



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
DESARROLLO LARVARIO Y METAMORFOSIS DE LA
ESTRELLA DE MAR *Pisaster ochraceus* (Brandt, 1835)

T E S I S

que para optar por el grado de
Maestra en Ciencias
presenta

VIRIDIANA TAPIA RAMÍREZ

Tutor principal: **DR. EUGENIO DE J. CARPIZO ITUARTE**
IIO-UABC

Comité tutor: **DR. ALFREDO LAGUARDA FIGUERAS**
ICML-UNAM

DR. FRANCISCO SOLÍS MARÍN
ICML-UNAM

DRA. DINORAH HERRERO PEREZRÚL
CICIMAR-IPN

DR. FRANCISCO BENÍTEZ VILLALOBOS
UMAR

México D. F. Enero 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“El amor por todas las criaturas vivientes es el más noble atributo del hombre”

Charles Darwin

“La libertad es para que se pueda pensar distinto, por que para estar de acuerdo no se precisa libertad”

José Mujica

Para Santiago con todo mi amor

Agradecimientos

Al Dr. Eugenio Carpizo por todo el apoyo durante éste largo recorrido, eres una gran persona Eugenio y estoy muy agradecida por todo lo que me enseñaste.

Al Dr. Francisco Solís por los comentarios y las correcciones pero sobre todo por que a la distancia me sigue enseñando la gran pasión por el estudio de los equinodermos.

Al Dr. Alfredo Laguarda por las revisiones y por tener siempre buenos comentarios para los que vamos empezando, personas como usted actualmente en la academia son muy escasas.

A la Dra Dinorah Herrero por las revisiones y correcciones a lo largo de toda la tesis.

Al Dr. Francisco Benítez por la atinadas revisiones a éste documento y por todo el conocimiento compartido.

Al posgrado de Ciencias del mar y Limnología de la UNAM

Un gran agradecimiento al Técnico Javier García Pámanes, por su ayuda en la recolecta de estrellas y su apoyo en el mantenimiento de los organismos.

Al Dr. Alfredo Salas, por el préstamo de equipo para la realización de cultivos, por las asesorías, el apoyo y las charlas motivacionales en los momentos más difíciles.

Al Dr. Isaí Pacheco por la facilitación para tomar fotografías al microscopio en su laboratorio.

Al técnico Roberto Escobar, por el apoyo en campo, en laboratorio y fuera de. Muchas gracias.

A la Dra. Alejandra Martínez Melo por el apoyo en la revisión de ésta tesis y por el gran apoyo moral.

A mis compañeros del laboratorio: Maritza, Alejandro, Jime, Juan, Carlitos, Quetza, Bryan, Julia, todos ustedes fueron un gran apoyo durante la realización de ésta tesis, gracias por su tiempo, paciencia, ayuda y por contagiarme la pasión por el mar.

Quiero agradecer a CONACYT al proyecto CONACyT de Ciencia Básica "Genes de respuesta al estrés como bioindicadores para evaluar el efecto del cambio global en organismos estructuradores del bentos en el Pacífico Mexicano" (No. de reg. 181597), por el aporte de fondos para la realización del trabajo.

A mis padres y hermanos por estar siempre ahí, por ayudarme a terminar y por apoyarme en la buenas y en las muy malas, los quiero muchísimo.

A Hiram por todo el apoyo físico (eres un experto en mantenimiento de larvas), moral y espiritual, sin ti esto solo sería un sueño.

A Santiago por darme la entereza para salir adelante, por acompañarme a contar, medir y cuidar larvas (algunas veces sin ganas de hacerlo), por quitar de mi mente el “no puedo”, por que por ti debo ser y soy una mejor persona- Hoy mañana y siempre te amo.

A mis amigas Elvia, Elena, Lupita, Angie y Norma por escuchar mis quejas mil y un veces y aún así tener siempre la mejor sonrisa para darme ánimos.

GRACIAS TOTALES...

Índice

Resumen.....	11
Introducción.....	12
Justificación.....	22
Objetivos.....	23
Antecedentes.....	23
Metodología.....	26
Recolecta de organismos.....	26
Mantenimiento de adultos en tanques.....	28
Inducción al desove.....	28
Mantenimiento de larvas en el laboratorio.....	32
Documentación del desarrollo larvario.....	33
Inducción a la metamorfosis.....	34
Resultados	37
Discusión.....	66
Conclusiones.....	71
Referencias.....	72
Anexo I. Análisis estadísticos	en CD

Índice de figuras

Figura 1. <i>Pisaster ochraceus</i> en sus coloraciones ocre y naranja.....	12
Figura 2. <i>Pisaster ochraceus</i> alimentándose de <i>Mytilus californianus</i>	13
Figura 3. Macho de <i>Pisaster ochraceus</i>	14
Figura 4. Huevo de <i>Pisaster ochraceus</i>	16
Figura 5. Larva bipinaria temprana y esquema de larva bipinaria.....	16
Figura 6. Larvas braquiolarias de <i>Pisaster ochraceus</i> de 21 días de cultivo y esquemas de larvas braquiolarias.....	17
Figura 7. Postlarva de <i>Pisaster ochraceus</i> y esquema de postlarva recién metamorfoseada del género <i>Henricia</i>	18
Figura 8. Mapa que muestra las 4 principales ciudades de Baja California (BC) donde es extraída para su comercio y recolecta de <i>Pisaster ochraceus</i> en Campo Kennedy	20
Figura 9. Estrellas de mar que presentan el <i>wasting syndrome</i> en distintas localidades de la costa de BC.....	21
Figura 10. Mapa que muestra las localidades de recolecta	26
Figura 11. Recolecta por buceo autónomo en Campo Kennedy.....	27
Figura 12. Recolecta en el intermareal del Ejido Eréndira.....	27
Figura 13. Grupo de estrellas recolectadas en Campo Kennedy.....	28
Figura 14. Tanques cónicos de 40L donde se realizó el cultivo de larvas.....	30
Figura 15. Adultos inyectados con 1-Metiladenina (1-MA)	31
Figura 16. Acercamiento al rudimento juvenil bien desarrollado de una larva braquiolaria.....	35
Figura 17. Día cero de cultivo, primer desove (3 marzo 2014)	38
Figura 18. Día tres de cultivo, primer desove (3 marzo 2014)	39
Figura 19. Día diez de cultivo, primer desove (3 marzo 2014)	40
Figura 20. Día dieciocho de cultivo, primer desove (3 marzo 2014)	41
Figura 21. Día veinticinco de cultivo, primer desove (3 marzo 2014).....	42
Figura 22. Día treinta y tres de cultivo, primer desove (3 marzo 2014)	43

Figura 23. Día treinta y nueve de cultivo, primer desove (3 marzo 2014).....	44
Figura 24. Día cuarenta y cinco de cultivo, primer desove (3 marzo 2014).....	45
Figura 25. Hembra y macho de <i>Pisaster ochraceus</i> desovando.....	46
Figura 26. Larva en estadio BE.....	48
Figura 27. Larva en estadio BM.....	49
Figura 28. Larva en estadio BT.....	50
Figura 29. Larva en estadio de BR _{s/r}	51
Figura 30. Larva en estadio de BR _{c/r}	52
Figura 31. Estadio post-larval.....	53
Figura 32. Embriones en distintos estadios de desarrollo I.....	54
Figura 33. Embriones en distintos estadios de desarrollo II.....	55
Figura 34. Larvas en estadio de bipinaria temprana.....	56
Figura 35. Larvas en estadio de bipinaria media.....	57
Figura 36. Larvas en estadio de bipinaria tardía.....	58
Figura 37. Larvas en estadio braquiolaria sin rudimento desarrollado.....	59
Figura 38. Larvas en estadio de braquiolaria con rudimento bien desarrollado.....	60
Figura 39. Estadio de postlarva.....	61
Figura 40. Longitud máxima de cada estadio larval.....	63
Figura 41. Ancho máximo de cada estadio larval.....	63
Figura 42. Porcentaje de larvas metamorfoseadas en presencia de KCl como inductor de la metamorfosis (cultivo hecho el 29 de mayo 2013).....	64
Figura 43. Porcentaje de larvas metamorfoseadas en presencia de KCl como inductor de la metamorfosis (cultivo hecho el 3 de marzo 2014).....	65

Índice de tablas

Tabla 1. Tiempos del desarrollo larvario de <i>Pisaster ochraceus</i> , cultivadas en laboratorio a una temperatura de $18^{\circ} \pm 1$ °C.....	47
Tabla 2. Promedios de mediciones de larvas, largo y ancho máximo (μm)	62

Resumen

La estrella de mar *Pisaster ochraceus*, es un equinodermo clave dentro del intermareal de la costa del Pacífico de Baja California y de Norteamérica. Es un recurso que en México ha sido explotado para abastecer el mercado regional y nacional, sin embargo, se desconocen muchos aspectos de su ciclo de vida en nuestras costas, incluyendo la duración de su desarrollo larvario y sus patrones de reclutamiento. Conocer el desarrollo larvario en el límite sur de su distribución resulta fundamental para entender la dinámica y conectividad de sus poblaciones, además de que con esta información, se puede contribuir para que con esfuerzos futuros que se ayude la conservación y al mejor manejo de la pesquería. El objetivo del presente trabajo es describir el desarrollo larvario de *P. ochraceus* proveniente de sus poblaciones sureñas y analizar su respuesta ante posibles inductores de la metamorfosis. La inducción al desove de *P. ochraceus* extraída de las costas de Ensenada, Baja California, México se llevó acabo inyectando 1-metiladenina [10^{-4} M]. Los óvulos son color salmón y los espermatozoides color beige. En condiciones de laboratorio, el desarrollo embrionario y larvario de la especie es heterogéneo. La primera división ocurre aproximadamente a los 30 min después de la fertilización a una temperatura de $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez pasados los estadios de mórula, blástula y gástrula el embrión se desarrolla al tercer día de cultivo en una larva bipinaria. En un cultivo con una temperatura de $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ la larva bipinaria se transforma en braquiolaria al transcurrir 25 días; una larva braquiolaria bien desarrollada llega a medir hasta $2178\text{ }\mu\text{m}$; la metamorfosis espontánea de las primaras larvas ocurrió después de 30 días a partir de la fertilización; durante éste proceso el cuerpo larval es reabsorbido por el rudimento juvenil y las postlarvas miden aproximadamente $722\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro. Se observó que las larvas crecen de manera continúa hasta que el rudimento juvenil se desarrolla completamente; además las larvas braquiolarias con rudimento bien desarrollado son capaces de metamorfosearse en presencia de distintas concentraciones de KCl como inductor.

Palabras clave: estrella de mar, desarrollo larvario, metamorfosis, *Pisaster ochraceus*, desarrollo embrionario.

Introducción

La clase Asteroidea Blainville, 1830 agrupa a las estrellas de mar que son organismos de forma estelada y con un disco central, del que se proyectan brazos (rayos), los cuales generalmente son cinco, aunque se han reportado especies que llegan a tener hasta 50 (Hendler *et al.*, 1995).

La estrella de mar, *Pisaster ochraceus* (Brandt, 1835) pertenece al género *Pisaster*, Müller & Troschel, 1840, la familia Asteroiidae, Gray, 1840 y al orden Forcipulatida, Perrier, 1884. En México existen aproximadamente 185 especies de las cuales 73 habitan en el Pacífico mexicano (Solís-Marín *et al.*, 2013). *P. ochraceus* es un organismo que tiene cinco brazos o radios, un disco central y puede vivir hasta 20 años (Menge, 1975). Presenta coloraciones variables pudiendo ser morada, ocre, amarilla o naranja (Fig. 1) (Harley *et al.*, 2006). La distribución más norteña de ésta especie es en Prince William Sound, Alaska, E. U. A. y al sur en Isla Cedros, Baja California (BC), México (Frontana-Uribe, 2005). Su distribución batimétrica se extiende desde la zona intermareal hasta aproximadamente 97m de profundidad (Lambert, 2007).

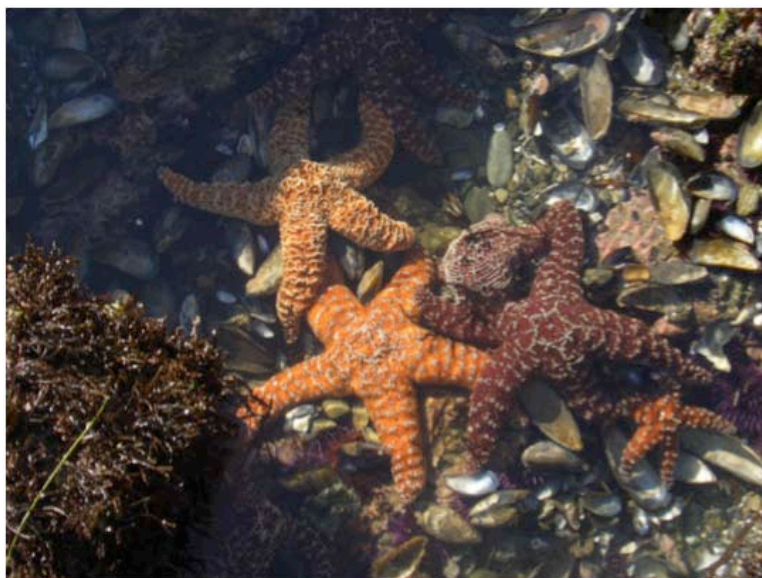


Figura 1. *Pisaster ochraceus* en sus coloraciones ocre y naranja. Fotografía de E. Carpizo Ituarte.

Esta especie es un depredador tope de las comunidades litorales rocosas, ya que determina muchos de los patrones de la estructura de las poblaciones de las presas en esta comunidad (como distribución, abundancia, talla, entre otros). Tiene preferencia por las zonas expuestas al oleaje (Menge, 1994)

donde se alimenta principalmente del mejillón californiano *Mytilus californianus* (Fig. 2) y de otros organismos de la comunidad intermareal (Feder, 1959; Strathmann, 1987). Para encontrar su alimento ésta estrella de mar es capaz de desplazarse más de 10 m (Sanford, 2002).



Figura 2. *Pisaster ochraceus* alimentándose de *Mytilus californianus*. Fotografía de E. Carpizo Ituarte.

Reproducción

La mayoría de los equinodermos se reproducen solo sexualmente y son gonocóricos, es decir tienen sexos separados. Éstos organismos producen gametos que son liberados en la columna de agua donde se lleva a cabo una fertilización o fecundación externa; posteriormente el embrión se convierte en una larva que de acuerdo a su tipo de alimentación puede clasificarse en tres tipos: planctotrófica, lecitotrófica o incubada (Menge, 1975; Lawrence, 1987).

Los asteroideos suelen tener varias gónadas y gonoductos que desembocan en gonoporos localizados en el interambulacro. La mayoría de los miembros de esta clase tiene un par de gónadas por radio y uno o dos gonoporos. El ciclo gametogénico de cada especie está regulado, entre otros factores, por el fotoperiodo, lo que asegura que los organismos de una misma población desoven casi al mismo tiempo (Strathmann, 1987; Brusca y Brusca, 2005). Internamente, el desove se inicia gracias a la acción de un polipéptido denominado 1-metiladenina (1-MA), que se encuentra en el nervio radial del organismo. Este compuesto se utiliza para inducir el desove en condiciones

controladas de laboratorio (Kanatani & Ohguri, 1966; Kanatani & Shirai, 1969; Stevens, 1972; Pearse & Eernisse, 1982; Strathmann, 1987).

Los organismos que pertenecen al género *Pisaster* tienen las gónadas distribuidas a lo largo de los interradios y tienen dos gonoporos por radio (Fig. 3) (Lawrence, 1987). *P. ochraceus* generalmente desova en primavera o verano dependiendo de la latitud a la que habite (Strathmann, 1987; Sanford & Menge, 2007). Se sabe que los desoves inician en forma simultánea a los florecimientos (“blooms”) primaverales de plancton debido a la dependencia de las larvas del alimento disponible. Se cree que desoves en cualquier otra época del año provocarían mayor mortalidad por hambre y un desarrollo más lento, con el consecuente aumento de la exposición de las larvas a la depredación (Menge, 1975).

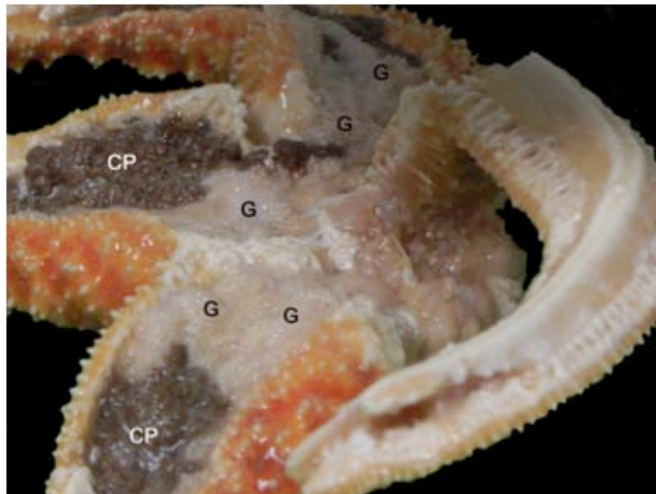


Figura 3. Macho de *Pisaster ochraceus* en la que se observa el ciego pilórico (CP) en café y las gónadas (G) en color crema.

Desarrollo larvario

Los huevos desovados por la mayoría de los equinodermos son isolecitos, con poca cantidad de vitelo. La segmentación es radial y holoblástica. Una vez que el óvulo ha sido fecundado, comienzan una serie de divisiones celulares hasta que el embrión alcanza el estadio de mórula, para posteriormente formar una esfera constituida por células denominada blástula, cuyo interior se denomina blastocele. La blástula suele tener cilios y eclosiona de la membrana de fertilización, por lo que el embrión puede nadar libremente. Posterior a la formación de la blástula comienza la migración de células que dan origen al

arquenteron lo que determina el estadio de gástrula. En esta etapa parte de las migraciones celulares al interior del embrión darán origen a la formación de los celomas para concluir en la organogénesis y la formación del primer estadio larval (Gilbert, 2003; Brusca y Brusca, 2005).

De manera general el tipo de larva a partir de la cual se presume derivaron las formas actuales en equinodermos se denomina dipleurula (larva hipotética) y se caracteriza por la presencia de una banda ciliada continua (Levin & Bridges, 1995; Gilbert, 2003). Las distintas clases de equinodermos tienen larvas morfológicamente diferentes: doliolaria (Crinoidea y Holothuroidea), bipinaria y braquiolaria (Asteroidea), echinopluteus (Echinoidea), ophiopluteus (Ophiuroidea) y auricularia (Holothuroidea) (Levin & Bridges, 1995).

La estrella *P. ochraceus* produce un gran número de ovocitos, una hembra puede desovar hasta 40 millones (Menge, 1975), los cuales se dispersan en la columna de agua y tienen un diámetro aproximado entre 150 y 160 μm (Fig. 4). El ciclo de vida de ésta estrella de mar incluye un periodo larvario planctotrófico y de vida libre, que una vez que alcanza el estadio de competencia, tiende a asentarse en el fondo, aunque durante la etapa larvaria se mueven fácilmente gracias a las corrientes marinas (Strathmann, 1987; McEdward & Janies, 1993).

P. ochraceus tiene durante su desarrollo dos estadios larvarios que se suceden; al primero se le denomina bipinaria (Fig. 5a, b) y posee simetría bilateral, bandas ciliadas (continuas) pre y post-orales que le permiten nadar y alimentarse (Strathmann, 1970), así como pequeños brazos que son extensiones de la pared del cuerpo. El segundo y más avanzado durante el desarrollo, se conoce como braquiolaria (Fig. 6a, b y c) que se caracteriza por la presencia de estructuras especializadas de fijación en el lóbulo pre-oral que son los brazos braquiolares y los discos de sujeción, que son capaces de detectar estímulos para asegurar un buen asentamiento de la larva (Strathmann, 1970; Murabe *et al.*, 2007). En esta especie el estadio de larva braquiolaria solo ocurre después del de bipinaria (Menge, 1975; McEdward & Janies, 1993).

El desarrollo larvario es regulado principalmente por la temperatura y disponibilidad de alimento (Strathmann, 1987). De acuerdo con la literatura, la metamorfosis ocurre entre 76 y 228 días de desarrollo, aunque en cultivos en

laboratorio éste periodo puede variar. Sin embargo, en la actualidad no se cuenta con registros que indiquen la duración de su desarrollo larvario en las poblaciones sureñas de su distribución geográfica, donde las temperatura superficial del océano suele ser mayor. Las pequeñas estrellas recién metamorfoseadas tienen una longitud transversal aproximada de 0.5 mm y maduran al alcanzar un peso húmedo de 70-95 g (Menge, 1975) o un radio mayor de 6.5 cm (Romero, 2007; Romero *et al.*, 2008).



Figura 4. Huevo de *P. ochraceus*. Escala 100 μ m.

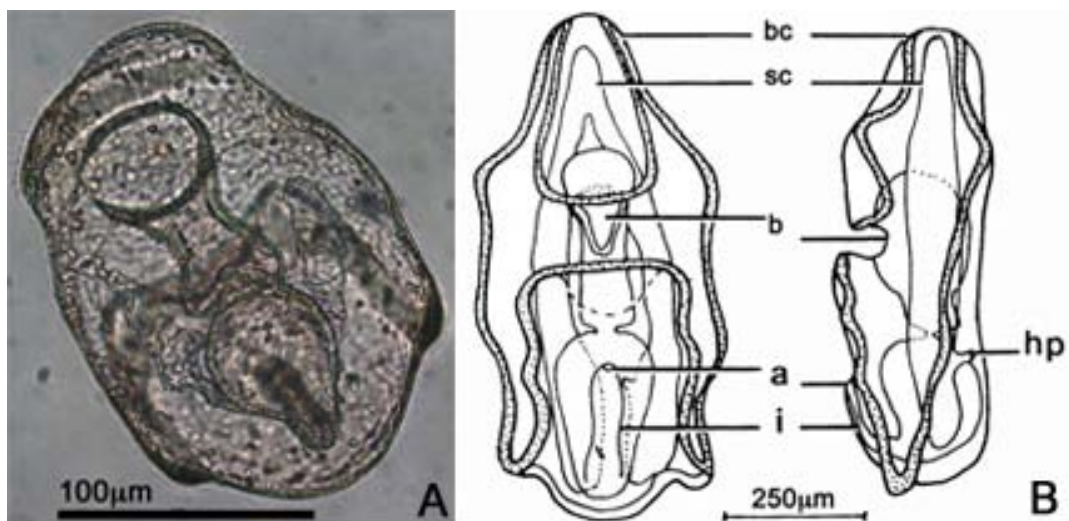


Figura 5. A) Larva bipinnaria temprana de *Pisaster ochraceus*, escala 100 μ m; **B)** esquema de larva bipinnaria, abreviaciones: (a) ano, (b) boca, (bc) banda ciliar, (hp) hidroporo, (i) intestino, (sc) saco celómico, escala 250 μ m (modificada de Strathmann, 1987).

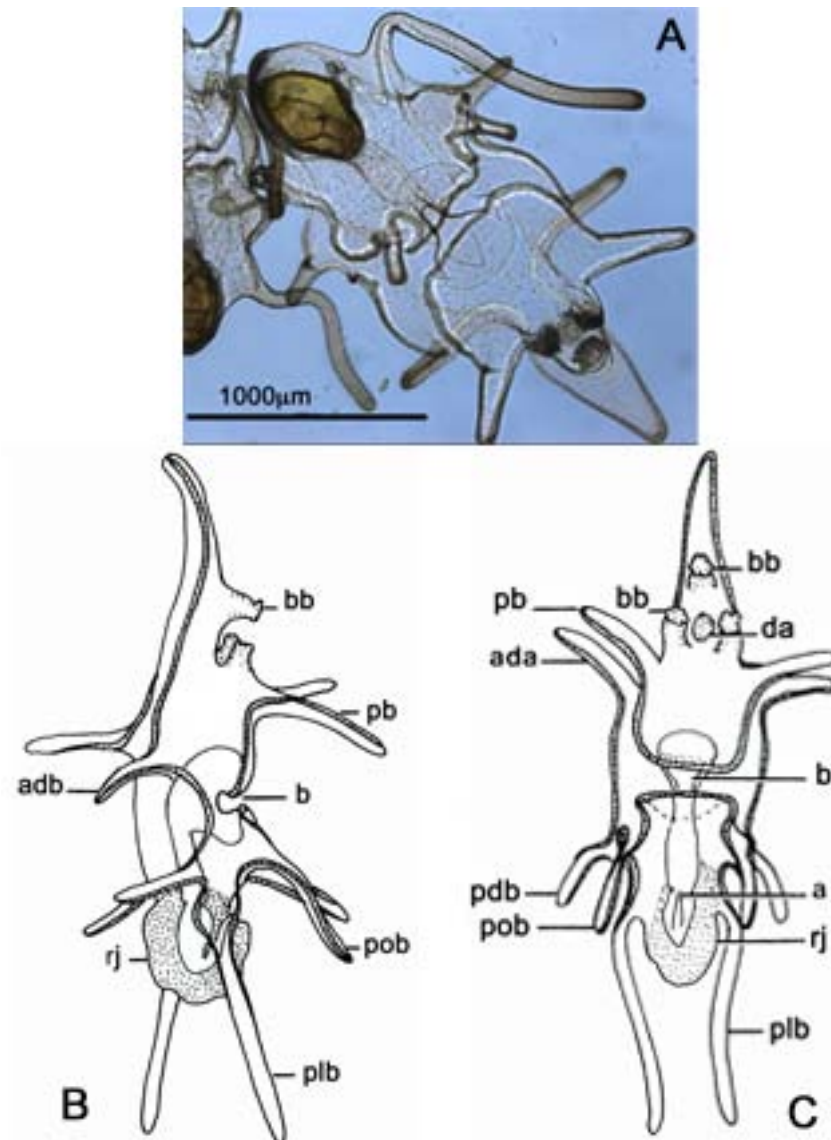


Figura 6. A) Larvas braquiolarias de *Pisaster ochraceus* de 21 días de cultivo, escala 1000 μm ; **B y C)** esquemas de larvas braquiolarias, abreviaciones: (a) ano, (adb) brazo anterodorsal, (b) boca, (bb) brazo braquiolar, (pb) brazo preoral, (pdb) brazo posterodorsal, (plb) brazo posterolateral, (pob) brazo post-oral, (rj) rudimento juvenil; (modificada de Strathmann, 1987).

Metamorfosis

Para todos los organismos que en su ciclo de vida pasan por un estadio larval, la metamorfosis (Fig. 7a y b) implica la pérdida de estructuras específicas de la larva (comúnmente aquellas que le permitían nadar y ser parte del plancton) y la aparición de órganos exclusivos de un organismo juvenil/adulto (McEdward & Janies, 1993; Hadfield *et al.*, 2001; Hadfield & Paul, 2001).

Las larvas solo pueden metamorfosearse si son competentes, esto es, responden a la presencia de estímulos ambientales para iniciar la metamorfosis (Hadfield *et al.*, 2001). El estadio de competencia suele estar determinado por la formación de ciertas estructuras larvales morfológicas específicas (Hadfield *et al.*, 2001), sin embargo cuando no existe un marcador morfológico o biológico confiable que indique el inicio de la competencia metamórfica en una larva, entonces la única forma de saber si una larva ha alcanzado la competencia es inducir la metamorfosis (Pechenik & Heyman, 1987).

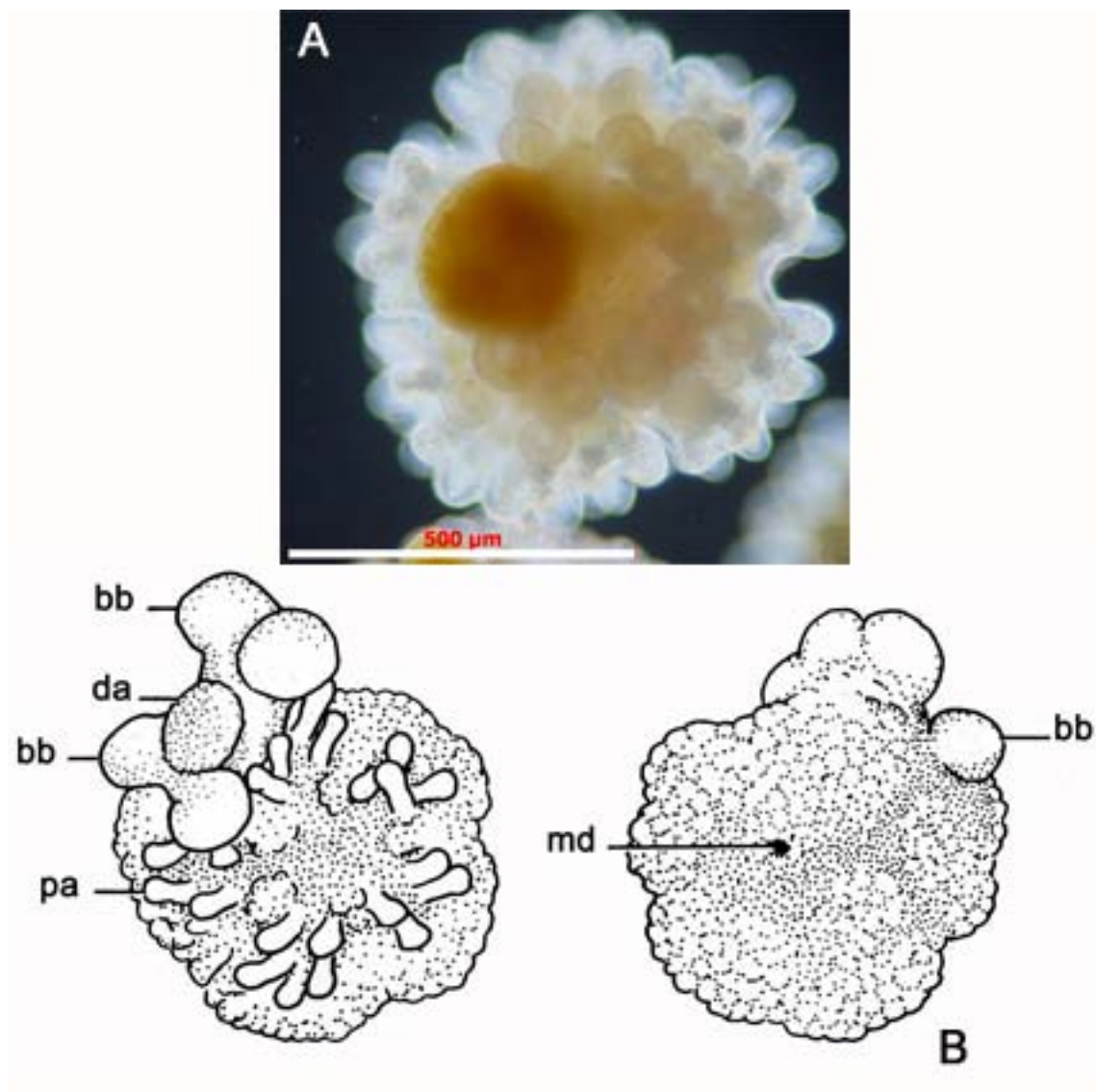


Figura 7. A) Postlarva de *Pisaster ochraceus*. Escala 500μm **B)** esquema de postlarva recién metamorfoseada del género *Henricia*, abreviaciones: (bb) brazo braquial, (da) disco adhesivo, (md) madreporita, (pa) pie ambulacral, tomada y (modificada de Strathmann, 1987).

Se sabe que el asentamiento de las larvas puede ser estimulado mediante la presencia de películas bio-orgánicas. En el mar las superficies pueden formar biopelículas iniciando con la depositación de moléculas orgánicas, después la colonización de bacterias, diatomeas y otros organismos. Mientras la biopelícula se forma, ésta puede ser una fuente dinámica de señales físicas y químicas que le permiten a las larvas identificar un sustrato adecuado para asentarse (Unabia & Hadfield, 1999). Se ha documentado que organismos de diversos fila responden ante la presencia de películas bacterianas metamorfoseándose, algunos de ellos son: Porifera, Cnidaria, Mollusca, Echinodermata, Annelida, Bryozoa y Chordata (Unabia & Hadfield, 1999).

La metamorfosis también puede ser inducida por cationes, como por ejemplo el ion K^+ (Yool *et al.*, 1986). Algunos autores sugieren que una elevada concentración del ion K^+ en el agua despolariza las membranas excitables en el sistema sensorial de la larva provocando una cadena de eventos que culminan en la metamorfosis (Baloun & Morse, 1984; Yool *et al.*, 1986). Estudios hechos usando estímulos eléctricos sugieren que las despolarizaciones de la membrana están involucradas, aunque los cambios morfológicos o fisiológicos que permiten que la larva se metamorfosee aún son desconocidos (Pechenik & Heyman, 1987).

Especie en peligro

P. ochraceus ha sido explotada a lo largo de la costa de BC desde finales de la década de los 60's y actualmente es una pesquería importante para la zona. Los organismos capturados (Fig. 8a) se destinan a la producción de artesanías en toda la República Mexicana (Fig. 8b) y en el extranjero (Diario Oficial, 2004; Lunn *et al.*, 2008).

La pesca no ha sido el único factor que afecta a *P. ochraceus*, recientemente las poblaciones de esta estrella también se han visto afectadas por una enfermedad: sea-star wasting disease (SSWD por sus siglas en inglés) que ha atacado a 20 especies de asteroideos en las costas del Pacífico norte, el patógeno que la causa es un virus de la familia de los Parvoviridae, es altamente infeccioso y la enfermedad generalmente comienza con cambios en el comportamiento, letargo, torsión de los brazos, seguida de lesiones,

autotomía de brazos, pérdida de turgencia y la muerte (Fig. 9) (Hewson *et al.*, 2014).



Figura 8. A) Mapa que muestra las 4 principales ciudades de BC: Tijuana, Rosarito, Ensenada y San Quintín donde *P. ochraceus* es extraída para después ser llevada (flechas negras) a toda la República Mexicana y E. U. A. (Modificado de Lunn *et al.*, 2008). **B)** Captura de *Pisaster ochraceus* en Campo Kennedy, BC. Fotografía de Quetzalli Hernández.

Una mortalidad de estrellas a esta escala puede tener consecuencias importantes en el ecosistema ya que en su mayoría son depredadores tope, por ejemplo, se ha documentado que cuando el número de estrellas disminuye existe un incremento en el número de erizos que provoca sobrepastoreo de los bosques de macroalgas, en consecuencia a los peces que habitan estas zonas les sería más difícil encontrar refugio o alimento (Stokstad, 2014).



Figura 9. Estrellas con SSWD en distintas localidades de la costa de BC.

Justificación

Conocer el desarrollo larvario de los animales marinos nos permite entender mejor como es la historia de vida de éstos *P. ochraceus* es una especie clave en las comunidades intermareales rocosas de Baja California, las cuales albergan una gran diversidad de organismos que son aprovechados para el consumo humano.

Las descripciones que se han hecho sobre el desarrollo embrionario, larvario y la metamorfosis de ésta estrella de mar requieren ser actualizadas, ninguno de los trabajos previos se ha realizado con organismos que habiten en el estado de Baja California en donde los organismos están expuestos a regímenes térmicos distintos de los que experimentan en las costas de E. U. A o Canadá. Éste trabajo contribuye con una serie de fotografías de todos los estadios embrionarios y larvarios de la estrella *Pisaster ochraceus*, así como la descripción morfológica detallada desde la fertilización hasta el asentamiento, obtenidas a partir de cultivos larvarios cuyos progenitores fueron organismos adultos de poblaciones ubicadas en la región más al sur de su distribución geográfica. Al ser un organismo que es explotado en la costa Pacífico de Baja California y que además se vio en peligro debido a que sus poblaciones a todo lo largo de la Costa Este del Pacífico se vieron afectadas por el SSWD, la información que aquí se presenta facilitará seguir con nuevos estudios sobre la especie que involucren determinación de periodos de veda, condiciones para el desarrollo de su cultivo y conectividad entre sus poblaciones, entre otros.

Objetivo general

- Documentar el desarrollo embrionario, larvario y la metamorfosis de la estrella de mar *P. ochraceus* (Brandt, 1835) en condiciones de laboratorio, a partir de adultos obtenidos de una de sus distribuciones más sureñas en donde la temperatura superficial del océano es mayor que las que se presentan en el norte de su distribución.

Objetivos particulares

- Evaluar la efectividad de distintos métodos para inducir al desove a *P. ochraceus*.
- Desarrollar un método de producción de larvas competentes de la estrella de mar *P. ochraceus*.
- Describir los estadios embrionarios y larvarios de la estrella de mar *P. ochraceus*.
- Evaluar posibles inductores de la metamorfosis para larvas competentes de la estrella de mar *P. ochraceus*.

Antecedentes

El estudio de cómo se forma y desarrolla un organismo en su etapa embrionaria y larvaria ha sido una interrogante muy antigua. Aristóteles fue el primero en trabajar con la biología del desarrollo cuando observó el desarrollo de un pollo al romper cada día un huevo de gallina que era incubado artificialmente. En los inicios del desarrollo de ésta disciplina la mayor parte de los trabajos se enfocaban en el estudio de los embriones de vertebrados (Gilbert, 2003).

Durante mediados del siglo XIX las publicaciones comenzaron a hacer énfasis en el estudio y descripción de las formas larvales de los animales. La mayoría de los invertebrados marinos presentan desarrollo indirecto y por lo tanto tienen al menos un estadio larval (Emler *et al.*, 2009).

A principios del siglo XX la mayoría de las publicaciones sobre Biología del desarrollo de equinodermos describían los factores físicos que afectan la fertilización o desarrollo larvario (Loeb, 1902; Garrey, 1919; Lillie & Cattell, 1925). En ese mismo siglo Mortensen en su publicación *Studies of the development and larval forms of echinoderms* (1921), es uno de los pioneros en describir e ilustrar el desarrollo larvario de numerosas especies de equinodermos incluida la larva bipinaria de *P. ochraceus*.

Desde mediados del siglo XX hasta la actualidad se siguen publicando artículos que describen el desarrollo embrionario y/o larvario de equinodermos, algunos de éstos trabajos han sido re-descritos con más detalle y con la ayuda de nuevas y mejores herramientas (Henderson & Lucas, 1971; Strathmann, 1987; Komatsu, 2000; McEdward *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2008; Vellutini & Migotto, 2010).

Los primeros en describir todos los estadios larvales de *P. ochraceus* fueron Fraser y colaboradores (1981) que realizaron cultivos en laboratorio a una temperatura de 12 °C, además elaboraron una descripción de los tiempos en que aparecen los estadios embrionarios y larvarios (hasta bipinaria) de la especie para las costas del Pacífico norte estadounidense. Strathmann (1987) elaboró un resumen de ese trabajo en su libro *Reproduction and Development of Marine Invertebrates of the north Pacific Coast*, en el que también se

incluyen trabajos sobre el desarrollo larvario, reproducción, recolecta, inducción al desove y mantenimiento en el laboratorio de las distintas clases de equinodermos.

Desde el siglo XX hasta la fecha *P. ochraceus* ha sido una de las especies de asteroideos más usada para entender la dinámica del intermareal rocoso y como modelo biológico. Al ser un organismo que habita esta comunidad, dónde es fácil de ubicar y recolectar, numerosos trabajos se han realizado con ésta especie; así se han escrito trabajos que hablan de tópicos variados entre los que se incluyen, estrategias de reproducción y desarrollo larvario (Mauzey, 1966; Schuetz, 1969; Bryan & Sato, 1970; Kanatani & Shirai, 1970; Lacalli 1996; George, 1999; Lowe & Wray, 1999; Shuetz, 2000; Vickery & McClintock, 2000; Sanford & Menge, 2007; Romero, 2007; Romero *et al.*, 2008; Jalali & Crawford, 2011); alimentación (Feder, 1959; Mauzey, 1966; Landenberger, 1968); fisiología (Perry, 1966; Pincebourne *et al.*, 2009); depredación (Sanford, 2002); genética poblacional (Frontana-Urbe, 2005; Harley *et al.*, 2006; Raimondi *et al.*, 2007) y estudios de carácter ecológico (Menge *et al.*, 1994; Garza y Robles, 2010; Fly *et al.*, 2012), entre otros.

Metodología

Recolecta de organismos

Las estrellas de mar fueron recolectadas, en la zona intermareal de Bajamar (diciembre 2012, enero 2014), el Ejido Eréndira (febrero 2013, marzo 2014), Punta Morro y San Miguel (junio 2014) y de la zona submareal de la Isla Todos Santos y de Campo Kennedy (febrero-mayo 2013), en la costa del Pacífico de BC (Fig. 10). Entre 10 y 30 estrellas fueron recolectadas por sitio y al finalizar los experimentos se les regresaba al mar.



Figura 10. Mapa que muestra las localidades de recolecta marcadas con viñetas amarillas.

Los organismos fueron extraídos por medio de buceo autónomo (Fig. 11) y búsqueda directa debajo de las rocas en la zona intermareal (Fig. 12).

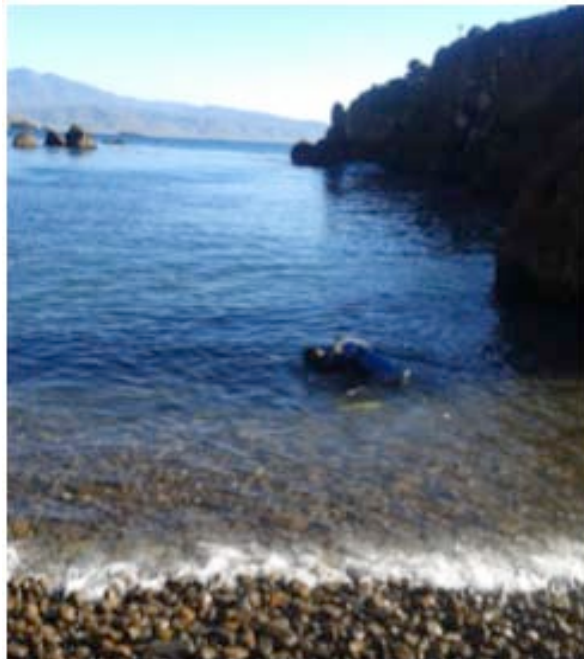


Figura 11. Recolecta por buceo autónomo en la localidad de Campo Kennedy.
Fotografía de Quetzalli Hernández.



Figura 12. Recolecta por búsqueda directa en el intermareal del Ejido Eréndira.
Fotografía de Quetzalli Hernández.

Las estrellas se trasladaron al Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) en hieleras sin agua en las cuales se formaron capas de organismos cubriéndolos con ice gel, para bajar su metabolismo y con macroalgas para mantenerlas húmedas durante el traslado (Fig. 13).



Figura 13. Grupo de estrellas recolectadas en Campo Kennedy, colocadas en una hielera con ice gel y macroalgas para su transporte. Fotografía de Quetzalli Hernández.

Mantenimiento de adultos en tanques

Las estrellas fueron colocadas en 3 estanques con aireación y un flujo aproximado de 50 ml/seg de agua de mar con una temperatura promedio de 17 ± 2 °C. Los tanques se limpiaron dos veces por semana para extraer restos de materia orgánica del fondo.

Las estrellas se alimentaron con distintas especies de mejillón (*Mytilus* spp.) o con trozos de pescado que fueron colocados cerca de ellas, procurando que siempre tuvieran alimento disponible.

Inducción al desove

Para inducir el desove de los organismos se emplearon dos métodos, en el primero se trató de estimular la liberación de gametos mediante “shock” térmico

y en el segundo se usó el compuesto 1-metiladenina (1-MA*). A continuación se describe lo realizado en ambos.

★ “Shock” térmico.

Se realizaron dos pruebas para intentar hacer desovar a los organismos sin el empleo de sustancias químicas. En la primera se sometió a 3 grupos de 11 organismos a un cambio súbito de temperatura de 10 a 23 °C, cada recipiente contenía 20 L de agua marina (AM) y pasados 30 min a 10 °C se les cambió a otro recipiente con agua a 23 °C y se les dejó ahí 30 min más. Durante la segunda prueba de inducción al desove se separaron 5 organismos y se les colocó en tinas de 5 L, se les mantuvo con AM a 10 °C por 30 min y se les hizo un cambio repentino de AM a 26 °C por 30 min.

★ Fecundación *in vitro*, expulsión de gametos óvulos usando 1-MA.

Para poder iniciar con el desove se preparó una solución con una concentración de 10^{-4} M del compuesto 1-MA y agua de mar filtrada hasta $1\mu\text{m}$ e irradiada con luz UV (AMF). Posteriormente una hembra se disectó y se le removieron los 4 pares de gónadas (había perdido un brazo). A cada gónada se le cortó un pequeño fragmento para tener un total de 10. Cada fragmento se colocó en una caja de Petri y se le añadieron 3 ml de la solución de 1-MA para permitir que los ovocitos fueran expulsados.

Después de 90 min de reposo con la solución de 1-MA, se les agregó a los óvulos obtenidos 1 ml de espermatozoides concentrados de una macho que desovó espontáneamente.

Una vez transcurridos 30 min el exceso de espermatozoides fue removido enjuagando con AMF, para así evitar la acumulación de materia orgánica en descomposición y la contaminación por virus o bacterias.

Los embriones obtenidos de la fertilización se colocaron en 10 cubetas de 5L con aireación continua. Se revisaron dos días después de la fertilización para observar si había presencia de larvas.

* El 1-MA para esta prueba se obtuvo por donación del Dr. José Luis Stephano Hornedo (FC-UABC).

★ Primer desove (29 de mayo 2013)

Se les inyectó a 10 organismos adultos en la cavidad celómica 3 ml de 1-MA. Las estrellas se colocaron en 10 cubetas de 5L con AMF. Según un estudio hecho por Benítez-Villalobos *et al.* (2006) con la estrella de mar *Marthasterias glacialis*, el tiempo aproximado en el que comenzaron a desovar los machos fue de 20 min y 40 min para las hembras. En el caso de *P. ochraceus* se les dejó desovar por 3 hrs para permitir que todos los huevos y espermatozoides fueran expulsados.

Debido a la gran cantidad de ovocitos expulsados por una sola hembra, se hicieron 3 fertilizaciones. Para todas ellas los gametos fueron colocados en una jarra de 3 L y mezclados cuidadosamente; una vez agregada la solución con espermatozoides, 1 ml de esperma concentrado se diluyó en 9 ml de AMF, se les dejó reposar por 1 hr, después de la cual se tomó una pequeña muestra para comprobar la presencia de la membrana de fertilización en el microscopio compuesto.

Una vez hecho lo anterior se retiró el exceso de espermatozoides al enjuagar con AMF. La densidad de larvas colocada en cada tanque cónico fue de 3 a 4 larvas/ml (Fig. 14).



Figura 14. Tanques cónicos de 40 L en los que fueron colocados los embriones para que continuaran su desarrollo hasta el estadio de postlarva.

★ Segundo desove (3 de marzo 2014)

En este desove se inyectaron a 15 organismos con 5 ml de 1-MA. Transcurridos 90 min después de la inyección, comenzaron a desovar las primeras estrellas (Fig. 15). Se tomó una muestra de los gametos obtenidos y se observó al microscopio que estuvieran en buen estado para la fertilización (movilidad en espermatozoides y ruptura de la vesícula germinal en óvulos).



Figura 15. Adultos inyectados con 1-MA el 3 de marzo de 2014.

Transcurridos 15 min los gametos y embriones que pudieran encontrarse se filtraron a través de una malla de 80 μm , se concentraron en una jarra de 3 L y se distribuyeron en 5 cubetas de 20 L; diariamente se les hizo el cambio de agua (al 100%) y se alimentaron con la microalga *Rhodomonas* sp. a una concentración de 5000 cél/ml (200ml), hasta que alcanzaron el estadio larval de bipinaria. A partir de este periodo, las larvas se mantuvieron en un tanque cónico de 40 L a una densidad de 4 larvas/ml. Una vez en el tanque la cantidad de alimento proporcionada varió desde 5000 cél/ml hasta 10000 cél/ml (250 a 500 ml) en los estadios más avanzados.

★ Tercer desove (15 de junio 2014)

La metodología usada en éste desove no varió mucho de la empleada en la anteriormente descrita. Se inyectaron 8 organismos con 5 ml de 1-MA cada uno y se les colocó en cubetas de 8 L con AMF; 90 min después se les aplicó una segunda inyección de 5 ml y comenzaron a desovar casi inmediatamente un macho y una hembra. Se tomó una muestra de los gametos obtenidos y se observó al microscopio que estuvieran en buen estado para la fertilización, de la misma forma que en desoves anteriores. Se comprobó la movilidad en espermatozoides y la ruptura de la vesícula germinal en los óvulos.

Después de 30 min se retiró el exceso de espermatozoides enjuagando cuidadosamente; una vez realizada la fertilización los embriones se distribuyeron en 2 cubetas de 20 L. Se realizaron cambios de agua diariamente al 100% hasta que alcanzaron el estadio de bipinaria temprana.

Mantenimiento de larvas en el laboratorio

★ Larvas obtenidas en la prueba A con 1-MA (maduración *in vitro* de los ovocitos)

Las larvas obtenidas por este método se mantuvieron en cubetas de 5 L a una temperatura de $16^{\circ} \pm 1$ °C por 7 días. Durante ese tiempo se les alimentó con una concentración de 5000 a 10000 cél/ml de *Rhodomonas* sp. y se les cambió el agua diariamente; además, se tomaron muestras cada 2 días para documentar el desarrollo. A los 7 días de desarrollo la totalidad de las larvas se separaron en 2 tanques cónicos. Una vez en los tanques la alimentación siguió siendo la misma y fue de 5000 a 10000 cél/ml de *Rhodomonas* sp. siguiendo con el método descrito por Salas-Garza *et al.* (2005) en el desarrollo larvario de erizo rojo.

★ Larvas obtenidas en el primer desove (29 de mayo 2013)

Los embriones obtenidos por este método fueron dispuestos en 3 tanques de fondo cónico de 40 L con AMF y aireación constante. La temperatura promedio de este desarrollo larvario fue de 16.5 °C \pm 1 °C.

Las larvas se alimentaron diariamente con la misma concentración de alimento que en la prueba mencionada anteriormente.

- ★ Larvas obtenidas en el segundo desove (3 marzo 2014) y tercer desove (15 de junio 2014)

Cuándo las larvas alcanzaron el estadio de bipinaria temprana se les colocó en un tanque cónico de 40 L con AMF y aireación constante a una densidad de 4 larvas/ml para el cultivo del 3 de marzo y de 1.2 larvas/ml para el cultivo del 15 de junio. La cantidad de alimento proporcionada fue la misma concentración de alimento que en la prueba mencionada anteriormente. Los cambios de agua se hicieron cada tercer día.

La temperatura de cultivo promedio fue de $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el cultivo del 3 de marzo y de $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el cultivo del 15 de junio.

Documentación del Desarrollo larvario

- ★ Larvas obtenidas en la prueba A con 1-MA (maduración *in vitro* de los ovocitos)

Durante el desarrollo del cultivo, cada vez que se realizaron los cambios de agua se tomaron 500 μl de muestra en un tubo Eppendorf para observar posteriormente las larvas en el microscopio compuesto Axioskop motorizado (Carl Zeiss). Después de documentar en vivo a las larvas, se procuró regresarlas a su recipiente de cultivo correspondiente.

- ★ Larvas obtenidas en primer desove (29 de mayo 2013)

En cada cambio de agua se tomaron 3 muestras de 500 μl las cuales fueron fijadas con 2-3 gotas de formol al 4%.

En el laboratorio estas muestras fueron fotografiadas con un microscopio Axioskop de luz invertida Carl Zeiss.

- ★ Larvas obtenidas en el segundo desove (3 marzo 2014)

Para las fotografías y conteos larvales se tomaron muestras de 100 μl (entre 15 y 20 larvas). Cada larva observada fue fotografiada con la ayuda de un microscopio invertido (Carl Zeiss) y medida usando el programa Axiovision versión 4.7. Las medidas de longitud total de cada larva fueron hechas midiendo desde el extremo posterior del cuerpo larval hasta el extremo anterior sin incluir los brazos, cuando estaban presentes. El ancho se midió haciendo una línea transversal que atravesaba el cuerpo por el límite del esófago y el

estómago y llegaba al extremo derecho e izquierdo de la larva, únicamente se usó para ejemplares que estuvieran en posición dorsal o ventral, nunca lateral.

Durante cada recambio de agua los tanques eran revisados para detectar postlarvas. A las postlarvas encontradas, se les despegó cuidadosamente del tanque y se les colocó en un recipiente con aireación para su posterior cuidado y mantenimiento. Las postlarvas fueron fotografiadas usando un microscopio Axioskop motorizado y una cámara Sony Cyber Shot DSC-S75.

★ Embriones y larvas obtenidos en el tercer desove (15 de junio 2014)

Para las fotografías y mediciones de cada estadio embrionario se tomaron muestras de 50 µl cada 30 min hasta que se alcanzó el estadio de mórula y cada 6 horas hasta que se alcanzó el estadio de gástrula temprana.

En el caso de las larvas se tomó una muestra de 100 µl. Cada larva observada fue fotografiada con la ayuda de un microscopio invertido marca Carl Zeiss y una cámara Sony Cyber Shot DSC-S75. Posteriormente las larvas se midieron usando el programa Axiovision versión 4.7.

Inducción a la metamorfosis

Una vez que las larvas tuvieron un rudimento juvenil bien desarrollado (cultivos 29 de mayo 2013 y 3 de marzo 2014), se realizó un experimento para inducirlas a la metamorfosis utilizando como inductor KCl a diferentes concentraciones. La evaluación de la respuesta a inductores naturales y artificiales en equinodermos, en particular equinoideos, es una práctica común en el laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del IIO, en donde se ha documentado al menos para 3 especies de erizos de mar regulares y uno irregular.

★ Larvas obtenidas en primer desove (29 de mayo 2013)

Para inducir a la metamorfosis a las larvas que tenían un rudimento bien desarrollado se probaron distintas concentraciones de KCl.

En este experimento, se incluyó un tratamiento control en agua de mar filtrada e irradiada con UV (sin KCl) para evaluar el porcentaje de metamorfosis en ausencia del inductor. En este control las larvas permanecieron hasta el final

del periodo experimental, el mismo tiempo que en los tratamientos experimentales. Asimismo, se incluyeron 3 tratamientos experimentales correspondientes a concentraciones de KCl de 10, 30 y 40 mM. Para cada tratamiento se incluyeron 6 réplicas y se cuantificó el porcentaje de metamorfosis a las 48 horas después de agregar el KCl.

A los datos obtenidos se les realizó una prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y una ANOVA no paramétrica: Kruskal-Wallis (KW) 95% de confianza para determinar si al menos un tratamiento era distinto al resto. Posteriormente se hizo un análisis de Wilcoxon de suma de rangos (WLX) con un porcentaje de confianza del 95% para establecer cual o cuales eran los tratamientos distintos. Los detalles de los análisis estadísticos se presentan en el **anexo I**.

★ Larvas obtenidas en el segundo (desove 3 marzo 2014)

Estos experimentos se realizaron con larvas que tenían un rudimento bien desarrollado (roseta bien formada, Fig. 16) de 57 y 80 días de cultivo. En ambos se incluyó un tratamiento control con agua de mar filtrada e irradiada con UV (sin KCl) y 4 tratamientos experimentales de KCl a una concentración de 10, 20, 30 y 40 mM, cada uno con 6 réplicas. Las larvas fueron expuestas al compuesto por 48 horas para después realizar la evaluación. Los análisis de datos fueron los mismos empleados en el experimento de inducción antes mencionado y se muestran a detalle en el **anexo I**.

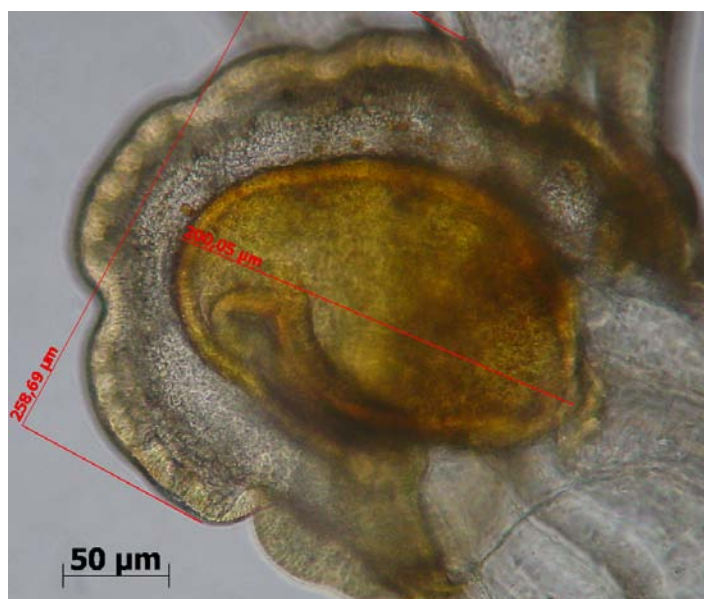


Figura 16. Acercamiento al rudimento bien desarrollado de una larva braquiolaria.

La hipótesis estadística de ambos experimentos fue la siguiente:

Hipótesis

H_0 : Todos los tratamientos tienen el mismo efecto para inducir la metamorfosis de las larvas de *P. ochraceus*.

H_1 : Al menos un tratamiento tiene un efecto diferente para inducir la metamorfosis en las larvas de *P. ochraceus*.

Resultados

Inducción al desove, documentación del desarrollo embrionario y larvario.

★ Shock térmico

En ninguna de las dos pruebas de shock térmico los organismos expulsaron gametos, a pesar de que se sabe que algunos equinodermos responden ante cambios de la temperatura del agua expulsando sus gametos (ver: Jiaxin, 1990; James, 1994; Dabbagh *et al.*, 2011).

Durante la segunda prueba de inducción por shock térmico se aumentó el rango de variaciones de temperatura y se disminuyó el tiempo entre cambio. Al no tener respuesta, se decidió utilizar el 1-MA que según la literatura funciona contrayendo los ovarios y desintegrando la sustancia cementante entre los ovocitos para permitir su liberación por los gonoductos (Kanatani & Ohguri, 1966; Kanatani & Shirai, 1969; Shirai *et al.*, 1981).

★ Primer desove (29 de mayo de 2014).

Al inyectar a 10 organismos adultos con 3 ml de 1-MA, seis expulsaron sus gametos (cuatro fueron machos y dos hembras). Aunque el cultivo fue heterogéneo las últimas BR_{c/r} se metamorfosearon en el día 60 de cultivo. Las fotografías y descripciones de los embriones y larvas obtenidas se muestran a continuación.

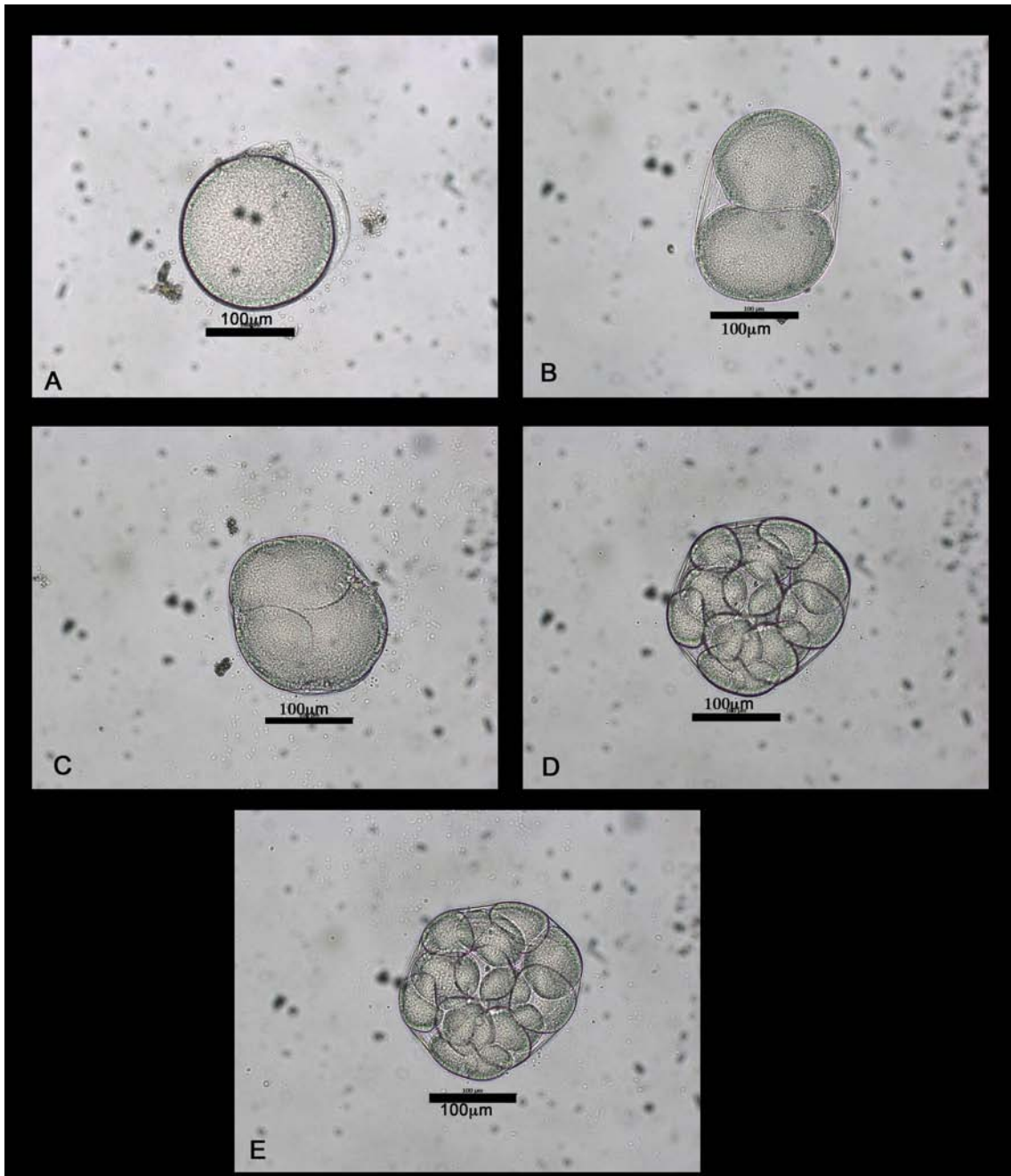


Figura 17. Día cero. Embriones. A) ovocito, B) embrión de 2 células, C) embrión en división, D y E) embrión en estadio de 16 células. Fotografías tomadas con un ocular de 20x.

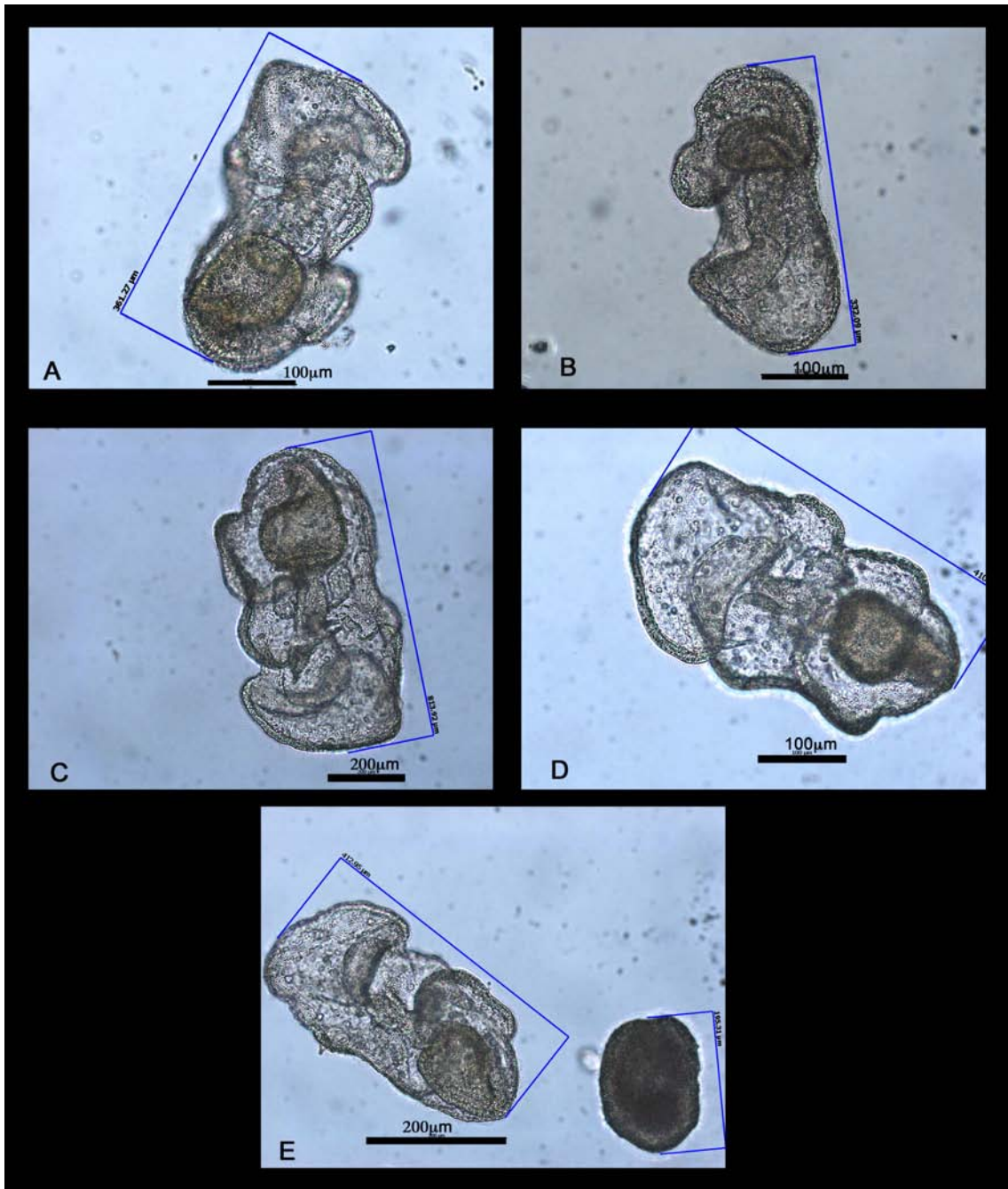


Figura 18. Día 3. Larvas bipinarias (A-E). Se observan larvas bipinarias con más de 300μm de longitud. Fotografías tomadas con un ocular de 20x.

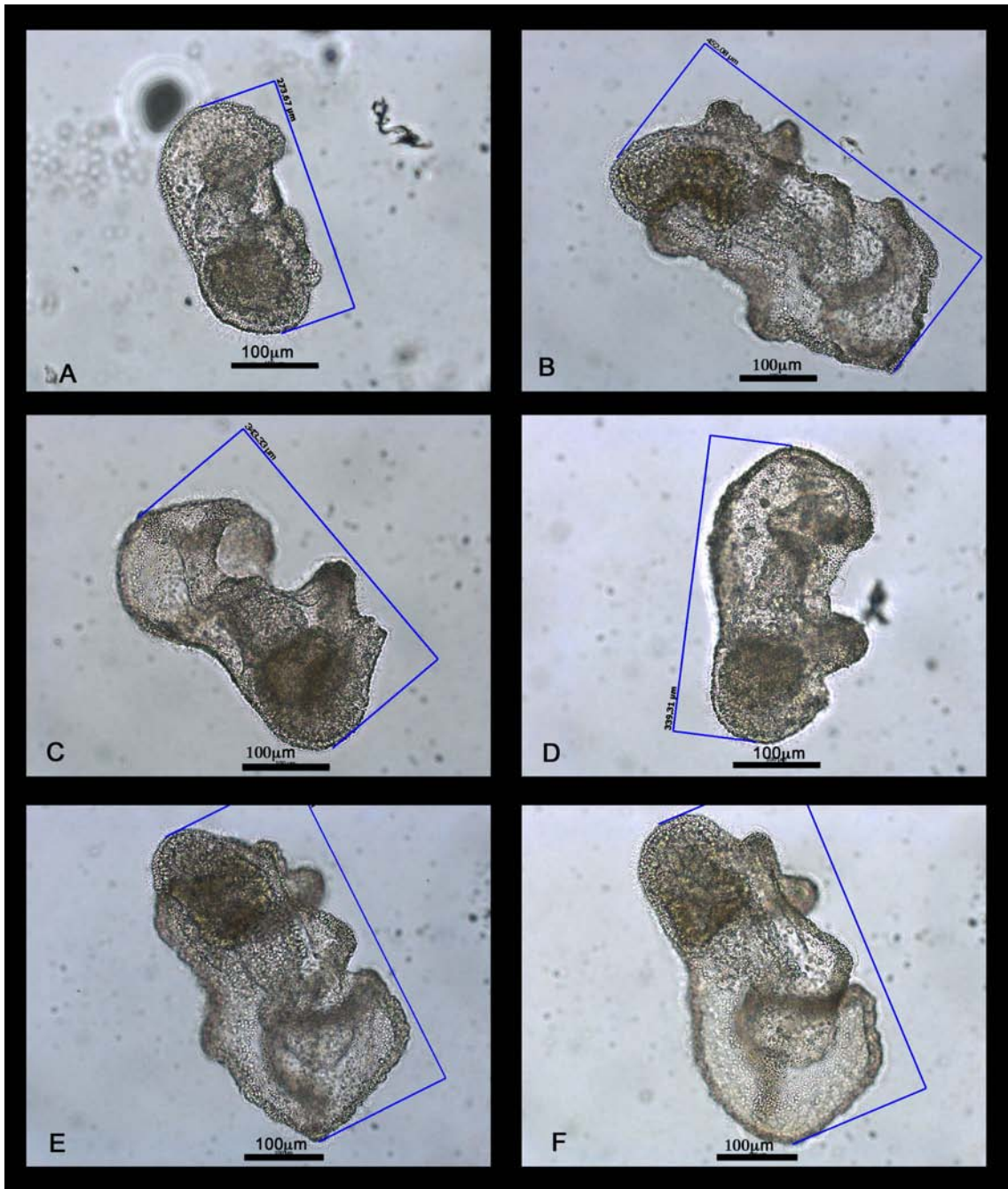


Figura 19. Día 10. Larvas bipinarias (A–F). Fotos tomadas con ocular de 20x.

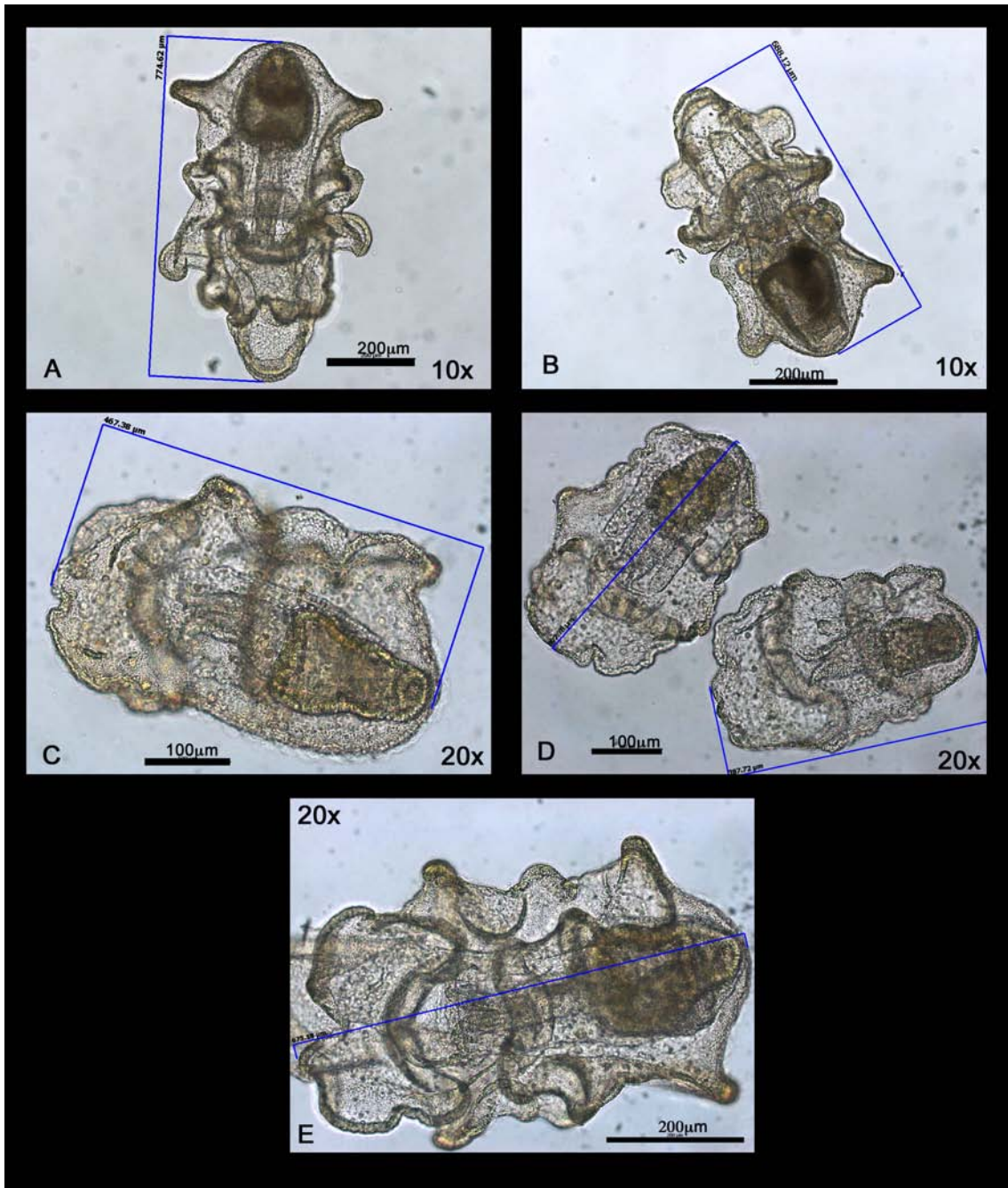


Figura 20. Día 18. Larvas bipinarias (A-E). Las larvas tienen pequeñas prolongaciones que se convertirán en los brazos cuando llegue a ser una larva braquiolaria.

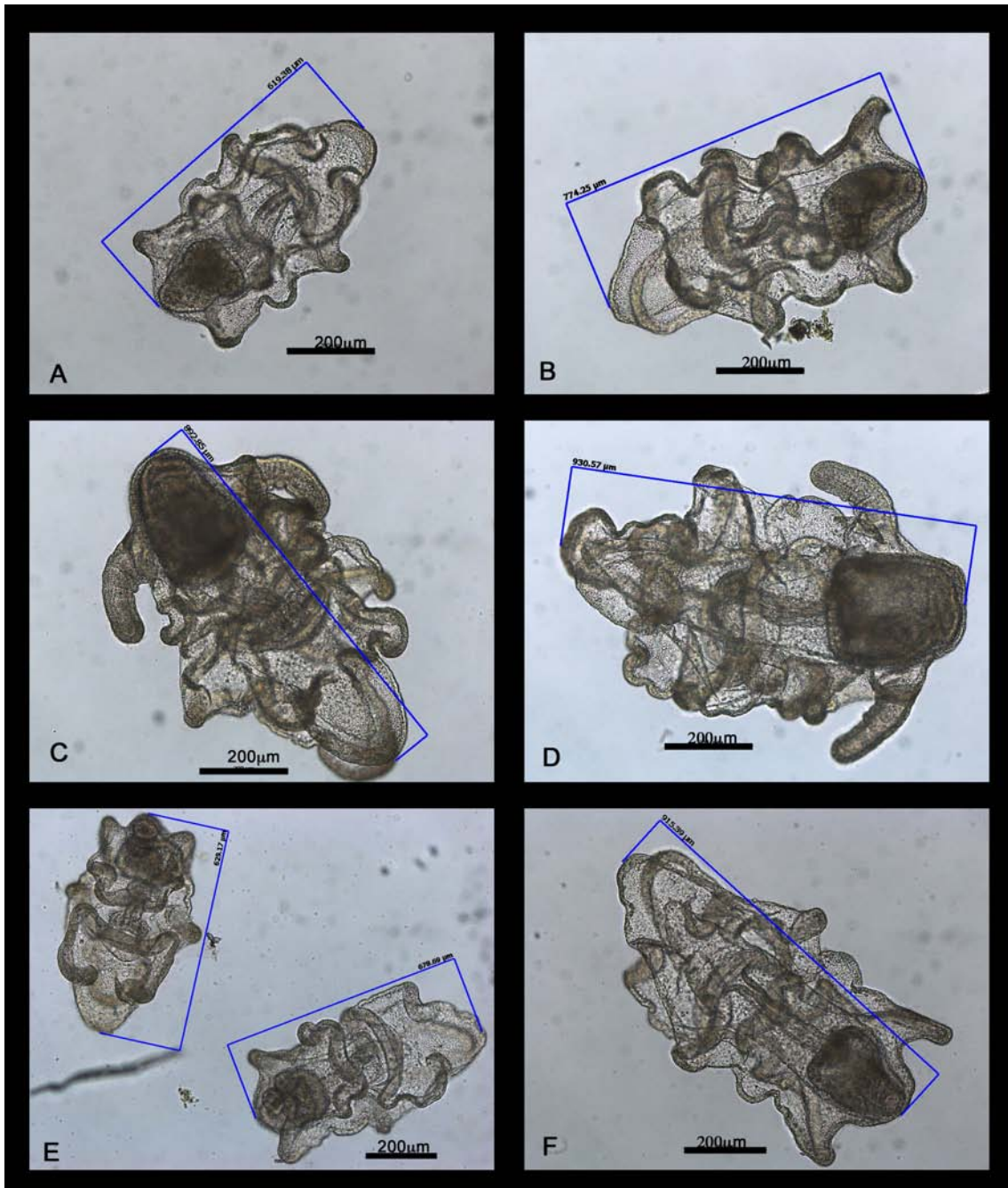


Figura 21. Día 25. Se observan aún larvas bipinarias, pero comienzan a aparecer larvas braquiolarias, las cuales se distinguen por la presencia de estructuras de sujeción como los brazos. Fotografía tomadas con un ocular de 10x.

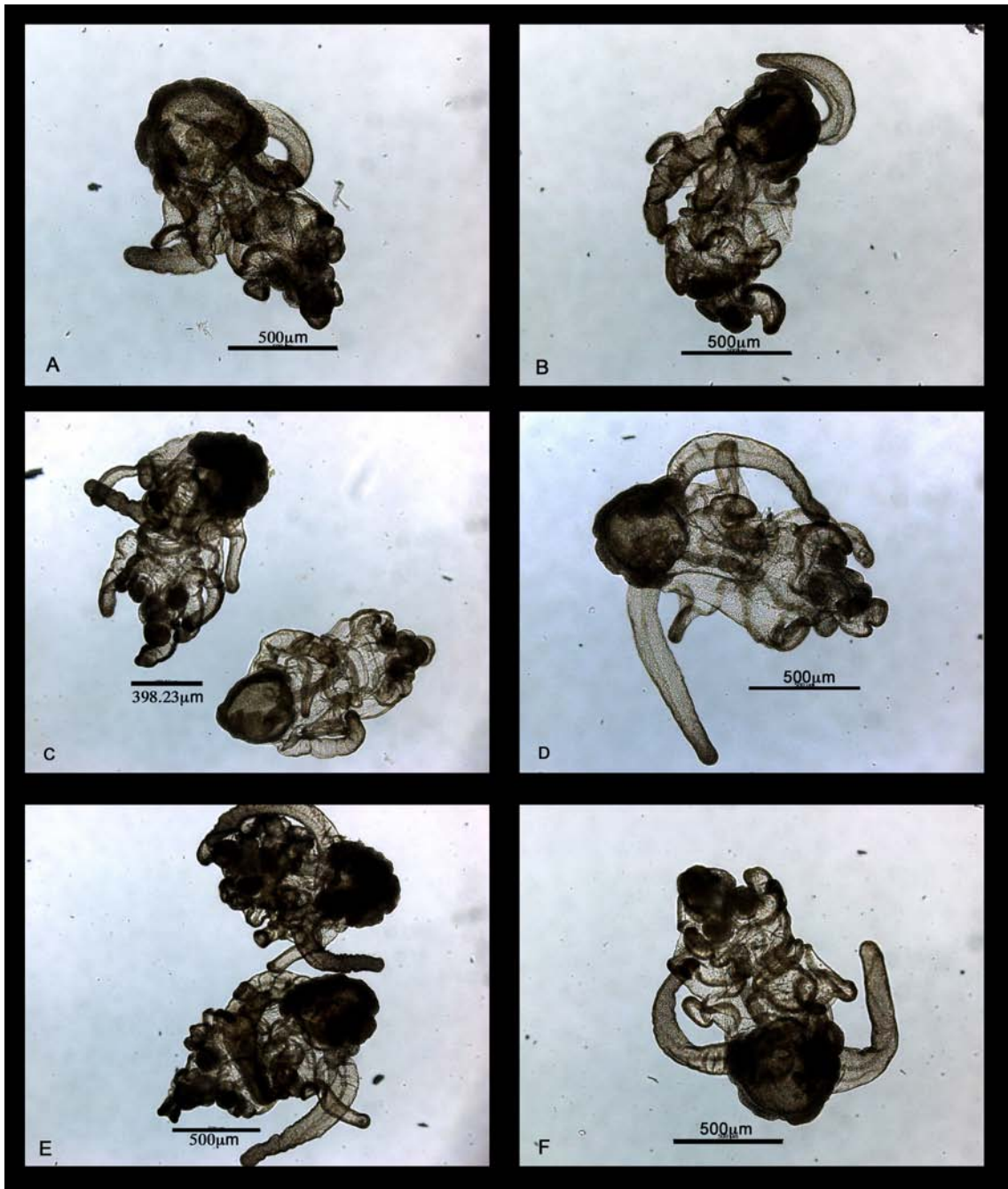


Figura 22. Día 33. Larvas braquiolarias (A-F), día 33 de cultivo, las cuales se distinguen por la presencia de discos sectores y largos brazos que les permiten “palpar” el fondo para fijarse.

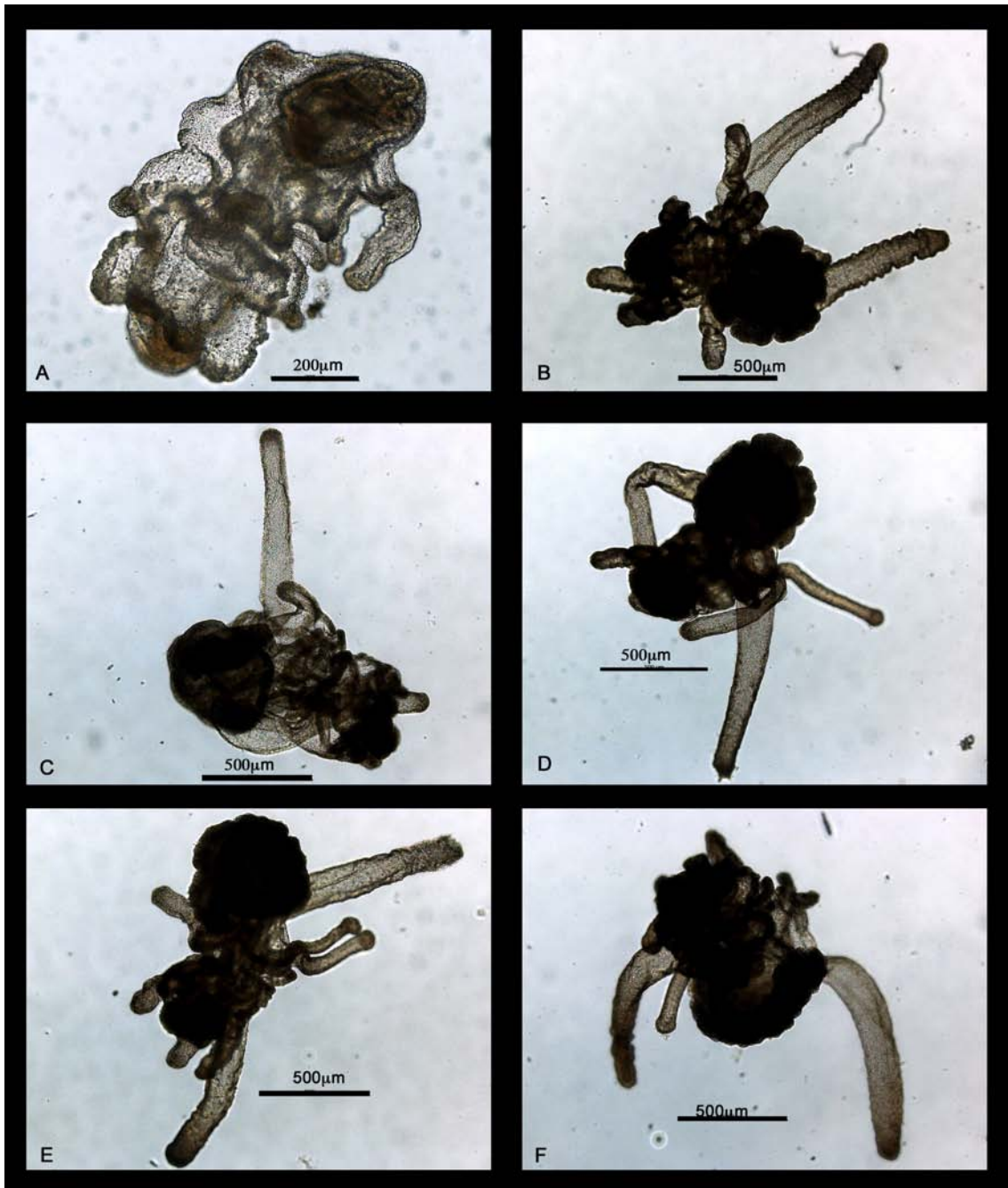


Figura 23. Día 39. La fotografía A muestra una larva bipinnaria, lo que significa que el desarrollo no es homogéneo en todo el cultivo. En las demás imágenes se observan larvas braquiolarias (B-F), todas ellas con un rudimento bien desarrollado.

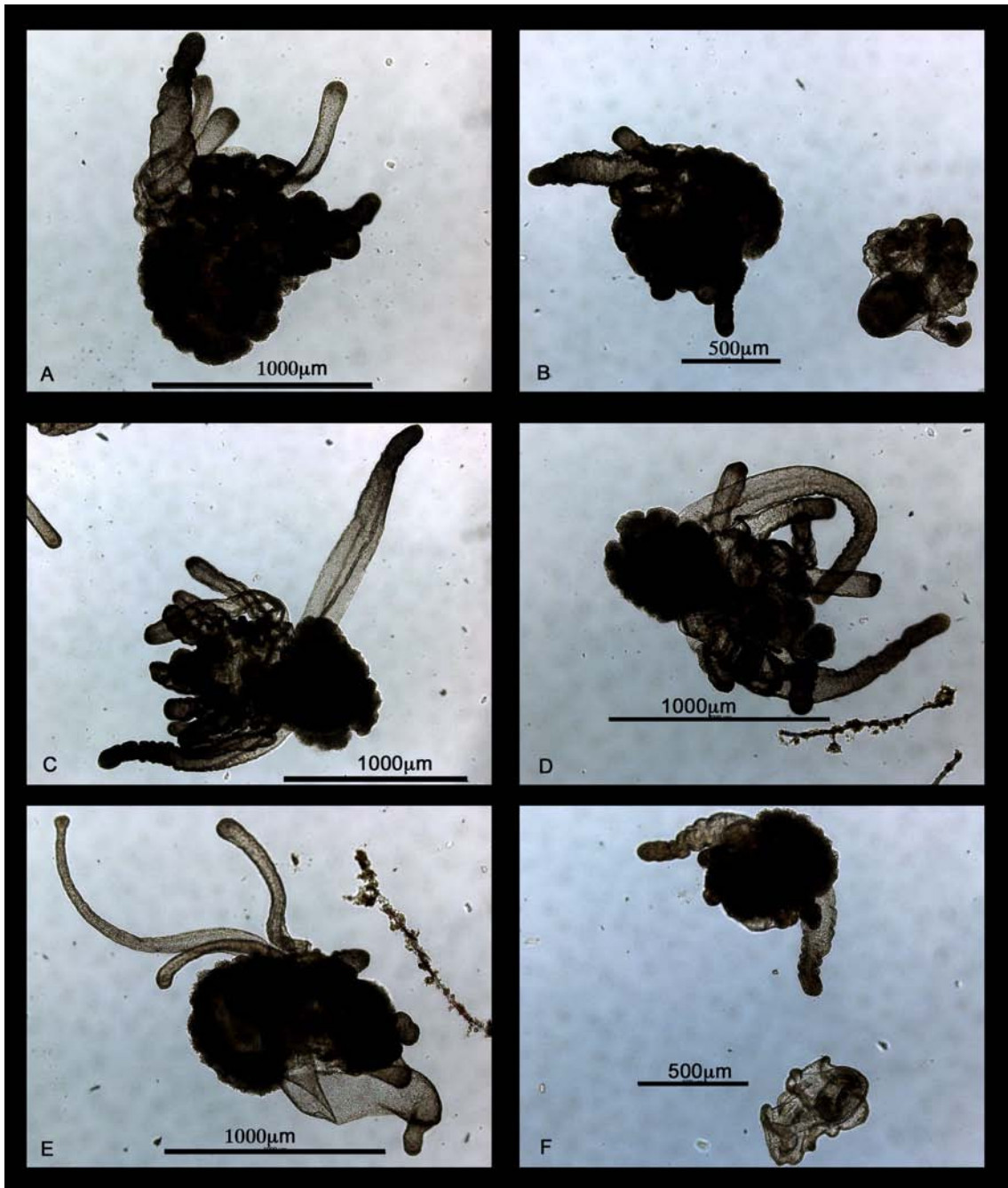


Figura 24. Día 45. En las imágenes B y F se observan 2 larvas bipinarias. Larvas braquiolarias (A, B, C, D, E y F); las larvas de esta edad fueron usadas para el experimento de inducción a la metamorfosis. Escala 500µm, fotos B y F; 1000µm para fotos A, C, D y E.

★ Segundo y tercer desove (3 de marzo y 15 de junio 2014).

En el segundo desove dos hembras y cinco machos desovaron (Fig. 17) y los embriones obtenidos fueron el producto de la fertilización de los huevos de una sola hembra con los espermatozoides de un macho. La temperatura promedio de éste cultivo fue de $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. En la tabla 1 se muestran los tiempos a los cuales se presentó cada estadio larval.

En el tercer desove, de los cinco organismos que se inyectaron solo dos de ellos expulsaron gametos y correspondieron a un macho y una hembra. El cultivo se desarrolló a una temperatura promedio de $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

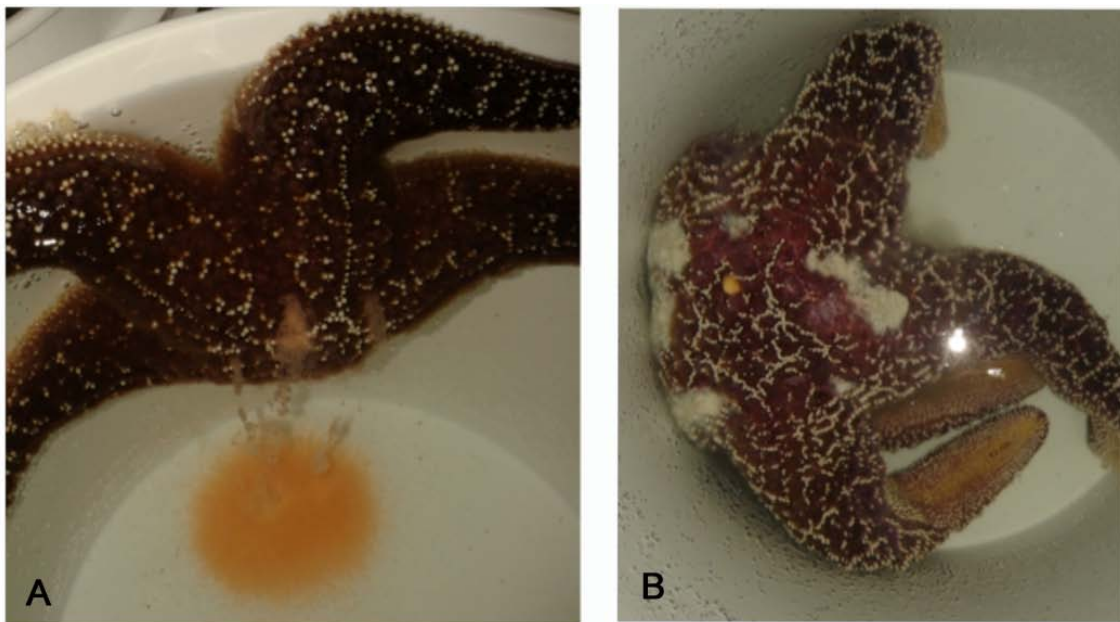


Figura 25. Hembra (A) y macho (B) de *Pisaster ochraceus* desovando.

Tabla 1. Tiempos del desarrollo larvario de *P. ochraceus*, cultivadas en laboratorio a una temperatura de $18^{\circ} \pm 1$ °C. Abreviatura N/A: no aplica.

Evento o estadio de desarrollo	Tiempo de cultivo (días)	Porcentajes
Aparición de larva bipinaria temprana. Larvas con capacidad para alimentarse	3	67.2%
Bipinaria media	10	62.2%
Bipinaria tardía	13	52.48%
Braquiolaria con rudimento	25	82.4%
Aparecen las primeras Post-larvas	30	N/A
Braquiolaria con rudimento bien desarrollado	35	58.4%
Larvas competentes, disminuyen consumo de alimento	76	N/A
Braquiolaria con rudimento bien desarrollado	78	92%

Con las observaciones obtenidas del desarrollo, se establecieron 11 estadios embrionarios: primera división celular (2 células o blástomeros), segunda división celular (4 células), tercera división celular (8 células), cuarta división celular (16 células), quinta división celular (32 células), sexta división celular (64 células), séptima división celular (128 células), mórula, blástula, gástrula temprana y gástrula tardía; 5 estadios larvales: bipinaria temprana (BE), bipinaria media (BM), bipinaria tardía (BT), braquiolaria sin rudimento desarrollado ($Br_{s/r}$), braquiolaria con rudimento bien desarrollado ($Br_{c/r}$) y un estadio post-larval denominado postlarva (PL).

El primer estadio embrionario o primera división celular se observó a los 20 min después de la fertilización (temperatura $21^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$). Los tiempos de aparición de cada estadio posterior fueron los siguientes: 4 células 40 min después de la fertilización (DF), 8 células 60 min DF, 16 células 90 min DF, 32 células 130 min DF, 64 células 180 min DF, 128 células 230 min DF y mórula 8 horas DF. El estadio de blástula fue observado 14 hrs DF, gástrula temprana 24 hrs DF y gástrula tardía 31 hrs DF.

A continuación se enlistan las características morfológicas principales que distinguen a cada estadio larval.

Larva BE:

- ★ Larvas con cuerpo reniforme.
- ★ Formación del sistema digestivo tripartita: esófago-estómago-intestino.
- ★ Aparición de la boca y de la capacidad para alimentarse.
- ★ Lóbulos oral y anal presentes.
- ★ Comienza la formación del somatocele.

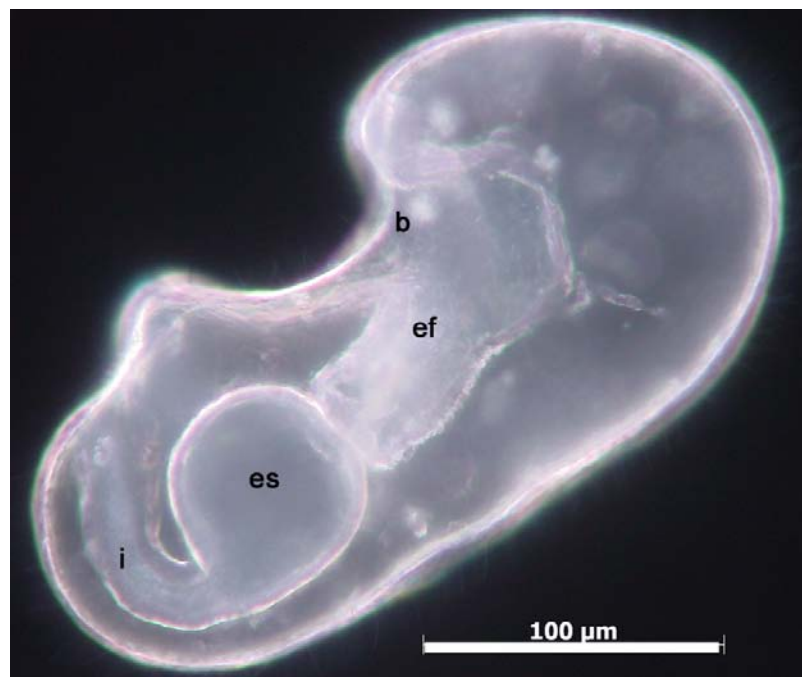


Figura 26. Larva en estadio BE se puede observar la boca (b) y el sistema digestivo tripartita compuesto por: el esófago (ef), estómago (es) e intestino (i), éste estadio larval se caracteriza también por ser reniforme.

Larva BM:

- ★ Larva con cuerpo en forma de horquilla.
- ★ Comienzan a aparecer los lóbulos post-oral, pre-anal y los laterales.
- ★ Lóbulos anterior y posterior muy evidentes, forman pliegues.
- ★ Somatocele ha migrado más de la mitad de la longitud total del cuerpo y ha alcanzado la altura del inicio de la boca.

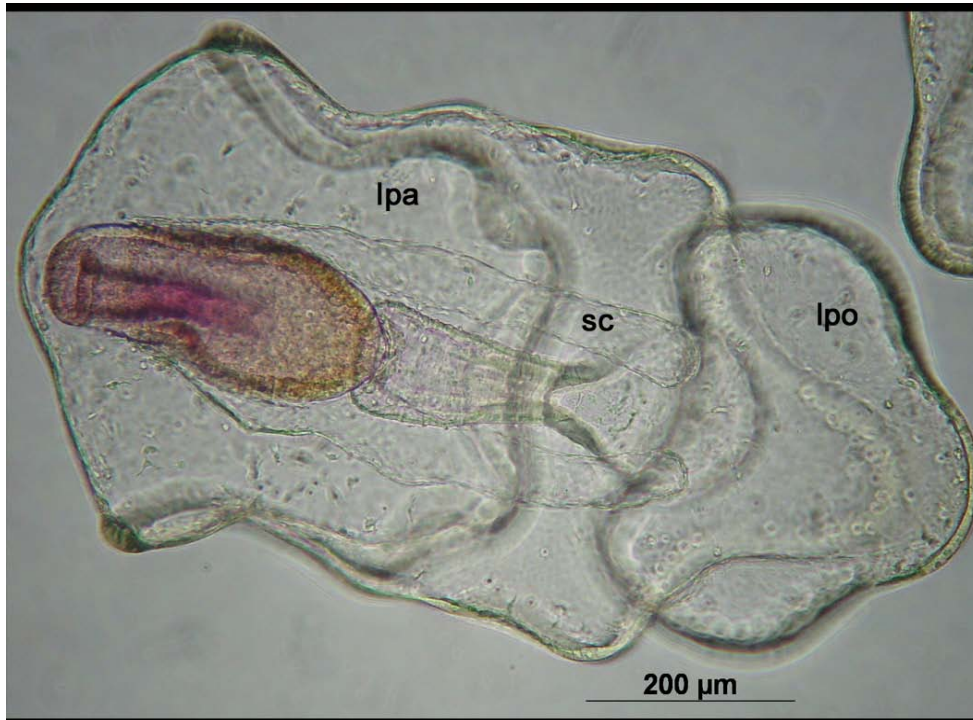


Figura 27. Larva en estadio BM se puede observar como se comienzan a formar los lóbulos post-orales (lpo) y pre-anal (lpa). En éste estadio el somatocele (sc) ya ha migrado y ha alcanzado la altura de la boca.

Larva BT:

- ★ Desarrollo completo del somatocele
- ★ Formación del axiocele en la región anterior.
- ★ Aparición de los brazos que no tienen soporte calcáreo
- ★ Formación de proyecciones ventrales y dorsales del lóbulo pre-oral.

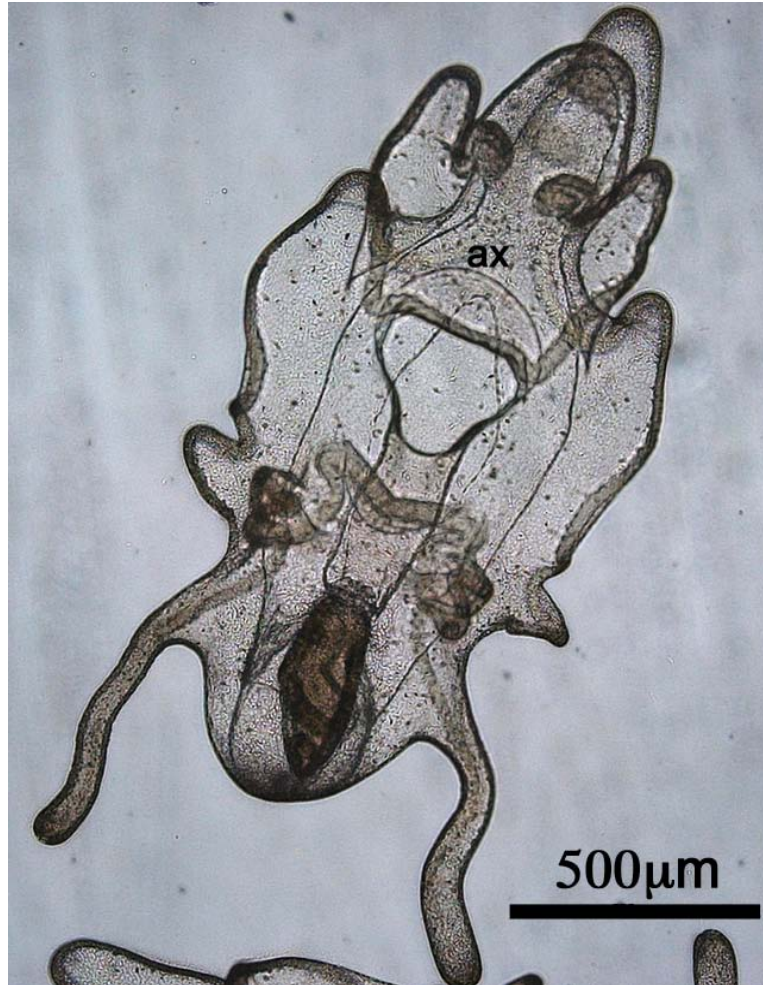


Figura 28. Larva en estadio BT, el somatocele ha migrado en su totalidad y se han fusionado formando el axiocele (ax), se comienzan a observar los brazos (sin soporte calcáreo) de la larva.

Larva Br_{s/r}:

- ★ Aparición de brazos braquiolares.
- ★ Formación de disco suctor.
- ★ Comienza la formación de los brazos preorales, posterodorsales y posteroventrales.

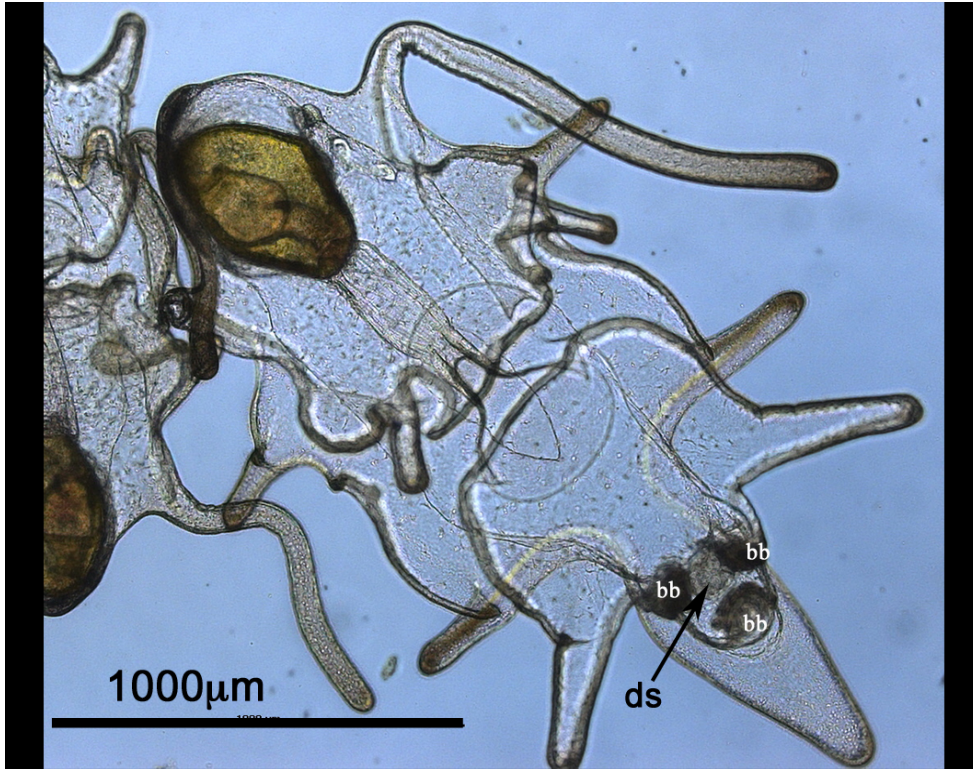


Figura 29. Larva en estadio BR_{s/r}, se han formado los brazos braquiolares (bb) y el disco suctor (ds), el rudimento juvenil no está presente aún.

Larva Br_{c/r}:

- ★ Desarrollo del rudimento juvenil en la región posterior izquierda del cuerpo larval.
- ★ 10 brazos larvales bien formados.
- ★ Se observan espículas en el rudimento.
- ★ Rudimento juvenil formando en el que se observa la formación de cinco protuberancias que serán los brazos de la estrella joven.
- ★ Larvas capaces de reaccionar a estímulos que induzcan la metamorfosis.

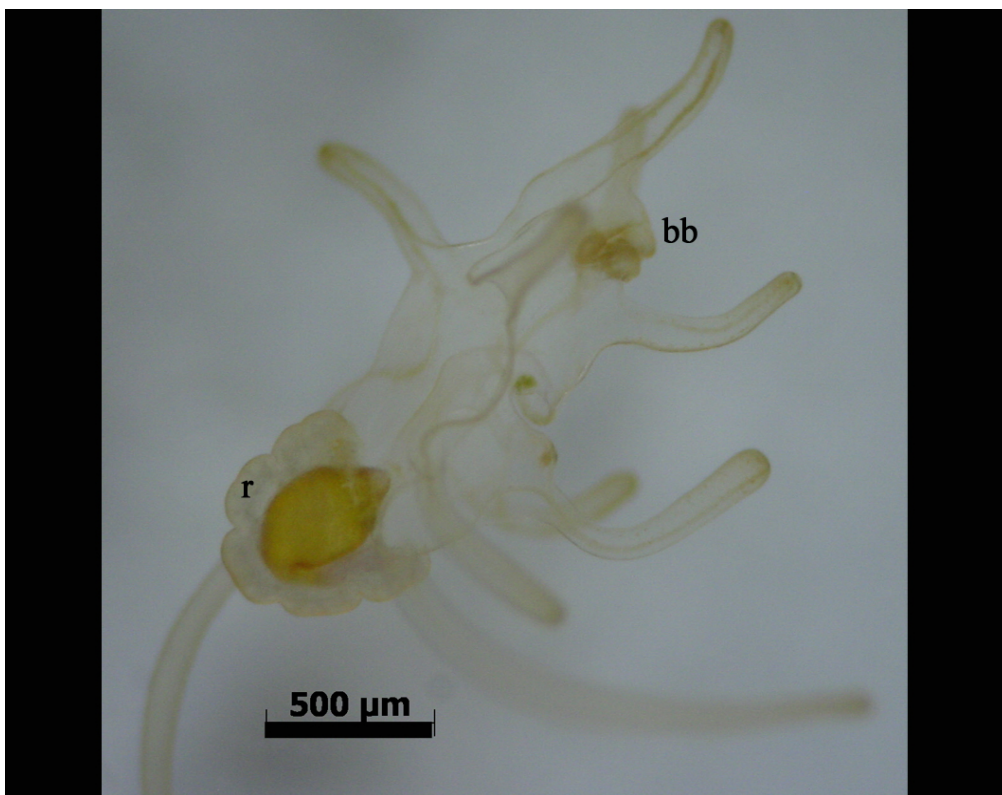


Figura 30. Larva en estadio BR_{c/r}, se ha formado el rudimento juvenil en la región posterior izquierda del cuerpo larval, las larvas en éste estadio tiene 10 brazos larvales.

PL:

- ★ Forma del cuerpo estelada.
- ★ Algunos organismos pueden tener remanentes del disco suctor o brazos braquiolares.
- ★ Pérdida del cuerpo larval.
- ★ Formación de brazos.
- ★ Desarrollo de pies ambulacrales.
- ★ Capacidad de movimiento sobre el sustrato.

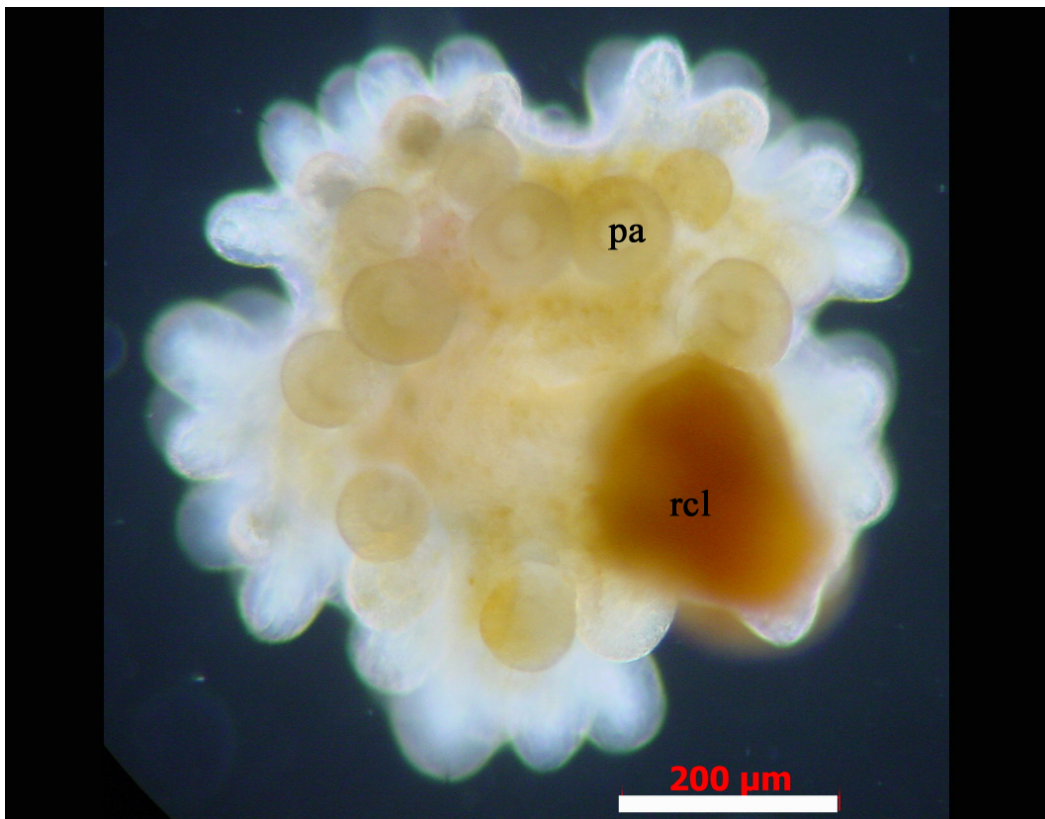


Figura 31. Post-larva, en éste estadio se a reabsorbido el cuerpo larval y solo quedan remanentes (rcl), hay presencia de pies ambulacrales (pa) y comienzan a desarrollarse los futuros brazos de la estrella juvenil.

Las fotografías y descripciones de los embriones y larvas obtenidos durante el segundo y tercer cultivos se muestran a continuación:



Figura 32. Embriones en distintos estadios de desarrollo I. **A**, embriones recién fecundados se observa la membrana de fertilización y el conjunto de espermatozoides intentando entrar; **B**, embrión en primera división celular con 2 células; **C** embriones en segunda y tercera división celular de izquierda a derecha primer embrión con 4 células o blastómeros y segundo embrión con 8 células; **D**, embrión de 16 células; **E**, embriones con 32 células; **F**, embrión con 64 células; **G**, mórula, se observan una gran cantidad de blastómeros pero es imposible contabilizarlos, en éste estadio todavía todos los embriones conservan la membrana de fertilización; **H** e **I** blástula se observan el nuevo rearrreglo celular.

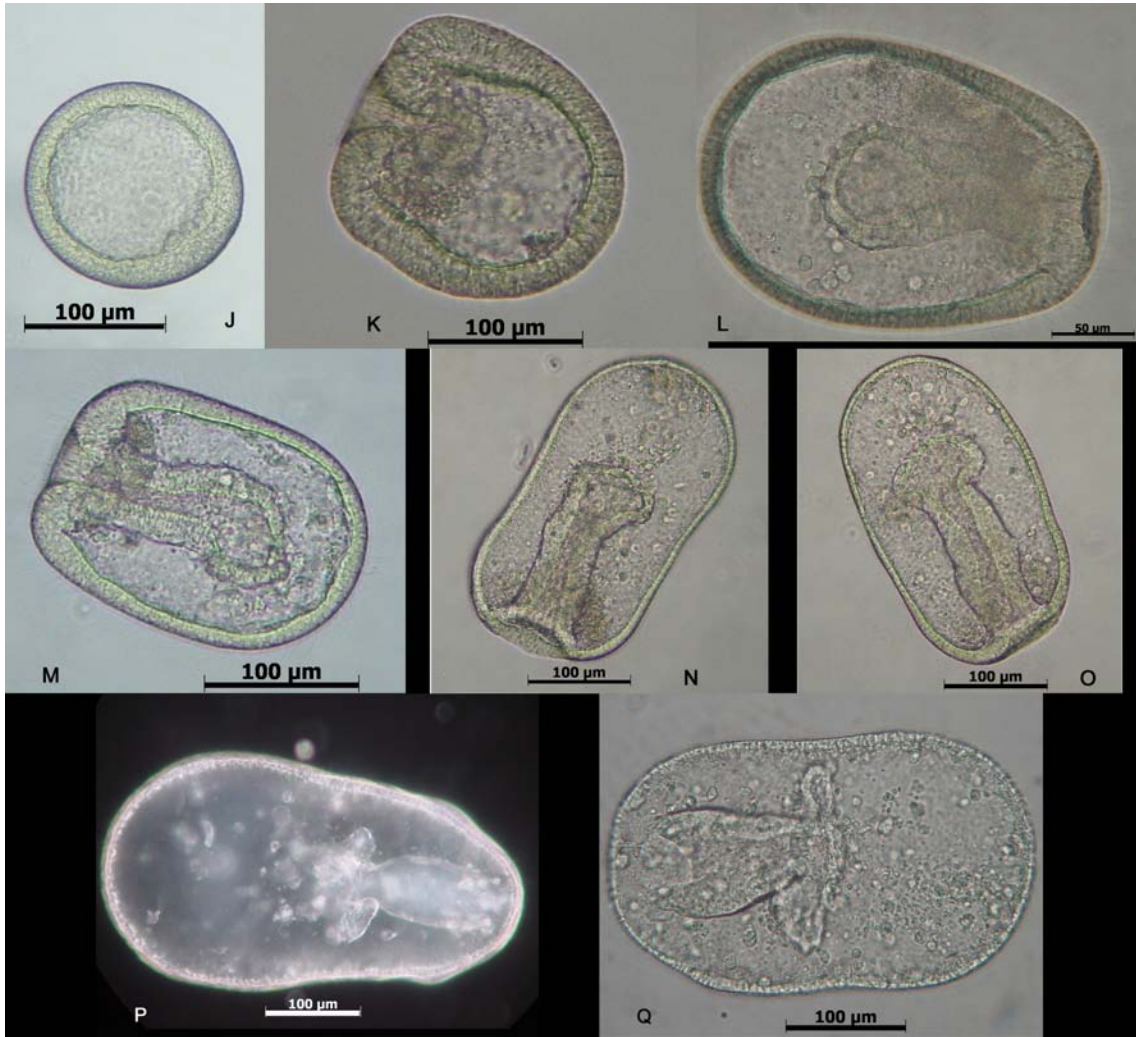


Figura 33. Embriones en desarrollo II. J, Blástula, las células del mesenquima comienzan a aglutinarse en la zona que formará el aroporo; K, Gástrula temprana, comienza la evaginación celular a través del líquido celómico y el arquéteron es evidente; L, M y N, Gástrulas medias, el arquéteron ha migrado más de la mitad de la longitud total del embrión y comienza a alongarse; O, P y Q, Gástrulas tardías el arquéteron forma una T y empiezan a formarse los vestigios de lo que será la boca de la larva.

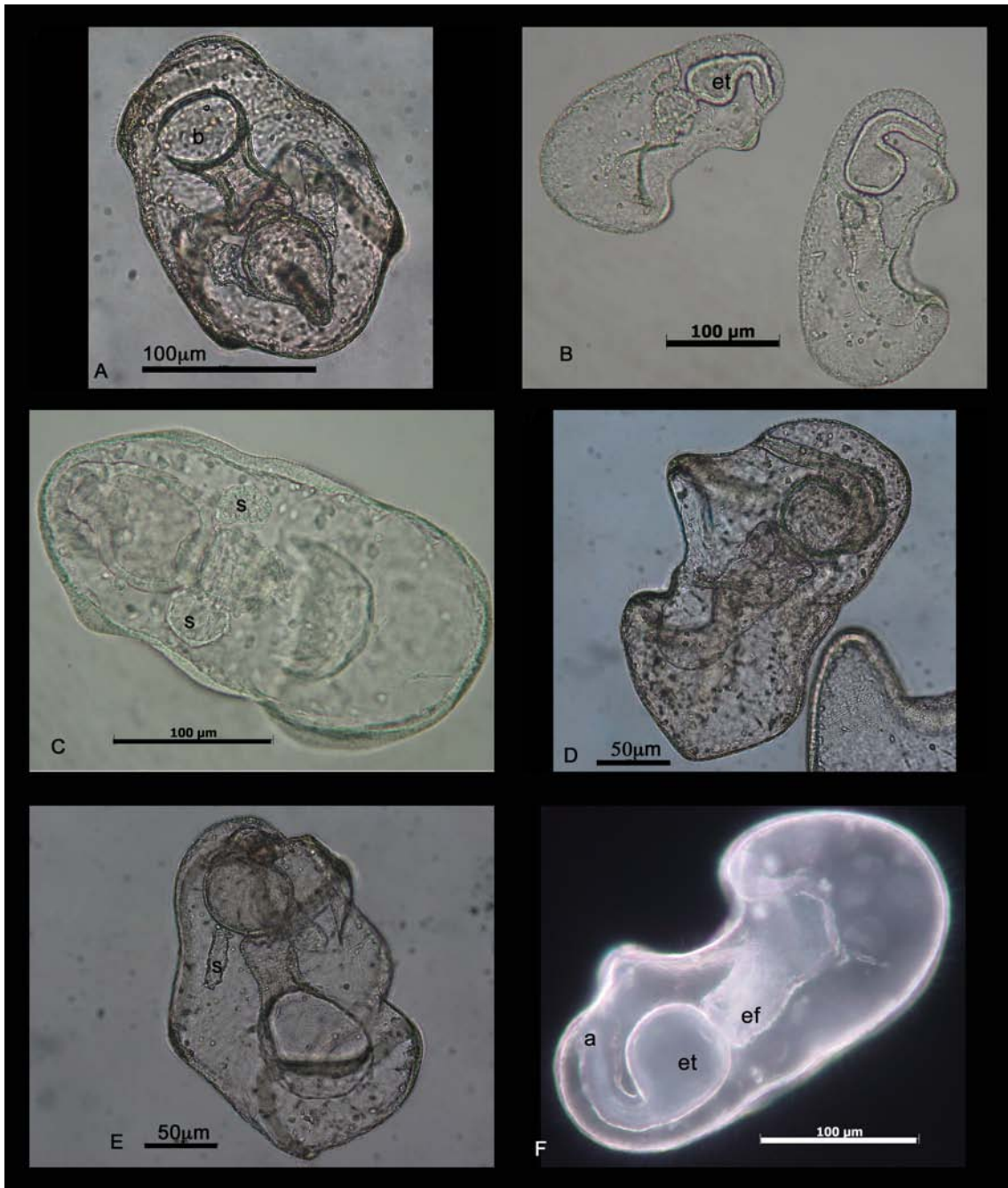


Figura 34. Larvas en estado de bipinaria temprana. Se ha formado el sistema digestivo tripartita y son capaces de alimentarse. En las fotografías **A** y **E** se observa a las larvas en una vista ventral donde se aprecia todo el contorno de la boca; **B**, **D** y **F** muestran vistas laterales de las larvas en éstas imágenes se aprecian claramente el esófago, estómago e intestino; **C**, fotografía de una vista dorsal de la larva donde se puede ver en forma circular a cada lado del esófago al celoma formándose. **Abreviaturas:** **b** (boca), **a** (ano), **es** (estómago), **ef** (esófago), **s** (somatocele).

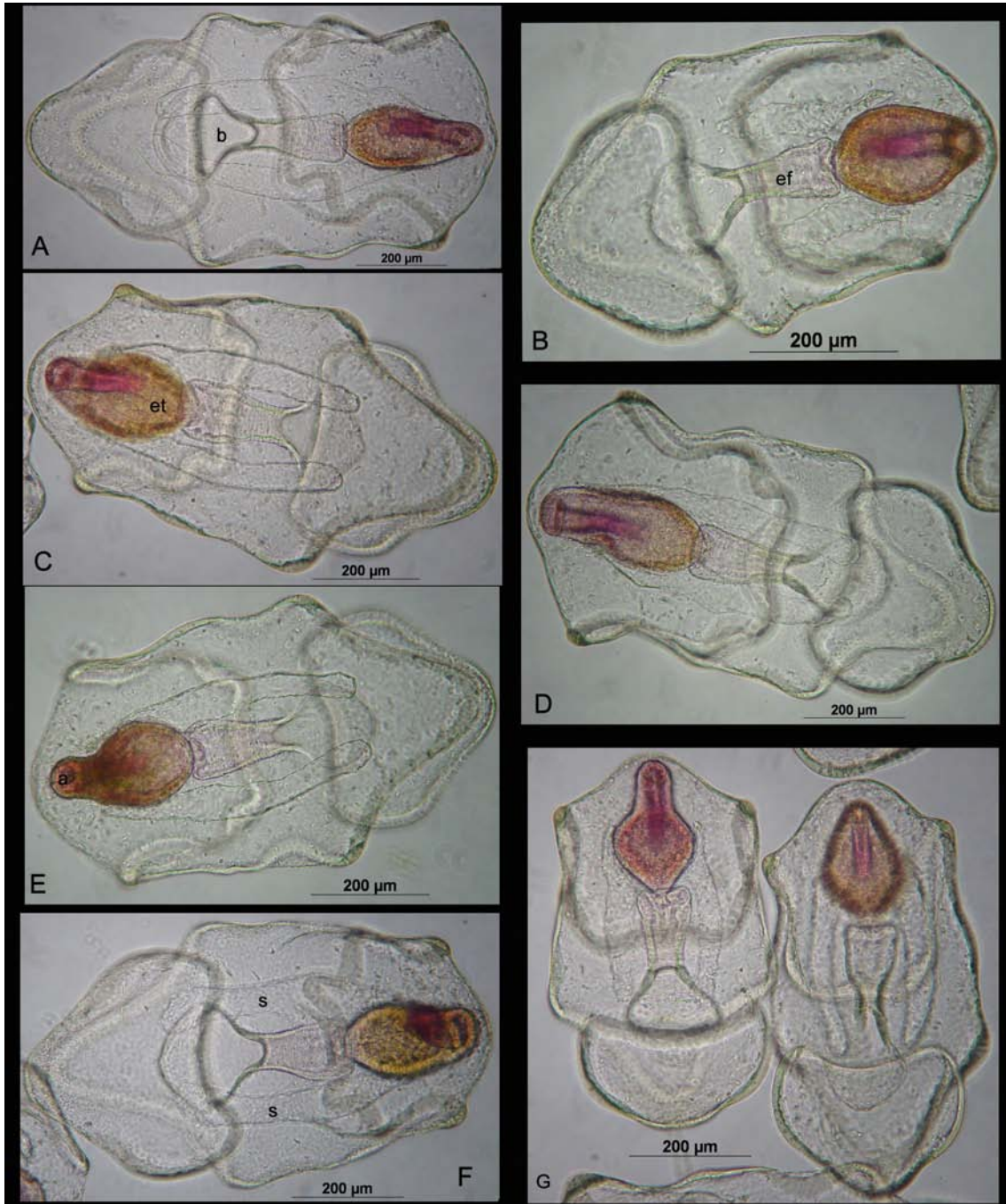


Figura 35. Larvas en estadio de bipinnaria media. Las larvas en éste estadio presentan los lóbulos posterior y anterior muy bien desarrollados, por lo que su cuerpo tiene forma de horquilla. Los lóbulos laterales comienzan a aparecer, fotografías **A**, **B**, **D** y **E**. Fotografías **A**, **C**, **D**, **E**, **F** y **G** el somatocel ha migrado hasta la altura de la boca o más (anterior). **Abreviaturas:** **b** (boca), **a** (ano), **es** (estómago), **ef** (esófago), **s** (somatocel).



Figura 36. Larvas en estadio de bipinaria tardía. Fotografías A, B, C, D, E, F, G, H e I, las larvas han desarrollado por completo el somatocoel y el axiocoel aparece en la región posterior del cuerpo. Se ha formado el lóbulo pre-oral y los brazos sin soporte calcáreo. **Abreviaturas:** **b** (boca), **a** (ano), **es** (estómago), **ef** (esófago), **s** (somatocoel), **ax** (axiocoel), **br** (brazo).

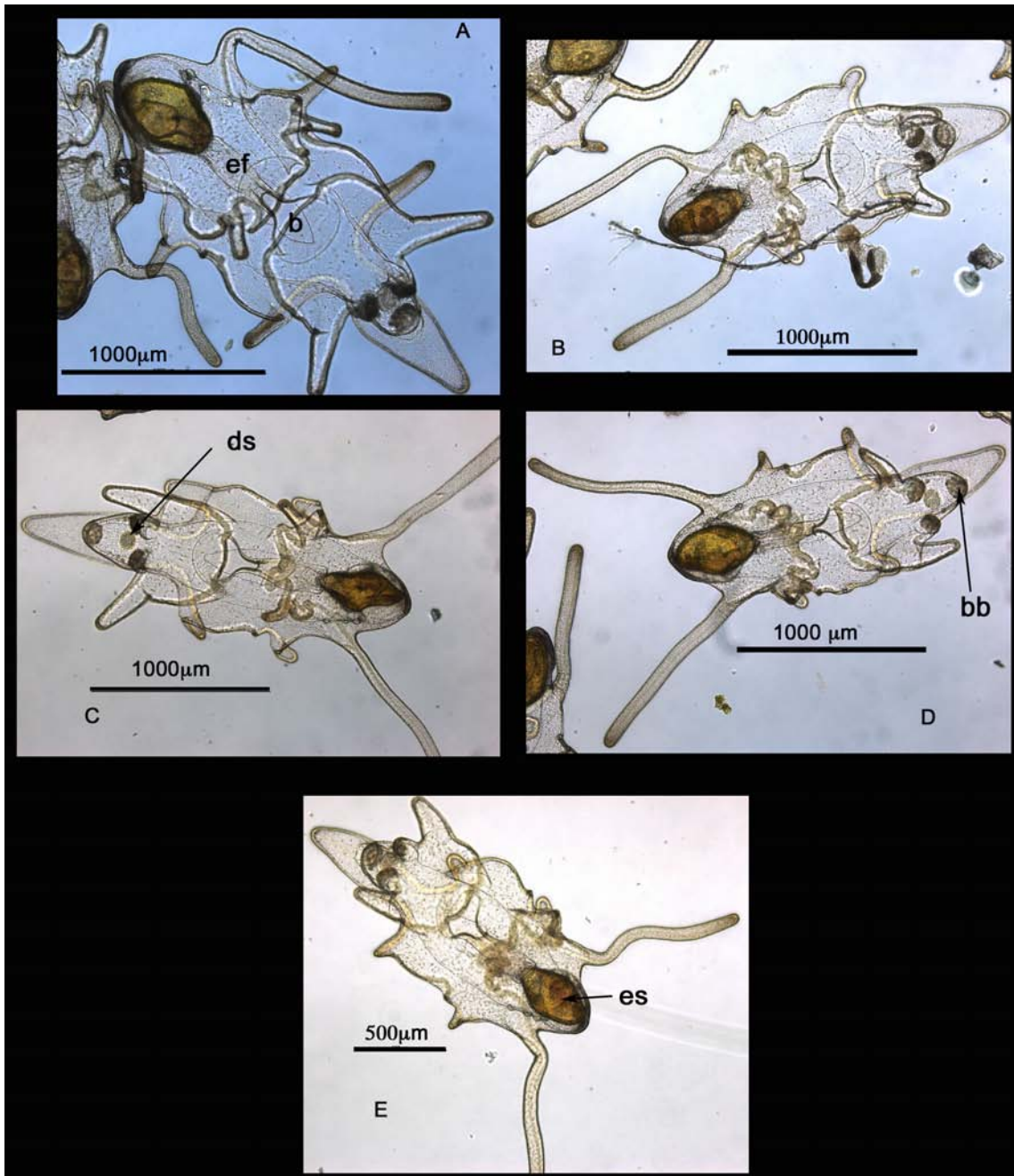


Figura 37. Larvas en estadio braquiolaria sin rudimento desarrollado. Fotografías A, B, C, D y E. En éste estadio las larvas han desarrollado en su totalidad los brazos posterodorsales, los brazos braquiolares y el disco adhesivo también están bien formados. Las larvas braquiolarias son muy activas sin embargo cuando el flujo del aire de los tanques se detiene tienden a asentarse en el fondo debido al gran tamaño del cuerpo. **Abreviaturas:** b (boca), es (estómago), ef (esófago), bb (brazo braquiolar), ds (disco suctor).

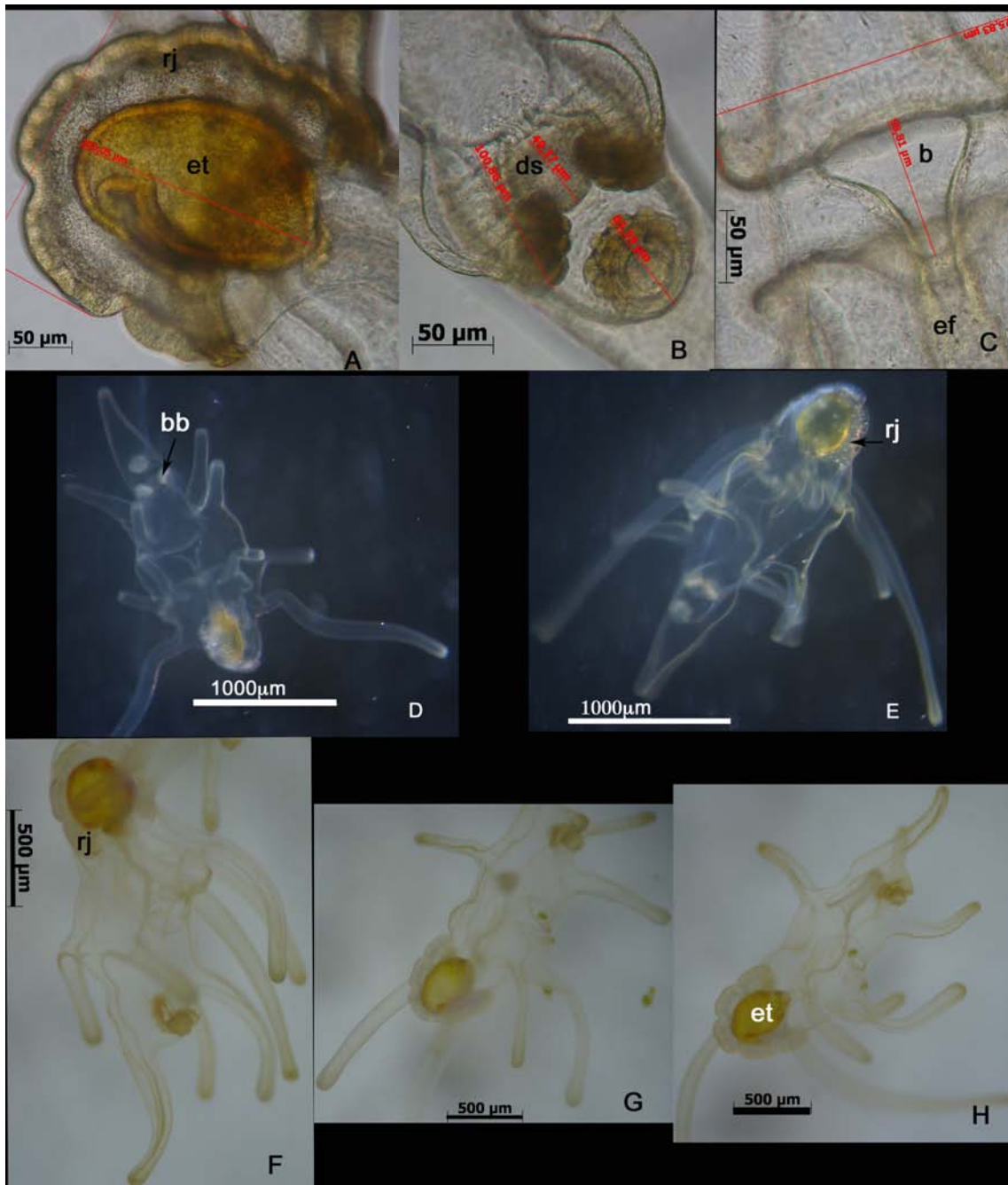


Figura 38. Larvas en estadio de braquiolaria con rudimento bien desarrollado. A, muestra el acercamiento del rudimento que tiene forma de flor con 5 bordes que formaran cada uno de los brazos al finalizar la metamorfosis; **B,** brazos braquiolares y disco adhesivo (al centro), cada brazo tiene una gran cantidad de células sensoriales que se permiten a la larva caracterizar e identificar un buen sitio para asentarse; **C,** boca de una larva BRA_{cr} . **D, E, F, G y H;** larvas con rudimento bien desarrollado, el rudimento se observa en las fotografías como una mancha blanca y se desarrolla a lo largo del costado posterior izquierdo del cuerpo larval hasta rodear toda la región posterior. **Abreviaturas:** **b** (boca), **es** (estómago), **ef** (esófago), **bb** (brazo braquiolar), **ds** (disco suctor), **rj** (rudimento juvenil).

Una vez que las larvas tuvieron el rudimento bien desarrollado se comenzó a detectar la presencia de larvas algunas metamorfoseadas en forma espontánea en las paredes del tanque.

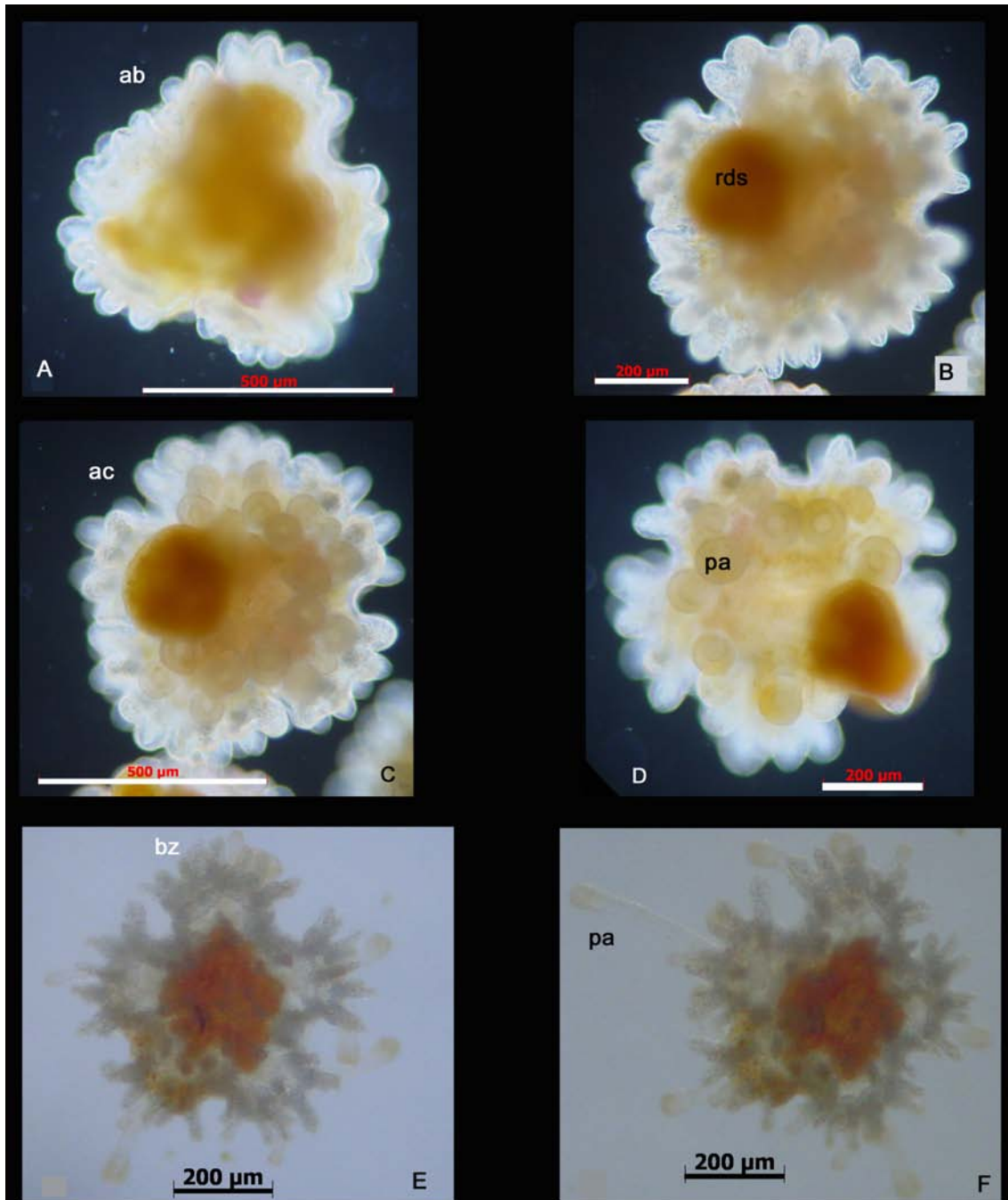


Figura 39. Estadio de Post-larva. A, región abactinal de una post-larva recién metamorfoseada, los 5 brazos apenas comienzan a desarrollarse; B, C y D; fotografías de la región actinal, se observan los pies ambulacrales y el vestigio (mancha naranja oscuro) de los brazos braquiolares y el disco suctor; E y F, post-larva capaz de desplazarse usando sus pies ambulacrales, los brazos están bien definidos. **Abreviaturas:** rds (rudimento del disco suctor), bz (brazo post-larva), pa (pie ambulacral), ac (región actinal), ab (región abactinal).

El 21 de mayo 2014 (día 78 de cultivo) el 92% de las larvas que se encontraban aún en cultivo tenían un rudimento bien desarrollado. Desde el día de cultivo 76 las larvas redujeron su consumo de alimento.

Los promedios de las mediciones hechas a cada estadio larval se incrementan conforme aumenta el estadio larval (hasta BR_{c/r}) (tabla 2), una vez que las larvas se han metamorfoseado el promedio de su longitud disminuye (Fig. 40).

Los promedios del ancho máximo tuvieron el mismo comportamiento (Fig. 41) que el largo, aunque ésta medida no tuvo diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$) entre los estadios de BT, BR_{s/r}, BR_{c/r} y PL.

Tabla 2. Promedios de mediciones de larvas (largo y ancho máximo), expresadas en μm ,. Los datos presentados para los estadios BE y BM son de un cultivo hecho a $21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, los datos de los estadios restantes son de larvas cultivadas a $18^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Estadio larval	Largo máximo (μm)	Ancho máximo (μm)
BE	489.3±79.6	299.3±46.5
BM	769.8±159	452±83.8
BT	1463.9±215	826.2±132
BR_{s/r}	1824.9±224	932.9±151
BR_{c/r}	2178.7±247	768.8±104
PL	722.8±69	683±67

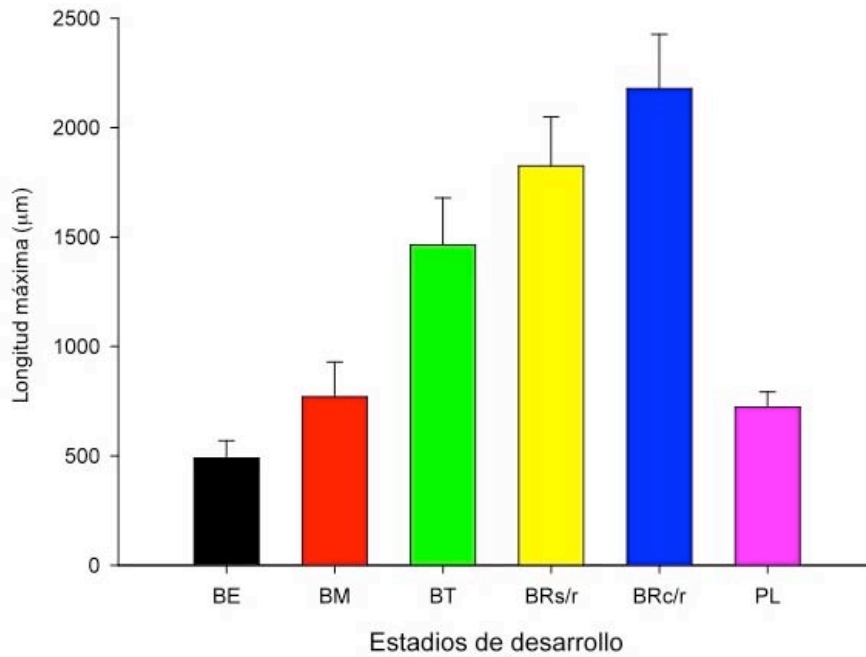


Figura 40. Longitud máxima de cada estadio larval. Los datos de los estadios BE y BM fueron tomados del cultivo hecho a $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, el resto de datos corresponden al cultivo que tuvo una temperatura promedio de $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. (Promedios \pm desviación estándar).

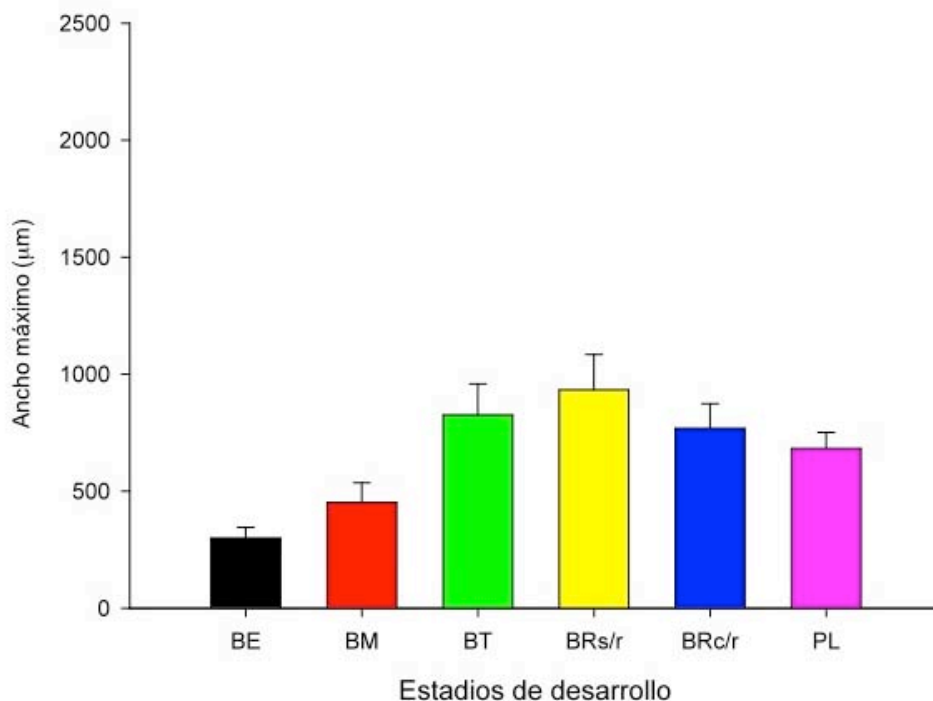


Figura 41. Ancho máximo de cada estadio larval. Los datos de los estadios BE y BM fueron tomados del cultivo hecho a $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, el resto de datos corresponden al cultivo que tuvo una temperatura promedio de $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. (Promedios \pm desviación estándar). Sigmaplot

Inducción a la metamorfosis

El tratamiento en el que las larvas se mantuvieron en presencia de KCl [40mM] fue el único distinto al resto (KW, $\alpha \leq 0.05$) y fue el que produjo un mayor porcentaje de larvas metamorfoseadas, además fue significativamente mayor al resto de los tratamientos (WLX, $\alpha \leq 0.05$) (Fig. 42). En el resto de los tratamientos, que incluyeron concentraciones de KCl de 10, 20 y 30 mM, así como el control negativo con solo AMF, se obtuvieron porcentajes similares de metamorfosis, todos ellos muy cercanos a cero. Los detalles de los análisis estadísticos se muestran en el **anexo I**.

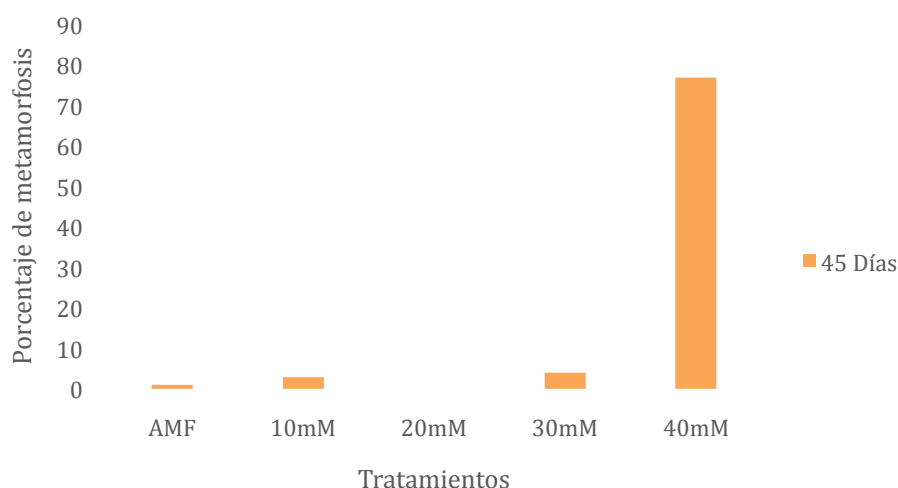


Figura 42. Porcentaje de larvas metamorfoseadas en presencia de KCl como inductor de la metamorfosis (cultivo hecho el 29 de mayo 2013, larvas con 45 días de cultivo).

Para el segundo cultivo (realizado el 3 de marzo) en donde se utilizaron larvas de 57 y 80 días de cultivo que tenían el rudimento bien desarrollado, los resultados mostraron nuevamente que el tratamiento en el que se mantuvieron las larvas a una concentración de KCl 40 mM fue el único distinto al resto (KW, $\alpha \leq 0.05$) y es en el cual se obtuvieron nuevamente los valores más altos de metamorfosis (WLX, $\alpha \leq 0.05$) (Fig. 43) ver **anexo I**.

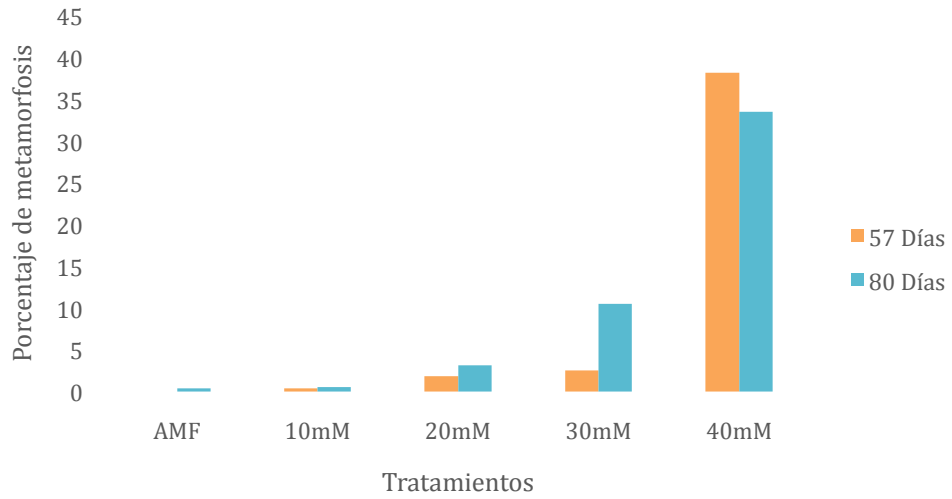


Figura 43. Porcentaje de larvas metamorfoseadas por tratamiento. En barras amarillas se observan los porcentajes de las larvas a los 57 días de cultivo y en barras azules a los 80 días de cultivo.

Discusión

Existen trabajos que hablan acerca de cómo los cambios abruptos de temperatura provocan el desove en asteroideos (Mercier & Hamel, 2009). Sin embargo para el caso de la estrella *P. ochraceus* las pruebas hechas induciendo el desove por shock térmico no tuvieron resultados positivos. Esto se puede deber a que los rangos de temperatura a los que se sometieron no fueron suficientes y es que al ser un organismo que habita en el intermareal se ve sujeto a variaciones de temperatura a lo largo del día y durante las mareas bajas (Pincebourne *et al.*, 2009). Los experimentos para inducir al desove por shock térmico son más comunes utilizando holoturoideos que son animales mucho más sensibles a pequeños cambios de temperatura. Trabajos hechos con especies de éste grupo muestran que variaciones de tan solo 4-5 °C pueden provocar la expulsión de gametos (James, 1994; Morgan, 2000; Battaglione *et al.*, 2002; Dabbagh, 2011).

Todas las inducciones hechas durante la primavera y verano con inyección de 1-MA fueron exitosas y produjeron cultivos viables que llegaron hasta la metamorfosis espontánea.

Las inducciones con 1-MA se realizaron durante los meses de marzo, mayo y junio porque según la literatura el desove de *P. ochraceus*, al igual que el de varios equinodermos que habitan en el Pacífico Norte, está regulado por el fotoperiodo (Pearse & Eernisse, 1982) y por los *blooms* de fitoplancton que ocurren en primavera y principios del verano (Strathmann, 1987); en la Bahía de Ensenada la temporada en la que existe una mayor concentración de nutrientes en el agua es marzo-junio y la época en la que hay una menor cantidad de nutrientes es septiembre-enero (Espinosa *et al.*, 2001). Los resultados de respuesta al desove mediante 1-MA sobre la temporada de madurez de *P. ochraceus* coinciden con los datos encontrados por Romero (2007). Una cuarta inducción con 1-MA desove se realizó durante el mes de septiembre, sin que ningún organismo arrojara gametos debido a que es un mes en el cual las estrellas se encuentran en periodo de recuperación (Romero, 2007).

El desarrollo larvario de *P. ochraceus* a una temperatura de $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con alimentación exclusiva de *Rhodomonas* sp. [5000-10000 cel/ml] tuvo una duración entre 30 y 90 días. Los trabajos hechos a temperaturas menores con la misma especie muestran tiempos más largos de desarrollo (Fraser *et al.*, 1981; Lowe & Wray 1999; Pia *et al.*, 2012).

Los resultados confirman que existe una relación directa entre la temperatura y el tiempo de desarrollo, como ha sido reportado para una gran cantidad de organismos. El aumento de la temperatura en los cultivos promovió un desarrollo acelerado de las larvas, por lo que es posible encontrar mayor velocidad de desarrollo a temperaturas mayores de $21\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sin embargo es necesario tomar en cuenta que un incremento en la temperatura de cultivo aumenta la posibilidad de presentar problemas por la proliferación de bacterias o por un desarrollo anormal de las larvas (Reverol *et al.*, 1998).

Trabajos hechos con asteroideos y otros invertebrados marinos muestran que dentro de los límites térmicos de tolerancia de las especies, las temperaturas cálidas aceleran el proceso de crecimiento (Watts *et al.*, 1982; Reverol *et al.*, 1998; O'Connor *et al.*, 2007). Esto se debe a que de manera general, en los invertebrados marinos la tasa metabólica aumenta conforme se incrementa la temperatura (Watts *et al.*, 1982). En el caso de *P. ochraceus* fue notorio el acortamiento del tiempo de desarrollo larvario en las costas de BC con respecto al tiempo del mismo en su distribución más norteña: Prince William Sound en Alaska donde la temperatura promedio de la costa es de $\approx 7.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (NOAA, 2015), esto implica que el periodo como parte del plancton también disminuye lo cual limita la conectividad entre poblaciones ya que para los asteroideos es el único momento en que pueden dispersarse lejos de la población parental (O'Connor *et al.*, 2007). Esta reducción en el periodo larvario y su consecuente efecto en la conexión de las poblaciones de estrellas deberá ser una consideración adicional para el manejo, explotación y conservación de sus poblaciones en Baja California.

En las observaciones hechas al microscopio se notó que desde el periodo embrionario hubo heterogeneidad en los cultivos. Esto puede ser debido a diferencias entre los óvulos y/o limitaciones técnicas en el laboratorio que

impiden que la fertilización sea sincrónica en todo el cultivo (Fraser *et al.*, 1981).

En los cultivos hecho en el laboratorio se utilizó siempre a la microalga *Rhodomonas* sp. en concentraciones de 5 000-10 000cél/ml para alimentar a las larvas. Según lo descrito por Vickery y McClintock (2001) a altas concentraciones de alimento las larvas de ésta especie pueden llegar a clonarse lo cual aumentaría su tasa de reclutamiento; sin embargo en las pruebas que ellos hicieron no incluyeron a *Rhodomonas* sp. como alimento, en su lugar usaron a las microalgas *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans* y *Dunaliella tertioecta*. Para determinar si *Rhodomonas* sp. estimula la clonación de *P. ochraceus* será necesario hacer experimentos con concentraciones mayores a 10 000 cél/ml ya que en nuestros cultivos no se encontró rastro de alguna larva que pudiera estarse clonando.

Según las diferencias morfológicas se proponen en el presente estudio cinco estadios larvarios dentro del desarrollo de *P. ochraceus*: bipinaria temprana, bipinaria media, bipinaria tardía, braquiolaria sin rudimento y braquiolaria con rudimento bien desarrollado. Para facilitar el estudio, cada estadio larval fue definido por un número de características morfológicas que se observaron por primera vez en ése estadio. La caracterización de éstos estadios mejorará el conocimiento de las estructuras larvarias para estudios posteriores. Un análisis más detallado de las estructuras permitirá entender la morfogénesis del rudimento juvenil y con esto poder responder a preguntas sobre cuales pudieran ser los factores morfogenéticos y moleculares que regulan la metamorfosis.

George (1999) realiza una clasificación de estadios larvarios basándose en los cambios y migraciones de los sacos celómicos, en total enumera 15 estadios que le permitieron determinar con mucho detalle anormalidades en el desarrollo provocadas por el tamaño de los óvulos de los cuales provenían las larvas. Pia *et al.* (2012) proponen 20 estadios larvarios para la especie mediante esta clasificación pudo observar si la salinidad afectaba la morfología de las larvas. En ambos trabajos la clasificación de los estadios está basada en la formación y migraciones de los sacos celómicos. En el presente trabajo

además de ésta característica para diferenciar cada estadio larval, también se incluyen características morfológicas distintivas de cada estadio, como el número de brazos, forma del cuerpo, número de lóbulos, aparición del rudimento juvenil, entre otras. Ésta clasificación reduce y agrupa características para hacer más fácil diferenciar los estadios larvarios siendo una buena herramienta de apoyo didáctico, así como un apoyo para entender mejor como se distribuyen éstos organismos en las costas de BC.

Los tres experimentos realizados para inducir la metamorfosis a las larvas en estadio BR_{cr} con distintas concentraciones de KCl mostraron que la presencia de K⁺ provoca la metamorfosis en *P. ochraceus*. Al incrementarse la concentración de KCl aumenta el porcentaje de larvas metamorfoseadas. La respuesta que dependió de la concentración y 40 mM de KCl fue la que indujo la metamorfosis a un mayor porcentaje de larvas en cada experimento, llegando casi al 100% en el cultivo del 29 de mayo 2013 y superando el 30% en el cultivo del 3 de marzo 2014. La inducción con exceso de KCl provoca, no solo en los asteroideos sino en varios phyla de invertebrados, cambios en el citoesqueleto que colapsan el epitelio larval. Un exceso de KCl ocasiona que las células músculo-epiteliales del somatocele se contraigan y se expulse el rudimento juvenil (Cameron *et al.*, 1989) como es el caso de *P. ochraceus* donde ocurre el mismo fenómeno.

La concentración de KCl capaz de inducir a la metamorfosis varía según el phyla. Concentraciones entre 5-10 mM de KCl son suficientes para inducir la metamorfosis a larvas de briozoarios (Wendt & Woollacott, 1995); larvas de *P. ochraceus* expuestas a una concentración de 10 mM por 48 hrs presentan solo un porcentaje ligeramente mayor a 10% de metamorfosis. Por otro lado en el caso de los erizos *Strongylocentrotus franciscanus*, *S. purpuratus* y *Lytechinus pictus*, las exposiciones a un exceso de K⁺ de 100 mM entre 15 y 30 min, fueron suficientes para iniciar la metamorfosis y llegar a un 100% de larvas metamorfoseadas (Carpizo-Ituarte *et al.*, 2002).

Además de la concentración de KCl, la edad de la larva puede influir en la cantidad de larvas que se metamorfosean. El K⁺ es un excelente estimulador, sin embargo las concentraciones necesarias para inducir la metamorfosis en

cada especie varían y la tasa de mortalidad larval aumenta cuando se incrementa la concentración. No hay estudios que prueben la efectividad del uso de películas biológicas para inducir la metamorfosis en *Pisaster ochraceus*, por lo que será importante continuar con investigaciones para conocer los procesos que permiten asentarse a ésta especie y así dar uno de los primeros pasos para entender mejor su distribución en el medio (Pawlik & Hadfield, 1990).

La descripción del desarrollo larvario de *P. ochraceus* para una de sus distribuciones más sureñas dio como resultado la clasificación de 5 estadios larvales y un estadio postlarval. Además se probó que el “shock” térmico no es capaz de inducir al desove a dicha especie, sin embargo las inyecciones de 1-MA permiten que los organismos expulsen gametos durante el periodo de madurez gonádica. Al ser ésta estrella un recurso explotado en las costas de Baja California, éste trabajo contribuirá a entender su desarrollo lo cual coadyuvará al manejo adecuado de sus poblaciones para mantener el equilibrio de la trama trófica.

Conclusiones

- ★ Las inyecciones con 1-MA a una concentración de 10^{-4} M son el método más efectivo para inducir el desove de la estrella de mar *P. ochraceus* que habita en las costas de BC.
- ★ Las condiciones óptimas de cultivo para *P. ochraceus* incluye la alimentación con *Rhodomonas* sp. [5000 a 10000 cél/ml], el recambio de agua de al menos dos veces por semana para evitar la proliferación de microorganismos dañinos y la aireación continúa.
- ★ Las larvas de *P. ochraceus* cultivadas en condiciones de laboratorio a una temperatura $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ alcanzan el estadio de PL en el día 30 de cultivo y pueden permanecer hasta 90 días en el estadio de BR_{c/r}.
- ★ Se diferenciaron cinco estadios larvales, BE, BM, BT, BR_{s/r} y BR_{c/r}, cada uno de ellos con características distintivas que aparecen al inicio de cada división.
- ★ Cuanto más alta fue la temperatura de cultivo el tiempo en que los embriones y larvas de *P. ochraceus* se desarrollaron fue más corto.
- ★ La concentración de 40mM de KCl fue la que indujo un mayor porcentaje de larvas a la metamorfosis, lo cual puede ser utilizado para manipular éste periodo crítico en cautiverio.

Referencias

- Baloun, A. J., y D. E. Morse. 1984. Ionic control of settlement and metamorphosis in larval *Haliotis rufescens* (Gastropoda). *The Biological Bulletin* 167: 124–138.
- Battaglione S. C., J. E. Seymour, C. Ramofafia and I. Lane. 2002. Spawning induction of three tropical sea cucumbers, *Holothuria scabra*, *H. fuscogilva* and *Actinopyga mauritiana*. *Aquaculture* 207: 29-47.
- Benítez-Villalobos, F., P. A. Tyler and C. M. Young. 2006. Temperature and pressure tolerance of embryos and larvae of the Atlantic sea stars *Asterias rubens* and *Marthasterias glacialis* (Echinodermata: Asteroidea): potential for deep-sea invasion. *Marine Ecology Progress Series* 314:109-117.
- Brusca, C. B. y G. J. Brusca. 2005. Invertebrados. McGraw Hill. Madrid. pp 865-903.
- Bryan, J. and H. Sato. 1970. The isolation of the meiosis in spindle from the mature oocyte of *Pisaster ochraceus*. *Experimental Cell Research* 59:371-378.
- Cameron, R. A., T. R. Tosteson and V. Hensley. 1989. The control of sea urchin metamorphosis: ionic effects. *Development Growth & Differentiation*. 31: 589-594.
- Carpizo-Iltuarte E., A. Salas-Garza y G. Parés-Sierra. 2002. Inducción de la metamorfosis con KCl en tres especies de erizos de mar y sus implicaciones en la producción de juveniles. *Ciencias Marinas*. 28:157-166.
- Dabbagh, A. R., M. R. Sedaghat, H. Rameshi and E. Kamrani. 2011. Breeding and larval rearing of the sea cucumber *Holothuria leucospilota* Brandt (*Holothuria vegabunda* Selinka) from the northern Persian Gulf, Iran. *SPC Beche de mer Information Bulletin* 31:35-38.
- Diario Oficial. 2004. Segunda sección. 15 de marzo. pp 13-14.
- Emlet, R. B., S. A. Maslakova, A. L. Shanks and C. M. Young. 2009. *Biological Bulletin* Virtual Symposium: Biology of Marine invertebrate Larvae. *Biological Bulletin* 216:201-202.
- Espinosa, T. L., G. Gaxiola, J. M. Robles y S. Nájera. 2001. Temperatura, salinidad, nutrientes y clorofila A en aguas costeras de la Ensenada del Sur de California. *Ciencias Marinas* 27: 397-422.
- Feder, H. M. 1959. The food of the starfish, *Pisaster ochraceus* along the California coast. *Ecological Society of America* 40:721-724.

- Fraser, A., J. Gomez, E. B. Hartwick y M. J. Smith. 1981. Observations on the reproduction and development of *Pisaster ochraceus* (Brandt). *Canadian Journal of Zoology*. 1700-1707.
- Frontana-Uribe, S. C. 2005. Filogeografía de *Pisaster ochraceus* (Echinodermata: Asteroidea) a lo largo de su distribución. Tesis de maestría en ciencias. Centro de investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 90p.
- Garrey, W. E. 1919. The nature of the fertilization membrane of *Asterias* and *Arbacia* eggs. *The Biological Bulletin* 37: 287-293.
- Garza, C. and C. Robles. 2010. Effects of brackish water incursions and diel phasing of tides on vertical excursions of the keystone predator *Pisaster ochraceus*. *Marine Biology* 157:673-682.
- George, S. H. 1999. Egg quality, larval growth and phenotypic plasticity in a forcipulate seastar. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 237:203-224.
- Gilbert, S. F. 2003. *Developmental Biology*, 7th edition. Sinauer Associates. 3-4, 245-257pp.
- Hadfield, M.G., E. Carpizo-Ituarte, K. del Carmen and B. T. Nedved. 2001. Metamorphic competence, a major adaptive convergence in marine invertebrate larvae. *Amer. Zool.* 41: 1123-1131.
- Harley, C. D. G., M. S. Pankey, J. P. Wares, R. K. Grosberg and M. J. Wonham. 2006. Color polymorphism and genetic structure in the sea star *Pisaster ochraceus*. *The Biological Bulletin* 211:248-262.
- Henderson, J. A. and J. S. Lucas. 1971. Larval development and metamorphosis of *Acanthaster planci* (Asteroidea). *Nature* 232: 655-657.
- Hendler, G., Miller, J. E., Pawson, D. L. and Kier, P. M. 1995. *Stars, Sea Urchins, and Allies: Echinoderms of Florida and the Caribbean Sea*. Smithsonian Institution, E. U. A. 390 pp.
- Hewson, I., Button, J. B., Gudenkauf, B. M., Miner, B., Newton, A. L., Gaydos, J. K., Wynne, J., Groves, C. L., Hendler, G., Murray, M., Fradkin, S., Breitbart, M., Fahsbender, E., Lafferty, K. D., Kilpatrick, A. M., Miner, C. M., Raimondi, P., Lahner, L., Friedman, C. S., Daniels, S., Haulena, M., Marliave, J., Burge, C. A., Eisenlord, M. E. and C. D. Harvell. 2014. Densovirus associated with sea-star wasting disease and mass mortality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:17278-17283

- Jalali, A. and B. Crawford. 2011. A freezing technique that maintains viability of sperm from the starfish *Pisaster ochraceus*. *Invertebrate Reproduction & Development*, 1-7.
- James, D. B. 1994. Seed production in sea cucumbers. Disponible online: http://eprints.cmfri.org.in/8231/1/Aqua_Intl_1993_97.pdf
- Jiaxin, C. 1990. Sea cucumber culture. *In*: Bueno, P., A. Lovatelli (Eds). Brief introduction to mariculture of five selected species in China. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura (FAO). Disponible online: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab736e/AB736E00.htm#PRE>.
- Kanatani, H. and M. Ohguri. 1966. Mechanism of starfish spawning I. Distribution of active substance responsible for maturation of oocytes and shedding of gametes. *The Biological Bulletin* 131:104-114.
- Kanatani, H. and H. Shirai. 1969. Mechanism of starfish spawning II. Some aspects of action of a neural substance obtained from radial nerve. *The Biological Bulletin* 137: 297-311.
- Kanatani, H. and H. Shirai. 1970. Mechanism of starfish spawning III. Properties and action of meiosis-inducing substance produced in gonad under influence of gonad-stimulating substance. *Development, Growth and Differentiation*, 12: 119-140.
- Komatsu, M., M. Swell, S. F. Carson and F. S. Chia. 2000. Development and metamorphosis of the sea star *Luidia foliata* (Echinodermata: Asteroidea). *Species Diversity* 5: 155-162.
- Lacalli, T. C. 1996. Mesodermal pattern repeats in the starfish bipinnaria larva, and related patterns in other deuterostome larvae and chordates. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 351:1737-1758.
- Lambert, P (Compilador). 2007. Checklist of the Echinoderms of British Columbia. En línea: [<http://www.royalbcmuseum.bc.ca>].
- Landenberger, D. E. 1968. Studies on selective feeding in the Pacific starfish *Pisaster* in southern California. *Ecological Society of America* 49(6): 1062-1075.
- Lawrence, J. 1987. A functional Biology of Echinoderms. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, 340 pp.
- Levin, L. A. and T. S. Bridges. 1995. Pattern and diversity in reproduction and development. *In*: McEdward L. R. (Ed.) Ecology of marine invertebrate larvae. CRC Press, Boca Raton. pp. 1-48.

- Lilie, R. S. and W. Cattell. 1925. The conditions of activation of unfertilized starfish eggs by the electric current. *The Biological Bulletin* 49: 100-110.
- Loeb, J. 1902. Maturation, natural death and the prolongation of the life of infertilized starfish eggs (*Asterias forbesii*) and their significance for the theory of fertilization. *The Biological Bulletin* 3: 295-311.
- Lowe, C. J. and G. A. Wray. 1999. Rearing larvae of sea urchins and sea stars for developmental studies. In: Walker, J. M., R. S. Tuan and C. W. Lo. (Eds) *Methods in Molecular Biology*. Springer. ISBN: 978-0-89603-852-3
- Lunn, K. E., M. J. Villanueva-Noriega and A.C.J. Vincent. 2008. Souvenirs from the sea and investigation into the curio trade in echinoderms from Mexico. *Traffic Bulletin* 22:19-32.
- Mauzey, K. P. 1966. Feeding behavior and reproductive cycles in *Pisaster ochraceus*. *The Biological Bulletin* 131: 127-144.
- McEdward, L. M. and D. A. Janies. 1993. Life cycle evolution in asteroids: what is a larva?. *Biology Bulletin* 184:225-268.
- McEdward, L. R., W. B. Jaeckle and M. Komatsu. 2002. Phylum Echinodermata: Asterozoa. In: Young, C. M., M. A. Sewell and M. E. Rice (Eds.) *Atlas of Marine Invertebrate Larvae*, Academic Press, San Diego. 499-512 pp.
- Menge, B. A. 1975. Brood or broadcast? The adaptive significance of different reproductive strategies in the two intertidal sea stars *Leptasterias hexactis* and *Pisaster ochraceus*. *Marine Biology* 31:87-100.
- Menge, B. A. 1994. The keystone species concept: variation in interaction strength in a rocky intertidal habitat. *Ecological Monographs*. 64:249-286.
- Menge, B. A., E. L. Berlow and C. A. Blanchette. 1994. The keystone species concept: variation in interaction strength in a rocky intertidal habitat. *Ecological Monographs* 64: 249-286.
- Mercier A. and J. F Hamel. 2009. *Advances in Marine Biology*. Elsevier Ltd. Vol. 55. 73pp.
- Morgan, A. D. 2000. Induction of spawning in the sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothurozoa). *Journal of the World Aquaculture Society* 31: 186-194.
- Mortensen, T. 1921. *Studies of the development and larval forms of echinoderms*. Dianco Luno Press Copenhagen. 192-193 pp.

- Murabe, N., H. Hatoyama, M. Komatsu, H. Kaneko and Y. Nakajima. 2007. Adhesive papillae on the brachiolar arms of brachiolaria larvae in two starfishes, *Asterina pectinifera* and *Asterias amurensis*, are sensors for metamorphic inducing factor(s). *Development Growth & Differentiation*. 49: 647-656.
- NOAA, 2015. Water temperature table of the Alaska Coast. Disponible online: <https://www.nodc.noaa.gov/dsdt/cwtg/alaska.html>
- O'Connor, M. I., J. F. Bruno, S. D. Gaines, B. S. Halpern, S. E. Lester, B. P. Kinlan and J. M. Weiss. 2007. Temperature control of larval dispersal and the implications of marine ecology evolution and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 1266-1271.
- Pawlik, J. R. And M. G. Hadfield. 1990. A symposium on chemical factors that influence the settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae: introduction and perspective. *Bulletin of Marine Science* 46:450-454.
- Pearse, J. S. and D. J. Eernisse. 1982. Photoperiodic regulation of gametogenesis and gonadal growth in the sea star *Pisaster ochraceus*. *Marine Biology* 67:121-125.
- Pechenik, J. A. and W. D. Heyman. 1987. Using KCl to determine size at competence for larvae of marine gastropod *Crepidula fornicata* (L.) *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 112: 27-38.
- Perry, K. 1966. Feeding behavior and reproductive cycles in *Pisaster ochraceus*. *The Biological Bulletin* 131:127-144.
- Pia, T. S., T. Johnson and S. B. George. 2012. Salinity-induced morphological changes in *Pisaster ochraceus* (Echinodermata: Asteroidea) larvae. *Journal of plankton research* 0:1-2.
- Pincebourne, S., E. Sanford and B. Helmuth. 2009. An intertidal sea star adjust termal inertia to avoid extreme body temperaturas. *The American Naturalist* 174:890-897.
- Raimondi, P. T., R. D. Sagarin, R. F. Ambrose, C. Bell, M. George, S. F. Lee, D. Lohse, C. M. Miner and S. N. Murray. 2007. Consistent frecuency of color morphs in the sea star *Pisaster ochraceus* (Echinodermata: Asteroidea) across open-coast habitats in the Northeastern Pacific. *Pacific Science* 6:201-210.
- Reverol, Y. M., Y. G. Severeyn, H. J. Severeyn y J. G. Delgado. 1998. Efecto de la temperatura sobre el desarrollo larvario del Guacuco, *Tivela mactroides*. *Boletín del Centro de investigaciones Biológicas* 32: 167-177.

- Romero, E. 2007. Comparación de la dinámica poblacional de la estrella de mar (*Pisaster ochraceus*) en dos zonas de captura de Baja California expuestas a diferentes intensidades por pesca. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California 91p.
- Romero, E., G. Montaña, G. Chee y F. Pámanes. 2008. Estrategias de manejo de la estrella de mar (*Pisaster ochraceus*) en Ensenada, Baja California. Memorias del IV Foro Científicos de Pesca Ribereña 167-169 pp.
- Sanford, E. 2002. The feeding, growth, and energetics of two rocky intertidal predators (*Pisaster ochraceus* and *Nucella canaliculata*) under water temperatures simulating episodic upwelling. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 273:199-218.
- Sanford, E. and B. A. Menge. 2007. Reproductive output and consistency of source populations in the sea star *Pisaster ochraceus*. *Marine Ecology Progress Series* 349:1-12.
- Salas-Garza, A., E. Carpizo-Iltuarte, G. Parés-Sierra, R. Martínez-López y R. Quintana-Rodríguez. 2005. Producción de juveniles de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* en Baja California, México. *Revista de Biología Tropical* 53:345-355.
- Schuetz, A. W. 1969. Induction of oocyte shedding and meiotic maturation in *Pisaster ochraceus*: kinetic aspects of radial nerve factor and ovarian factor induced changes. *The Biological Bulletin* 137: 524-534.
- Shirai, H., Y. Yoshimoto and H. Kanatani. 1981. Mechanism of starfish spawning. IV. Tension generation in the ovarian wall by 1-methyladenine at the time of spawning. *Biological Bulletin* 161: 172-179.
- Smith M. M., L. Cruz-Smith, R. A. Cameron and L. A. Urry. 2008. The larval stages of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Journal of Morphology* 269: 713-733.
- Solís-Marín, F. A., M. B. I. Honey-Escandón, M. D. Herrero-Perezrul, F. Benitez-Villalobos, J. P. Díaz-Martínez, B. E. Buitrón-Sánchez, J. S. Palleiro-Nayar and A. Durán-González. 2013. The echinoderms of Mexico: biodiversity, distribution and current state of knowledge. *In*: Alvarado, J. J. and F. A. Solís-Marín (Eds). Echinoderm research and diversity in Latin America. Springer. 658p. ISBN: 978-3-642-20051-9

- Stevens, M. 1972. Procedures for induction of spawning and meiotic maturation of starfish oocytes by treatment with 1-methyladenine. *In*: Melnik, J. (Ed) Meiosis: current research. III. MSS Information Corporation. ISBN: 0-8422-7036-1.
- Stokstad, E. 2014. Death of the Stars. *Science* 344:464-467.
- Strathmann, M. F. 1970. The behavior of planktotrophic echinoderm larvae: mechanisms, regulation, and rates of suspension feeding. University of Washington. Tesis Doctoral.
- Strathmann, R. R. 1987. Reproduction and Development of Marine Invertebrates of the north Pacific Coast. Data and Methods for the Study of Eggs, Embryos, and Larvae. University of Washington Press, Seattle, 670 p.
- Unabia, C. R. C and M. G. Hadfield. 1999. Role of bacteria in larval settlement and metamorphosis of the polychaete *Hydroides elegans*. *Marine Biology* 133: 55-64.
- Vellutini, B. C. and A. E. Migotto. 2010. Embryonic, Larval, and Juvenile Development of the Sea Biscuit *Clypeaster subdepressus* (Echinodermata: Clypeasteroidea). *PLoS ONE* 5: 1-15.
- Vickery, M. S. and J. B. McClintock. 2000. Effects of food concentration and availability on the incidence of cloning in planktotrophic larvae of the sea star *Pisaster ochraceus*. *Biology Bulletin* 199: 298-304.
- Watts, S. A., R. E. Scheibling, A. G. Marsh y J. B. McClintock. 1982. Effect of temperature and salinity on larval development of sibling species of *Echinaster* (Echinodermata: Asteroidea) and their hybrids. *The Biological Bulletin* 163:1348-354.
- Wendt, D. E. y R. M. Woollcott. 1995. Induction of larval settlement by KCl in three species of *Bugula* (Bryozoa). *Invertebrate Biology* 114: 345-351.
- Yool, A. J., S. M. Grau, M. G. Hadfield, R. A. Jensen, D. A. Markell y D. E. Morse. 1986. Excess potassium induces larval metamorphosis in four marine invertebrate species. *The Biological Bulletin* 170: 255-266.