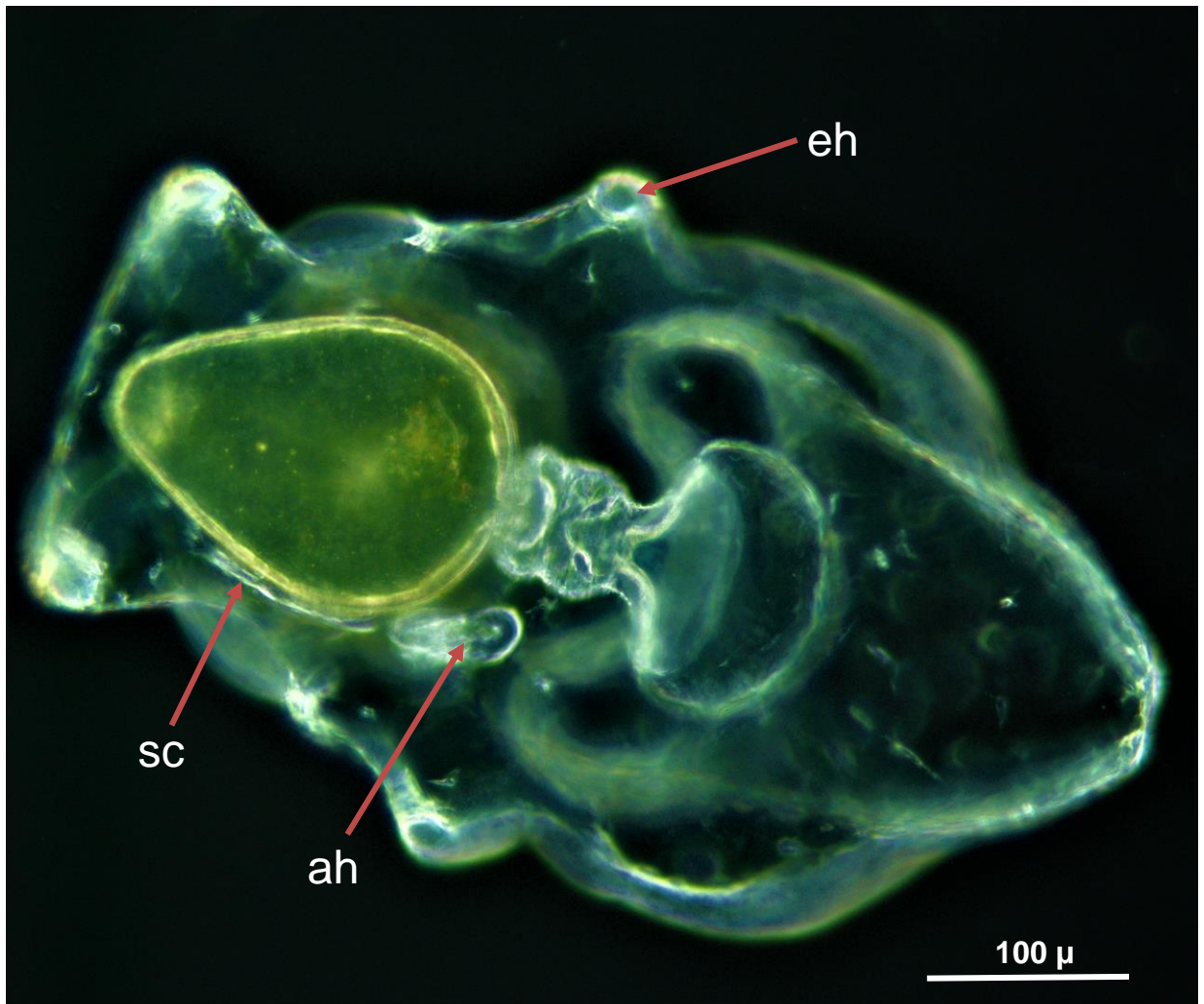


Figura 10. Auricularia media en la cual se observa el desarrollo del somatoceloma (SC) junto al estómago, junto a la base del estómago se encuentra el axohidrocéloma (ah). Asimismo, se observa una banda ciliada más ondulada y el desarrollo de esferas hialinas (eh) en la porción media de la misma.

### Auricularia tardía

El estadio de auricularia tardía representó el último de las fases de auricularia y se observó a partir de 13 DPF. El aspecto más sobresaliente de este estadio de desarrollo fue la presencia de una banda ciliada mucho más ondulada que en estadios anteriores, y la presencia de alrededor de 8 esferas hialinas en la banda ciliada (figura 11).

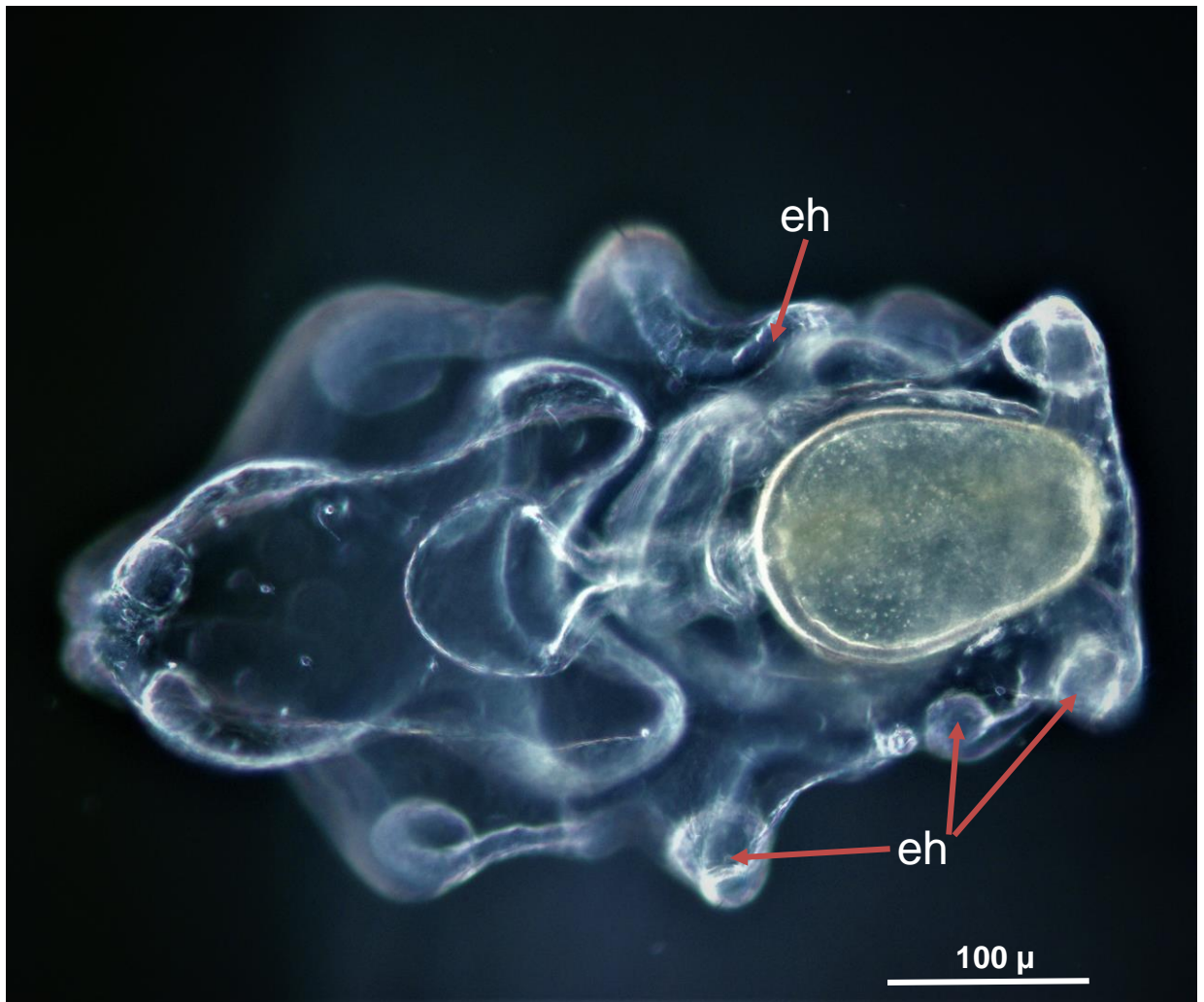


Figura 11. Larva auricularia tardía con una banda ciliada con ondulaciones prominentes acompañada de hasta 10 esferas hialinas (eh).

Otro aspecto sobresaliente durante esta fase fue la reducción de la abertura de la cavidad oral, la cual va acompañada de una evidente reducción de la longitud de la larva, que durante esta etapa midió alrededor de 500  $\mu\text{m}$  de largo total. A partir de este punto, a medida que la larva se desarrolló, la proporción del espacio interno que ocupa el sistema digestivo fue disminuyendo (en comparación a la auricularia media), iniciando con la contracción de la abertura oral y finalmente con la reabsorción del sistema digestivo.

### Doliolaria

Durante esta fase que estuvo presente a los 18 DPF, se pudo apreciar una larva comprimida y redondeada, cuya morfología puede ser un tanto variable con formas que se asemejan a la forma de un frijol o hasta algunas que parecen un barril (figura 12). A su vez, la banda ciliada se fragmenta en 3 o 5 bandas que recorren horizontalmente el cuerpo de la larva. Durante este estadio de desarrollo, las esferas hialinas se hacen prominentes, mientras que el sistema digestivo se encuentra notablemente contraído con respecto al estadio anterior. El sistema digestivo, deja de ser funcional en este estadio y la larva suspende su alimentación. A partir de aquí, las esferas hialinas son su única fuente de energía para completar la metamorfosis.

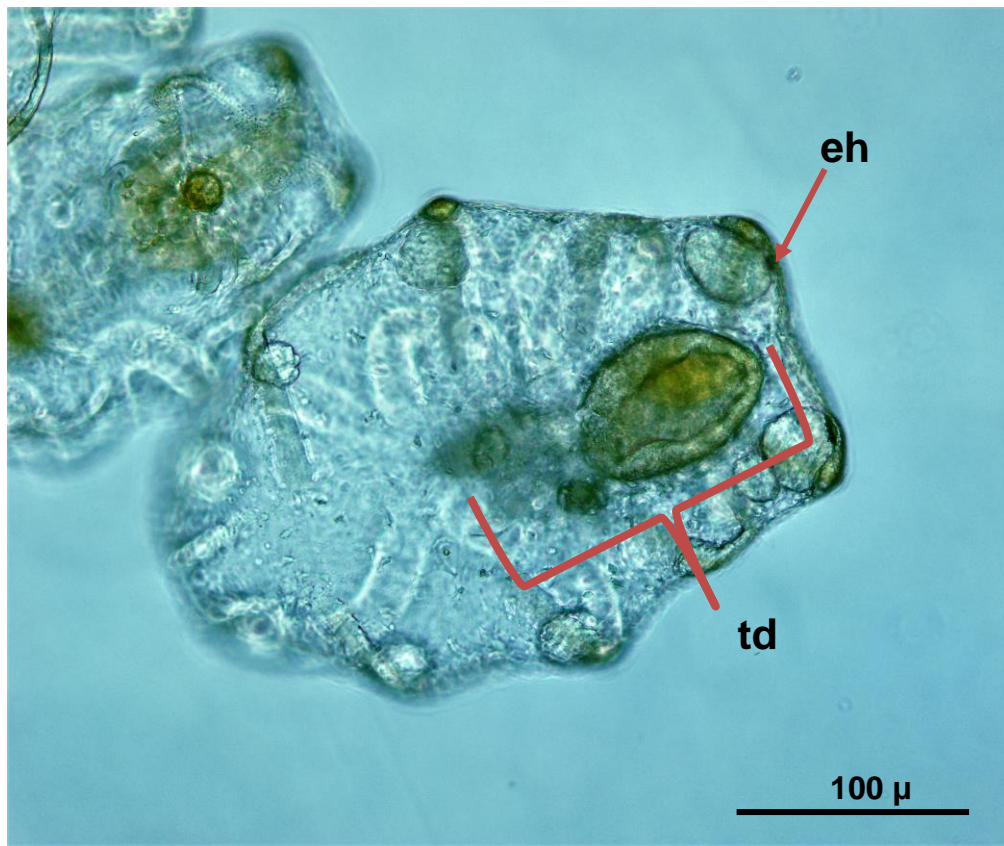


Figura 12. Larva doliolaria recién formada con un sistema digestivo (td) en reabsorción y esferas hialinas (eh).

Conforme el desarrollo continúa, la larva adquiere una coloración café y la banda ciliada se vuelve más evidente, así mismo el sistema digestivo se reduce todavía más y comienza a formarse el primer tentáculo oral. En este punto, la doliolaria está lista para dar lugar a la siguiente fase del desarrollo (figura 13).

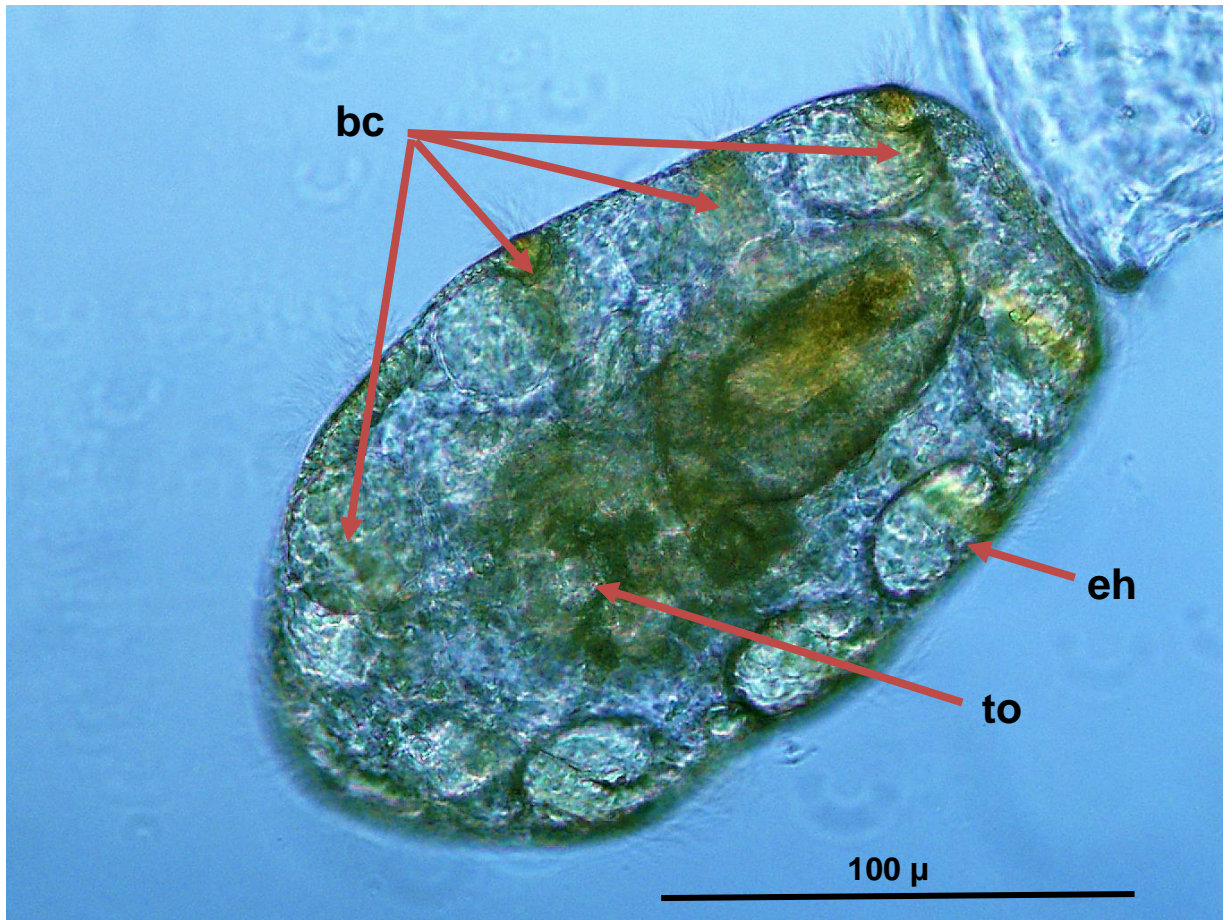


Figura 13. Larva doliolaria tardía con 4 bandas ciliadas (bc), presencia de las esferas hialinas (eh) y la formación del primer tentáculo oral (to), que tiene una forma similar a un pie ambulacral.

### Pentáctula

Considerada como la última fase del desarrollo larval, la pentáctula fue visible a los 21 PDF y se caracterizó por presentar un cuerpo más elongado con respecto a la doliolaria y cinco tentáculos orales. En esta fase se les considera larvas competentes y comienzan a migrar al fondo del tanque, donde buscaron activamente un sustrato en el cual fijarse y completar la metamorfosis (figura 14).

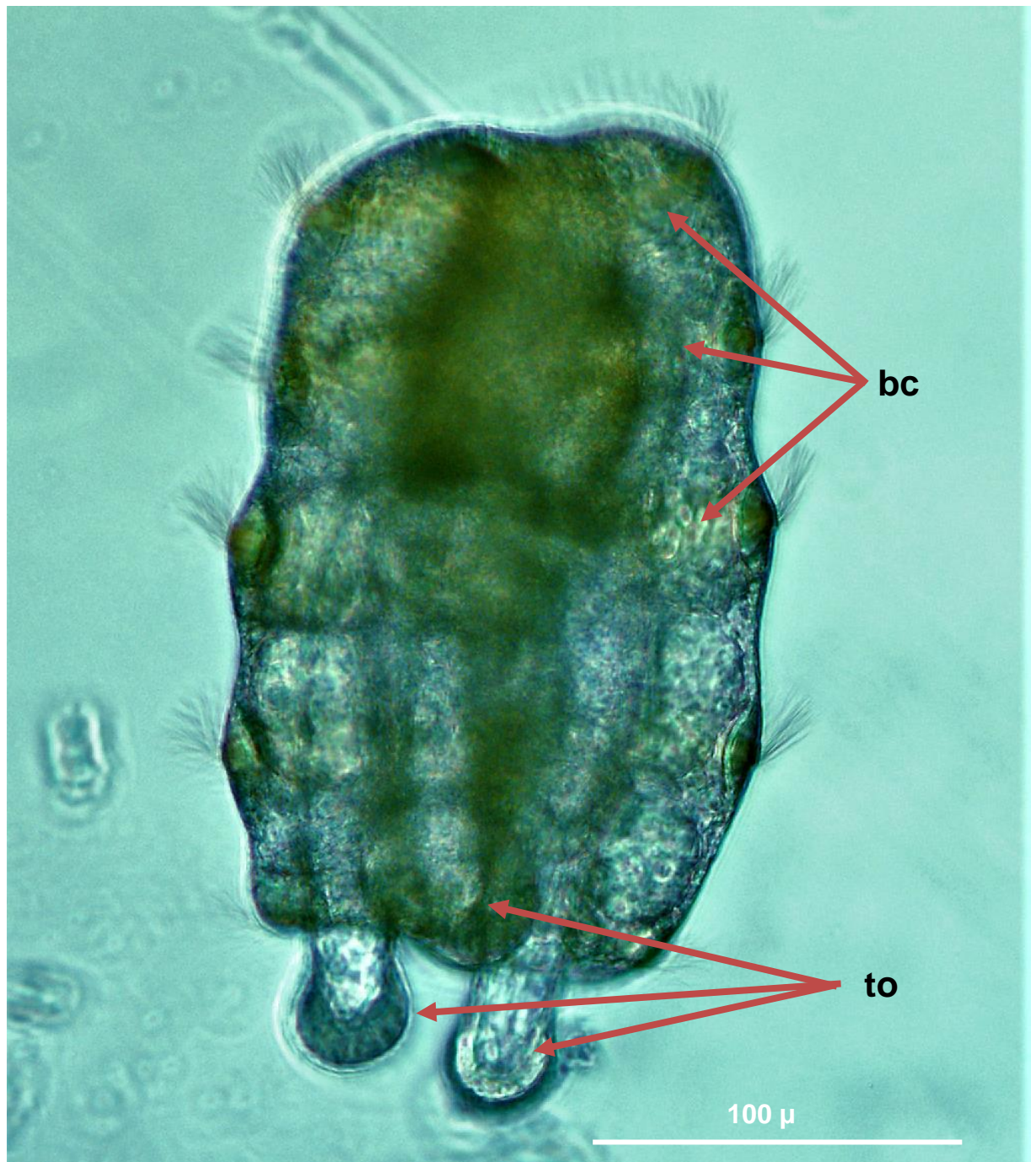


Figura 14. Larva en la fase de pentáctula no metamorfoseada con la presencia de cinco bandas ciliada (bc). A su vez, se observan tres de los 5 tentáculos orales (to).

Transcurridos aproximadamente dos días en esta fase, las larvas concluyen la metamorfosis perdiendo su capacidad de nadar (perdida de los cilios), presentan cinco tentáculos orales bien desarrollados y comienza a desarrollarse el primer pie ambulacral (figura 15). En este punto se concluye el desarrollo larval y aparecen las primeras postlarvas.



Figura 15. Postlarva, con la presencia del primer pie ambulacral (pa) y cinco tentáculos orales (to).

### **Juveniles de *Apostichopus parvimensis***

Transcurridos 26 DPF, se concluyó el desarrollo larval para la especie de pepino de mar *A. parvimensis*, momento en el cual se obtuvieron los primeros juveniles. Estos exhibieron una naturaleza completamente bentónica, presentan el primer pie ambulacral funcional que, en conjunto con los tentáculos orales, le permiten reptar por las superficies del tanque de cultivo.

En esta etapa, los juveniles de *A. parvimensis* presentan un sistema digestivo completamente funcional y comienzan a alimentarse de las películas de microalgas con la ayuda de los tentáculos orales. Durante este trabajo, los juveniles fueron alimentados con diatomeas bentónicas (*Navícula incerta*), teniendo una buena respuesta en su crecimiento, llegando a alcanzar algunos de ellos, hasta 1 cm de longitud en un periodo de tres meses posteriores a la fertilización.

En este punto las estructuras calcáreas conocidas como osículos son evidentes y se presentan en todo el cuerpo del animal. Otras estructuras como los pies ambulacrales continúan desarrollándose conforme el organismo crece, alcanzando un total de nueve pies ambulacrales para organismos con una talla de 1 cm de longitud. En esta talla, los organismos ya presentaban papilas en la porción media del cuerpo (figura 16).

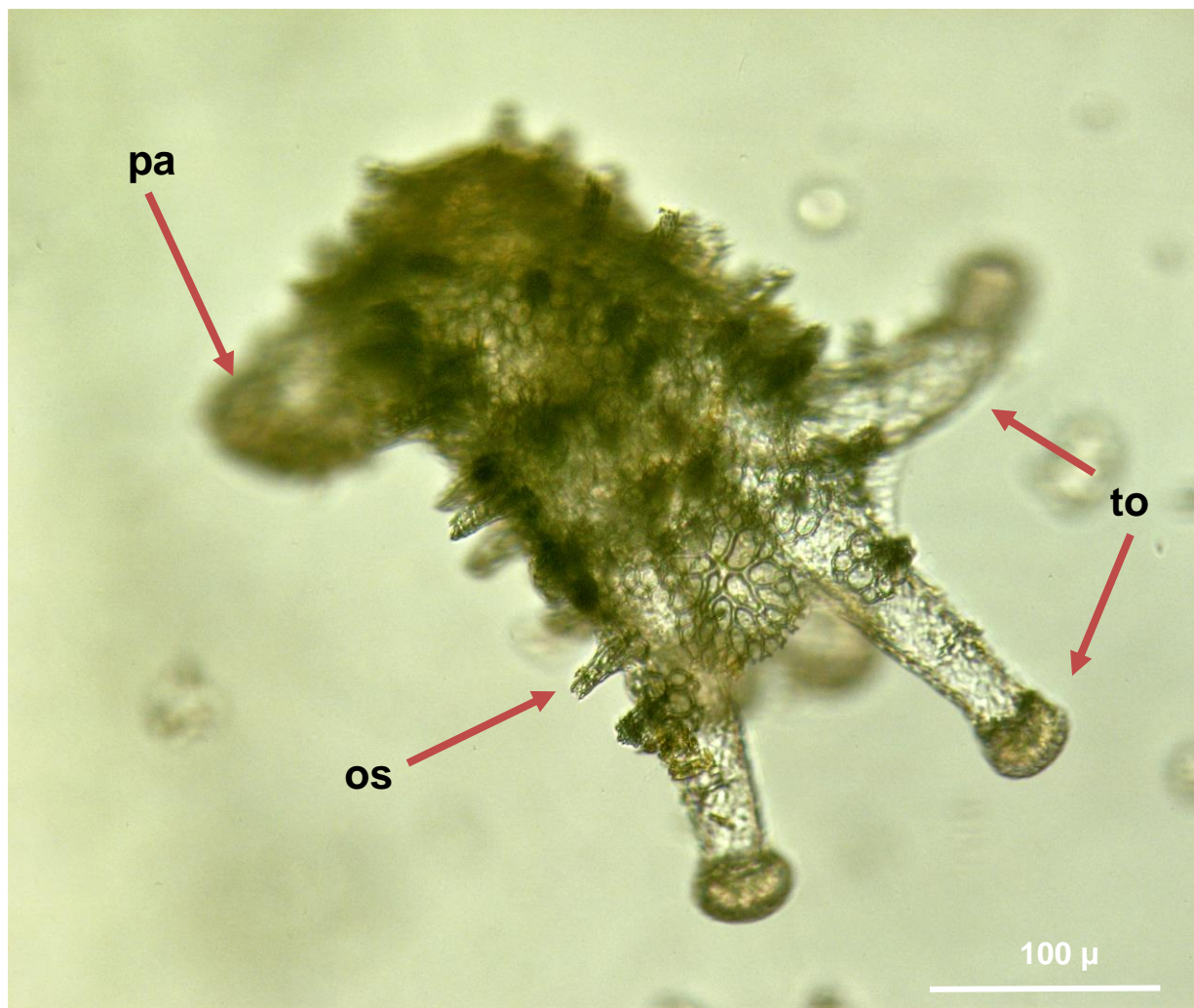


Figura 16. Juvenil del pepino de mar *Apostichopus parvimensis* con el primer pie ambulacral (pa) y cinco tentáculos orales (to). También se puede apreciar la formación de los osículos (os).

## Multitrofia

Como se mencionó anteriormente en la sección de metodología, para determinar una dieta efectiva para la manutención y maduración de organismos adultos en el laboratorio, se probaron dos dietas. 1) Un cultivo multitrófico donde los pepinos fueron alimentados con excremento de caracoles (*Megastrea undosa*) los cuales fueron alimentados *ad vivitum* con frondas de *Macrocystis pyrifera*. Y 2) alimento formulado en un sistema de monocultivo.

Los pepinos de mar que fueron alimentados con alimento formulado sufrieron ulceraciones en la piel, muy posiblemente debido a que dicho alimento se adhería al epitelio de los organismos y en algunos casos llegó a causar la muerte de estos. En el caso de los organismos en un sistema de multitrofia, en donde se alimentaron del excremento producido por el caracol *M. Undosa*, no se presentaron problemas de salud. No obstante, en ambos tratamientos se registró una disminución del peso promedio de los organismos transcurridos 7 meses, momento en el que finalizo el experimento.

En ambos tratamientos se presentó una disminución general en el peso de los organismos a lo largo del tiempo. Sin embargo, los organismos tratados en multitrofia presentaron una disminución menor en el peso; así mismo, el aumento de peso registrado hacia la fase final del periodo experimental en ambos tratamientos fue mayor también en el tratamiento de multitrofia al término del experimento. contraste con los que se trataron con alimento formulado (figura 17).

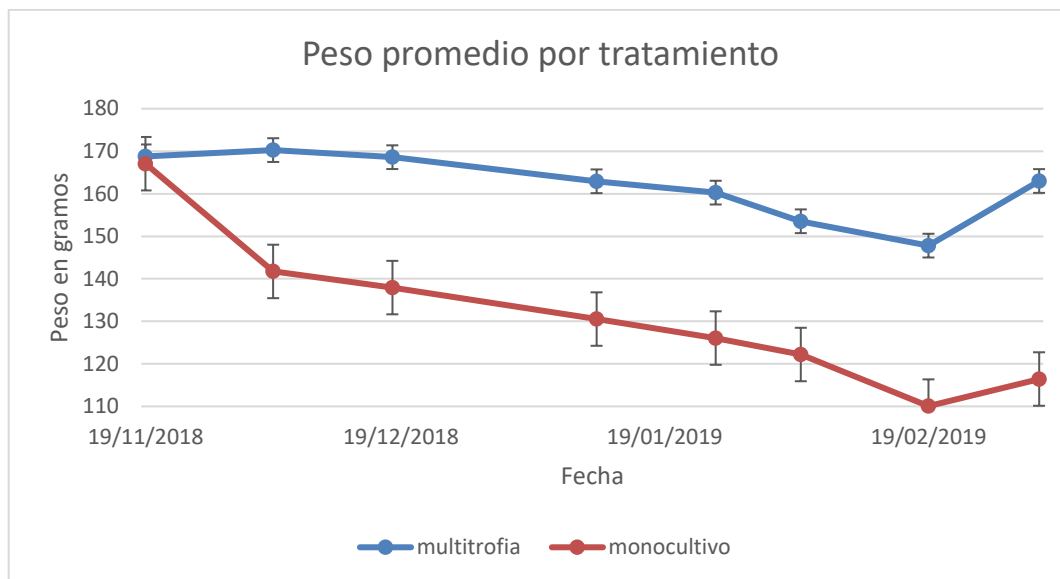


Figura 17 Pesos promedio de los pepinos de mar *Apostichopus parvimensis* de cada tratamiento. Se presenta la media  $\pm$  error estándar. Los tratamientos indican: multitrofia = tratamiento en el que los pepinos permanecieron en combinación con caracoles y se alimentaron de su excremento; monocultivo = los organismos fueron alimentados con alimento balanceado.

Al analizar los pesos individuales de los pepinos de mar, estos mostraron diferencias con respecto unos a otros, donde los pepinos de mayor peso (que, a su vez, tenían un mayor tamaño), mantuvieron una tendencia positiva en la ganancia mismo, mientras que los más pequeños perdieron mayor cantidad de su peso.

Cabe resaltar que al final del periodo experimental se apreció un aumento evidente en los pesos de los organismos en ambos tratamientos para la primera quincena del mes de marzo, que corresponde al inicio de la temporada reproductiva para esta especie y que posiblemente estuvo relacionado con la gametogénesis (figura 16). En dicha fecha se mostró un aumento generalizado en el peso de la mayoría de los organismos. Sin embargo, solamente un organismo del sexo femenino desovó en el periodo reproductivo correspondiente.

## Discusión

### Desove natural

Los desoves naturales observados durante el presente estudio, donde los organismos desovaron espontáneamente entre dos y 3 días posteriores al cuarto menguante de la luna para el 2018 y el 2019 a las 6:00pm, cuando el sol comenzaba a ponerse y la luz natural comenzaba a atenuarse, corresponden con lo reportado para diversas especies de holoturoideos en los que parece que la inducción al desove esta mediada por mecanismos asociados a la temperatura del agua y los ciclos lunares. Los pepinos de mar típicamente presentan un ciclo reproductivo anual, su desove está regido por variaciones estacionales, tales como lo es el aumento de la temperatura. No obstante, el momento en el que desovan está fuertemente relacionado con las fases de la luna, como ha sido reportado para varias especies por diversos autores (Liu, *et al.* 2015; Morgan, 2009; J. E. Purcell *et al.* 2013; Zacarías-Soto, *et al.* 2013). Sin embargo, el 11 de abril se registró un desove atípico (fuera del ciclo lunar y de la hora usual) en uno de los tanques de cultivo a las 3 de la tarde a plena luz del día. Se especula que al agregar espirulina en dosis mayores a 50gr/2000L pudo haber estimulado este desove en particular, ya que fue agradado previamente al desove observado.

Cabe mencionar que, al alimentar a los organismos con estas dosis de alimento con espirulina, estos se mostraron activos reptando por las paredes del tanque, levantando  $\frac{3}{4}$  partes del cuerpo y extendiendo los tentáculos orales. No obstante, se requiere realizar más estudios para determinar si el alimento es un factor adicional que influye en el desove para esta especie y otras de pepinos de mar.

Lo anterior nos hace suponer que posiblemente la presencia de alimento en el medio sea un estimulante adicional para el desove, sin embargo, es necesario repetir con un diseño experimental apropiado esta observación inicial, para

poder verificar si realmente tiene algún significado en el desove de estos organismos.

### **Desove artificial**

La efectividad del desove mediante el uso de un neuropéptido comercial que se obtuvo a partir de otra especie de holoturoideo, muestra lo conservado que el sistema de regulación del desove debe estar en holoturoideos, sin que esto signifique que sea homogéneo entre todas las especies. Su efectividad en el presente trabajo es una de las principales contribuciones de nuestra investigación, ya que el desove de los holoturoideos se realiza principalmente mediante shock térmico y al igual que en cualquier organismo que se requiere cultivar, es una etapa fundamental para lograr obtener semilla en condiciones de laboratorio. El desove controlado es uno de los principales retos en el cultivo de los holotúridos, ya que existen variaciones en cada especie y los métodos convencionales (shock térmico, tratamiento a secas, presión de agua, etc.) no son confiables y pueden deteriorar la calidad de los gametos (Agudo, 2006; Liu *et al.*, 2015; Lovatelli *et al.*, 2004). Para algunas especies como *A. japonicus*, se desarrollaron neuropéptidos que además de promover el desove, no degradan la calidad de los gametos obtenidos por este método (Fujiwar *et al.*, 2010; Kato *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015; J. E. Purcell *et al.*, 2013), por lo que reiteramos, los resultados obtenidos en el presente estudio establecen una metodología eficaz para el desove de *A. parvimensis*.

La importancia de esta aportación radica en el mejoramiento de las técnicas para la reproducción de la especie, ya que permite una planeación más precisa en el proceso de cultivo y reproducción, brindando la seguridad de un desove exitoso. Esto, a su vez permite estimar la producción de larvas, lo que optimiza todo el proceso de cultivo, ya que podemos estimar el espacio y la producción de juveniles.

Por otra parte, el periodo de desarrollo embrionario para *A. parvimensis*, el cual se completó en 48 horas a partir de la fertilización (tabla III) a una temperatura de 18°C, lo que resulta un poco más prolongado que lo reportado para *A. japonicus*, otra especie de aguas templadas, para el cual se ha reportado de 36 horas a una temperatura de 20°C (Xiyin *et al.*, 2004). Es probable que la diferencia en el tiempo de desarrollo radique en la temperatura, puesto que este es un factor determinante en el desarrollo de estos organismos (Cameron *et al.*, 1986; Purcell *et al.*, 2012)

El desarrollo larval de 26 días desde la fertilización a una temperatura promedio de 18°C en el presente estudio, fue bastante similar a lo reportado para *A. japonicus*, (21 DPF) a una temperatura de 20°C (Ito *et al.*, 1998). Nuevamente, la diferencia puede estar asociada al papel que juega la temperatura en el desarrollo larvario, donde a mayor temperatura, dentro del rango de tolerancia de la especie, el desarrollo ocurre más rápidamente. Este fue el caso al comparar los resultados del presente trabajo con otra especie con desarrollo larvario similar.

No obstante, como ya se mencionó anteriormente, se encontró un desarrollo larvario asincrónico en el presente estudio, pudiendo observarse larvas en todas las etapas en muestras tomadas en 20 DPF e incluso larvas auricularias a los 40 DPF. Esta condición se observó en los dos años de estudio. Esto mismo fue reportado anteriormente por Vela-Gallo (2017) y Cameron (1986) con la especies *A. parvimensis* y *Parastichopus californicus* respectivamente, lo que sugiere a su vez que este comportamiento es típico y pudiera beneficiar la dispersión larval al permitir que los diversos estadios larvales permanezcan más tiempo en la columna de agua y por ende, sea transportada por las corrientes a mayores distancias y con esto, poder potencialmente tener acceso a sitios más favorables para metamorfosearse (Cameron *et al.*, 1986).

Los 5 estadios larvales que se reportan en el presente estudio, con un patrón que tiende a reducir el tamaño de la larva en la etapa de auricularia tardía, es similar a los reportados para otras especies de holotúridos (Agudo. 2006; Jean-François. 2003; Lovatelli et al., 2004; McEdward et al., 2001; Rakaj et al., 2019).

Finalmente, para nuestro conocimiento, el presente trabajo representa la primera vez que se obtienen Juveniles de *Apostichopus parvimensis* en condiciones de cultivo, los cuales se observaron a los 26 DPF, en donde se apreció que aparecen los primeros juveniles con su primer pie ambulacral. 63 DPF se observaron organismos más desarrollados con hasta 4 pies ambulacrales, papilas evidentes y tallas de 5 a 10 mm de longitud total. Asimismo, el desarrollo de *A. parvimensis*, en comparación a otras especies de holotúridos como *A. japonicus* y *H. polii* es más acelerado, donde la talla reportada en condiciones de cultivo para los 90 PDF es de 21 mm de longitud (Rakaj et al., 2019). Esto podría deberse a diferentes variables, como calidad del agua, alimentación y características especie-específicas de las diferentes especies (Liu et al., 2015; J. E. Purcell et al., 2013; Rakaj et al., 2019).

Sin embargo, se requieren estudios posteriores para definir los factores que influyen en las tasas de crecimiento de esta especie y entre otras cosas, contribuir a afinar las metodologías de obtención de larvas, producción de juveniles, mantenimiento de adultos en cautiverio y metodologías de cultivo multitrófico que ayuden a optimizar la producción de especies por medio de la acuicultura, en las actuales condiciones de un océano cambiante.

Durante el experimento de multitrofia se observó un mejor rendimiento en los organismos cuando se alimentaron del excremento de *M. undosa*. Sin embargo, los organismos en ambos tratamientos mostraron un decremento en el peso al finalizar el experimento, en relación con el peso inicial al cual se iniciaron los tratamientos.

En el caso de la multitrofia, esto podría estar relacionado a los nutrientes en las dietas probadas, puesto que los gasterópodos empleados en el experimento solo fueron alimentados con láminas de *Macrocystis pyrifera*, mientras que se sugiere llevar una mezcla de macroalgas y otros elementos en las dietas empleadas en los organismos adultos ( Xiyin *et al.*, 2004; Domínguez- Gao *et al.*, 2011; Godino *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015).

En cuanto al monocultivo, se presentaron altas tasas de mortalidad (7 organismos muertos) en los organismos por ulceraciones causadas en la dermis. Se cree que estas fueron causadas por el alimento, que al entrar en contacto con la piel de los organismos se quedaba adherido a la misma, provocando reacciones alérgicas o bien, infecciosas. Sin embargo, con la información generada en el presente estudio, no nos es posible llegar a una conclusión contundente, por lo que se requieren más estudios para determinar con exactitud las causas de estas lesiones ya que solo se presentaron en los tanques con el alimento formulado.

Otro aspecto importante por considerar es que no se colocó sedimento en los tanques de ambos tratamientos durante el periodo experimental. Existe evidencia de que el sedimento es importante para los procesos de digestión en aspidóquiritidos inclusive en condiciones de acuicultura multitrofica (Gao *et al.*, 2011; Cubillo *et al.*, 2016), razón por la cual, es importante considerar el efecto del sedimento en futuros experimentos que estén relacionados con la alimentación de aspidóquiritidos.

## **Conclusiones**

El peino de mar *A. Parvimensis* es una especie apta para su producción en acuicultura. Durante los dos años de experimentación mostró una buena adaptación a las condiciones de cautiverio y se establecieron las bases para

establecer una metodología para su manejo, reproducción y producción de juveniles en cautiverio.

Uno de los puntos más relevantes de este trabajo es el desarrollo de una técnica de inducción al desove con la ayuda de un neuropéptido inductor que permitió desovar con eficacia a los organismos tratados. Esta metodología nos permite tener el control del desove y poder estimar la producción de larvas por temporada de cultivo.

Otro logro importante del presente trabajo radica en la descripción completa del desarrollo larval por primera vez para esta especie, lo que además nos brinda información adicional y muy importante, para desarrollar un manejo más eficiente de esta especie, no solo en acuicultura, sino en otros esfuerzos de conservación como en reservas marinas y repoblamiento. Específicamente, al conocer los tiempos que permanecen las larvas en la columna de agua y caracterizar con detalle la talla de los organismos juveniles. Aunado a esto, es información que puede ayudar al diseño e implementación de estas estrategias de conservación.

A nuestro entender, esta es la primera vez que se obtuvieron los primeros juveniles de *A. parvimensis* producidos en condiciones de laboratorio. Esto es un avance científico que nos permite que impulsa el desarrollo de la actividad acuícola por primera vez para esta especie en su área de distribución.

El desarrollo de la acuicultura de *A. parvimensis* nos permite no solo realizar programas de repoblamiento y desarrollar una actividad acuícola con fines comerciales y de manera simultánea, apoyar programas de repoblamiento que contribuyan con la recuperación y mantenimiento de las poblaciones naturales. Si bien, todavía quedan por definir muchos aspectos de su manejo y cultivo, incluyendo los requerimientos nutricionales de la especie, ahora podemos empezar a utilizar este organismo como un elemento de la acuicultura multitrófica debido a sus capacidades detritívoras. De esta forma será posible

promover así que la acuicultura se una actividad más productiva, sostenible y amigable con el medioambiente, en las condiciones actuales de un océano cambiante, en donde, los retos para la humanidad de mantener un medioambiente saludable serán cada vez más exigentes.

## **Agradecimientos**

La realización del presente trabajo fue posible gracias a la ayuda y contribución de un gran número de personas e instituciones. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) quien me otorgó una beca para poder realizar mis estudios de maestría. Al Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (ECODEL) a cargo de Eugenio de J. Carpizo Ituarte, por integrarme a su equipo, brindarme su ayuda y compartirme su experiencia. Al programa de Monitoreo de Ecosistemas por las Californias (MEXCAL) a cargo de Rodrigo Beas, por incluirme en su equipo de trabajo, apoyarme con materiales, colecta de organismos, apoyo financiero y un invaluable compañerismo. A la Universidad Autónoma de Baja California, quien otorgo los servicios e instalaciones para el desarrollo de mi trabajo. Al Laboratorio de Nutrición y fisiología de Organismos Marinos (LINDEAACUA | FEED AQUA LAB), a cargo de María Teresa Viana Castrillón, por proveer la dieta formulada para el experimento de multitrofia. A Stanford University, por recibirme en sus instalaciones y apoyarme con valiosa información para el desarrollo de mi trabajo. Y finalmente al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), por permitirme utilizar sus instalaciones para realizar parte de los experimentos realizados en este trabajo.

La presente investigación se llevó a cabo con el apoyo financiero de los siguientes proyectos: 1. Biología del Desarrollo para el Aprovechamiento y Conservación de los Recursos Costeros (Proy. Interno # 403/1030, IIO a cargo de ECI).2. Genes de Respuesta al Estrés Como Bioindicadores Para Evaluar el Efecto del Cambio Global en Organismos Extractadores del Bentos del Pacífico

Mexicano (Proy. Ciencia Básica 2012 – CONACYT # 181597, a cargo de ECI).3. Proyectos MEXCAL: PRODEP UABC-PTC-669 y 21ª Convocatoria interna # 240 PRODEP UABC-PTC-669.

## Referencias

- Agudo, N. (2006). Sandfish Hatchery Techniques. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research.
- Anderson, S. C., Flemming, J. M., Watson, R., Lotze, H. K. (2011). Serial exploitation of global sea cucumber fisheries. *Fish and Fisheries*, 12(3), 317–339. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2010.00397.x>
- Cameron, J.Lane, Fankboner, P. V. (1986). Reproductive biology of the commercial sea cucumber *P. californicus* I Reproductive periodicity and spawning behavior. *Canadian Journal of Zoology*, 64, 168–175.
- Cameron, J.Lane, Fankboner, P. V. (1989). Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Parastichopus californicus* (Stimpson) (Echinodermata:Holothuroidea). II. Observations on the ecology of development, recruitment, and the juvenile life stage. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 127(656), 43–67. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(89\)90208-6](https://doi.org/10.1016/0022-0981(89)90208-6)
- Cameron, J L, Fankboner, P. V. (1986). Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Parastichopus californicus* (Stimpson) (Echinodermata: Holothuroidea). I. Reproductive periodicity and spawning behavior. *Canadian Journal of Zoology*, 64(656), 168–175. <https://doi.org/10.1139/z86-027>
- Chávez, E. A., de lourdes salgado-rogel, M. A., Palleiro-Nayar, J. (2011). Stock assessment of the warty sea cucumber fishery (*Parastichopus parvimensis*) of NW Baja California. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports, 52, 136–147.

- Chen, J. (2003). Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China. *SPC Beche-de-Mer Information 18 Bulletin*, (May 2003), 18–23.
- Collard, M., Eeckhaut, I., Dehairs, F., Dubois, P. (2014). Acid-base physiology response to ocean acidification of two ecologically and economically important holothuroids from contrasting habitats, *Holothuria scabra* and *Holothuria parva*. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(23), 13602–13614. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3259-z>
- Cubillo, A. M., Ferreira, J. G., Robinson, S. M. C., Pearce, C. M., Corner, R. A., Johansen, J. (2016). Role of deposit feeders in integrated multi-trophic aquaculture - A model analysis. *Aquaculture*, 453. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.031>
- Domínguez-Godino, J. A., Slater, M. J., Hannon, C., González-Wangüermert, M. (2015). A new species for sea cucumber ranching and aquaculture: Breeding and rearing of *Holothuria arguinensis*. *Aquaculture*, 438. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.004>
- Espinoza-Montes, A. (2000). Ciclo reproductivo del pepino de mar *Parastichopus parvimensis* (HL Clarck, 1913) (Echinodermata, Holothuroidea) en Isla Natividad, Baja California Sur, México.
- Fajardo-León, M. C., Suárez-Higuera, M. C. L., Valle-Manríquez, Hernández-López, a. (2008). Reproductive biology of the sea cucumber *Parastichopus parvimensis* (Echinodermata: Holothuroidea) at Isla Natividad and Bahía Tortugas, Baja California Sur, Mexico. *Ciencias Marinas*, 34, 165–177.
- Fang, J., Zhang, J., Xiao, T., Huang, D., Liu, S. (2016). Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in Sanggou Bay, China. *Aquaculture Environment Interactions*, 8, 201–205. <https://doi.org/10.3354/aei00179>
- Fujiwara, A., Yamano, K., Ohno, K., Yoshikuni, M. (2010). Spawning induced by cubifrin in the Japanese common sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fisheries Science*, 76(5), 795–801. <https://doi.org/10.1007/s12562-010->

0262-2

- Gao, Q. F., Wang, Y., Dong, S., Sun, Z., & Wang, F. (2011). Absorption of different food sources by sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) (Echinodermata: Holothuroidea): Evidence from carbon stable isotope. *Aquaculture*, 319(1–2), 272–276. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.051>
- Hamel, J.-F., Mercier, A. (2008). Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in Asia. *Sea Cucumbers. A Global Review of Fisheries and Trade*, 257–291.
- Hamel, J., Mercier, A. (2008). Population status , fisheries and trade of sea cucumbers in temperate areas of the Northern Hemisphere. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, (516), 257–291.
- Hu, C., Li, H., Xia, J., Zhang, L., Luo, P., Fan, S., Wen, J. (2013). Spawning, larval development and juvenile growth of the sea cucumber *Stichopus horrens*. *Aquaculture*, 404–405. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.04.007>
- Ito, S., Kitamura, H. (1998). Technical development in seed production of the Japanese sea cucumber , *Stichopus japonicus*. *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin*, 10(May), 24–28.
- Jean-François Hamel (2003). Beche-De-Mer-Larval development and juvenile growth of the Galapagos sea cucumber *Isostichopus fuscus*. *Time*, (May), 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.ptsp.2011.03.003>
- Kato, S., Tsurumaru, S., Taga, M., Yamane, T., Shibata, Y., Ohno, K., Yoshikuni, M. (2009). Neuronal peptides induce oocyte maturation and gamete spawning of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Developmental Biology*, 326(1), 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.11.003>
- Liu, S., Sun, J., Ru, X., Hamel, J. F., Mercier, A. (2015). Broodstock conditioning

- and spawning. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 39, 101–110. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799953-1.00007-6>
- Lonhart, S. I., Jeppesen, R., Beas-Luna, R., Crooks, J. A., Lorda, J. (2019). Shifts in the distribution and abundance of coastal marine species along the eastern Pacific Ocean during marine heatwaves from 2013 to 2018. *Marine Biodiversity Records*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s41200-019-0171-8>
- Lovatelli, A., Conand, C., Purcell, S., Uthicke, S., Hamel, J.-F., Mercier, A. (2004). Advances in sea cucumber aquaculture and management. FAO Fisheries Technical Paper, 463, 425. <https://doi.org/ISSN 0429-9345>
- McEdward, L. R., Miner, B. G. (2001). Larval and life-cycle patterns in echinoderms. *Canadian Journal of Zoology*, 79(7), 1125–1170. <https://doi.org/10.1139/z00-218>
- Morgan, A. (2009). Spawning of the Temperate Sea Cucumber, *Australostichopus mollis*. *Journal Of The World Aquaculture Society*, 40(3), 363–373. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00256.x>
- Pietrak, M., Kim, J., Redmond, S., Kim, Y., Yarish, C., Bricknell, I. (2014). Culture of sea cucumber in Korea: a guide to Korean methods and the local sea cucumber in the Northeast U.S., 12.
- Purcell, J. E., Baxter, E. J., Fuentes, V. L. (2013). *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*. Advances in Aquaculture Hatchery Technology. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857097460.2.404>
- Purcell, S. W., Hair, C. A., Mills, D. J. (2012). Sea cucumber culture, farming and sea ranching in the tropics: Progress, problems and opportunities. *Aquaculture*, 368–369, 68–81. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.053>
- Purcell, S. W., Mercier, A., Conand, C., Hamel, J. F., Toral-Granda, M. V.,

- Lovatelli, A., Uthicke, S. (2013). Sea cucumber fisheries: Global analysis of stocks, management measures and drivers of overfishing. *Fish and Fisheries*, 14(1), 34–59. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2011.00443.x>
- Rakaj, A., Fianchini, A., Boncagni, P., Scardi, M., Cataudella, S. (2019). Artificial reproduction of *Holothuria polii*: A new candidate for aquaculture. *Aquaculture*, 498, 444–453. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.060>
- Salgado-Rogel, M., Palleiro-Nayar, J., Rivera-Ulloa, J., Aguilar-Montero, D., Vázquez-Solórzano, E. (2009). La pesquería y propuestas de manejo del pepino de mar *Parastichopus parvimensis* en Baja California , México. *Ciencia Pesquera*, 17, 17–26.
- Shi, C., Dong, S., Wang, F., Gao, Q., Tian, X. (2013). Effects of four fresh microalgae in diet on growth and energy budget of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Aquaculture*, 416–417. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.050>
- Shi, C., Dong, S., Wang, F., Gao, Q., Tian, X. (2015). Effects of the sizes of mud or sand particles in feed on growth and energy budgets of young sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Aquaculture*, 440. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.028>
- Vela-Gallo, C. (2017). DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVAL DEL PEPINO DE MAR *Parastichopus parvimensis* EN ISLA NATIVIDAD, BCS, MÉXICO. Universidad Autónoma de Baja California Sur.
- Xiyin, L., Guanghui, Z., Qiang, Z., Liang, W., Benxue, G. (2004). Studies on hatchery techniques of the sea cucumber , *Apostichopus japonicus*. *Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management*, 287–295.
- Yoon, H. S., Kim, T., Shin, S., Oh, M. H., Kwon, I., Lee, J., Jeong, K. S. (2014). Physical and biological evaluation of co-culture cage systems for grow-out of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai*, with juvenile sea cucumber,

*Apostichopus japonicus* (Selenka), with CFD analysis and indoor seawater tanks. *Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.07.001>

Zacarías-Soto, M., Olvera-Novoa, M. A., Pensamiento-Villarauz, S., Sánchez-Tapia, I. (2013). Spawning and larval development of the four-sided sea cucumber, *Isostichopus badionotus* (Selenka 1867), under controlled conditions. *Journal of the World Aquaculture Society*, 44(5), 694–705. <https://doi.org/10.1111/jwas.12061>

Zamora, L. N., Yuan, X., Carton, A. G., Slater, M. J. (2016). Role of deposit-feeding sea cucumbers in integrated multitrophic aquaculture: Progress, problems, potential and future challenges. *Reviews in Aquaculture*, pp. 1–18. <https://doi.org/10.1111/raq.12147>