

Nouvelles avancées sur la reproduction spontanée en captivité et les conditions d'élevage des holothuries de la Caraïbe *Stichopus* sp.

Vianys Agudelo^{1,*} et Adriana Rodríguez¹

Résumé

On sait peu de choses sur le comportement reproducteur en conditions contrôlées de laboratoire de l'holothurie *Stichopus* sp., une espèce vivant dans les eaux caribéennes de la Colombie. En 2012 et 2013, de juillet à octobre, plusieurs épisodes spontanés de ponte et d'émission de sperme se sont produits au laboratoire d'aquaculture de l'Université de Magdalena (Santa Marta, Colombie). Le nombre moyen d'œufs fécondés à atteindre la fin du stade auricularia fut de $48,4 \times 10^6$. Cette étude décrit les conditions de manipulation, la qualité de l'eau et les limites relatives à la reproduction et à l'élevage larvaire.

Mots clés : reproduction, phase lunaire, ovocyte, *Stichopus*.

Introduction

Les pays asiatiques se livrent à une production maîtrisée d'holothuries dans le cadre de programmes de reconstitution des stocks, de conservation et de fabrication de produits de santé naturels (Sicuro et Levine 2011). De leur côté, les pays d'Amérique du Sud commencent à mener des études sur l'élevage d'espèces d'importance commerciale (Guzman et al. 2003 ; Guisado et al. 2012 ; Rodríguez et al. 2013 ; Zacarías-Soto et al. 2013). En Colombie, très peu d'informations sont disponibles sur les espèces d'holothuries, leur biologie, leur taxonomie, la dynamique de leurs populations, la gestion des pêches et leur élevage (Caycedo 1978 ; Borrero-Pérez et al. 2004 ; Rodríguez et al. 2013).

On a constaté que la reproduction naturelle des holothuries était possible en conditions contrôlées. À cet égard, plusieurs auteurs présentent des résultats probants (Sicuro et Levine 2011 ; Soliman et al. 2013 ; Zacarías-Soto et al. 2013), tandis que d'autres ont obtenu des œufs par des moyens artificiels, tels que les hormones, les substances chimiques, la stimulation thermique, la fécondation in vitro, la photopériode ou l'apport contrôlé de nourriture (Ong Che and Gomez 1985 ; Hamel et al. 1993 ; Conand and Byrne 1993 ; Morgan 2000 ; Ramofafia et al. 2000 ; Fajardo-León et al. 2008 ; Eeckhaut et al. 2012). C'est la raison pour laquelle on considère que l'environnement et les substances chimiques sont des facteurs déterminants pour la reproduction contrôlée de ces organismes marins. Par ailleurs, plusieurs auteurs ont démontré l'influence des phases lunaires lorsque les variables environnementales n'induisaient pas de réaction chez des organismes placés dans des environnements contrôlés (Mercier et al.

2000 ; Hamel et al. 2001 ; Battaglione et al. 2002 ; Asha and Muthiah 2008 ; Hu et al. 2013).

Malgré les nombreux documents existants, très peu d'informations sont disponibles sur le comportement reproducteur et les techniques d'induction de la ponte chez les holothuries de la Caraïbe. Cette étude décrit brièvement la reproduction et le développement larvaire de *Stichopus* sp., une espèce peuplant les eaux caribéennes de la Colombie, et relève les problèmes rencontrés lors de son élevage.

Matériel et méthodes

Collecte des animaux

Pendant la saison de reproduction (de juillet à octobre) de 2012 et 2013, deux cents *Stichopus* sp. ont été achetées à des petits pêcheurs de la baie de Rodadero à Santa Marta, en Colombie (11°13'22,73" N-74°13'32,59" O). Les holothuries ont été rapidement transportées au laboratoire d'aquaculture de l'Université du Magdalena, dans des bacs en plastique de 20 litres remplis d'eau de mer. Elles ont été pesées avec une balance analytique Ohaus (0,001 g) et leur longueur totale a été mesurée à l'aide d'un ichtyomètre standard (en mm). Ensuite, les holothuries ont eu la possibilité de s'adapter progressivement aux conditions d'une cuve de 550 litres remplie d'eau de mer ambiante (température de 26 °C, pH de 7,8), conservée au laboratoire d'aquaculture.

Gestion du stock de géniteurs

Après cette période d'acclimatation en laboratoire, les animaux ont été séparés de manière aléatoire et placés à

¹ Aquaculture Laboratory, Group of Research and Development Technology in Aquaculture, Fisheries Engineering Program, Universidad del Magdalena, Cra 32 No. 22-08, Santa Marta, Colombie

* Auteur à contacter : vianysam@gmail.com

une densité de 0,1 ind. l⁻¹ dans six bacs circulaires en plastique de 550 litres, répartis dans un système de recirculation. Les bacs ont été remplis d'eau de mer stérilisée, équipés d'un filtre biologique et aérés à l'aide de diffuseurs d'air. La température de l'eau a été maintenue à 26,68 °C (ÉT de ± 0,79). Les holothuries ont été exposées à une photopériode de 12 heures de lumière pour 12 heures d'obscurité grâce à des plafonniers fluorescents. Les fèces ont été siphonnées chaque jour et la salinité de l'eau ajustée si nécessaire (figure 1).



Figure 1. Géniteurs de *Stichopus* sp.

Gestion des œufs et des larves

Les géniteurs ont été contrôlés en permanence afin d'observer leur comportement reproducteur, tel qu'une élévation de l'extrémité antérieure, un gonopore proéminent ou une érection du tégument.

Une fois la présence de gamètes observée dans les bacs d'élevage, ceux-ci ont été enlevés par siphonnage et on a remplacé 80 % de l'eau des bacs. Les œufs fécondés ont été lavés avec de l'eau de mer filtrée, stérilisés, puis sélectionnés à l'aide d'un maillage de 60 microns. Pour estimer le nombre total d'œufs, des échantillons ont été prélevés à l'aide d'une aliquote de 1 ml. Ensuite, ils ont été placés en incubation dans un aquarium de 50 litres, légèrement aéré à température ambiante (26 °C). Pendant les deux premiers jours de développement embryonnaire, on a prélevé des échantillons toutes les 30 minutes afin d'observer les transformations morphologiques au microscope optique (Carl Zeiss, Modelo Primo Star) et on a pris des photos avec une caméra vidéo et un appareil photo numérique (AxioCam ERC 5S).

Nourrissage

Stock de géniteurs

À partir du troisième jour suivant leur arrivée au laboratoire, les géniteurs ont été alimentés comme suit : en 2012, ils ont reçu une poudre de microalgues (5 g 100 l⁻¹

de *Spirulina*, Artemia-International®), tandis qu'en 2013, ils ont été nourris avec un mélange de sédiments marins (lavés et séchés au préalable) et de poudre de *Spirulina* à raison de 0,5 g par 100 g de sédiments.

Larves

Deux protocoles d'alimentation ont été testés. Pendant la période de ponte de 2012, les larves ont été nourries avec de la poudre d'algues, *Spirulina* (Artemia-International®), tandis qu'en 2013, on a utilisé des algues vivantes (*Chlorella* sp.) à une concentration de 5 000 cellules ml⁻¹.

Suivi des conditions d'élevage

En 2012, les paramètres de qualité de l'eau ont été contrôlés chaque jour avec un multiparamètre HandyLab : température de 25,14 °C ± 2,02, pH de 6,96 ± 0,13, salinité de 36,4 g l⁻¹ ± 0,27 et concentration en oxygène dissous de 6,40 mg l⁻¹ ± 0,16. En 2013, ces paramètres ont été modifiés afin d'améliorer la survie des larves : température de 28,51 °C ± 0,17, pH de 8,18 ± 0,07, salinité de 36,96 g l⁻¹ ± 0,42 et concentration en oxygène dissous de 5,56 mg l⁻¹ ± 0,28. La photopériode se composait de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. L'aération était assurée par des ventilateurs (Hitachi Iced Série G).

Pendant l'incubation, un siphonnage de l'aquarium a été effectué chaque jour afin d'éviter l'apparition de parasites.

On a également remplacé 30 % de l'eau de mer tous les jours jusqu'au stade blastula, puis 20 % après le début du stade auricularia.

Résultats et discussion

Ponte des holothuries

De juillet à octobre 2012 et d'août à octobre 2013, on a observé seize pontes et émissions de gamètes spontanées. Les épisodes de reproduction se sont présentés dans les deux semaines qui ont suivi l'arrivée des holothuries au laboratoire, pendant la nuit et à l'aube. Les individus ont présenté un comportement normal. Les holothuries ont parcouru les parois des bacs avec un pore génital proéminent et visible (figure 2). Certains auteurs ont identifié le comportement animal et l'état du pore génital comme étant des indicateurs de reproduction de certaines espèces telles que *Holothuria scabra*, *Actinopyga mauritiana* et *Stichopus* sp. (Ramofafia et al. 2003 ; Hu et al. 2010). Comme les femelles et les mâles ont été placés dans le même bac, la fécondation s'est produite librement et la quantification *a posteriori* a permis de chiffrer la production moyenne totale à 48,4 x 10⁶ ovocytes fécondés.

Dans cette étude, il semble que la nouvelle lune ait exercé une influence considérable sur la reproduction des holothuries. Le pic de reproduction se situe en septembre 2012, pendant la phase de nouvelle lune (tableau 1). Durant

cette période, une ponte naturelle a été observée pendant trois jours consécutifs (figure 3). Ces épisodes ont permis d'enregistrer le plus grand nombre d'ovocytes fécondés par mois ($17,1 \times 10^6$). Le comportement reproducteur de cette espèce est similaire à celui qui a été signalé pour *Isostichopus badionotus* et qui se caractérise par des pics de reproduction entre juillet et novembre, d'après plusieurs auteurs (Guzman et al. 2003 ; Foglietta et al. 2004 ; Zaccarias-Soto et al. 2013).



Figure 2. Adulte mature présentant un pore génital proéminent (flèche).

Dans le cadre d'autres études, on a constaté que le cycle lunaire jouait un rôle majeur dans la reproduction de certaines espèces, telles que *Stichopus* sp., *H. scabra*, *I. fuscus* et *I. badionotus*, ce qui a permis de prévoir les épisodes de reproduction en fonction de ce cycle (Babcock et al. 1992 ; Mercier et al. 2000). Par conséquent, cette influence est probablement liée aux rythmes endogènes de chaque espèce. La ponte de *Stichopus* sp. se produit entre la première et la deuxième nuit suivant la nouvelle lune entre mai et août, que ce soit en captivité ou en milieu naturel. Cette caractéristique a également été référencée pour les espèces *A. japonicus*, *H. scabra*, *I. fuscus*, *Polycheira rufescens*, *Pearsonothuria graeffei*, *S. herrmanni* (Kubota et Tomari 1998 ; Morgan 2000 ; Hamel et al. 2002, 2003 ; Mercier et al. 2007 ; Hu et al. 2013 ; Soliman et al. 2013), et en milieu naturel, pour *B. argus*, *Euapta godeffroyi*, *S. chloronotus* et *H. tubulosa* (Babcock et al. 1992 ; Andrade et al. 2008). Bien que l'épisode de ponte présenté dans cette étude soit lié à la phase lunaire, il est indispensable d'évaluer une période plus longue pour vérifier s'il s'agit d'une caractéristique de reproduction de l'espèce, étant donné que les phases lunaires ont été associées à la reproduction et que leur influence peut varier en fonction des espèces.

Larviculture

Le développement embryonnaire de *Stichopus* sp. est représenté dans la figure 4 et le tableau 2. En 2012, une fois que les larves ont atteint le stade initial d'auricularia, elles n'ont pas poursuivi leur métamorphose et une mortalité de 100 % a été constatée après un mois. Par ailleurs, durant cette période, les larves n'ont pas changé de stade. En 2013, dix jours après la fécondation, les larves se sont bien développées jusqu'au stade final d'auricularia (figure 4), mais une infestation par les copépodes et les protozoaires a provoqué une mortalité de 100 %. Par conséquent, pendant l'élevage larvaire, on a enregistré

Tableau 1. Production d'œufs fécondés de *Stichopus* sp. en conditions de laboratoire.

Phase lunaire	Date de ponte	Œufs fécondés $\times 10^6$	
Le dernier quartier	juill.-10-2012	1,2	
	août-20-2012	4,0	
Nouvelle lune	sept.-17-2012	12,3	
	sept.-18-2012	2,1	
	sept.-20-2012	3,3	
Lune décroissante	oct.-10-2012	5,3	
	août-6-2013	2,4	
	août-7-2013	1,5	
	août-8-2013	1,7	
	août-9-2013	1,8	
	Nouvelle lune	sept.-5-2013	2,1
		sept.-6-2013	1,8
		sept.-7-2013	3,2
		oct.-5-2013	3,0
		oct.-6-2013	1,2
	oct.-7-2013	1,5	



Figure 3. Ponte femelle de *Stichopus* sp.

une mortalité élevée probablement liée à la gestion de la qualité de l'eau. La présence de parasites protozoaires pendant l'élevage de larves d'holothuries est un problème courant qui a été décrit par plusieurs auteurs (Purcell et Eeckhaut 2005 ; Raison 2008 ; Hu et al. 2010, 2013). Becker et al. (2009) ont signalé que ces micro-organismes apparaissent après la période d'éclosion et qu'une fois que les larves commencent à s'alimenter, ils se nourrissent des contenus et tissus intestinaux, ce qui provoque un rétrécissement et une rupture de la paroi intestinale tuant les

larves dans un délai d'un à trois jours. Les deux actions préventives dans l'élevage de *I. fuscus* consistent à diminuer la température de l'eau et à augmenter l'aération. Cependant, les températures plus froides et l'agitation plus forte produisent un effet néfaste se traduisant par un retard ou une interruption du développement larvaire (Becker et al. 2009 ; Mercier et al. 2012). Par ailleurs, au Japon et en Inde, des traitements chimiques sont appliqués pour éliminer les copépodes dans les éclosiers (James 1994 ; Ito 1995 ; Yanagisawa 1998 ; Ito et Kitamura 1997).



Figure 4. Développement embryonnaire et larvaire de *Stichopus* sp. Phases embryonnaires : A) Œuf fécondé ; B) Blastula ; C) Gastrula. Phases larvaires planctoniques ; D) Stade initial d'auricularia ; E) Stade intermédiaire d'auricularia ; F) Stade final d'auricularia (échelle graphique de 20 μ m).

Tableau 2. Caractérisation du développement embryonnaire de *Stichopus* sp.

Phase	Caractéristiques	Taille (µm)	Moment
Œuf fécondé	Sphérique.	138,02–175,05	0
Blastula	Sphérique. Recouvert par des cils qui le maintiennent dans un mouvement de rotation permanent autour de son axe.	262,72–302,79	4–5 (h)
Gastrula	Invagination du pôle végétal. Apparition des rudiments du tube digestif.	287,40–356,30	8–10 (h)
Stade initial d'auricularia	Allongement de la larve. Présence de cils buccaux, de l'intestin et du cloaque.	425,30–476,50	30–40 (h)
Stade intermédiaire d'auricularia	Larve plus grande, avec les côtés des replis plus grands et un tube digestif mieux différencié et développé.	609,28–788,83	50–60 (h)
Stade final d'auricularia	Accumulation de nodules hyalins, développement et axo-hydrocoelome.	787,59–1 087,66	21–23 (j)

Comme l'indiquent Bataglione et Bell (2004), on utilise du Trichlorfon ou du Dipterex pour maîtriser les infestations par les copépodes. Dans cette étude, la stérilisation et le filtrage de l'eau de mer n'ont pas suffi pour éliminer ce problème. Par conséquent, il faudra effectuer des tests en utilisant plusieurs doses de Trichlorfon/Dipterex afin de déterminer la concentration optimale nécessaire pour lutter contre les infestations de copépodes.

Plusieurs auteurs ont constaté que le développement larvaire est directement lié à la gestion de la qualité de l'eau, comme la température, le pH ou la salinité. Par ailleurs, la quantité et la qualité de l'apport de nourriture sont des facteurs déterminants pour le développement des holothuries d'écloserie. Comme l'ont signalé James (1994), Ramofafia et al. (1995) et Battaglione (1999), qui ont étudié certaines holothuries (respectivement *H. scabra*, *A. echinites* et *H. atra*), la température optimale de l'eau pour les larves d'holothuries tropicales se situe entre 27 et 30 °C, valeurs qui ont été respectées dans cette étude. D'après des auteurs tels que Hamel et Mercier (1996) ou Asha et Muthiah (2005), un pH de 7,8 à 8,0 permet d'obtenir une croissance larvaire optimale de *C. frondosa* et *H. spinifera*. Dans la partie de notre étude portant sur 2012, ce facteur est resté inférieur à la valeur optimale suggérée par d'autres auteurs. Dans le cadre de cette étude, il n'a pas été possible de déterminer s'il a directement influencé le développement et la survie des larves, bien qu'en 2013, le pH soit resté constant (8,18) et les conditions d'élevage aient été améliorées. En outre, la salinité est également un facteur déterminant pour le développement larvaire des holothuries, puisque les larves ne supportent pas des valeurs inférieures à 32 g l⁻¹. En effet, celles-ci peuvent provoquer des malformations et une mortalité élevée, comme pour les espèces *H. spinifera*, *A. echinites* et *A. japonicus* (Chen et Chian 1990 ; Asha et Muthiah 2003 ; Kashenko 2003). Dans cette étude, la salinité n'a eu aucun effet sur les larves ; ce paramètre est resté constant et optimal pour les deux périodes d'éclosion (2012 et 2013).

Au cours de l'étude, le développement larvaire a été influencé par la température et l'apport de nourriture : pendant la première ponte obtenue entre juillet et septembre 2012, le développement larvaire s'est interrompu au stade initial d'auricularia et la taille des larves était inférieure à celle atteinte par les larves en 2013 (août–octobre). Durant cette année, l'alimentation constituée de

microalgues vivantes (*Chlorella* sp.) et la température plus élevée (28 °C) ont permis d'améliorer les conditions d'élevage larvaire et de faire progresser le développement des larves jusqu'au stade final d'auricularia. Les tailles des larves sont reproduites dans la figure 5.

Becker et al. (2009) ont constaté que les larves en pleine croissance doivent être nourries avec une quantité importante de microalgues vivantes de qualité, surtout pendant le stade auricularia. Si cette condition n'est pas remplie, la croissance et la métamorphose des larves sont considérablement retardées, comme ce fut le cas durant la première année de notre étude. Certains auteurs ont suggéré une alimentation constituée de certaines algues du genre *Spirulina* durant les stades larvaires initiaux (Agudo 2006 ; Zacarias-Soto et al. 2013). Cependant, elles ne peuvent être utilisées que pendant le stade pentactula ou juvénile, étant donné qu'il s'agit d'algues benthiques (la *Spirulina* ajoutée se dépose au fond du bac). Par conséquent, en 2013, on a cultivé l'algue *Chlorella* sp. pour alimenter les larves au stade auricularia. Comme l'ont indiqué Xilin (2004), Asha (2004) et Asha et Muthiah (2006), cette algue mélangée à d'autres (comme *Dunaliella euclaiia*, *Chaetoceros gracilis*, *C. muelleri*, *Isochrysis galbana*, *Nanochloropsis salina*, *Dicrateria zhanjiangensis*, *Pavlova lutheri* et *Tetraselmis chuii*) joue un rôle déterminant à ce stade de développement.

En 2013, la couleur verte des viscères (figure 6) nous a permis d'établir que les larves ingéraient de la nourriture. Au dixième jour d'élevage, ces larves avaient atteint une taille maximum de 888,71 µm ± 106,71, quand leur développement a été interrompu par une nouvelle infestation par les copépodes, qui a bloqué le cycle larvaire et la métamorphose des larves.

Conclusion

La reproduction de *Stichopus* sp. est possible en conditions de laboratoire puisque cette espèce se manipule facilement et s'adapte à la captivité. De plus, la ponte est permanente entre juillet et novembre. Nos conclusions serviront de point de départ à leur reproduction en conditions de laboratoire et, par conséquent, favoriseront la réalisation d'autres études portant sur le nourrissage des larves afin d'optimiser la production et la survie des holothuries d'une part, et de répondre aux besoins des larves pour leur croissance et leur métamorphose d'autre part.

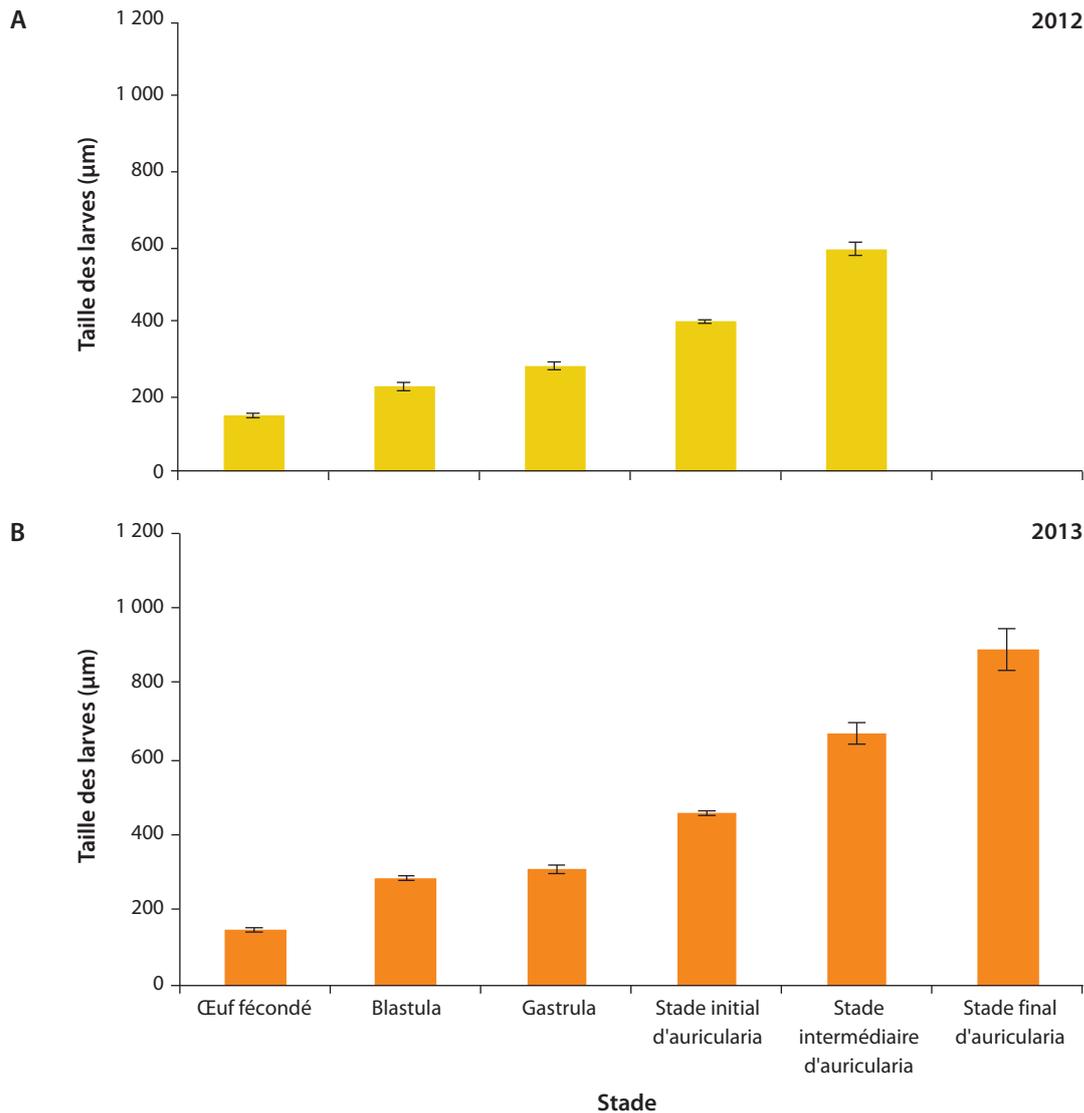


Figure 5. Taille des larves à chacune des périodes de reproduction en conditions d'élevage :

A) 2012 : Température de 26 °C et alimentation constituée de poudre de *Spirulina* ;

B) 2013 : Température de 28 °C et alimentation constituée de *Chlorella* sp. à une densité de 5 000 cellules ml⁻¹.



Figure 6. Larve au stade final d'auricularia nourrie avec des microalgues (*Chlorella* sp.). Coloration verte des viscères. Échelle graphique de 20 µm.

Remerciements

Ces travaux ont bénéficié d'une bourse de Colciencias (No 1117-521-28356) et du Vicerrectoría de Investigación (Universidad de Magdalena). Les auteurs tiennent à remercier les pêcheurs d'holothuries Eng. Yahir Mendoza Vane-gas et Jorge Polo Ramírez qui a participé à la collecte des spécimens.

Bibliographie

- Agudo N. 2006. Sandfish hatchery techniques. Australian Centre for International Agricultural Research, Secretariat of the Pacific Community and the World Fish Center, Noumea. 44 p.
- Andrade Á.A., Machado L.F., Barreiros J.P., Paulay G. et Cardigos F. 2008. Observation *in situ* de la reproduction sexuée de *Holothuria tubulosa* Gmelin, 1788 (Echinodermata : Holothuroidea) dans les Açores (Atlantique nord-est). La Bêche-de-mer, Bulletin d'information de la CPS 27:43-45.

- Asha P.S. 2004. Effect of feed concentrations on larval growth, survival and development of *Holothuria (Theelothuria) spinifera* Theel. Journal of the Marine Biological Association of India 46(1):80–86.
- Asha P.S. et Muthiah P. 2003. Ponte et élevage de larves de l'holothurie *Holothuria (Theelothuria) spinifera* Theel. La Bêche-de-mer, Bulletin d'information de la CPS 16:11–15.
- Asha P.S. and Muthiah P. 2005. Effects of temperature, salinity and pH on larval growth, survival and development of the sea cucumber *Holothuria spinifera* Theel. Aquaculture 250:823–829.
- Asha P.S. and Muthiah P. 2006. Effects of single and combined microalgae on larval growth, development and survival of the commercial sea cucumber *Holothuria spinifera* Theel. Aquaculture Research 37(2):113–118.
- Asha P.S. and Muthiah P. 2008. Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Holothuria spinifera* (Echinodermata: Holothuroidea) from Tuticorin, Tamil Nadu, India. Aquaculture International 16:231–242.
- Babcock R., Mundy C., Kessing J. and Oliver J. 1992. Predictable and unpredictable spawning events: *In situ* behavioural data from free-spawning coral reef invertebrates. Invertebrates Reproduction and Development 22:210–228.
- Battaglione S.C. 1999. Culture of the tropical sea cucumbers for the purpose of stock restoration and enhancement. Naga, the ICLARM Quarterly 22(4):4–11.
- Battaglione S.C. and Bell J.D. 2004. The restocking of sea cucumbers in the Pacific Islands. p. 109–132. In: Bartley D.M. and Leber K.M. (eds). Marine Ranching. FAO Fishery Technical Paper No. 429. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 213 p.
- Battaglione S.C., Seymour E.J., Ramofafia C. and Lane I. 2002. Spawning induction of three tropical sea cucumbers *Holothuria scabra*, *Holothuria fuscogilva* and *Actinopyga mauritiana*. Aquaculture 207:29–47.
- Becker P., Eeckhaut I., Ycaza R.H., Mercier A. and Hamel J.-F. 2009. Protozoan disease in larval culture of the edible sea cucumber *Isostichopus fuscus*. p. 571–573. In: Harris L.G., Bottger S.A., Walker C.W. and Lesser M.P. (eds). Echinoderms. London, United Kingdom: CRC Press.
- Borrero-Pérez G., Benavides-Serrato M., Solano O. and Navas R. 2004. Holothuroideos (Echinodermata: Holothuroidea) recolectados en el talud continental superior del Caribe Colombiano. Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente 42(1,2):68–85.
- Caycedo I.E. 1978. Holothuroidea (Echinodermata) de aguas someras en la Costa Norte de Colombia. Anales del Instituto de Investigaciones Marinas de Punta Betín 10:149–198.
- Chen C.P. and Chian C.S. 1990. Short note on the larval development of the sea cucumber *Actinopyga echinites* (Echinodermata: Holothuroidea). Bulletin of the Institute of Zoology Academia Sinica 29:127–133.
- Conand C. and Byrne M. 1993. A review of recent developments in the world sea cucumber fisheries. Marine Fisheries Review 55(4):1–13.
- Eeckhaut I., Lavitra T., Léonet A., Jangoux M. and Rasolofonirina R. 2012. *In vitro* fertilisation: A simple, efficient method for obtaining sea cucumber larvae year round. Asia-Pacific tropical sea cucumber aquaculture 136:40–49.
- Fajardo-León M.C., Suárez-Higuera M.C.L., Del Valle-Manríquez A. and Hernández-López A. 2008. Biología reproductiva del pepino de mar *Parastichopus parvimensis* (Echinodermata: Holothuroidea) de Isla Natividad y Bahía Tortugas, Baja California Sur, México. Ciencias Marinas 34(002):165–177.
- Foglietta L.M., Camejo M.I., Gallardo L. and Herrera F.C. 2004. A maturity index for holothurians exhibiting asynchronous development of gonad tubules. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 303:19–30.
- Guisado C., Carrasco S.A., Díaz-Guisado D., Maltrain R. and Rojas H. 2012. Embryonic development, larval morphology and juvenile growth of the sea cucumber *Athyonidium chilensis* (Holothuroidea: Dendrochirotida). Revista de Biología Marina y Oceanografía 47(1):65–73.
- Guzmán H., Guevara C. and Hernández I. 2003. Reproductive cycle of two commercial species of sea cucumber (Echinodermata: Holothuroidea) from Caribbean Panama. Marine Biology 142(2):271–279.
- Hamel J.-F. and Mercier A. 1996. Early development, settlement, growth, and spatial distribution of the sea cucumber *Cucumaria frondosa* (Echinodermata: Holothuroidea). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 53(2):253–271.
- Hamel J.-F., Himmelman J.H. and Dufresne L. 1993. Gametogenesis and spawning of the sea cucumber *Psolus fabricii* (Duben and Koren). Biological Bulletin 184:125–143.
- Hamel J.-F., Conand C., Pawson D.L. and Mercier A. 2001. The sea cucumber *Holothuria scabra* (Holothuroidea: Echinodermata): Its biology and exploitation as beche-de-mer. Advances in Marine Biology 41:129–233.
- Hamel J.-F., Pawson D.L., Conand C. and Mercier A. 2002. The sea cucumber *Holothuria scabra* (Holothuroidea: Echinodermata): Its biology and its exploitation as beche-de-mer. Advances in Marine Biology 41:131–233.
- Hamel J.-F., Hidalgo R.Y. et Mercier A. 2003. Développement larvaire et croissance des juvéniles de l'holothurie des Galapagos, *Isostichopus fuscus*. La Bêche-de-mer, Bulletin d'information de la CPS 18:3–8.
- Hu C., Xu Y., Wen J., Zhang L., Fan S. and Su T. 2010. Larval development and juvenile growth of the sea cucumber *Stichopus* sp. (Curry fish). Aquaculture 300(1):73–79.
- Hu C., Li H., Xia J., Zhang L., Luo P., Fan S. and Wen J. 2013. Spawning, larval development and juvenile growth of the sea cucumber *Stichopus horrens*. Aquaculture 404:47–54.

- Ito S. 1995. Studies on the technical development of the mass production for sea cucumber juvenile, *Stichopus japonicus*. Hatchery Manual. Saga, Japan: Saga Prefectural Sea Farming Center. 87 p.
- Ito S. and Kitamura H. 1997. Induction of larval metamorphosis in the sea cucumber *Stichopus japonicus* by periphitic diatoms. *Hydrobiologia* 358:281–284.
- James D.B. 1994. Seed production in sea cucumbers. *Aquaculture International* 1(9):15–26.
- Kashenko S.D. 2003. Réactions des larves de concombre de mer *Apostichopus japonicus* à une forte baisse de salinité à la surface de l'eau : étude en laboratoire. *La Bêche-de-mer, Bulletin d'information de la CPS* 16:15–20.
- Kubota T. and Tomari M. 1998. Reproduction in the apodid sea cucumber *Polycheira rufescens*: Semilunar spawning rhythm and sex change. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 78(01):249–267.
- Mercier A., Battaglene S.C. and Hamel J.-F. 2000. Periodic movement, recruitment and size-related distribution of the sea cucumber *Holothuria scabra* in Solomon Islands. *Hydrobiologia* 440:81–100.
- Mercier A., Ycaza R.H. and Hamel J.-F. 2007. Long-term study of gamete release in a broadcast-spawning holothurian: Predictable lunar and dial periodicities. *Marine Ecology Progress Series* 329:179–189.
- Mercier A, Ycaza R.H., Espinoza R, Haro V.M.A and Hamel J.-F. 2012. Hatchery experience and useful lessons from *Isostichopus fuscus* in Ecuador and Mexico. *ACIARSPC Asia-Pacific tropical sea cucumber aquaculture symposium* 136:79–90.
- Morgan A.D. 2000. Induction of spawning in the sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea). *Journal of the World Aquaculture Society* 31:186–194.
- Ong Che R.G. and Gomez E.D. 1985. Reproductive periodicity of *Holothuria scabra* Jaeger at Calatagan, Batangas, Philippines. *Asian Marine Biology* 2:21–29.
- Purcell S.W. et Eeckhaut I. 2005. Un examen sanitaire externe des holothuries produites en éclosérie. *La Bêche-de-mer, Bulletin d'information de la CPS* 22:34–38.
- Raison C.M. 2008. Advances in sea cucumber aquaculture and prospects for commercial culture of *Holothuria scabra*. *CAB Reviews* 3(82):1–15.
- Ramofafia C., Gervis M. et Bell J. 1995. Reproduction et élevage de larves d'*Holothuria atra*. *La Bêche-de-mer, Bulletin d'information de la CPS* 7:2–6.
- Ramofafia C., Battaglene S.C., Bell J.D. and Byrne M. 2000. Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Holothuria fuscogilva* in the Solomon Islands. *Marine Biology* 136:1045–1056.
- Ramofafia C., Byrne M. and Battaglene C. 2003. Reproduction of the commercial sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Solomon Islands. *Marine Biology* 142(2):281–288.
- Rodríguez A., Vergara W. et Agudelo V. 2013. Premières observations sur les espèces et la pêche de holothuries de la Caraïbe colombienne. *La Bêche-de-mer, Bulletin d'information de la CPS* 33:9–13.
- Sicuro B. and Levine J. 2011. Sea cucumber in the Mediterranean: A potential species for aquaculture in the Mediterranean. *Reviews in Fisheries Science* 19(3):299–304.
- Soliman T., Yamazaki Y., Niiyama H. and Tsunoda K. 2013. Spontaneous captive breeding and larval development in the green and red variants of the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867). *Aquaculture Research* 44(5):738–746.
- Xilin S. 2004. L'aquaculture de l'*Apostichopus japonicus* en Chine : progrès réalisés et perspectives d'avenir. *La Bêche-de-mer, Bulletin d'information de la CPS* 19:17.
- Yanagisawa T. 1998. Aspects of the biology and culture of the sea cucumber. p. 292–308. In: De Silva S.S. (ed.). *Tropical Mariculture*. London, United Kingdom: Academic Press. 487 p.
- Zacarias-Soto M., Olvera-Novoa M.A., Pensamiento-Villarauz S. and Sánchez-Tapia I. 2013. Spawning and larval development of the four-sided sea cucumber, *Isostichopus badionotus* (Selenka, 1867), under controlled conditions. *Journal of the World Aquaculture Society* 44(5):694–705.