



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**CICLO REPRODUCTIVO DEL OFIUROIDEO**  
*Ophiocomella alexandri* (LYMAN, 1860) Y  
**LA INFLUENCIA DE LA LUNA**  
**EN LA LIBERACIÓN DE SUS GAMETOS**  
**EN BAHÍA DE LA PAZ, BCS**

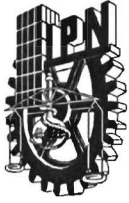
**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

**PRESENTA**

**MARÍA GUADALUPE MARTÍNEZ MORALES**

**LA PAZ, B.C.S., DICIEMBRE DEL 2019**



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de  siendo las  horas del día  del mes de  del  se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de:

para examinar la tesis titulada:  por el (la) alumno (a):


Apellido Paterno:	MARTÍNEZ	Apellido Materno:	MORALES	Nombre (s):	MARÍA GUADALUPE
-------------------	----------	-------------------	---------	-------------	-----------------

Número de registro:

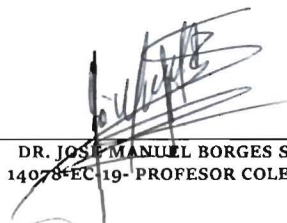
Aspirante del Programa Académico de Posgrado:


Después de la lectura y revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR**  **NO APROBAR**  la tesis, en virtud de los motivos siguientes: "SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES"

#### Comité tutorial

  
DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS VÁZQUEZ  
(Directora de TesIs)  
13723-EJ-18/6 PROFESOR COLEGIADO

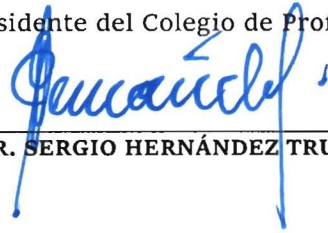
  
DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ  
11907-EH-16/6- PROFESOR COLEGIADO

  
DR. JOSÉ MANUEL BORGES SOUZA  
14078-EC-19- PROFESOR COLEGIADO

  
DRA. MARÍA DINORAH HERRERO PEREZRUL  
13862-EG-18/3 - PROFESOR COLEGIADO

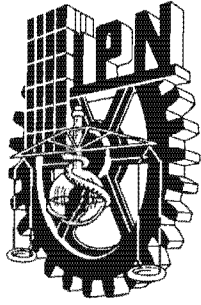
  
DR. MANUEL MIRANDA AMAYA  
PROFESOR - OTRA INSTITUCIÓN

Presidente del Colegio de Profesores

  
DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO



I.P.N.  
CICIMAR  
DIRECCIÓN



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 11 del mes de Diciembre del año 2019

El (la) que suscribe BIÓL. MARÍA GUADALUPE MARTÍNEZ MORALES Alumno (a) del Programa  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A180461 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS VÁZQUEZ

y cede los derechos del trabajo titulado:

"CICLO REPRODUCTIVO DE OFIUROIDEO *Ophiocomella alexandri* (LYMAN, 1860)

Y LA INFLUENCIA DE LA LUNA EN LA LIBERACIÓN DE SUS GAMETOS EN BAHÍA DE LA PAZ, BCS."

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: mguadalupemtzm@gmail.com - bpceballos@gmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

BIÓL. MARÍA GUADALUPE MARTÍNEZ MORALES

*Nombre y firma del alumno*

The possession of a time sense allows an organism to set in motion at the proper time, processes whose final stage should be synchronized with set phases of a rhythmical environment  
Janet Harker, 1964

A mi **familia y amigos**.  
Gracias por su apoyo y  
por todo el amor.

## **Agradecimientos**

Al Instituto Politécnico Nacional (IPN) y al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) por la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado y por impulsar mi desarrollo académico y personal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a la Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) y a los proyectos SIP por el apoyo económico otorgado.

A mi directora de tesis la Dra. Patricia Ceballos, por la oportunidad de ser parte de este proyecto, por el apoyo y por confiar en mí y en mi trabajo.

A mi comité revisor, por su tiempo en la revisión de este trabajo y por sus comentarios para mejorarlo: Dr. Marcial Arellano, Dr. José Manuel Borges, Dra. Ma. Dinorah Herrero, Dr. Manuel Miranda y Dr. Rodrigo Moncayo.

A la Biol. Alma Rivera por los consejos dentro y fuera del laboratorio, por compartir su conocimiento y creatividad y sobre todo por hacer del laboratorio una bonita familia.

A Humberto Ceseña y a Cesar Casas por su apoyo en todos los trámites, por facilitar nuestra vida burocrática y por su amabilidad.

A todo el personal de la Unidad de Computo por estar siempre dispuestos a apoyarnos y por la buena vibra, especialmente a Roberto Aguilera; también a mis compañeros de escritorio quienes siempre han sido muy amables y con los que pude compartir momentos agradables.

A los organizadores del curso de Sistemática, Taxonomía y Ecología de Equinodermos, así como a la Red Iberoamericana de Equinodermos, por contribuir en mi conocimiento sobre el grupo y hacerme parte de su familia.

A mis compañeros de laboratorio y clases, así como a mis maestros, por contribuir a mi crecimiento personal y académico.

A mis padres Antonio Martínez y Bertha Morales por estar a mi lado aún en la distancia, han sido mi mayor sostén, gracias por animarme siempre a conseguir mis sueños y a la vez mantener mis pies en la tierra. A mi hermana María José por ser la mejor cómplice y amiga, gracias por llenarme de tanta paz, estoy orgullosa de ti. Los amo.

A mis amigos: Silvestre por no perderte la defensa de mi trabajo, gracias por siempre estar a mi lado, eres un ejemplo a seguir. Salvador por soportar mis altibajos y ayudar a equilibrarme, gracias por todo el apoyo y por creer tanto en mí. Harold Castillo por el apoyo en la parte estadística del proyecto, por siempre proponerme dar más, estirando mis límites; gracias por compartir este proceso conmigo y enseñarme tanto, pero sobre todo por hacerme parte del tuyo y tu cultura. Los quiero.

A Yutzin Jiménez por compartir este proceso dentro y fuera de las aulas, por las risas, las pláticas, las prisas y momentos de impotencia. A Fernando, Valentina y Mar gracias por todos los buenos momentos, por darme ánimos y por sus consejos, ¡sin asco! A Alondra por compartir el día a día, por los momentos de ñoñez y por la confianza. A Dulce y Memo, así como a sus dos nenas por todo el apoyo y por hacerme parte de su familia. Gracias a todos por hacer mi estancia en La Paz tan llevadera y por siempre escuchar. Los quiero.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
GLOSARIO .....	xi
RESUMEN .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	1
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	3
4. HIPÓTESIS .....	3
5. OBJETIVOS.....	4
5.1. General.....	4
5.2. Específicos .....	4
6. MÉTODOS .....	5
6.1. Área de estudio.....	5
6.2. Obtención de muestras .....	6
6.3. Procesamiento de muestras .....	6
6.4. Relación longitud-peso.....	7
6.5. Factor de condición (K) .....	8
6.6. Índice gonadosomático (IG).....	9
6.7. Proceso histológico .....	9
6.8. Caracterización de células germinales y fases de desarrollo gonádico .....	9
6.9. Proporción de sexos.....	10
6.10. Longitud de primera madurez (Ld <sub>50</sub> ).....	11
6.11. Relación del ciclo reproductivo y las fases lunares.....	12
7. RESULTADOS .....	13
7.1. Biometrías .....	13
7.2. Proporción sexual .....	13
7.3. Relación longitud-peso.....	18
7.4. Factor de condición (K) .....	19
7.5. Caracterización de los estadios de desarrollo de los ovocitos .....	20
7.6. Fases del desarrollo gonádico.....	22
7.6.1. Hembras .....	24
7.6.2. Machos.....	27



7.7.	Ciclo gonádico de <i>Ophiocomella alexandri</i> -----	30
7.7.1.	Hembras -----	30
7.7.2.	Machos-----	32
7.8.	Ciclo reproductivo y medidas de la condición reproductiva (IG e IM)-----	32
7.9.	Longitud de primera madurez (Ld <sub>50</sub> )-----	35
7.10.	Liberación de gametos y fases lunares -----	36
8.	DISCUSIÓN-----	38
9.	CONCLUSIONES-----	44
10.	RECOMENDACIONES-----	45
11.	REFERENCIAS -----	46
12.	ANEXOS-----	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ejemplar de <i>Ophiocomella alexandri</i> .-----	<b>2</b>
<b>Figura 2.</b> Mapa de la Bahía de La Paz, Punta Galeras (México).-----	<b>5</b>
<b>Figura 3.</b> Vista oral del disco de <i>Ophiocomella alexandri</i> .-----	<b>7</b>
<b>Figura 4.</b> Proporción sexual por mes de <i>Ophiocomella alexandri</i> .-----	<b>14</b>
<b>Figura 5.</b> Boxplot del peso total por sexos de <i>Ophiocomella alexandri</i> .-----	<b>15</b>
<b>Figura 6.</b> Boxplot del peso del disco por sexos de <i>Ophiocomella alexandri</i> .-----	<b>16</b>
<b>Figura 7.</b> Boxplot del peso de la gónada por sexos de <i>Ophiocomella alexandri</i> .-----	<b>17</b>
<b>Figura 8.</b> Boxplot del diámetro del disco por sexos de <i>Ophiocomella alexandri</i> .-----	<b>18</b>
<b>Figura 9.</b> Relación longitud-peso de <i>Ophiocomella alexandri</i> .-----	<b>19</b>
<b>Figura 10.</b> Variabilidad mensual de la condición relativa (K) de <i>Ophiocomella alexandri</i> en Bahía de La Paz.-----	<b>20</b>
<b>Figura 11.</b> Distribución de las frecuencias del diámetro de ovocitos por fase de desarrollo gonádico.-----	<b>22</b>
<b>Figura 12.</b> Fotografía representativa de organismos indiferenciados de <i>Ophiocomella alexandri</i> .-----	<b>24</b>
<b>Figura 13.</b> Fases del desarrollo gonádico en hembras de <i>Ophiocomella alexandri</i> .-	<b>26</b>
<b>Figura 14.</b> Fases del desarrollo gonádico en machos de <i>Ophiocomella alexandri</i> .--	<b>29</b>
<b>Figura 15.</b> Ciclo reproductivo de hembras y machos de <i>Ophiocomella alexandri</i> .---	<b>31</b>
<b>Figura 16.</b> Ciclo reproductivo de <i>Ophiocomella alexandri</i> .-----	<b>33</b>
<b>Figura 17.</b> Horas luz promedio por día en Bahía de La Paz, BCS.-----	<b>35</b>

**Figura 18.** Regresión logística ajustada de la proporción de hembras y machos maduros de *O. alexandri* por longitud del disco. ----- **36**

**Figura 19.** Gráfico en mosaico de la liberación de gametos de *Ophiocomella alexandri* durante la luna llena y nueva de agosto 2016. ----- **37**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Análisis de las biometrías de <i>Ophiocomella alexandri</i> , por sexos. -----	<b>13</b>
<b>Tabla II.</b> Parámetros estimados y tipo de alometría de la relación longitud-peso de <i>Ophiocomella alexandri</i> , por sexos. -----	<b>19</b>
<b>Tabla III.</b> Parámetros estimados en el cálculo de la longitud de primera madurez $L_{50}$ de <i>Ophiocomella alexandri</i> , por sexos. -----	<b>35</b>

## GLOSARIO

**Atresia:** Proceso de degeneración estructural.

**Bajamar:** Fin o término del reflujo del mar.

**Ciclo gonádico:** Representación seriada del desarrollo de la gónada, desde el momento en que se encuentra inmadura hasta la post liberación de gametos.

**Ciclo reproductivo:** Frecuencia de aparición de las diferentes etapas del desarrollo gonádico dentro de una población durante el ciclo gonádico.

**Dioico:** Especie que cuenta con individuos machos y hembras.

**Estrategia reproductiva:** Conjunto de tácticas que optimizan la reproducción de una especie.

**Fagocito:** Célula sanguínea, capaz de fagocitar bacterias, cadáveres celulares y, en general, de toda clase de partículas nocivas o inútiles para el organismo, incluyéndolas en su citoplasma y digiriéndolas después.

**Folículo gonádico:** Saco rodeado por tejido conectivo transparente, que empaqueta células germinales que al madurar se desarrollan en gametos. Unidad básica de la gónada.

**Lumen:** Espacio interior del folículo gonádico carece de células, se le denomina la luz de dicha estructura.

**Pleamar:** Fin o término de la creciente del mar.

**Sincronizador:** Factor ambiental que ajusta el periodo y la fase de un ritmo endógeno.

**Táctica:** Método o sistema para ejecutar o conseguir algo.

**Bursa:** Saco generalmente a ambos lados de un brazo, contiene las gónadas, también la función respiratoria.

**Disco:** Cuerpo central, que contiene los principales órganos internos.

**Hendidura bursal:** Apertura externa a la bursa.

**Escudo:** Placa grande distal a cada mandíbula, separada de la mandíbula por un par de **placas**, al menos un escudo oral funciona como madreporita, a menudo agrandada y / o con un hidroporo visible.

## RESUMEN

La estrella quebradiza *Ophiocomella alexandri* contribuye de manera importante en procesos biológicos de reciclaje y transformación de energía en el ecosistema, por lo tanto, el aumento o disminución en su abundancia influye sobre la estructura de la comunidad bentónica. Dado que las estrategias reproductivas, son clave en el mantenimiento de las poblaciones marinas y que *O. alexandri* es una especie fotosensible, en este estudio se describió su ciclo reproductivo y evaluó la influencia de la luna para la liberación de sus gametos, realizándose muestreos bimensuales durante la luna llena y nueva de julio del 2015 a junio del 2016 en Bahía de La Paz, B.C.S., México. Además, se obtuvieron datos biométricos mensuales para evaluar el tipo de crecimiento, condición corporal y longitud de primera madurez. Se determinó que la proporción sexual fue de 1M:0.8H ( $Xc^2=4.3$ ) y se observó alta frecuencia de organismos indiferenciados de noviembre a marzo. El análisis de la relación longitud-peso determinó que el crecimiento fue de tipo isométrico, pero los análisis mensuales mostraron alternancia entre el tipo de crecimiento a lo largo del año ( $P=0.336$ ). La condición relativa de los organismos fue casi constante durante todos los meses, mostrando una rápida recuperación por encima de la media después de la liberación de gametos ( $P<0.05$ ). La longitud de primera madurez para sexos combinados fue de 13.7mm, los machos tienden a madurar antes que las hembras, pero la diferencia no fue significativa ( $P>0.05$ ). El desarrollo gonádico en ambos sexos se diferenció en cinco etapas: crecimiento 1 y 2, madurez, liberación de gametos y post-liberación. El ciclo reproductivo de *O. alexandri* se determinó como anual, con una temporada reproductiva de marzo a octubre, que coincidió con el incremento en la temperatura y la presencia de días largos. En agosto y octubre se observaron mayores frecuencias de desove, siendo agosto el de mayor importancia, debido a que se observó alta frecuencia de organismos liberando gametos durante la luna nueva ( $P=0.01$ ). Es probable que, debido a la ausencia de luz en esta fase, los gametos sean menos depredados y la marea viva, favorezca su dispersión, siendo una estrategia reproductiva que favorece el éxito reproductivo de la especie.

Palabras clave: Reproducción, Desove, Luna, Equinodermos, Ofiuroideos.

## ABSTRACT

The brittle star *Ophiocomella alexandri* contributes importantly in biological processes of recycling and energy transformation in the ecosystem, therefore, the increase or decrease in its abundance influences the structure of the benthic community. Since reproductive strategies are key in the maintenance of marine populations and that *O. alexandri* is a photosensitive species, this study describes its reproductive cycle and assesses the influence of the moon in the spawning, taking bimonthly sampling during the full and new moon from July 2015 to June 2016 in Bahía de La Paz, BCS, Mexico. In addition, monthly biometric data were obtained to assess the type of growth, body condition and length of first maturity. The sexual ratio was determined to be 1M: 0.8H ( $Xc2 = 4.3$ ) and the high frequency of undifferentiated organisms was observed from November to March. The analysis of the length-weight ratio determined that the growth was of the isometric type, but the monthly analyzes were affected by the alternation between the type of growth throughout the year ( $P = 0.336$ ). The relative condition of the organisms was almost constant during every month, showing a rapid recovery above the media after the release of the games ( $P < 0.05$ ). The length of first maturity for combined sexes was 13.7 mm, the males affected to mature before the females, but the difference was not significant ( $P > 0.05$ ). Gonadic development in both sexes differed in five stages: growth 1 and 2, maturity, gamete spawning and post-spawning. The reproductive cycle of *O. alexandri* was determined as annual, with a reproductive season from March to October, which coincided with the increase in temperature and the presence of long days. In August and October, higher spawning frequencies were observed, with August being the most important, due to the high frequency of spawning organisms during the new moon ( $P = 0.01$ ). It is likely that due to the absence of light in this phase, the gametes are less depredated, and the live tide favors their dispersion, being a reproductive strategy that favors the reproductive success of the species.

Keywords: Reproduction, Spawning, Moon, Echinoderms, Brittle star.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las estrategias reproductivas de los organismos juegan un papel importante en la dinámica de sus poblaciones y en la continuidad de las especies, éstas involucran una gran cantidad de procesos o tácticas destinadas a incrementar su capacidad de dejar descendencia ([Ramirez, 2002](#)). La adopción de una estrategia reproductiva es la consecuencia de presiones selectivas que involucran una amplia gama de factores tanto internos como externos ([Todd & Doyle, 1981](#)). Esto lleva a las especies a presentar épocas reproductivas más o menos prolongadas, relacionadas con factores ambientales.

Los ciclos reproductivos en invertebrados marinos se encuentran estrechamente relacionados con la latitud, donde, los organismos con distribución más cercana al ecuador presentan una reproducción continua y los que se distribuyen a mayores latitudes, presentan una temporada reproductiva corta ([Hendler, 1991](#); [Mercier & Hamel, 2009](#)). Asimismo, algunas especies de equinodermos difieren geográficamente en sus épocas reproductivas y fases gonádicas, sincronizando la liberación de gametos con ciclos lunares ([Hendler & Meyer, 1982](#); [Iliffe & Pearse, 1982](#); [Glynn et al., 1994](#); [Kubota, 2000](#); [Benítez-Villalobos & Martínez-García, 2012](#)). Si bien conocer estas tácticas de reproducción contribuyen al entendimiento de procesos ecológicos y biológicos del medio marino pocos son los esfuerzos científicos que abarcan esta área ([Granja-Fernández & López-Pérez, 2011](#)). Este es el caso de la estrella quebradiza *Ophiocomella alexandri* (anteriormente *Ophiocoma alexandri*; [O'Hara et al., 2018](#)) de la que se desconoce la influencia de la luna en su ciclo reproductivo. Por esta razón, el presente estudio llena ese vacío en el conocimiento de los equinodermos y aporta información general de su biología reproductiva.

## 2. ANTECEDENTES

*Ophiocomella alexandri* (Figura 1) es una especie dioica con fecundación externa, en la que se ha descrito para las costas de Oaxaca (México) un ciclo reproductivo anual con temporada reproductiva que va de mayo a diciembre. Donde las máximas liberaciones de gametos ocurren en los meses de abril y septiembre ([Benítez-](#)



[Villalobos et al., 2012](#)). Si bien para especies del mismo grupo estas liberaciones masivas son explicadas por los cambios en la fase de la luna, para *O. alexandri* aún no se ha comprobado ([Kennedy & Pearse, 1975](#); [Hendler & Meyer, 1982](#); [Hagman & Vize, 2003](#)).

Ahora bien, esta especie tiene cristales de calcita en la parte posterior de sus brazos que funcionan como fotorreceptores, permitiéndole captar la luz proporcionada por la luna (fotosensible) ([Hendler, 1984](#); [Hendler & Byrne, 1987](#); [Benavides-Serrato & O'Hará, 2008](#)), la cual, ha sido sugerida como señal anticipatoria para la posterior retención o dispersión de gametos, por las corrientes de marea, además, la coincidencia de la ausencia de luz con las liberaciones masivas beneficia a los gametos, manteniéndolos ocultos de depredadores ([Smith, 1940](#); [Hendler, 1991](#); [Numata & Helm, 2014](#)).

La distribución de *O. alexandri* abarca desde la costa del Pacífico Oriental, hasta las islas Galápagos ([Granja-Fernández et al., 2014](#)), sin embargo, no es una especie explotada por alguna pesquería, y por ello carece del análisis biométrico que involucra el tipo de crecimiento, la longitud de primera madurez y su bienestar corporal (K; [Humara-Gil, 2019](#)).



**Figura 1. Ejemplar de *Ophiocomella alexandri*.**

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Ligado a los procesos biológicos de reciclaje y transformación de energía en un ecosistema, *Ophiocomella alexandri* es parte importante en la dieta de crustáceos y peces subyacentes a su distribución ([Warner, 1982](#); [Chartock, 1983](#)). Asimismo, dichos procesos de reciclaje son condicionados por el aumento o disminución de su abundancia, la cual es mantenida a partir de las tácticas reproductivas que esta especie ha incorporado.

### **4. HIPÓTESIS**

Considerando la diferencia en latitudes entre las costas de Oaxaca (donde se sabe que la época reproductiva de *Ophiocomella alexandri* tiene una duración de 8 meses) y nuestra zona de estudio, se espera encontrar una temporada reproductiva más corta. Además, se espera que la liberación de gametos este influenciada por alguna fase lunar, ya que *O. alexandri* presenta adaptaciones morfológicas que le permiten captar la iluminación lunar.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. General**

Describir el ciclo reproductivo de *Ophiocomella alexandri* y determinar si la luna en sus fases llena y/o nueva influyen en la liberación de gametos en Bahía de La Paz, B.C.S.

### **5.2. Específicos**

- A través del análisis biométrico de *O. alexandri*, determinar: el tipo de crecimiento, bienestar corporal y longitud de primera madurez.
- Estimar la proporción sexual.
- Caracterizar los estadios de desarrollo de los ovocitos y describir las fases del desarrollo gonádico de ambos sexos.
- Describir el ciclo reproductivo e identificar la época reproductiva de *O. alexandri* así como su relación con la temperatura.
- Estimar el índice gonadosomático (IGS) y de madurez (IM) de manera mensual.
- Identificar si la liberación de gametos está influenciada por las fases lunares, específicamente luna llena y nueva.

## 6. MÉTODOS

### 6.1. Área de estudio

Hacia la parte sureste de la Bahía de La Paz, frente al Canal de San Lorenzo, se encuentra una pequeña ensenada llamada Punta Galeras ( $24^{\circ}21'11''$  N,  $110^{\circ}17'00''$  W), que fungió como sitio de muestreo (Figura 2). Esta playa se compone principalmente por un sustrato areno-rocoso, algunas cabezas de coral y abundantes rodolitos ([Cintra-Buenrostro et al., 2002](#)), favoreciendo la formación de pozas de marea, y con esto, la presencia de ofiuroides.

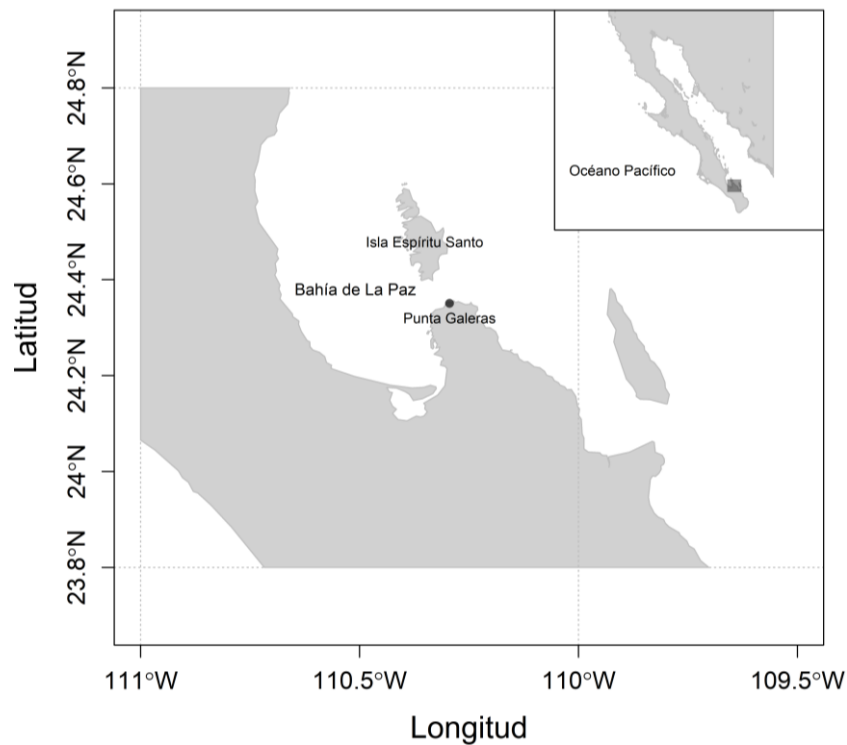


Figura 2. Mapa de La Bahía de La Paz, Punta Galeras (México).

En la zona prevalecen las mismas condiciones ambientales de Bahía La Paz, con un régimen de marea mixto, predominantemente semidiurno ([Obeso-Nieblas, 2003](#)). La temperatura mínima superficial registrada para la bahía en invierno-primavera es de  $20^{\circ}\text{C}$  y la máxima en verano-otoño de  $32^{\circ}\text{C}$  ([Martínez-López et al., 2001](#)).

## 6.2. Obtención de muestras

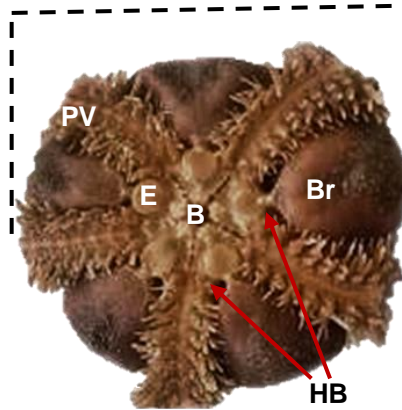
Durante un año, de julio del 2015 a junio del 2016, se llevaron a cabo cuatro muestreos por mes: un día antes y un día después de la luna llena y nueva. La recolecta de organismos adultos se realizó en la zona del intermareal en un ambiente rocoso, durante la marea baja y de manera aleatoria. Obteniéndose en promedio 15 organismos por muestreo y se registró la temperatura del agua, con un termómetro.

Los organismos fueron colocados en agua de mar con hielo para su adormecimiento, posteriormente se fijaron con solución Davidson (Anexo I) durante 24h y se preservaron en alcohol etílico al 70%.

## 6.3. Procesamiento de muestras

En el laboratorio, con una balanza analítica marca ADAM Equipment USA® y un vernier calibrado se realizó la biometría de los organismos, se registró: el peso total y del disco ( $\pm 0.1$ g de precisión) y el diámetro del disco ( $\pm 0.1$ mm de precisión), en donde, se consideró el promedio de dos mediciones perpendiculares y que en análisis posteriores será referenciado como longitud del disco (Figura 3).

Los pesos, así como del diámetro del disco, fueron analizados con la prueba de bondad de ajuste de Kolmogórov-Smirnov para evaluar la normalidad de los datos, también se obtuvo, los valores máximos, mínimos, la media y desviación estándar además del valor de *kurtosis*. Posteriormente, se realizó una prueba de ANDEVA seguido por un análisis *a posteriori* de Tukey utilizando un nivel de significancia del  $P < 0.05$ , esto con la finalidad de conocer si existían diferencias significativas en el peso y el diámetro del disco entre sexos.



**Figura 3. Vista oral del disco de *Ophiocomella alexandri*.** Línea punteada referencia de la toma de medida del diámetro del disco. Abreviaturas: B: boca, Br: bursa, E: escudo, HB: hendiduras bursales PV: placas ventrales.

Para la extracción de la gónada, se realizó una incisión en la región oral de los discos, siguiendo el sentido de las placas ventrales de los brazos e iniciando en las hendiduras bursales (Figura 3). Se registró el peso de la gónada ( $\pm 0.1$ g de precisión) y se analizó de la misma forma que las medidas morfométricas antes mencionadas. Posteriormente una porción se colocó en un histocasette para su procesamiento histológico. La gónada restante junto con el disco se etiquetó y almacenó en alcohol al 70% en el Laboratorio de Biología de Invertebrados Marinos del CICIMAR.

#### 6.4. Relación longitud-peso

Para la relación de la longitud del disco vs el peso del disco se utilizó el modelo potencial ([Huxley & Tessier, 1936](#)):

$$Pd = aLd^b$$

en donde  $Pd$  es el peso del disco (g),  $Ld$  es el diámetro del disco (mm),  $a$  es el intercepto y  $b$  es la pendiente, también considerado como el coeficiente de alometría. Se llevo a cabo la transformación de los datos aplicando logaritmo natural ([Huxley, 1924](#); [Robinson et al., 2010](#)), para reducir la varianza. Con los datos transformados se aplicó un modelo lineal. Se calculó el coeficiente de determinación  $R^2$ , como medida de bondad de ajuste con intervalos de confianza del 95%. A partir de los gráficos de la

ecuación, se identificaron y eliminaron los “datos atípicos”, es decir, los que estuvieron por fuera de los intervalos de confianza ([De la Hoz-M et al., 2009](#)) y se recalculó el coeficiente de determinación, Posteriormente se aplicó el modelo potencial. Mediante una prueba de *t-student* ([Zar, 2010](#)):

$$t = \frac{b - 3}{EE_b}$$

Donde: *b* es la pendiente estimada, 3 es el coeficiente teórico de isometría y  $EE_b$  es el error estándar de la pendiente, se evaluó si *b* no difirió del coeficiente teórico de tres, lo cual indicaría un crecimiento isométrico, es decir, el crecimiento relativo de ambas variables sería idéntico ([Quinn II & Deriso, 1999](#)). Cuando *b* es significativamente < 3 el organismo tiene un crecimiento alométrico negativo, lo que significa que la ganancia de peso sería menor a la ganancia de longitud y en el caso contrario, si el valor de *b* fuese significativamente > 3 su crecimiento se considera como alométrico positivo, siendo mayor la ganancia de peso con relación a la longitud ([Shingleton et al., 2009](#)). Se elaboró una tabla con los parámetros estimados entre sexos y combinados.

### 6.5. Factor de condición (K)

Para conocer el estado de los organismos de acuerdo con su tamaño se calculó el factor de condición relativo ([Le Cren, 1951](#)):

$$K = \frac{Pd}{aLd^b}$$

En donde si *K* es igual a uno, el peso observado de un individuo es igual al peso promedio de los individuos de su misma longitud. Dicho factor, utiliza los parámetros, previamente descritos en el modelo potencial. Se estimó la relación longitud-peso de los organismos de manera mensual para la obtención de *a* y *b* (Anexo IV) y los intervalos de confianza al 95% ([Duarte et al., 2015](#)) mediante el método de Bootstrap acelerado con corrección de sesgo ([Efron, 1987](#)).

## 6.6. Índice gonadosomático (IG)

Por último, como medida del estado reproductivo de los organismos, se calculó el índice gonadosomático (IG) de manera mensual; que es la relación entre el peso de la gónada (Pg) y el peso total (Pt) del organismo ([Lasker & Giese, 1954](#); [Patent, 1969](#)):

$$IG = \frac{Pg}{Pt} * 100$$

Es importante mencionar que este índice da una buena aproximación del tamaño relativo de la gónada, pero no de la condición real de los gametos ([Patent, 1969](#)).

## 6.7. Proceso histológico

Se aplicó la técnica histológica convencional: la deshidratación del tejido gonádico se realizó en un procesador de tejidos Leica ASP6025® (Anexo II). Una vez terminado el proceso, el tejido se colocó en bloques mediante el uso del centro de inclusión Leica Histo Core Arcadia®, donde se llevó a cabo la inclusión del tejido gonádico y la formación de bloques de parafina. Después, se realizaron cortes de un grosor de 3 µm con un micrótopo de rotación semiautomático Leica RM2245®, para obtener una preparación de cuatro a seis cortes ya montados. Los cortes se tiñeron en el centro de tinción Leica ST5020® siguiendo el protocolo de tinción de hematoxilina-eosina ([Humanson, 1962](#)) (Anexo III) y se montaron en portaobjetos con Cytoseal®.

## 6.8. Caracterización de células germinales y fases de desarrollo gonádico

Las preparaciones fueron revisadas en un microscopio óptico marca Leica DM4B®, acondicionado con una cámara Leica DMC2900® lo que permitió la toma de fotografías en por lo menos tres campos de observación aleatorios de la gónada.

La caracterización de las células germinales y de los estadios de desarrollo se realizaron con base en los criterios establecidos por [Benítez-Villalobos et al. \(2012\)](#), [Méndez-Aquino \(2016\)](#) y con observaciones personales. Para la descripción del ciclo gonádico en ambos sexos se utilizó la clasificación propuesta en la literatura ([Aguilar-Duarte, 2011](#); [Méndez-Aquino, 2016](#)). La época reproductiva fue definida



considerando los meses donde los organismos fueron observados en fase de madurez y liberación.

El ciclo reproductivo de *Ophiocomella alexandri* se relacionó con la temperatura mensual, con los índices gonadosomático (IGS) y de madurez (IM), así como con el promedio de horas luz mensual (obtenido en: [TuTiempo.Net, 2019](#)).

A partir de las fotografías y usando el software SCAN PRO-5.0 se midió el área de los ovocitos, en los cuales el núcleo fue visible y posteriormente se obtuvo el diámetro a partir del despeje de la fórmula para el área de un círculo. Para cada fase de desarrollo, se realizó la clasificación y medición de 100 ovocitos, los cuales se obtienen contando 10 ovocitos por fotografía, es decir, las mediciones se realizaron a partir de 10 fotografías por fase de desarrollo.

Considerando que en algunos estudios reproductivos de ofiuroides no se reporta el IG y para tener un punto de comparación, se calculó el índice de madurez (IM) de [Yoshida \(1952\)](#) de manera mensual ([Patent, 1969](#)), considerando las fases de desarrollo gonádico, donde la fórmula que se utilizará es:

$$IM = \frac{\sum_{n=1}^k nN_{fn}}{N_t} ; k = \#fase$$

## 6.9. Proporción de sexos

La identificación del sexo se hizo a partir de la revisión histológica de las laminillas, con el reconocimiento de células germinales masculinas y femeninas. La proporción de sexos se estimó dividiendo el número total de machos entre el número total de hembras. Esta relación se analizó mediante la prueba Chi cuadrada con modificación de continuidad de Yates ( $Xc^2$ ), para determinar si existe diferencia significativa de la proporción teórica 1H: 1M ( $H_0$ ). El rechazo de la proporción teórica se realizó con un nivel de significancia de  $P < 0.05$ , donde el valor de  $Xc^2$  obtenido fuera mayor a 3.86 ([Sokal & Rohlf, 1979](#)).

### 6.10. Longitud de primera madurez ( $Ld_{50}$ )

Se realizó la estimación de la longitud de primera madurez ( $Ld_{50}$ ) para ambos sexos y de manera conjunta. Teniendo como variable de respuesta binomial la madurez, donde se considera a los organismos indiferenciados y en crecimiento 1 y 2 como organismos inmaduros y al resto, como organismos maduros, los organismos indiferenciados se suprimieron para la estimación por separado de machos y hembras; como variable explicativa cuantitativa se consideró la longitud del disco ([Le Cren, 1951](#)). Dado que se cuenta con una variable binomial se requiere de una transformación logística, que permita el ajuste de los datos al modelo ([Ogle, 2013](#)).

$$\text{logit}(p) = \log\left(\frac{p}{1-p}\right)$$

Donde  $p$  representa la probabilidad de que los organismos sean maduros y  $1-p$  de que sean inmaduros. Haciendo la transformación lineal del modelo entonces tenemos:

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \alpha + \beta_1 Ld$$

$\alpha$  y  $\beta$  son los parámetros de la función logística y  $Ld$  es la longitud del disco. El ajuste de la regresión logística se realizó con ayuda de un modelo lineal generalizado considerando una distribución de tipo binomial. Para el cálculo de los intervalos de confianza de los parámetros de la regresión logística se utilizó un remuestreo por el método de bootstrap. Por lo que la probabilidad predicha de que ser maduro en un valor dado de la variable explicativa se calcula con:

$$p = \frac{e^{\alpha + \beta_1 Ld}}{1 + e^{\alpha + \beta_1 Ld}}$$

Dado que se busca encontrar la longitud del disco a la cual el 50% de los organismos son maduros, la formula general para encontrar esta medida se reduce a:

$$Ld_{50} = \frac{\alpha}{\beta_1}$$

Los parámetros estimados se organizaron en forma de tabla.

### **6.11. Relación del ciclo reproductivo y las fases lunares**

Debido a que la frecuencia relativa de la fase de liberación de gametos no varió al considerar los cuatro muestreos mensuales, los datos se unieron y se consideraron para su posterior análisis datos por cada luna llena y nueva, es decir, dos muestreos por mes.

La influencia de las fases lunares en la liberación de gametos se exploró, considerando sólo la frecuencia relativa de la fase de liberación de gametos por cada luna llena y nueva y se aplicó una prueba de Chi cuadrada ( $X^2$ ) para determinar si existía diferencia significativa entre los organismos que liberaban sus gametos durante alguna de las lunas vs los que no lo hacían. La prueba se realizó considerando un nivel de significancia de  $P < 0.05$  ([Zar, 2010](#)).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Biometrías

Se recolectaron un total de 657 organismos, con pesos totales y del disco, que variaron entre los 0.2 a 18.9 g y de los <0.01 a 4.0 g respectivamente y tallas entre los 4.6 a 24.7 mm de diámetro de disco. En la Tabla I, se muestran los valores obtenidos para machos, hembras y sexos combinados y los resultados de la prueba de normalidad para cada variable. A pesar de que no hubo diferencia significativa ( $P>0.05$ ) en ninguna variable entre sexos, las hembras presentaron mayores medias y desviaciones estándar, así como rangos más amplios (valores más pequeños y grandes) para las cuatro variables. La kurtosis entre los sexos y de manera combinada fue semejante para las cuatro variables, presentando todas diferente grado de concentración de los datos, es decir comportamiento leptocúrtico, siendo el peso del disco la variable con el valor más alto y el diámetro del disco la variable con un comportamiento más cercano al mesocúrtico.

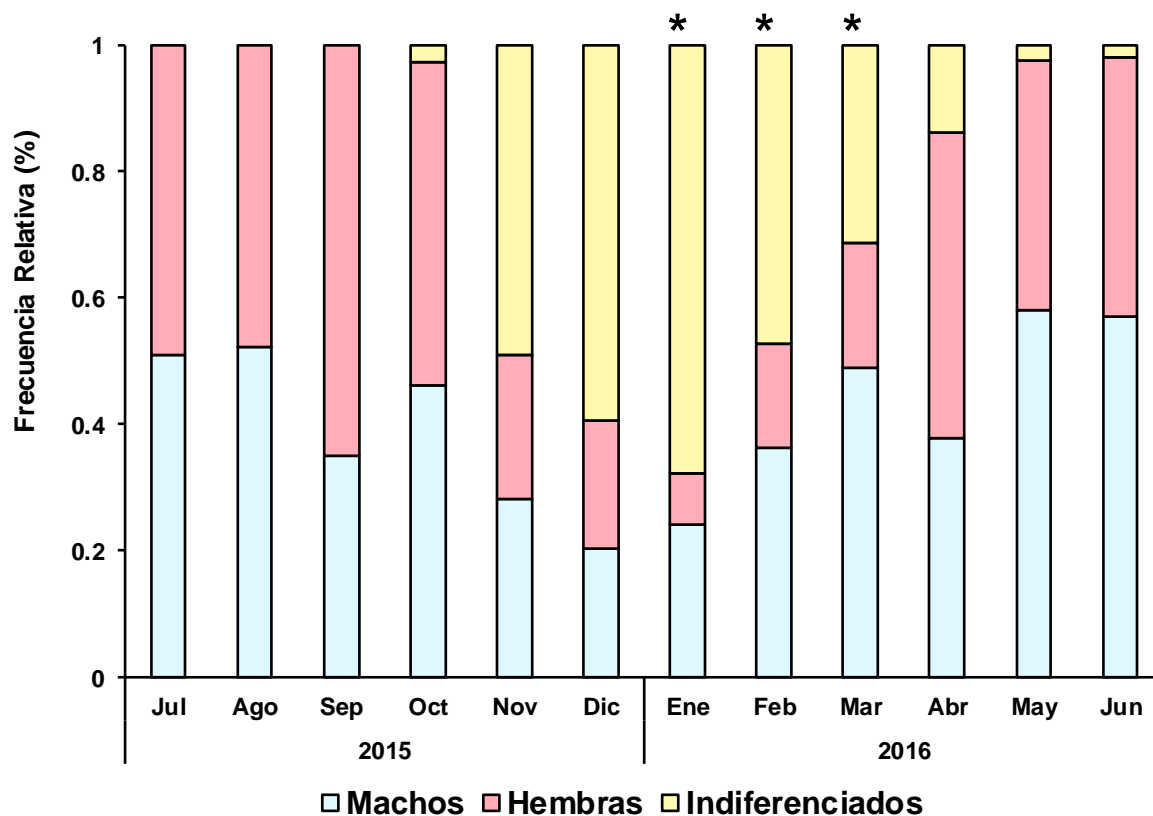
Tabla I. Análisis de las biometrías de *Ophiocomella alexandri*, por sexos.

Sexo	Variable	n	$\bar{x}$	sd	min	max	Kurtosis	K-S
Machos	Peso total (g)	259	5.7	2.8	0.4	16.3	1.2	>0.05
	Peso del disco (g)		1.0	0.6	0.1	3.5	3.8	<0.05
	Peso de la gónada (g)		0.24	0.2	0.0	1.27	3.9	<0.05
	Diámetro del disco (mm)		13.7	3.0	5.6	23.3	0.5	>0.05
Hembras	Peso total (g)	214	6.0	3.1	0.2	18.9	1.2	>0.05
	Peso del disco (g)		1.1	0.7	0.0	4.0	3.8	<0.05
	Peso de la gónada (g)		0.27	0.2	0.0	1.32	-0.2	<0.05
	Diámetro del disco (mm)		14.4	3.4	4.6	24.7	0.4	>0.05
Combinados	Peso total (g)	657	5.5	2.8	0.2	18.9	1.2	<0.05
	Peso del disco (g)		0.9	0.6	0.0	4.0	3.8	<0.05
	Peso de la gónada (g)		0.21	0.2	0.0	1.54	3.4	<0.05
	Diámetro del disco (mm)		13.5	3.2	4.6	24.7	0.5	>0.05

### 7.2. Proporción sexual

Del total de organismos recolectados, se pudo establecer el sexo de 626, de los cuales: 259 fueron machos (41%), 214 fueron hembras (34%) y 153 fueron indiferenciados

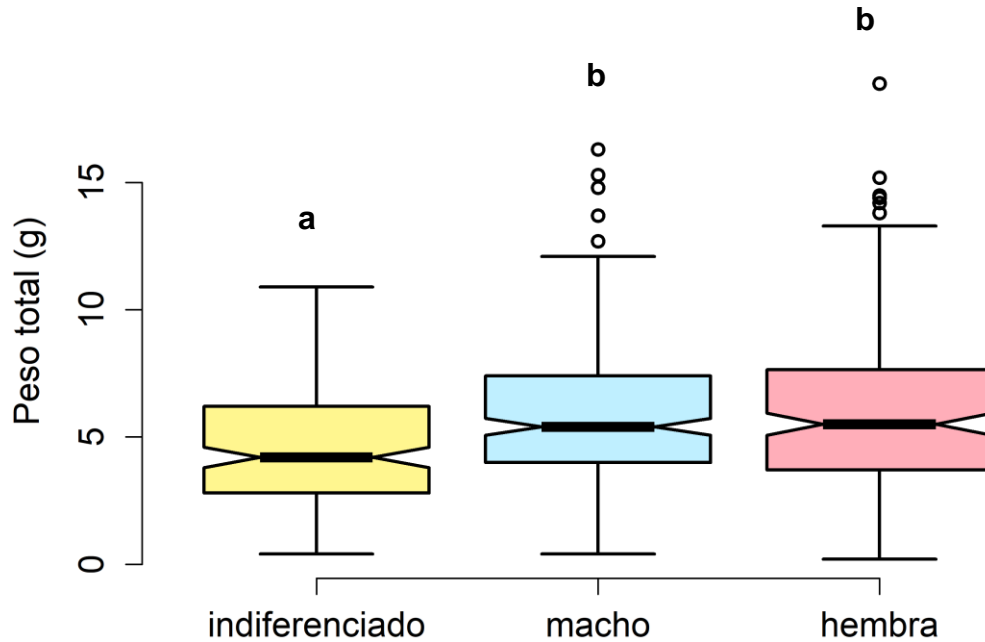
(24%; Figura 4). Los organismos que se identificaron como indiferenciados carecían de folículos gonádicos o bien las células germinales eran irreconocibles, se encontraron durante los meses de octubre del 2015 a junio del 2016, siendo más abundantes de noviembre del 2015 a marzo del 2016. La proporción sexual total fue 1M:0.8H ( $Xc^2=4.3$ ) por lo que refleja diferencia significativa con la proporción teórica 1M:1H, a diferencia de lo que ocurrió en la mayoría de los meses, en donde no se encontraron diferencias significativas, excepto en los meses de enero a marzo, en donde, la proporción de machos superó a la de hembras - 1:0.3, 1:0.5 y 1:0.4 respectivamente- ( $Xc^2=5.0, 4.2, 6.4$ ).



**Figura 4. Proporción sexual por mes de *Ophiocomella alexandri*.** Los asteriscos indican una proporción de sexos diferente de 1:1.

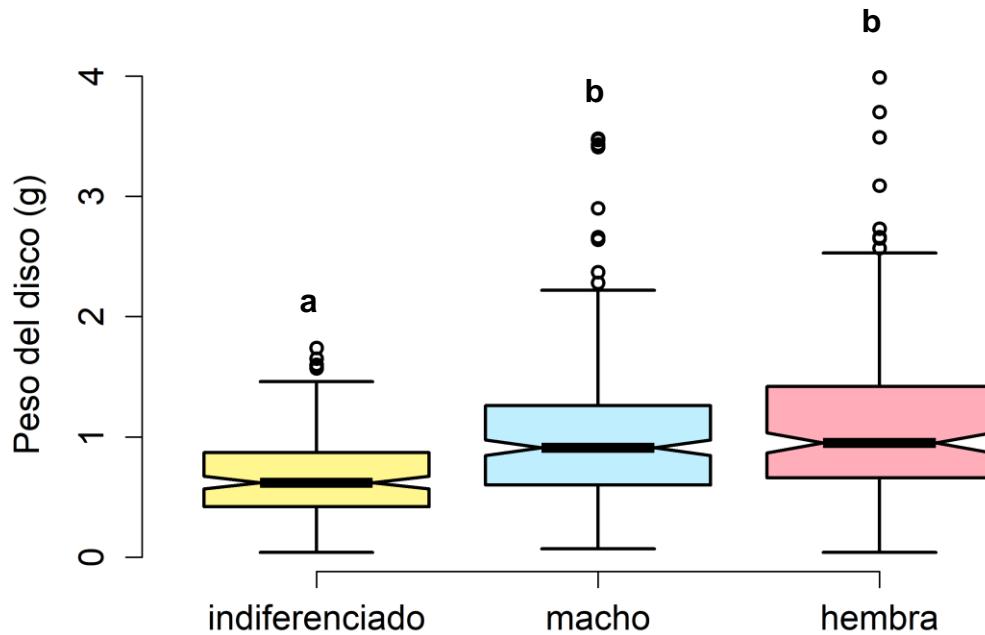
Considerando de manera independiente el peso total de los organismos, no existieron diferencias significativas entre machos y hembras ( $P>0.05$ ), en contraste de lo

observado con los organismos indiferenciados, donde su peso total fue significativamente menor que machos y hembras ( $P=2.6 \times 10^{-6}$ ; Figura 5).



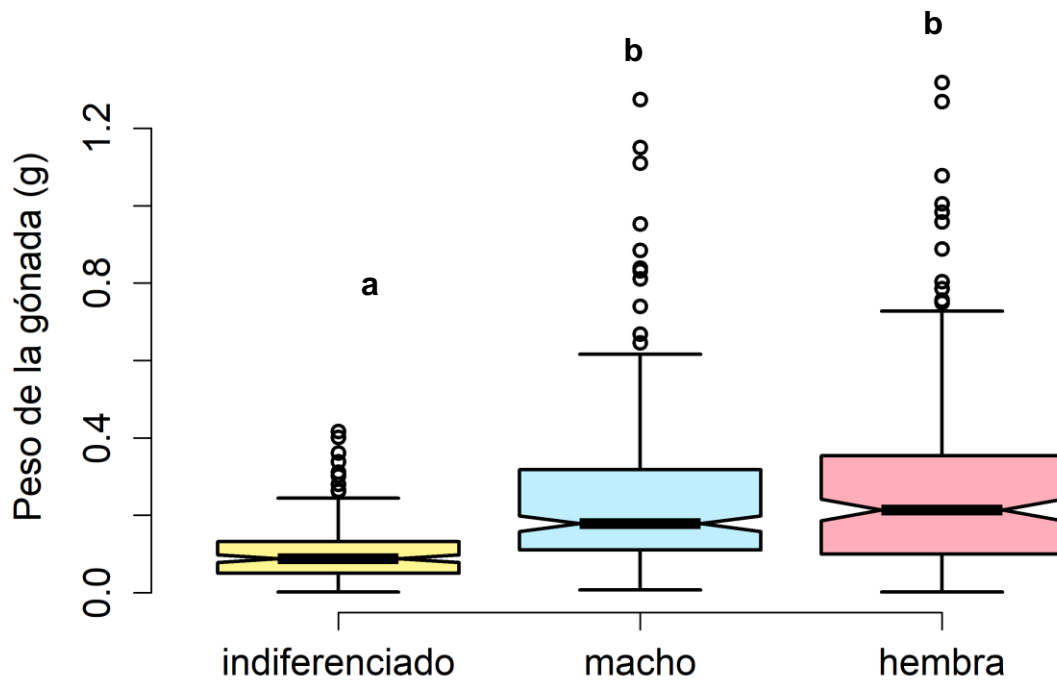
**Figura 5. Boxplot del peso total por sexos de *Ophiocomella alexandri*.** El diagrama incluye los intervalos de confianza al 95% para las medianas del peso total por sexo con líneas inclinadas. Letras diferentes indican diferencias significativas.

De igual manera que para el peso total, el análisis por sexos del peso del disco indicó que los organismos indiferenciados son significativamente más pequeños que los machos y las hembras ( $P < 0.05$ ) y que entre machos y hembras no existe diferencia significativa en el peso de sus discos ( $P > 0.05$ ; Figura 6).



**Figura 6. Boxplot del peso del disco por sexos de *Ophiocomella alexandri*.** El diagrama incluye los intervalos de confianza al 95% para las medianas del peso del disco por sexo con líneas inclinadas. Letras diferentes indican diferencias significativas.

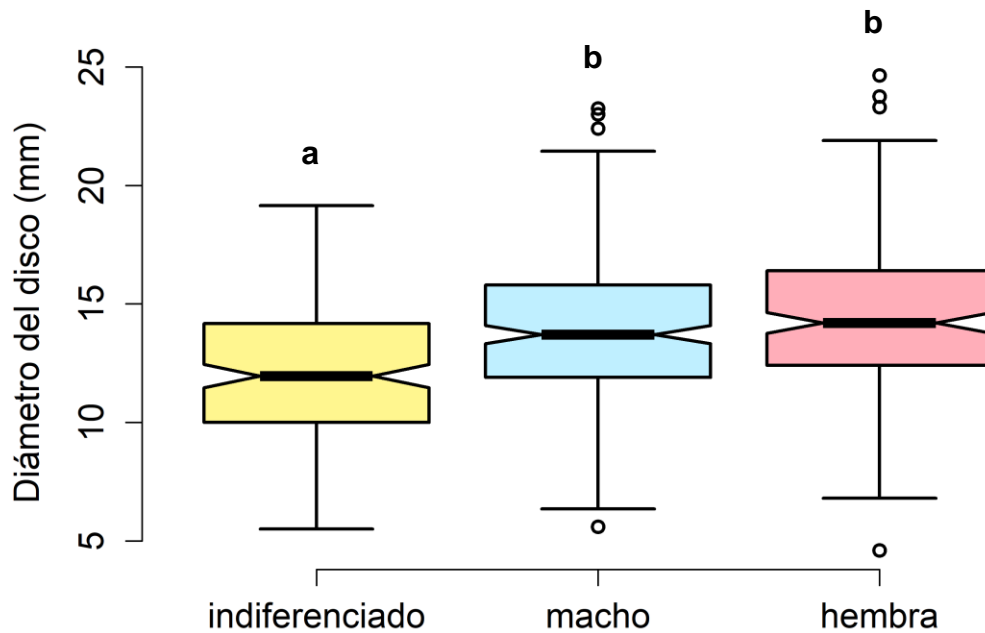
En cuanto al análisis por sexos del peso de la gónada los organismos indiferenciados también fueron significativamente más pequeños machos y hembras ( $P < 0.05$ ) y entre machos y hembras no existe diferencia significativa en el peso de la gónada ( $P = 1.7 \times 10^{-14}$ ; Figura 7).



**Figura 7. Boxplot del peso de la gónada por sexos de *Ophiocomella alexandri*.** El diagrama incluye los intervalos de confianza al 95% para las medianas del peso de la gónada por sexo con líneas inclinadas. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Seguendo el comportamiento de los pesos, el análisis del diámetro del disco señala diferencias significativas entre organismos indiferenciados vs machos y hembras ( $P < 0.05$ ) siendo nuevamente los organismos indiferenciados más reducidos que el resto, en la comparación entre machos y hembras, se encontraron diámetros del disco similares ( $P = 5.9 \times 10^{-12}$ ; Figura 8).

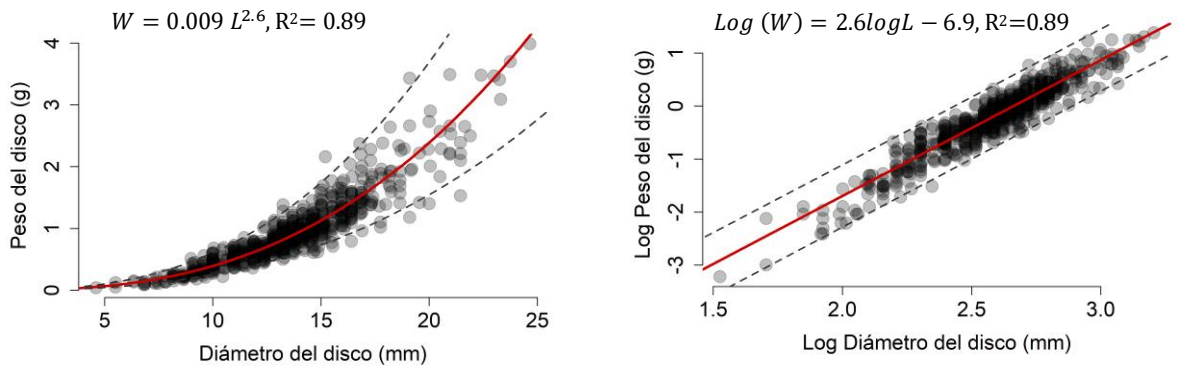




**Figura 8. Boxplot del diámetro del disco por sexos de *Ophiocomella alexandri*.** El diagrama incluye los intervalos de confianza al 95% para las medianas del diámetro del disco por sexo con líneas inclinadas. Letras diferentes indican diferencias significativas.

### 7.3. Relación longitud-peso

La relación longitud-peso fue estimada por sexos y de manera combinada (Tabla II). El ajuste de la relación de los sexos combinados fue alto, tomando en consideración que se obtuvo una  $R^2=0.89$ , por lo que se explica un porcentaje elevado de la varianza del peso (Figura 9).



**Figura 9. Relación longitud-peso de *Ophiocomella alexandri*.** Se presenta el modelo potencial (izquierda), cuyos parámetros fueron calculados a partir de los obtenidos mediante el ajuste lineal de los datos transformados logarítmicamente (derecha).

Para todos los casos, la relación indicó un crecimiento de tipo isométrico ya que el coeficiente de alometría  $b$  no tuvo diferencia estadística del valor teórico de tres ( $P > 0.05$ ; Tabla II). Por otro lado, el ajuste de las relaciones de machos y hembras también fue alto, explicando un porcentaje elevado de la varianza del peso (Tabla II).

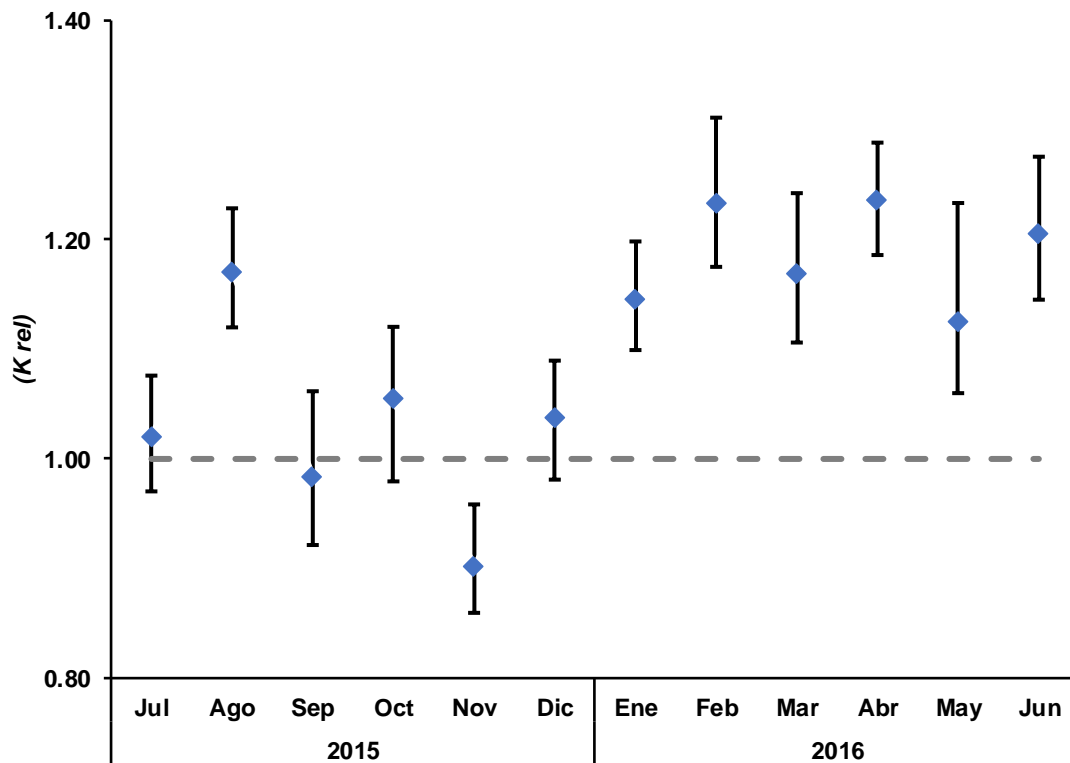
**Tabla II. Parámetros estimados y tipo de alometría de la relación longitud-peso de *Ophiocomella alexandri*, por sexos.**

Sexo	n	a	b	EE <sub>b</sub>	R <sup>2</sup>	t	gL	p-valor	Alometría
Machos	247	0.0009	2.61	1.068	0.86	-0.412	245	0.340	Isométrico
Hembras	200	0.0009	2.61	1.056	0.92	-0.417	198	0.339	Isométrico
Combinados	622	0.0009	2.60	1.037	0.89	-0.424	620	0.336	Isométrico

#### 7.4. Factor de condición (K)

La condición relativa de *O. alexandri* se mantuvo casi todos los meses en/ o por encima del valor esperado estadísticamente, con excepción del mes de noviembre 2015 donde su condición relativa fue significativamente menor de lo esperado ( $P < 0.05$ ). A partir del mes de diciembre 2015 y hasta febrero 2016, donde se presentó la condición relativa

máxima, los valores de  $K$  relativa fueron significativamente mayores a noviembre ( $P < 0.05$ ), posteriormente, de marzo a junio 2016 la condición no tuvo variaciones significativas entre meses, pero sí fueron significativamente mayores al valor esperado ( $P < 0.05$ ) al igual que en agosto. En los meses de julio, septiembre y diciembre del 2015,  $K$  relativa no difirió estadísticamente de lo esperado ( $P > 0.05$ ; Figura 10).



**Figura 10. Variabilidad mensual de la condición relativa (K) de *Ophiocomella alexandri* en Bahía de La Paz.** La línea segmentada representa la condición promedio esperada para individuos de los tamaños observados en cada mes. Las barras de error corresponden a los intervalos de confianza del 95%.

### 7.5. Caracterización de los estadios de desarrollo de los ovocitos

Caracterizar los estadios del desarrollo de los ovocitos se basó en la diferenciación de las células germinales femeninas con relación a su estado de madurez: ovogonias (Og), ovocitos previtelogénicos (Op; primarios y secundarios), ovocitos vitelogénicos (Ov) y ovocitos atrésicos (Oa).

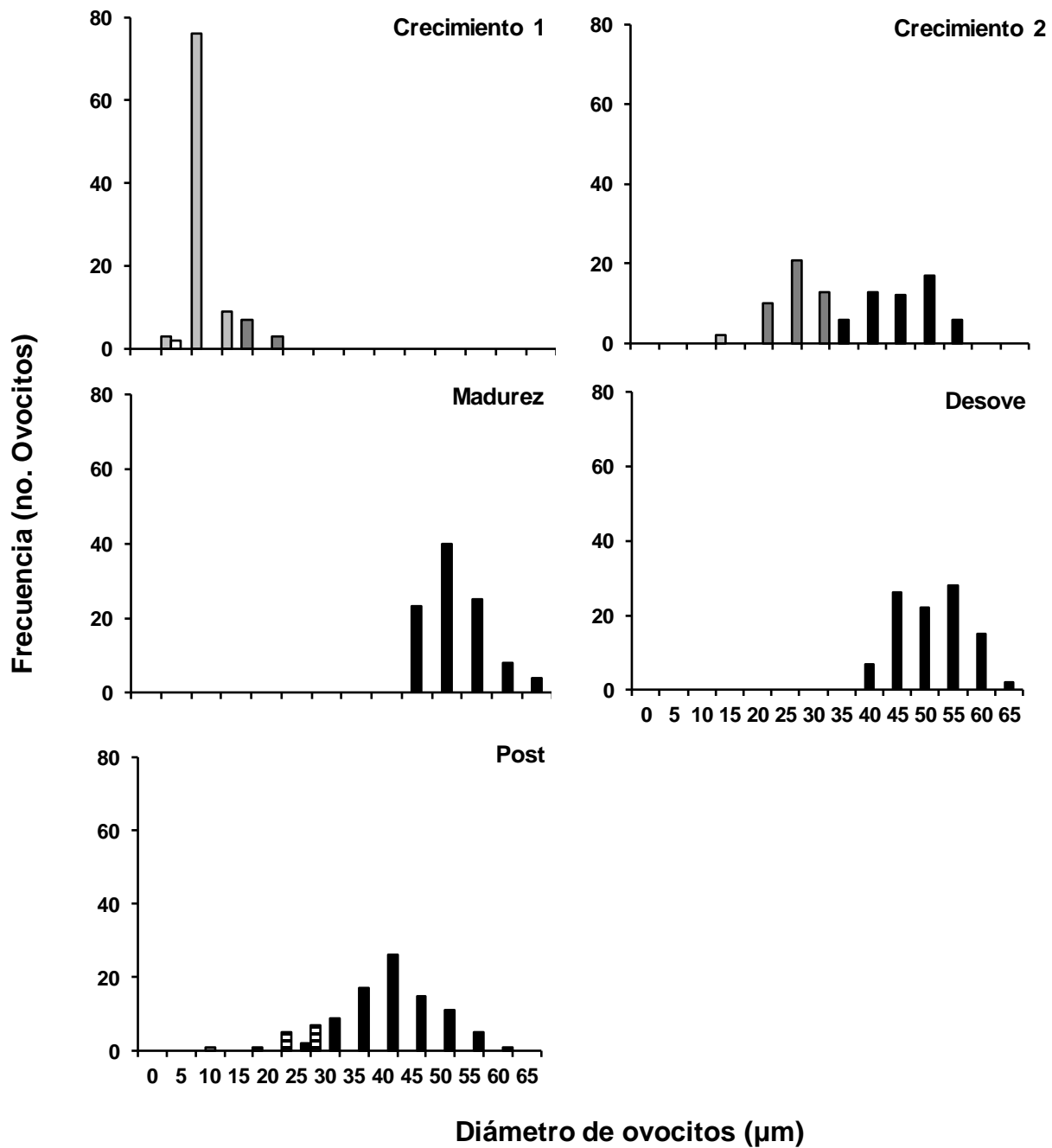
Las ovogonias (Og) se pueden diferenciar, cuando presentan un color violeta intenso, resultado de que el núcleo basófilo ha ocupado la mayor parte del citoplasma. Se les asocia al epitelio germinal, aunque no es sencilla su identificación debido a su tamaño ( $\bar{x}= 4.8 \pm 0.0 \mu\text{m}$ ), es posible observarlas durante las fases de crecimiento 1 y 2 (Figura 11, Figura 13 A y B).

Los ovocitos previtelogénicos (Op), se observaron más grandes, ya que tanto el núcleo como el citoplasma aumentan de tamaño (Figura 11). En ese estado el citoplasma es visible y presenta una tonalidad rosácea, a diferencia del núcleo que sigue siendo violeta intenso. De modo que, se encuentran presentes en diferente grado de crecimiento, durante las fases 1 y 2 (Figura 13 A y B) y con base a su estado fueron clasificados en primarios ( $\bar{x}= 7.9 \pm 2.1 \mu\text{m}$ ) y secundarios ( $\bar{x}= 21.1 \pm 5.0 \mu\text{m}$ ).

Los ovocitos vitelogénicos (Ov) son las células de mayor tamaño ( $\bar{x}= 45.1 \pm 7.6 \mu\text{m}$ ) (Figura 11), su acomodo en el folículo los mantiene muy juntos y provoca su deformación. Se distinguen por tener gran parte del citoplasma ocupado por gránulos de vitelo, por lo que su coloración fue cada vez más rosácea (Figura 13 C y D). El núcleo se ubicó hacia el polo animal y dentro fue posible observar el nucléolo con una coloración violeta intensa. Estos son característicos de la fase de madurez y desove, aunque se comienzan a observar desde la fase de crecimiento 2 y en ocasiones no se liberan todos durante el desove, de modo que se pueden observar también durante la post-liberación.

Por último, los ovocitos atrésicos (Oa;  $\bar{x}= 24.2 \pm 3.3 \mu\text{m}$ ) que son ovocitos que no se liberaron o bien no alcanzaron el desarrollo adecuado. Presentan deformaciones, debido a que se encuentran en un proceso de atresia folicular, mediante la cual son reabsorbidos por fagocitos; por sus características se les observó únicamente durante la post-liberación (Figura 13E).

Como los estados de desarrollo de los ovocitos se presentan de manera progresiva a lo largo de las fases de desarrollo gonadal, fue posible corroborar la determinación de las fases relacionadas con el crecimiento de los ovocitos (Figura 11).



**Figura 11. Distribución de las frecuencias del diámetro de ovocitos por fase de desarrollo gonádico.** Ovogonias (barra blanca), ovocitos previtelogénicos primarios y secundarios (barras grises), ovocitos vitelogénicos (barra negra) y ovocitos atrésicos (barra en trama). La n=100 por cada fase de desarrollo.

### 7.6. Fases del desarrollo gonádico

En cada bursa existe una gónada que se divide en dos lóbulos que desembocan en un poro genital común, cada lóbulo orientado a un costado de las hendiduras bursales;

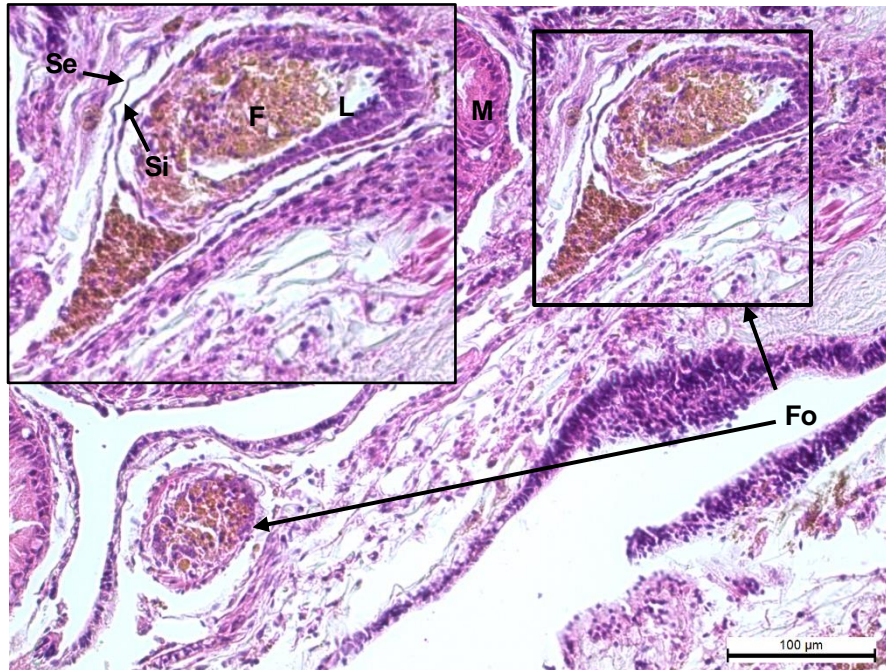
es decir, por cada organismo se tiene un total de diez lóbulos. La gónada de manera macroscópica puede describirse como un saco compacto y traslucido, que contiene un gran número de sacos de menor tamaño llamados folículos, cuyo color en organismos fijados, varió en tonos de beige.

A nivel microscópico, cada folículo tiene una pared compuesta por dos capas de tejido, un saco externo (Se) y un saco interno (Si), separados por el celoma genital. El espacio entre los sacos es una característica que va variando en las distintas fases del desarrollo gonádico. En el caso de la gónada femenina (Figura 13), se observó que los folículos presentes correspondían a la misma fase de desarrollo gonadal, a diferencia de los machos, donde es posible observar folículos en fases diferenciales del desarrollo gonadal (Figura 14).

Considerando las características de los folículos gonádicos, se determinaron cinco fases de desarrollo gonádico para ambos sexos (crecimiento 1, crecimiento 2, madurez, liberación de gametos y post liberación), y una fase de indiferenciados, las cuales se describen a continuación:

### **Indiferenciados**

El folículo pierde tamaño y forma, su saco interno (Si) y externo (Se) son delgados, en algunos casos se observó un lumen (L) grande y en otros el lumen se encontró lleno de fagocitos (Fa). Dado que la gónada se encuentra pegada al sistema digestivo es posible encontrar en los cortes histológicos paquetes musculares asociados a este sistema. El folículo carece de células germinales o bien son difíciles de distinguir, debido a su bajo número (Figura 12).



**Figura 12. Fotografía representativa de organismos indiferenciados de *Ophiocomella alexandri*.** F: fagocitos, Fo: folículo, L: lumen, M: músculo intestinal, Se: saco externo, Si: saco interno. Barra de escala= 100  $\mu$ m. En el recuadro izquierdo superior se muestra un aumento del recuadro derecho.

### 7.6.1. Hembras

#### Crecimiento 1

En esta fase, el espacio entre el saco interno (Si) y externo (Se) está reducido. Se encuentran una gran cantidad de ovocitos primarios, secundarios y previtelogénicos (Op), siendo los ovocitos primarios y secundarios los más abundantes, distribuidas entre los ovocitos, se encuentran células nutritivas. El epitelio germinal rodea a los ovocitos y cubre el espacio entre ellos; sin embargo, el lumen (L) representó por lo menos una tercera parte del folículo y su reducción se realizó de forma regular de la periferia hacia el centro, con algunos parches (Figura 13A).

#### Crecimiento 2

Durante el crecimiento 2 el espacio entre el saco interno (Si) y externo (Se) se mantuvo reducido. Son dos las características que diferencian a esta fase de la anterior: la primera, es la presencia de ovocitos vitelogénicos (Ov) y la segunda, es la ausencia

de lumen (L), el cual ya ha sido ocupado por diferentes células germinales (Og). Inmersas entre el epitelio germinal, también encontramos células nutritivas (Cn; Figura 13B).

### **Madurez**

La fase de madurez se caracterizó por la presencia casi única de ovocitos vitelogénicos (Ov). El crecimiento de estas células fue tal, que el folículo se hinchó y las células se deformaron al estar unas contra otras. El espacio entre el saco interno (Si) y externo (Se) se reduce aún más y el lumen sigue ausente (Figura 13C).

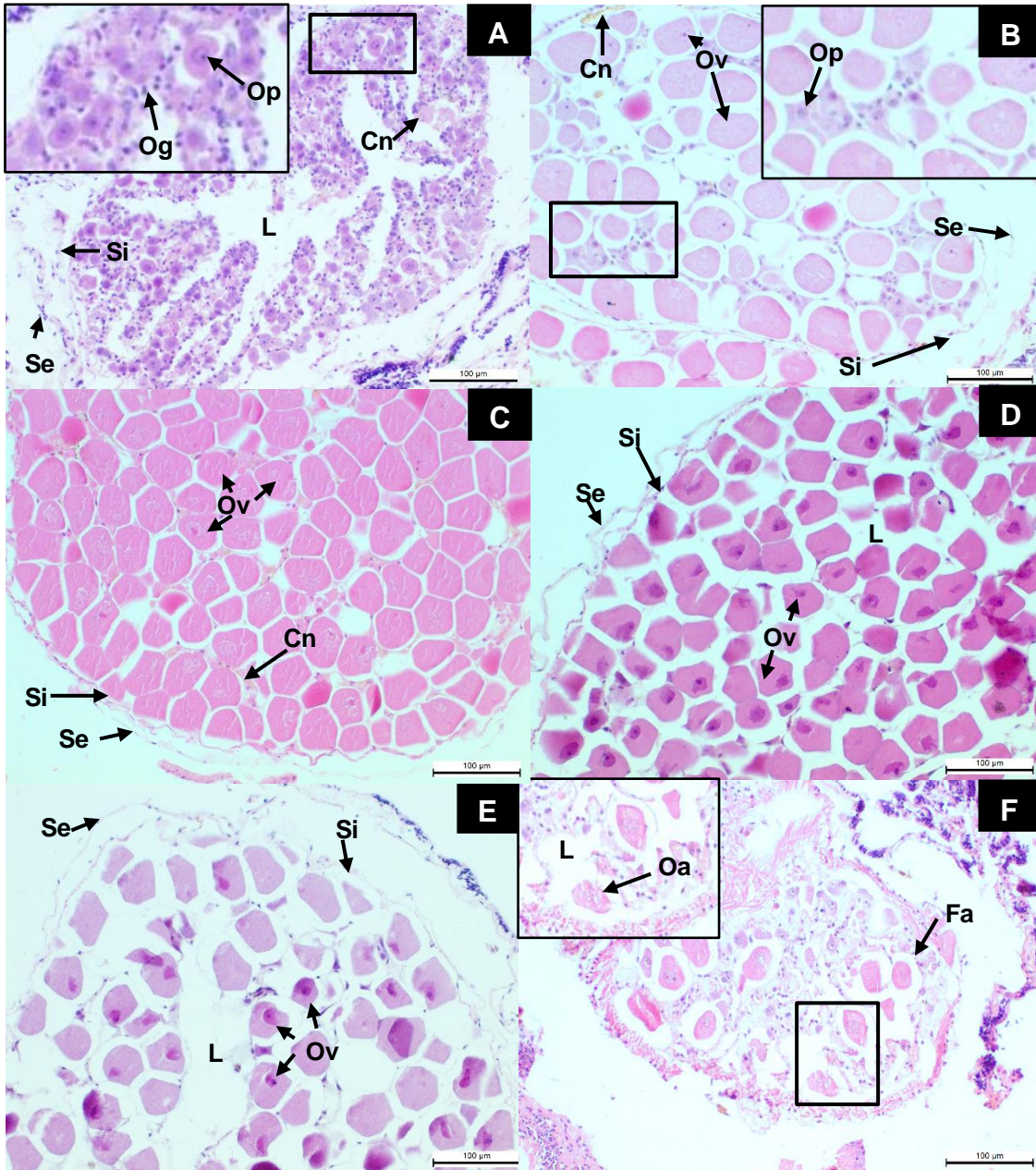
### **Liberación de gametos**

En la liberación de gametos fue evidente la presencia de espacios vacíos dentro del folículo, producidos por la liberación de ovocitos vitelogénicos (Ov). En tanto más avanzada se encontró esta fase, se observó el engrosamiento del espacio entre el saco interno (Si) y el externo (Se) y la deformación del folículo (Figura 13D y E).

### **Post-liberación**

La fase de post-liberación se caracterizó por el engrosamiento de la pared del folículo y por el aumento en el espacio entre el saco interno (Si) y externo (Se). El folículo se encontró deformado ante la ausencia de ovocitos, sin embargo, aún se observaron algunos ovocitos vitelogénicos (Ov) que no fueron liberados, ovocitos atrésicos (Oa) y fagocitos (Fa). El tamaño del folículo se ve reducido (Figura 13F).





**Figura 13. Fases del desarrollo gonádico en hembras de *Ophiocomella alexandri*.** A: crecimiento 1, B: crecimiento 2, C: madurez, D y E: liberación de ovocitos y F: post liberación. Cn: células nutritivas; Fa: fagocitos; L: lumen; Oa: ovocitos atrésicos; Og: ovogonias; Op: ovocitos previtelogénicos; Ov: ovocitos vitelogénicos; Se: saco externo; Si: Saco interno. Barra de escala= 100 µm.

## **7.6.2. Machos**

### **Crecimiento 1**

En esta fase el espacio entre el saco interno (Si) y externo (Se) fue amplio, seguido por una capa espermática (Ce) gruesa, donde los espermatoцитos primarios (Ep) y secundarios (Es) están contenidos. En el lumen (L) los fagocitos (Fa) se observaron dispersos y hacia el centro del lumen una agrupación de espermatozoides (Es) fue creciendo conforme más avanzada se encontró la fase de madurez (Figura 14A).

### **Crecimiento 2**

Durante el crecimiento 2 el espacio entre el saco interno (Si) y externo (Si) se redujo y el tamaño del folículo aumenta. La capa espermática (Ca) se conserva, pero reducida en espesor, se observaron espermatoцитos primarios (Ep) y secundarios (Es) en menor cantidad. El lumen se observó ocupado en su mayoría por espermatozoides (Es), sin embargo, se conservó una franja del lumen entre la capa espermática y los espermatozoides (Figura 14B).

### **Madurez**

En la fase de madurez el lumen (L) se encontró totalmente lleno de espermatozoides (Es), en algunas ocasiones aún se observó una delgada capa espermática (Ce; Figura 14C).

### **Liberación de gametos**

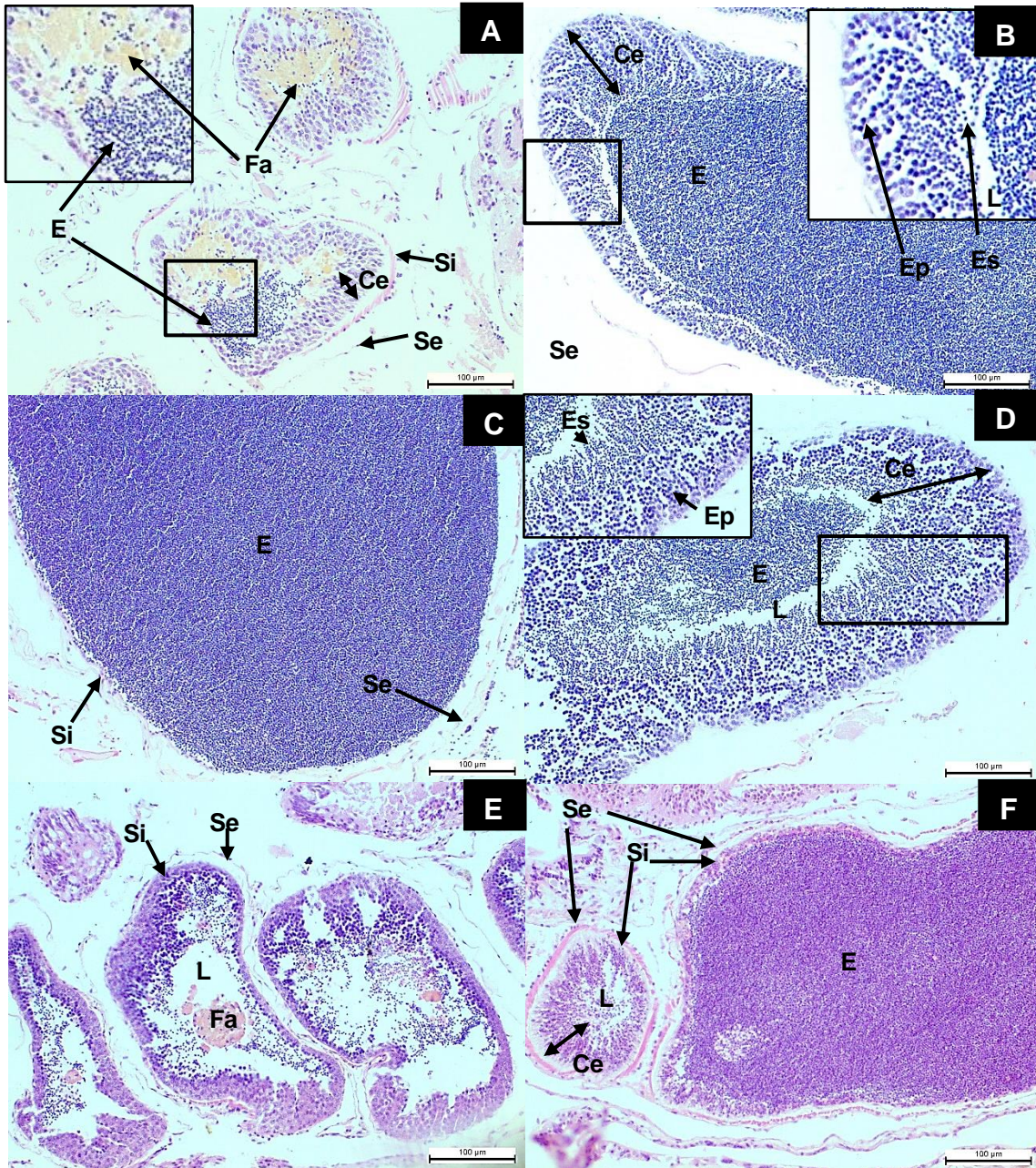
Los espacios vacíos en forma de estrías en la parte central del folículo fueron evidencia de la liberación de gametos, ya sea de forma parcial o avanzada. Además, se observó la presencia de fagocitos (Fa). En fases avanzadas de la liberación, la capa espermática (Ce) se engrosó nuevamente, en algunos casos para un mismo individuo, se encontraron folículos maduros y otros en liberación. (Figura 14D).

## **Post-liberación**

La fase de post-liberación se caracterizó por el engrosamiento de la capa espermática (Ce), el espacio entre el saco interno (Si) y externo (Se) se incrementó. El folículo se encontró deformado y reducido en tamaño ante la ausencia de espermatozoides (Es). Es posible observar una gran cantidad de fagocitos (Fa) en el lumen (L), que en esta fase se observó bastante grande (Figura 14E).

Es importante mencionar que, a diferencia de las hembras, los machos presentan desarrollo asincrónico por lo que, se observaron folículos en distintas fases de desarrollo gonádico; siguiendo los criterios aplicados en la literatura, se asignó la fase más avanzada que se observó (Figura 14F).





**Figura 14. Fases del desarrollo gonádico en machos de *Ophiocomella alexandri*.** A: crecimiento 1, B: crecimiento 2, C: madurez, D: liberación de espermatozoides, E: post liberación y F) Folículos en distinta fase de desarrollo. Ce: capa espermática; Fa: fagocitos; Ep: espermatoцитos primarios; Es: espermatoцитos secundarios; E: espermatozoides; L: lumen; Se: saco externo; Si: saco interno. Barra de escala= 100 µm.

## **7.7. Ciclo gonádico de *Ophiocomella alexandri***

### **7.7.1. Hembras**

En hembras, el desarrollo gonádico se llevó a cabo de diciembre 2015 a junio 2016, se presentó la mayor frecuencia de crecimiento 1 durante febrero (44%) y de febrero a abril de 2016 el crecimiento 2 (66%; Figura 15).

La mayor frecuencia de madurez ovárica se presentó durante el periodo de julio a octubre 2015, siendo durante julio (78%) y septiembre (73%) las frecuencias más altas. Nuevamente de marzo a junio 2016, se fue incrementando la frecuencia de aparición del 10% al 47% respectivamente. En diciembre también se observó la presencia de algunos ovarios maduros, siendo durante este mes la menor frecuencia registrada (9%; Figura 15).

La liberación de ovocitos se llevó a cabo de julio 2015 a enero 2016, siendo los meses de agosto y enero los que tuvieron las mayores frecuencias (> 60%), seguidos por octubre y diciembre (40 y 36% respectivamente). En abril y junio se presentó baja liberación de ovocitos (< 8%; Figura 15).

Por último, la post liberación de ovocitos ocurrió de agosto a diciembre 2015, en noviembre todas las gónadas (100%) se encontraron prácticamente libres de ovocitos. En marzo 2016 se observó una frecuencia baja en post liberación, al igual que de agosto a octubre (< 10%; Figura 15).

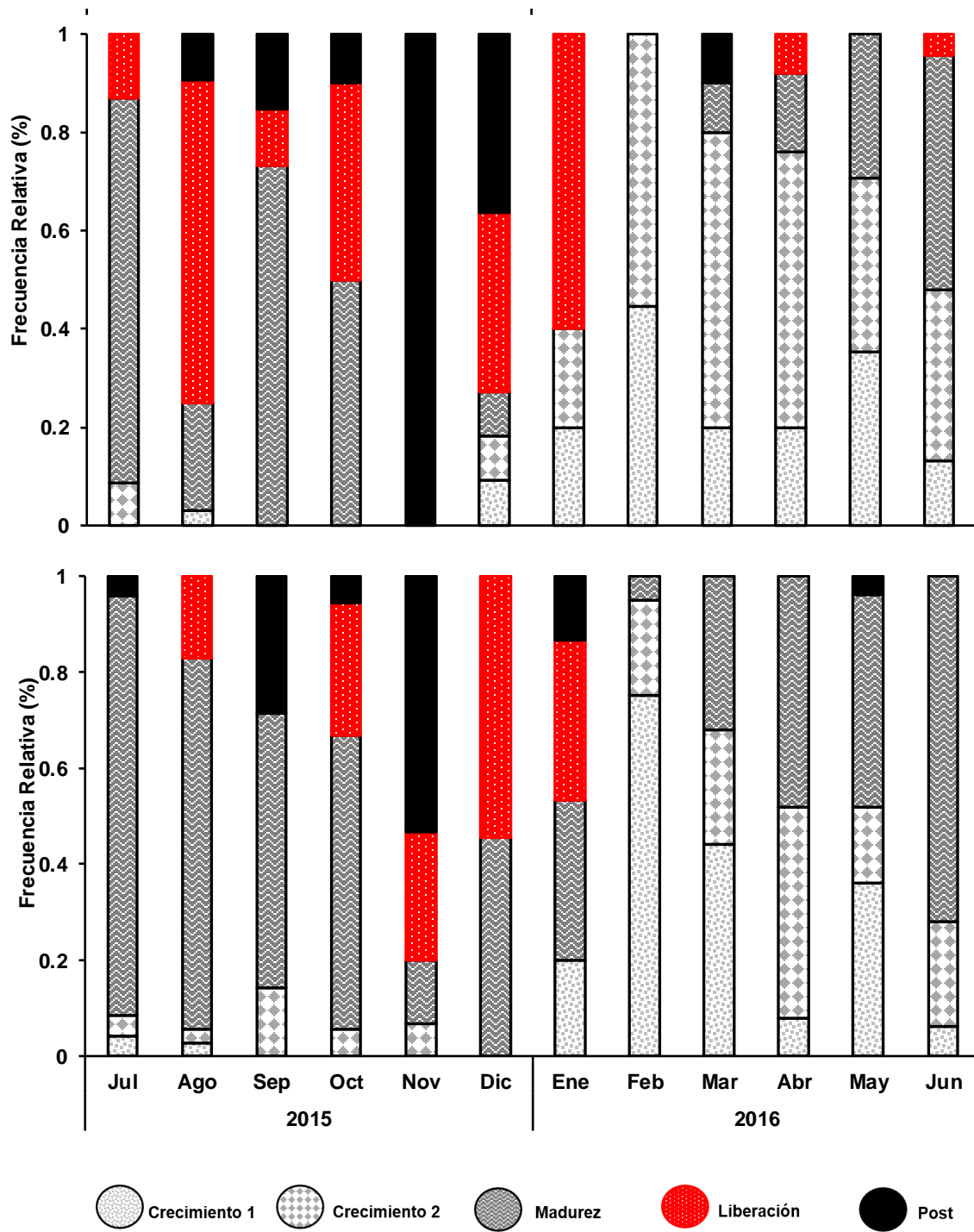


Figura 15. Ciclo reproductivo de hembras (arriba) y machos (abajo) de *Ophiocomella alexandri*.

### **7.7.2. Machos**

Los machos presentaron actividad reproductiva casi todo el año (Figura 15). La primera fase de crecimiento se observó durante julio y agosto 2015 en baja frecuencia (<4%) y de enero a junio 2016, con la mayor frecuencia (75%) durante febrero. El crecimiento 2 ocurrió de julio a noviembre 2015 y de febrero a junio 2016, presentando la mayor frecuencia (44%) en abril.

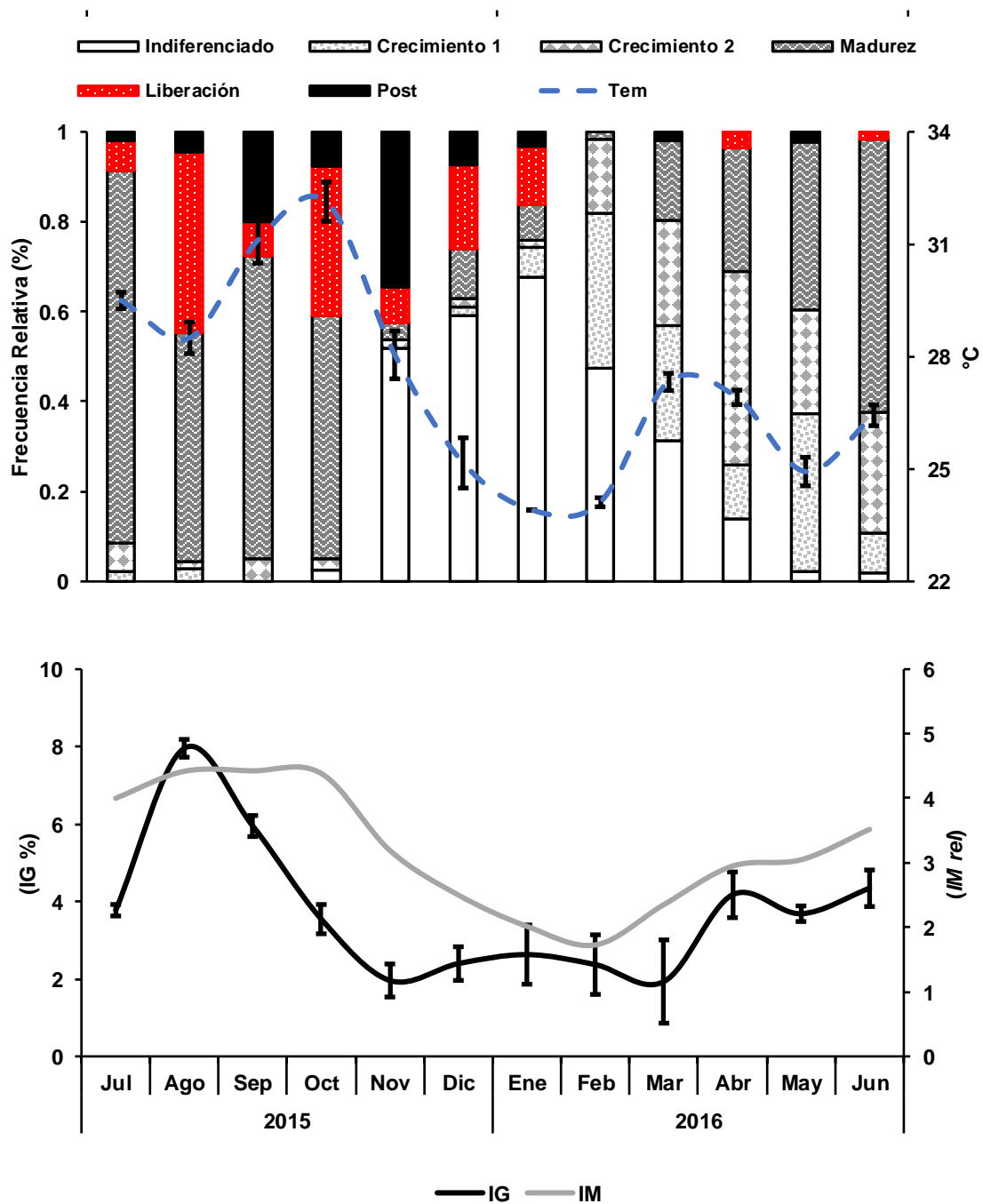
Se presentaron machos maduros todos los meses, con mayores frecuencias de julio a octubre del 2015, con frecuencias de aparición entre el 88% y el 61% y en junio 2016 (71%). La liberación de espermatozoides se llevó a cabo de agosto 2015 a enero 2016, con mayor frecuencia fue durante diciembre (54%), en los meses restantes la frecuencia fue constante (~30%).

Las gónadas en post liberación se observaron en julio y de septiembre a noviembre 2015 y enero y mayo 2016, siendo noviembre el mes con la mayor frecuencia (53%) y mayo y julio los de las menores frecuencias (ambos con el 4%;Figura 15).

### **7.8. Ciclo reproductivo y medidas de la condición reproductiva (IG e IM)**

Considerando los ciclos gonádicos de ambos sexos y los organismos indiferenciados se obtuvo el ciclo reproductivo poblacional de la especie. Donde, se pudo identificar que la especie tiene un ciclo reproductivo anual de marzo a octubre, ya que durante estos meses se encontraron tanto hembras como machos en estado de madurez y liberando gametos, este periodo, coincide con los dos picos de elevación de temperatura que se presentaron durante el año de muestreo. Es importante mencionar que de marzo a junio los organismos se observaron mayormente en estado de madurez y crecimiento y de julio a octubre en madurez y liberación de gametos. De manera particular, la mayor liberación de gametos ocurrió dos veces al año, en el mes de agosto y nuevamente en octubre, durante la época más cálida del año (28-32°C). Por otro lado, el periodo no reproductivo de la población se caracterizó por presentar las mayores frecuencias de organismos indiferenciados durante los meses de

noviembre a febrero, coincidente con los valores de temperatura más bajos en la zona (25-23.9°C; Figura 16).



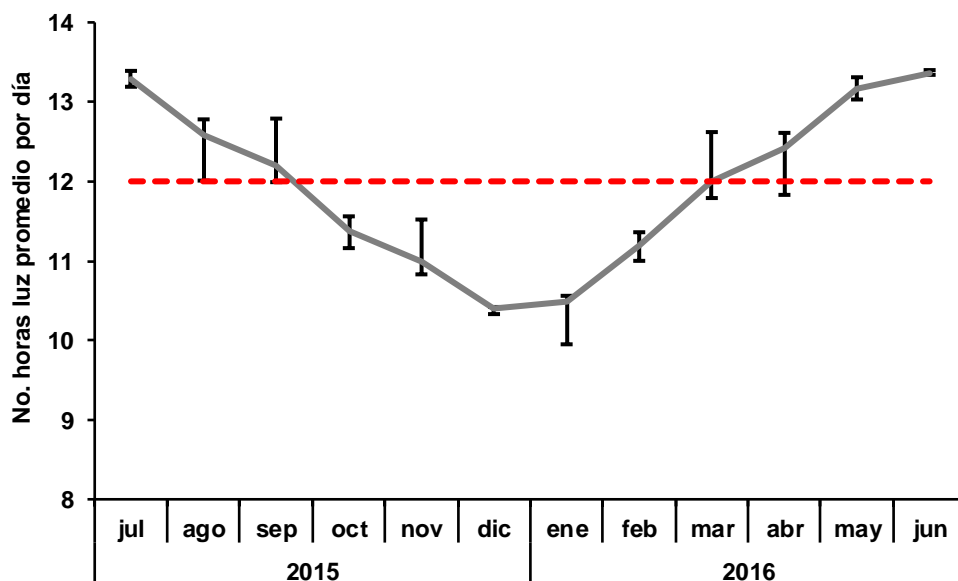
**Figura 16. Ciclo reproductivo de *Ophiocomella alexandri*.** Se muestra el ciclo reproductivo a partir de la frecuencia de fases gonádicas de *Ophiocomella alexandri* en contraste con la temperatura mensual (a) y los índices gonadosomático y de madurez mensuales (b). Las barras sobre las líneas azul (temperatura) y roja (IG) representan los intervalos de confianza al 95%, en ambas gráficas se presentan dos ejes verticales.



El IG reflejó perfectamente las épocas de reproducción y no reproducción. Durante la época no reproductiva de noviembre a marzo, se encontraron los valores más bajos (1.9-2.6 IG%), indicando la falta de madurez de la gónada o su ausencia, como es el caso de los organismos indiferenciados. Progresivamente a partir del mes de marzo el IG comenzó a elevarse, presentando un primer pico (3.7-4.1 IG%) en los meses en los que se llevó a cabo el crecimiento de la gónada y siguió aumentando hasta llegar a agosto, donde se alcanzó el IG máximo (7.9 IG%) y uno de los picos de liberación de gametos, es decir, la gónada se encontraba lo suficientemente madura para liberar gametos, por lo que inmediatamente después podemos observar el declive del IG pues la gónada queda vacía (Figura 16).

Al igual que con el IG, el IM hace distinción entre la época no reproductiva y la reproductiva donde, desde el mes de marzo y hasta octubre el *IM* *rel* va incrementando, hasta alcanzar los valores más altos (2.3-4.3 *IM* %), correspondiendo a los valores más pequeños de esta época con organismos que se encuentran en crecimiento y madurez de la gónada y los mayores valores con organismos en madurez y liberación de gametos. La época no reproductiva, se caracterizó por el decremento del IM con el valor más bajo en febrero (1.7 *IM* %), además de la coincidencia con organismos indiferenciados, es decir, los organismos se encontraban inmaduros durante estos meses (Figura 16).

La presencia de días largos, es decir, días con más horas luz que horas oscuridad, también coincidió con la época reproductiva de *O. alexandri*, ya que de marzo a septiembre las horas luz promedio fueron mayores a la relación 12:12 (L:O), el final de la época reproductiva se presentó en octubre, siendo este el primer mes con una relación menor en tanto a la cantidad promedio de horas luz (Figura 17).



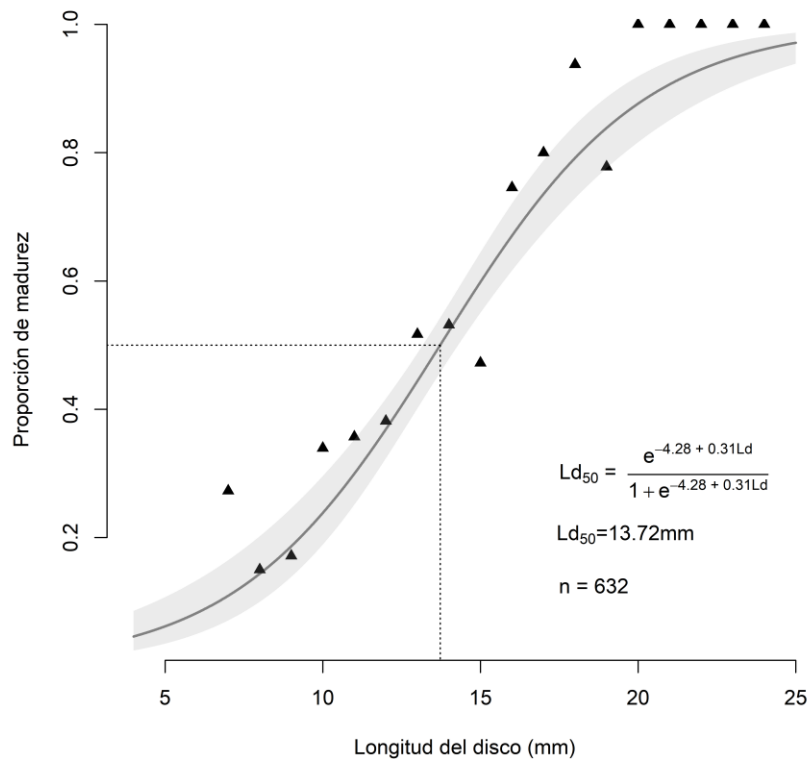
**Figura 17. Horas luz promedio por día en Bahía de La Paz, BCS.** La línea gris representa el número promedio de horas luz diarias de manera mensual, las barras verticales son los valores máximos y mínimos de horas luz presentes en cada mes y la línea segmentada en color rojo señala las 12h luz, esperadas en un fotoperiodo cercano al ecuador.

### 7.9. Longitud de primera madurez ( $Ld_{50}$ )

El comportamiento de la curva para sexos (Figura 18) indica que, desde longitudes pequeñas, se comienza el proceso de madurez en *O. alexandri* y la curva sube de manera constante hasta alcanzar la longitud de primera madurez (13.7mm). La comparación estadística de las curvas de madurez entre sexos, confirman que no hay diferencia en la  $Ld_{50}$  de machos vs hembras ( $P > 0.05$ ; Tabla III).

**Tabla III. Parámetros estimados en el cálculo de la longitud de primera madurez  $Ld_{50}$  de *Ophiocomella alexandri*, por sexos.**

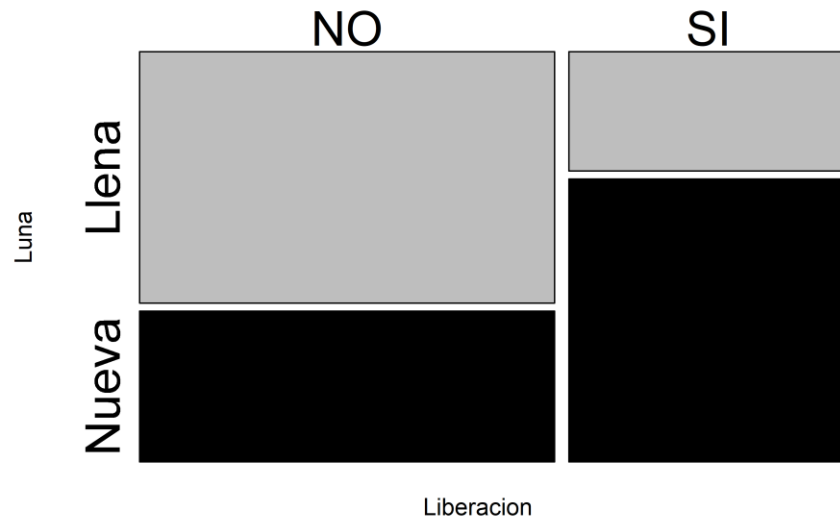
Sexo	Estimaciones											
	n	Proporción de madurez		Parámetros						Longitud de primera madurez sexual		
		Inmaduros	Maduros	$\hat{\alpha}$	IC inf	IC sup	$\hat{\beta}$	IC inf	IC sup	$Ld_{50}$	IC inf	IC sup
Machos	257	1	1.4	-2.1	-3.4	-0.9	0.2	0.1	0.3	9.8	6.7	11.5
Hembras	207	1	1.4	-2.4	-4.0	-1.1	0.2	0.1	0.3	10.5	7.7	12.2
Sexos combinados	632	1	1	-4.3	-5.2	-3.4	0.3	0.2	0.4	13.7	13.2	14.3



**Figura 18. Regresión logística ajustada de la proporción de hembras y machos maduros de *O. alexandri* por longitud del disco.** Con línea punteada se muestra  $Ld_{50}$  y de manera sombreada, para toda la curva los IC 95%.

### 7.10. Liberación de gametos y fases lunares

La liberación de gametos de *Ophiocomella alexandri* entre la luna llena y nueva no fue significativamente distinta al analizar la totalidad de los datos ( $X^2=0.61$ ,  $P=0.43$ ), sin embargo, durante el ciclo reproductivo de *O. alexandri* hubo dos meses importantes para la liberación de gametos: agosto y octubre (Anexo V), donde, se observó que en agosto la frecuencia de individuos que liberaron sus gametos durante la luna nueva fue significativamente mayor a la frecuencia de organismos que no lo hicieron ( $X^2=5.72$ ,  $P=0.01$ ; Figura 19), a diferencia del mes de octubre, que no mostró diferencias significativas en la liberación de gametos entre las fases de la luna ( $X^2=0$ ,  $P=1$ ).



**Figura 19. Gráfico en mosaico de la liberación de gametos de *Ophiocomella alexandri* durante la luna llena y nueva de agosto 2016.** Los mosaicos negros representan los organismos que liberaron gametos y no durante luna nueva y los mosaicos grises los que liberaron gametos y no durante la luna llena.

## 8. DISCUSIÓN

Los organismos de *Ophiocomella alexandri* que fueron recolectados en Punta Galeras, tuvieron longitudes (diámetro del disco) de 4.6 a 24.7 mm, similar a lo reportado en [Humara-Gil \(2019\)](#), donde también se reportaron organismos de menor longitud (1.64 mm). En este trabajo no se reportan organismos menores a 4.6 mm, debido a que, por la naturaleza del estudio, el muestreo estuvo dirigido a organismos adultos. En los pesos total, del disco y de la gónada, así como en el diámetro del disco las hembras mostraron mayores valores que los machos, pero no resultaron ser significativamente distintos, relacionado, quizá con la necesidad de almacenar mayor cantidad de energía en las bursas para la producción de gametos que a su vez, son de mayor tamaño que los de los machos ([García-Barros, 1999](#)).

La relación longitud-peso para *O. alexandri* fue estimada con la totalidad de los datos, así como por sexos, se establece que presentaron crecimiento isométrico, sin embargo, cuando se analizó esta relación de manera mensual (Anexo IV) se detectó variabilidad en el tipo de crecimiento, siendo los meses de septiembre 2015, mayo y junio 2016 los únicos con crecimiento isométrico, en los meses restantes se evidenció crecimiento alométrico negativo, igual a lo reportado para otras especies de ofiuroides ([Robinson et al, 2010](#)), donde el valor de la pendiente nunca fue superior o igual a 3, aunque el análisis se realizó solo de manera general. Es importante tener en cuenta que, a lo largo del año y del ciclo de vida de los organismos, la relación longitud-peso presenta variaciones debido a la disponibilidad de alimento y las necesidades particulares de la especie ([Froese, 2006](#)), así como al almacenamiento y liberación de gametos, ([Froese, 2006](#)), mismos que en ofiuros, ocupan un alto porcentaje del espacio disponible en las bursas ([Patent, 1969](#)).

En *O. alexandri* los parámetros estimados en la relación fueron iguales entre machos y hembras, es posible que exista compensación entre el número y tamaño de los gametos ya que el tamaño de la gónada no fue distinto significativamente  $P > 0.05$ . Por otro lado, el cambio en el tipo de crecimiento mensual entre la isometría y la alometría negativa muestran que durante la mayoría de los meses la ganancia de longitud es

mayor a la de peso, por lo que el crecimiento del organismo es mayormente explicado por el aumento de la longitud.

En la revisión bibliográfica fue posible notar que la relación longitud-peso es escasa en invertebrados, pero cada vez más utilizadas y por tanto, necesarias en el estudio de la estructura de comunidades marinas, considerando que el tamaño y tipo de crecimiento de los organismos son clave en el rol que desempeñan ([Robinson et al., 2010](#)).

La variabilidad mensual en la condición de *O. alexandri* indicó un estado favorable durante todo el año, excepto en septiembre y noviembre donde la condición decayó por debajo del promedio estadístico. El declive de los valores se presenta seguido de los meses con mayores frecuencias en la liberación de gametos. Además, el mes de noviembre coincide con el término de la etapa reproductiva de la especie, por lo que, la disminución en los valores del factor de condición, responden al vaciado de las bursas por la liberación total de gametos y al mismo tiempo por la carencia de almacenamiento energético. El resto del año, la condición de los organismos fue buena, y esto normalmente está ligado al aumento en la disponibilidad de alimento en el medio, en este caso, debido a las surgencias por la disminución de temperatura en la Bahía de La Paz ([Martínez-López et al., 2001](#); [Reyes-Salinas et al., 2003](#)). Sin embargo, durante los meses de febrero y hasta agosto, la condición de los organismos también fue buena y se mantuvo estable, a pesar de que la disponibilidad de alimento en la Bahía de La Paz se va reduciendo ([Reyes-Salinas et al., 2003](#)). Este comportamiento en la condición de *O. alexandri* se explica por el intercambio de peso entre el tejido de reserva de energía (almacenamiento durante la época no reproductiva y utilización para la maduración gonádica) y la gónada (producción, crecimiento y maduración de gametos).

Es importante mencionar que el factor de condición (K) no es un índice de uso común en ofiuroides, es utilizado en pesquerías ([Froese, 2006](#)) y en el caso de equinodermos solo se reporta en la clase Holoturoidea ([Herrero-Pérezrul & Reyes-Bonilla, 2008](#)), sin embargo, parece ser un buen indicador de la condición reproductiva en ofiuroides (desove-posdesove), debido a que responde a las variaciones en el

peso a lo largo del año. Aunque es necesario hacer más análisis para comprobar esto, se propone como herramienta para el monitoreo de la condición reproductiva de poblaciones de ofiuroides y resultaría sumamente útil ya que para su obtención no se requiere del sacrificio de los organismos.

Ahora bien, *O. alexandri* es una especie dioica, con una proporción sexual teórica de 1M:1H ([Hendler, 1991](#)), sin embargo, en este trabajo se encontraron significativamente más machos que hembras (1M:0.8H,  $X^2c=4.3$ ,  $P<0.05$ ). En contraste, cuando se analizó esta proporción de manera mensual, el resultado no fue consistente, de abril a diciembre la proporción fue de 1:1 pero no de enero a marzo, en donde hubo más machos que hembras (0.3:1, 0.5:1 y 0.4:1, respectivamente). Esto coincide con una alta frecuencia de organismos indiferenciados; así, la mayor frecuencia de machos al inicio del crecimiento gonadal podría ser explicada por el hecho de que en muchos invertebrados, los machos tienden a madurar antes que las hembras ([Somerton, 1980](#); [Viau et al., 2006](#)). Esta proporción también puede ser afectada por la presencia de machos maduros durante todo el año, tal como se observó en el ciclo reproductivo de los machos de *O. alexandri*.

El registro de organismos indiferenciados se reportó para las costas de Oaxaca donde se propone que corresponden a organismos maduros considerando el diámetro del disco ([Aguilar-Duarte 2011](#)) pero que estos están en reposo. En este sentido, se ha reportado que los equinodermos realizan el reemplazo de sus folículos gonádicos de manera total o parcial, pues estos tienen vida limitada ([Smiley 1988](#)). En este trabajo los organismos identificados como indiferenciados carecían de gónada desarrollada, o bien de células germinales identificables para su determinación y resultaron ser significativamente menores que los machos y las hembras, tanto en peso como en longitud. Esto permitió inferir que se trataba de organismos inmaduros; su presencia en la muestra fue clave para la interpretación adecuada del ciclo reproductivo ([Hendler, 1991](#)) y de la talla de primera madurez ([Ogle, 2013](#)). Los organismos indiferenciados, se ajustaron de manera correcta al modelo en la determinación de la  $Ld_{50}$  para sexos combinados (13.7mm).

En cuanto a su reproducción, *O. alexandri* presenta un ciclo anual, con una temporada reproductiva de marzo a octubre -8 meses-, y coincidente con el incremento de la temperatura en Bahía de La Paz ([Obeso-Nieblas, 2003](#)); esto es semejante a lo reportado en Oaxaca, en donde, la temporada reproductiva ocurre durante los meses más calurosos para la región (de mayo a diciembre; [Benítez-Villalobos et al., 2012](#)). En Bahía de La Paz, al igual que en Oaxaca, *O. alexandri* presenta un periodo largo de liberación de gametos, caracterizado por pequeños pulsos de expulsión y dos pulsos mayores, siendo en agosto y octubre para el presente trabajo y en abril y diciembre en las Costas de Oaxaca ([Benítez-Villalobos et al., 2012](#)). Lo anterior indica que el ciclo reproductivo de esta especie se encuentra estrechamente ligado a la temperatura y su patrón de actividad reproductiva es semejante al de otras poblaciones de *O. alexandri* en diferentes latitudes ([Hendler, 1979](#); [Benítez-Villalobos et al., 2012](#)).

Respecto a la asignación de fases de desarrollo gonádico (crecimiento 1, crecimiento 2, madurez, liberación de gametos y post-liberación), hubo algunas diferencias con lo antes propuesto por [Benítez-Villalobos et al. \(2012\)](#). Se encontró que en Bahía de La Paz *O. alexandri* presenta un periodo de crecimiento más extendido por lo que se decidió diferenciar dos fases de crecimiento; por otra parte, la fase de reactivación no se pudo identificar ya que no se encontraron coincidencias histológicas.

Las diferentes fases del desarrollo gonádico estuvieron bien representadas por la variación en los tamaños del diámetro de los ovocitos (4-65 $\mu$ m); como era de esperarse al encontrar que los ovocitos vitelogénicos presentes durante la madurez y desove, fueron los de mayor tamaño (32-65  $\mu$ m). Sin embargo, resultaron ser más pequeños que los reportados para Oaxaca, de hasta 80 $\mu$ m de diámetro ([Benítez-Villalobos et al., 2012](#)). Considerando estos diámetros de ovocitos maduros y de acuerdo con las características generales de los patrones de desarrollo en ofiuroides propuestas por [Hendler \(1975\)](#) y [Mladenov \(1979\)](#), *O.alexandri* debería presentar un desarrollo planctotrófico y requerir de 12 a 40 días aproximadamente para su metamorfosis, tal como se propone para las especies con huevos pequeños (hasta 200  $\mu$ m). El diámetro de los ovocitos, además, evidenció un crecimiento sincrónico, en



la fase de madurez se observó una sola cohorte en la distribución por diámetro de los ovocitos.

Cabe mencionar que *O. alexandri* presenta una temporada reproductiva larga, la cual fue posible dividirla en dos periodos de acuerdo con la frecuencia de las fases gonádicas, al índice gonadosomático y de madurez. El primero, de marzo a junio donde se encontraron mayormente individuos en fases de crecimiento y madurez, con pulsos pequeños de liberación, lo cual se vio reflejado en el incremento paulatino del IM y del IG cuyos los valores son significativamente mayores a los presentes en la etapa no reproductiva. El segundo, de julio a octubre donde se incrementó la frecuencia de organismos liberando gametos, se presentaron los mayores valores del IM y en el mes de agosto el pico más grande del IG coincidió con la mayor frecuencia de liberación. Lo anterior es indicador que si bien, no todos los organismos maduran al mismo tiempo, la mayoría lo hace durante marzo a junio y su mayor periodo de liberación de gametos ocurre a partir en agosto y octubre, tal como se ha reportado en otras especies de equinodermos en Bahía de La Paz ([Herrero-Pérezrul, 1994](#); [Herrera-Escalante, 2005](#); [Sánchez-Villalobos, 2012](#)). De manera complementaria se presenta la temporada no reproductiva de noviembre a febrero, la cual, además de presentar organismos en las fases de crecimiento 1 y 2 involucra una alta frecuencia de organismos indiferenciados.

El uso de indicadores de la condición reproductiva como el IG e IM permite observar de manera resumida lo encontrado en la revisión histológica, particularmente el IM resume la condición de los organismos ponderando cada una de las fases gonádicas ([Patent, 1969](#)). En este estudio fue posible contrastar ambos índices, debido al compacto acomodo de la gónada de *O. alexandri*, ya que no en todas las especies es posible extraer la gónada de manera limpia, por lo que en algunos casos el IG no se reporta y solo es posible comparar con el IM. Ambos índices mostraron un comportamiento similar al describir el ciclo reproductivo, sin embargo, el IG fue más específico que el IM, indicando la temporada reproductiva y el momento de la mayor frecuencia de liberación de gametos.

Por otra parte, los organismos están adaptados a desovar de tal manera que la duración de la temporada reproductiva está ligada a proporcionar las condiciones adecuadas para la supervivencia de las larvas y/o juveniles, según sea el caso ([Giese & Pearse, 1974](#)). De acuerdo a [Baker \(1938\)](#) existen dos tipos de factores involucrados en la temporada reproductiva: los factores próximos, que son de procedencia externa y sirven de sincronizadores de los ciclos reproductivos como lo es la temperatura para *O. alexandri* y los factores últimos que ejercen presión selectiva, favoreciendo la reproducción de una especie sobre otras, p ej., la sincronización de la liberación de gametos con alguna fase lunar.

*O. alexandri* responde liberando gametos, al incremento de temperatura por encima de los 28°C, presentando dos meses importantes en cuanto a la frecuencia de organismos en desove (agosto y octubre). En agosto la frecuencia de organismos que liberaron gametos fue significativamente mayor que la frecuencia de organismos que no lo hicieron, además las liberaciones se llevaron a cabo de manera significativa durante la luna nueva, al igual que en *Ophiarthrum pictum*, la cual se observó en campo por la identificación de la postura de araña típica del desove ([Hendler & Meyer, 1982](#)). En *Ophiothrix fragilis*, *Ophiopholis aculeata*, *Ophiura robusta*, *Ophioderma rubicundum* y *Ophioderma squamosissimum*, la sincronización del desove ha sido documentada con la luna llena (septiembre), sin embargo, al igual que con *Ophiarthrum pictum* los reportes han sido de manera incidental durante sesiones de buceo ([Smith, 1940](#); [Hendler, 1991](#)).

En ofiuridos, los reportes en el medio natural han permitido, la identificación de comportamientos, como la formación de agregaciones y la secuencia de liberación de gametos entre machos y hembras, ([Hendler & Meyer, 1982](#); [Hagman & Vize, 2003](#)), mientras que en laboratorio se observó que los machos de *Ophiocoma scolopendrina* liberan su esperma únicamente ante la estimulación por el desove de la hembra y durante la marea baja ([Soong et al., 2009](#)).

De acuerdo a [Neumann \(2014\)](#), la verificación experimental de la sincronización con ciclos lunares requiere de dos cosas: un mecanismo fotorreceptor que no sea molestado por el fotoperiodo diario, lo cual ya ha sido descrito en ofiuroideos ([Hendler](#)

[& Byrne, 1987](#); [Hendler, 1984](#)) y considerar el hecho de que la señal dada por la luna no es medible en un momento exacto, sino que corresponde a un periodo amplio de aproximadamente 5 días, lo que explica que con el muestreo realizado un día antes y uno después de las fases lunares, no se encontraran diferencias significativas en este trabajo. Por lo demás, *O.alexandri* presenta características morfológicas que le permiten sincronizar su desove con la luna ([Hendler, 1984](#); [Byrne & Hendler, 1988](#); [Benavides-Serrato & O 'Hará, 2008](#)) y distinguir entre las distintas fases de la misma.

En diversos trabajos se sugiere a la luna como señal anticipatoria para la posterior retención o dispersión de gametos, por las corrientes de marea; en *O. alexandri* la ausencia de luz, durante la luna nueva, además, podría beneficiar a los gametos manteniéndolos ocultos de depredadores ([Smith, 1940](#); [Hendler, 1991](#); [Numata & Helm, 2014](#)). La sincronía de la liberación de gametos influenciada por diversas señales ambientales evita el entrecruzamiento de especies filogenéticamente cercanas ([Soong et al., 2005](#)). En tal caso, *O. alexandri* pudiese estar sincronizando la liberación de sus gametos con la luna nueva y tiene un patrón reproductivo distinto al de *Ophiocoma aethiops* la cuál es una especie conspicua que comparte su distribución y hábitat, pero no la misma estrategia reproductiva ([Méndez-Aquino, 2016](#)).

## 9. CONCLUSIONES

*O. alexandri* no presentó dimorfismo sexual, sus valores biométricos no fueron significativamente distintos entre machos y hembras, crece isométricamente de manera general, sin embargo, se observó una diferencia estacional entre crecimiento isométrico y alométrico negativo. Su condición fue favorable durante todo el año, con excepción del mes de noviembre. Presentó una proporción sexual de 1M :0.8H, significativamente distinta a la teórica de 1:1.

La longitud de primera madurez para la población de *O. alexandri* en Bahía de La Paz, México fue de 13.7mm. Se registraron organismos indiferenciados, con valores biométricos significativamente menores de los de machos y hembras, por lo que fueron considerados como organismos inmaduros.

*O. alexandri* tiene un ciclo anual, con temporada reproductiva larga de marzo a octubre con relación al incremento de la temperatura y con dos picos de liberación de gametos: el primero de mayor magnitud en agosto y el segundo en octubre. Su ciclo reproductivo está compuesto por 5 fases de desarrollo gonádico: crecimiento 1 y 2, madurez, liberación de gametos y post-liberación.

El índice de madurez (IM) y el gonadosomático (IG) describieron adecuadamente el ciclo reproductivo de *O. alexandri*, sin embargo, el IG lo hizo con mayor precisión. Además, se propone el uso del factor de condición (K) para el monitoreo de la condición reproductiva de ofiuroideos sin necesidad de sacrificio.

La temporada reproductiva de *O. alexandri* respondió a factores próximos y últimos como lo son la temperatura y la luna nueva, respectivamente. La mayor frecuencia significativa de liberación de gametos *O. alexandri* ocurrió durante la luna nueva de agosto.

## **10. RECOMENDACIONES**

Realizar la validación del factor de condición (K) como indicador del estado reproductivo en ofiuroideos con distintos patrones de reproducción y considerando el peso total en vez del peso del disco.

Realizar monitoreos nocturnos con snorkel en los meses de agosto y octubre, para contribuir con información sobre la conducta de *O. alexandri* durante la liberación de gametos, así como pruebas en laboratorio de inducción del desove con ayuda de la variación en la intensidad lumínica y simulación de mareas.

## 11. REFERENCIAS

- Aguilar-Duarte, C. 2011. Comparación del patrón reproductivo entre *Ophiocoma alexandri* y *Ophiocoma aethiops* (Echinodermata: Ophiuroidea) y su relación con las variables ambientales temperatura, luminosidad, horas de luz, pluviosidad, clorofilas y salinidad. Tesis de Maestría. Universidad del Mar, Campus Puerto Ángel. Oaxaca, México. 41 p.
- Baker, J.R. 1938. The evolution of breeding seasonality. In: De Beer, G.R. (ed) *Evolution*. Clarendon Press, Oxford, p 161–178
- Benavides-Serrato, M. & T. D. O'Hara. 2008. A new species in the *Ophiocoma erinaceus* complex from the South-west Pacific Ocean (Echinodermata: Ophiuroidea: Ophiocomidae). *Memoirs of Museum Victoria*, 65: 51-56.
- Benítez-Villalobos, F. & M. Martínez-Aguilar. 2012. Reproductive biology of the starfish *Pharia pyramidatus* (Echinodermata : Asteroidea) from the Mexican tropical Pacific. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 92(6) : 1409-1418.
- Benítez-Villalobos, F., C. Aguilar-Duarte & O. H. Ávila-Poveda 2012. Reproductive biology of *Ophiocoma aethiops* and *O. alexandri* (Echinodermata : Ophiuroidea) from Estacahuite Bay, Oaxaca, Mexico. *Aquatic Biology*, 17: 119-128.
- Brogger, M. I. 2010. Crecimiento, reproducción y alimentación del ofiuroido *Ophioplocus januarii* (Lütken, 1856) (Echinodermata: Ophiuroidea) en costas de Patagonia, Argentina. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. 154 p.
- Byrne, M. & G. Hendler. 1988. Arm structures of the ophiomyxid brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea: *Ophiomyxidae*). In: Burke, R. D., P. V. Mladenov, P. Lambert & R. Parsley (eds), *Echinoderm Biology: proceedings of the Sixth International Echinoderm Conference*, Victoria Balkema, Rotterdam, 687-695 p.
- Chartock, M. A. 1983. Habitat and feeding observations on species of *Ophiocoma* (Ophiocomidae) at Enewetak. *Micronesica*, 19(1-2):131-149.
- Cintra-Buenrostro C.E., M.S. Foster & K.H. Meldahl. 2002. Response of nearshore marine assemblages in Pleistocene and modern rhodolith beds in the

southwestern Gulf of California, México. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 183: 299-320.

- De la Hoz-M., J., J.C. Narváez B. & O. D. Solano. 2009. Length-weight relationships for 36 fish populations from a disturbed tropic estuary in northern Colombia. *Journal of Applied Ichthyology*, 25: 618-619.
- Duarte L.O., H. Castillo-Navarro, A. Rojas & E. Castro. 2015. Variabilidad temporal de relaciones biométricas y de la condición del bonito, *Thunnus atlanticus*, en el Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina, Caribe de Colombia. 58-72 pp. En: En: Rojas, A., M. Prada, M. Jay, (eds). 2015. *Atlas Biológico Pesquero de la Reserva de Biosfera Seaflower*. Gobernación del departamento de San Andrés, Providencia y Santa Catalina. San Andrés Islas, Colombia. 160 p.
- Efron, B. 1987. Better Bootstrap Confidence Intervals. *Journal of the American Statistical Association*, 82(397), 171–185.
- Froese, R. 2006. Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, 22: 241-253.
- García, E. 2004. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. 5a ed. UNAM, México, 91 p.
- García-Barros, E. 1999. Implicaciones ecológicas y evolutivas del tamaño en los artrópodos. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 26: 657-678.
- Giese, A.C. & Pearse, J.S. 1974. Reproduction: general principles. In: Giese, A.C. & Pearse, J.S. (eds) *Reproduction of marine invertebrates*, Vol 1. Academic Press, New York, NY, p 1–49
- Glynn P. W., S. B. Colley, C. M. Eakin, D. B. Smith, J. Cortés, N. J. Gassman, H. M. Guzmán, J.B. Del Rosario & J.S. Feingold. 1994. Reef coral reproduction in the Eastern Pacific: Costa Rica, Panamá, and Galápagos Islands (Ecuador). II. Poritidae. *Marine Biology*, 118: 191-208.
- Granja-Fernández, R. & R. A. López-Pérez. 2011. Nuevos registros de ofiuroides (Echinodermata: Ophiuroidea) para localidades de Zihuatanejo (Guerrero) y

- Puerto Escondido (Oaxaca), Pacífico mexicano. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82: 1320-1323.
- Granja-Fernández, R., M.D. Herrero-Pérezrul, R.A. López-Pérez, L. Hernández, F.A. Rodríguez-Zaragoza, R. Wallace Jones & R. Pineda-López. 2014. Ophiuroidea (Echinodermata) from coral reefs in the Mexican Pacific. *Zookeys*, 406: 101-145.
- Hagman D. K. & P. D. Vize. 2003. Mass spawning by two brittle star species, *Ophioderma rubicundum* and *O. squamosissimum* (Equinoidea: Ophiuroidea), at the flower garden banks, Gulf of Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 72 (3): 871-876.
- Hendler, G. & D. L. Meyer. 1982. Ophiuroids flagrante delicto and notes on the spawning behavior of other echinoderms in their natural habitat. *Bulletin of Marine Science*, 32(2):600-607.
- Hendler, G. & M. Byrne. 1987. Fine structure of the dorsal arm plate of *Ophiocoma wendti*: Evidence for a photoreceptor system (Echinodermata, Ophiuroidea). *Zoo morphology*, 107: 261-272.
- Hendler, G. 1975. Adaptational significance of the patterns of ophiuroid development. *American Zoologist*, 15: 691-715.
- Hendler, G. 1979. *Reproductive periodicity of ophiuroids (Echinodermata: Ophiuroidea) on the Atlantic and Pacific coasts of Panama*. In: Stancyk, S. E. (ed). *Reproductive ecology of marine invertebrates*. University of South Carolina Press, Columbia, SC, 145–156 p.
- Hendler, G. 1984. Brittle star color-change and phototaxis (Echinodermata: Ophiuroidea: Ophiocomidae). *Marine Ecology*, 5 (4): 379-401.
- Hendler, G. 1991. Echinodermata: Ophiuroidea. 355-511 pp. In: Giese, A.C., J.S. Pearse & V.B. Pearse (eds). *Reproduction of Marine Invertebrates: Echinoderms and Lophophorate*. Boxwood Press, Pacific Grove, California.
- Herrera-Escalante, T. 2005. Dinámica poblacional y reproducción de la estrella de mar *Phataria unifascialis* (GRAY, 1840) (ECHINODERMATA: ASTEROIDEA) en Pichilingue, Bahía de la Paz, Baja California Sur, México. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional. La Paz, B. C. S., México. 80p.

- Herrero-Pérezrul, M. D. 1994. Estudio comparativo de la reproducción de *Isostichopus fuscus* (LUDWIG, 1875) y *Neothyone gibbosa* DEICHMANN, 1941 (ECHINODERMATA: HOLOTHUROIDEA), en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional. La Paz, B. C. S., México. 88 p.
- Herrero-Pérezrul, M.D. & H. Reyes-Bonilla. 2008. Weight-Length relationship and relative condition of the holothurian *Isostichopus fuscus* at Espíritu Santo Island, Gulf of California, México, *Revista de Biología Tropical*, 56 (3): 273-280.
- Humara-Gil, K. J. 2019. Caracterización morfométrica de *Ophiocomella alexandri* (Lyman, 1860) (Ophiuroidea: Ophiocomidae). Tesis de Grado. Universidad del Mar. Puerto Ángel, Oaxaca, México. 78 p.
- Humason, G.L. 1962. Histology. Technique, Stains and staining (Microscopy), Histochemistry Technique.
- Huxley, J. S. & G. Tessier. 1936. Terminology of relative growth. *Nature*, 137: 780-781.
- Huxley, J. S. 1924. Constant differential growth-ratios and their significance. *Nature*, 114: 895-896.
- Iliffe T. M. & J. S. Pearse 1982. Annual and lunar reproductive rhythms of the sea urchin, *Diadema antillarum* (Philippi) in Bermuda. *International Journal of Invertebrate Reproduction*, 5: 139-148.
- Jiménez-Illescas A. R. 1996. Análisis de procesos barotrópicos y baroclínicos en la Bahía de La Paz B. C. S. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 212p.
- Kennedy B. & J. S. Pearse 1975. Lunar synchronization of the monthly reproductive rhythm in the sea urchin *Centrostephanus coronatus* Verril. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 17: 323-331.
- Kubota T. 2000. Reproduction in the Apodid Sea Cucumber *Patinapta ooplax*: Semilunar Spawning Cycle and Sex Change. *Zoological Science*, 17: 75-81.
- Lasker R. & A. C. Giese. 1954. Nutrition of the Sea Urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Biological Bulletin*, 106 (3): 328-340.



- Le Cren, E.D. 1951. The Length-Weight Relationship and Seasonal Cycle in Gonad Weight and Condition in the Perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Animal Ecology*, 20(2): 201-219.
- Martínez-López A., Cervantes-Duarte R., Reyes-Salinas A. & Valdez-Holguín J.E. 2001. Cambio estacional de clorofila a en la Bahía de La Paz, B.C.S., México, *Hidrobiológica*, 11(1):45-52.
- Medeiros-Bergen, D. E. & T. A. Ebert. 1995. Growth, fecundity and mortality rates of two intertidal brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea) with contrasting modes of development. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 189: 47-64.
- Méndez-Aquino C.E. 2016. Influencia de las fases lunares en el ciclo reproductivo de *Ophiocoma aethiops* LÜTKEN, 1859 en Bahía de La Paz, B. C. S. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional. La Paz, B. C. S., México. 51 p.
- Mercier A. & J. F. Hamel. 2009. *Advances in Marine Biology: Endogenous and exogenous control of gametogenesis and spawning in echinoderms*. Academic Press, 55.
- Mladenov, P.V. 1979. Unusual lecithotrophic development of the Caribbean Brittle Star *Ophiothrix oerstedii*. *Marine Biology*, 55: 55-62.
- Numata, H. & B. Helm. 2014. *Annual, Lunar, and Tidal Clocks: Patterns and Mechanisms of Nature's Enigmatic Rhythms*. Springer, Tokyo. 360 p
- O'Hara, T.D., S. Stöhr, A. F. Hugall, B. Thuy & A. Martynov. 2018. Morphological diagnoses of higher taxa in Ophiuroidea (Echinodermata) in support of a new classification. *European Journal of Taxonomy*, 416: 1-35.
- Obeso-Nieblas M. 2003. Variabilidad espacio-temporal de las condiciones oceanográficas de la Bahía de La Paz, B.C.S., México. Tesis de Doctorado. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional. La Paz, B. C. S., México. 337 p.
- Ogle, D. H. 2013. Maturity Schedules. 1-10 pp. In: Ogle, D. H. (eds.). *Introductory fisheries analyses with R*. Chapman and Hall/CRC. New York.

- Patent, D. H. 1969. The Reproductive Cycle of *Gorgonocephalus caryi* (Echinodermata: Ophiuroidea). *Biological Bulletin*, 136 (2): 241-252.
- Quinn II, T. J. & R. B. Deriso, 1999. *Quantitative Fish Dynamics*. Oxford University Press. New York. 542 p.
- Ramirez Llodra, E. 2002. Fecundity and life-history strategies in marine invertebrates. *Advances in Marine Biology*, 43: 87-170.
- Reyes-Salinas, A., R. Cervantes-Duarte, R. A. Morales-Pérez, J. E. Valdez-Holguín. 2003. Variabilidad estacional de la productividad primaria y su relación con la estratificación vertical en la Bahía de la Paz, B.C.S. *Hidrobiológica*, 13(2): 103-110.
- Robinson L.A., S.P.R. Greenstreet, H. Reiss, R. Callaway, J. Craeymeersch, I. de Boois, S. Degraer, S. Ehrich, H.M. Fraser, A. Goffin, I. Kröncke, L. Lindal Jorgenson, M.R. Robertson & J. Lancaster. 2010. Length–weight relationships of 216 North Sea benthic invertebrates and fish. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 90: 95-104.
- Sánchez-Villalobos, E. E. 2012. Dinámica poblacional y ciclo reproductivo de *Pharia pyramidatus* (GRAY, 1840) (ECHINODERMATA: ASTEROIDEA) en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional. La Paz, B. C. S., México. 64p.
- Shingleton, A. W., Estep, C. M., Driscoll, M. V. & Dworkin, I. 2009. Many ways to be small: different environmental regulators of size generate distinct scaling relationships in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society Biology Science*, 276(1667): 2625-33.
- Smiley, S. 1988. The Dynamics of Oogenesis and the Annual Ovarian Cycle of *Stichopus californicus* (Echinodermata: Holothuroidea). *Biological Bulletin*, 175: 79–93
- Smith, J.E. 1940. The reproductive system and associated organs of the brittle star *Ophiothrix fragilis*. *Quarterly Journal Microscopical Science*, 82: 267-310.
- Sokal, R.R. & F.J. Rohlf. 1979. *Biometría: principio y métodos estadísticos en la investigación biológica*. H Blume Ediciones. Madrid. 832 p.

- Somerton, D. A. 1980. A computer technique for estimating the size of sexual maturity in crabs. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 37: 1488-1494.
- Soong, K., D. Chang & M. Chao. 2005. Presence of spawn-inducing pheromones in two brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea). *Marine Ecology Progress Series*, 195-201.
- Soong, K., Y. Lin, S. Chao & Chang. D. 2009. Spawning time of two shallow-water brittle stars. *Marine Ecology Progress Series*, 376: 165-171.
- Todd, C.D. & R.W. Doyle 1981. Reproductive strategies of marine benthic invertebrates: A settlement-timing hypothesis. *Marine ecology-Progress series*, 4: 75-83.
- TuTiempo.net. Noviembre, 2019. Horas sol y luna en La Paz. Recuperado de: <https://www.tutiempo.net/mexico/la-paz.html?datos=calendario#cal>
- Viau, V. E., L. S. López G., G. Bond-Buckup & E. M. Rodríguez. 2006. Size at the onset of sexual maturity in the Anomura crab, *Aegla uruguayana* (Aeglidae). *Acta Zoologica* (Stockholm), 87: 253-264.
- Warner, G. 1982. Food and feeding mechanisms: Ophiuroidea. 161-181 pp. In: M. Jangoux & J.M. Lawrence (eds.) *Echinoderm Nutrition*. Balkema, Rotterdam.
- Yoshida, M., 1952. Some observations on the maturation of the sea urchin, *Diadema setosum*. *Annotationes Zoologicae Japanenses*, 25: 265-271.
- Zar, J.H. 2010. Biostatistical analysis. 5a ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. 944 p.

## 12. ANEXOS

### Anexo I. Solución de Davidson

Reactivo	Proporción
Etanol 96%	3/10
Formol	2/10
Glicerina	1/10
Ácido acético	1/10
Agua de mar	3/10

### Anexo II. Protocolo de deshidratación de tejidos, procesador de tejidos Leica ASP6025®.

Reactivo	Duración
Etanol 70%	02:00:00
Etanol 80%	02:00:00
Etanol 96%	02:00:00
Etanol 100%	01:00:00
Etanol 100%	01:00:00
Etanol 100%	01:00:00
Xileno	01:00:00
Xileno	01:00:00
Xileno	01:00:00
Paraplast ® (56°C)	01:00:00
Paraplast ® (56°C)	01:00:00
Paraplast ® (56°C)	01:00:00

**Anexo III. Protocolo de tinción de hematoxilina-eosina, centro de tinción Leica ST5020®.**

Estación caliente o de desparafinación 00:25:00.

<b>Reactivo</b>	<b>Duración</b>
Sustituto de Xilol	00:10:00
Sustituto de Xilol	00:08:00
Sustituto de Xilol	00:08:00
Etanol al 100%	00:03:00
Etanol al 96%	00:03:00
Etanol al 80%	00:03:00
Etanol 70%	00:03:00
H2O	00:01:00
Hematoxilina de Harris	00:40:00
H2O	00:01:00
HCl- alcohol 1%	00:01:00
H2O	00:01:00
NH4OH al 1%	00:01:00
H2O	00:01:00
Eosina 1%	00:01:30
Etanol 96%	00:03:00
Etanol 100%	00:03:00
Sustituto de Xilol	00:03:00
Sustituto de Xilol	00:03:00

**Anexo IV. Parámetros de las relaciones longitud-peso de *Ophiocomella alexandri*, estimados mensualmente.**

mes	n	Longitud (mm)	A	IC inf	IC sup	b	IC inf	IC sup	R <sup>2</sup>	Alometría
julio	47	8.15-21.90	1.03E-03	4.84E-04	2.17E-03	2.541	2.263	2.820	0.883	Negativa
agosto	64	9.50-24.65	9.64E-04	5.07E-04	1.83E-03	2.614	2.384	2.844	0.893	Negativa
septiembre	35	6.35-23.30	4.73E-04	2.72E-04	8.22E-04	2.824	2.613	3.036	0.957	Isométrico
octubre	30	4.60-23.75	8.62E-04	5.14E-04	1.45E-03	2.623	2.426	2.820	0.964	Negativa
noviembre	52	5.50-20.00	1.05E-03	6.15E-04	1.80E-03	2.484	2.272	2.696	0.917	Negativa
diciembre	55	6.85-17.75	1.03E-03	5.28E-04	2.02E-03	2.544	2.276	2.812	0.873	Negativa
enero	66	8.65-18.25	2.12E-03	1.15E-03	3.88E-03	2.308	2.075	2.542	0.859	Negativa
febrero	60	5.50-15.95	9.16E-04	4.77E-04	1.76E-03	2.664	2.397	2.930	0.874	Negativa
marzo	55	7.40-17.85	1.69E-03	6.80E-04	4.20E-03	2.396	2.035	2.757	0.770	Negativa
abril	57	8.20-19.20	1.30E-03	7.43E-04	2.28E-03	2.527	2.309	2.744	0.908	Negativa
mayo	44	6.85-17.35	5.16E-04	2.56E-04	1.04E-03	2.849	2.574	3.123	0.913	Isométrico
junio	57	8.10-18.70	7.67E-04	3.31E-04	1.78E-03	2.717	2.393	3.040	0.837	Isométrico

**Anexo V. Histograma de frecuencia mensual y por lunas de organismos de *O. alexandri* en fase de madurez, liberación y post liberación de gametos.**

