

Gonad index and larval development of the sand dollar *Dendraster excentricus* (Echinodermata; Echinoidea) in Baja California, Mexico

Índice gonadal y desarrollo larvario de la galleta de mar *Dendraster excentricus* (Echinodermata; Echinoidea) en Baja California, México

T Olivares-Bañuelos, S Figueroa-Flores, E Carpizo-Ituarte*

Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, Apartado postal 453, Ensenada 22800, Baja California, México.

* Corresponding author. E-mail: ecarpizo@uabc.edu.mx, ecarpizo@gmail.com

ABSTRACT. The sand dollar *Dendraster excentricus* has been extensively used in diverse studies in Baja California (Mexico). This study shows annual variations in the gonad index and describes larval development under laboratory conditions of *D. excentricus*. Over a period of one year, adult sand dollars (6.73 ± 0.56 cm diameter and 23.22 ± 6.90 g) were collected monthly. Both the monthly analysis of the gonad index (male and female) and the measure of mature eggs were considered to estimate the reproductive period of the sand dollar in Punta Banda Estuary (Baja California). Our results suggest that *D. excentricus* has two maximum reproductive peaks, one during the early spring and another during the summer, although viable gametes were obtained in the laboratory year round. Larval development took 21–23 days from fertilization to metamorphosis under laboratory conditions (19 ± 2 °C, salinity 33.5). The blastula stage was observed 5 h postfertilization, while four-armed echinopluteus larvae, with an average size of 387.00 ± 23.25 μ m (from aboral to dorsal arms), were observed two days after fertilization. A different larval stage was attained approximately every two days. Eight-armed echinopluteus larvae were 744.60 ± 69.45 μ m in size. The completely developed juvenile rudiment was detected 18 days after fertilization and metamorphosed larvae were observed 72 h after induction. These results, while not new for the species, show the reproductive behavior and larval period for the *D. excentricus* populations associated with an estuary at the southern limit of its distribution, and will be useful to document variation in the response of species of ample geographic distribution in global change scenarios.

Key words: *Dendraster excentricus*, larval development, gonad index, Mexican Pacific.

RESUMEN. La galleta de mar *Dendraster excentricus* ha sido extensivamente utilizada en diversos estudios en Baja California (México). El presente trabajo muestra la variación anual del índice gonadal y describe el desarrollo larvario de *D. excentricus* en condiciones de laboratorio. Durante un periodo de un año, se recolectaron mensualmente galletas adultas (6.73 ± 0.56 cm de diámetro, 23.22 ± 6.90 g). El análisis mensual del índice gonadal (hembras y machos) y la determinación del tamaño de los huevos fueron considerados para estimar el periodo reproductivo de esta especie en el estero de Punta Banda (Baja California). Los resultados sugieren que *D. excentricus* presenta dos picos reproductivos máximos, uno durante el inicio de la primavera y otro en el verano, aunque se observaron gametos viables todo el año. El desarrollo larvario tuvo una duración de 21–23 días desde la fertilización hasta la metamorfosis en condiciones de laboratorio (19 ± 2 °C, 33.5 de salinidad). La formación de la blástula se observó a las 5 h postfertilización. Las larvas equinopluteus de cuatro brazos, con un tamaño de 387.00 ± 23.25 μ m desde el brazo aboral al dorsal, se observaron a los dos días de la fertilización. Se desarrolló un estadio larval diferente aproximadamente cada dos días. Las larvas equinopluteus de ocho brazos alcanzaron un tamaño promedio de 744.60 ± 69.45 μ m. El rudimento juvenil completamente desarrollado se detectó al día 18 postfertilización y las larvas metamorfoseadas se observaron 72 h después de la inducción. Los resultados aquí presentados, si bien no son nuevos para la especie, muestran el comportamiento reproductivo y la duración del periodo larvario para las poblaciones de *D. excentricus* asociada a un estero en la parte sur de su distribución y resultan de utilidad para documentar la variabilidad de la respuesta de especies de amplia distribución geográfica en escenarios de cambio global.

Palabras clave: *Dendraster excentricus*, desarrollo larvario, índice gonadal, Pacífico de México.

INTRODUCTION

The sand dollar *Dendraster excentricus* (Eschscholtz 1831) is a common echinoderm along the coast of the Pacific Ocean. It is distributed from southwestern Alaska to the west coast of Baja California Sur (Merrill and Hobson 1970, Mooi 1997). On exposed coasts it inhabits the sandy subtidal and intertidal zones, and in Punta Banda Estuary, located 13 km

INTRODUCCIÓN

La galleta de mar *Dendraster excentricus* (Eschscholtz 1831) es un equinodermo común en las costas del océano Pacífico. Se distribuye desde el suroeste de Alaska hasta la costa oeste de Baja California Sur (Merrill y Hobson 1970, Mooi 1997). En costas expuestas, habita el intermareal y el submareal arenoso, y en el estero de Punta Banda, a 13 km al

to the south of Ensenada (Baja California, Mexico), it is found associated with channels close to the mouth.

The genus *Dendraster* has been widely used in diverse studies, including life cycle (Merrill and Hobson 1970, Niesen 1977, Emler 1986), developmental biology (Burke 1983, Highsmith and Emler 1986, Boidron-Metairon 1988), distribution (Beadle 1989, Mooi 1997, Smith *et al.* 2008), and feeding studies (Timko 1976, Francisco and Herzka 2010), among others. During the reproductive period, sand dollar eggs and sperm are released into the water column where fertilization and subsequent embryonic and larval development occurs (Kozloff 1983). Development is modified by factors such as food availability and temperature (O'Connor *et al.* 2007). On reaching metamorphic competence, larvae metamorphose and transform into postlarvae, which usually settle in areas where adult congeners are found (Burke 1984, Highsmith and Emler 1986). Larval development of *D. excentricus* is basically similar to that described for the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Smith *et al.* (2008) have presented one of the most detailed accounts to date of the larval development of this latter species, providing key information for understanding each one of the stages of this and other echinoderm genera with similar larval development. Studies on *Scaphechinus mirabilis* and *Clypeaster subdepressus* (Dautov and Kashenko 2008, Vellutini and Migotto 2010) have also provided data that contribute to the understanding of the development of echinoderm larvae.

While the development of *D. excentricus* larvae has been extensively documented, the reproductive period and duration of larval development of the populations inhabiting Punta Banda Estuary, the southernmost part of the geographic distribution of this species, have not been studied. Recent research conducted at this site focused on studying the feeding mechanisms in shallow waters (Francisco and Herzka 2010). Initial reports of *D. excentricus* populations in Punta Banda Estuary indicated densities of up to 45 ind m⁻² (Merrill and Hobson 1970), but they have occasionally disappeared temporarily from the intertidal zone, possibly due to local rainfall effects. This study thus aimed to document the gonad index and larval development of *D. excentricus* populations in Punta Banda Estuary. As the larval development of *D. excentricus* is well documented (Tyler 1936, Hart and Strathmann 1994, Collin 1997, Heyland and Hodin 2004), the results presented herein will contribute to the knowledge of the reproductive behavior and duration of the larval period of the populations found in the southernmost part of the geographic distribution range, where habitat conditions and temperature differ from those further north (e.g., California, Washington, and Alaska). This will be useful for understanding the behavior of these estuarine populations of wide geographic distribution under current climate change and ocean acidification conditions.

sur de Ensenada (Baja California, México), se le encuentra asociada a los canales cercanos a la boca.

El género *Dendraster* ha sido ampliamente utilizado en diversos estudios, entre los que se incluyen estudios de ciclo de vida (Merrill y Hobson 1970, Niesen 1977, Emler 1986), biología del desarrollo (Burke 1983, Highsmith y Emler 1986, Boidron-Metairon 1988), distribución (Beadle 1989, Mooi 1997, Smith *et al.* 2008) y alimentación (Timko 1976, Francisco y Herzka 2010), entre otros. Durante la época reproductiva, los huevos y espermatozoides de la galleta de mar son liberados en la columna de agua, donde ocurre la fertilización y el subsecuente desarrollo embrionario y larvario (Kozloff 1983). Este desarrollo, se sabe, es modificado por factores como la alimentación y la temperatura (O'Connor *et al.* 2007). Una vez que alcanzan el estadio competente, las larvas se metamorfosean y se transforman en postlarvas, que generalmente se establecen en sitios con presencia de congéneres adultos (Burke 1984, Highsmith y Emler 1986). El desarrollo larvario de *D. excentricus* comparte elementos básicos con el descrito para el erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*. Para esta especie de erizo, Smith *et al.* (2008) han presentado uno de los desarrollos larvarios más detallados descritos a la fecha para equinodermos. Dicho estudio aporta información clave para entender cada uno de los estadios de éste y otros géneros de equinoideos que comparten desarrollos larvarios similares. Estudios sobre *Scaphechinus mirabilis* y *Clypeaster subdepressus* (Dautov y Kashenko 2008, Vellutini y Migotto 2010) también han proporcionado datos que contribuyen a elucidar el desarrollo en larvas de equinodermos.

A pesar de que el desarrollo larvario ha sido ampliamente documentado para *D. excentricus*, el periodo reproductivo y la duración del desarrollo larvario para las poblaciones localizadas en el estero de Punta Banda, que representan la porción más al sur de su distribución geográfica, no han sido estudiados. Estudios recientes para esta localidad han estado enfocados al entendimiento de los mecanismos de alimentación en sitios poco profundos (Francisco y Herzka 2010). Registros iniciales de las poblaciones de *D. excentricus* en el estero de Punta Banda indicaron densidades de hasta 45 ind m⁻² (Merrill y Hobson 1970), pero en algunos casos las poblaciones han llegado a desaparecer temporalmente del intermareal del estero, posiblemente por un efecto local asociado a la precipitación pluvial. El objetivo del presente trabajo consistió en documentar el índice gonadal y el desarrollo larvario de la galleta de mar *D. excentricus* de poblaciones localizadas en el estero de Punta Banda. Tomando en consideración que el desarrollo larvario de *D. excentricus* ha sido ampliamente documentado (Tyler 1936, Hart y Strathmann 1994, Collin 1997, Heyland y Hodin 2004), los resultados que se presentan en el presente estudio resultan de utilidad para entender el comportamiento reproductivo y la duración del periodo larvario de las poblaciones que habitan la porción más al sur de su distribución geográfica, donde la temperatura y las condiciones del hábitat difieren de sus contrapartes

MATERIAL AND METHODS

Collection and maintenance of adult organisms

Adult sand dollars (*D. excentricus*) were collected monthly during low tide from May 2009 to May 2010 at Punta Banda Estuary in Todos Santos Bay, Baja California, Mexico (31°42'–31°47' N, 116°37'–116°39' W) (fig. 1). This estuary covers an area of approximately 20 km² (~10 km long and 2 km wide) (Buenrostro *et al.* 1999). Thirty adult organisms, measuring 6.73 ± 0.56 cm in diameter and weighing 23.22 ± 6.90 g (mean \pm standard deviation), were collected every month, except in February and March 2010 because they were not found on the banks of the channels during low tides. Their disappearance was attributed to rainfall, which modified the distribution of the fine sediment in the estuary and possibly affected the sand dollar populations. The organisms were transported to the laboratory at the Institute of

más norteñas (e.g., California, Washington y Alaska). Lo anterior resulta de interés para entender el comportamiento de estas poblaciones estuarinas de amplia distribución geográfica en las condiciones actuales de cambio global y acidificación del océano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y mantenimiento de organismos adultos

Galletas de mar (*D. excentricus*) adultas fueron recolectadas mensualmente durante la marea baja de mayo de 2009 a mayo de 2010 en el estero de Punta Banda en la Bahía de Todos Santos, Baja California, México (31°42'–31°47' N, 116°37'–116°39' W) (fig. 1). Este estero comprende un área aproximada de 20 km² (~10 km de longitud por 2 km de ancho) (Buenrostro *et al.* 1999). Cada mes se recolectaron 30 organismos adultos con un tamaño de 6.73 ± 0.56 cm de diámetro y un peso de 23.22 ± 6.90 g (media \pm desviación estándar). En febrero y marzo de 2010 no se recolectaron galletas de mar debido a que no se encontraron en las orillas de los canales durante las mareas bajas. Este hecho fue atribuido a la época de lluvias, la cual modificó la distribución del sedimento fino en el estero y posiblemente afectó las poblaciones de galleta de mar. Los organismos se transportaron al laboratorio del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (Ensenada) en cubetas con agua de mar y se colocaron en acuarios con temperatura promedio de 19 ± 2 °C. Los acuarios utilizados fueron habilitados con una cama de arena del estero (5 cm de espesor) y se mantuvieron con aireación y flujo de agua de mar constante (1 L min⁻¹). Veinte de las galletas recolectadas mensualmente fueron utilizadas para determinar el índice gonadal y 10 para llevar a cabo los cultivos de larvas.

Determinación del índice gonadal

El índice gonadal se determinó en un periodo de 24 h posteriores a la llegada de las galletas de mar al laboratorio. Los organismos fueron pesados en una balanza granataria (0.01 g de precisión), medidos por su parte más ancha con un calibrador vernier (0.1 cm de precisión) y, posteriormente, diseccionados para obtener las gónadas. Para determinar el sexo de cada organismo, las gónadas se pesaron y observaron al microscopio estereoscópico. El índice gonadal se calculó en 10 hembras y en 10 machos de acuerdo con Phillips *et al.* (1998): índice gonadal = peso gónada \times 100/peso total de la galleta.

Una vez pesadas las gónadas, se tomaron muestras representativas de los óvulos y se colocaron en una caja de Petri. Veinte huevos de cada hembra diseccionada, que presentaban la cubierta gelatinosa pigmentada característica de la especie, se fotografiaron con ayuda del microscopio compuesto Axioskop2 Zeiss motorizado para su posterior análisis.

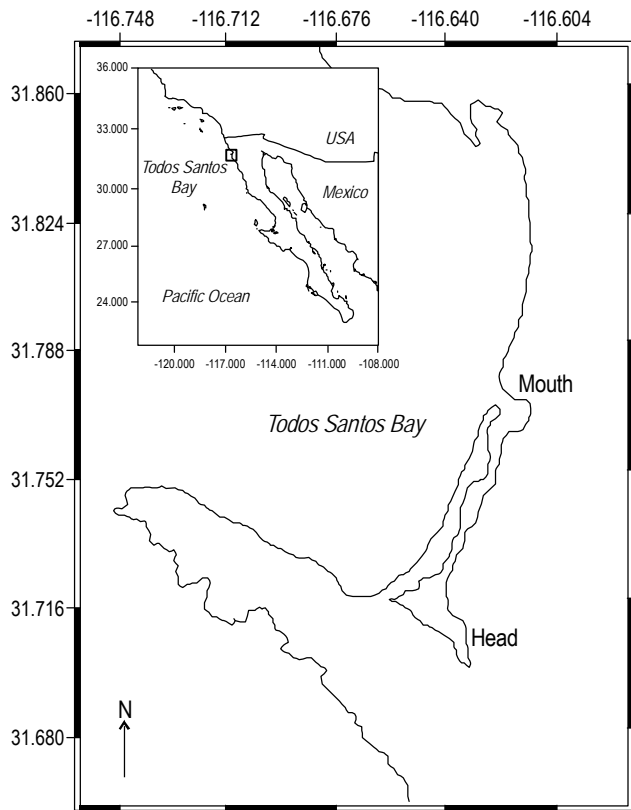


Figure 1. Map of Punta Banda Estuary in Todos Santos Bay, Baja California, Mexico (taken from NOAA). Specimens of the sand dollar *Dendraster excentricus* were collected at the estuary mouth. The numbers indicate latitude North and longitude West (°) and the black bars represent a distance of 4 km.

Figura 1. Mapa del estero Punta Banda en Baja California, México (tomado de la NOAA). Las galletas de mar *Dendraster excentricus* fueron recolectadas en la boca del estero. Los números indican la latitud Norte y longitud Oeste en grados (°) y cada barra negra representa una distancia de 4 km.

Oceanological Research (Ensenada) in buckets containing seawater and placed in tanks with average water temperature of 19 ± 2 °C. The aquaria contained a bed of sand from the estuary (5 cm thick) and were supplied with aeration and continuous water flow (1 L min^{-1}). Twenty of the sand dollars collected monthly were used to determine the gonad index and ten for the larval cultures.

Determination of the gonad index

The gonad index was determined 24 h after the arrival of the sand dollars at the laboratory. The organisms were weighed on a granatary scale (0.01 g precision), measured across their widest part with a vernier caliper (0.1 cm precision), and dissected to remove the gonads. Gonads were weighed and observed under a stereoscopic microscope for sex determination. The gonad index was calculated for 10 females and 10 males according to Phillips *et al.* (1998): gonad index = gonad weight \times 100/total body weight.

After weighing, representative samples of eggs were taken and placed in a Petri dish. Twenty eggs of each dissected female showing the pigmented gelatinous covering characteristic of the species were photographed using a motorized Zeiss Axioskop 2 compound microscope for later analysis.

Larval culture

Spawning was induced by injecting approximately 800 μL of 0.55 M potassium chloride (KCl) in the oral side of the sand dollar (Strathmann 1987, Salas-Garza *et al.* 2005). The organisms were then placed oral side up in containers filled with 1- μm filtered seawater (Cuno filters) and irradiated with UV light. After expulsion of the gametes (approximately 5 min after injection of KCl), one female and one male were selected for the fertilization process. After spawning, the organisms were allowed to recover in tanks supplied with aeration and constant seawater flow and then returned to the site where they were collected.

To achieve fertilization, the gametes of one female and one male were gently mixed for one minute in a container filled with 5 L of filtered seawater. The container's content was filtered through a 90- μm pore size filter to remove excess sperm and prevent polyspermy. Fertilized eggs were placed in containers filled with 15 L of filtered seawater, covered, and left to develop at a temperature of 19 ± 2 °C. After 24 h, prism stage larvae were passed to 45-L cylindrical fiberglass tanks supplied with aeration and 1- μm filtered seawater. Larvae were cultured at a density of 3–4 larvae mL^{-1} . During larval rearing, 50% and 100% water changes were performed daily and water temperature was recorded. During the first six days of culture, larvae were fed *Rhodomonas* sp. at a concentration of 10,000 cells mL^{-1} , after which the

Cultivo de larvas

El desove fue inducido mediante la inyección de aproximadamente 800 μL de cloruro de potasio (KCl) 0.55 M en la parte oral de la galleta (Strathmann 1987, Salas-Garza *et al.* 2005). Posterior a la inyección, los organismos se colocaron con la parte oral hacia arriba en recipientes con agua de mar filtrada hasta 1 μm (filtros Cuno) e irradiada con luz UV. Una vez que los organismos expulsaron sus gametos (aproximadamente 5 min después de la inyección con KCl), se seleccionó una hembra y un macho para realizar la fertilización. Al término del desove los organismos se colocaron en acuarios con aireación y flujo constante de agua de mar, hasta su recuperación. Una vez recuperados del desove, los organismos se regresaron al sitio del estero donde fueron recolectados.

Para llevar a cabo la fertilización, los gametos de una hembra y un macho se mezclaron suavemente durante un minuto en un recipiente con 5 L de agua de mar filtrada. El contenido del recipiente se tamizó a través de una malla de 90 μm de luz para remover el exceso de espermatozoides y prevenir la poliespermia. Los huevos fertilizados se colocaron en recipientes con 15 L de agua de mar filtrada, se cubrieron y se dejaron a una temperatura de 19 ± 2 °C. Después de 24 h, las larvas (en estadio de prisma) se pasaron a tanques cónicos de fibra de vidrio de 45 L con aireación y agua de mar filtrada hasta 1 μm . La densidad del cultivo fue de 3–4 larvas mL^{-1} . Durante el desarrollo larvario se realizaron recambios de agua diariamente, al 50% y 100%, y se registró la temperatura del agua. Durante los primeros seis días de cultivo, las larvas se alimentaron con *Rhodomonas* sp. a una concentración de 10,000 cél mL^{-1} ; a partir del día siete, se incrementó la concentración a 15,000 cél mL^{-1} . Se realizaron al menos 12 cultivos de larvas de galleta de mar durante el periodo de estudio.

Desarrollo larvario

La documentación del desarrollo embrionario y larvario se hizo a partir de la fertilización de los gametos. El tiempo de fertilización se consideró como tiempo cero, y a partir de ahí se fotografiaron las larvas cada 30 minutos mediante un microscopio compuesto Axioskop2 Zeiss motorizado. Se tomaron microfotografías hasta que los embriones alcanzaron el estadio de gástrula. Posterior a este estadio de desarrollo, se realizaron observaciones diarias con un microscopio estereoscópico. Cuando se observaron como larvas pluteus de cuatro, seis u ocho brazos, larvas competentes o postlarvas recién metamorfoseadas, se tomaron microfotografías con el microscopio compuesto para su posterior análisis.

Medición de gametos y larvas

Todas las mediciones se realizaron a partir de microfotografías tomadas con el microscopio compuesto Axioskop2

concentration increased to 15,000 cells mL⁻¹. At least 12 larval cultures were performed during the study period.

Larval development

Embryonic and larval development was documented following the fertilization of gametes. After fertilization at time zero, larvae were photographed every 30 min using a motorized Zeiss Axioskop 2 compound microscope. Microphotographs were taken until embryos reached the gastrula stage, after which daily observations were made under a stereoscopic microscope. When four-, six-, and eight-armed pluteus larvae, competent larvae, or recently metamorphosed larvae were observed, microphotographs were taken with the compound microscope for later analysis.

Measurement of gametes and larvae

All measurements were made on microphotographs taken with the Zeiss Axioskop 2 compound microscope and analyzed using Zeiss AxioVision software (AxioVs40 v4.8.0.0). Egg size was determined by measuring the maximum diameter. The size of blastulae and gastrulae was obtained by measuring 20 embryos in each of these stages of development; blastulae were measured diametrically and gastrulae longitudinally from animal pole to vegetal pole. To determine the size of four-, six-, and eight-armed pluteus and competent larvae, 20 specimens were measured in each case; the size of each larva corresponds to four measurements taken from the aboral side to the dorsal arms (two from the anterolateral arms and two from the posterodorsal arms). To estimate the size of postlarvae, 20 specimens were measured longitudinally across their widest part.

Data analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism v4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Data were analyzed using the D'Agostino-Pearson omnibus K2 normality test considering a 95% confidence limit. For adults, a Kruskal-Wallis non-parametric test and Dunn's post test ($\alpha = 0.05$) were used to determine the mean \pm standard deviation (SD) of the gonad index ($n = 10$), size ($n = 20$), and weight ($n = 20$). For eggs, the same tests were used and the maximum and minimum values of 20 measurements \pm SD were plotted. The measurements during larval development represent the mean of 20 repetitions ($M \pm SD$). For all sources of variation, $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Analysis of the mean size (in centimeters) of adult *D. excentricus* revealed that there were no significant statistical differences among males ($N = 110$, $M = 6.78 \pm 0.26$,

Zeiss, y las microfotografías fueron analizadas con el programa AxioVision Zeiss (AxioVs40 V4.8.0.0). El tamaño de los huevos se determinó considerando su diámetro máximo. El tamaño de las blástulas y gástrulas se obtuvo midiendo 20 embriones que se encontraban en cada uno de estos estadios de desarrollo; las blástulas se midieron diametralmente y las gástrulas longitudinalmente del polo animal al vegetal. En el caso de larvas pluteus de cuatro, seis y ocho brazos y larvas competentes, se obtuvo el tamaño de cada estadio considerando las medidas obtenidas de 20 larvas; el tamaño de cada larva corresponde al promedio de cuatro mediciones realizadas desde la parte aboral de la larva hasta los brazos dorsales (dos mediciones en brazos anterolaterales y dos en brazos posterodorsales). El tamaño de las postlarvas se calculó midiendo longitudinalmente 20 postlarvas por su parte más ancha.

Análisis de datos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism v4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Los datos se analizaron con la prueba de normalidad de D'Agostino-Pearson (omnibus K2) considerando un límite de confianza del 95%. En organismos adultos, la determinación de la media \pm desviación estándar (DE) de la talla ($n = 20$), el peso ($n = 20$) y el índice gonadal ($n = 10$) consistió en una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y una postprueba de Dunns ($\alpha = 0.05$). Para los huevos, se realizó esta misma prueba y se graficaron los máximos y mínimos obtenidos de 20 mediciones \pm DE. Las mediciones durante el desarrollo larval representan la media de 20 repeticiones ($M \pm DE$). Para todas las fuentes de variación, se consideró significativa una $P < 0.05$.

RESULTADOS

El análisis de la media (\pm DE) de la talla (en centímetros) de organismos adultos de *D. excentricus* mostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los machos ($N = 110$, $M = 6.78 \pm 0.26$, Kruskal-Wallis = 7.306, $P = 0.1206$) o entre las hembras ($N = 110$, $M = 6.64 \pm 0.19$, Kruskal-Wallis = 10.19, $P = 0.0374$). La media del peso de los machos fue de 23.38 ± 5.94 g ($N = 110$, $P = 0.1015$) y la de las hembras fue de 23.35 ± 4.89 g ($N = 110$, $P = 0.0356$), lo que demuestra que este factor tampoco fue estadísticamente significativo entre los organismos de estudio.

El diámetro de los huevos fue significativamente diferente en los primeros meses del año de muestreo (mayo-julio de 2009). El menor tamaño ($M \pm DE$) de los huevos se registró en mayo de 2009, con un valor de 88.63 ± 5.70 μ m, y presentó una diferencia altamente significativa con respecto a la media máxima registrada en noviembre de 2009, que fue de 187.60 ± 24.54 μ m (<0.001 , Kruskal-Wallis = 183.9, $P < 0.0001$) (fig. 2a). La media del tamaño de los huevos en

Kruskal-Wallis = 7.306, $P = 0.1206$) or among females ($N = 110$, $M = 6.64 \pm 0.19$, Kruskal-Wallis = 10.19, $P = 0.0374$). Mean weight was 23.38 ± 5.94 g ($N = 110$, $P = 0.1015$) for males and 23.35 ± 4.89 g ($N = 110$, $P = 0.0356$) for females, also indicating no significant statistical differences.

Egg diameter was significantly different during the first months of the study period (May–July 2009). Minimum mean egg size ($M \pm SD$) was 88.63 ± 5.70 μm , recorded in May 2009, and it was highly significantly different from the maximum mean egg size of 187.60 ± 24.54 μm recorded in November (<0.001 , Kruskal-Wallis = 183.9, $P < 0.0001$) (fig. 2a). Mean egg size for May 2009 ($n = 20$, $M = 88.63 \pm 5.70$ μm) was highly significantly different (<0.001 , Kruskal-Wallis = 122.4) from that for September–November 2009 ($n = 60$, $M = 145.50 \pm 34.66$ μm), December 2009–January 2010 ($n = 40$, $M = 144.90 \pm 9.41$ μm), and April–May 2010 ($n = 40$, $M = 145.80 \pm 20.53$ μm). Highly significant differences were also observed (<0.001 , Kruskal-Wallis = 122.4) when the mean for September–November 2009 (145.50 ± 34.66 μm), December 2009–January 2010 (144.90 ± 9.41 μm), and April–May 2010 (145.80 ± 20.53 μm) was compared to the mean for June–August 2009 ($n = 60$, 102.80 ± 18.83 μm).

The gonad index of males showed greater variability than the gonad index of females (fig. 2b). The mean monthly female gonad index had a maximum value of 6.45% (± 2.81) in January 2010 and a minimum of 3.10% (± 1.59) in October 2009, with no statistically significant differences between them (Kruskal-Wallis = 101.7, $P < 0.0001$). The highest female gonad index values occurred during December–January 2010 ($n = 20$, $M = 4.87 \pm 2.67$) and the lowest during April–May 2010 ($n = 20$, $M = 3.22 \pm 0.96$), with no significant statistical differences between both periods; however, the values for June–August 2009 ($n = 30$, $M = 4.02 \pm 1.36$) were significantly different than those for April–May 2010 (0.01–0.05, Kruskal-Wallis = 12.30, $P = 0.0153$).

The maximum and minimum monthly male gonad index values were recorded in June 2009 ($n = 10$, $M = 5.54 \pm 1.52$) and October 2009 ($n = 10$, $M = 2.13 \pm 0.91$), respectively; there was a highly significant difference between both means (<0.001 , Kruskal-Wallis = 101.7). The male gonad index showed significant differences (<0.05 , Kruskal-Wallis = 27.51, $P < 0.0001$) between May 2009 ($n = 10$, $M = 4.43 \pm 0.34$) and April–May 2010 ($n = 20$, $M = 2.41 \pm 0.70$), between June–August 2009 ($n = 30$, $M = 4.43 \pm 1.96$) and September–November 2009 ($n = 30$, $M = 2.79 \pm 1.42$), and between September–November 2009 and April–May 2010.

Sand dollar sperm had a milky white color and a mean size of 5.20 ± 0.29 μm (fig. 3a). Sperm concentration ranged from 2.00×10^{10} to 2.00×10^{12} sperm mL^{-1} . Female gametes had a pale pink color, a gelatinous coating with small peripheral purple granules (fig. 3b), and a mean size of 138.70 ± 27.82 μm . Egg counts per spawning female ranged from 250,000 to 550,000 eggs per individual.

mayo de 2009 ($n = 20$, $M = 88.63 \pm 5.70$ μm) presentó diferencias altamente significativas (<0.001 , Kruskal-Wallis = 122.4) con respecto a la media de septiembre–noviembre de 2009 ($n = 60$, $M = 145.50 \pm 34.66$ μm), diciembre de 2009–enero de 2010 ($n = 40$, $M = 144.90 \pm 9.41$ μm) y abril–mayo de 2010 ($n = 40$, $M = 145.80 \pm 20.53$ μm). También se observaron diferencias altamente significativas (<0.001 , Kruskal-Wallis = 122.4) cuando se comparó la media de septiembre–noviembre de 2009 (145.50 ± 34.66 μm), diciembre de 2009–enero de 2010 (144.90 ± 9.41 μm) y abril–mayo de 2010 (145.80 ± 20.53 μm) contra la media de junio–agosto 2009 ($n = 60$, 102.80 ± 18.83 μm).

El índice gonadal de los machos presentó una mayor variabilidad que en las hembras (fig. 2b). La media mensual del índice gonadal de hembras tuvo un valor máximo de 6.45% (± 2.81) en enero de 2010 y un mínimo de 3.10% (± 1.59) en octubre de 2009, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellas (Kruskal-Wallis = 101.7, $P < 0.0001$). El periodo con valores mayores del índice gonadal para las hembras se presentó durante diciembre–enero de 2010 ($n = 20$, $M = 4.87 \pm 2.67$) y el periodo con valores menores se presentaron en abril–mayo de 2010 ($n = 20$, $M = 3.22 \pm 0.96$), sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos periodos; sin embargo, los valores de junio–agosto de 2009 ($n = 30$, $M = 4.02 \pm 1.36$) tuvieron una diferencia significativa con respecto a la registrada en abril–mayo de 2010 (0.01–0.05, Kruskal-Wallis = 12.30, $P = 0.0153$).

Para los machos, se registró el valor máximo mensual de índice gonadal durante junio de 2009 ($n = 10$, $M = 5.54 \pm 1.52$) y el valor mínimo durante octubre de 2009 ($n = 10$, $M = 2.13 \pm 0.91$); se encontró una diferencia altamente significativa entre ambas medias (<0.001 , Kruskal-Wallis = 101.7). En estos organismos, el índice gonadal registró diferencias significativas (<0.05 , Kruskal-Wallis = 27.51, $P < 0.0001$) entre mayo de 2009 ($n = 10$, $M = 4.43 \pm 0.34$) y abril–mayo de 2010 ($n = 20$, $M = 2.41 \pm 0.70$), entre junio–agosto de 2009 ($n = 30$, $M = 4.43 \pm 1.96$) y septiembre–noviembre de 2009 ($n = 30$, $M = 2.79 \pm 1.42$) y entre septiembre–noviembre de 2009 y abril–mayo de 2010.

Los espermatozoides de *D. excentricus* presentaron un color blanco lechoso y un tamaño de 5.20 ± 0.29 μm (fig. 3a). La concentración de espermatozoides varió entre 2.00×10^{10} y 2.00×10^{12} espermas mL^{-1} . En las hembras, los gametos presentaron un color rosa pálido, una cubierta gelatinosa con pequeños gránulos periféricos de color púrpura (fig. 3b) y un diámetro medio de 138.70 ± 27.82 μm . La concentración de huevos por hembra desovada osciló entre 250,000 y 550,000 huevos por individuo.

La fertilización de los huevos se confirmó con la presencia de la membrana de fertilización (fig. 3c). La primera división celular se detectó 50 min después (fig. 3d), y, en intervalos de aproximadamente 40 min, se presentaron las subsecuentes divisiones celulares (fig. 3e–j) hasta que a los 220 min se formó la blástula temprana (fig. 3k).

Egg fertilization was confirmed by the presence of the fertilization membrane (fig. 3c). First cell division occurred after 50 min (fig. 3d), followed by the occurrence, at approximately 40-min intervals, of the subsequent cell divisions (fig. 3e–j) until the early blastula was formed after 220 min (fig. 3k). Five hours after fertilization, late blastulae about to hatch were observed (fig. 3l), followed by mesenchyme blastulae (fig. 3m) showing an accumulation of primary mesenchyme cells migrating into the blastocoel. The initial formation of the archenteron was clearly visible in blastulae in the process of gastrulation (fig. 3n, o); the formed

Transcurridas 5 h postfertilización, se observó la formación de blástulas tardías a punto de eclosionar (fig. 3l), seguidas por blástulas mesenquimales (fig. 3m) en las que fue posible observar la acumulación de células primarias mesenquimales migrando al blastocelo del embrión. La formación incipiente del arquenteron fue claramente visible en blástulas en proceso de gastrulación (fig. 3n, o) y el blastoporo formado se convirtió en el ano, mientras que las células primarias mesenquimales dieron origen a las espículas tri-radiales que formaron el esqueleto de la larva. El arquenterón completamente formado dio origen al intestino primitivo y, en su parte superior, se

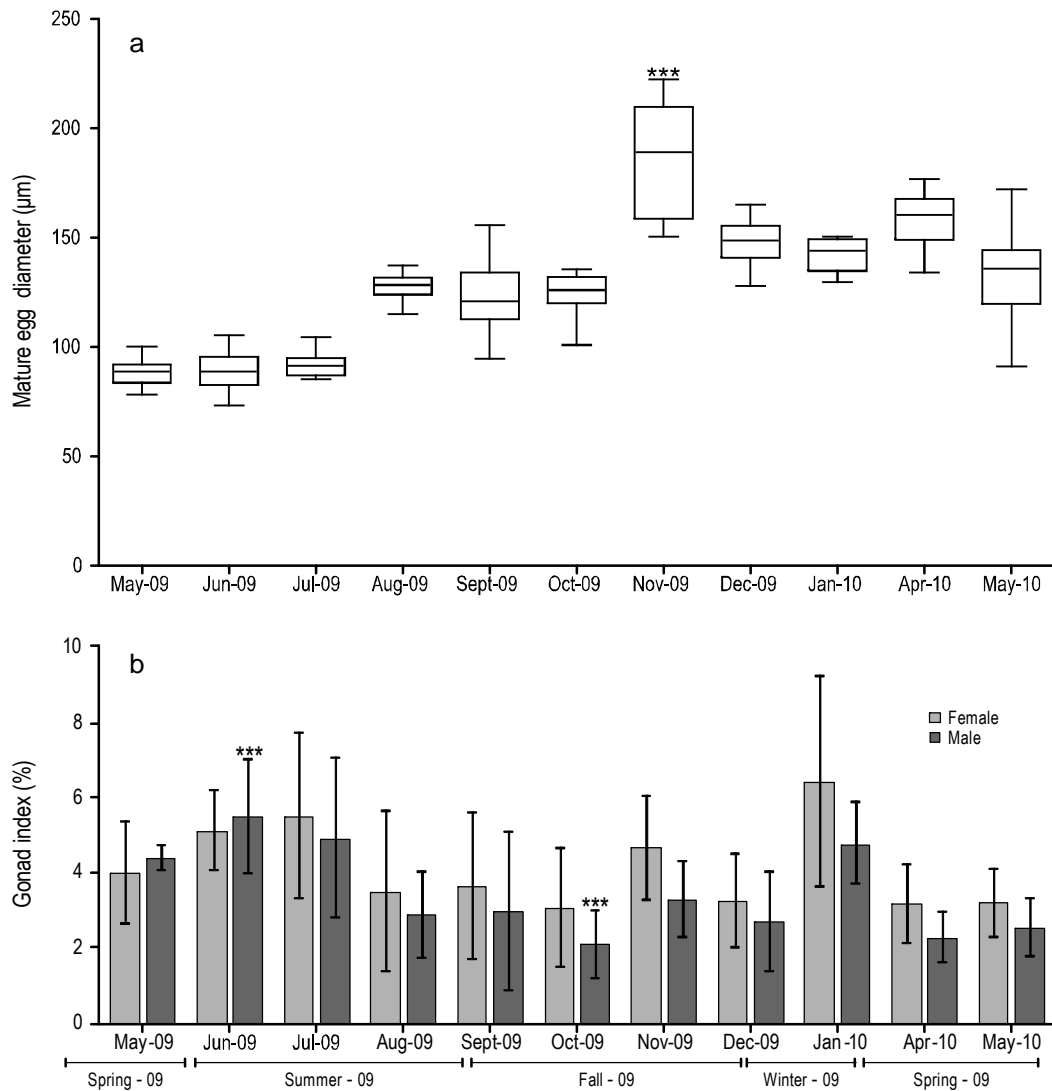


Figure 2. Egg diameter and gonad index of *Dendraster excentricus*. Plots show the mean \pm standard deviation of (a) the maximum and minimum values (μm) of 20 eggs and (b) the gonad index (%) for males and females. The x axis shows the month and year when the adult specimens were collected at Punta Banda Estuary (Baja California, Mexico). *** $P < 0.0001$, 95% confidence interval.

Figura 2. Diámetro de huevos e índice gonadal de *Dendraster excentricus*. Las gráficas representan la media \pm la desviación estándar de (a) los valores máximos y mínimos (μm) de 20 huevos y (b) el índice gonadal (%) para hembras y machos. El eje x indica el mes y el año en que se realizó la recolecta de los especímenes adultos en el estero Punta Banda (Baja California, México). *** $P < 0.0001$, intervalo de confianza del 95%.

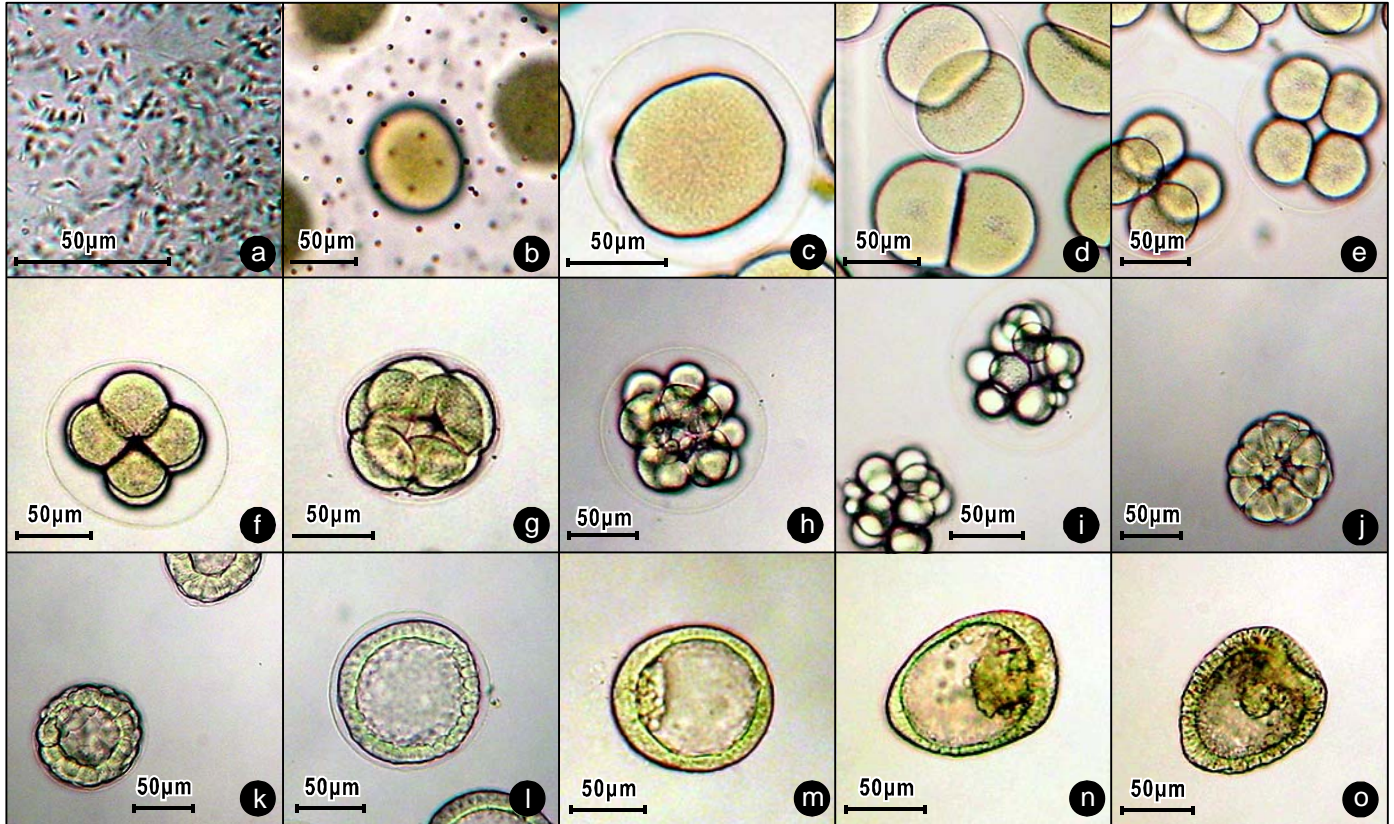


Figure 3. Embryonic development of *Dendraster excentricus*. Microphotographs of gametes and phases of cell division after fertilization: (a) sperm; (b) eggs; (c) fertilized egg; (d) 2-cell stage; (e) 4-cell stage; (f) 8-cell stage; (g) 16-cell stage; (h) 32-cell stage; (i) 64-cell stage; (j) 128-cell stage; (k) early blastula stage; (l) blastula; (m) mesenchyme blastula, mesenchyme cells are visible in the blastopore; (n) early gastrulation, beginning of archenteron formation; and (o) gastrulation. The scale (μm) is shown at the bottom of each microphotograph.

Figura 3. Desarrollo embrionario de *Dendraster excentricus*. Microfotografías de gametos de galleta de mar y fases de división celular posteriores al proceso de fertilización: (a) espermatozoides; (b) huevos; (c) huevo fertilizado; (d) estadio de 2 células; (e) estadio de 4 células; (f) estadio de 8 células; (g) estadio de 16 células; (h) estadio de 32 células; (i) estadio de 64 células; (j) estadio de 128 células; (k) estadio de blástula temprana; (l) blástula; (m) blástula mesenquimal, las células mesenquimales son visibles en el blastoporo; (n) gastrulación temprana, inicio de la formación del arquenteron; (o) gastrulación. La escala (μm) está indicada en la parte inferior de cada microfotografía.

blastopore becomes the anus, while the primary mesenchyme cells initiate the triradiate spicules that form the larval skeleton. The completely formed archenteron is the primitive gut, the larval mouth forming on the upper side. Twenty-four hours postfertilization, the gastrula became prism-shaped and continued as such for another 24 h, during which the extended spicules formed that will become the skeleton that supports the arms of echinopluteus larvae.

After 24 h, larvae developed the anterolateral arms and then the postoral arms (table 1). Forty-eight hours postfertilization, larvae reached the four-arm echinopluteus stage (fig. 4a) and a completely formed digestive system was observed through the translucent epithelium. During this stage, larvae attained a size of $387.00 \pm 23.25 \mu\text{m}$ (table 1) and began to feed on microalgae using the ciliated bands on both pairs of arms; the anterolateral arms extended to one-third of the body length, while the postoral arms extended

formó la boca de la larva. Veinticuatro horas después de la fertilización, la gástrula adquirió la forma de prisma. Como prisma continuó por 24 h adicionales, durante las cuales se formaron las espículas extendidas que se convertirían en el esqueleto que da soporte a los brazos de la larva equinopluteus.

Tras 24 h, las larvas desarrollaron los brazos anterolaterales y, posteriormente, los brazos postorales (tabla 1). A las 48 h postfertilización, las larvas alcanzaron el estadio equinopluteus de cuatro brazos (fig. 4a) y se observó, a través del epitelio translúcido, un sistema digestivo completamente formado. Durante este estadio las larvas alcanzaron un tamaño de $387.00 \pm 23.25 \mu\text{m}$ (tabla 1) y comenzaron a alimentarse de microalgas, con las bandas ciliadas presentes en ambos pares de brazos. En este estadio, se observó que los brazos anterolaterales se alargaron hasta un tercio de la longitud corporal, mientras que los brazos postorales se

Table 1. Embryonic and larval development of *Dendroaster excentricus* cultured under laboratory conditions (19 ± 2 °C, salinity 33.5).**Tabla 1.** Desarrollo embrionario y larvario de *Dendroaster excentricus* cultivada en condiciones de laboratorio (19 ± 2 °C, 33.5 de salinidad).

Stage of development	Age after fertilization	Size ($\mu\text{m} \pm 95\%$ confidence) ^a
First cell division	50 min	138.70 \pm 27.82
Second cell division	90 min	138.70 \pm 27.82 ^b
Early blastula	220 min	107.80 \pm 6.51
Blastula	5 h	107.80 \pm 6.51 ^b
Early gastrula	6 h	106.60 \pm 5.78
Gastrula	9 h	106.60 \pm 5.78 ^b
Four-armed pluteus	48 h	387.00 \pm 23.25
Six-armed pluteus	5 days	525.50 \pm 63.21
Eight-armed pluteus	8 days	744.60 \pm 69.45
Competent	18 \pm 1 days	639.00 \pm 30.72
Metamorphic	22 \pm 1 days	355.50 \pm 49.77

^a Values indicate mean \pm SD of 20 independent measurements.^b During these stages, changes in larval size were not observed, so the same values as in the previous stage are given.

away from the body. During the following hours, the postoral arms of the larvae became thicker than the anterolateral arms and, after three days, the skeleton developed gradually until forming the posterodorsal arms. Five days after fertilization, larvae attained the six-arm echinopluteus stage (fig. 4b) and mean size was $525.50 \pm 63.21 \mu\text{m}$. Eight days postfertilization, the last two pairs of preoral arms formed and larvae attained the eight-arm echinopluteus stage (fig. 4c); they measured $744.60 \pm 69.45 \mu\text{m}$ and the juvenile rudiment was observed. In the following days, larvae became wider posteriorly and rounder in shape (fig. 4d). The stomach lengthened considerably and the arms extended anteriorly; the postoral and posterodorsal arms projected more deeply into the larval body. After 18 days of culture, larvae measured $639.00 \pm 30.72 \mu\text{m}$. The circumference of the rudiment increased and there was invagination of the ectoderm towards the stomach; the rudiment continued to grow, as did the primordia of the ambulacral feet and the juvenile spines. As the size of the rudiment increased, the vestibular pore opened (competent larvae ready to metamorphose).

Metamorphosis of *D. excentricus* larvae initiated with a decrease in the size and thickness of the arms. The epithelium covering the arms, together with the ciliated bands on the larval body, joined its dorsal part. Larvae began to settle at the bottom of the culture tank, probably because of increased body weight and the loss of the ciliated bands that allowed them to swim in the water column (fig. 4e). The ambulacral feet emerged from the body through the vestibular pore,

alejaron del cuerpo larval. En las horas siguientes, los brazos postorales de las larvas se volvieron más gruesos que los anterolaterales y, después de tres días, el esqueleto se desarrolló gradualmente hasta formar los brazos posterodorsales. Las larvas alcanzaron el estadio equinopluteus de seis brazos cinco días después de la fertilización (fig. 4b) y la media de su tamaño fue de $525.50 \pm 63.21 \mu\text{m}$. A los ocho días, se formaron los dos últimos pares de brazos preorales y las larvas pasaron al estadio equinopluteus de ocho brazos (fig. 4c). Las larvas midieron $744.60 \pm 69.45 \mu\text{m}$ y se observó la presencia del rudimento juvenil desarrollado. En los días siguientes, las larvas comenzaron a ensancharse por su extremo posterior y presentaron una forma más redondeada (fig. 4d). Consecutivamente, se alargó el estomago significativamente y los brazos se extendieron anteriormente; los brazos postorales y posterodorsales se proyectaron más profundamente en el cuerpo de la larva. A los 18 días de cultivo las larvas midieron $639.00 \pm 30.72 \mu\text{m}$. La circunferencia del rudimento se incrementó y se presentó una invaginación del ectodermo hacia el estómago; continuó el crecimiento del rudimento, de los primordios de los pies ambulacrales y de las espinas juveniles. Conforme el tamaño del rudimento incrementó, se abrió el poro vestibular (larvas en estadio competente listas para metamorfosearse).

La metamorfosis en *D. excentricus* inició con una disminución en el tamaño y grosor de los brazos. El epitelio que recubre los brazos, junto con las bandas ciliadas en el cuerpo de la larva, se unió a su parte dorsal. Las larvas comenzaron a asentarse en el fondo del tanque de cultivo, probablemente por el incremento en el peso corporal y por la pérdida de bandas ciliares que le permitían nadar en la columna de agua (fig. 4e). Los pies ambulacrales emergieron del cuerpo larval por el poro vestibular, y el rudimento se evirtió por ese mismo poro. Las espículas que soportaban los brazos rasgaron la epidermis de la larva y ésta comenzó a colapsar. Después de algunas horas, se completó la metamorfosis con la eversión del rudimento y fue posible observar espinas adultas y juveniles, y pies ambulacrales con una forma puntiaguda en su extremo distal (fig. 4f). A los 22 (± 1) días de cultivo, a una temperatura de $17\text{--}21$ °C y una salinidad de 33.5, las postlarvas se encontraban metamorfoseadas y tenían un tamaño promedio de $355.50 \pm 49.77 \mu\text{m}$.

DISCUSIÓN

La variación en el índice gonadal con dos picos máximos, uno en verano y otro en invierno, hace suponer que posiblemente estos periodos indican que la máxima actividad reproductiva para *D. excentricus* sucede en septiembre y después en diciembre en el estero de Punta Banda. Cabe mencionar que en el laboratorio fue posible obtener gametos viables la mayor parte del año, mediante inducción al desove de organismos adultos con KCl. Lane y Lawrence (1979) expusieron que en equinodermos se presenta un incremento en el índice gonadal justo antes del desove. Este hecho fue

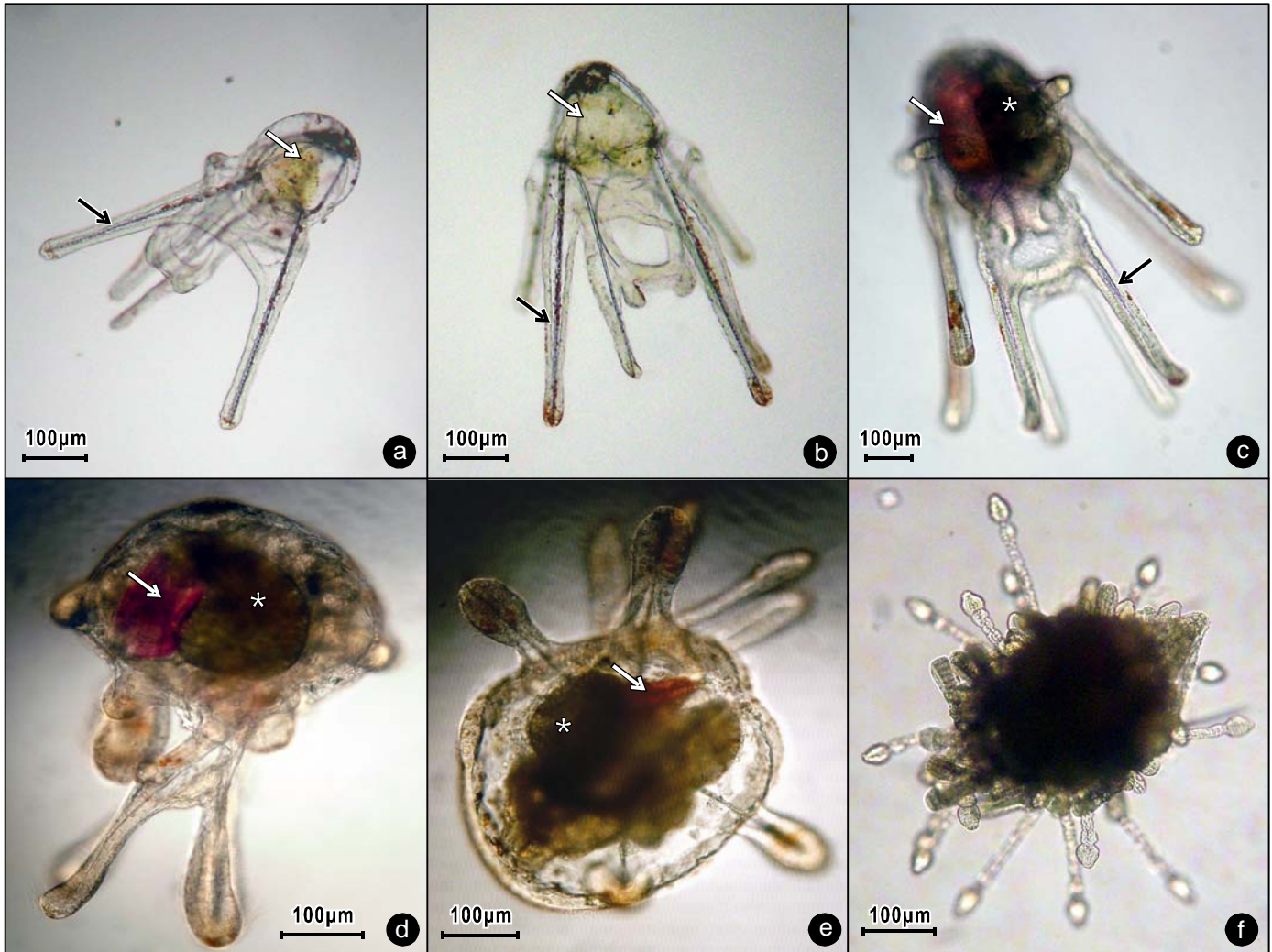


Figure 4. Larval development of *Dendraster excentricus* under laboratory conditions (19 ± 2 °C, salinity 33.5): (a) four-armed pluteus, (b) six-armed pluteus, (c) eight-armed pluteus showing the juvenile rudiment, (d) competent larva showing advanced rudiment, (e) eversion of ambulatory feet, and (f) metamorphosed postlarva. The stomach (white arrow), arm spicules (black arrow), and rudiment (*) are indicated.

Figura 4. Desarrollo larvario de *Dendraster excentricus* en condiciones de laboratorio (19 ± 2 °C, 33.5 de salinidad): (a) pluteus de cuatro brazos, (b) pluteus de seis brazos, (c) pluteus de ocho brazos donde se aprecia el rudimento juvenil de la larva, (d) larva competente con un rudimento avanzado, (e) eversion de los pies ambulacrales y (f) postlarva metamorfoseada. Se indican el estómago (flechas blancas), las espículas de los brazos (flechas negras) y el rudimento (*).

through which rudiment eversion also occurred. The spicules supporting the arms tore the larval epidermis and it began to collapse. After a few hours, metamorphosis was completed by the eversion of the rudiment and it was possible to observe adult and juvenile spines, and distally-pointed ambulacral feet (fig. 4f). After $22 (\pm 1)$ days of culture, at a temperature of $17\text{--}21$ °C and salinity of 33.5, the metamorphosed postlarvae had a mean size of 355.50 ± 49.77 µm.

DISCUSSION

The variation in the gonad index with two peaks, one in summer and another in winter, suggests that maximum

corroborado en el erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* (Phillips *et al.* 1998) y la galleta de mar *Mellita quinquiesperforata* (Lane y Lawrence 1980), lo que concuerda con las observaciones para *D. excentricus* en el presente estudio.

La producción de gametos viables en el laboratorio durante casi todo al año indica que la reproducción puede estar relacionada con las variaciones de temperatura en el estero. Se infiere que hay una maduración de gametos durante el verano (junio-agosto), cuando las temperaturas del estero oscilan entre 22 y 25 °C (López-Rasgado y Herzka 2009), tal como sucede en algunas especies tropicales de equinodermos como el erizo *Centrostephanus coronatus*

reproductive activity of *D. excentricus* in Punta Banda Estuary occurs in September and in December. It should be mentioned, however, that in the laboratory it was possible to obtain viable gametes throughout most of the year by inducing spawning of adult organisms with KCl. According to Lane and Lawrence (1979), there is an increase in the gonad index of echinoderms just before spawning occurs. This was corroborated for the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Phillips *et al.* 1998) and the sand dollar *Mellita quinquesperforata* (Lane and Lawrence 1980), and concurs with our findings for *D. excentricus*.

The almost year-round production of viable gametes in the laboratory indicates that reproduction in the estuary may be related to variations in temperature. It can be inferred that maturation of gametes takes place in summer (June–August), when estuarine temperatures range from 22 to 25 °C (López-Rasgado and Herzka 2009), as has been reported for other tropical echinoderm species like *Centrostephanus coronatus* (Pearse 1972) and *M. quinquesperforata* (Lane and Lawrence 1980), at temperatures between 18 and 22 °C. In winter (December–February, 14–18 °C), *D. excentricus* seems to respond to temperatures close to the lowest recorded for its habitat, as has also been documented for the sand dollars *Echinarachnius parma* (Cocanour and Allen 1967) and *Arachnoides placenta* (Hines and Kenny 1967), and the sea urchin *Evechinus chlorotilus* (Brewin *et al.* 2000), species believed to exhibit slower rates of gametogenesis. In the case of *D. excentricus*, food availability in Punta Banda Estuary may allow this species to continue producing mature gametes even at low temperatures.

In echinoderms, as gametogenesis proceeds, young oocytes increase in size and are released into the environment. In the case of some species, like *M. quinquesperforata*, young females that reach sexual maturity during the first year of life release small viable gametes in autumn, whereas mature females (at least four years of age) release larger oocytes in spring (Lane and Lawrence 1979). Though the development of gametes in echinoderms is similar, the seasonal variations between both sand dollars can be explained by the fact that the factors associated with gametogenesis, the rate of gamete development, and spawning synchrony vary among species and among populations of the same species located at different sites (Holland and Giese 1965).

The extent to which diverse environmental factors influence gonadal development and spawning is not yet fully known, but it is cyclical (associated with seasons) in temperate areas and of greater continuity during the year in tropical areas. Reproductive cycles are characterized by periodic breeding patterns and show flexibility since they can be modified by key external factors such as food availability (Giese 1959, Gonor 1973, Pearse and Cameron 1991), or the occurrence of periodic events such as El Niño. In the case of the sand dollar populations in Punta Banda Estuary, the reproductive cycle conforms more to the pattern observed for other

(Pearse 1972) y la galleta de mar *M. quinquesperforata* (Lane y Lawrence 1980), a temperaturas entre 18 y 22 °C. Aparentemente, durante el invierno (diciembre–febrero), a 14–18 °C, *D. excentricus* responde a temperaturas cercanas a las más bajas registradas en su hábitat. Eso mismo ha sido documentado para las galletas de mar *Echinarachnius parma* (Cocanour y Allen 1967) y *Arachnoides placenta* (Hines y Kenny 1967), y para el erizo *Evechinus chlorotilus* (Brewin *et al.* 2000), especies en las que se especula ocurre una gametogénesis más lenta. En el caso de *D. excentricus*, a temperaturas bajas, la disponibilidad de alimento en el estero de Punta Banda quizá permita continuar produciendo gametos maduros.

En equinodermos, conforme la gametogénesis procede, los ovocitos jóvenes incrementan su tamaño y son liberados al medio. En algunas especies como la galleta *M. quinquesperforata*, las hembras jóvenes que alcanzan su madurez sexual durante el primer año de vida liberan gametos viables de tamaño pequeño durante el otoño, mientras que las hembras maduras (de al menos 4 años de edad) liberan los ovocitos de mayor tamaño durante la primavera (Lane y Lawrence 1979). Las variaciones estacionales entre ambas especies de galleta de mar se explican porque a pesar de que el desarrollo de gametos en equinodermos es muy similar, los factores que inducen la gametogénesis, el índice de desarrollo de gametos y la sincronía de los tiempos de desove, varían entre especies y entre poblaciones de la misma especie localizadas en diferentes sitios (Holland y Giese 1965).

El grado en el que los diversos factores ambientales determinan las épocas de desove y desarrollo gonadal en equinodermos aún no se conoce por completo, pero se sabe que es cíclico (asociado a las estaciones) en zonas templadas y con mayor continuidad durante el año en el trópico. Los ciclos reproductivos se caracterizan por patrones periódicos de reproducción y se dan en forma flexible, dado que pueden ser modificados por claves externas como las variaciones estacionales en alimentación (Giese 1959, Gonor 1973, Pearse y Cameron 1991) o eventos de mayor periodicidad como El Niño. Posiblemente, en el caso de las poblaciones de galleta de mar del estero de Punta Banda, el ciclo reproductivo se ajusta al patrón observado en otras especies de zonas templadas (estacional), con variaciones particulares asociadas a la dinámica de esta laguna costera.

Las observaciones en *D. excentricus* del estero de Punta Banda mostraron que el desarrollo de la larva comprende un periodo de 21–23 días, desde el momento de la fertilización hasta la postlarva, en condiciones de laboratorio (17–21 °C, 33.5 de salinidad). El tiempo de desarrollo en esta especie hasta la metamorfosis corresponde a los periodos más cortos registrados a esas temperaturas y resulta menor que lo que se ha registrado para su desarrollo a temperaturas menores que la del presente estudio (Strathmann 1987). El tiempo de desarrollo fue similar al documentado para otros géneros de galletas de mar, aunque en algunos casos se trata de especies

temperate species (seasonal), with particular variations associated with the dynamics of this coastal lagoon.

Our findings for *D. excentricus* from Punta Banda Estuary showed that larval development took 21–23 days from fertilization to metamorphosis under laboratory conditions (17–21 °C, salinity 33.5). This development time is one of the shortest reported for this species at similar temperatures and is shorter than that observed at lower temperatures (Strathmann 1987); however, it is similar to that documented for other genera of sand dollars, albeit some of them are tropical species whose larval development occurs at higher temperatures. Larval development time for the sand dollar *Scapechinus mirabilis*, from the Japan Sea, was 28.5–29 days under similar temperature and salinity conditions (20–21 °C, salinity 32.2) (Dautov and Kashenko 2008). For *Clypeaster subdepressus*, found on the coasts of Brazil, it was 23 days at 26 °C (Vellutini and Migotto 2010), whereas for *Arachnoides placenta*, found in Australia, it was approximately 7 days, regardless of the temperature (28–34 °C) to which larvae were exposed (Chen and Chen 1992).

Postfertilization cell divisions in *D. excentricus* were similar to those found for other echinoderms with planktotrophic larvae (Smith *et al.* 2008, Vellutini and Migotto 2010). The time recorded for blastula formation (5 h at 17–21 °C) was similar to that reported for *Heliocidaris erythrogramma* (6 h at 25 °C, Henry *et al.* 1991), *Ophiodaphne formataressus* (6.2 h at 26 °C, Tominaga *et al.* 2004), and *C. subdepressus* (7 h at 26 °C, Vellutini and Migotto 2010); however, in the latter cases embryonic development occurred at higher temperatures than in our study. On the other hand, our results differ considerably from those documented for other echinoderms such as *S. mirabilis*, *S. griseus*, and *E. parma*, in which the blastula formed 13–16 h after fertilization at 20–21 °C (Kasyanov *et al.* 1983, Dautov and Kashenko 2008). These results suggest that from the first cell divisions in *D. excentricus* to the formation of the blastula, the factors regulating the process appear to be more related to the organism's own gene regulatory mechanisms than to the environmental conditions under which the experiments are conducted. Apparently temperature is not the only factor influencing the time required for the formation of the blastula since our times at 17–21 °C coincide with those reported for a species that inhabits warm waters (27 °C) and differ from those found at similar temperatures. The results indicate that, for the above-mentioned species, the largest differences in development times occur during the first stages of development, before the prism stage.

In *D. excentricus*, the time elapsed between each subsequent larval stage (two days between stage and stage) did not differ from that reported for other sand dollars (Dautov and Kashenko 2008, Vellutini and Migotto 2010) and was even similar to that of some species of sea urchins (Kasyanov *et al.* 1983). The size of *D. excentricus* larvae in each stage was similar to that reported by Hart and Strathmann (1994) for the same species found in Washington (USA) and by Dautov

tropicales cuyo desarrollo larvario ocurre a mayores temperaturas. Para la galleta de mar *Scapechinus mirabilis*, localizada en el mar de Japón, el periodo de desarrollo fue de 28.5–29 días en condiciones de temperatura y salinidad similares (20–21 °C, 32.2 de salinidad) (Dautov y Kashenko 2008). Para *Clypeaster subdepressus*, localizada en las costas de Brasil, dicho desarrollo duró 23 días a 26 °C (Vellutini y Migotto 2010), mientras que para *Arachnoides placenta*, localizada en Australia, duró aproximadamente siete días, independientemente de la temperatura (28–34 °C) a la que se sometieron las larvas (Chen y Chen 1992).

En *D. excentricus*, las divisiones celulares postfertilización fueron similares a las de otros equinodermos con larvas planctotróficas (Smith *et al.* 2008, Vellutini y Migotto 2010). El tiempo registrado para la formación de la blástula (5 h a 17–21 °C) fue similar al registrado para *Heliocidaris erythrogramma* (6 h a 25 °C) (Henry *et al.* 1991), *Ophiodaphne formataressus* (6.2 h a 26 °C) (Tominaga *et al.* 2004) y *C. subdepressus* (7 h a 26 °C) (Vellutini y Migotto 2010); sin embargo, es importante mencionar que en estos últimos casos, la temperatura a la que se documentó el desarrollo embrionario es mucho mayor a la del presente estudio. Por otro lado, nuestros resultados difieren considerablemente de otros registrados para equinodermos como *S. mirabilis*, *S. griseus* y *E. parma*, en los cuales la blástula se forma entre las 13 y 16 h posteriores a la fertilización a 20–21 °C (Kasyanov *et al.* 1983, Dautov y Kashenko 2008). Estos resultados sugieren que durante las primeras divisiones celulares en *D. excentricus* hasta la formación de la blástula, los factores que regulan el proceso deben estar más relacionados con los mecanismos de la regulación genética propia del organismo y no con las condiciones ambientales a las que se realizan los experimentos. Aparentemente, la temperatura no es el único determinante en el tiempo que se requiere para la formación de la blástula, dado que nuestros tiempos a 17–21 °C coinciden con los registrados para una especie que habita en aguas cálidas (27 °C) y difieren de aquellas que se encuentran a temperaturas similares. Los resultados indican que, para las especies arriba mencionadas, las mayores diferencias en los tiempos de desarrollo se presentan durante los primeros estadios de desarrollo, antes de la formación del estadio de prisma.

El periodo transcurrido durante cada uno de los subsecuentes estadios larvales (dos días entre estadio y estadio) de *D. excentricus* no difirió con respecto a los documentados para otras galletas de mar (Dautov y Kashenko 2008, Vellutini y Migotto 2010) e incluso fue similar al de algunas especies de erizo (Kasyanov *et al.* 1983). El tamaño de las larvas de *D. excentricus* en cada uno de estos estadios fue similar al reportado por Hart y Strathmann (1994) para la misma especie recolectada en Washington (EUA) y por Dautov y Kashenko (2008) para *S. mirabilis*; en ambos casos, los cultivos de larvas equinopluteus se mantuvieron en condiciones de temperatura y salinidad similares al presente trabajo (19–22 °C, 32.2–33.5 de salinidad). La morfometría y

and Kashenko (2008) for *S. mirabilis*; in both cases, echinopluteus larvae were reared under similar temperature and salinity conditions as those used in our study (19–22 °C, salinity 32.2–33.5). The morphometry and development time of the populations of *D. excentricus* from Punta Banda Estuary show some differences relative to the population from Orcas Island (Washington), the latter larvae reaching the six-arm echinopluteus stage three days after fertilization and the eight-arm stage after five days, under similar temperature and salinity conditions (Reitzel *et al.* 2004). The length of the anterodorsal arms of eight-armed echinopluteus larvae of *D. excentricus* from Punta Banda Estuary is greater than that documented for the same species found in Washington (Reitzel *et al.* 2004), 220–310 μm vs 744.60 \pm 69.45 μm , but smaller than that recorded for *S. mirabilis*, with which there are differences of up to 300 μm in the echinopluteus larval stages (Dautov and Kashenko 2008). Postlarvae reached a very similar size to that reported for different populations of *D. excentricus* (Emlet 1986, Strathmann 1987, Hart and Strathmann 1994, Heyland and Hodin 2004) and *S. mirabilis* (Dautov and Kashenko 2008).

The similarities in the size of the echinopluteus larvae and postlarvae is likely related to the sand dollar genus and to the energy input from oocytes until the larvae begin feeding, as has been mentioned for other echinoderms by Bertram and Strathmann (1998). The differences observed in the time required to reach the different larval stages may be related to the culture feeding regimes. In this study, *D. excentricus* was fed *Rhodomonas* sp., whereas the larvae from Orcas Island were fed the microalga *Dunaliella tertiolecta*. Nutritional differences between the microalgal species used may explain the differences in the development of larvae from both sites. In echinoderms, simple or compound microalgal diets modify the variability of fatty acids at different times of development and in the specific case of *Dendraster* species, increase survival and accelerate metamorphosis (Schiopu *et al.* 2006, George *et al.* 2008).

In summary, our findings show that *D. excentricus* from Punta Banda Estuary presents specific increases in the gonad index, which may be directly related to the reproductive season, as has been reported for other echinoderms. There are also similarities between *D. excentricus* and other echinoids in relation to egg size and fertilization time, the time lapse between first cell divisions and the blastula stage, and the size of postlarvae. There are, however, differences in relation to the hours required by the organisms to pass from the blastula stage to the gastrula stage and the number of days elapsed between each one of the echinopluteus larval stages. We infer that these distinctive traits are directly related to organism-specific gene regulation during development and habitat conditions. Our results for *D. excentricus* from Punta Banda Estuary, in the southern portion of its geographic distribution range, will be useful in assessing the response of widely distributed marine invertebrates to current global change conditions.

el tiempo de desarrollo de las poblaciones de *D. excentricus* en el estero de Punta Banda presenta algunas diferencias con respecto a la población que se localiza en la isla Orcas, Washington, donde las larvas alcanzaron su estadio equinopluteus de seis brazos a los tres días postfertilización y de ocho brazos a los cinco días, en condiciones similares de temperatura y salinidad (Reitzel *et al.* 2004). La longitud de los brazos anterodorsales en larvas equinopluteus de *D. excentricus* de ocho brazos en las poblaciones de Baja California es mayor que la que se documenta para la misma especie en Washington (Reitzel *et al.* 2004), 220–310 μm vs 744.60 \pm 69.45 μm , pero menor que la registrada para *S. mirabilis*, con la cual presenta diferencias de hasta 300 μm en los estadios de larva equinopluteus (Dautov y Kashenko 2008). Por su parte, las postlarvas alcanzaron un tamaño muy similar al registrado para distintas poblaciones de *D. excentricus* (Emlet 1986, Strathmann 1987, Hart y Strathmann 1994, Heyland y Hodin 2004) y *S. mirabilis* (Dautov y Kashenko 2008).

Las similitudes en el tamaño de las larvas equinopluteus y postlarvas deben estar relacionadas con el género de las galletas de mar y con el aporte energético proporcionado por los ovocitos hasta que la larva comienza a alimentarse, como ha sido mencionado por Bertram y Strathmann (1998) para otros equinodermos. Las diferencias observadas en el tiempo para alcanzar los distintos estadios larvales pudieran estar relacionadas con el régimen alimenticio de los cultivos. En el presente estudio, *D. excentricus* fue alimentada con *Rhodomonas* sp., mientras que las larvas de la isla Orcas fueron alimentadas con la microalga *Dunaliella tertiolecta*. Diferencias nutricionales entre las especies de microalgas utilizadas pudieran explicar las diferencias en el desarrollo larvario en ambas localidades. En los equinodermos, las dietas de microalgas simples o compuestas modifican la variabilidad de ácidos grasos en diferentes puntos del desarrollo y específicamente en distintas especies de *Dendraster*, incrementan la supervivencia y aceleran la metamorfosis (Schiopu *et al.* 2006, George *et al.* 2008).

En conjunto, los resultados del presente estudio demuestran que en el estero de Punta Banda *D. excentricus* presenta incrementos puntuales en el índice gonadal, que pueden estar directamente relacionados con su época reproductiva, tal y como ha sido documentado para otros equinodermos. Es un hecho que existen similitudes entre *D. excentricus* y otros equinoideos con relación al tamaño de los huevos y el tiempo de fertilización de los mismos, el tiempo en el que ocurren las primeras divisiones celulares hasta alcanzar la etapa de blástula y el tamaño que alcanzan las postlarvas. Se destaca que existen diferencias en cuanto a las horas necesarias para que los organismos pasen de la etapa de blástula a gástrula y en el número de días transcurridos en cada uno de los estadios de larvas equinopluteus. Se infiere que estos rasgos distintivos están directamente relacionados con la regulación genética durante el desarrollo, propia del organismo y las condiciones de su hábitat. Los resultados para *D. excentricus*,

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Universidad Autónoma de Baja California (UABC internal project No. 533 to ECI). The first author acknowledges receipt of a postdoctoral scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Mexico, No. 119311). We thank R Escobar-Fernández and J Guzmán-Calderón for their help with collecting adult organisms, and E Valenzuela-Espinoza and his laboratory staff for providing the microalgae used to feed the larvae.

English translation by Christine Harris.

REFERENCES

- Beadle SC. 1989. Ontogenetic regulatory mechanisms, heterochrony, and eccentricity in dendrosterid sand dollars. *Paleobiology* 15: 205–222.
- Bertram DF, Strathmann RR. 1998. Effects of maternal and larval nutrition on growth and form of planktotrophic larvae. *Ecology* 79: 315–327.
- Boidron-Metairon IF. 1988. Morphological plasticity in laboratory-reared echinoplutei of *Dendraster excentricus* (Eschscholtz) and *Lytechinus variegatus* (Lamarck) in response to food conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 119: 31–41.
- Brewin PE, Lamare MD, Keogh JA, Mladenov PV. 2000. Reproductive variability over a four-year period in the sea urchin *Evechinus chloroticus* (Echinoidea: Echinodermata) from differing habitats in New Zealand. *Mar. Biol.* 137: 543–557.
- Buenrostro MA, Warnock N, Cueva H. 1999. Wintering Western Sandpipers *Calidris mauri* at Estero de Punta Banda, Baja California, Mexico. *Wader Study Group Bull.* 88: 59–63.
- Burke RD. 1983. Development of the larval nervous system of the sand dollar, *Dendraster excentricus*. *Cell Tissue Res.* 229: 145–154.
- Burke RD. 1984. Pheromonal control of metamorphosis in the Pacific sand dollar, *Dendraster excentricus*. *Science* 225: 442–443.
- Chen C-P, Chen B-Y. 1992. Effects of high temperature on larval development and metamorphosis of *Arachnoides placenta* (Echinodermata: Echinoidea). *Mar. Biol.* 112: 445–449.
- Cocanour B, Allen K. 1967. The breeding cycles of a sand dollar and a sea urchin. *Comp. Biochem. Physiol.* 20: 327–331.
- Collin R. 1997. Ontogeny of subtle skeletal asymmetries in individual larvae of the sand dollar *Dendraster excentricus*. *Evolution* 51: 999–1005.
- Dautov SS, Kashenko SD. 2008. Development of the sand dollar *Scaphechinus mirabilis*. *Russ. J. Mar. Biol.* 34: 415–420.
- Emler RB. 1986. Larval production, dispersal, and growth in a fjord: A case study on larvae of the sand dollar *Dendraster excentricus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 31: 245–254.
- Francisco V, Herzka SZ. 2010. Regulation of feeding mode by the sand dollar *Dendraster excentricus* in a shallow estuarine habitat. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 383: 146–155.
- George SB, Fox C, Wakeham S. 2008. Fatty acid composition of larvae of the sand dollar *Dendraster excentricus* (Echinodermata) might reflect FA composition of the diets. *Aquaculture* 285: 167–173.
- Giese AC. 1959. Comparative physiology: Annual reproductive cycles of marine invertebrates. *Annu. Rev. Physiol.* 21: 547–576.
- localizadas en el estero de Punta Banda, en la región sur de su distribución geográfica, pueden tomarse como punto de partida para valorar la respuesta de invertebrados marinos de amplia distribución ante las presentes condiciones del cambio global.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo recibió apoyo financiero de la Universidad Autónoma de Baja California (proyecto interno IIO-UABC No. 533 a cargo de ECI). El primer autor recibió una beca de apoyo posdoctoral del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT No. 119311) para la realización del presente estudio. Los autores agradecen a R Escobar-Fernández y J Guzmán-Calderón su colaboración en la recolección de los organismos adultos, y a E Valenzuela-Espinoza y el personal de su laboratorio por facilitar las microalgas utilizadas para la alimentación de los cultivos de larvas.

- Gonor JJ. 1973. Reproductive cycles in Oregon populations of the echinoid, *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson). II. Seasonal changes in oocyte growth and in abundance of gametogenic stages in the ovary. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12: 65–78.
- Hart MW, Strathmann RR. 1994. Functional consequences of phenotypic plasticity in echinoid larvae. *Biol. Bull.* 186: 291–299.
- Henry JJ, Wray GA, Raff RA. 1991. Mechanism of an alternate type of echinoderm blastula formation: The wrinkled blastula of the sea urchin *Heliocidaris erythrogramma*. *Develop. Growth Differ.* 33: 317–328.
- Heyland A, Hodin J. 2004. Heterochronic developmental shift caused by thyroid hormone in larval sand dollars and its implications for phenotypic plasticity and the evolution of nonfeeding development. *Evolution* 58: 524–538.
- Highsmith RC, Emler RB. 1986. Delayed metamorphosis: Effect on growth and survival of juvenile sand dollars (Echinoidea: Clypeasteroidea). *Bull. Mar. Sci.* 39: 347–361.
- Hines J, Kenny R. 1967. The growth of *Arachnoides placenta* (L.) (Echinoidea). *Pac. Sci.* XXI: 230–235.
- Holland ND, Giese AC. 1965. An autoradiographic investigation of the gonads of the purple sea urchin (*Strongylocentrotus Purpuratus*). *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole* 128: 241–258.
- Kasyanov VL, Kryuchkova GA, Kulikova VA, Medvedeva LA. 1983. Larvae of Marine Bivalves and Echinoderms. *Nauka, Moscow*, 82 pp.
- Kozloff EN. 1983. *Seashore Life of the Northern Pacific Coast*. University of Washington Press, Seattle, 370 pp.
- Lane JM, Lawrence JM. 1979. Gonadal growth and gametogenesis in the sand dollar *Mellita quinquesperforata* (Leske 1778). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 38: 271–285.
- Lane JM, Lawrence JM. 1980. Seasonal variation in body growth, density and distribution of a population of sand dollar *Mellita quinquesperforata* (Leske). *Estuar. Coast. Mar. Sci.* 14: 421–431.
- López-Rasgado FJ, Herzka SZ. 2009. Assessment of habitat quality for juvenile California halibut (*Paralichthys californicus*) in a seasonally arid estuary. *Fish. Bull.* 107: 343–358.

- Merrill RJ, Hobson ES. 1970. Field observations of *Dendraster excentricus*, a sand dollar of western North America. *Am. Midl. Nat.* 83: 595–624.
- Mooi R. 1997. Sand dollars of the genus *Dendraster* (Echinoidea: Clypeasteroidea): Phylogenetic systematics, heterochrony and distribution of extant species. *Bull. Mar. Sci.* 61: 343–375.
- Niesen TM. 1977. Reproductive cycles of two populations of the Pacific sand dollar *Dendraster excentricus*. *Mar. Biol.* 42: 365–373.
- O'Connor MI, Bruno JF, Gaines SD, Halpern BS, Lester SE, Kinlan BP, Weiss JM. 2007. Temperature control of larval dispersal and the implications for marine ecology, evolution, and conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 1266–1271.
- Pearse JS. 1972. A monthly reproductive rhythm in the diadematid sea urchin *Centrostephanus coronatus* Verrill. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 8: 167–186.
- Pearse JS, Cameron RA. 1991. Reproduction of marine invertebrates. In: Giese AC, Pearse JS, Pears VB (eds.), *Echinodermata: Echinoidea*. Boxwood, Pacific Grove, California, pp. 513–622.
- Phillips BM, Anderson BS, Hunt JW. 1998. Spatial and temporal variation in results of purple urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) toxicity tests with zinc. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 453–459.
- Reitzel AM, Webb J, Arellano S. 2004. Growth, development and condition of *Dendraster excentricus* (Eschscholtz) larvae reared on natural and laboratory diets. *J. Plankton Res.* 26: 901–908.
- Salas-Garza A, Carpizo-Ituarte E, Parés-Sierra G, Martínez-López R, Quintana-Rodríguez R. 2005. Juvenile production of the red sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus* (Echinodermata: Echinoidea) in Baja California, Mexico. *Rev. Biol. Trop.* 53 (Suppl. 3): 345–355.
- Schiopu D, George SB, Castell J. 2006. Ingestion rates and dietary lipids affect growth and fatty acid composition of *Dendraster excentricus* larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 328: 47–75.
- Smith MM, Cruz Smith L, Cameron R, Urry L. 2008. The larval stages of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *J. Morphol.* 269: 713–733.
- Strathmann MF. 1987. *Reproduction and Development of Marine Invertebrates of the Northern Pacific Coast*. University of Washington Press, Seattle, 670 pp.
- Timko PL. 1976. Sand dollars as suspension feeders: A new description of feeding in *Dendraster excentricus*. *Biol. Bull.* 151: 247–259.
- Tominaga H, Nakamura S, Komatsu M. 2004. Reproduction and development of the conspicuously dimorphic brittle star *Ophiodaphne formata* (Ophiuroidea). *Biol. Bull.* 206: 25–34.
- Tyler A. 1936. On the energetics of differentiation. III. Comparison of the temperature coefficients for cleavage and later stages in the development of the eggs of some marine animals. *Biol. Bull.* 71: 59–81.
- Vellutini BC, Migotto EE. 2010. Embryonic, larval, and juvenile development of the sea biscuit *Clypeaster subdepressus* (Echinodermata: Clypeasteroidea). *PLoS ONE* 5: e9654.

*Received December 2010,
received in revised form March 2012,
accepted March 2012.*