

## TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN Y ESTUDIO EN LA CLASE *HOLOTHUROIDEA*. I. GENERALIDADES, SISTEMÁTICA, ECOLOGÍA, BIOLOGÍA Y COMPORTAMIENTO

Angel Pérez Ruzafa\* y Concepción Marcos Diego\*

Recibido: diciembre 1984

### ABSTRACT

**Methods** for the collection and study of the **Class** Holothuroidea. I. Generalities, **systematics, ecology, biology** and behaviour.

Studies about holothurans in Spain are scarce and they are reduced to **some** faunistic or systematic notes. **In** this paper **some** of the methods habitually employed in the different aspects of the systematic (**sampling** and preservation, preparation of spicules, calcareous ring, etc.), biological (**reproduction**, development, growth, nutrition and activity) and ecological (evaluation of the populations, **incidence** of the environmental factors) studies of this group of echinoderms are presented.

### RESUMEN

En España los estudios sobre las holoturias son escasos y se reducen a algunas notas faunísticas o sistemáticas. En este trabajo se presentan algunas de las técnicas empleadas habitualmente por los investigadores en los distintos aspectos de la sistemática (recolección y conservación, preparación de espículas, anillo calcáreo, etc.), biología (reproducción, desarrollo, crecimiento, nutrición, actividad) y ecología (evaluación de las poblaciones, incidencia de los factores ambientales) de este **grupo** de equinodermos.

### 1. INTRODUCCIÓN

Las holoturias (clase Holothuroidea), con sus aproximadamente 1.160 especies conocidas (PAWSON, 1982), constituyen, en contra de las afirmaciones de DEICHMANN (1954), el segundo grupo en número de individuos de los equinodermos recientes, precedido por la clase *Stelleroidea* (estrellas de mar y ofiuras). Esto puede dar una idea del gran avance que se ha conseguido en el conocimiento de estos organismos en los últimos años. No obstante, hasta el presente, su estudio ha sido dejado de lado por zóólogos y ecólogos españoles, reduciéndose las escasas notas que sobre él existen a trabajos marginales, o a citas de especies in-

cluidas en trabajos faunísticos dispersos en la bibliografía.

Los componentes de la clase están ampliamente distribuidos en todos los océanos, desde las costas del Ártico hasta las mayores profundidades, donde constituyen más del 90 % de la fauna abisal, y son particularmente abundantes en las regiones de arrecifes de coral. El grupo es exclusivamente marino y está constituido predominantemente por formas bentónicas, aunque unas pocas especies se han adaptado a la vida pelágica. La importancia ecológica de muchos de estos organismos (en concreto de los sedimentívoros) está relacionada con la movilidad del sedimento (BAKUS, 1968) y todos ellos (incluidos los filtradores y planctófagos).

\* Departamento de Ecología. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Campus Universitario de Espinardo, Murcia.

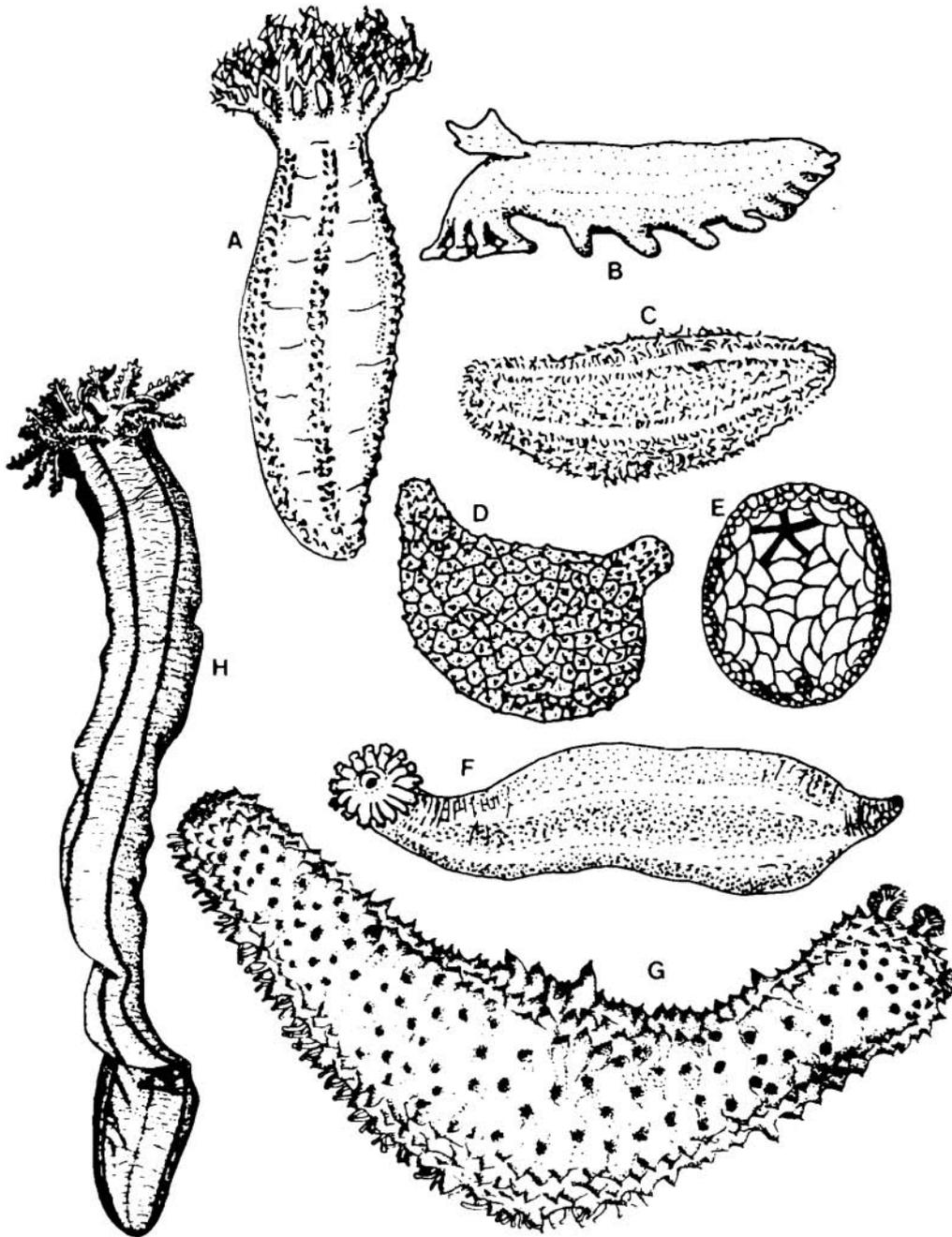


FIGURA 1. Aspecto externo de algunas holotunas representativas: A, *Cucumaria* (Dendrochirotida); B, *Peniagone* (Elasipodida); C, *Paroriza* (Aspidochirotida); D, *Ypsilothuria* (Dactylochirotida); E, *Psolus* (Dendrochirotida); F, *Molpadia* (Molpadida); G, *Holothuria* (Aspidochirotida); H, *Euapta* (Apodida). (A-F, tomados de PAWSON & FELL, 1966; G y H, originales).

External aspect of some representative holothurians: A, *Cucumaria* (Dendrochirotida); B, *Peniagone* (Elasipodida); C, *Paroriza* (Aspidochirotida); D, *Ypsilothuria* (Dactylochirotida); E, *Psolus* (Dendrochirotida); F, *Molpadia* (Molpadida); G, *Holothuria* (Aspidochirotida); H, *Euapta* (Apodida). (A-F, from PAWSON & FELL, 1966; G, H originals).

sobre todo en aguas extratropicales, forman parte de un importante eslabón en la cadena trófica (PAWSON, 1966; GRAHAM en BAKUS, 1973).

Desde antiguo el hombre ha utilizado algunas especies de holoturias como alimento, tanto en la ribera mediterránea como, sobre todo, en los países del lejano oriente —China, Indonesia y Filipinas— donde, una vez secas y ahumadas, son consumidas bajo el nombre de *beche-dermer* o *trepang*, al cual se le atribuyen propiedades afrodisíacas, seguramente más por el aspecto del animal que por la presencia real de alguna sustancia con dichas propiedades (THÉODORIDÈS, 1980). Asimismo, se han utilizado con éxito como integrantes de piensos artificiales para aves (BAKUS, 1973). En la actualidad se sabe (véase ALENDER & RUSSELL, 1966, y THÉODORIDÈS, 1980) que las toxinas de ciertas holoturias actúan como agentes anticancerígenos. La holoturina, una saponina extraída de algunas holoturias, suprime el crecimiento de algunos tumores e incrementa la actividad fagocítica de los leucocitos; algunas holotoxinas muestran una alta actividad *in vitro* contra varios hongos.

Si bien en el trabajo de NICHOLS (1964), en el que se realiza una revisión bastante completa de los estudios efectuados desde 1955 hasta ese momento en cuanto a la fisiología, biología y ecología de los equinodermos, se aprecia una marcada desventaja de los que tratan sobre holoturias respecto a los de las otras clases, desde entonces, y cada vez con más intensidad, esos vacíos se han ido llenando (para los trabajos anteriores a esta fecha debe consultarse HYMAN, 1955). Así, sobre la ecología y el comportamiento de las holoturias en general y de algunas especies en particular pueden verse trabajos como los de CRUMP (1966), PAWSON (1966), REESE (1966), BAKUS (1968, 1973), MASSIN & JANGOUX (1976), LAWRENCE & MURDOCH (1977), SLOAN (1979), SLOAN & BODUNGEN (1980), MASSIN (1980b), GUSTATO & VILLARI (1977, 1978, 1980), LAWRENCE (1980), BRAND & MUNOZ (1980), ROBERTS & BRYCE (1982), CARNEY & CAREY (1982), MUSCAT (1982, 1984), PAWSON *et al.* (1982), YOUNG & CHIA (1982), BILLET & HANSEN (1982, 1984), SMITH & KEEGAN (1984), VELIMIROV (1984), etc. Diversos aspectos de la fisiología y genética, nutrición, reproducción y desarrollo pueden encontrarse en BOULOTIAN (1966), LAWRENCE (1972), KISHIMOTO & KANATANI (1980), ENGSTROM (1980a, 1980b, 1982), JOHNSON *et al.* (1980), HOLLAND (1981), SIBUET & LAWRENCE (1981), CONAND (1981, 1982, 1983), BYRNE (1982), SIBUET *et al.* (1982), CHAFFEE (1982).

MOSHER (1982), MASSIN & JANGOUX (1976), MASSIN (1982a, 1982b), FERAL & MASSIN (1982), SUZUKI *et al.* (1982), COSTA *et al.* (1982), TYLER & GAGE (1983), TYLER *et al.* (1984), JOHNSON *et al.* (1984), FERAL (1984), McEUEEN (1984), MILLER (1984), McKENZIE (1984), BYRNE (1984), SILVER (1984), etc.

Este trabajo no pretende ser una revisión exhaustiva de los métodos utilizados por los investigadores en los distintos aspectos de la sistemática, biología o ecología de este grupo de equinodermos; se intenta presentar algunas de las técnicas empleadas con el ánimo de facilitar los estudios sobre holoturias y la esperanza de que éstos lleguen a ser habituales en nuestro país.

## 2. RECOLECCIÓN DE EJEMPLARES

La metodología empleada habitualmente para la recolección y estudio del bentos en general y de los equinodermos en particular es amplia y variada (véase BELLAN-SANTINI, 1970; SCHLIEPER, 1972; DART & RAINBOW, 1976; ROS *et al.*, 1976; HOLME & McINTYRE, 1984).

Las holoturias pueblan todos los mares y todas las profundidades, habitando en cualquier tipo de sustrato ya sea como individuos solitarios, ya como gregarios. Esta diversidad de hábitats hace que los métodos de captura empleados sean a su vez muy variados. En el piso mediolitoral, durante la marea baja, no se precisan técnicas especiales de recolección. En nuestras aguas pueden encontrarse en esta zona especies como *Holothuria sanctori*, *H. mammata*, *H. dakarensis* u *H. arguinensis*, ocupando los charcos intermareales, generalmente situadas a refugio de la luz directa. El tamizado de la arena en las cubetas mediolitorales es útil para la captura de las especies que, como *Leptosynuptu inharrens*, viven enterradas en los sustratos blandos. A su vez el tamizado de algas es apto para otras especies: algunas, como *Neocnus incubans*, muestran gran especificidad, encontrándose tan sólo sobre algas del género *Cystoseira*.

Para la recolección en el infralitoral la técnica más empleada es la inmersión a pulmón libre o con escafandra autónoma, siguiendo el sistema de búsqueda abierta (*open search*) en el sentido de DART & RAINBOW (1976).

Los sustratos duros albergan diversas especies en las oquedades y grietas de las rocas (v. g. *Holothuria sanctori*, *Pawsonia saxicola*). La pradera de *Posidonia oceanica* es el hábitat preferido por otras especies en el Mediterráneo (*Holothuria tubulosa*, *H. mammata*, *H. poli*, *H. stellati*, etc.), siendo los rizomas de estas

plantas un refugio ideal de otras muchas y de estadios juveniles. En los fondos blandos se emplean diversos tipos de dragas y artes de arrastre. Tales técnicas son las únicas utilizables para la recolección de especies de profundidad (elasipódidos, sinaláctidos y algunos esticopódidos).

### 3. CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

La adecuada conservación de los holoturoideos presenta ciertas peculiaridades. La presencia de cuerpos calcáreos (espículas y anillo calcáreo), que además son caracteres taxonómicos de primer orden, hace que el empleo de formol resulte incompatible con una adecuada preservación, ya que ablanda los tejidos, disuelve los escleritos (DEICHMANN, 1954) y elimina dentículos y protuberancias, de manera que, con frecuencia, algunos ejemplares que han sido conservados en formol no pueden ser determinados con fiabilidad a pesar de que sus caracteres externos coinciden en todo con los de una especie dada (HÉROUARD, 1929; DEICHMANN, 1957; CHERBONNIER, 1965). No obstante, puede recomendarse el uso de formol al 10% en agua de mar durante unas horas o unos pocos días para fijar, y después enjuagar con agua dulce antes de colocar los ejemplares en alcohol de 70° (FERAL, com. pers.; WAGSTAFFE & FIDLER en RUSSELL, 1963; BILLET & HANSEN, 1982; MILLER & PAWSON, 1984).

Otro problema que se plantea deriva de la gran contractilidad de estos animales y la tendencia de algunos de ellos a eviscerar cuando son molestados. Según los distintos autores se recomienda anestésicar los ejemplares con diferentes tipos de reactivos después de haberlos colocado en agua de mar limpia durante un cierto tiempo, con el fin de que se distiendan. Algunos de los productos más utilizados son cloretona, sulfato de magnesio hidratado, sulfato sódico en solución saturada, éter, etc. (DEICHMANN, 1954, 1957; CAMPOS-VILLARROEL & MACSOTAY, 1979). Otra información acerca de estos compuestos puede obtenerse en RUSSELL (1963). En caso de carecer de estos productos, otro sistema que nos ha dado buen resultado y que es empleado también con otros invertebrados marinos (ROS, 1975) es el de colocar el animal en una cubeta con agua de mar limpia y someterlo a temperaturas próximas a la de congelación.

Resulta positivo colocar los ejemplares en cubetas con agua de mar limpia y, una vez extendidos y con los tentáculos fuera, tomarlos con los dedos por debajo de la corona tentacu-

lar e introducir ésta en ácido acético concentrado a la vez que se les inyecta alcohol de 90° por la abertura anal. El ácido acético tiene la propiedad de penetrar en los tejidos instantáneamente, endureciéndolos, por lo que resulta muy eficaz para matar rápidamente animales contráctiles. Posteriormente el animal es colocado en alcohol de 70° (LO BIANCO (en RUSSELL, 1963 y TORTONESE, 1965).

Si la preservación ha de realizarse en el campo y no se dispone de ácido acético u otros

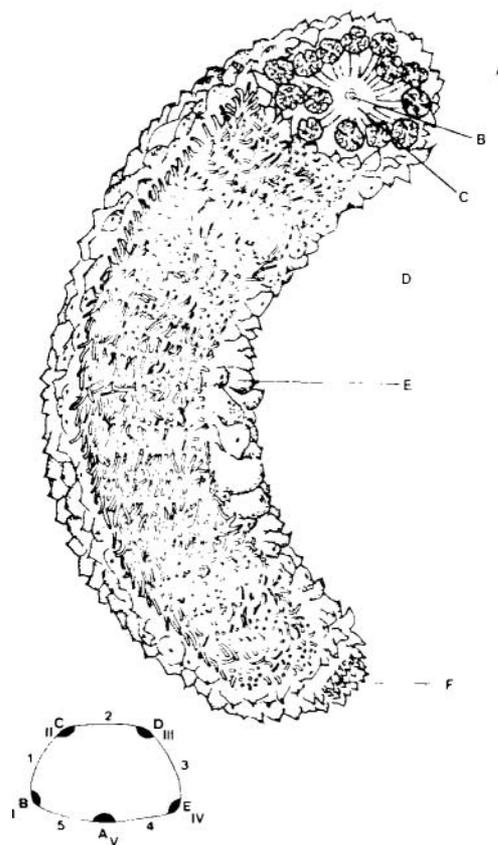


FIGURA 2. Morfología externa de una holoturia (*Holothuria (Platyperona) sanctori*): A, tentáculo; B, boca; C, membrana bucal; D, suela ventral de pedicelos; E, papilas; F, ano. Abajo: esquema mostrando las diferentes terminologías empleadas para denominar los radios (A-E y I-V) y los interradii (1-5). Original.

External morphology of an holothurian (*Holothuria (Platyperona) sanctori*): A, tentacle; B, mouth; C, buccal membrane; D, creeping sole; E, papillae; F, anus. Bottom: diagram showing the different terminologies employed to designate the radii (A-E and I-V) and the interradii (1-5). Original.

anestésicos, puede intentarse anestesiarse al animal añadiendo concentraciones crecientes de alcohol etílico al agua de mar limpia (DEICHMANN, 1954) y una vez muerto, inyectar alcohol de 90° y conservar en alcohol de 70°.

A algunas *Cucumaria* el alcohol de 90° se les debe inyectar por el orificio bucal.

Si los ejemplares son de pequeño tamaño, pueden ser colocados directamente en alcohol de 70°.

Por último, con algunas holoturias ápodas hay que extremar las precauciones ya que no sólo se contraen sino que pueden escindirse en varios fragmentos.

Si los especímenes se deshidratan por evaporación del alcohol nos ha dado buenos resultados tratarlos durante un día con una solución al 0.5% de fosfato trisódico (MARHUE, 1983).

#### 4. OBSERVACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL MATERIAL

Una vez conservados los ejemplares, deben tomarse notas acerca de la morfología externa: forma general del cuerpo, suela ventral, aspecto del tegumento, coloración, medidas, presencia o ausencia de dientes anales, posición del ano y boca, pedicelos, papilas, tentáculos (número y forma), etc., así como de la anatomía interna: tubo digestivo, presencia o ausencia de cloaca, tubos de Cuvier, pulmones, *retia mirabilia*, gónadas, urnas ciliadas, músculos fanérgicos y retractores, ampollas tentaculares, vesículas de Poli, canales hidróforos y madreporitos, etc. (Figs. 14).

La mayoría de estos caracteres son interesantes para la descripción de las especies y en todo caso para reafirmar una determinación, pero su extrema variabilidad los hace inservibles como caracteres taxonómicos en la casi totalidad de los casos. ROWE (1969), en su revisión de la familia *Holothuriidae*, llega a la conclusión de que para la identificación de todos los géneros y especies de holoturias se depende casi enteramente de la forma y combinaciones de las espículas calcáreas de la pared del cuerpo y pedicelos. A conclusiones similares llegan PAWSON & FELL (1965) en su revisión del orden *Dendrochirotida*. Asimismo son caracteres taxonómicos la forma de los tentáculos, la forma del anillo calcáreo y la distribución de los pedicelos.

##### 4.1. PREPARACIÓN DEL ANILLO CALCÁREO

En primer lugar se disecta al animal cortando el tegumento desde el orificio anal, por la suela ventral, hasta las proximidades de la corona

tentacular; allí, procurando no romper el anillo calcáreo que rodea el tubo digestivo a la altura de la faringe, se secciona circularmente hasta desprender la corona tentacular y el anillo del resto del cuerpo. Cuidando de no estropear la estructura calcárea y operando a la lupa, se van desprendiendo las membranas y los tejidos que lo envuelven hasta dejarlo lo más al descubierto posible. Una vez realizada esta operación se introduce unos minutos en alcohol etílico absoluto para deshidratar, para pasarlo sucesivamente a butanol y a xileno, permeneciendo el material en cada producto de 5 a 10 minutos. Con ello, los tejidos que aún quedaban adheridos se hacen semitransparentes, permitiendo la observación a la lupa. A continuación se dibuja el anillo calcáreo utilizando una cámara clara. Una vez estudiado, se reintroduce en alcohol de 70°, en el que se conserva el ejemplar.

##### 4.2. PREPARACIÓN DE ESPÍCULAS

Por su importancia como carácter taxonómico, cualquier información que pueda extraerse acerca de la forma, tamaño, distribu-

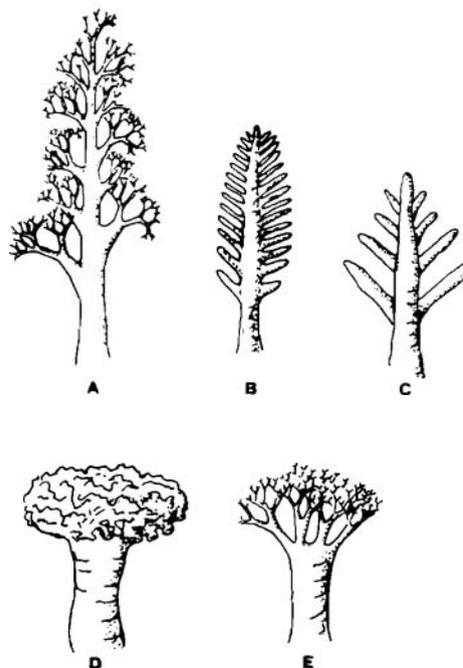


FIGURA 3: Principales tipos de tentáculos de holoturias: A, dendroide; B, pinnado; C, digitado; D, peltado; E, peltado-dendroide. Original.

Types of tentacles in holothurians: A, dendritic; B, pinnate; C, digitate; D, peltate; E, peltate-dendritic. Original.

ción. variabilidad o diversidad de estos escleritos es importante para asegurar una buena determinación.

En muchas ocasiones esta información es difícil de obtener o es inaccesible. Muchos ejemplares que se encuentran en las colecciones han sido mal conservados y los individuos están deteriorados por no haberles sido inyectado alcohol en la cavidad del cuerpo, o sus espículas están deshechas o han perdido detalle por haber sido guardados en formol.

Algunas explicaciones acerca de la preparación de espículas pueden encontrarse en DEICHMANN (1954, 1957) y en TORTONESE (1965).

Cuando el tegumento de los individuos es fino y casi transparente puede ser observado directamente al microscopio. Nosotros hemos aplicado la técnica de preparación del anillo calcáreo en estos casos, obteniendo muy buenos resultados; el método es empleado asimismo por HANSEN (1975) para elasiópodos. Para ello se toman unos milímetros cuadrados de tegumento y se colocan extendidos sobre un portaobjetos. Previamente, y trabajando a la lupa, se han eliminado en lo posible las capas musculares subyacentes. Tras deshidratar con alcohol absoluto, se aclaran los tejidos con xileno para, seguidamente, montar la preparación con bálsamo del Canadá.

Esta técnica permite no sólo observar la forma y clases de espículas sino que conserva su distribución, emplazamiento y disposición en el tegumento y mantiene las relaciones entre los distintos tipos de escleritos (entre anclas y placas ancorales, por ejemplo).

En algunas ocasiones no basta con que la dermis sea lo suficientemente fina, ya que algunas especies presentan tal densidad de corpúsculos calcáreos que se solapan unos con otros dificultando su reconocimiento. En estos casos, y cuando el tegumento es demasiado grueso para ser observado directamente al microscopio, se toman unos pocos milímetros de piel y se colocan en un vidrio de reloj con unas gotas de lejía, calentando hasta la total evaporación del líquido. Tras dejar enfriar unos minutos, se realizan sucesivos lavados con agua destilada. Las espículas quedan en el fondo del recipiente como un polvillo blanco. Después de 5 ó 6 lavados, se deshidrata con alcohol absoluto y con una pipeta se toma un poco del líquido que contiene las espículas y se deposita sobre un portaobjetos, calentándolo hasta la total evaporación del alcohol. A continuación se aplica xileno y se monta la preparación con bálsamo del Canadá.

El material de vidrio empleado es colocado en ácido clorhídrico diluido durante algún

tiempo y lavado después con agua destilada antes de volver a utilizarlo. Por razones obvias, hay que extremar los cuidados con el fin de que no aparezcan restos de espículas de una especie en las preparaciones de otra.

En las fases en las que es preciso calentar es recomendable no hacerlo de forma violenta o

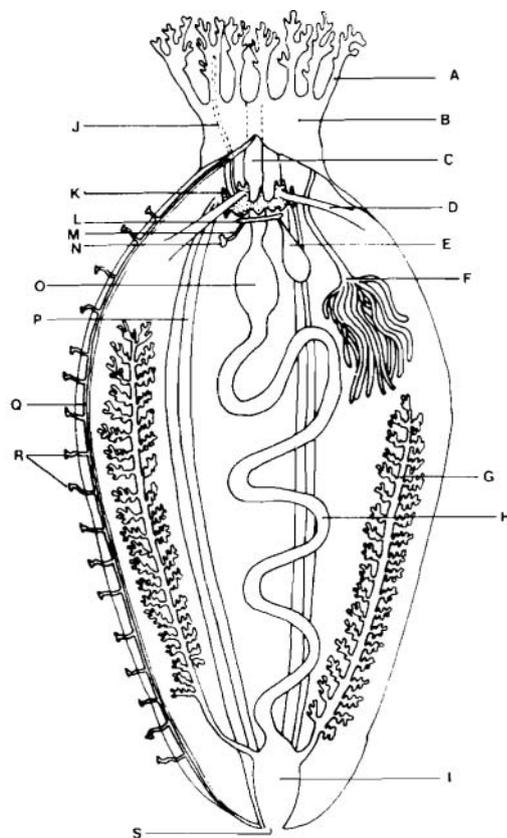


FIGURA 4. Anatomía interna de una holotuna: A, tentáculo; B, introvertido; C, faringe; D, músculos retractores; E, vesícula de Poli; F, gónada; G, árbol respiratorio; H, intestino; I, cloaca; J, canal tentacular; K, anillo calcáreo; L, anillo acuífero; M, canal pétreo; N, madreporito; O, estómago; P, músculos longitudinales; Q, canal radial; R, pedicelos; S, ano. Original.

Diagram showing the internal anatomy of an holothurian: A, tentacle; B, introvert; C, pharynx; D, retractor muscle; E, polian vesicle; F, gonad; G, respiratory trees; H, intestine; I, cloaca; J, tentacular canal; K, calcareous ring; L, ambulacral or water ring; M, stone canal; N, madreporite; O, stomach; P, radial longitudinal muscle; Q, radial water canal; R, tube feet; S, anus. Original.

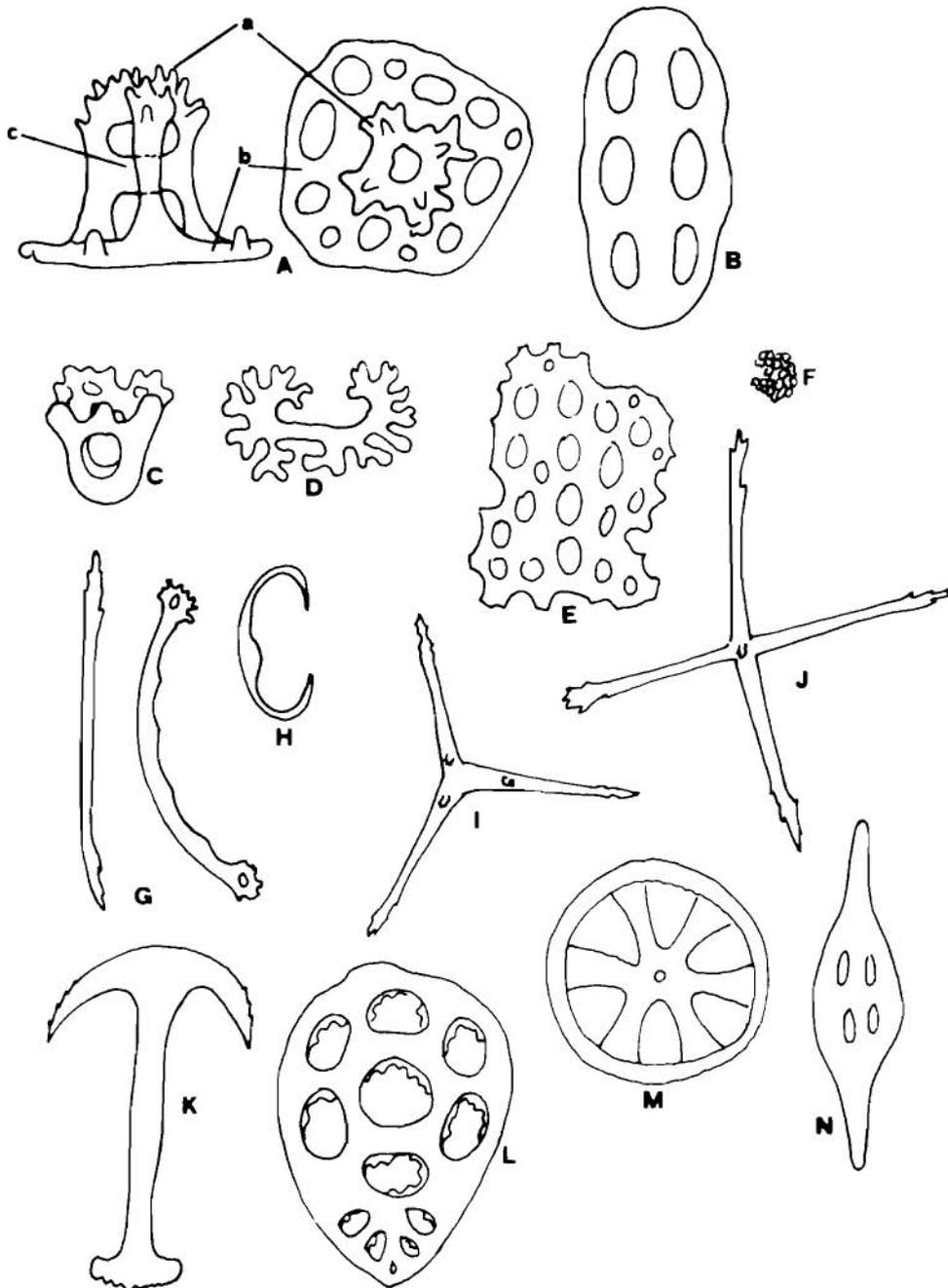


FIGURA 5. Tipos básicos de espículas de holoturias: A, torres (vista lateral y vista superior): a, corona, b, disco basal, c, travesaño o viga; B, botón; C, cesta; D, roseta; E, placa perforada; F, gránulo miliar; G, bastones; H, bastón en forma de C; I, cuerpo trirradiado; J, cuerpo cruciforme o tetrarradiado; K, ancla; L, placa anclal; M, rueda; N, cuerpo fusiforme. Original.

Basic types of spicules in holothurians: A, tables (in lateral and plan view): a, crown, b, basal disc, c, beam; B, button; C, basket; D, rosette; E, perforated plate; F, miliary granules; G, rod; H, C-shaped rod; I, 1.3-radiate body; J, cruciform or 4-radial body; K, anchor; L, anchor plate; M, wheel; N, fusiform body. Original.

directamente a la llama, ya que los escleritos suelen romperse. Las mismas precauciones deben tomarse al manipular el trozo de piel con las pinzas o las tijeras.

Es conveniente, para cada ejemplar, realizar preparaciones de espículas de las diversas partes del cuerpo: tentáculos, papilas, pedicelos, tegumento dorsal anterior, dorsal posterior, ventral anterior y ventral posterior. En las holoturias ápodas deben hacerse además preparaciones de las bandas musculares longitudinales, ya que suelen tener pequeñas espículas en forma de bastoncitos características para cada especie.

Si la observación de las espículas va a hacerse con un microscopio electrónico de barrido, el protocolo es el mismo. La deshidratación con alcohol absoluto y o la llama se realiza sobre el mismo vidrio de reloj. Las espículas se escogen a la lupa, una a una, con un alfiler entomológico muy fino y se depositan sobre el porta del microscopio donde previamente se ha colocado un papel transparente adhesivo por las dos caras. Posteriormente se recubren con un baño de oro de aproximadamente 400 Å de espesor. Para la realización de fotografías suelen aplicarse 25 Kv.

En ocasiones pueden encontrarse distintos estadios de formación o degeneración de las espículas en un mismo individuo (véase PÉREZ RUZAFÁ, 1984, para *Euapta lappa*). Para dilucidar si se trata de uno u otro caso, IMAOKA (1977), trabajando con ejemplares de *Ilyodae-mon ijimai*, toma tres individuos de tallas diferentes y obtiene para cada uno de ellos datos como la distribución de frecuencias de tallas de las espículas (ruedas y bastones en su caso), el porcentaje de ruedas grandes y pequeñas y bastones grandes, el contenido de calcio total (incluyendo el anillo calcáreo) y la relación calcio total / peso del cuerpo.

## 5. ESTUDIOS SOBRE LA ECOLOGÍA, BIOLOGÍA Y COMPORTAMIENTO

### 5.1. EVALUACIÓN DE LAS POBLACIONES

En la selección de una técnica para estimar la población de una determinada especie hay que tener en cuenta ciertos parámetros como son su talla, abundancia, comportamiento, etc., que afectan a la facilidad con que puede ser encontrada bajo el agua (DART & RAINBOW, 1976). En sustratos rocosos o irregulares y con un gradiente marcado (generalmente batimétrico) es recomendable el uso de transectos al estilo tradicional. Las formas de recuento varían según los autores; puede seguirse el método de

recuentos directos desplazando una vara de longitud conocida perpendicular a la línea del transecto (HARMELIN *et al.*, 1980) o rastreando sin más una anchura conocida a lo largo de dicha línea (BRAND & MUÑOZ, 1980; SLOAN & BODUNGEN, 1980; CONAND, 1982).

A mayores profundidades se utilizan artes de arrastre contando el número de individuos colectados sobre un área conocida (SIBUET & LAWRENCE, 1981; BILLET & HANSEN, 1982; CARNEY & CAREY, 1982). El recuento directo es también utilizado en fondos profundos, pero lógicamente requiere el empleo de sumergibles (PAWSON *et al.*, 1982; SMITH & HAMILTON, 1983).

El sistema de cuadrados orrojados al azar (BAKUS, 1968) es recomendable para sustratos más aplacados y con distribuciones de holoturias relativamente homogéneas. Algunos autores emplean los cuadrados sobre el arrecife de coral (DART & RAINBOW, 1976) o colocándolos a intervalos fijos (dependientes de la densidad de individuos) a lo largo de una línea de transecto (LAWRENCE, 1980).

El recuento de manchas (*patch counts*) es aplicable a especies que dejan marcas en el sustrato, como áreas peladas al ramonear en las rocas, etc. Este sistema puede utilizarse en el caso de las grandes holoturias en el sentido de buscar y contabilizar los rosarios de excrementos. No obstante, presenta dificultades cuando aparecen poblaciones que no son monoespecíficas. El sistema es válido más para localizar a los ejemplares ocultos en las grietas que para su recuento.

La utilización de un planeador a remolque de una embarcación (*towing*) para el recuento (DART & RAINBOW, 1976) conlleva problemas en el caso de la mayoría de las especies de holoturias por su inconspicuidad y por las dificultades que presenta su determinación en base a caracteres externos,

El marcado y recaptura presenta inconvenientes en los equinodermos; aunque se había utilizado en estrellas de mar (DART & RAINBOW, 1976), hasta muy recientemente los intentos de utilizar las distintas técnicas en holoturias habían sido infructuosos. En la actualidad se están realizando experiencias en este sentido utilizando una pistola para colocar etiquetas de las empleadas en la industria textil (CONAND, 1983). El método, según el mismo autor, presenta problemas por diversas razones: por un lado produce heridas en el tegumento de los animales y, por otro, el porcentaje de pérdida de las marcas en los individuos jóvenes es muy elevado y en periodos largos de tiempo (más de seis meses) también lo es en los individuos de mediano y gran tamaño. En

parte. esto se resuelve realizando marcados dobles. Las dificultades son aún mayores en especies que autotomizan las regiones dañadas de su cuerpo. *Euapta lappa* sufre autotomía incluso cuando se utilizan colorantes vitales (HAMMOND, 1982a).

Otro procedimiento empleado como una medida indirecta de la densidad en los casos de individuos muy dispersos, o donde las técnicas de transecto o de cuadrados presentan dificultades, es el de contabilizar las capturas por unidad de esfuerzo, por ejemplo el número de individuos recogidos por buceador y por hora (CONAND, 1981, 1982).

El empleo de la fotografía submarina en el estudio del bentos es ya general (LUNDALV. 1971; GEORGE. 1980; LAMIA *et al.*, 1982; HOLME. 1984) y, ya sea en inmersión, con escafandra autónoma, a lo largo de transectos (YOUNG & CHIA. 1982), ya colocando la cámara en un trineo arrastrado desde una embarcación y cubriendo un área conocida (SIBUET & LAWRENCE, 1981; BILLET & HANSEN. 1982) o desde sumergibles (SMITH & HAMILTON. 1983), es también muy útil en el estudio de las holoturias, sobre todo como técnica complementaria a los métodos anteriores.

Los valores de biomasa pueden expresarse en gramos de peso húmedo o en calorías. En el primer caso, y para evitar la gran variación que pueden suponer las distintas cantidades de agua y sedimento retenidos por los árboles respiratorios y tubo digestivo, respectivamente, dependiendo de la fase de actividad de los individuos (CONAND, 1983), algunos autores expresan sus datos en peso húmedo de tegumento o de la pared del cuerpo después de haber extraído dichos órganos (LAWRENCE, 1972; ENGSTROM. 1980a; CHOE en CONAND, 1983) (véase 5.3).

El cálculo del contenido energético de la pared del cuerpo puede hacerse con un calorímetro, añadiendo a las muestras ácido benzoico para facilitar la combustión (SIBUET & LAWRENCE. 1981).

Para extrapolar los datos a la población pueden calcularse los valores de Kcal para especímenes de cada clase de talla según la especie, y utilizar las regresiones entre la talla del cuerpo y el contenido calórico (LAWRENCE. 1980). En cualquier caso, no es aconsejable emplear directamente valores de conversión que no correspondan a las poblaciones con las que se está trabajando.

## 5.2. INCIDENCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES EN LA DISTRIBUCIÓN Y EN LA ACTIVIDAD DE LOS INDIVIDUOS

La influencia de los distintos factores am-

bientales (corrientes dominantes, temperatura, salinidad del agua, profundidad, naturaleza físico-química del sustrato, etc.) en la distribución de una especie determinada de holoturia o en la composición de especies de una región, puede valorarse midiendo dichos parámetros en las áreas sometidas a estudio y estableciendo correlaciones con la densidad de individuos o la diversidad de especies en dichas zonas.

De este modo, por ejemplo, CARNEY & CARNEY (1982) aprecian que los cambios más significativos en la composición faunística y diversidad de las holoturias en Cascadia Basin (costa occidental de los EE.UU.) están más estrechamente relacionados con la profundidad que con la distancia a la costa; PAWSON *et al.* (1982) observan que la distribución de *Holothuria lentiginosa enodis* depende del contenido en materia orgánica del sedimento; SLOAN & BODUNGEN (1980) encuentran una preferencia de *Isoetichopus badiotus* por las zonas al abrigo de las olas y, dentro de éstas, por las arenosas estables con comunidades epibentónicas o asociadas a praderas de fanerógamas no demasiado densas; SLOAN (1979) utiliza un análisis de la varianza (ANOVA) para relacionar la presencia de diferentes especies con los distintos microhábitats que se pueden encontrar bajo las rocas (rugosas, lisos, con retención de grava o arena, etc.).

YOUNG & CHIA (1982) observan el comportamiento ante la luz de las larvas de *Psolus chitonoides*, sometiendo en el laboratorio los discos de cultivo en los que se desarrollan a iluminación unidireccional y fotografiando periódicamente dichos recipientes. Las fotos, ampliadas a tamaño natural, son divididas en sectores de 20°, y el modelo de distribución espacial observado representado en un diagrama que es comparado con una distribución circular normal mediante una prueba de  $\chi^2$ .

Asimismo, estos autores observan las respuestas a la luz y a la gravedad de las larvas pentáctula colocando cada una (para eliminar interacciones entre individuos) en cajas de Petri completamente llenas de agua y tapadas, estando medio recipiente expuesto a la luz y la otra mitad en sombra, de modo que las larvas puedan escoger libremente entre la zona iluminada o la parte oscura o entre el techo y el fondo; la posición al cabo de una hora se anota.

Para el estudio de las respuestas de los adultos, éstos son colocados en tanques con paredes opacas a la luz excepto en un extremo, y se anotan sus movimientos durante algunos días mientras están sometidos a un ciclo de 12 horas de luz y oscuridad (YOUNG & CHIA, 1982).

Siguiendo a los mismos autores puede estudiarse la fijación de las larvas al sustrato *in situ*

mediante cajas de plexiglás provistas de un diafragma de goma en la tapa, por donde pueden inyectarse las larvas, y de orificios de ventilación en las paredes protegidos por una malla fina. Las cajas se fijan al sustrato (roca aplacerada) y se sellan mediante tiras de masilla de epóxido cuidando de no alterar los organismos del mismo. Las larvas (entre 150 y 200) se inyectan entonces mediante jeringuillas hipodérmicas. Al cabo de una semana se retiran las cajas y se fotografía la distribución de los individuos. La superficie de cada sustrato potencial se calcula a partir de las fotografías superponiendo una lámina transparente punteada regularmente y dividiendo el número de puntos que cubre cada área por el número de puntos totales. La fracción obtenida para cada sustrato es multiplicada por el número total de larvas empleadas en el experimento para conocer el número de éstas que cabría esperar que se fijaran sobre este sustrato particular si lo hicieran al azar. El número real de larvas asentadas sobre los distintos sustratos se contrasta con los valores esperados mediante una prueba de  $\chi^2$ . En este tipo de estudios hay que tener en cuenta que en muchas especies las larvas tienden a agruparse o a asentarse sobre adultos de su propia especie (YOUNG & CHIA, 1982).

Aparte de actuar sobre la distribución de los individuos, algunas características del medio pueden afectar al comportamiento de las especies. LAWRENCE & MURDOCH (1977) estudian de qué modo la porosidad y el tamaño de partículas del sustrato actúan sobre la capacidad excavadora de *Chiridota rigida*. Para ello los individuos son colocados sobre distintos sustratos, naturales o preparados artificialmente mezclando guijairos y arena en diferentes porcentajes conocidos, y se mide el tiempo que tardan en enterrarse desde que son depositados hasta que desaparece la totalidad del cuerpo excepto los 2 mm posteriores. Dicho tiempo se expresa como un coeficiente de actividad:

$$\frac{1.000}{\text{tiempo de enterramiento en segundos}}$$

El tiempo máximo concedido para que los individuos se enterraran era de 15 minutos (900 segundos) y el coeficiente de actividad para los animales que emplean un intervalo mayor se consideró como  $< 1,1$  para el cálculo del coeficiente de actividad medio.

Las características granulométricas de los diferentes sustratos se estudian según los métodos habituales (5.4). Asimismo, la densidad del sustrato se estima a partir de su volumen y peso total; y el volumen de los espacios interpartículas

se estima rellenando una probeta con sustrato seco hasta una marca determinada y midiendo el volumen de agua necesario para alcanzar la misma marca. Con estos datos se establece la relación:

$$\frac{\text{volumen de espacios interpartículas}}{\text{volumen de sustrato}}$$

El efecto de otros factores, como las variaciones de temperatura por ejemplo, en el comportamiento de las holoturias, ha sido apenas observado bajo condiciones experimentales y para unas pocas especies, aportándose datos como la temperatura a la que el animal deja de desplazarse o la temperatura a la que cesa incluso la actividad de los tentáculos (BAKUS, 1968, 1973).

### 5.3. REPRODUCCIÓN, DESARROLLO Y CRECIMIENTO

La mayoría de los estudios efectuados en este campo están dirigidos hacia un mayor conocimiento de los ciclos de vida y el desarrollo de aquellas especies que presentan interés comercial.

El seguimiento de una población con el fin de estudiar su biología y los ritmos de crecimiento presenta especiales dificultades en el caso de las holoturias. CONAND (1983) repasa las principales técnicas empleadas con este fin en los organismos marinos y los inconvenientes que surgen de su aplicación al estudio de los corderos de mar. Los métodos de marcado (véase 5.1) aportan información acerca del crecimiento, las migraciones y desplazamientos de los individuos, pero la frecuente pérdida de las marcas induce a errores en las estimas de mortalidad al interpretar las tasas de recaptura. Otra técnica empleada habitualmente consiste en seguir el crecimiento de individuos previamente encerrados en cajas, ya sea en su hábitat natural (EDWARDS y CHOE en CONAND, 1983) o en acuarios. Las observaciones en laboratorio presentan el inconveniente de que muchas especies dejan de alimentarse, con la consiguiente pérdida de peso.

La lectura de estrías de crecimiento se ha intentado en las piezas de los anillos calcáreos, pero sin éxito. EBERT (en CONAND, 1983) efectuó un marcaje con tetraciclina en *Holothuria atra*, estudiando las líneas de fluorescencia que aparecían en dicho anillo; sin embargo, no siempre parecen obtenerse buenos resultados (CONAND, 1983).

Un problema adicional que surge en todos los estudios sobre la biología de estos organismos es la dificultad de medir la longitud y g-isor de

los individuos y de establecer clases de talla, debido a su enorme contractilidad. Así, SLOAN (1979) prefiere utilizar biomasas como medida de tamaño antes que medidas lineales y TYLER & GAGE (1983) renuncian a extraer conclusiones sobre la estructura de la población a partir de especímenes fijados de *Ypsilothuria talismani* debido a la forma irregular que presentan.

Habitualmente se emplean reglas de mano más o menos flexibles, midiéndose la longitud total, dorsalmente, desde la boca al ano. Por lo general, cada autor lo resuelve a su manera intentando que las medidas sean lo más objetivas posible. ENCSTROM (1983) seca previamente sus pequeños especímenes de *Cucumaria lubrica* enrollándolos en toallas de papel durante cinco minutos. El mismo autor (ENGSTROM, 1980a), estudiando los ciclos reproductivos de *Holothuria floridana* y *H. mexicana*, mide la longitud de sus individuos cuando éstos presentan la máxima contracción después de haber sido disectados y de haberles extraído las gónadas.

YINGST (1982) mide también la longitud total y la anchura sobre las holoturias contraídas, pero lo hace *in situ*, bajo el agua, y considerando como máxima contracción la mayor alcanzada después de haberlas «estrujado».

HAMMOND (1982a) utiliza como longitud la media de varias medidas realizadas también en inmersión, pero procurando no molestar a los ejemplares al medirlos con el fin de que no se contraigan.

El peso, a su vez, puede expresarse como peso húmedo total o como peso escurrido (tras extraer el agua de la cavidad del cuerpo y el líquido celómico) (CONAND, 1981; ENGSTROM, 1982). Algunos autores prefieren utilizar el peso húmedo del cuerpo, pero entendiendo por tal el peso húmedo del animal tras extraer el tubo digestivo y los árboles respiratorios para evitar las variaciones debidas a la arena y al agua contenidas en ellos respectivamente (ENGSTROM, 1980a), o lo que CONAND (1981) denomina peso destripado, extirpando además las gónadas.

El peso gonadal es expresado como peso húmedo y su volumen como los ml de agua desplazados al ser introducidas en un cilindro graduado.

Con estas medidas se establecen las correspondientes distribuciones de frecuencias y se analizan las relaciones entre los caracteres, considerados como variables independientes, mediante análisis de regresión y correlación.

En *Parastichopus parvimensis*, YINGST (1982) encuentra correlaciones altas entre el ín-

dice de tallas ( $S1 = \text{longitud} \times \text{anchura} \times 0.01$ ) y el peso húmedo del cuerpo y con el volumen desplazado.

Como índice gonadal puede usarse la relación entre el peso gonadal y el peso escurrido (CONAND, 1981, 1982) o, lo que sería similar,

$$\frac{\text{peso gonadal}}{\text{peso gonadal} + \text{peso corporal}} \times 100$$

(ENCSTROM, 1982), o bien

$$\frac{\text{volumen gonadal}}{\text{peso total del cuerpo}} \times 100$$

(ENGSTROM, 1980a).

Con los índices gonadales se obtiene una primera idea de la periodicidad de los ciclos reproductores que posteriormente se confirman con los estudios histológicos (ENGSTROM, 1980a).

Algunas consideraciones acerca del empleo de los índices gonadales pueden encontrarse en GRANT & TYLER (1983a). Asimismo, y en particular para los equinodermos, GRANT & TYLER (1983b) proponen la medida de las tallas de los oocitos como el mejor método para el estudio de dichos ciclos reproductivos.

La recogida de material se realiza periódicamente (de mensual a cuatrimestral). Conviene tomar también datos de la temperatura y salinidad del agua de mar ya que los períodos reproductores pueden estar influidos por cambios en dichos parámetros (ENGSTROM, 1980a). Los ejemplares son transportados al laboratorio en agua de mar, con cloruro magnésico para relajarlos, y guardados toda la noche en depósitos fríos a 4°C (CONAND, 1981) o bien se fijan en formol al 8% y son transferidos a alcohol de 70° después de una semana (TYLER & GAGE, 1983).

Para el estudio del comportamiento reproductor puede interesar mantener los ejemplares en grandes acuarios con un sistema de flujo de agua de mar (HOLLAND, 1981; ENCSTROM, 1982).

El sexo de las gónadas maduras puede ser determinado visualmente en algunos casos (CONAND, 1981, 1982; ENCSTROM, 1982). En general, en los aspidoquirótidos los ovarios suelen presentar túbulos más cortos y gruesos con color rosado, anaranjado o rojo y con frecuencia los oocitos se pueden ver a través de las paredes del ovario. Los testículos son más blanquecinos o de color crema claro.

En los casos en que el estudio histológico requiera más tiempo del disponible, CONAND (1981) emplea métodos similares a los utilizados

TABLE 1. Algunas tinciones y técnicas histoquímicas aplicadas a estudios reproductivos y nutricionales en holoturias

Some staining and histochemical techniques applied to reproductive and nutritional studies in holothurians

DEMOSTRACION O VISUALIZACION DE	TECNICA APLICADA	DESCRIPCION DE LA TECNICA	AUTOR QUE LA APLICA	TIPO DE ESTUDIO	ESPECIE
Estructura general de los tejidos	Tricrómico de Masson	BANCROFT & STEPHENS, 1977	COSTELLOE & KEEGAN, 1984	Estructura tentacular	Aslia lefevrei
	Van Gieson	»	»	»	»
	Hematoxilina-eosina	—	TYLER & GAGE, 1983	Histología de las gónadas	Ypsilothuria talismani
	<b>Hematoxilina-eosina</b>	—	ENGSTROM, 1980 a	»	Holothuria floridana y H. mexicana
	Tricrómico de Mallory	—	TYLER & GAGE, 1983	»	Ypsilothuria talismani
	<b>Hematoxilina-floxina-verde luz</b>	} Azul alcian oxidado-hemalum-floxina	} MASSIN, 1980	} Morfología funcional del tubo digestivo	} Holothuria tubulosa
	<b>Azán de Heidenhain</b>				
Proteínas	Reacción de Millou	BAKER, 1956	KRISHNAN, 1968	Histoquímica de las gónadas, tubo digestivo y pared del cuerpo en relación con los ciclos reproductivo y <b>nutricional</b>	Holothuria scabra
	Tetrazorreacción	Método de Danielli y método de Burstone en LISON, 1960; GABE, 1968 y GANTER & JOLLES, 1969	MASSIN, 1980	Morfología funcional del tubo digestivo	Holothuria tubulosa
	Tetrazorreacción precedida de una benzoflación	LISON, 1960; GABE, 1968; GANTER & JOLLES, 1969	»	»	»
Localización de proteínas	Digestión de tripsina y pepsina	GURR, 1958	KRISHNAN, 1968	Histoquímica de las gónadas, tubo digestivo y pared del cuerpo en relación con los ciclos <b>reproductivo</b> y <b>nutricional</b>	Holothuria scabra
Proteínas básicas	Azul de bromofenol mercurio (acuoso y alcohol)	MAZIA et al., 1953	»	»	»
Proteínas ácidas	Y Marrón Bismark	GURR, 1958	»	»	»
Mucoproteínas	S Amarillo Naftol	OEITCH, 1955	»	»	»
Carbohidratos	Acido periódico de Schiff (PAS)	HOTCHKISS, 1948	»	»	»
	Acido periódico de Schiff (PAS)	—	TYLER & GAGE, 1983	Histología de las gónadas	Ypsilothuria talismani

	<p>Azul alcian (pH 0'5 y pH 2'6)  Azul alcian (pH 0'5) con amarillo alcian (pH 2'6)  Azul alcian (pH 2'6) precedido de una <b>metilación</b> y una <b>saponificación</b>  PAS precedido de dimedona, de tialina y de una acetilación reversible  Azul alcian (pH 2'6) acoplado a PAS</p>	LISON, 1960; GABE, 1968; MASSIN, 1980 GANTER & JOLLES, 1969	Morfología funcional del tubo digestivo	Holothuria <b>tubulosa</b>	
Aldehidos libres	PAS sin oxidación	PEARSE, 1961	KRISHNAN, 1968	Histoquímica de las gónadas, tubo digestivo y pared del cuerpo en relación con los ciclos <b>reproductivo</b> y nutricional	Holothuria scabra
Aldehidos y grupos ácidos sulfónicos	Fucsina aldehido	PEARSE, 1961	»	»	»
Glucógeno	PAS después de una digestión salivar y <b>diastasa</b>	PEARSE, 1961	»	»	»
Localización de glucógeno	Carmin de Best después de tratamiento con <b>diastasa</b>	PEARSE, 1961	»	»	»
Grupo glicol 1:2	PAS después de una <b>acetilación</b> y deacetilación con KOH 0'1N a temperatura ambiente	McMANUS & CASON, 1950	»	»	»
<b>Glucó</b> y mucoproteínas	PAS después de extracción con metanol-cloroformo, a la piridina caliente	GERSH, 1949	»	»	»
Mucopolisacáridos neutros	<b>PAS</b>  PAS		COSTELLOE & KEEGAN, 1984 ROBERTS // & BRYCE, 1982	Digestivo (estructuras glandulares) Estructuras tentaculares	Aslia lefevrei Holothuria spp, Actinopyga echinites, Stichopus sp.
Mucopolisacáridos ácidos	Azul alcian	STEEDMAN, 1950 (en PEARSE, 1961)	KRISHNAN, 1968	Histoquímica de las gónadas, tubo digestivo y pared del cuerpo en relación con los ciclos <b>reproductivo</b> y nutricional	Holothuria scabra
	Azul alcian	—	COSTELLOE & KEEGAN, 1984	Digestivo (estructuras glandulares)	Aslia lefevrei
	Azul alcian	—	ROBERTS & BRYCE, 1982	Estructuras secretoras tentaculares	Holothuria spp, Actinopyga echinites, Stichopus sp.
Mucopolisacáridos ácidos sulfatados	Prueba de extinción del azul de <b>metileno</b>	DEMPSEY & SINGER, 1946 (en GURR, 1958)	KRISHNAN, 1968	Histoquímica de las gónadas, tubo digestivo y pared del cuerpo en relación con los ciclos <b>reproductivo</b> y nutricional	Holothuria scabra

Metacromasia	Azul de toluidina	PEARSE, 1961	»	»	»
<b>β-Metacromasia</b>	Azul de toluidina 0'1%	—	ROBERTS & BRYCE, 1982	Estructuras tentaculares	Holothuria spp, Actinopyga echinites, Stichopus, sp.
	Azul de toluidina en solución acuosa al 5%	—	TYLER & GA-GE, 1983	Histología de las gónadas	Ypsilothuria talismani
Lípidos	Sudán negro B en acetona	PEARSE, 1961	KRISHNAN, 1968	Histoquímica de las gónadas, tubo digestivo y pared del cuerpo en <b>relación con los ciclos reproductivo v nutricional</b>	Holothuria scabra
	Sudán negro B en piridina caliente y extracción posterior con metanol-cloroformo	EDGAR & DONKAR, 1957 (en PEARSE, 1961)	»		
	Sudán negro B acetilado predecido o no de extracción a la piridina	LISON, 1960; GABE, 1968; GANTER & JOLLES, 1969	MASSIN, 1980	Morfología funcional del tubo digestivo	Holothuria <b>tubulosa</b>
	<b>Ziehl-Neelsen</b>	—	»	»	»
Lípidos y <b>lipo-proteínas</b>	Sudán negro B en alcohol	McMANUS, 1946 (en PEARSE, 1961)	KRISHNAN, 1968	Histoquímica de las gónadas, tubo digestivo y pared del cuerpo en relación con los ciclos reproductivo y <b>nutricional</b>	Holothuria scabra
Grasas neutras	Oil red O	LILLIE, 1944 (en PEARSE, 1961)			»
<b>Fosfolípidos</b>	Sulfato azul Nilo	MENSCHIK, 1957 (en PEARSE, 1961); CAIN, 1947			»
Lípidos que contienen enlaces <b>insaturados</b>	Reacción del ácido <b>perfórmico</b> de Schiff (PFAS)	LILLIE, 1952			
Ácidos ribo- y <b>desoxirribonucleicos</b>	Verde-metilo-azul de <b>toluidina/pironina</b> (MGTBP)	GURR, 1958			
Localización de ARN y ADN	MGTBP después de tratamiento con ribonucleasa y ácido tricloroacético	PEARSE, 1961	»	»	»
ADN	Reacción de <b>Feulgen</b>	SWIFT, 1955	»	»	»
Hierro	Técnica de Perls	LISON, 1960; GABE, 1968; GANTER & JOLLES, 1969	MASSIN, 1980	Morfología funcional del tubo digestivo	Holothuria <b>tubulosa</b>

en peces para definir el estadio de madurez sexual de los individuos u partir de los caracteres macroscópicos de forma, color y consistencia, combinados con observaciones al microscopio óptico de fragmentos de gónadas conservadas en formol tamponado al 7 %.

Para los estudios histológicos, las gónadas, una vez extraídas, son fijadas en Bouin. Después de dos semanas las piezas se lavan con alcohol etílico al 50-70 %. Para acelerar la extracción del ácido pícrico se añaden unas gotas de solución acuosa saturada de carbonato de litio. Luego, tras aclarar con xileno, se incluyen en parafina (ENGSTROM, 1980a).

Cuando las gonadas resultan demasiado friables, la totalidad del animal puede ser decalcificado en Bouin durante una noche, lavado posteriormente en concentraciones crecientes de alcohol, aclarado con xileno e incluido en parafina (TYLER & GAGE, 1983).

Para observaciones generales, secciones de un grosor de 7 a 8  $\mu\text{m}$  pueden teñirse con hematoxilina-eosina (ENGSTROM, 1980a; TYLER & GAGE, 1983). Otras tinciones destinadas a evidenciar componentes específicos pueden verse en TYLER & GAGE (1983). Asimismo, para estudios histoquímicos durante el ciclo reproductor, tales como detección de proteínas, carbohidratos, glucógeno, lípidos, ARN y ADN, etc., KRISHNAN (1968) utiliza hasta 25 técnicas en *Holothurium scabrum* (véase tabla I).

Las técnicas básicas empleadas en histología e histoquímica, más detalladas y con otras alternativas a las aquí expuestas, pueden encontrarse en los manuales sobre el tema (PEARSE, 1960; PANTIN, 1968; BURCK, 1969, etc).

A partir de estas observaciones pueden elaborarse un poco más los datos. Para el cálculo del índice de talla a la que se alcanza la primera madurez sexual puede representarse el porcentaje de individuos maduros frente a las clases de talla, trazándose una curva entre las clases de talla en las que el 0 % y el 100 %, respectivamente, de los individuos han alcanzado la madurez, tomándose como dicho índice la talla a la cual el 50 % de los individuos son sexualmente maduros (CONAND, 1981, 1982). Como la misma CONAND (1981) apunta, este método asume que la población está constituida por una única clase de edad, o bien que en una población que contenga varias clases de edad los animales maduros más viejos serán mayores que los que alcanzan dicha madurez por primera vez. Otros autores se limitan a indicar la talla del individuo maduro de menor tamaño (ENGSTROM, 1980a; CHOE en CONAND, 1982) o la talla a la que los individuos han alcanzado generalmente la madurez (FRANKLIN y HARRIOT en CONAND, 1982).

CONAND (1981) utiliza como índice de fecundidad el cociente entre el peso medio del ovario en el estado de madurez sexual previo al desove y el cubo del diámetro de los oocitos.

El porcentaje de reducción en el peso corporal como consecuencia del desove viene dado por la diferencia entre el índice gonadal antes de desovar y el índice gonadal postdesove (ENGSTROM, 1982). Los porcentajes de individuos maduros en cada mes dan asimismo una idea del ciclo reproductivo (CONAND, 1981).

El desarrollo larvario se estudia en acuarios en el laboratorio. Los huevos se recogen en el campo en estaciones de puesta seleccionadas al efecto estimando por un lado el porcentaje de individuos que incuban sus huevos en su caso, o el número de huevos por hembra, que puede estar relacionado con el tamaño del cuerpo; para ello son recogidos cuidadosamente mediante una pipeta e introducidos en recipientes — (ENGSTROM, 1982), o bien los ejemplares son recogidos y llevados al laboratorio. El estrés originado por la recolección y manipulación induce al desove. Una vez producido éste, los huevos son transferidos mediante pipetas a un vaso de precipitados con 500 ml de agua de mar, donde se dejan depositar (HOLLAND, 1981).

Este autor encuentra que los huevos sin fertilizar de *Stichopus tremulus* han de ser enfriados a razón de 1°C/minuto hasta alcanzar una temperatura de 7,5°C antes de ser inseminados con esperma extraído de un testículo previamente disectado para que sean viables y no se produzcan polispermias. Una vez que se ha producido la fertilización (transcurridos algunos minutos), los huevos se lavan y se transfieren a una bandeja poco profunda con dos litros de agua de mar que es renovada cada pocas horas. El desarrollo tiene lugar a temperatura constante de 7,5°C  $\pm$  0,5°C. Bajo estas condiciones, HOLLAND (1981) obtiene un 90 % de eclosiones normales.

En el momento de la eclosión pueden tomarse datos acerca del aspecto de las fases juveniles, tipo de fase larvaria, tiempo transcurrido desde el desove, etc., o, si el trabajo se ha efectuado en el campo, el porcentaje de juveniles eclosionados en cada época del año, etc.

Para su estudio histológico, HOLLAND (1981) toma huevos antes de la fertilización y huevos y larvas en las distintas fases de desarrollo a diferentes intervalos (1', 2', 5', 9', 15', 1 h, 4 h, 4,25 h, 7 h, 10 h, 13 h, 16 h, 21 h, 25 h, 30 h, 37 h, 45 h y 57 h).

Aplicando los métodos de microscopía electrónica (JOHANNESSEN, 1978; HAYAT, 1981), utilizados también para otros equinodermos (BURKE, 1980; FALK-PETERSEN, 1983), los

embriones y larvas se fijan en tetróxido de osmio al 2% en agua de mar y posteriormente son deshidratados en alcohol, incluidos en Spurr o Epon, seccionados a 500 Å y contrastados con citrato de plomo (REYNOLDS, 1963).

Para el estudio con microscopio electrónico de barrido (SEM), los huevos y larvas, tras la deshidratación, son transferidos a amilacetato para ser secados con el método del punto crítico, montados sobre el porta y revestidos con oro. Durante el procesamiento se puede producir encogimiento y disminución del diámetro de los especímenes, y la fijación puede eliminar la capa gelatinosa y estrechar la anchura del espacio perivitelino por lo que estas estructuras, siempre que sea posible, deberían medirse *in vivo* (HOLLAND, 1981). La capa de gelatina se hace visible al microscopio óptico añadiendo tinta china al agua de mar que contiene los huevos y embriones vivos (HOLLAND, 1981).

#### 5.4. NUTRICIÓN

Una gran parte de los trabajos sobre la nutrición de las holoturias se han dirigido hacia las especies sedimentívoras, refiriéndose principalmente a la capacidad de selección del alimento, tasas de ingestión y reciclado y comportamiento alimentario en general.

Para los estudios más sencillos se capturan los animales mediante buceo y se recogen muestras del sedimento superficial o subsuperficial cercano, dependiendo de que los especímenes sean epi- o infaunales (aproximadamente 1 cm de espesor para los primeros y del orden de los 5 cm bajo la superficie para los segundos); se recogen asimismo las heces adyacentes a cada individuo para su posterior estudio en el laboratorio. Algunas especies como *Euapta lappa* no protegen sus heces con una cubierta de mucus, por lo que en mar abierto es imposible recogerlas antes de que se dispersen (HAMMOND, 1982a).

Para las especies excavadoras que forman embudos de sedimento alrededor de su región oral para alimentarse, conviene recoger las muestras de los 3 cm superficiales al lado del extremo anterior del animal (HAMMOND, 1982b).

Ya en el laboratorio, los animales son disecados inmediatamente y se les extrae el sedimento contenido en el intestino anterior, intestino medio e intestino posterior, si se quieren estudiar las modificaciones sufridas por el sedimento a su paso por las distintas regiones del tubo digestivo (MASSIN, 1980b; YINGST, 1976, 1982; HAMMOND, 1983) o bien sólo del intestino anterior (los primeros 10 cm más o menos) si sólo se desea determinar la capacidad de seleccionar el alimento (HAMMOND, 1982b).

A la hora de recolectar los ejemplares conviene conocer previamente, de un modo general, sus hábitos alimentarios en el sentido de que, mientras que algunas especies se alimentan durante todo el día de un modo continuo, como *Holothuria tubulosa* (MASSIN & JANGOUX, 1976), otras lo hacen sólo o más activamente al atardecer o por la noche (CRUMP, 1966; HAMMOND, 1982b, 1983), a la vez que otras, como *Cucumaria elongata*, interrumpen su alimentación durante ciertas épocas del año (FISH en BAKUS, 1973).

Si las muestras de sedimento no han de ser estudiadas inmediatamente, es posible conservarlas congeladas durante varias semanas (KRIPOUNOFF & SIBUET, 1980; YINGST, 1982; HAMMOND, 1983). Sobre cada muestra pueden realizarse recuentos de poblaciones bacterianas (SIBUET *et al.*, 1982) y de meiofauna (HAMMOND, 1981, 1983; SIBUET *et al.*, 1982), etc.

Para el análisis granulométrico, las muestras son lavadas con agua destilada con el fin de eliminar las sales y favorecer la dispersión; posteriormente son tratadas con lejía o agua oxigenada para destruir la materia orgánica, de nuevo lavadas con agua destilada y, por último, secadas a 100°C (YINGST, 1982) o a menos de 50°C durante 48 horas para evitar que se agreguen los granos del sedimento (HAMMOND, 1981, 1982b; ROBERTS & BRYCE, 1982). Las distintas fracciones, gravas ( $\varnothing > 2$  mm), arenas ( $2\text{ mm} > \varnothing > 50\text{ }\mu\text{m}$ ) y limos y arcillas ( $\varnothing < 50\text{ }\mu\text{m}$ ) según el método inteinacional, o cualquier otra división más o menos aleatoria, se separan tamizando y son pesadas para expresar los resultados, finalmente, como porcentaje de la muestra total; estos valores se representan sobre papel semilogarítmico o estándar para gráficas sedimentológicas, según los métodos empleados habitualmente en granulometría.

Para la separación de las fracciones limo ( $2-50\text{ }\mu\text{m}$ ) y arcilla ( $\varnothing < 2\text{ }\mu\text{m}$ ) las técnicas más utilizadas son el densímetro de Bouyoucos y el método de la pipeta de Robinson. Para cantidades de muestra pequeñas, que es lo habitual en el caso de contenidos intestinales, sólo es recomendable por su mayor precisión el empleo de la pipeta, considerando además que ésta únicamente puede operar para concentraciones superiores a 20 g de sedimento/l de agua (MARSHALL & HOLMES, 1979).

HAMMOND (1981, 1982b) emplea para el cribado un tamizador sónico, separando las fracciones a intervalos de 0,5 a 4,5  $\mu\text{m}$  de diámetro.

Para cada muestra o grupo de muestras (sedimentos, contenido intestinal o heces) se calcula el diámetro medio y la desviación típica.

El agua retenida por el sedimento corres-

ponde al porcentaje de humedad según la expresión:  $(1 - P_s/P_h) \times 100$ , donde  $P_h$  es el peso húmedo y  $P_s$  es el peso seco tras secar hasta peso constante a 105°C (MASSIN, 1980b).

El porcentaje de materia orgánica total puede calcularse como el peso perdido tras someter la muestra seca a 475°C durante 5-6 horas (MASSIN, 1980b; YINGST, 1982):

% de materia orgánica total =

$$= \left(1 - \frac{\text{peso seco cenizas}}{\text{peso seco}}\right) \times 100$$

Para el carbono orgánico y nitrógeno. HAMMOND (1983) utiliza el método de las dos temperaturas según Telek y Marshall, con un analizador Colman y empleando 0.5 g de sedimento homogeneizado, secado previamente hasta peso constante a 90°C.

YINGST (1982) seca hasta peso constante a 100°C y determina el  $N_2$  mediante el método Kjeldahl, y para el C utiliza un analizador gaseométrico tomando como medida la diferencia entre el C total y el C obtenido en el análisis del carbonato contenido en la muestra.

La mayoría de los métodos expuestos para el tratamiento y estudio de los sedimentos pueden encontrarse en los tratados habituales de Edafología (SOIL CONSERVATION SERVICE, 1973; CHAPMAN & PRATT, 1973; RIVIERE, 1977; MARSHALL & HOLMES, 1979) o en PARKER (1983) y BUCHANAN (1984), para el caso específico de sedimentos marinos.

De las comparaciones sencillas de los parámetros anteriormente vistos en los distintos grupos de muestras pueden obtenerse conclusiones acerca de la posible selección en la ingestión de un rango determinado de diámetros de partículas o de sedimento rico en materia orgánica, el efecto del paso por el tubo digestivo ejercido sobre dichos diámetros y los contenidos en materia orgánica, carbono o nitrógeno, etc. Dichas comparaciones pueden efectuarse mediante la prueba de la  $t$  de Student (YINGST, 1982).

La eficiencia en la asimilación de la materia orgánica puede determinarse mediante la relación:

$$\frac{\text{contenido orgánico del sedimento}}{\text{contenido orgánico de las heces}} \times 100\%$$

(BRAND & MUÑOZ, 1980), o bien mediante el índice de Conover (YINGST, 1976; HAUKSON, 1979):

$$\frac{(F' - E')}{(1 - E') (F')} \times 100$$

(CONOVER, 1966), donde

$$F' = \frac{\text{peso seco sin cenizas}}{\text{peso seco}}$$

para el alimento ingerido, y

$$E' = \frac{\text{peso seco sin cenizas}}{\text{peso seco}}$$

para las heces.

Debe tenerse en cuenta que cuando se compara entre la materia orgánica contenida en los sedimentos, en el digestivo y en las heces, hay que considerar que los valores obtenidos para estas últimas pueden estar ligeramente incrementados por la cubierta de mucus que presentan en muchas especies (YINGST, 1982).

YINGST (1976) estudia en *Parastichopus parvimensis* la eficiencia en la utilización de los distintos componentes alimenticios que forman la materia orgánica disponible en el sedimento bentónico y en las rocas (detritos vegetales, detritos animales, diatomeas y algas flageladas, cianofíceas, bacterias, hongos, etc.), preparando mezclas de sedimento con cada uno de estos componentes por separado, marcados previamente con  $^{14}C$ .

Los detritos vegetales se obtienen a partir de algas cultivadas en un medio que contiene 30  $\mu C/l$  de  $NaH^{14}CO_3$ , y que, una vez lavadas para eliminar el  $^{14}C$  extracelular y reducidas a polvo, son resuspendidas en agua de mar con bacterias hasta su descomposición.

Los detritos animales se obtienen de la carne descompuesta por bacterias de un cangrejo alimentado con algas marcadas con  $^{14}C$ . Asimismo se obtiene diatomeas y algas flageladas, bacterias y cianofíceas, cultivándolas en medios marcados con  $^{14}C$ . Los hongos se obtienen de cultivos de diatomeas muertas previamente marcadas con  $Na^{14}CO_3$ .

Las distintas fracciones se lavan para eliminar el  $^{14}C$  extracelular y se esterilizan antes de ser añadidas a porciones de 50-100 g de sedimentos previamente esterilizados, secados y tamizados para eliminar partículas mayores de 2 mm.

El experimento se desarrolla en el laboratorio, en contenedores de plástico divididos en dos mitades comunicadas por un orificio que lleva un filtro de 0.45  $\mu m$ . En una de las mitades se coloca el sedimento preparado y un individuo de la especie estudiada y en la otra mitad un individuo de la misma especie que sirve de control.

Las heces son retiradas de la cubeta al menos tres veces al día para evitar que sean comidas

de nuevo o que contaminen el medio. Al finalizar la experiencia (12 horas después de que se produzcan las primeras bolitas fecales) se toman dos muestras de agua de 0.5 ml de ambos lados de la cubeta y dos muestras de fluido corporal de ambos animales y se colocan directamente en frascos con 5 ml de cóctel de centelleo. El sedimento y alimento que queda en las cubetas es recogido, lavado, secado y pesado.

Los animales son transferidos a agua de mar limpia durante 24 horas para permitir el vaciado del tubo digestivo. Las heces recogidas durante este tiempo se agrupan con las recogidas durante el experimento y son lavadas, secadas y pesadas.

Los animales son disectados y sus distintos órganos congelados por separado para su almacenamiento, posteriormente descongelados, pesados y homogeneizados. Dos alícuotas de cada homogeneizado se pesan y se preparan para el recuento de centelleo.

El sedimento no comido, muestras de la mezcla de sedimento y alimento colocada inicialmente y las heces recogidas durante el experimento se reducen a consistencia uniforme con un mortero y se toma una alícuota de cada uno de estos materiales, se coloca en frascos de peso conocido y se pesa. En cada frasco se añaden 0.5 ml de NCS (un solubilizador de tejidos) y se incuban a 50°C durante 24 horas. Antes de contar se añaden 5 ml de cóctel de centelleo a cada frasco con muestra.

Las cantidades de las diferentes fracciones de alimento ingeridas (I) y asimiladas (A) vienen dadas por las expresiones:

$$I = [(B_x - B_c) wtx + (B_{fx} - B_{fc}) vol B_{fx} + F]$$

$$A = I - F,$$

donde

x es el animal de experimentación.

c es el animal que sirve de control,

B es la radioactividad en los tejidos corporales en (cpm/g peso seco)

wt es el peso seco expresado en gramos del animal.

B<sub>f</sub> es la radioactividad en los fluidos corporales (cpm), y

F es la radioactividad en la materia fecal (cpm).

siendo la eficiencia en la asimilación para cada tipo de alimento:

$$U, (\%) = 100 \times A/I$$

Los efectos de la reingestión de las heces sobre un trabajo de este tipo, las limitaciones del método para el cálculo de la eficacia en la asimilación (método de CONOVER (en YINGST, 1976), que asume que no existe asimilación de materiales inorgánicos) y las limitaciones del

empleo de radioisótopos en el cálculo de dichas eficiencias, son discutidos por YINGST (1976) en su trabajo.

La selectividad en el tamaño de partículas puede valorarse con la fórmula de Ivlev (en ROBERTS & BRYCE, 1982; YINGST, 1982):

$$E = \frac{(r_i - p_i)}{(r_i + P_i)} \text{ , donde}$$

E es el valor de selectividad.

r<sub>i</sub>, el porcentaje de partículas de la clase de talla de diámetros i encontradas en el intestino de las holoturias, y p<sub>i</sub>, es el porcentaje de partículas de la clase de talla i en el sedimento.

E varía de -1 a +1. Si E=0, se considera que no hay selección, si E<0, se considera que hay una contraselección o rechazo de una clase de tallas determinada y si E>0, es que existe selección de una clase de talla.

No obstante, HAMMOND (1982b) recomienda la no utilización de dicho índice por considerar que confiere excesiva importancia a pequeñas diferencias entre los extremos de una distribución de frecuencias de talla y minimiza el significado de diferencias en la porción central, por lo que su aplicación a variables continuas, como el tamaño de grano, puede conducir a resultados anómalos de difícil interpretación. En este mismo trabajo, este autor repasa la utilidad y recomienda el empleo de los distintos estadísticos sedimentológicos estándar para estudios de este tipo, como las diferencias de tamaño de grano medio (FOLK en HAMMOND, 1982b), pero evaluando con referencia a otras características de la distribución de frecuencias de talla. Además, los métodos resultan también apropiados a muestras pequeñas de granos finos que hay que analizar con ayuda del microscopio (FRIEDMAN en HAMMOND, 1982b).

Más información sobre los índices de Ivlev y otros índices de selectividad y sus propiedades puede encontrarse en LECHOWICZ (1982).

Resulta particularmente interesante que los estudios sobre la capacidad de selección del alimento vayan acompañados de observaciones microscópicas de la estructura tentacular con el fin de intentar detectar en ella formaciones que ayuden o justifiquen la posible selección de tamaños de grano, etc.

Para la extracción de los tentáculos los ejemplares son anestesiados con cloruro magnésico al 5% (HAMMOND, 1982b; ROBERTS & BRYCE, 1982; SMITH, 1983) o con cristales de mentol (COSTELLOE & KEEGAN, 1984); sin embargo, no es posible evitar totalmente su contracción (ROBERTS & BRYCE, 1982).

Para preparaciones destinadas a la observación con el microscopio Óptico. ROBERTS & BRYCE (1982) fijan los tentáculos en glutaraldehído al 4 % con NaCl al 3 % en una solución tampón de cacodilato (pH 7,2), siendo posteriormente deshidratados e incluidos en JB4. COSTELLOE & KEEGAN (1984) decalcifican en ácido etilendiamino tetracético y fijan en formol tamponado o en Bouin. Secciones de 2 a 4  $\mu\text{m}$  o de 4 a 8  $\mu\text{m}$  de grosor (para inclusiones en JB4 o en parafina, respectivamente) se tienen según las técnicas habituales (tabla I).

Para su estudio al microscopio electrónico. SMITH (1983) fija con glutaraldehído al 4 % en tampón cacodilato 0,2 M (pH 7,4) durante una hora, postfija en tetróxido de osmio al 1 %, deshidrata en etanol e incluye en resina Spurr. Las secciones son contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo (REYNOLDS, 1963).

Para su estudio al microscopio electrónico de barrido (véase HAMMOND, 1982b; COSTELLOE & KEEGAN, 1984), una vez extraídos, los tentáculos son fijados en formaldehído de Baker o en solución al 3,5 % de glutaraldehído en tampón fosfato o en cacodilato (pH 7,5) y postfijados en una solución de tetróxido de osmio al 1 %, posteriormente deshidratados, utilizando concentraciones crecientes de alcohol o de acetona, secados al punto crítico y recubierto con la capa de oro.

ROBERTS & BRYCE (1982) y SMITH (1983) fijan los tentáculos en una mezcla de glutaraldehído al 4 % y tetróxido de osmio al 1 % en una proporción 3:1.

YINGST (1982) determina la tasa de sedimento reciclado durante la alimentación de *Parastichopus parvimensis* colocando los animales recién capturados en tanques con sedimento y un sistema de circulación de agua de mar, dejándolos comer durante 6 horas, y recuperando las heces cada 30 minutos, para enjuagarlas con agua destilada, secarlas a 100°C y pesarlas.

A partir de estos datos, las tasas de extracción de materia orgánica, carbono orgánico o nitrógeno del sedimento a su paso por el intestino vendrían dadas por la expresión:

$$\left[ \frac{(A \text{ intestino anterior}) - (A \text{ intestino posterior})}{(A \text{ intestino anterior})} \right] \times \text{tasa de producción de heces (YINGST, 1982)}$$

Donde A es la concentración de materia orgánica, carbono orgánico o nitrógeno, en cada caso.

Si bien este tipo de estudios se realiza más fácilmente en el laboratorio, debe tenerse cuidado al interpretar los datos obtenidos ya que, como se ha indicado anteriormente, muchas especies dejan de alimentarse al ser colocadas en acuarios (BAKUS, 1973; CONAND, 1983), especialmente cuando se trata de tanques profun-

dos, en los que las holoturias se sitúan en las paredes y evitan comer sobre el fondo (CROZIER y TREFZ en HAMMOND, 1982b). Por ello puede solventarse en parte el problema empleando cubetas o mesas de experimentación poco profundas (TREFZ en BAKUS, 1973), con una capa de sedimento de unos 3 cm de espesor y agua de mar circulando con unos 6 cm de profundidad, con lo que en pocas horas se puede encontrar a las holoturias comiendo (HAMMOND, 1982b).

El tiempo de paso del sedimento a lo largo del intestino suele medirse empleando arenas coloreadas con colores comerciales no tóxicos (MASSIN & JANGOUX, 1976; HAMMOND, 1982a) o arenas de grosores diferentes y bien diferenciables (HAMMOND, 1982a, 1982b). Este último procedimiento puede dar resultados ambiguos en el caso de especies que presenten una fuerte selección por un diámetro de partículas específico.

A ser posible, y por las razones ya expuestas, estos estudios e, preferible hacerlos en la naturaleza. En las especies infaunales es relativamente sencillo colocar la arena tenida en el fondo de los embudos de alimentación y anotar el tiempo que aquélla tarda en aparecer en el alto de cada montón (HAMMOND, 1982a).

Para las especies epifaunales, puede emplearse el método seguido por MASSIN & JANGOUX (1976) para *Holothuria tubulosa*: la arena de color es colocada, con un espesor de 5 a 10 mm, en cajas que se depositan sobre el fondo durante 4-5 días para que se enriquezcan en materia orgánica. Una vez transcurrido este tiempo se colocan las holoturias. A los primeros 30 minutos, y posteriormente cada hora, se extraen dos ejemplares para ser disectados. Las disecciones continúan hasta que todo el tubo digestivo se haya llenado de la arena coloreada. Los individuos supervivientes se colocan entonces en arena de otro color y se reinicia el proceso, hasta un total de cuatro cambios de sustrato. A cada holoturia sacrificada se le mide la longitud total del cuerpo, la del tubo digestivo, la porción del digestivo coloreada y el peso húmedo del animal y del contenido del digestivo.

Algunos autores expresan, mediante ecuaciones, el tiempo de paso en función de la longitud del cuerpo o del tubo digestivo (TREFZ en BAKUS, 1973; MASSIN & JANGOUX, 1976). De los tiempos de paso parciales pueden obtenerse conclusiones acerca de la función de las distintas regiones del digestivo (almacenamiento, función digestiva, eliminación, etc.) (MASSIN & JANGOUX, 1976). Es conveniente que estas observaciones se complementen con un estudio histológico e histoquímico sobre la

morfología funcional del digestivo (véase MASSIN, 1980a). Para el microscopio óptico este autor aplica las técnicas ya vistas anteriormente: fijación de fragmentos de digestivo en Bouin, formol neutro o líquido de Baker, e inclusión en parafina o en polietilenglicol con nitrocelulosa (según técnica adaptada de REID & TAYLOR en MASSIN, 1980a). Las secciones, de 7  $\mu\text{m}$  o 10  $\mu\text{m}$ , son teñidas con técnicas tróxicas e histoquímicas (véase tabla 1).

Para las observaciones al microscopio electrónico, MASSIN (1980a) sigue el método de DESCHUYTENEER & JANGOUX (1978): extracción de los fragmentos de digestivo *in vivo*; éstos son fijados a 4°C en glutaraldehído al 3% en tampón cacodilato 0,4 M (en medio salino: NaCl 1.75%), postfijados en tetróxido de osmio al 1% en el mismo tampón, deshidratados e incluidos en Epon o en Aradilta.

## 5.5 ACTIVIDAD DIARIA

Algunos autores han estudiado la actividad de las holoturias, casi siempre relacionada con la obtención del alimento. Como se ha indicado anteriormente, dicha actividad puede ser mayor durante el día o bien durante la noche, o indistintamente, según las especies. Las dificultades que presenta el marcado de los individuos hacen que la observación haya de ser casi continua.

Sobre un área determinada y delimitada, más o menos extensa, del fondo marino (dependiendo de la topografía, de la densidad de los animales y de la actividad de los mismos), se cartografían las posiciones de los individuos de cada especie objeto del estudio y, o intervalos fijos, un buceador toma nota de las nuevas localizaciones.

Los cambios en la dirección seguida por los ejemplares pueden detectarse indicados por los rosarios de excrementos y la orientación del animal (HAMMOND, 1982a). Este autor tiene en cuenta sólo los cambios de dirección mayores de 45°. Para comprobar la aleatoriedad de los movimientos, la dirección neta en el movimiento de cada individuo se asigna a uno de los cuatro cuadrantes definidos por los ejes N-S y E-W, y se hacen corresponder los movimientos en las direcciones de dichos ejes N-S o E-W al cuadrante inmediato en el sentido de las agujas del reloj. La hipótesis de que el movimiento se produce al azar se confronta mediante una prueba de  $\chi^2$ .

Para las especies excavadoras, los movimientos a largo plazo de los montículos bajo los que se encuentran pueden ser medidos colocando estaquillas de referencia y tomando las distancias desde cada montículo a tres de ellas utilizadas

como coordenadas (HAMMOND, 1982a).

CRUMP (1966), para la observación nocturna de *Holothuria tubulosa*, emplea linternas con filtro rojo para no alterar el comportamiento de los individuos, ya que la luz blanca los hace regresar a las rocas, inhibiendo la actividad alimentaria. A este respecto creemos que, en realidad, los ejemplares con los que trabajó Crump eran individuos de *H. sanctori*, por un lado por la descripción que el autor hace de su coloración y, por otro lado, por el tipo de alimentación discontinua que presentan: el autor citando los encuentra durante el día en las grietas de las rocas, y por la noche se desplazan a comer al fondo de arena, lo que coincide con nuestras propias observaciones para *Holothuria sanctori* (PÉREZ RUZAFÁ, 1984), mientras que *H. tubulosa* presenta alimentación continua (MASSIN & JANGOUX, 1976).

## AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a la Dra. M.<sup>a</sup> Luisa Tejedor, del Departamento de Edulogía de la Universidad de La Laguna, al Dr. J. Meseguer, del Departamento de Citología e Histología de la Universidad de Murcia, y a los Dres. Luis Ramírez y Joun-Domenec Ros, del Departamento de Ecología de la Universidad de Murcia, el haber leído el manuscrito, al que han aportado valiosos consejos y clarificado algunos aspectos relacionados con sus respectivos campos de trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA:

- ALENDER, C. B. & RUSSELL, F. E. 1966. Pharmacology. In: BOOLOOTIAN, R. A. (Ed.), 1966: 529-543.
- BAKUS, G. J. 1968. Defensive mechanisms and ecology of some tropical holothurians. *Mar Biol.*, 2(1): 23-32.
- BAKUS, G. J. 1973. The biology and ecology of tropical holothurians. In: *Biology and Geology of Coral Reefs. Vol. II: Biology I*: 325-367. Academic Press. New York. London.
- BEILLAN-SANIINI, D. 1970. Methodologie pour l'étude qualitative et quantitative des peuplements de substrat dur. *Thalassia Jugoslavica*, VI: 129-137.
- BILLET, D. S. M. & HANSEN, B. 1982. Abyssal aggregations of *Kolga hyalina* Danielssen and Koren (Echinodermata: Holothurioidea) in the northeast Atlantic Ocean: a preliminary report. *Deep Sea Research*, 29 (7A): 799-818.
- BILLET, D. S. M. & HANSEN, B. 1984. Pelagic Holothurioidea of the North-East Atlantic. *5th International Echinoderm Conference*, Irlanda.
- BOOLOOTIAN, R. A. (Ed.), 1966. *Physiology of Echinodermata*. Wiley Interscience. New York. London.
- BRAND, T. & MUÑOZ LEY, E. 1980. On the newly

- discovered relationship between the parasitic gastropod *Balcis catalinensis* and its holothurian host *Brandtothuria arenicola*. *Bull. Amer. Malacological Union*: 5-10.
- BUCHANAN, J. B. 1984. Sediment Analysis. *In*: HOLME, N. A. & MCINTYRE, A. D. (Eds.), 1984: 41-65.
- BURCK, H.-C. 1969. *Técnica Histiológica*. Paz Montalvo. Madrid.
- BURKE, R. D. 1980. Development of pedicellanae in the pluteus larva of *Lytechinus pictus* (Echinodermata: Echinoidea). *Canadian Journal of Zoology*, 58 (9): 1674-1682.
- BYRNE, M. 1982. Functional morphology of a holothurian autotomy plane and its role in evisceration. *In*: LAWRENCE, J. M. (Ed.), 1982: 65-68.
- BYRNE, M. 1984. The fine structure of the autotomy tissues of the holothurian *Eupentacta quinquesemita* (Selenka) before, during and after evisceration. *5th International Echinoderm Conference*, Irlanda.
- CAMPOS-VILLARROEL, R. A. & MACSOTAY, O. 1979. Nociones sobre técnicas de colección, transporte y preservación de invertebrados marinos. *Boletín Sociedad Venezolana Ciencias Naturales*, 136 (XXXIV): 157-205.
- CARNEY, R. S. & CAREY, A. G. 1982. Distribution and diversity of holothuroids (Echinodermata) on Cascadia Basin and Tufts Abyssal Plain. *Deep-Sea Research*, 29 (5A): 597-607.
- CHAFFEE, C. 1982. Birth by the viviparous holothuroid *Pachythyone rubra* (Clark, 1901). *In*: LAWRENCE, J. M. (Ed.), 1982: 465-466.
- CHAPMAN, H. D. & PRATT, P. F. 1973. *Métodos de análisis para suelos, plantas y aguas*. Trillas. México.
- CHERBONNIER, G. 1947. Étude de la couronne calcaire périparingienne, des différents organes et de la spiculation chez une Holothurie dendrochirote: *Cucumaria lefevrei* Barrois. *Bull. Lab. Dinard*, XXIX: 13-23.
- CHERBONNIER, G. 1965. Expedition océanographique belge dans les eaux côtières africaines de l'Atlantique sud (1948-1949). Holothurides. *Com. Adm. Patr. Inst. Royal Sc. Nat. de Belgique*, III (1): 1-24.
- CONAND, C. 1981. Sexual cycle of three commercially important holothurian species (Echinodermata) from the lagoon of New Caledonia. *Bull. Mar. Sci.*, 31 (3): 523-543.
- CONAND, C. 1982. Reproductive cycle and biometric relations in a population of *Actinopyga echinites* (Echinodermata: Holothuroidea) from the lagoon of New Caledonia, western tropical Pacific. *In*: LAWRENCE, J. M. (Ed.), 1982: 437-442.
- CONAND, C. 1983. Methodes d'étude de la croissance des holothuries et premiers résultats d'une expérience de marquage en Nouvelle-Calédonie. *Lettre CPS d'information sur les pêches*, 26: 33-40.
- CONOVER, R. J. 1966. Assimilation of organic matter by zooplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 11: 338-345.
- COSTA, R., BISOL, P. M. & SIBUET, M. 1982. Genetic variability in deep-sea holothurians. *In*: LAWRENCE, J. M. (Ed.), 1982: 189-191.
- COSTELLOE, J. & KEEGAN, B. F. 1984. Feeding and related morphological structures in the dendrochirote *Aslia lefevrei* (Holothuroidea: Echinodermata). *Mar. Biol.*, 84: 135-142.
- CRUMP, R. G. 1966. The diurnal activity of holothurians. *In*: LYTHGOE, J. N. & WOODS, J. D. (Eds.), *Malta '65*. Symposium of Underwater Association for Malta 1965: 43-45.
- DART, J. K. G. & RAINBOW, P. S. 1976. Some Underwater Techniques for Estimating Echinoderm Populations. *In*: DREW, E., A., LYTHGOE, J. N. & WOODS, J. D. (Eds.), 1976. *Underwater research*: 303-311. Academic Press. London.
- DEICHMANN, E. 1954. The holothurians of the Gulf of Mexico. *Fishery Bulletin Fish Wildlife Service*, 55: 381-410.
- DEICHMANN, E. 1957. The Littoral Holothurians of the Bahama Islands. *American Museum Novitates*, 1821: 1-20.
- DESCHUYTENEER, M. & JANGOUX, M. 1978. Comportement alimentaire et structures digestives d'*Ophioderma longicauda* (Retzius) (Echinodermata, Ophiuroidea). *Ann. Inst. Océanogr.*, Paris, 54 (2): 127-138.
- ENGSTROM, N. A. 1980a. Reproductive cycles of *Holothuria (Halodeima) floridana*, *H. (H.) mexicana* and their hybrids (Echinodermata: Holothuroidea) in southern Florida, U.S.A. *International Journal of Invertebrates Reproduction*, 2: 237-244.
- ENGSTROM, N. A. 1980b. Hybridization and the systematic status of the Aspidochirote Holothurians *Holothuria (Halodeima) floridana* Pourtales, 1851 and *H. (H.) mexicana* Ludwig, 1875. *Brenesia*, 17: 69-84.
- ENGSTROM, N. A. 1982. Brooding behavior and reproductive biology of a subtidal Puget Sound sea cucumber. *Cucumaria lubrica* (Clark, 1901) (Echinodermata: Holothuroidea). *In*: LAWRENCE, J. M. (Ed.), 1982: 447-450.
- FALK-PETERSEN, I.-B. 1983. Light and electron microscopic studies of the embryonic development of *Strongylocentrotus pallidus* (G. O. Sars). *Sarsia*, 68: 9-20.
- FERAL, J. P. 1984. Caloric content of temperate and subantarctic holothuroids at critical stages of their life cycles. *5th International Echinoderm Conference*. Irlanda.
- FERAL, J. P. & MASSIN, C. 1982. Digestive systems: Holothuroidea. *In*: JANGOUX, M. & LAWRENCE, J. M. (Eds.), 1982: 191-212.
- GEORGE, J. D. 1980. Photography as a marine biological research tool. *In*: PRICE, H., IRVINE, D. E. G. & FARNHAM, W. F. (Eds.), *The shore environment. I. Methods*: 45-115. Academic Press. London.
- GRANT, A. & TYLER, P. A. 1983a. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. 1. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices. *In*: *ASFA. 1*, 14 (7) (1984): 44. (Resumen).
- GRANT, A. & TYLER, P. A. 1983b. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. 2. The analysis of oocyte size/frequency data and comparison of different types of data. *In*: *ASFA. 1*, 14 (7) (1984): 44. (Resumen).
- GUSTATO, G. & VILLARI, A. 1977. Sulla sistematica e frequenza delle specie del genere *Holothuria* in una zona del golfo di Napoli. *Bollettino Società Naturalisti Napoli*, LXXXVI: 283-314.

- GUSTATO, G. & VILLARI, A. 1978. Sulla distribuzione delle specie del genere *Holothuria* nel Golfo di Napoli. *Ibid.*, 87: 413-426.
- GUSTATO, G. & VILLARI, A. 1980. On the ecology and species frequency of the genus *Holothuria* in the Gulf of Naples. *In*: JANGOUX, M. (Ed.), 1980: 187.
- HAMMOND, L. S. 1981. An analysis of grain size modification in bioeyenic carbonate sediments by deposit-feeding holothurians and echinoids (Echinodermata). *Limnol. Oceanogr.*, 26 (5): 898-906.
- HAMMOND, L. S. 1982a. Patterns of feeding and activity in deposit-feeding holothurians and echinoids (Echinodermata) from a shallow back-reef lagoon, Discovery Bay, Jamaica. *Bull. Mar. Sci.*, 32 (2): 549-571.
- HAMMOND, L. S. 1982b. Analysis of grain-size selection by deposit-feeding holothurians and echinoids (Echinodermata) from a shallow reef lagoon, Discovery Bay, Jamaica. *Marine Ecology, Progress Series*, 8: 25-36.
- HAMMOND, L. S. 1983. Nutrition of deposit-feeding holothurians and echinoids (Echinodermata) from a shallow reef lagoon, Discovery Bay, Jamaica. *Ibid.*, 10: 297-305.
- HANSEN, B. 1975. Systematics and biology of the deep-sea holothurians. Part I. Elaspoda. *Galathea Reports*, 13: 1-126.
- HARME LIN, J.-G., BOUCHON, C., DUVAL, C. & HONG, J.-S. 1980. Les Echinodermes des substrats durs de l'île de Port-Cros, parc national (Méditerranée Nord-Occidentale). Elements pour un inventaire quantitatif. *Trav. sci. Parc nation. Port-Cros*, 6: 25-38.
- HAUKSSON, E. 1979. Feeding biology of *Stichopus tremulus*, a deposit-feeding holothurian. *Sarsia*, 64 (3): 155-160.
- HAYAT, M. A. 1981. *Fixation for Electron Microscopy*. Academic Press, New York.
- HÉROUARD, E. 1929. Holothurines de la côte atlantique du Maroc et de Mauritanie. *Bull. Soc. Sciences Naturelles Maroc*, IX (1-6): 36-70.
- HOLLAND, N. D. 1981. Electron microscopic study of development in a sea cucumber, *Stichopus tremulus* (Holothuroidea), from unfertilized egg through hatched blastula. *Acta Zoologica*, 62 (2): 89-111.
- HOLME, N. A. 1984. Photography and television. *In*: HOLME, N. A. & McINTYRE, A. D. (Eds.), 1984: 66-98.
- HOLME, N. A. & McINTYRE, A. D. (Eds.), 1984. *Methods for the study of marine benthos*. Blackwell, Oxford.
- IMAOKA, T. 1977. A brief observation of ossicles in a sea cucumber. *Ilyodaemon ijimai* Mitsukuri. *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, XXIII (6): 387-391.
- JANGOUX, M. (Ed.). 1980. *Echinoderms: Present and Past*. Balkema, Rotterdam.
- JANGOUX, M. & LAWRENCE, J. M. (Eds.). 1982. *Echinoderm nutrition*. Balkema, Rotterdam.
- JOHANNESSEN, J. V. (Ed.), 1978. *Electron Microscopy in Human Medicine. I. Instrumentation and techniques*. McGraw-Hill, London.
- JOHNSON, D. B., RUSHE, B., GLYNN, B., CANNING, M. & SMITH, T. 1980. Hydrolases in the digestive tracts of some Echinoderms. *In*: JANGOUX, M. (Ed.). 1980: 313-317.
- JOHNSON, D. B., O'DONOGHUE, G. V. & DONLON, J. C. 1984. Soluble and membrane bound peptide hydrolases of *Holothuria forskali* digestive tract. *5th International Echinoderm Conference*, Irlanda.
- KHRIPOUNOFF, A. & SIBUET, M. 1980. La nutrition d'échinodermes abyssaux. I. Alimentation des Holothuries. *Mar. Biol.*, 60: 17-26.
- KISHIMOTO, T. & KANATANI, H. 1980. Induction of oocyte maturation by disulfidereducing agent in the sea cucumber, *Stichopus japonicus*. *Develop., Growth and Differ.*, 22 (2): 163-167.
- KRISHNAN, S. 1968. Histochemical studies on reproductive and nutritional cycles of the holothurian. *Holothuria scabra*. *Mar. Biol.*, 2: 54-65.
- LAMIA, P., MORANA, P., RIGGIO, S. & ROMEO, A. 1982. Il contributo della fotografia subacquea nella documentazione scientifica dei popolamenti bentonici. Studio degli insediamenti biotici su massi di barriere frangiflutti. *Naturalista sicil.*, S. IV, VI (Suppl.) 1: 162-166.
- LAWRENCE, J. M. 1972. Carbohydrate and lipid levels in the intestine of *Holothuria atra* (Echinodermata, Holothuroidea). *Pacific Science*, XXVI (1): 114-116.
- LAWRENCE, J. M. 1980. Numbers and biomass of the common Holothuroidea on the Windward reef flat at Enewetak atoll, Marshall Islands. *In*: JANGOUX, M. (Ed.). 1980: 201-204.
- LAWRENCE, J. M. (Ed.), 1982. *Echinoderms: Proceedings of the International Conference, Tampa Bay*. Balkema, Rotterdam.
- LAWRENCE, J. M. & MURDOCH, J. 1977. The effect of particle size frequency distribution of the substratum on the burrowing ability of *Chiridota rigida* (Semper) (Echinodermata: Holothuroidea). *Mar. Behav. Physiol.*, 4: 305-311.
- LECHOWICZ, M. J. 1982. The sampling characteristics of electivity indices. *Oecologia*, 52: 22-30.
- LUNDALV, T. 1971. Quantitative studies on rocky-bottom biocoenoses by underwater photogrammetry. A methodological study. *Thalassia Jugoslavica*, 7 (1): 201-208.
- MARHUE, L. 1983. Techniques to restore dried-up invertebrate specimens. *Sylogus*, 44: 175-177.
- MARSHALL, T. J. & HOLMES, J. W. 1979. *Soil physics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- MASSIN, C. 1980a. Morphologie fonctionnelle du tube digestif d'*Holothuria tubulosa* Gmelin (Echinodermata, Holothuroidea). *In*: JANGOUX, M. (Ed.), 1980: 261-269.
- MASSIN, C. 1980b. The sediment ingested by *Holothuria tubulosa* Gmel (Holothuroidea: Echinodermata). *In*: JANGOUX, M. (Ed.), 1980: 205-208.
- MASSIN, C. 1982a. Food and feeding mechanisms: Holothuroidea. *In*: JANGOUX, M. & LAWRENCE, J. M. (Eds.), 1982: 53-55.
- MASSIN, C. 1982b. Effects of feeding on the environment: Holothuroidea. *In*: JANGOUX, M. & LAWRENCE, J. M. (Eds.), 1982: 493-497.
- MASSIN, C. & JANGOUX, M. 1976. Observations écologiques sur *Holothuria tubulosa*, *H. poli* et *H. forskali* (Echinodermata-Holothuroidea) et comportement alimentaire de *H. tubulosa*. *Cahiers Biologie Marine*, XVII: 45-59.

- McEuen, F. S. 1984. Reproductive Patterns among northeast Pacific Holothuroids. *5th International Echinoderm Conference*, Irlanda.
- McKENZIE, J. D. 1984. The tentacles of dendrochirote holothurians - an SEM study. *5th International Echinoderm Conference*, Irlanda.
- MILLER, J. E. 1984. Viviparity in a Psolid Holothurian from the tropical western Atlantic. *5th International Echinoderm Conference*, Irlanda.
- MILLER, J. E. & PAWSON, D. L. 1984. Holothurians (Echinodermata: Holothuroidea). *Memoirs of the Hourglass Cruises*, VII (1): 1-79.
- MOSHER, C. 1982. Spawning behavior of the aspidochirote holothurian *Holothuria mexicana* Ludwig. *In: LAWRENCE, J. M. (Ed.)*, 1982: 467-468.
- MUSCAT, A. M. 1982. The population biology and ecology of *Parastichopus parvimensis*, a deposit feeding holothurian. *In: LAWRENCE, J. M. (Ed.)*, 1982: 319.
- MUSCAT, A. M. 1984. An experimental evaluation of the effect of holothurian deposit feeding on infaunal communities. *5th International Echinoderm Conference*, Irlanda.
- NICHOLS, D. 1964. Echinoderms: experimental and ecological. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 2: 393-423.
- PANTIN, C. F. A. 1968. *Técnicas microscópicas para zoólogos*. Academia. León.
- PARKER, J. G. 1983. A comparison of methods used for the measurement of organic matter in marine sediment. *Chemistry in Ecology*, 1: 201-210.
- PAWSON, D. L. 1966. Ecology of holothurians. *In: BOOLOOTIAN, R. A. (Ed.)*, 1966: 63-71.
- PAWSON, D. L. 1982. Holothuroidea. *In: PARKER, S. P. (Ed.)*, *Synopsis and classification of living organisms*: 813-818. McGraw-Hill. New York.
- PAWSON, D. L. & FELL, H. B. 1965. A revised classification of the Dendrochirote Holothurians. *Breviora*, 214:1-7.
- PAWSON, D. L., MILLER, J. E. & HOSKIN, C. M. 1982. Distribution of *Holothuria lentiginosa enodis* Miller and Pawson in relation to a deep-water *Oculina* coral reef off Fort Pierce, Florida (Echinodermata: Holothuroidea). *In: LAWRENCE, J. M. (Ed.)*, 1982: 321.
- PFARSE, A. G. E. 1960. *Histoquímica teórica y aplicada*. Aguilar. Madrid.
- PÉREZ RUZAFÁ, A. 1984. *Estudio sistemático, ecológico y biogeográfico de la Clase Holothuroidea (Echinodermata) en las islas Canarias*. Tesis de Licenciatura, Universidad de La Laguna.
- REESE, E. S. 1966. The complex behaviour of Echinoderms. *In: BOOLOOTIAN, R. A. (Ed.)*, 1966: 157-218.
- REYNOLDS, E. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17: 208-212.
- RIVIERE, A. 1977. *Méthodes granulométriques. Techniques et interprétations*. Masson. Paris.
- ROBERTS, D. & BRYCE, C. 1982. Further observations on tentacular feeding mechanisms in holothurians. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 59: 151-163.
- ROS, J.-D. 1975. Opisthobranchios (Gastropoda: Euthyneura) del litoral ibérico. *Inv. Pesq.*, 39 (2): 269-372.
- ROS, J.-D., CAMP, J., OLIVELLA, I. & ZABALA, M. 1976. Comunidades bentónicas de sustrato duro del litoral NE español. I. Introducción; antecedentes; material y métodos. *Inmersión y Ciencia*, 10-11: 13-45.
- ROWE, F. W. E. 1969. A review of the family Holothuriidae (Holothuroidea: Aspidochirotida). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Zool.*, 18 (4): 119-170.
- RUSSELL, H. D. 1963. *Notes on methods for the narcotization, killing, fixation and preservation of marine organisms*. Systematics-Ecology Program. Marine Biol. Lab. Woods Hole.
- SCHLIEPER, C. 1972. *Research methods in marine biology*. Eden Fisher. London.
- SIBUET, M. & LAWRENCE, J. M. 1981. Organic content and biomass of abyssal holothuroids (Echinodermata) from the Bay of Biscay. *Mar. Biol.*, 65: 143-147.
- SIBUET, M., KHRIPOUNOFF, A., DEMING, J., COLWELL, R. & DINET, A. 1982. Modification of the gut contents in the digestive tract of abyssal holothurians. *In: LAWRENCE, J. M. (Ed.)*, 1982: 421-428.
- SILVER, H. 1984. Histology of the anterior autotomy planes in the viscera of *Holothuria scabra* (Holothuroidea: Aspidochirotida). *5th International Echinoderm Conference*, Irlanda.
- SLOAN, N. A. 1979. Microhabitat and resource utilization in cryptic rocky intertidal echinoderms at Aldabra Atoll, Seychelles. *Mar. Biol.*, 54: 269-279.
- SLOAN, N. A. & BODUNGEN, B. 1980. Distribution and feeding of the sea cucumber *Isostichopus badionotus* in relation to shelter and sediment criteria of the Bermuda platform. *Marine Ecology, Progress Series*, 2: 257-264.
- SMITH, C. R. & HAMILTON, S. 1983. Epibenthic megafauna of a bathyal basin off southern California: patterns of abundance, biomass, and dispersion. *Deep-sea Research*, 30 (9A): 907-928.
- SMITH, T. 1983. Tentacular ultrastructure and feeding behaviour of *Neopentadactyla mixta* (Holothuroidea: Dendrochirota). *J. Mar. Biol. Ass. UK*, 63: 301-311.
- SMITH, T. & KEEGAN, B. F. 1984. Seasonal torpor in *Neopentadactyla mixta* (Oestergren) (Echinodermata: Holothuroidea). *5th International Echinoderm Conference*, Irlanda.
- SOIL CONSERVATION SERVICE 1973. *Investigación de suelos. Métodos de laboratorio y procedimientos para recoger muestras*. Trillas. México.
- SUZUKI, Y., NAKAHARA, M., NAKAMURA, R. & UEDA, T. 1982. Uptake and excretion of cobalt by sea cucumber *Stichopus japonicus* and prawn *Penaeus japonicus*. *Bulletin Japanese Society Scientific Fisheries*, 48 (10): 1495-1500.
- THEODORIDES, J. 1980. Considerations of the medical use of marine invertebrates. *In: SEARS, M. & MERRIMAN, D. (Eds.)*, *Oceanography. The past: 734-749*. Springer. Berlin.
- TORTONESE, E. 1965. *Echinodermata*. Calderini. Bologna.
- TYLER, P. A. & GAGE, J. D. 1983. The reproductive biology of *Ypsilothuria talismani* (Holothuroidea: Dendrochirota) from the N.E. Atlantic. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 63: 609-616.
- TYLER, P. A., GAGE, J. D. & BILLET, D. S. M. 1984. Gametogenic strategies in deep-sea echinoids and

- holothuroids from the NE Atlantic. 5th *International Echinoderm Conference*. Irlanda.
- VELIMIROV, B. 1984. Niche repartition in co-existing sea cucumber species in the kelp bed community. 5th *International Echinoderm Conference*. Irlanda.
- YINGST, J. Y. 1976. The utilization of organic matter in shallow marine sediments by an epibenthic deposit-feeding holothurian. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **23**: 55-69.
- YINGST, J. Y. 1982. Factors influencing rates of sediment ingestion by *Purastichopus parvimensis* (Clark), an epibenthic deposit-feeding holothurian. *Estuarine, Coastal Shelf Science*, **14**: 119-134.
- YOUNG, C. M. & CHIA, F.-S. 1982. Factors controlling spatial distribution of the sea cucumber *Psolus chitonoides*: settling and post-settling behavior. *Mar. Biol.*, **69**: 195-205.