



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**  
**(BIOLOGÍA MARINA)**

“FILOGEOGRAFÍA DE *Holothuria (Halodeima) inornata* SEMPER, 1868  
(ECHINODERMATA: HOLOTHUROIDEA)”

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

**PRESENTA:**  
**ELBA PRIETO RIOS**

**TUTOR:**

**Dr. FRANCISCO ALONSO SOLÍS MARÍN**  
**INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA**

COMITÉ TUTOR:

Dr. ALBERTO ABREU GROBOIS

**UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN. UNAM**

Dr. ELÍAS PIEDRA IBARRA

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA. UNAM**

Dr. ALEJANDRO ZALDÍVAR RIVERÓN

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA. UNAM**

Dra. Ma. DINORAH HERRERO PÉREZRUL

**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

México, D. F. ABRIL 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología  
Universidad Nacional Autónoma de México



“FILOGEOGRAFÍA DE *Holothuria (Halodeima) inornata*  
SEMPER, 1868 (ECHINODERMATA: HOLOTHUROIDEA)”

# T E S I S

que para obtener el grado académico de:

**Maestra en Ciencias**

(Biología Marina)

Presenta:

**Bióloga Elba Prieto Rios**

Director de tesis: Dr. Francisco Alonso Solís Marín

Comité tutor: Dr. Alberto Abreu Grobois  
Dr. Elías Piedra Ibarra  
Dr. Alejandro Zaldívar Riverón  
Dra. Ma. Dinorah Herrero Pérezrul

México, D. F. 2014

## **Agradecimientos**

Cuando empecé esta tesis nadie dijo que sería una labor fácil, pero tampoco que recibiría tanta y tan preciada ayuda que no puedo dejar de agradecer.

En primer lugar, al doctor Francisco Alonso Solís Marín, por su confianza, y brindarme la oportunidad y facilidades para realizar mis estudios de posgrado en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología en la Universidad Nacional Autónoma de México. ¡Gracias Francisco!

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-CONACYT, por la beca (Número de registro 447486) que me permitió realizar mis estudios y hacer realidad esta investigación.

Al doctor Píndaro Díaz Jaimes, por su apoyo económico a esta investigación, sin el cual hubiera fracasado. ¡Mi personal reconocimiento al doctor Píndaro, por su oportuna y valiosa ayuda!

Un especial reconocimiento a la doctora Giomar Helena Borrero Pérez, por asesorarme en la investigación, darle estructura a la tesis, y en especial por enseñarme a hacer los análisis y usar los programas, por brindarme su tiempo aún sábados y domingos y con paciencia guiarme y enseñarme, haciéndome sentir la confianza y libertad para preguntar hasta lo más obvio.

Del mismo modo, agradecer al doctor Alfredo Laguarda, por sus consejos, por financiar (Proyecto No 204) parte de mis análisis. ¡Porque gracias a él, el laboratorio y la colección existen!

De manera especial, a mi familia, por su cariño, atenciones, consejos y sobre todo por estar a mi lado en momentos de flaqueza, y porque no agradecerles también el apoyo económico durante todos estos años fuera de Perú.

Del mismo modo, agradecer a las personas que contribuyeron con el material biológico utilizado en este trabajo, al doctor Francisco Benítez Villalobos de la UMAR de Oaxaca-México; a Heleni Eunice Cansino Guzmán de Chiapas-México; a Elizabeth Franco García; al doctor José Enrique Barraza del Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales de San Salvador; a la ingeniera Zedna Ibis Guerra

del Laboratorio de Moluscos Bivalvos, Estación de Maricultura del Pacífico, Dirección de Investigación y Desarrollo, a Fabián Valdés y al ingeniero Gustavo N. Collado de Panamá, al doctor José Manuel Mazón Suástegui del CIBNOR, México y a Yuri Hooker por las muestras de Perú. De la misma manera, al biólogo Tito Sancho M. de Costa Rica y a la doctora Dinorah Herrero de La Paz, B.C.S., México.

A la M. en C. Alicia Durán González, Técnico Académico del Laboratorio de Sistemática y Ecología de Equinodermos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM por sus consejos, y por su trabajo como técnico de laboratorio, ya que sin su labor sería complicado acceder a bibliografía.

A los miembros de mi comité, al Doctor Alberto Abreu Grobois, al Doctor Elías Piedra Ibarra, al Doctor Alejandro Zaldívar Riverón y a la Doctora Ma. Dinorah Herrero Pérezrul por sus sugerencias y recomendaciones.

A la doctora Gloria Vilaclara Coordinadora del posgrado, por su apoyo durante mi estancia y desarrollo de la tesis, así también al personal del posgrado: Diana, Lupita, Chantal y Gaby.

A Armando por ser mi amigo y por estar a mi lado en las buenas y en las malas, excepto una vez que regresando de Acapulco de una salida de campo suya, me dejo tirada en Taxqueña a las 10pm con 38 grados de fiebre, al menos me dio una pastilla jajajaa. Muchas gracias por tus consejos y sobre todo por tu amistad! Así mismo, quiero agradecerle a Ziania, por su amistad!

También a mis compañeros del laboratorio de equinodermos, a Andrea Caballero, por echarme una mano con lo de biogeografía, filogeografía y cualquier aspecto geográfico del que tuviera duda y sobre todo por su amistad, a Magali Honey por brindarme ayuda con los protocolos para los análisis del ADN y por asesorarme en la compra de material y reactivos, a Tania por los apuntes de algunas materias del posgrado y por ser siempre atenta, a Daniela, por los ánimos cuando enferme, a Elizabeth por su amistad y su apoyo en muchas ocasiones, a Pedro y su esposa Jazmín por brindarme su casa para el muestreo en Acapulco, y agradecer por su

compañerismo a Julio, Quetzalli, Lupita, Caro M, Mauricio, Caro J, Carlos C., Itzel C., Paola, Ángeles, Viridiana, Luís Miguel, Eduardo, Noé.

Quiero agradecerle a los chicos del laboratorio de Genética de Organismos Acuáticos, principalmente a Nataly Bolaño por su amistad y por su ayuda con los análisis en el laboratorio, también quiero agradecerle a Nadia Sandoval, por compartir sus conocimientos y ayudarme con mis inquietudes acerca de los protocolos del PCR, a Xochitl Sánchez por su amistad y por resolver mis dudas con los geles de agarosa, a Linda García porque siempre me hacía ver la claridad con algún cálculo, a Josué Barranco por ayudarme en el envío de las placas a EE.UU. y en general a todos los chicos del laboratorio: Silvia Hinojosa, Erika Magallon y Natalia Bayona.

Muchos fracasos de la vida han sido de hombres que no supieron darse cuenta,  
de lo cerca que estaban del éxito, cuando se rindieron

Thomas Alva Edison

# Contenido

Contenido .....	7
Capitulo 1 Introducción .....	1
1.1 Filogeografía .....	2
1.2 Genética de la conservación .....	4
1.3 Características de los marcadores genéticos utilizados en estudios filogeográficos .....	5
1.4 Genoma mitocondrial .....	5
1.4.1 Particularidades del genoma mitocondrial del género <i>Holothuria</i> .....	6
1.4.2 El gen Citocromo Oxidasa 1 .....	7
1.5 El objeto de estudio, <i>Holothuria (Halodeima) inornata</i> Semper, 1868.....	8
1.5.1 Generalidades de la familia Holothuriidae .....	8
1.5.2 El género <i>Holothuria</i> Linnaeus, 1767 .....	8
1.5.3 El subgénero <i>Halodeima</i> Pearson, 1914 .....	9
1.5.4 Caracteres morfológicos utilizados en la diagnosis de <i>H. inornata</i> .....	10
1.5.5 Estatus taxonómico.....	11
1.5.6 Distribución de <i>Holothuria inornata</i> .....	12
1.5.7 Ecología de <i>Holothuria inornata</i> .....	12
1.6 Importancia económica de los pepinos de mar .....	13
1.7 Antecedentes en el estudio y la conservación de los pepinos de mar .....	15
1.7.1 Antecedentes moleculares.....	16
1.8 Problemática, hipótesis y objetivos .....	21
1.8.1 Problemática .....	21
1.8.2 Hipótesis .....	21
1.8.3 Objetivos .....	22
Capitulo 2 Materiales y métodos.....	23
2.1 Área de estudio .....	24
2.1.1 Características geológicas del área de estudio.....	27
2.1.2 Oceanografía del Pacífico Oriental Tropical .....	27
2.2 Técnica de recolección y conservación del material .....	30
2.2.1 Técnica de muestreo .....	30
2.3 Material estudiado .....	30

2.3.1 Determinación taxonómica de los individuos .....	31
2.4 Estudio molecular.....	32
2.4.1 Extracción de ADN.....	32
2.4.2 Cuantificación de ADN y electroforesis.....	32
2.4.3 Purificación de ADN.....	34
2.4.4 Amplificación y secuenciación del ADN.....	34
2.4.5 Alineación de las secuencias.....	34
2.5 Análisis filogeográfico .....	35
2.5.1 Diversidad genética .....	35
2.5.2 Estructura genética.....	35
2.5.3 Redes de haplotipos .....	37
2.5.4 Demografía histórica.....	37
Capitulo 3 Resultados.....	40
3.1 Amplificación .....	41
3.2 Diversidad genética.....	42
3.3 Estructura genética .....	44
3.3.1 Estadístico $F_{st}$ de Wright y Test exacto de diferenciación poblacional..	44
3.3.2 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).....	45
3.3.3 Test de Mantel .....	46
3.4 Redes de haplotipos .....	48
3.5 Demografía histórica.....	51
3.4.1 Distribución de las diferencias por parejas ( <i>Mismatch distribution</i> ).....	51
Capitulo 4 Discusión y conclusiones.....	53
4.1 Discusión.....	54
4.2 Conclusiones.....	61
Bibliografía .....	62
Anexos .....	77

## Índice de Figuras

FIG. 1.1 FILOGRAMA HIPOTÉTICO DE UNA ESPECIE. ....	3
FIG. 1.2 MAPA DEL GENOMA MITOCONDRIAL DE <i>A. JAPONICUS</i> Y <i>S. HORRENS</i> . ....	7
FIG. 1.3 ANATOMÍA DE UN PEPINO DE MAR (TOMADO DE KERR 2000) .....	10
FIG. 1.4 FOTOGRAFÍA AL MICROSCÓPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DE ESPÍCULAS DE <i>H. INORNATA</i> .....	12
FIG. 1.5 EJEMPLAR DE <i>HOLOTHURIA INORNATA</i> .....	14
FIG. 2.1 REGIÓN DEL PACÍFICO ORIENTAL TROPICAL.....	25
FIG. 2.2 REGIÓN BIOGEOGRÁFICA DEL PACÍFICO ORIENTAL TROPICAL (HASTINGS, 2000). ....	26
FIG. 2.3 PROVINCIAS BIOGEOGRÁFICAS DEL PACÍFICO ORIENTAL (MODIFICADA DE LANDINI <i>ET AL.</i> 2002). 26	
FIG. 2.4 MAPA DE CORRIENTES DEL PACÍFICO ORIENTAL TROPICAL (MODIFICADO DE LANDINI <i>ET AL.</i> 2002). .....	29
FIG. 2.5 PRODUCTOS DE LA EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO (A). PRODUCTOS DE PCR (B).....	33
FIG. 2.6 CLASIFICACIÓN DE PROCESOS DEMOGRÁFICOS DE ACUERDO CON LOS ÍNDICES DE DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA Y NUCLEOTÍDICA SEGÚN GRANT Y BOWEN 1998 .....	38
FIG. 2.7 GRÁFICA DE DISTRIBUCIÓN POR MISMATCH.....	39
FIG. 3.1 MUESTRA DE LOS ELECTROFEROGRAMAS DEL FRAGMENTO COI AMPLIFICADOS.....	41
FIG. 3.2 GRÁFICA DE DISTANCIAS GEOGRÁFICAS VS. DISTANCIAS GENÉTICAS .....	46
FIG. 3.3 HISTOGRAMA OBTENIDO DE LA CORRELACIÓN ENTRE LOS VALORES DE $F_{ST}$ Y LAS DISTANCIAS GEOGRÁFICAS. ....	47
FIG. 3.4 RED DE HAPLOTIPOS. ....	48
FIG. 3.5 GRÁFICA DE <i>MISMATCH</i> PARA LAS POBLACIONES DE LA PROVINCIA MEXICANA .....	51
FIG. 3.6 GRÁFICA DE <i>MISMATCH</i> PARA LAS POBLACIONES DE LA PROVINCIA PANÁMICA.....	51
FIG. 4.1 MAPA UNIFICADO DEL SISTEMA DE CIRCULACION Y LAS PROVINCIAS BIOGEOGRÁFICAS DEL PACÍFICO ORIENTAL (MODIFICADO DE LANDINI <i>ET AL.</i> 2002). ....	57

## Índice de tablas

TABLA 2-1 NÚMERO DE MUESTRAS POR LOCALIDAD .....	31
TABLA 2-2 TABLA DE PUREZA DEL ADN .....	32
TABLA 2-3 TABLA DE AMOVA .....	36
TABLA 2-4 MODELO DE MATRIZ CON VALORES DE FST Y DISTANCIA GEOGRÁFICA .....	37
TABLA 3-1 ESTIMADORES DE DIVERSIDAD GENÉTICA PARA <i>HOLOTHURIA INORNATA</i> .....	42
TABLA 3-2 ESTIMADORES DE DIVERSIDAD GENÉTICA PARA CADA LOCALIDAD .....	42
TABLA 3-3 TABLA DE FST Y TEST EXACTO DE DIFERENCIACIÓN POBLACIONAL DE <i>H. INORNATA</i> CON BASE EN EL GEN CO1 .....	44
TABLA 3-4 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA MOLECULAR (AMOVA) PARA DIFERENTES AGRUPACIONES. SI: SINALOA, O: OAXACA, C: CHIAPAS, ES: EL SALVADOR, PA: PANAMÁ, PE: PERÚ. ....	45
TABLA 3-5 MATRIZ DE DISTANCIAS GEOGRÁFICAS EN KILÓMETROS.....	46
TABLA 3-6 TABLA DE HAPLOTIPOS (118) CON EL NÚMERO DE INDIVIDUOS (223) POR LOCALIDAD (11) .....	50
TABLA 3-7 PARÁMETROS DE EXPANSIÓN POBLACIONAL Y PRUEBAS DE NEUTRALIDAD CON BASE EN EL GEN CO1 PARA LAS PROVINCIAS MEXICANA Y PANÁMICA. ....	52
TABLA 4-1 NÚMERO DE HAPLOTIPOS RESPECTO AL NÚMERO DE INDIVIDUOS .....	60

## Resumen

En este estudio mostramos los resultados sobre la filogeografía de *H. inornata*, se recolectaron muestras tratando de abarcar todo el ámbito de distribución, desde México (Mazatlán) hasta el norte de Perú. Los resultados con base en secuencias del gen COI muestran alta diversidad de haplotipos ( $Hd=0.979$ ) y moderada diversidad nucleotídica ( $\pi=0.017$ ), característico en poblaciones grandes. Además, se detectaron 118 haplotipos en 223 individuos y las diferencias entre dichos haplotipos fueron debidas a 97 sitios variables (21.41%) en los 453 pb secuenciados. Los análisis de diferenciación genética entre las localidades muestreadas, fueron determinados por los valores de  $F_{st}$ , el test exacto de diferenciación poblacional y los análisis de varianza molecular (AMOVA). Estos análisis nos sugieren que las localidades muestreadas pertenecen a dos poblaciones, las del norte (Sinaloa, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca) y las del sur (Chiapas, El Salvador, Panamá y Perú). La separación entre estas dos poblaciones podría deberse al Istmo de Tehuantepec, el cual está constituido por una serie de eventos tectónicos e hidrológicos que lo convierten en un área compleja que constituye una barrera para el asentamiento de *H. inornata*, pues estos organismos viven en fondos rocosos cubiertos con una delgada capa de arena. La discontinuidad a lo largo de su distribución podría estar determinada por la discontinuidad en el hábitat. Es probable que la población original se haya extendido inicialmente en el sur y luego por la corriente costanera de Costa Rica, hacia el norte.

# Capitulo 1 Introducción

## 1.1 Filogeografía

La filogeografía parte de la idea de que la gran mayoría de las especies en la naturaleza exhiben cierto grado de estructura genética asociada con la geografía (Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez 2009). Se define, como el campo de estudio relacionado con los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes genealógicos (Avice *et al.* 1987, Avice 2000).

La filogeografía está directamente relacionada con el desarrollo de la teoría de la coalescencia, que es un modelo de separación de linajes y deriva génica que se retrotrae en el tiempo, hasta un ancestro común (Harding 1996).

Estudios en este campo implican conocer los aspectos históricos que conllevaron a la actual distribución de los linajes genealógicos mediante el análisis de genealogías genéticas. Así como inferir procesos de flujo génico, aislamiento por distancia, cuellos de botella, extinción de linajes génicos e identificar unidades de conservación (Avice *et al.* 1987, Avice 2000, 2008, Vázquez-Domínguez 2002, 2007, Freeland 2005).

La reconstrucción de las relaciones filogenéticas se basa principalmente en el análisis de secuencias de ADNmt, dado que el ADNmt no recombina, tiene una tasa de mutación alta y es de herencia casi exclusivamente materna (Lanteri y Confalonieri 2003). La metodología implica la obtención de las secuencias de ADNmt, y el estudio filogeográfico el cual se puede abordar con un análisis basado en los principios de coalescencia, por medio del análisis de clados anidados (NCA o *nested clade analysis*). Mediante este análisis se pueden reconstruir redes de haplotipos que se unen en clados anidados con el programa TSC (*phylogenetic network estimation using statistical parsimony*) y que permite obtener información de procesos históricos, como estimaciones de flujo génico, deriva génica o expansión, además de ayudar a estimar parámetros complejos y modelos reales de estructura poblacional en un contexto geográfico (Fig. 1.1).

Una limitante de este análisis es que los patrones encontrados en las redes pueden ser explicados por diferentes historias poblacionales (Templeton *et al.*

1995, Templeton 1998, Hare 2001, Scataglini *et al.* 2001, Lanteri y Confalonieri 2003).

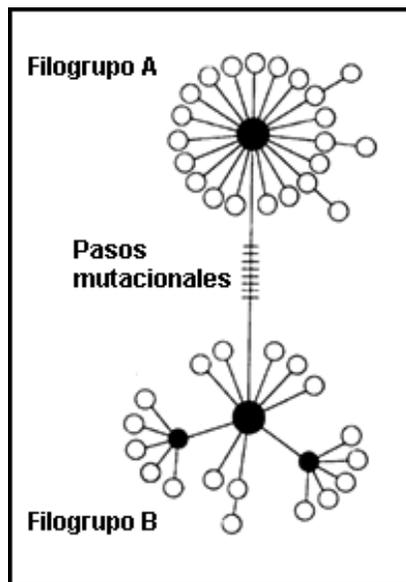


Fig. 1.1 Filograma hipotético de una especie.

En la figura 1.1 los haplotipos están representados por círculos. Los círculos negros representan los haplotipos más comunes de cada filogrupo. Se pueden observar dos filogrupos separados por ocho pasos mutacionales. La separación puede deberse a la distancia geográfica o algún tipo de aislamiento (ecológico o etológico) de largo plazo. Dentro de cada filogrupo, los haplotipos se separan generalmente por un solo paso mutacional y la presencia de varios haplotipos en un mismo filogrupo, evidencia mayor variabilidad genética y mayor tiempo de divergencia.

Por otro lado, modelos matemáticos como los estimadores de índices de  $F_{st}$  para medir la variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones, los análisis de varianza molecular (AMOVA), la distribución de las diferencias por parejas (*Mismatch distribution*) para medir el número de diferencias entre cada par de secuencias en una población, la  $D$  de Tajima que utiliza la frecuencia de las mutaciones en la muestra y la  $F_s$  de Fu que fue desarrollada con la misma lógica que la prueba de Tajima para medir cambios en el tamaño de la población; son comúnmente utilizados en estudios filogeográficos (Tajima 1989, Rogers 2002, Fu 1997).

El estadístico F de Wright por medio del índice  $F_{st}$  indica la reducción de la heterocigosis debido a la subdivisión poblacional; el nivel de diferenciación genética puede aumentar con la deriva genética y las mutaciones, y disminuir con la migración. El índice de  $F_{st}$  oscila desde 0, cuando todas las poblaciones tienen los mismos haplotipos, hasta 1, cuando las poblaciones tienen diferentes frecuencias haplotípicas e indican máxima diferenciación genética.

Wright (1978) presentó una guía cuantitativa para la interpretación de los  $F_{st}$ :

Poca diferenciación genética:  $0 < F_{st} < 0.05$

Diferenciación genética moderada:  $0.05 < F_{st} < 0.15$

Gran diferenciación genética:  $0.15 < F_{st} < 0.25$

Diferenciación genética muy grande:  $0.25 < F_{st}$

## **1.2 Genética de la conservación**

La preocupación por el mantenimiento de la diversidad genética de especies explotadas dio inicio a la disciplina de la genética de la conservación. Posteriormente, esta preocupación se trasladó a la conservación de otras especies y de sus poblaciones. Los objetivos de esta nueva disciplina son evaluar el estado genético de las poblaciones y proponer medidas para preservar la diversidad genética y prevenir los riesgos de naturaleza genética para la persistencia de las poblaciones. Los marcadores moleculares y las diferentes teorías y análisis genéticos contribuyen para tener el conocimiento de los procesos de las poblaciones, lo cual es fundamental para la delimitación de unidades de conservación, evaluación de riesgos y diseño de estrategias de conservación (Godoy 2009).

Sin embargo, hay que ser cuidadosos con la interpretación biológica de los datos obtenidos por medio de los análisis, ya que pueden suponerse estructura con significancia estadística pero no biológica. Y, por otra parte, podría suponerse ausencia de estructura con marcadores neutrales, lo cual no descarta la existencia de divergencia. Según lo anterior, la interpretación de los datos debe hacerse con cuidado, considerando siempre la información ecológica y demográfica (Hedrick 1999, Lenormand 2002).

### **1.3 Características de los marcadores genéticos utilizados en estudios filogeográficos**

Los primeros trabajos en filogeografía se realizaron con base en información proveniente de los fragmentos de restricción, por medio de la técnica de RFLP (polimorfismos para la longitud de fragmentos de restricción) sobre ADNmt total (Confalonieri *et al.* 1998). Hoy en día, un requisito fundamental es el uso de marcadores genéticos o secuencias de ADN que no recombinen. Con base en lo anterior, la mayoría de trabajos filogeográficos utilizan marcadores como el ADNmt o marcadores nucleares en donde se haya constatado que existe poca o ninguna recombinación genética (Thorpe *et al.* 1993, Confalonieri *et al.* 1998).

### **1.4 Genoma mitocondrial**

El ADN de la mitocondria está implicado principalmente en la respiración celular, es circular, de doble cadena y con un tamaño de  $\pm 16.000$  pb en todas las especies animales estudiadas. Estudiar el ADNmt es fácil por su pequeño tamaño y porque la estructura global, tamaño y disposición de los genes están relativamente conservados (Zardoya 1994, Galtier *et al.* 2009). Además, el ADNmt de los animales tiene una alta tasa de mutación, esto significa que los niveles de polimorfismo son altos y, por lo tanto, revelan a menudo múltiples linajes genéticos dentro y entre las poblaciones (Awise *et al.* 1987). Así mismo, no recombina, lo que significa que la descendencia tendrá generalmente (salvo mutación) exactamente el mismo genoma mitocondrial como la madre, es decir, el ADNmt es un único haplotipo que se transmite de las madres a su descendencia (excepto en algunas especies donde la transmisión es a través del esperma) y esto permite que puedan ser rastreados a través del tiempo y el espacio, lo que hace de esta molécula un marcador útil en filogeografía a escala microevolutiva (Awise *et al.* 1987, Wolfe *et al.* 1987, Anderson *et al.* 1995, Freeland 2005). Sin embargo, hay limitaciones, pues se ha encontrado transmisión de mitocondrias de padres a hijos en ratones, aves, humanos y algunas especies de bivalvos, encontrando que las hembras generalmente heredan sus mitocondrias de la madre, pero los machos de ambos (heteroplasmia). De esta manera, una de las limitaciones del ADNmt es la heteroplasmia (Freeland 2005).

El ADNmt codifica para 13 subunidades: tres de la proteína citocromo c oxidasa (COI, COII y COIII), siete subunidades de la NADH deshidrogenasa (ND1 a ND6 y ND4L), el citocromo b de la citocromo c reductasa (cit-b) y las subunidades 6 y 8 del componente F<sub>0</sub> de la ATP sintetasa (ATPasa 6 y 8). Además, contiene la información necesaria para la síntesis de 22 tRNAs y 2 rRNAs (12S y 16S) implicados en la traducción de los mensajeros expresados por el genoma mitocondrial. El resto de las proteínas presentes en la mitocondria son codificadas por el genoma nuclear, excepto la región control (RC o D-loop), que contiene el denominado bucle de desplazamiento, y ha sido útil en estudios filogeográficos con escalas de tiempo evolutivos de miles o cientos de miles de años (Anderson *et al.* 1981, Bibb *et al.* 1981, Chomyn *et al.* 1985, Lunt *et al.* 1998, Martinazzo 2011).

#### 1.4.1 Particularidades del genoma mitocondrial del género *Holothuria*

Dentro de los equinodermos se sabe que los pepinos de mar del género *Holothuria* tienen un número diploide de cromosomas (40 a 44). Además, se conoce el genoma completo de 21 especies pertenecientes a las cinco clases (Scouras *et al.* 2004, Persekec *et al.* 2008). Para el orden Aspidochirotida de la clase Holothuroidea se ha descrito el genoma mitocondrial de *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867) y *Stichopus horrens* Selenka, 1867 con 16,109 pb aproximadamente (SiGang *et al.* 2001, Shen *et al.* 2009) (Fig. 1.2). Esta información permite saber que en el genoma mitocondrial de los equinodermos han ocurrido dos inversiones, tres transposiciones y tres duplicaciones en tándem seguidas de pérdidas aleatorias (TDRL, *tándem-duplication-random-loss*) desde hace aproximadamente 500 m.a. (Zamora *et al.* 2012).



## 1.5 El objeto de estudio, *Holothuria (Halodeima) inornata* Semper, 1868

### 1.5.1 Generalidades de la familia Holothuriidae

La familia Holothuriidae pertenece al orden Aspidochirotida y a la clase Holothuroidea, la cual comprende alrededor de 1400 especies vivientes (Hendler *et al.* 1995, Pawson 2007). Además, es una de las familias más diversas dentro de la clase, comprende cinco géneros con unas ~185 especies (13% de la diversidad de holoturoideos vivos), el mayor de los cuales es el género *Holothuria*, con alrededor de 150 especies (Smiley 1994, Kerr *et al.* 2005, Samyn *et al.* 2005). Esta familia es cosmopolita y predomina en aguas tropicales a menos de 50 m de profundidad (O'Loughlin *et al.* 2007). Este grupo también incluye muchas especies de importancia comercial que son comercializadas en el mundo (Conand 2004).

Se caracterizan porque su cuerpo presenta forma cilíndrica y alargada, con la boca en un extremo, rodeada de tentáculos, y el ano en el otro; los individuos de esta familia puede llegar a medir más de 40 cm de longitud, con 20 tentáculos en forma de escudo y pies ambulacrales dispuestos irregularmente y más abundantes en la región ventral del cuerpo (Deichmann 1958).

Por tanto y de manera general, los caracteres utilizados para la clasificación taxonómica son: la forma del cuerpo, el arreglo de los pies ambulacrales, el número y la forma de los tentáculos, del anillo calcáreo y por la forma y combinación de las espículas (Pawson 1982). Las espículas son unas placas calcáreas que presentan un arreglo no articulado y conforman el endoesqueleto; se les conoce desde el Mesozoico, sugiriendo una antigüedad de aproximadamente 241 m.a. para varios géneros dentro de esta familia (Gilliland 1993, Reich 2004).

### 1.5.2 El género *Holothuria* Linnaeus, 1767

El género *Holothuria* es el más diverso dentro de la familia Holothuriidae, está formado por unas 150 especies repartidas en 18 subgéneros: *Acanthotrapeza*, *Cystipus*, *Halodeima*, *Holothuria*, *Lessonothuria*, *Mertensiothuria*, *Metriatyla*,

*Microthele*, *Panningothuria*, *Platyperona*, *Rowethuria*, *Selenkothuria*, *Semperothuria*, *Stauropora*, *Stichothuria*, *Theelothuria*, *Thymiosycia*, *Vaneyothuria* (Rowe 1969, Samyn *et al.* 2005, O'Loughlin *et al.* 2007).

La mayor parte de la diversidad de este género se distribuye en aguas a menos de 50 m de profundidad; tropicales, subtropicales y templadas en todo el mundo (O'Loughlin *et al.* 2007). Además, la mayoría de las especies explotadas comercialmente pertenecen al género *Holothuria*, pues de las 60 especies comercializadas 23 pertenecen a este género (Purcell *et al.* 2012).

### 1.5.3 El subgénero *Halodeima* Pearson, 1914

*Halodeima* es un subgénero del género *Holothuria*. Samyn *et al.* (2005) sugirieron que *Halodeima* sea elevado a género, pero añadieron que “la revisión de Holothuriidae dependerá de futuros estudios taxonómicos comparativos, así como análisis filogenéticos más detallados antes de que los cambios propuestos se puedan solidificar en una nueva clasificación” (Samyn *et al.* 2005, O'Loughlin *et al.* 2007).

La especie tipo de *Halodeima* es *Holothuria atra* Jäger, 1833. Actualmente, se reconocen 13 especies en este subgénero. Rowe (1969) considera que las siguientes especies constituyen el subgénero: *H. chilensis* Semper, 1868; *H. edulis* Lesson, 1830; *H. floridana* Pourtalés, 1851; *H. grisea* Selenka, 1867; *H. kefersteinii* (Selenka, 1867); *H. mexicana* Ludwig, 1875 y *H. pulla* Selenka, 1867. Pawson (1978) agrega *H. manningi* Pawson, 1978. Paulay (1989, 2003), Pawson (1995) y Samyn (2003) también listan a *H. signata* Ludwig, 1875 (O'Loughlin *et al.* 2007). A esta lista hay que agregarle *H. enalia* Lampert, 1885 (tomado de: WorldRegister of Marine Species. <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=241831> el 2013-11-27); *H. inornata* Semper, 1868 (Honey-Escandón, *com. pers.*); *Holothuria atra* Jäger, 1833 y *H. nigralutea* O'Loughlin in O'Loughlin, Paulay, Vanden Spiegel & Samyn, 2007 (O'Loughlin *et al.* 2007).

#### 1.5.4 Caracteres morfológicos utilizados en la diagnosis de *H. inornata*

Para la identificación a nivel de orden los caracteres utilizados son la forma del cuerpo, número y forma de los tentáculos, posición de la boca y ano, disposición y forma de los pies ambulacrales. A nivel familia y género se toman en cuenta caracteres internos como la forma del anillo calcáreo, número y forma de los canales pétreos, forma y número de madreporitas, número y longitud de vesículas de Poli, disposición de las gónadas, músculos retractores, forma y disposición de los árboles respiratorios, forma de los músculos longitudinales y disposición y trayectoria de los intestinos (Fig. 1.3). La identificación a nivel específico está basada principalmente en la combinación y forma de las espículas, que se encuentran embebidas en la piel y tentáculos (Fig. 1.4) (Solís-Marín *et al.* 2009), y/o en algunos órganos internos, músculos longitudinales, transversales y retractores de la cloaca, así como en la cloaca (Samyn y Massin 2003).

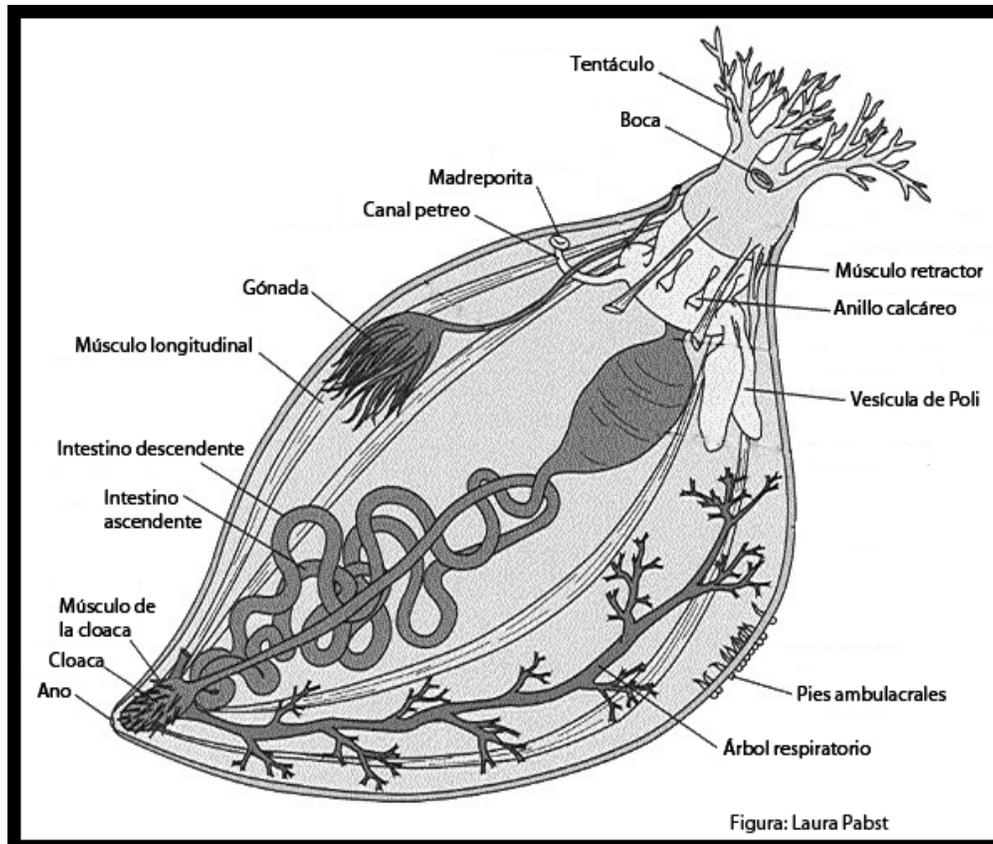


Fig. 1.3 Anatomía de un pepino de mar (Tomado de Kerr 2000)

### 1.5.5 Estatus taxonómico

*Holothuria inornata* es una especie de pepino de mar que se encuentra clasificada taxonómicamente de la siguiente manera, siguiendo los criterios de Pawson y Fell (1965) y Rowe (1969):

Phylum	Echinodermata
Clase	Holothuroidea Blainville, 1834
Orden	Aspidochirotida Grube, 1840
Familia	Holothuriidae Ludwig, 1894
Género	<i>Holothuria</i> Linnaeus, 1767
Subgénero	<i>Halodeima</i> Pearson, 1914
Especie	<i>Holothuria inornata</i> Semper, 1868

Se necesita un trabajo morfológico y genético para resolver si *Halodeima* es monofilético (O`Loughlin *et al.* 2007).

Diagnosis (Tomada de Solís-Marín *et al.* 2009).

Veinte tentáculos en forma de escudo, superficie dorsal generalmente con cuatro a seis filas de papilas y pies ambulacrales dispersos entre ellas, superficie ventral con pies ambulacrales no contraídos. Canales pétreos numerosos con madreporita. De tres a cuatro vesículas de Poli. El color de los individuos preservados es marrón. El color del cuerpo de los organismos no preservados es marrón con las papilas y pies ambulacrales más claros; los tentáculos pueden ser marrón más claro u oscuro que el cuerpo.

*Holothuria inornata* presenta varias formas de espículas, sin embargo los siguientes tipos son utilizadas como caracteres de importancia taxonómica:

#### Tablas o mesas

Las tablas son típicas de la familia Holothuriidae. Son estructuras tridimensionales conformadas por un disco perforado del que salen un número variable de pilares verticales, que pueden estar conectados por una o varias barras cruzadas y que

forman la espira, la terminación de la espira presenta una agrupación de espinas (Fig. 1.4). Se encuentran solamente en la pared corporal.

### Barrotes o bastones

Son estructuras alargadas de diferentes tamaños que se encuentran en los tentáculos y que pueden ser de forma variada, los extremos pueden estar ramificados o perforados y su superficie puede ser lisa o rugosa (Fig. 1.4).

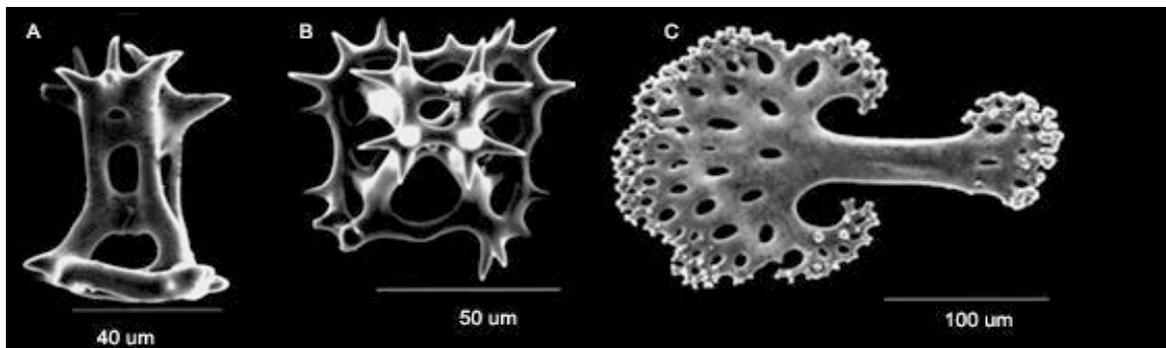


Fig. 1.4 Fotografía al microscopio electrónico de barrido de espículas de *H. inornata* Vista lateral de una tabla (A), Vista superior de una tabla (B), Barrote (C). (Foto: Elba Prieto).

### 1.5.6 Distribución de *Holothuria inornata*

*Holothuria inornata* ha sido registrada, desde la zona intermareal hasta 18 m de profundidad, en México, en el Golfo de California: Sonora, Sinaloa y La Paz. En el Pacífico mexicano: Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Islas Clarión y Socorro; en Costa Rica: Isla del Coco; en Panamá; en Ecuador: Islas Galápagos y en Perú: Zorritos, Punta Sal, Isla Foca e Islas Lobos de Afuera (Solís-Marín *et al.* 2009). La localidad tipo de *H. inornata* es Mazatlán, Sinaloa (Deichmann 1938).

### 1.5.7 Ecología de *Holothuria inornata*

Los pepinos de mar son muy importantes en los ecosistemas debido a que dominan la megafauna de invertebrados de los fondos de aguas profundas, tanto en número como en biomasa, llegando a representar hasta el 90% de la biomasa de megafauna del ecosistema. Debido a que el agua del mar cubre más del 70%

de la superficie de la tierra, las holoturias son algunos de los organismos dominantes en nuestro planeta (Billett 1991, Hendler *et al.* 1995, Sibuet 1999).

*Holothuria inornata* ha sido encontrada hasta 18 m de profundidad cubiertos por una capa de arena, sobre fondos rocosos (Fig. 1.5). Estos organismos son dioicos, sin dimorfismo sexual, presentan una gónada ramificada, ambos sexos alcanzan la madurez en junio (verano), y desovan en julio (solo hay estudios de su desove para el estado de Michoacán, México); su fecundación es externa, se desarrolla primero una larva auricularia y posteriormente una larva doliolaria, finalmente se establecen en el fondo del mar y pasan ahí su vida como adultos; se estima que algunas especies de pepinos de mar viven hasta 10 años (Uthicke y Benzie 2000, Ramos-Ramírez 2013). Ramofafia *et al.* (1995) mencionan que el tiempo necesario para alcanzar la etapa de larva doliolaria en *H. atra* es de 20 días, mientras que Asha y Muthiah (2002) estiman 13-15 días para *H. spinifera*, con una tasa de supervivencia del cuarto al sexto día de 76.9% y luego decrece a 34.6% al undécimo día. La mortalidad máxima se observa en el noveno día cuando se da la transición de larva doliolaria a adulto. El asentamiento de las larvas y el crecimiento se ven afectados en gran medida por el pastoreo de los depredadores (Asha y Muthiah 2002).

## **1.6 Importancia económica de los pepinos de mar**

Por lo menos 60 especies son capturadas en más de 40 países y comercializadas principalmente, en los mercados de Asia. Los precios de venta oscilan entre 300 y 500 USD por kg (seco), convirtiendo a los pepinos de mar en un recurso importante para los pueblos costeros. Actualmente, la explotación indiscriminada y excesiva en varios lugares ha provocado la extinción local de algunas especies de alto valor comercial, lo cual es perjudicial para los ecosistemas, pues los pepinos de mar son importantes ecológicamente porque filtran el sedimento de los fondos oceánicos devolviéndolo a través de paquetes fecales a los procesos de la red alimentaria, además remueven las capas superficiales de sedimento facilitando con ello la oxigenación del fondo marino (Purcell *et al.* 2010, Tuz y Aguilar 2011).

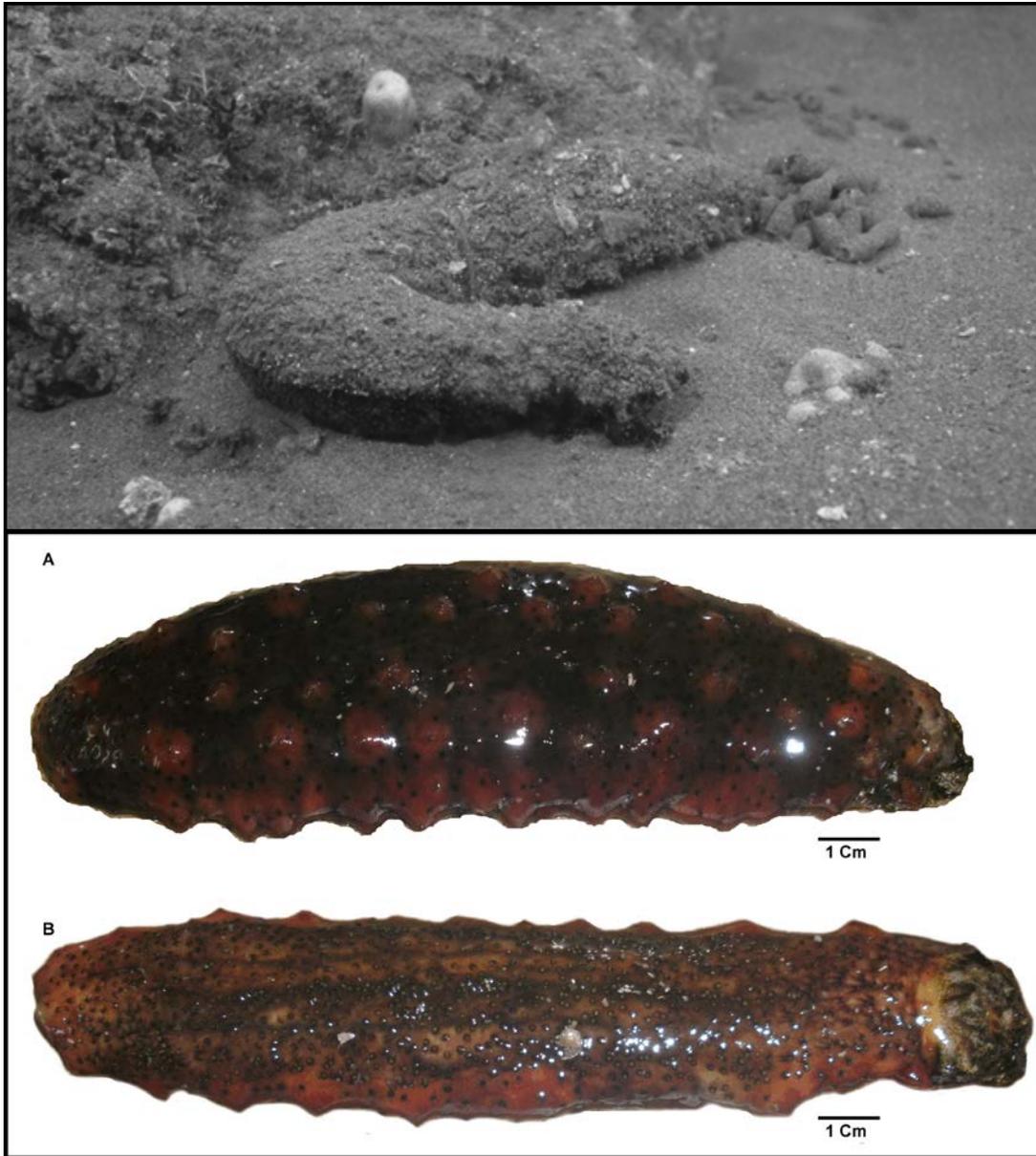


Fig. 1.5 Ejemplar de *Holothuria inornata*.

En la parte superior se muestra un ejemplar de *H. inornata* en su hábitat natural (Foto de Carlos Sánchez Ortiz). En la parte inferior se muestra un ejemplar de *H. inornata* capturado; vista dorsal (A), vista ventral (B). (Foto de Francisco Benites Villalobos).

La mayoría de especies objeto de pesca intensiva se encuentran ampliamente distribuidas en el Océano Pacífico e Índico (Uthicke y Benzie 2003). En México, la captura de pepino de mar se inició a finales de los años ochenta del pasado siglo, extrayéndose principalmente dos especies: *Parastichopus parvimensis* en la costa occidental de la península de Baja California y, la más importante, *Isostichopus fuscus*, en el Golfo de California (Herrero-Pérezrul y Chávez-Ortiz 2003). Así

mismo, en los estados de Yucatán y Campeche las especies *Isostichopus badionotus*, *Astichopus multifidus* y *Holothuria floridana* son explotadas para su comercio (Tuz y Aguilar 2011).

## **1.7 Antecedentes en el estudio y la conservación de los pepinos de mar**

En razón a su gran demanda en las pesquerías asiáticas, algunas poblaciones de pepinos de mar fueron puestas en peligro de extinción, lo que condujo a una disminución de su captura y a la búsqueda de nuevas especies susceptibles de pesca en otros países. De esta manera la demanda de pepinos de mar por los países orientales ha promovido la captura legal e ilegal de otras especies como *Holothuria inornata*, de la que solo se tienen registros de su captura en Ecuador y de la cual no existe información biológica ni ecológica (Toral-Granda 2008).

En México no se tiene una cultura para el consumo de pepino de mar; sin embargo, su explotación como recurso pesquero en Yucatán se inició en 2001, por lo que en 2006 la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), a través de la Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura (CONAPESCA), expidió seis permisos de pesca de fomento para el pepino café (*I. badionotus*), el blanco (*A. multifidus*) y el negro (*H. floridana*) (Tuz y Aguilar 2011).

Por otra parte, la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) y la CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres) han desarrollado reuniones internacionales determinando la necesidad urgente de mejorar la capacidad de los países, para la gestión de esta industria (Lovatelli 2004, Toral Granda 2008). Consecuentemente, se hizo necesario conocer la biología y ecología de los pepinos de mar de importancia económica, así como los tipos de pesquería y estado global de las poblaciones (p. ej. tamaño poblacional y abundancia) para tomar medidas reguladoras y acciones de manejo sostenibles (p. ej. vedas) según el escenario. Muchas pesquerías de pepino de mar difieren grandemente en la

escala de las actividades pesqueras, el estado de las poblaciones y la capacidad de la agencia de manejo (Purcell *et al.* 2010).

Desde los informes del 'Challenger' (Expedición científica británica que realizó la primera gran campaña oceanográfica mundial entre diciembre de 1872 y mayo de 1876) muchos trabajos sobre taxonomía basados en caracteres morfológicos han sido realizados en equinodermos, sin embargo la literatura al respecto era particularmente confusa hasta finales del siglo pasado (Clark y Rowe 1971). Sin embargo, en el último par de décadas, los análisis moleculares han ofrecido herramientas de gran alcance para detectar la diferenciación taxonómica, en combinación con análisis morfológicos que, sumados a la filogeografía, pueden esclarecer patrones históricos y evolutivos entre poblaciones de una misma especie (Pawson 2007, Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez 2009).

En México se han realizado trabajos sobre reproducción, crecimiento, biología poblacional y pesquerías de especies de importancia comercial, principalmente *Isostichopus fuscus* en el sur del Golfo de California, y en la costa del estado de Yucatán; estos trabajos unidos con la información filogeográfica, podrían ayudar a una mejor toma de decisiones para la conservación de las poblaciones (Fajardo-León *et al.* 1995, Herrero-Pérezrul *et al.* 1999, Rodríguez-Gil 2007, Reyes-Bonilla *et al.* 2008, Salgado-Rogel *et al.* 2009).

### 1.7.1 Antecedentes moleculares

Arndt *et al.* (1996) llevaron a cabo un análisis filogenético con datos moleculares de algunos holotúridos, utilizando secuencias de ADNmt (CO1) a fin de aclarar su sistemática y taxonomía; encontrando que *Cucumaria lubrica* y *Cucumaria fisheri astigmata* tienen 99.8% de similitud de nucleótidos. Por otra parte, los análisis morfológicos en *C. lubrica* y *C. fisheri astigmata* mostraron que el tipo de espículas encontradas en las dos especies era el mismo; es así, que tanto las características del ADNmt y la morfología proporcionan evidencia de que ambos taxones son sinónimos. Uthicke *et al.* (1998) analizaron la estructura genética de poblaciones fisíparas de *Holothuria (Halodeima) atra* en la Gran Barrera de Arrecife utilizando aloenzimas; estudiaron 311 individuos de ocho localidades y observaron

diferencias significativas en los valores de  $F_{st}$  entre localidades, indicando una subdivisión de la población. Además, Arndt y Smith (1998) examinaron, a lo largo de la costa oeste de Norte América, la estructura poblacional de dos especies de pepinos de mar analizando secuencias de ADNmt (ARNsr) amplificado con primers diseñados a partir de secuencias de ADNmt de erizos de mar. Detectaron 72 sitios variables y 60 haplotipos en las secuencias de 222 especímenes de *Cucumaria pseudocurata*; mientras que en *C. miniata* se detectó un total de 63 sitios variables y 68 haplotipos entre las 84 muestras secuenciadas. Además, se menciona que la estructura poblacional podría deberse al aislamiento por distancia y a los parches de arena que a lo largo de la costa forman barreras para la dispersión.

Uthicke y Benzie (2000) estudiaron la variación genética, utilizando aloenzimas, en 15 poblaciones de *Holothuria nobilis* en una barrera de coral; encontraron que aunque las poblaciones estaban separadas por distancias de hasta 1300 km, no había restricciones aparentes con el flujo de genes, pues los valores de  $F_{st}$  no fueron significativamente diferentes de cero; es decir, las poblaciones estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg. Por otra parte Kerr (2000), en su tesis 'Evolución y Sistemática de Holothuroidea', trabajó con secuencias de ADNr (18S). Los resultados postulan que en holoturoideos esa secuencia está sujeta a una alta tasa de evolución comparada con las otras clases de equinodermos. Así mismo, mencionó que la velocidad con la que se fijan las mutaciones de un gen puede variar ampliamente entre las especies.

Uthicke y Benzie (2003) hicieron análisis para conocer el flujo de genes y la historia de las poblaciones de *Holothuria nobilis* usando el ADNmt; los análisis de AMOVA,  $F_{st}$  y el test exacto mostraron que las poblaciones de *H. nobilis* están conectados por alto flujo de genes, con un poco de estructura observada entre poblaciones separadas por grandes distancias. NCA sugirió que el flujo de genes en los últimos años sigue un patrón consistente con el aislamiento por distancia. Además, se pudo inferir que la expansión de poblaciones de *H. nobilis* corresponde al Pleistoceno tardío (hace 88 000 a 193 000 años). Benzie y Uthicke (2003) utilizaron como marcadores aloenzimas y ADN mitocondrial para conocer

los patrones de variación genética que sumada a la información básica ayudaría a la industria del pepino de mar. Los análisis con aloenzimas no mostraron diferencias significativas entre las poblaciones; mientras que las secuencias de CO1 de *H. nobilis* mostraron alta diversidad de haplotipos, pero baja diversidad nucleotídica. Concluyeron que ambos marcadores no sugirieron restricciones para el flujo de genes, dispersión y reclutamiento, y que la pesquería de pepino de mar sería viable.

Solís-Marín (2003) se basó en secuencias de ADNmt (16S), genes de Citocromo Oxidasa I (CO1) y caracteres morfológicos en su tesis doctoral "Sistemática y Filogenia de los Holothuroidea de la Familia Synallactidae". La mayoría de las muestras fueron recolectadas del atlántico noreste. Se utilizaron aproximadamente 870 nucleótidos del COI y 350 nucleótidos de 16S. La gran diversidad morfológica de la familia Synallactidae hace difícil el uso de criterios morfológicos para validar la monofilia de la familia; y desde el punto de vista molecular es un grupo parafiletico. La distancia nucleotídica con el gen COI fue de 39%. El Resultado fue que algunas especies no tienen relación morfológica, pero su ADN mitocondrial revela una relación críptica y que a pesar que el análisis morfológico apoya el reconocimiento de algunos taxones, por el momento no hay suficiente información taxonómica (morfológica y/o molecular) para entender la naturaleza de este grupo.

Lacey *et al.* (2005), a partir de secuencias de genes ARNr (18S), infirieron relaciones filogenéticas dentro de la clase Holothuroidea. Las filogenias producidas no coinciden con otras basadas en la morfología y ampliamente aceptadas. En resumen, este constituyó un estudio a gran escala de diferenciación filogenética, que demostró la utilidad del análisis molecular. Chang *et al.* (2009) analizaron la variabilidad genética de cinco poblaciones de pepinos de mar usando microsatélites. Los cuatro sitios de muestreo cubren la mayor parte de su ámbito de distribución (costas de Aomori, Japón, Yosú, Corea del Sur, Dalian, China, Vladivostok y Rusia). Encontraron que la diversidad genética (intrapoblacional) en las cinco poblaciones es similar; sin embargo, los valores de  $F_{st}$  mostraron una moderada diferenciación genética entre las poblaciones, lo que indica que estas son territorialmente independientes. Así mismo, mencionaron que una gran

distancia podría explicar el pobre intercambio de genes entre poblaciones (distancia genética entre 0.497 y 1.029). Curiosamente, obtuvieron una gran distancia genética entre dos poblaciones recogidas en el mismo sitio, por lo que sugieren que la especiación no podría haber ocurrido a nivel local; sin embargo, un cambio geográfico del mar de Japón ocurrió en el último periodo glacial, estos cambios proporcionaron la posibilidad de una inmigración y la especiación. Por otra parte, observaron que la población del extremo oriente ruso y la población de pepino rojo japonés muestran una relación genética estrecha a pesar de tener fenotipos diferentes y de su distribución geográfica, lo que no se puede explicar porque la ecología, evolución y antecedentes genéticos de *Stichopus japonicus* son en gran parte desconocidos, pues es demasiado simplista relacionar la evolución de los pepinos de mar a los cambios geográficos en el último período glacial, o incluso establecer este vínculo cuando falta datos sobre la paleo-oceanografía y paleontología de los pepinos de mar.

Uthicke *et al.* (2009) analizaron la información genética disponible en GenBank y secuencias (obtenidas de muestras del Atlántico, Pacífico e Indico) recién generadas para determinar COI puede ser utilizado para identificar especies de pepinos de mar mediante el sistema de código de barras genético, los resultados sugirieron que así es. El análisis de divergencia conespecífico indicó que la variación promedio de la secuencia es de 1.3% y que la divergencia genética congénica es de 16.9%. Además, mencionan que en holoturias CO1 es un marcador ideal para estudiar la genética de poblaciones intraespecífica y para el trabajo de filogenética y taxonomía por debajo del nivel de género; mientras que para el trabajo filogenético entre géneros y a nivel de familia, el 16S es un marcador más adecuado dado que evoluciona más lentamente.

Byrne *et al.* (2010) realizaron un trabajo de taxonomía molecular, filogenia y evolución basado en ADNmt (COI y 16S). En conclusión, los análisis de dos marcadores genéticos mitocondriales apoyaron en gran medida la taxonomía de la familia Stichopodidae; sin embargo, se demostró la necesidad de una nueva evaluación de los caracteres morfológicos de diagnóstico. Además, se destacaron los grupos que pueden albergar especies crípticas y aclaró la situación de varias

especies comerciales. Borrero-Pérez *et al.* (2010) analizaron la sistemática del género *Holothuria* en el mar Mediterráneo y Atlántico noreste, también establecieron que los linajes basales en la familia Holothuriidae surgieron desde la mitad hasta finales del Triásico superior. Se identificaron al menos cuatro linajes y por lo menos tres especies con una aparente historia evolutiva larga. Borrero-Pérez *et al.* (2011) evaluaron la estructura genética de poblaciones de *Holothuria (Holothuria) mammata* e investigaron los efectos de las barreras marinas y procesos históricos por medio de los genes mitocondriales 16S y CO1; encontraron que este último es más variable y por tanto más útil para la detección de la estructura de la población.

SiGan *et al.* (2011) caracterizaron el genoma mitocondrial de *Stichopus horrens*, el cual es una molécula circular de 16257 pb compuesto por 13 genes codificadores de proteínas, dos genes ARNr y 22 ARNt. Skillings *et al.* (2011) y examinaron la estructura genética de la población de *Holothuria atra* basados en CO1 para determinar la escala apropiada para el manejo de los arrecifes de coral; los análisis de diversidad y las redes de haplotipos sugieren que Hawai y el arrecife Kingman son centros importantes de la diversidad genética. Honey-Escandón *et al.* (2011), en el estudio: “Molecular phylogeny of the subgenus *Holothuria (Selenkothuria)* Deichmann, 1958 (Holothuroidea: Aspidochirotida)” por medio de CO1 y 16S, encontraron que el esquema actual de subgéneros del género *Holothuria* no es compatible con la clasificación actual, por lo que sugieren una nueva clasificación. Wangensteen (2013) analizó 635 pb del gen mitocondrial CO1 de 604 individuos de *Arbacia lixula* de 24 localidades de Brasil, Atlántico Oriental y Mediterraneo. Encontró 135 sitios polimórficos con un total de 144 mutaciones. La diversidad haplotípica ( $H_d$ ) y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), calculada para toda el área de distribución geográfica, fue de 0.912 ( $\pm 0.007$  SD) y 0.00658 ( $\pm 0.00026$  SD) respectivamente. Además, sugiere que las poblaciones han sufrido expansiones demográficas muy recientes, entre 94000 y 205000 años en el Mediterráneo, y entre 31000 y 67000 años en el Atlántico Oriental.

## 1.8 Problemática, hipótesis y objetivos

### 1.8.1 Problemática

Los holoturoideos, un grupo del que se conocen a nivel mundial más de 1400 especies, tiene por lo menos 60 que son comercializadas, principalmente en los mercados de Asia (Pawson 2007, Purcell *et al.* 2010). La pesca indiscriminada y excesiva de especies de alto valor comercial ha dado lugar a la extinción de algunas de ellas y ha generado la necesidad de comprender la biología, ecología y los principios y procesos que gobiernan la estructura y evolución de las poblaciones. Toda esta información contribuirá al manejo de este recurso de manera sostenible.

### 1.8.2 Hipótesis

Ho. No existe estructura genética en *Holothuria inornata* a lo largo de su ámbito de distribución en el Pacífico oriental tropical entre México y Perú; es decir, la capacidad de dispersión de la especie, las características oceanográficas como el patrón de corrientes, las surgencias y los gradientes térmicos de esta región no generan una estructura genética en la especie.

Ha. Sí existe estructura genética a lo largo de la distribución de la especie, esta estructura puede estar asociada a su capacidad de dispersión y características oceanográficas como el patrón de corrientes, las surgencias y los gradientes térmicos de esta región.

### 1.8.3 Objetivos

#### Objetivo general

Investigar la filogeografía de *Holothuria inornata* en el Pacífico oriental tropical para generar información que permita a futuro tomar decisiones orientadas a su conservación y aprovechamiento como recurso pesquero.

#### Objetivos específicos

- Calcular la diversidad genética, el grado de diferenciación o similitud de las poblaciones de *H. inornata* y su historia demográfica.
- Relacionar el efecto de las características oceanográficas de la región y los eventos históricos sobre las características genéticas de *H. inornata*, determinando posibles barreras al flujo génico.

# **Capitulo 2 Materiales y métodos**

## 2.1 Área de estudio

El área de estudio corresponde a la región del Pacífico Oriental Tropical (POT). La región del POT (Fig. 2.1) está marcada por gradientes térmicos de norte a sur, por una amplia extensión de océano abierto hacia el oeste y por parte de la masa terrestre de América hacia el este. Abarca la línea costera continental desde la parte sur de Bahía de Magdalena, continuando por el Golfo de California y bajando hacia el sur hasta el norte de Perú. Esta región incluye cinco islas oceánicas y grupos de islas: Islas Revillagigedo, Isla Clipperton, Isla del Coco, Isla Malpelo e Islas Galápagos.

Briggs (1974) dividió el territorio continental en regiones biogeográficas que, a su vez, contenían provincias más pequeñas. Las provincias se definieron con base en el endemismo de la biota, principalmente de los peces, un valor del 10% de endemismo fue elegido para calificar un área como una provincia distinta. Hastings (2000), con base en la distribución de peces costeros e invertebrados marinos, reconoce cuatro provincias: Entre la provincia de Cortez y la Mexicana y la provincia Mexicana y la Panámica hay dos tramos de costa que denominó “*Sinaloa Gap*” y “*Central American Gap*”, respectivamente, donde predominan los fondos blandos y no hay afloramientos rocosos importantes. La provincia Mexicana incluye la costa de México desde Mazatlán hasta el Istmo de Tehuantepec. “*Central American Gap*” es el comprendido entre el Istmo de Tehuantepec y el Golfo de Fonseca. La provincia Panámica se extiende desde el Golfo de Fonseca (Nicaragua) hasta el norte de Perú (Fig. 2.2). Landini *et al.* (2002), con base en la distribución de peces e invertebrados fósiles (Formación Canoa) y actuales, reconoce en la región del Pacífico oeste, la provincia Panámica con dos diferentes unidades: Mexicana y Panámica *sensu stricto*, las cuales se ubican desde Mazatlán hasta el norte de Perú (Fig. 2.3).

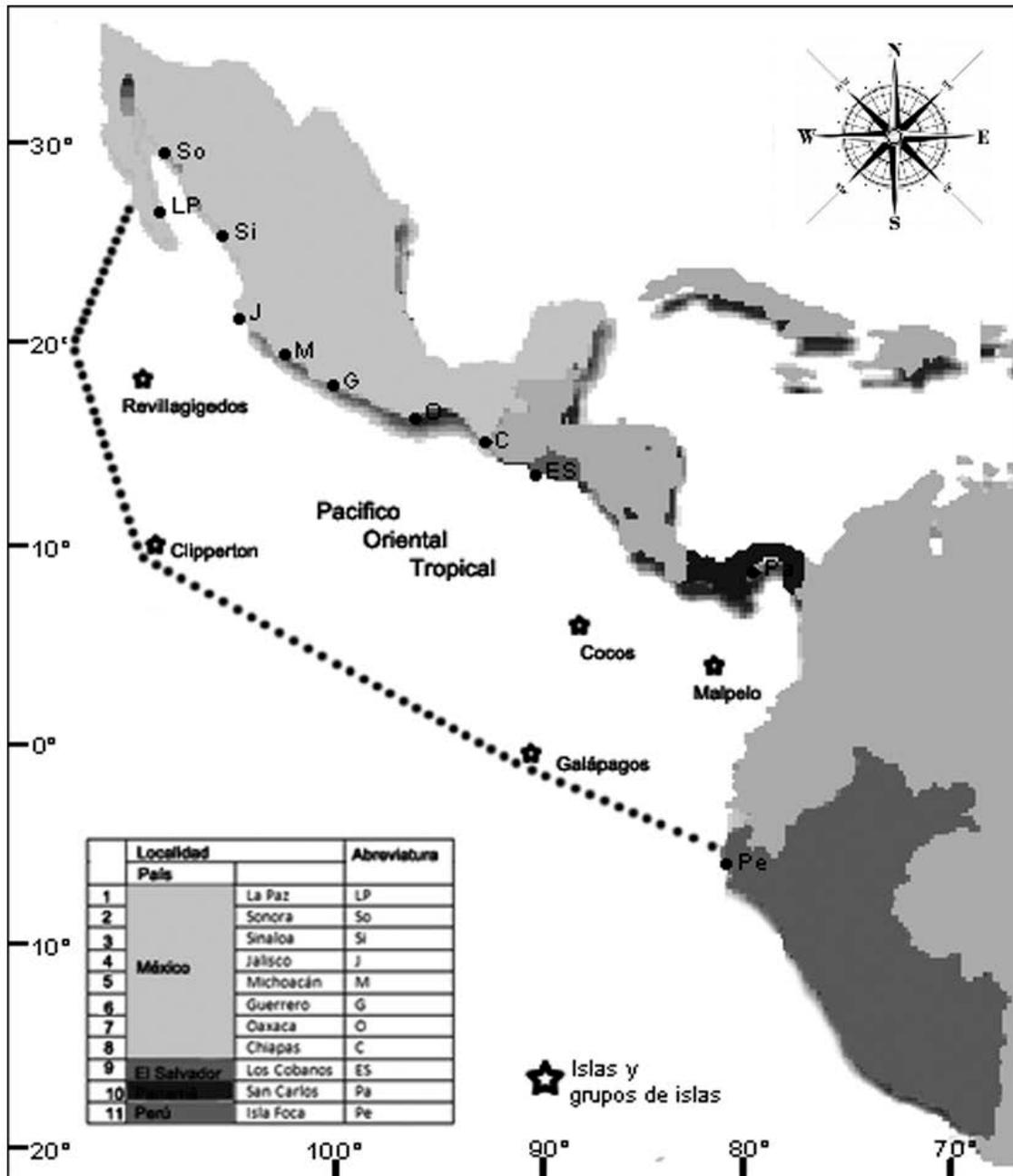


Fig. 2.1 Región del Pacífico Oriental Tropical.

Área que abarca la mayor parte de la costa de México, Centro América, Colombia, Ecuador y norte de Perú, sus islas y grupos de islas. Las localidades donde se recolectaron las muestras se indican con puntos negros.

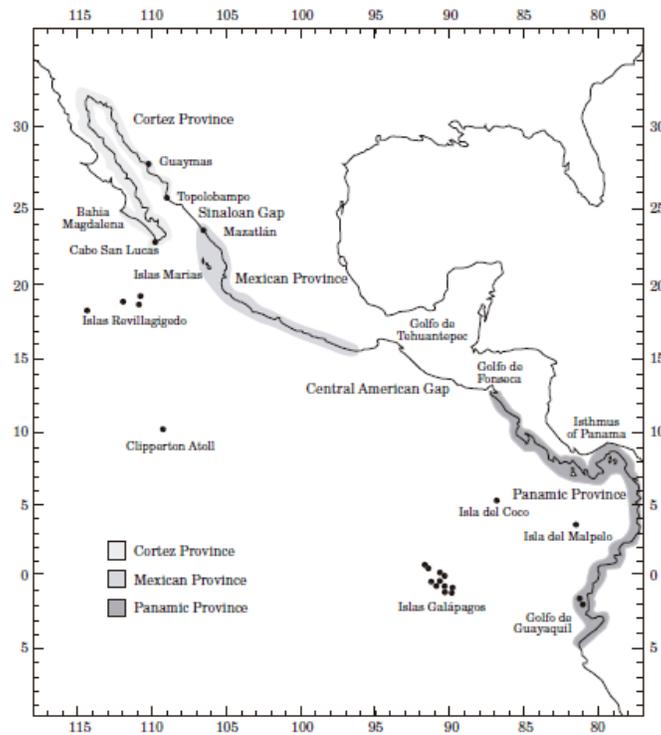


Fig. 2.2 Región biogeográfica del Pacífico Oriental Tropical (Hastings, 2000).

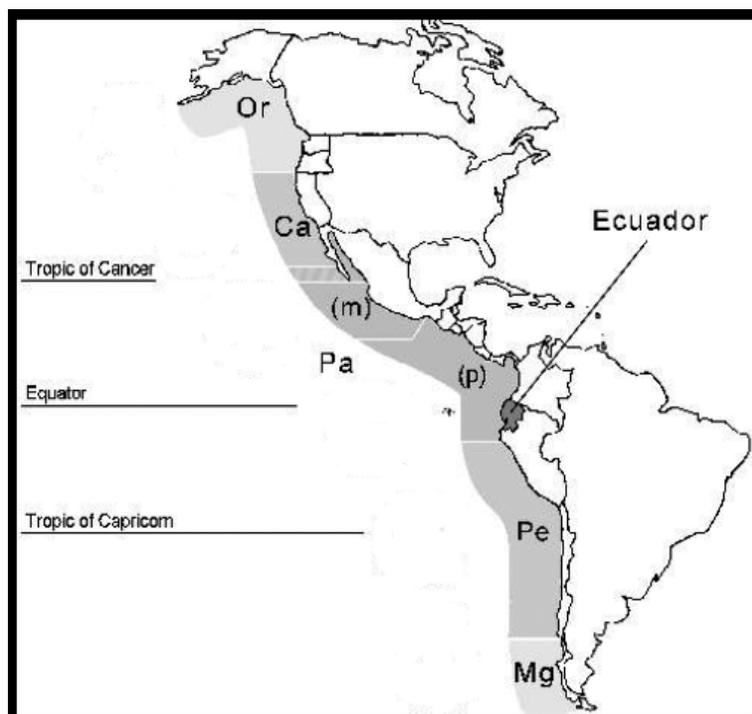


Fig. 2.3 Provincias biogeográficas del Pacífico oriental (Modificada de Landini *et al.* 2002).

### 2.1.1 Características geológicas del área de estudio

El océano Pacífico es un resto de la *Panthalassea* (océano que rodeaba al supercontinente Pangea) y su origen está asociado con la formación de los continentes actuales que surgieron a partir del desprendimiento de corteza terrestre de la Pangea; los restos más antiguos encontrados en el océano Pacífico datan de hace aproximadamente 200 m.a. (Wegener 1966). La formación de la costa occidental de Norteamérica se dio en el Mesozoico (~200m.a.) con la separación de los dos Supercontinentes, Laurasia y Gondwana. En esa era, el sur de México y América Central no se habían formado como actualmente se conocen, y entre el sur de México y América del Sur comenzó a activarse un sistema de distensión, creando un arco insular primitivo que prosiguió su desarrollo en el Cenozoico (de la Lanza 1991).

En el Eoceno Medio (~45 m.a.), el movimiento de las placas tectónicas inició la emersión de este arco de islas volcánicas que iba desde el norte de Costa Rica hasta el noroeste de Colombia. Parte de este arco de islas formaría el Istmo de Panamá; hasta el Mioceno temprano (~20m.a.) Centroamérica y Suramérica aún estaban separadas. A finales del Mioceno (~10m.a.) el arco de Panamá colisionó con Suramérica, produciendo eventos como el levantamiento progresivo de tierra firme que empezó alrededor de 5 m.a. atrás hasta que, finalmente, se cerró el paso que comunicaba el Pacífico Tropical con el Caribe hace 2.8 m.a., condicionando el clima de aquella época y completando así la configuración de la cuenca (Recchi y Metti 1973, de la Lanza 1991, Coates *et al.* 2005, O'Dea *et al.* 2007). Así mismo, la evolución del sistema Andino, desde Colombia hasta la Patagonia en el sur de Chile, empezó al comienzo del Cenozoico (Cahill y Isacks 1992). Por otro lado, en el Neógeno, se inició la separación de la Península de la Baja California de la parte continental de México originando el Golfo de California (Wegener 1929).

### 2.1.2 Oceanografía del Pacífico Oriental Tropical

El Pacífico es el más antiguo, grande y profundo de los océanos; su plataforma continental, hacia el sur del paralelo 22° (Nayarit, México) tiene una amplitud de 10

a 15 km que se mantiene más o menos constante a lo largo de toda la margen continental, aunque se producen ampliaciones de algunos kilómetros. La menor amplitud de la plataforma se observa frente a las costas de Oaxaca, reduciéndose a unos 4-6 km, ampliándose bruscamente hasta 50 km en el Golfo de Tehuantepec. Frente a las costas de Chiapas y Guatemala la plataforma es considerablemente amplia y uniforme con entre 50 y 80 km (Menard y Smith 1966, Lugo 1986).

La región del POT tiene características oceanográficas complejas debido, en parte, a la convergencia de las corrientes marinas presentes (Corriente de California, Corriente Costera de Costa Rica, Corriente Ecuatorial y Corriente de Humboldt) y también por el ciclo climático de El Niño-La Niña (Allauca 1990, Kessler 2006). Las corrientes facilitan la dispersión de larvas y la distribución de especies por tanto, cambios producidos en ellas se reflejan directamente en la disponibilidad de recursos pesqueros (Lucero y Mindiola 2007, Ruiz 2013). Además, las aguas del Pacífico tropical están sujetas a calentamiento superficial y excesiva evaporación, que promueven la convección y consecuentemente un proceso de mezcla constante en la vertical que enriquece el lugar (de la Lanza 1991). La Corriente de California, que transcurre de norte a sur, es estacional, transporta aguas de tipo subártico, que afectan solo las capas superficiales; su flujo puede alcanzar hasta los 15°N (Chiapas) (Fig. 2.4) (Wyrcki 1965, Ruiz 2013).

A uno y otro lado de la zona ecuatorial están las corrientes denominadas Norecuatorial y Surecuatorial, que transportan agua superficial (Kessler 2006). La Corriente Norecuatorial es estacional y abastecida por la Corriente de California (de la Lanza 1991, Kessler 2006). Por otro lado, la Contracorriente Ecuatorial o de Cromwell se bifurca y una parte fluye hacia el norte y el noroeste alrededor del Domo de Costa Rica, acarreando aguas a lo largo de la costa de Centroamérica y sur de México, y otra parte se dirige hacia el sur y al oeste, ingresando en el sistema de la corriente Surecuatorial (Hastenrath 1985, Guillén, *en prep*). La Corriente Costanera de Costa Rica proviene de la región de isla del Coco, es la rama más pronunciada de la circulación frente a Centroamérica y pasa directamente a introducirse en la corriente Norecuatorial, se mueve hacia el

Noroeste y el Oeste desde 9 a 12°N llegando, una rama de la corriente, a ingresar en el Golfo de Tehuantepec, continuando hasta Cabo Corrientes (México) (de la Lanza 1991, Quesada-Alpizar y Cortés 2006).

La circulación frente a la costa de Perú se destaca por la Corriente Peruana o Corriente de Humboldt que fluye hacia el noroeste y contribuye con sus aguas a la Corriente Surecuatorial como parte de la circulación. En sentido contrario fluye la Corriente Subsuperficial Peruano-Chilena, que comienza frente a Talara (4°35'S) y transporta agua, proveniente de una rama de la Corriente de Cromwell, hacia el sur (Allauca 1990, Morón 2000).

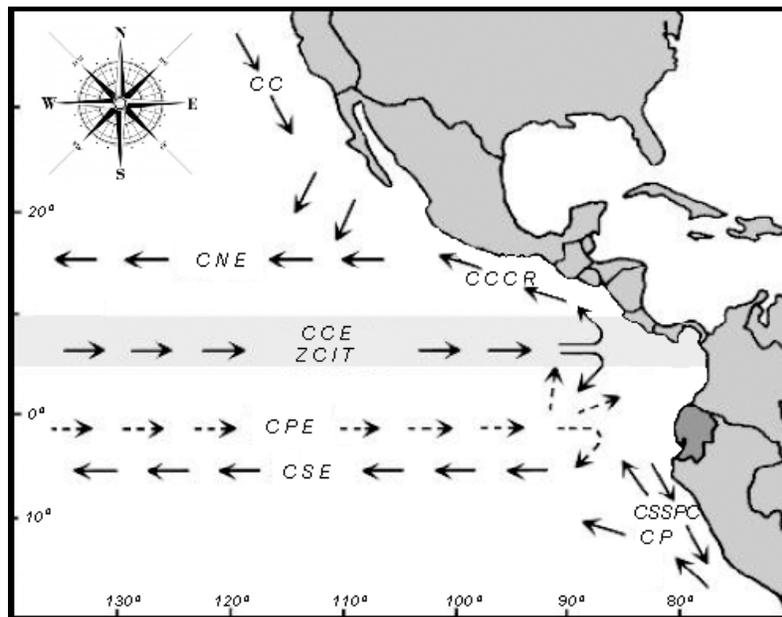


Fig. 2.4 Mapa de corrientes del Pacífico Oriental Tropical (modificado de Landini *et al.* 2002).

Sistema general de corrientes. CC=Corriente de California; CNE=Corriente Norte Ecuatorial; CCE=Contra Corriente Ecuatorial; ZCIT=Zona de Convergencia Inter Tropical; CPE=Corriente Profunda Ecuatorial; CSE= Corriente Sur Ecuatorial; CCCR=Corriente Costanera de Costa Rica; CSSPC=Corriente Sub Superficial Peruano Chilena; CP=Corriente Peruana.

## **2.2 Técnica de recolección y conservación del material**

### **2.2.1 Técnica de muestreo**

La captura de los holoturoideos se realizó manualmente, en el intermareal, y con buceo SCUBA hasta 10 m de profundidad, tomando los datos del lugar. Algunos ejemplares fueron preservados en etanol al 70% y otros retornaron al lugar de dónde se les recolectó, previa extracción de un pedazo de tejido (pies ambulacrales), guardado en etanol absoluto para análisis molecular. Los ejemplares preservados se depositaron en la Colección Nacional de Equinodermos “Dra. Ma. E. Caso Muñoz” del ICML, UNAM.

### **2.3 Material estudiado**

Se analizaron muestras de tejido de 223 ejemplares de *H. inornata*, recolectados en once localidades (Fig. 2.1; tabla 2.1) tratando de abarcar de manera completa su área de distribución geográfica. Todas las localidades hacen parte de la región del POT, excepto por isla Foca en Perú. Isla Foca se encuentra ubicada a 05°12´S, norte de Perú, en el área de convergencia de las corrientes de Humboldt y Surecuatorial.

En su mayoría estas muestras han sido obtenidas por colaboración de diversos investigadores. Las muestras de Oaxaca, por el doctor Francisco Benítez Villalobos de la Universidad del Mar, Oaxaca, las de Chiapas, por la estudiante Heleni Eunice Cansino Guzmán; las de El Salvador, por el doctor José Enrique Barraza del Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales de El Salvador y las de Panamá, por la Ingeniera Zedna Ibis Guerra del Laboratorio de Moluscos Bivalvos, Estación de Maricultura del Pacífico, Dirección de Investigación y Desarrollo, Panamá, con colaboración del ingeniero Gustavo N. Collado, del señor Fabián Valdés y del doctor José Manuel Mazón Suástegui del CIBNOR, México.

Además, se realizaron salidas de campo para obtener muestras de Guerrero y Perú. De la misma manera, las muestras del resto de localidades han sido obtenidas mediante salidas de campo organizadas por el Laboratorio de Sistemática y Ecología de Equinodermos-LSEE del Instituto de Ciencias del Mar y

Limnología (ICML), UNAM, y de ejemplares que forman parte de la Colección Nacional de Equinodermos del ICML, UNAM y de la Colección Científica del Instituto del Mar Del Perú-IMARPE. Por otro lado, algunas muestras de Perú y Chiapas fueron donadas por el Biólogo Yuri Hooker y por el estudiante Marco A. Rodas Castillo, respectivamente. Se realizaron muestreos en las localidades de La Paz, con colaboración de la doctora Dinorah Herrero Pérezrul del Instituto Politécnico Nacional; en Costa Rica, con colaboración del biólogo Tito Sancho M., y en Guaymas, Sonora, sin obtener muestras de la especie en estudio.

Tabla 2-1 Número de muestras por localidad

En la columna “origen del material” el número entre paréntesis indica la cantidad de muestras.

Localidad	Abreviatura	N de muestras	Origen del material
La Paz	LP	2	Salida de campo del LSEE
Sonora	So	1	Salida de campo del LSEE
Sinaloa	Si	6	Colección Nacional de Equinodermos del ICML-UNAM (5), Marco A. Rodas Castillo (1).
Jalisco	J	17	Colección Nacional de Equinodermos del ICML-UNAM (16), salida de campo del LSEE (1)
Michoacán	M	21	Salida de campo del LSEE
Guerrero	G	30	Salida de campo del LSEE (4), Elba Prieto Rios (26)
Oaxaca	O	29	Dr. Francisco Benitez Villalobos (27), salida de campo del LSEE (2)
Chiapas	C	30	Heleni Eunice Cansino Guzmán (19) y Marco A. Rodas Castillo (11)
El Salvador	ES	32	Dr. José Enrique Barraza
Panamá	Pa	28	Ing. Zedna Ibis Guerra
Perú	Pe	27	IMARPE (4), Yuri Hooker (2), Elba Prieto Rios (21)
Total		223	

### 2.3.1 Determinación taxonómica de los individuos

Se realizó la determinación preliminar de los ejemplares con base en las características morfológicas externas descritas por diferentes autores, entre ellas los siguientes caracteres: papilas dispersas en la superficie dorsal, pies ambulacrales pequeños en relación con las papilas y coloración de los individuos de rojizo a gris con tentáculos negros (Semper 1868, Deichmann 1938, Solís-

Marín *et al.* 2009). La determinación taxonómica de los ejemplares se realizó *in situ*, usando la clave de Solís-Marín *et al.* (2009).

## 2.4 Estudio molecular

### 2.4.1 Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído según el procedimiento de Honey-Escandón *et al.* (2012) (Anexo 1).

### 2.4.2 Cuantificación de ADN y electroforesis

La concentración de ácidos nucleicos se determinó midiendo la absorbencia a 260 nm y multiplicando por el factor de concentración (50 ug/ml). Por otro lado, las proteínas absorben a 280 nm y el cociente  $A_{260}/A_{280}$  se emplea para calcular la pureza de los ácidos nucleicos. El cociente para ADN puro debe ser de 1.7 a 2.0. Una absorción a 230 nm significa que la muestra está contaminada con hidratos de carbono, péptidos, fenoles, compuestos aromáticos u otras sustancias. El cociente  $A_{260}/A_{230}$  de las muestras puras deberá ser de 2.2 aproximadamente. En la tabla 2.2 el cociente  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$  muestra el grado de impureza del ADN.

Tabla 2-2 Tabla de pureza del ADN

	Ácid.Nucl.Conc. (ug/ml)	A260	A280	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$
Si1	48.6	0.97	0.77	1.27	0.1
O7	-625.1	-12.5	-9.7	1.38	47.04
C2	40	0.8	0.68	1.18	0.23
ES2	7.1	0.143	0.082	1.74	1.29
ES33	299.8	6	4.3	1.39	0.19
Pa1	6.8	0.14	0.08	1.63	0.17
Pa2	14.7	0.29	0.19	1.59	0.17
Pa3	21.5	0.43	0.38	1.14	0.09
Pa4	19.4	0.39	0.22	1.76	0.03
Pa26	62.8	1.26	0.74	1.69	0.5
Pe14	70	1.4	0.98	1.42	0.2

De acuerdo con los análisis de cuantificación de ADN mediante espectrofotometría (tabla 2.2), más del 50% del ADN obtenido podría tener impurezas (el cociente  $A_{260}/A_{280}$  para ADN puro debe ser de 1.7 a 2.0), razón por la que no se obtuvieron resultados positivos en todas las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR *Polimerase Chain Reaction*). Para solucionar esto, se aplicó un protocolo de limpieza de ADN utilizando *PCR Purification Kit, QUIAquick*, que se explicará más adelante (Anexo 2).

Los resultados de la extracción de ADN y los PCRs se corroboraron por medio de la electroforesis de gel de agarosa, método empleado para separar macromoléculas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas.

Se realizaron las siguientes preparaciones para la electroforesis:

Preparación de Buffer TBE 10X (pH=8.3) Solución stock 1x, se hizo una sola disolución con una concentración % m/v de las siguientes solutos: 10.8 % m/v de Tris base; 5.5 % m/v de ácido bórico; 0.93 % m/v de  $Na_4EDTA$ . Para la preparación solución estándar 10x hacer una solución al 10 % v/v a partir de la solución stock 1x.

Preparación de los geles de agarosa Se preparó una disolución al 1 % m/v de agarosa con buffer TBE 1X. A la disolución anterior se le adicióno 0.0005 % v/v de Red Gel.

Para estimar el tamaño de las moléculas de ADN obtenidas en el PCR se usó una escalera "*Ladder*" de peso molecular, la cual contiene fragmentos de ADN de varios tamaños (Fig. 2.5).

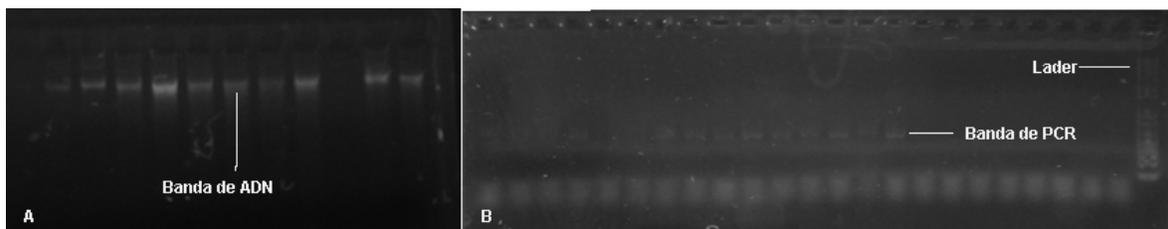


Fig. 2.5 Productos de la extracción de ADN genómico (A). Productos de PCR (B).

Panel A, productos de ADN de once organismos separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% de la localidad de Panamá. Panel B, amplificación del ADN mediante las PCRs (540 pb) usando los primers CO1F 5´ATGGCTTTTCCCCGAATGAA3´ CO1R 5´ACACCATTCTAGATACCCGA3´

### 2.4.3 Purificación de ADN

Para la limpieza de ADN se utilizó el “*PCR Purification Kit*”, QUIAquick y se siguió el protocolo detallado en el Anexo 2.

### 2.4.4 Amplificación y secuenciación del ADN

Se amplificaron aproximadamente 540 pb del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa 1 (CO1) utilizando iniciadores específicos diseñados para este estudio a partir de una secuencia de *H. inornata* de la página del *GenBank*, los iniciadores utilizados son: CO1 Forward 5´ATGGCTTTTCCCCGAATGAA3´ y CO1 Reverse 5´ACACCATTCTAGATACCCGA3´. Las PCRs fueron realizadas siguiendo un ciclo de desnaturalización de 30 segundos a 95°C; y 40 ciclos con los siguientes pasos: 95°C por 30 segundos, 42°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto. Extensión final de 4 minutos a 72°C y finalmente a 4°C (Honey-Escandón *et al.* (2012).

Los detalles del protocolo de PCRs se mencionan en el anexo 3. El ADN amplificado mediante las PCRs fue secuenciado, con un oligonucleotido, en el *High Throughput Genomics Center*, en la University of Washington, Department of Genome Sciences, EE.UU.

### 2.4.5 Alineación de las secuencias

Las secuencias obtenidas tuvieron casi la misma longitud (aproximadamente 540 pb) y siguieron un patrón de tripletes por lo que las homologías entre los diferentes nucleótidos se pudieron establecer de forma inequívoca. Las alineaciones se llevaron a cabo de forma manual y automática. Inicialmente se trabajó de forma manual, para lo cual se obtuvo una secuencia consenso sobre la cual se trabajaron las otras y se corroboró cada base nitrogenada de las secuencias con los electroferogramas, luego se cortaron 87 pb entre ambos extremos debido a

que los inicios y finales de las secuencias eran confusos. Finalmente las secuencias se editaron con el programa BioEdit (*Biological Sequence Alignment Editor*) ver. 7.0.9.0 y para su alineamiento se empleó la opción *Clustal W Multiplealignment* disponible en este mismo programa; este programa utiliza algoritmos matemáticos que tiene en cuenta parámetros, como por ejemplo el costo de introducir un espacio, entre otros, seleccionando la opción que optimice el criterio establecido.

## **2.5 Análisis filogeográfico**

### **2.5.1 Diversidad genética**

Los análisis de variación genética se realizaron (a) a nivel de nucleótidos, para *H. inornata* y (b) para cada localidad, usando parámetros de diversidad genética, número de sitios polimórficos, número promedio de diferencias por pares y diversidad nucleotídica por medio del programa ARLEQUIN 3.1.

### **2.5.2 Estructura genética**

Para entender la diferenciación o similitud de las poblaciones se utilizaron estadísticos F de Wright (Wright 1951) y el análisis de varianza molecular (AMOVA), así como el test exacto de diferenciación poblacional (Raymond y Rousset 1995) y el test de Mantel (Mantel 1967).

#### Estadístico Fst de Wright

Los valores de Fst por pares entre las localidades en este estudio fueron estimados utilizando el programa ARLEQUIN 3.1. La distribución de los valores de Fst se obtuvo efectuando 10100 permutaciones a partir de la matriz de haplotipos, estos valores se compararon con el valor de  $p$ , considerando  $p = 0.05$  como significativo. Estos análisis se realizaron sobre la base de datos de frecuencia haplotípica sin tomar en cuenta distancias genéticas entre haplotipos.

#### Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

AMOVA se utilizó para estimar la diferenciación poblacional, a partir de las secuencias obtenidas, y probar hipótesis acerca de su estructura entre

poblaciones, dentro de grupos y dentro de poblaciones (Excoffier *et al.* 1992). Se realizaron varios Análisis de varianza molecular (AMOVA) considerando diferentes agrupaciones de acuerdo con propuestas de provincias del POT presentadas por varios autores, las cuales se consideran como hipótesis que pueden explicar la estructura genética de las poblaciones. Las agrupaciones consideradas son las siguientes:

- (i) Si-O: Sinaloa, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca; C-ES: Chiapas, El Salvador; Pa-Pe: Panamá, Perú;
- (ii) Si-O: Sinaloa, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca; C-Pe: Chiapas, El Salvador, Panamá, Perú;
- (iii) Si-ES: Sinaloa, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, El Salvador; Pa-Pe: Panamá, Perú.

A continuación se muestra el modelo de tabla con los datos que se obtendrán de los AMOVA (Tabla 2-3).

Tabla 2-3 Tabla de AMOVA

Fuente de variación	Varianza total (%)	Índices de fijación	Valores- <i>p</i>
Entre grupos		FCT	
Entre poblaciones, dentro de grupos		FSC	
Dentro de poblaciones		FST	

#### Test exacto de diferenciación poblacional

Este test consiste en probar la hipótesis nula de una distribución aleatoria de  $k$  diferentes haplotipos entre  $r$  poblaciones siguiendo el procedimiento descrito por Raymond y Rousset (1995) implementado en ARLEQUIN. El software ARLEQUIN genera un valor de  $F_{st}$  corregido (valor de  $F_{st}$  cercano a lo que ocurre en poblaciones naturales) empleando el algoritmo matemático de las Cadenas de Markov. El resultado obtenido del valor de  $p$ , si no es significativo, se acepta la hipótesis nula.

#### Test de Mantel

Este test se utiliza para determinar el grado de correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas entre pares de poblaciones, para lo cual se

realizan pruebas de asociación de matrices de distancia genética (Fst) y de distancia geográfica. La hipótesis nula es que las matrices no están correlacionadas linealmente. El riesgo de rechazar la hipótesis nula cuando es verdadera es  $< 0.15\%$ . Cuando el  $p$ -valor computado es menor que el nivel de significación alfa, se debe rechazar la hipótesis nula. El nivel de significación alfa es de  $5\%$ . Se calcula el  $p$ -valor utilizando la distribución de  $r(AB)$  estimada a partir de 10000 permutaciones. A continuación se muestra un modelo de la matriz que se utilizó (Tabla 2-4):

Tabla 2-4 Modelo de matriz con valores de Fst y distancia geográfica

Fst o Dist. Geográfica	Si	J	M	G	O	C	ES	Pa	Pe
Sinaloa									
Jalisco									
Michoacán									
Guerrero									
Oaxaca									
Chiapas									
El Salvador									
Panamá									
Perú									

### 2.5.3 Redes de haplotipos

Se utilizó el programa TCS versión 1.21 (Clement *et al.* 2000) que hace aproximaciones tipo redes con el método de parsimonia estadística con una confianza de  $95\%$ . La edición de la red de haplotipos se hizo manualmente en el programa Microsoft Excel 2010.

### 2.5.4 Demografía histórica

Para inferir procesos demográficos pueden utilizarse:

#### Indicadores de diversidad haplotípica y nucleotídica

Grant y Bowen (1998) sugieren que los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica, además de medir la diversidad genética, pueden ser utilizados para determinar procesos demográficos, es así que según la combinación de diversidad haplotípica y nucleotídica se podrían clasificar en cuatro grupos (Fig. 2.6).

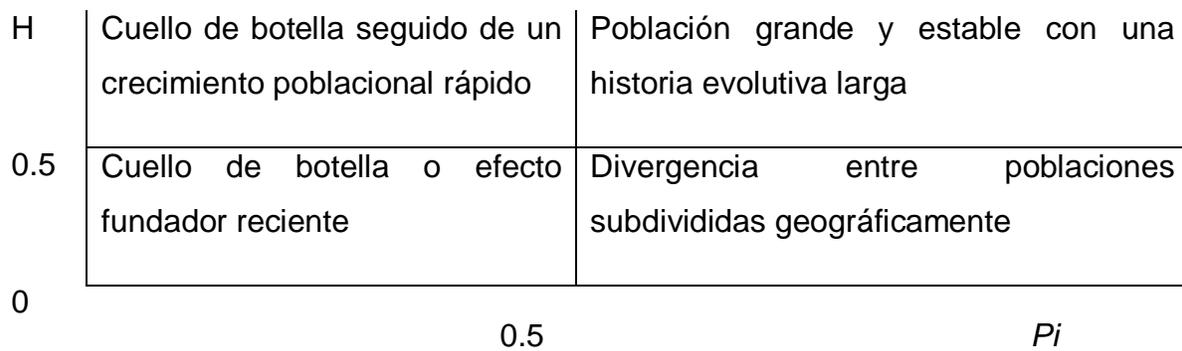


Fig. 2.6 Clasificación de procesos demográficos de acuerdo con los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica según Grant y Bowen 1998

Distribución de las diferencias por parejas (*Mismatchdistribution*)

Los episodios de crecimiento, cuello de botella, tiempo desde que sucedió el evento y tamaño inicial en una población se pueden estimar por medio de la distribución de *mismatch*, la cual cuenta el número de diferencias entre cada par de secuencias en una población (Rogers 2002) y el resultado permite construir un histograma. Los datos de este histograma se comparan con el modelo de una población en expansión repentina. Con una prueba de  $\chi^2$  estadísticamente significativa se acepta que la diferencia entre ambas no es debida al azar, y se observa en la estructura de la gráfica si las poblaciones experimentaron recientemente un crecimiento exponencial (Zink y Blackwell-Rago 2000). Este modelo tiene una distribución unimodal cuando las poblaciones han sufrido expansiones demográficas recientes y multimodal cuando las poblaciones están en equilibrio demográfico. Se obtendrá una gráfica (Fig. 2.7) con la distribución de las diferencias observadas y esperadas.

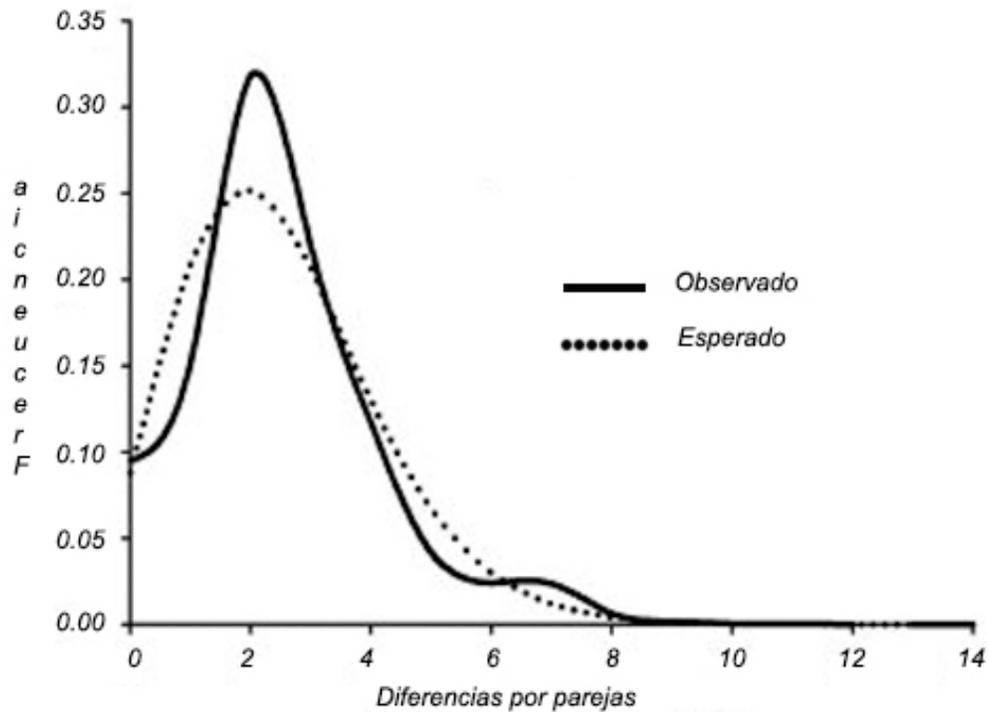


Fig. 2.7 Gráfica de distribución por Mismatch

### Pruebas de neutralidad

#### D de Tajima

En esta prueba, en caso de expansión poblacional, debido al exceso de *singletons* y variantes de baja frecuencia, los valores de  $D$  serán negativos. Mientras que en una población subestructurada  $D$  es positiva. Por otra parte, los valores significativos pueden ser debido a cuellos de botella, expansiones poblacionales o tasas de mutación heterogénea. La significación estadística se obtiene generando muestras aleatorias bajo la hipótesis nula de neutralidad selectiva y equilibrio poblacional usando algoritmos implementados en ARLEQUIN (Tajima 1989).

#### Fs de Fu

Esta prueba es eficiente para detectar expansión poblacional, indicando que si hay un exceso de mutaciones con baja frecuencia los valores de  $F_s$  serán negativos. La significación estadística se obtiene generando muestras aleatorias bajo la hipótesis nula de neutralidad selectiva y equilibrio poblacional usando algoritmos implementados en ARLEQUIN. La significación estadística es la misma que la de  $D$  de Tajima (Fu 1997).

# Capitulo 3 Resultados

### 3.1 Amplificación

Se obtuvieron los siguientes electroferogramas (Fig. 3.1)

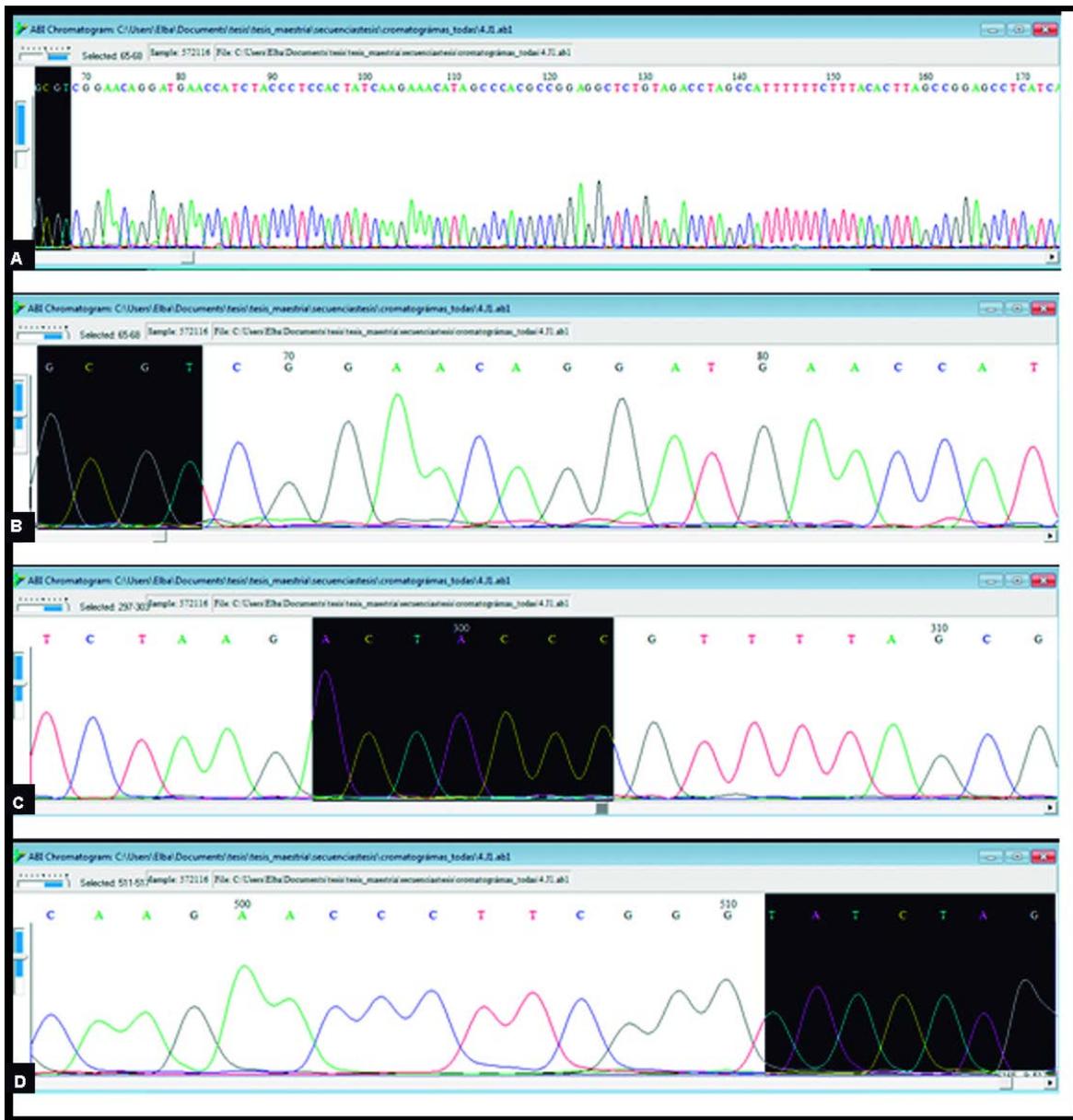


Fig. 3.1 Muestra de los Electroferogramas del fragmento COI amplificados. En este caso la muestra fue obtenida de Jalisco. A, vista reducida. B, vista ampliada en la parte inicial de la secuencia. C, vista ampliada en la parte media de la secuencia. D, vista ampliada en la parte final de la secuencia.

### 3.2 Diversidad genética

Los estimadores genéticos para la especie *H. inornata* se calcularon con base en el gen CO1, considerando todas las secuencias disponibles incluyendo las localidades de La Paz y Sonora (Tabla 3-1).

Tabla 3-1 Estimadores de diversidad genética para *Holothuria inornata*

Estimadores de diversidad genética con base en CO1	<i>H. inornata</i>
Número de individuos (N)	223
Número de sitios (pares de bases)	453
Número de haplotipos (h)	118
Número de sitios segregantes (S)	97
Polimorfismo (%)	21.41
Número promedio de diferencias nucleotídicas (k) (%)	7.534
Diversidad de haplotipos (Hd)	0.979
Diversidad nucleotídica ( $\pi$ )	0.017

Para los análisis por localidades no se incluyeron las localidades de La Paz y Sonora debido a que tienen dos y un individuo, respectivamente (Tabla 3-2).

Tabla 3-2 Estimadores de diversidad genética para cada localidad

Región	Localidad	Código	CO1		
			N	Hd	$\pi$
Mexicana	Sinaloa	Si	6	0.8	0.008
Mexicana	Jalisco	J	17	0.934	0.007
Mexicana	Michoacán	M	21	0.948	0.012
Mexicana	Guerrero	G	30	0.959	0.009
Mexicana	Oaxaca	O	29	0.968	0.009
Panámica	Chiapas	C	30	0.977	0.016
Panámica	El Salvador	ES	32	0.978	0.015
Panámica	Panamá	Pa	28	0.968	0.015
Panámica	Perú	Pe	27	0.969	0.014

Se detectaron 118 haplotipos en 223 individuos y las diferencias entre dichos haplotipos fueron debidas a 97 sitios variables en los 453 pb secuenciados (21.41%). La diversidad haplotípica, expresada como la probabilidad de encontrar

dos haplotipos diferentes en la muestra de 223 individuos, fue de 0.979. La diversidad nucleotídica, la cual expresa la probabilidad de encontrar sitios nucleotídicos diferentes entre secuencias de la misma población, es de  $\pi=0.017$  (Tabla 3-1).

En los análisis por localidades, la diversidad haplotípica, estuvo entre 0.8 en Sinaloa y 0.978 en El Salvador. Las mayores diversidades nucleotídicas se encontraron en diferentes localidades, Michoacán ( $\pi=0.012$ ), Chiapas ( $\pi=0.016$ ), El Salvador ( $\pi=0.015$ ), Panamá ( $\pi=0.015$ ) y Perú ( $\pi=0.014$ ). Sin embargo, las menores diversidades nucleotídicas fueron registradas en Sinaloa ( $\pi=0.008$ ), Jalisco ( $\pi=0.007$ ), Guerrero (0.009) y Oaxaca (0.009) (Tabla 3-2).

Resulta claro que los valores de  $F_{st}$  son altos y significativos al comparar entre poblaciones de las provincias Mexicana y Panámica, observándose nula diferenciación dentro de estos dos grupos. El valor de  $F_{st}$ , el cual expresa el flujo de genes, se incrementa a medida que aumenta la distancia geográfica. Es decir, el flujo de genes entre Chiapas/El Salvador/Perú vs. Sinaloa va disminuyendo ( $F_{st}=0.341, 0.359, 0.434$  respectivamente). De la misma manera sucede entre Chiapas/El Salvador/Perú vs. Jalisco, Guerrero y Oaxaca, respectivamente. Algunas de estas comparaciones no siguieron el patrón, pues Sinaloa vs. Panamá, tiene el mismo valor de  $F_{st}$  (0.359) que Sinaloa vs. El Salvador, y lo que se esperaría sería que el valor de  $F_{st}$  sea mayor. Por otra parte, Jalisco/Michoacán/Guerrero vs. Panamá arrojó valores de  $F_{st}$  menores (0.414, 0.350, 0.418) que Jalisco/Michoacán/Guerrero vs. El Salvador (0.416, 0.356, 0.419), y lo esperado es un valor mayor como en el caso de Oaxaca vs. El Salvador (0.394) con respecto a Oaxaca vs. Panamá (0.395) (Tabla 3-3).

El Test Exacto indica que hay diferenciación entre los grupos, pues en la mayoría de los casos corrobora lo encontrado en los estadísticos  $F_{st}$ ; excepto entre El Salvador/Panamá/Perú vs Sinaloa, entre estas localidades el test no marco diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) (Tabla 3-3).

### 3.3 Estructura genética

#### 3.3.1 Estadístico Fst de Wright y Test exacto de diferenciación poblacional

Se muestran en la tabla 3-3, para las nueve localidades con base en el gen CO1, los valores de Fst en la parte inferior diagonal. Los valores de  $p$  significativos se indican con (\*) =  $p < 0.05$ . Los valores del test exacto de diferenciación poblacional se muestran en la parte diagonal superior. Longitud de la cadena de Markov: 100000 pasos.  $p < 0.05$ . Los valores de  $p$  significativos se indican con (\*) (Tabla 3-3).

Tabla 3-3 Tabla de Fst y Test exacto de diferenciación poblacional de *H. inornata* con base en el gen CO1

	Sinaloa	Jalisco	Michoacán	Guerrero	Oaxaca	Chiapas	El Salvador	Panamá	Perú
Si(1)		0.500+0.007	0.150+0.011	0.437+0.015	0.458+0.015	<b>0.035+0.003*</b>	0.135+0.014	0.064+0.005	0.108+0.010
J(2)	0		0.406+0.011	0.784+0.010	0.707+0.009	<b>0.012+0.002*</b>	<b>0.004+0.001*</b>	<b>0.002+0.001*</b>	<b>0.003+0.001*</b>
M(3)	0	0		0.420+0.012	0.729+0.012	<b>0.019+0.003*</b>	<b>0.003+0.001*</b>	<b>0.001+0.001*</b>	<b>0.002+0.001*</b>
G(4)	0	0	0		0.961+0.002	<b>0.005+0.003*</b>	<b>0.000+0.000*</b>	<b>0.000+0.000*</b>	<b>0.000+0.000*</b>
O(5)	0	0	0	0		<b>0.003+0.001*</b>	<b>0.004+0.001*</b>	<b>0.000+0.000*</b>	<b>0.000+0.000*</b>
C(6)	<b>0.341*</b>	<b>0.396*</b>	<b>0.336*</b>	<b>0.401*</b>	<b>0.378*</b>		0.122+0.011	0.147+0.014	0.208+0.008
ES(7)	<b>0.359*</b>	<b>0.416*</b>	<b>0.356*</b>	<b>0.419*</b>	<b>0.394*</b>	0		0.900+0.009	0.964+0.004
Pa(8)	<b>0.359*</b>	<b>0.414*</b>	<b>0.350*</b>	<b>0.418*</b>	<b>0.395*</b>	0	0		0.899+0.006
Pe(9)	<b>0.434*</b>	<b>0.484*</b>	<b>0.416*</b>	<b>0.481*</b>	<b>0.458*</b>	0	0	0	

### 3.3.2 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

Tabla 3-4 Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) para diferentes agrupaciones. Si: Sinaloa, O: Oaxaca, C: Chiapas, ES: El Salvador, Pa: Panamá, Pe: Perú.

Grupos (con base en el gen CO1)	Fuente de variación	Varianza total (%)	Índices de fijación	Valores- $p$
(i) Si-O vs C-ES vs Pa-Pe (Hasting 2000)	Entre grupos	36.09	FCT=0.361	0.01*
	Entre poblaciones, dentro de grupos	0	FSC=0	0.98
	Dentro de poblaciones	65.12	FST=0.349	0*
(ii) Si-O vs C-Pe (Landini <i>et al.</i> 2001)	Entre grupos	41.95	FCT=0.420	0*
	Entre poblaciones, dentro de grupos	0	FSC=- 0.018	0.99
	Dentro de poblaciones	59.10	FST=0.409	0*
(iii) Si-ES vs Pa-Pe (Briggs 1974)	Entre grupos	13.71	FCT=0.137	0.13
	Entre poblaciones, dentro de grupos	19.76	FSC=0.229	0*
	Dentro de poblaciones	66.53	FST=0.335	0*

Los resultados del análisis de varianza molecular arrojaron que la mayor varianza era explicada significativamente por la diferencia entre los grupos de las provincias Mexicana y Panámica (Si-O vs. C-Pe), con 41.95% aproximadamente de varianza total. Esto corrobora lo encontrado en los análisis de estructura genética (estadístico  $F_{st}$  y test exacto). Sin embargo aunque la mayor fue encontrada entre los grupos de la provincia Mexicana y Panámica, también se detectó una varianza significativa (36.09%) entre las agrupaciones de las localidades Si-O vs. C-ES vs Pa-Pe (Tabla 3-4).

### 3.3.3 Test de Mantel

Para realizar el test de Mantel se correlacionaron dos matrices, la primera con los valores de  $F_{st}$  de la Tabla 3-3 y la segunda matriz con las distancias geográficas. Las distancias geográficas se obtuvieron utilizando el software Google Earth y se elaboró la matriz de la Tabla 3-5.

Tabla 3-5 Matriz de distancias geográficas en kilómetros

Dist. Geográf.	Si	J	M	G	O	C	ES	Pa	Pe
Sinaloa	0	520	845	1345	1589	2100	2426	4108	6080
Jalisco	520	0	325	825	1069	1580	1906	3588	5560
Michoacán	845	325	0	500	744	1255	1581	3263	5235
Guerrero	1345	825	500	0	244	755	1081	2763	4735
Oaxaca	1589	1069	744	244	0	511	837	2519	4491
Chiapas	2100	1580	1255	755	511	0	326	2008	3980
El Salvador	2426	1906	1581	1081	837	326	0	1682	3654
Panamá	4108	3588	3263	2763	2519	2008	1682	0	1972
Perú	6080	5560	5235	4735	4491	3980	3654	1972	0

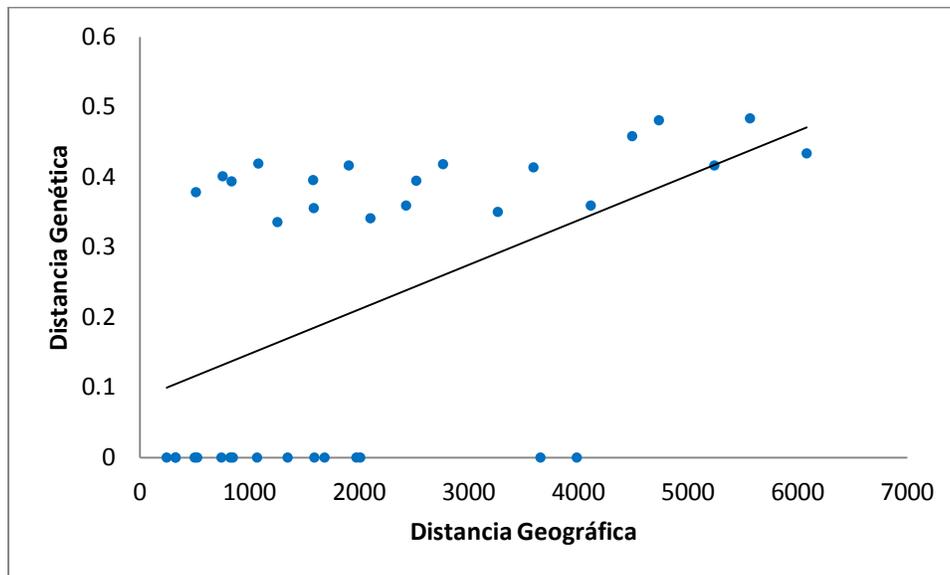


Fig. 3.2 Gráfica de distancias geográficas vs. distancias genéticas

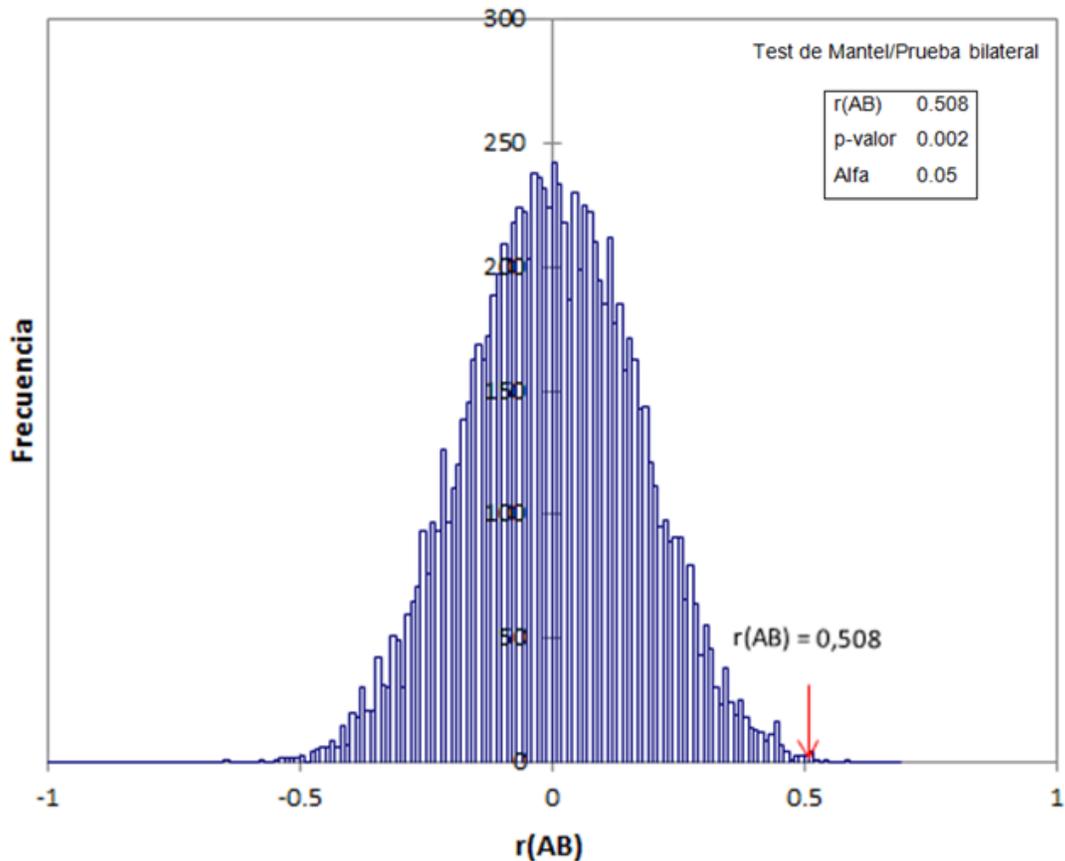


Fig. 3.3 Histograma obtenido de la correlación entre los valores de Fst y las distancias geográficas.

En  $r(AB)$ , A = valores de Fst, B= valores de las distancias geográficas.

Al observar el gráfico de la correlación entre las distancias genéticas y geográficas (Fig. 3.2), puede parecer que, no existe correlación. Por otra parte, la significancia ( $p=0.002$ ) de la prueba de Mantel se obtuvo a partir de 10000 permutaciones, por lo que los resultados arrojan que existe una correlación positiva entre la distancia genética y la distancia geográfica lineal (Fig. 3.2). Sin embargo, esta correlación no es muy alta ( $r(AB)=0.508$ ), pues un valor alto debería ser mayor a 0.8.

### 3.4 Redes de haplotipos

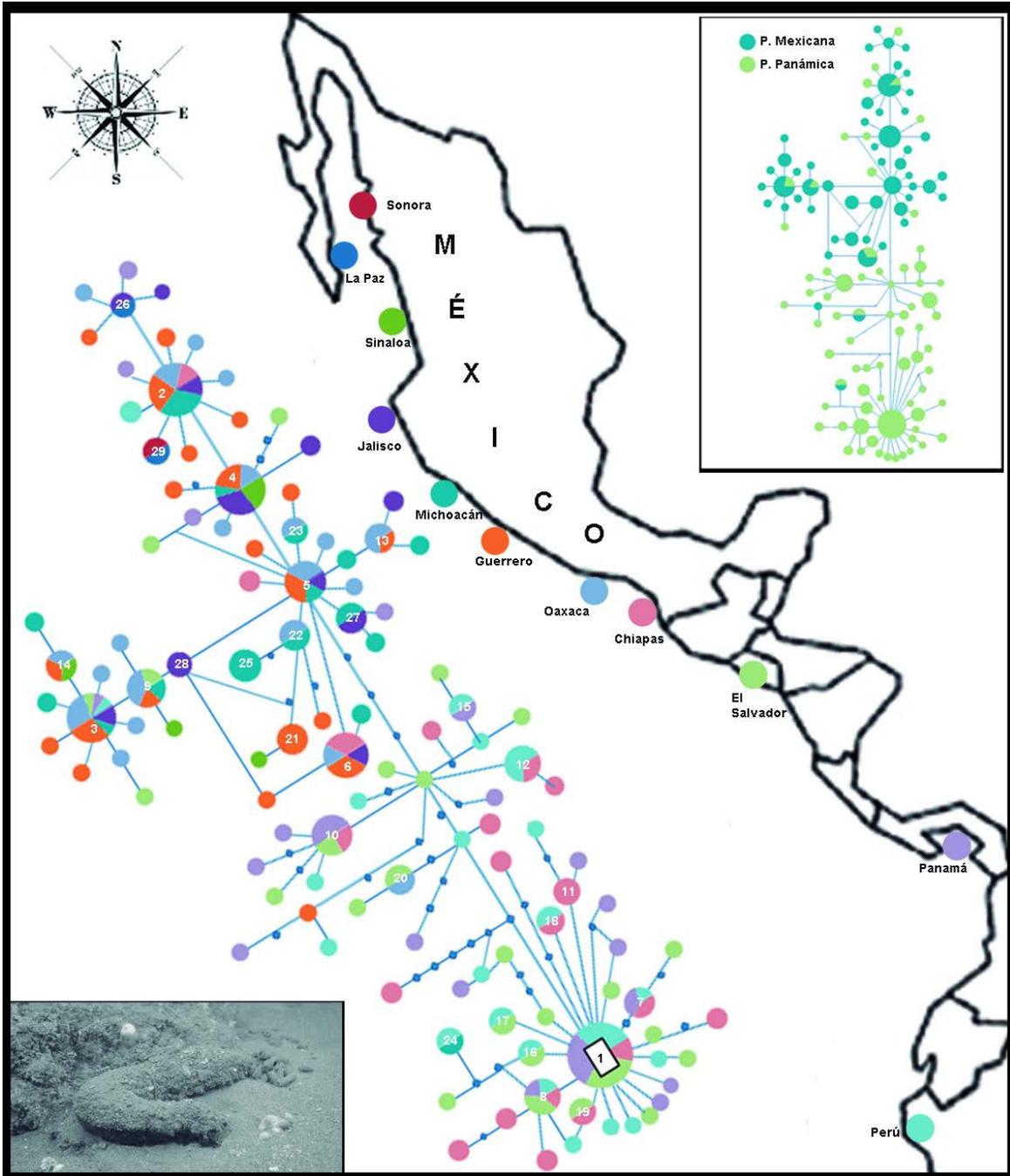


Fig. 3.4 Red de haplotipos.

Los círculos a lo largo del mapa indican el color de cada localidad. En la esquina superior derecha se muestra la misma red de haplotipos coloreada por provincia. En la esquina inferior izquierda *H. inornata* (Foto: Carlos Sánchez). Los haplotipos que solo están en un individuo no tienen número. Cada línea de la red de haplotipos representa un solo cambio mutacional. Los puntos pequeños de color negro indican haplotipos perdidos,

probablemente no muestreados o extintos. El tamaño de los círculos es proporcional al número de individuos que presentan cada haplotipo y las divisiones dentro de cada círculo representan la proporción de individuos de cada localidad.

Los haplotipos compartidos aparecen enumerados, en orden desde el más frecuente, el haplotipo con el cuadrado y el número 1 es el que por el método se deduce ser el ancestral y el más común.

Se observa que las redes de abajo a arriba, como hasta la mitad, incluyen la mayoría de los haplotipos de Perú, Panamá, El Salvador y Chiapas (provincia Panámica); y a medida que se va hacia arriba empiezan a aparecer los haplotipos de las otras localidades hacia el norte (Fig. 3.4). Los haplotipos que no se ajustan a este patrón son CO1-2, CO1-3, CO1-4, CO1-6 y CO1-9 (Fig. 3.4) (Tabla 3-6). En la parte superior están los haplotipos de los individuos de La Paz y Sonora, que sí se incluyen en esta red.

La red derivada de los datos del gen CO1 mostró una genealogía en forma de estrella. Los haplotipos más frecuentes: CO1-1, CO1-2, CO1-3 y CO1-4, se encontraron en 7.6%, 7.2%, 6.3% y 5.8% de los individuos, respectivamente. El haplotipo principal es el ancestral y más común (CO1-1), fue detectado en todas las localidades muestreadas en la provincia Panámica. El segundo haplotipo más común fue detectado en Chiapas y en todas las localidades de la provincia Mexicana, excepto en Sinaloa. El tercer haplotipo compartido (CO1-3) está ampliamente distribuido en todas las localidades de las dos provincias, excepto en Chiapas y Sinaloa.

Tabla 3-6 Tabla de haplotipos (118) con el número de individuos (223) por localidad (11)

	LP	So	Si	J	M	G	O	C	ES	Pa	Pe		LP	So	Si	J	M	G	O	C	ES	Pa	Pe		LP	So	Si	J	M	G	O	C	ES	Pa	Pe			
1	0	0	0	0	0	0	0	2	5	5	5	17	41	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	81	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
2	0	0	0	0	2	5	4	3	2	0	0	0	16	42	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	82	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
3	0	0	0	2	1	4	4	0	1	1	1	14	43	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	83	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
4	0	0	3	4	1	3	2	0	0	0	0	13	44	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	84	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
5	0	0	0	1	1	2	2	0	0	0	0	6	45	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	85	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
6	0	0	0	1	0	2	1	2	0	0	0	6	46	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	86	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
7	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	1	5	47	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	87	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
8	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1	5	48	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	88	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
9	0	0	0	0	1	1	2	0	1	0	0	5	49	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	89	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
10	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	4	50	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	90	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
11	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	4	51	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	91	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
12	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	52	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	92	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
13	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	3	53	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	93	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
14	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	3	54	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	94	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	55	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	95	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
16	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	56	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	96	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
17	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	57	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	97	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
18	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	58	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	98	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
19	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	59	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
20	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	60	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
21	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	61	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	101	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
22	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	62	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	102	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
23	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	63	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	103	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
24	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	64	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	104	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
25	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	65	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	105	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
26	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	66	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	106	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
27	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2	67	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	107	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
28	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	68	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	108	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
29	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	69	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	109	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	70	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	110	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	71	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	111	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	72	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	112	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	73	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	113	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	74	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	114	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	75	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	115	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	76	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	116	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	77	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	117	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	78	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	118	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	79	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	118	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	80	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	118	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1

Las columnas en gris indican el nombre del haplotipo. Las columnas en azul indican las localidades de la provincia Panámica y en verde de la Mexicana. La columna en blanco muestra cuantos individuos tienen algún haplotipo. Se encontró que apenas el 6% de los haplotipos son compartidos por individuos de las provincias Mexicana y Panámica (color naranja en la Tabla 3-6).

### 3.5 Demografía histórica

#### 3.4.1 Distribución de las diferencias por parejas (*Mismatch distribution*)

Dada la diferenciación encontrada entre las poblaciones de las provincias Mexicana y Panámica, se llevó a cabo el análisis demográfico considerando el grupo de poblaciones en cada provincia como una unidad panmíctica e independiente (Fig. 3.5; Fig. 3.6).

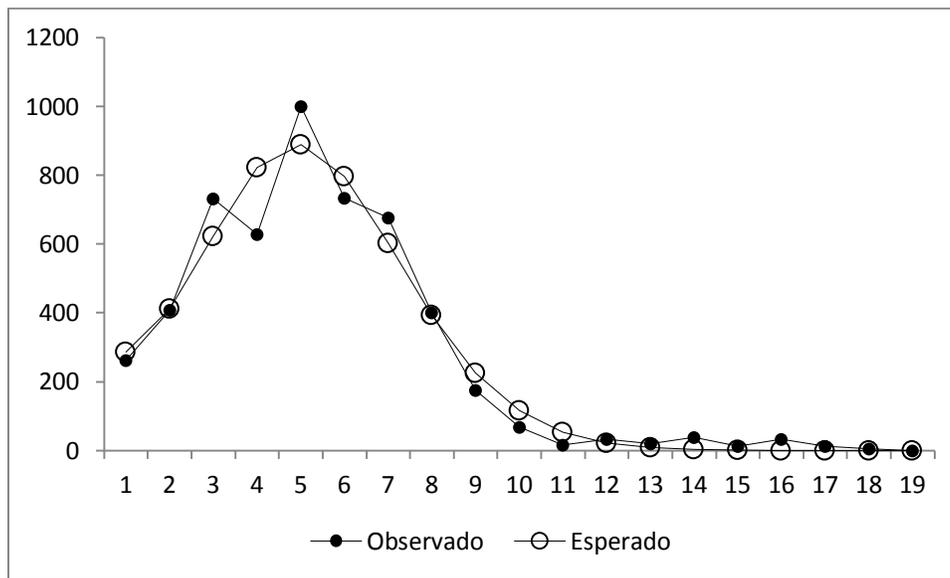


Fig. 3.5 Gráfica de *Mismatch* para las poblaciones de la provincia Mexicana

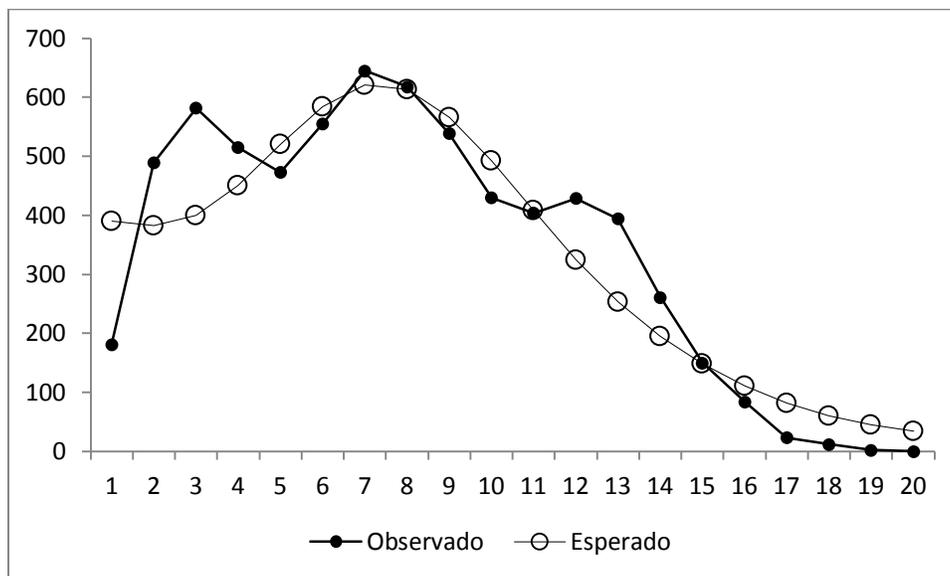


Fig. 3.6 Gráfica de *Mismatch* para las poblaciones de la provincia Panámica

Tabla 3-7 Parámetros de expansión poblacional y pruebas de neutralidad con base en el gen CO1 para las provincias Mexicana y Panámica.

Parámetros	Provincia Mexicana	Provincia Panámica
T	4.646	5.934
$\Theta_0$	0.023	2.995
$\Theta_1$	20.088	16.533
Tiempo de expansión (1.5%/m.a.)	3,418,690.213	4,366,445.916
Ajuste de la prueba		
SSD	0.003	0.003
$\rho$	0.526	0.822
D de Tajima	-1.894	-1.769
$\rho$	<b>0.006*</b>	<b>0.01*</b>
Fs de Fu	-25.756	-24.96
$\rho$	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>

La distribución de las diferencias de sitios nucleotídicos entre pares de haplotipos, mostró una distribución bimodal en las poblaciones de la provincia Mexicana (Fig. 3.5) y multimodal en las poblaciones de la provincia Panámica (Fig. 3.6), por lo que se podría sugerir que las poblaciones se encuentran en equilibrio demográfico. Sin embargo, los parámetros de expansión poblacional y las pruebas de neutralidad detectaron que no hay diferencias entre lo observado y lo esperado en las provincias Mexicana y Panámica; es decir, los datos se ajustan a un modelo de expansión poblacional súbita, rechazando la hipótesis nula de neutralidad (Tabla 3-7).

Para estimar el tiempo aproximado de expansión de las poblaciones de *H. inornata*, se utilizó la fórmula  $t = 1T / 2uk$ . Se consideró una tasa de mutación de 1.5 % / m.a. para el gen CO1 estimado para equinoideos (Lessios *et al.* 2001). El tiempo de expansión calculado para la población mexicana es de aproximadamente 3.4 m.a. y para la Panámica 4.3 m.a. (Tabla 3-7).

## **Capitulo 4 Discusión y conclusiones**

## 4.1 Discusión

Los marcadores mitocondriales son una herramienta útil para estudiar las genealogías de especies de distintos grupos, entre ellas de equinodermos. Sin embargo, como estos análisis se basan en un solo locus mitocondrial (CO1), estos resultados deben tomarse con cautela, pues es deseable realizar más análisis e incluso utilizar otros marcadores.

*Holothuria inornata* muestra alta diversidad de haplotipos ( $H_d=0.979$ ) e intermedia diversidad nucleotídica ( $\pi=0.017$ ) (Tabla 3-1). En *Holothuria atra*, otra especie de la clase holothuroidea, a partir de 385 individuos recolectados en cinco archipiélagos (islas de Hawai, de la Linea, Marshal, Bonin y Ryukyu), usando CO1 y amplificando un fragmento de 423 pb encontraron 55 haplotipos, diversidad haplotípica de 0.92 y nucleotídica de 0.009 (Skillings *et al.* 2011). Por otra parte, Borrero-Pérez (2010) recolectó individuos de *Holothuria mammata* en ocho localidades, cuatro muestreadas en el océano Atlántico y cuatro en el mar Mediterráneo. Se detectaron 58 haplotipos en los 147 individuos, las diferencias entre dichos haplotipos fueron debidas a 57 sitios variables en los 502 pb amplificados usando CO1. Así mismo, la diversidad haplotípica fue 0.92 y la nucleotídica 0.007. Uthicke y Benzie (2003), en 360 muestras de *Holothuria nobilis* recolectadas en Australia e isla La Reunión, detecto 106 haplotipos en los 559 pb secuenciados usando CO1, alta diversidad haplotípica (0.942) y baja diversidad nucleotídica (0.0075). En *Arbacia lixula*, otra especie de equinodermo, Wangensteen (2013) encontró, usando CO1, 161 haplotipos en los 604 individuos recolectados, diversidad haplotípica de 0.912 y nucleotídica de 0.0075.

En otro invertebrado marino con ámbito de distribución en todo el archipiélago Indo-Australiano, también analizado con CO1, amplificaron 658 pb y detectaron un total de 355 haplotipos en los 529 individuos del caracol marino, *Nerita albicilla*. Detectaron una diversidad haplotípica de 0.989 y nucleotídica de 0.021 (Crandall *et al.* 2008). Por otra parte, Cassone y Boulding (2006) recolectaron muestras de 346 individuos de *Pachygrapsus crassipes*, a lo largo de la costa del Pacífico nororiental y Corea. Análisis de las secuencias de ADN de 613 pb del gen CO1

mostró 154 haplotipos, alta diversidad haplotípica (0.923) y baja diversidad nucleotídica (0.009).

Por lo tanto, los resultados aquí obtenidos para la diversidad de haplotipos indican que dentro de la región de Pacífico Oriental Tropical (POT), los valores son similares a los observados para otras especies dentro de otras regiones (Occidental, Atlántico, Mediterráneo e Índico), lo cual indica que estas cifras de diversidad son típicas de invertebrados marinos que tienen tamaños poblacionales grandes (Avice *et al.* 1984, Watterson 1984). Por otra parte, aunque el número de individuos no es el mismo en todas las localidades, los valores de diversidad nucleotídica calculados son bajos (0.007-0.009) e intermedios (0.012-0.016), con respecto a los valores de los trabajos mencionados; las cifras están entre 0.007 y 0.016 (Tabla 3-2) y se encuentra en el intervalo de 0.0005 – 0.020 propuesto por Stephan y Langley (1992), quienes mencionaron que dependiendo de los loci y de las especies estudiadas, la diversidad nucleotídica, en una población típica, se encuentra en ese intervalo.

El ámbito de distribución de *H. inornata* comprende la región del POT (Fig. 2.1). Dentro de la región del POT se han reconocido varias provincias y subprovincias con base en la distribución de peces costeros e invertebrados marinos (Fig. 2.2) (Hastings 2000); en la distribución de peces e invertebrados marinos fósiles de la Formación Canoa y actuales (Fig. 2.3) (Landini *et al.* 2002); así como en el porcentaje de endemismo de algunas especies de peces e invertebrados (Briggs 1974). Estas especies de peces e invertebrados marinos viven en la región del POT por las características oceanográficas, geográficas y ecológicas que se formaron después del surgimiento del istmo de Panamá. De la misma manera, es de suponerse que *H. inornata* sea afín con las características de esta región.

Los análisis de diferenciación genética entre las poblaciones muestreadas, que además están ubicadas dentro de la región del POT, fueron determinados por los valores de  $F_{st}$ , el test exacto de diferenciación poblacional (Tabla 3-3) y los análisis de varianza molecular (AMOVA) (Tabla 3-4). Estos análisis sugieren que las localidades muestreadas podrían dividirse en dos poblaciones, las del norte (Sinaloa, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca) que se ubican dentro de la

provincia Mexicana y las del sur (Chiapas, El Salvador, Panamá y Perú) que se ubican dentro de la provincia Panámica o en aguas meridionales adyacentes. Los valores calculados de los análisis de Fst más significativos son los del grupo panámico con respecto a las del mexicano, sugiriendo dos poblaciones; de la misma manera el test exacto de diferenciación poblacional corrobora en la mayoría de los casos lo encontrado en los análisis de Fst.

Además, con base en lo propuesto por Briggs (1974), Hastings (2000) y Landini *et al.* (2002), quienes consideran aspectos geológicos y oceanográficos (orientación de las corrientes marinas, tipo de fondo) para la regionalización marina, y los resultados del Fst y test exacto, se hicieron diferentes agrupaciones para los Análisis de Varianza Molecular (AMOVA). Con base en lo propuesto por Hastings (2000), las muestras de las localidades de Chiapas y El Salvador no pertenecerían a ninguna provincia, pues ambas localidades están ubicadas en un tramo de costa, entre la provincia mexicana y panámica denominado “*Central American Gap*” (Fig. 2.2), con fondos blandos carentes de afloramientos rocosos importantes continuos. De acuerdo con lo anterior, se calcularon los AMOVA para tres grupos, grupo uno: las localidades de Sinaloa, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca; grupo dos: Chiapas y El Salvador; grupo tres: Panamá y Perú. El resultado para esta estructura fue de 36%. Es importante mencionar que las muestras obtenidas de *H. inornata* dentro del “*Central American Gap*”, se encontraban en fondos rocosos, pues esta especie solo vive sobre fondos rocosos y se cubre de una delgada capa de arena.

El mayor porcentaje de varianza fue de 41.95% para las agrupaciones realizadas con base en lo propuesto por Landini *et al.* (2002) (Fig. 4.1), quienes reconocen dos subprovincias desde Mazatlán hasta el norte de Perú: la mexicana (m) que contiene las localidades de Sinaloa, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca, y la panámica sensu estricto (p) que contiene las localidades de Chiapas, El Salvador; Panamá y Perú. Los resultados de esta AMOVA corroboran la estructura que se encontró en los estadísticos Fst y en el test exacto de diferenciación poblacional.

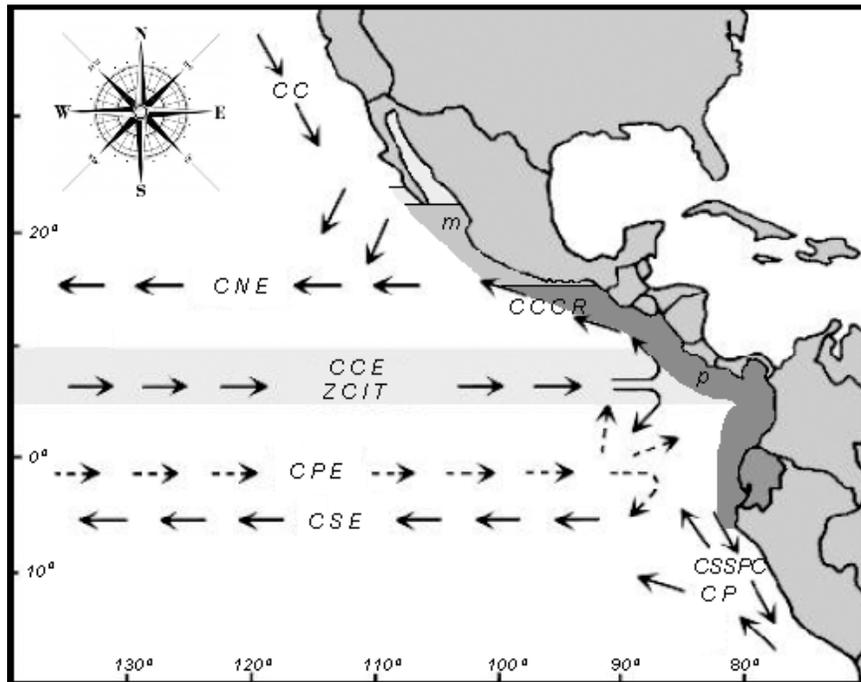


Fig. 4.1 Mapa unificado del sistema de circulación y las provincias biogeográficas del Pacífico Oriental (modificado de Landini *et al.* 2002).

Los valores de  $F_{st}$  aquí obtenidos están entre 0.336 – 0.48. En otras especies de equinodermos, los cuales se calcularon usando CO1, son:  $\phi_{st}$  = 0.084 - 0.889 en *Holothuria atra* (Skillings *et al.* 2011);  $F_{st}$  = 0.049 - 0.327 en *Holothuria mammata* (Borrero-Pérez 2010);  $F_{st}$  = 0.198 en *Holothuria nobilis* (Uthicke y Benzie 2003) y  $F_{st}$  = 0.074 - 0.876 en *Arbacia lixula* (Wangensteen 2013). Esto significa que la diferenciación genética entre la población mexicana y la panámica es muy grande y que los individuos de estas dos regiones difícilmente se están reproduciendo entre sí. Por otra parte, es de esperarse que debido a la cercanía entre Oaxaca y Chiapas, el valor de  $F_{st}$  entre estos grupos sea menor, sin embargo, no es así.

Esto podría explicarse porque entre estas dos localidades se halla el Istmo de Tehuantepec. El istmo está constituido por una serie de eventos tectónicos e hidrológicos que lo convierten en un área compleja. El principal río que desemboca en el golfo de Tehuantepec es el Tehuantepec; junto con los ríos Los Perros, Espíritu Santo y Ostuta. Todas estas aguas forman deltas y cordones de arena que podrían constituir una barrera para el asentamiento de *H. inornata*, pues estos organismos han sido encontrados solo en fondos rocosos poco profundos (18 m). Por otra parte, aunque las surgencias hagan de esta región un centro de

actividad biológica, los daños por la contaminación derivada de actividades humanas (basureros marinos, actividades pesqueras y petroleras), podrían haber constituido una barrera para el asentamiento y la migración de las larvas. Así mismo su biología podría haber contribuido a la diferenciación entre estos dos grupos, pues se conoce que las larvas en la especie *Holothuria atra* alcanzan la etapa de larva doliolaria en 20 días y la mortalidad máxima se observa durante la metamorfosis.

La presencia de esta especie es más abundante en Chiapas, El Salvador y Panamá y disminuye hacia el norte y sur (observación personal) (Tabla 4-1). Es posible que algunas larvas de *H. inornata*, por medio de la Corriente Costanera de Costa Rica en verano, hayan podido establecerse en Oaxaca y luego hayan llegado a La Paz y Sonora, pues se sabe que *H. inornata* desova en verano (julio) en Michoacán. Así mismo, los valores de  $F_{st}$  son muy bajos entre los individuos de Sinaloa (Mazatlán), Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca (Puerto Ángel) (provincia mexicana). Podría sugerirse que los individuos de estas localidades no tienen barreras que les impidan reproducirse y el transporte de sus larvas podría realizarse por medio de la Corriente de California y la contracorriente hacia el norte en verano. La poca presencia de *H. inornata* en La Paz y Sonora podría explicarse debido a que la entrada del golfo de California es una zona compleja que se caracteriza por una estructura termohalina complicada con frentes y remolinos vinculados a la confluencia de corrientes distintas que se podría sugerir que dificultan el paso de las larvas y su asentamiento en el interior del golfo. De la misma manera que para los individuos de la provincia Mexicana, los valores de  $F_{st}$  son muy bajos entre los de Chiapas, El Salvador, Panamá y Perú (provincia Panámica). Podría sugerirse que los individuos de estas localidades no tienen barreras que les impidan reproducirse y el transporte de sus larvas podría realizarse por medio de la Contracorriente Ecuatorial, la cual dispersa las larvas de Panamá hasta el norte de Perú y hacia el norte de Panamá con la Corriente Costanera de Costa Rica. Según la red de haplotipos el haplotipo ancestral y más común se encuentra en algunos individuos de la provincia Panámica.

Todas estas características oceanográficas ayudan a sugerir mecanismos de dispersión de *H. inornata* y cómo las características fisiográficas y oceanográficas del Istmo de Tehuantepec podría constituir una barrera para la conectividad de las poblaciones al norte y sur de esa región. Otra característica oceanográfica importante que pudiera haber influido en la capacidad de dispersión es el gradiente térmico, pues la especie solo llega hasta el norte de Perú, un área de convergencia de las Corriente Peruana y Sur Ecuatorial (de aguas frías).

Los cálculos con el test de Mantel (Fig. 3.3) muestran que las distancias genéticas sí están correlacionadas con las distancias geográficas. Sin embargo, esta correlación no es alta (0.50). Lo que se espera en un modelo de aislamiento por distancia es que los individuos más cercanos geográficamente sean más parecidos genéticamente, como sucede entre los individuos de la provincia Mexicana y entre los de la Panámica, pues, el valor de  $F_{st}$  se incrementa a medida que la distancia geográfica aumenta, por lo que es posible que si se realiza el cálculo del test de Mantel a cada provincia el aislamiento por distancia probablemente sería más alto.

En la red de haplotipos hay algunos que son compartidos por ambas poblaciones (6%) (Tabla 3-6). Esta similitud de haplotipos en las dos poblaciones puede ser el resultado del intercambio de larvas favorecido por el sistema de corrientes de la región del POT, la de California, con dirección norte-sur que puede llegar hasta Chiapas, y la corriente costanera de Costa Rica, con dirección sur-norte que puede llegar incluso hasta Cabo Corrientes. Sin embargo, como los valores de  $F_{st}$  son altos, esta conectividad es escasa.

El haplotipo ancestral, "haplotipo 1", se encuentra en algunos individuos de la población del sur y está ausente en los del norte. Por otra parte, la mayor diversidad de haplotipos, entre todas las localidades, se encontró en El Salvador (ES) (tabla 4-1) y entre las dos provincias, en la provincia Panámica (Tabla 3-6). Sin embargo, ambas provincias contienen una diversidad de haplotipos única, pues solo el 6% de estos se comparten entre ambas provincias.

Tabla 4-1 Número de haplotipos respecto al número de individuos

Localidades		Número de haplotipos	Número de individuos
La Paz	LP	2	2
Sonora	So	1	1
Sinaloa	Si	4	6
Jalisco	J	11	17
Michoacán	M	16	21
Guerrero	G	19	30
Oaxaca	O	20	29
Chiapas	C	22	30
El Salvador	ES	27	32
Panamá	Pa	22	28
Perú	Pe	21	27

El análisis demográfico, considerando a cada población como una unidad panmíctica, indica que los datos no se ajustan a un modelo de expansión súbita (Fig. 3.5, Fig. 3.6) para ambas poblaciones. Sin embargo, las pruebas *D de Tajima* y *Fs de Fu* (Tabla 3-7) muestran lo contrario. Con lo anterior y con el cálculo del tiempo aproximado de expansión podría plantearse la hipótesis de que *H. inornata* se expandió en la provincia Panámica hace aproximadamente 4 m.a. (Tabla 3-7), además es ahí donde se encuentran los haplotipos ancestrales, y que durante el cierre que comunicaba el Pacífico Tropical con el Caribe hace 2.8 m.a., se expandía en la provincia Mexicana, la cual según el cálculo fue hace aproximadamente 3 m.a.

La comprensión de la genética, de *H. inornata*, tanto a nivel molecular como de las poblaciones es un factor que contribuye al uso sustentable como recurso pesquero. Dado que la pesca ejerce una presión sobre las poblaciones eliminando individuos y con ellos sus genes, para establecer políticas en materia de ordenación de las poblaciones de *H. inornata* es fundamental disponer de una base científica sólida con información sobre la composición genética, pues la diversidad genética es determinante para la adaptación ante las variaciones del ambiente, así como la base de sus procesos evolutivos. De acuerdo a lo anterior, el estudio de la genética de las poblaciones de *H. inornata* revela aspectos como la historia evolutiva, información acerca de sus relaciones geográficas y la conectividad entre poblaciones. Estos aspectos son útiles para la sustentabilidad así como para la conservación y restauración de las poblaciones.

## 4.2 Conclusiones

Sí existe estructura genética a lo largo de la distribución de la especie, y esta estructura está asociada a la combinación de su capacidad de dispersión y los patrones regionales de corrientes oceánicas. Además, su tipo de hábitat es un factor determinante para el asentamiento, pues estas poblaciones viven en fondos rocosos. Así mismo, la distribución de la especie está asociada a los gradientes térmicos, pues solo ha sido registrada en el POT. Su límite más austral es en el norte de Perú, donde confluyen en las Corriente Peruana y la Sur Ecuatorial. Su límite más septentrional es Sonora (Guaymas), donde las aguas son relativamente templadas.

Podría sugerirse que la especie ancestral de *H. inornata* se originó en Chiapas; la discontinuidad a lo largo de su distribución se debe a la discontinuidad en el hábitat. Es probable que la discontinuidad del hábitat rocoso en el Istmo de Tehuantepec, entre Oaxaca y Chiapas, y la presencia de otros factores como la desembocadura de ríos, alta actividad biológica por las surgencias y la direccionalidad hacia el este de la Contra Corriente Ecuatorial en esta zona, haya constituido una barrera impidiendo el asentamiento larvario, disminuido su supervivencia y favorecido la diferenciación genética entre la población Mexicana y Panámica.

Los organismos de cada población están reproduciéndose entre ellos, pero escasamente con los organismos de la otra población, pues solo un 6% de haplotipos son compartidos por ambas poblaciones, lo que sugiere que el istmo de Tehuantepec sería la principal barrera al flujo génico. Sin embargo, para confirmar este resultado es necesario conseguir más muestras de *H. inornata* en distintas localidades de la provincia Mexicana y Panámica para continuar con el estudio de estas poblaciones.

Estudios con base en microsatélites para estudiar poblaciones podrían revelar estructura genética en especies que no la mostraban usando marcadores genéticos como el ADN mitocondrial. De acuerdo con lo anterior, podría ser útil continuar con este estudio utilizando marcadores como los microsatélites, 16S y aumentar el número de muestras por igual para todas las localidades.

# Bibliografía

- Allauca, S. 1990. Presencia de la Corriente Costanera Ecuatoriana. *Acta Oceanogr. Pac.* 6:10–17
- Anderson, S., A. T. Bankier, H. G. Barrel, M. H. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, J. C. Eperon, D. P. Nierlich, H. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. Smith, R. Staden & I. G. Young. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290:457–464.
- Anderson, T. J. C., R. Komuniecki, P. R. Komuniecki & J. Jaenike. 1995. Are mitochondrial paternally inherited in *Ascaris*? *Int. J. Parasitol.* 25:1001–1004.
- Arndt, A. & M. J. Smith. 1998. Genetic diversity and population structure in two species of sea cucumber: differing patterns according to mode of development. *Mol. Ecol.* 7:1053–1064.
- Arndt, A., C. Márquez, P. Lambert & M. J. Smith. 1996. Molecular phylogeny of Eastern Pacific sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) based on mitochondrial DNA sequence. *Mol. Phylog. Evol.* 6(3):425–437.
- Asha, P. S. & P. Muthiah. 2002. Spawning and larval rearing of sea cucumber *Holothuria (Theelothuria) spinifera* Theel. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin.* 16:11–14.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography*. Harvard Univ. Press. Cambridge.
- Avise, J. C. 2008. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography.* 36:3–15.
- Avise, J. C., J. E. Neigel & J. Arnod. 1984. Demographic influences on mitochondrial-DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution.* 20:99–105.

- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, L. E. Neigel, C. A. Reeb & N. C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review in Ecology and Systematics*. 18:489–522.
- Benzie, J. A. H. & S. Uthicke. 2003. Stock size of Beche de mer, recruitment patterns and gene flow in black teatfish, and recovery of over-fished black teatfish stocks, on the Great Barrier Reef. FDC Project 97/344. 86 p.
- Bibb, M. J., R. A. Van Etten, C. T. Wright, M. W. Walberg & D. A. Clayton. 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*. 26:167–180.
- Billett, D. S. M. 1991. Deep sea holothurians. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*. 29:259–317.
- Borrero-Pérez, G. H. 2010. Sistemática y filogeografía de las especies del subgénero *Holothuria* (Echinodermata: Holothuriidae: *Holothuria*) de la región Atlanto-Mediterránea. Tesis de doctorado, Universidad de Murcia, España. 228 p.
- Borrero-Pérez, G. H., J. Gómez-Zurita, M. González-Wangüemert, C. Marcos & A. Pérez-Ruzafa. 2010. Molecular systematics of the genus *Holothuria* in the Mediterranean and Northeastern Atlantic and molecular clock for the diversification of the Holothuriidae (Echinodermata: Holothuroidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 57:899–906.
- Borrero-Pérez, G. H., M. González-Wangüemert, C. Marcos & A. Pérez-Ruzafa. 2011. Phylogeography of the Atlanto-Mediterranean sea cucumber *Holothuria (Holothuria) mammata*: the combined effects of historical processes and current oceanographical pattern. *Molecular Ecology*. 1–11.
- Briggs, J. C. 1974. Marine zoogeography. McGraw-Hill. Nueva York.

- Byrne, M., F. Rowe & S. Uthicke. 2010. Molecular taxonomy phylogeny and evolution in the family Stichopodidae (Aspidochirotida: Holothuroidea) based on COI and 16S mitochondrial DNA. *Mol. Phylog. Evol.*
- Cahill, T. & B. Isacks. 1992. Seismicity and shape of the subducted Nazca Plate. *Journal of Geophysical Research*, 97 (B12):17503–17529.
- Cassone, B. J. & E. G. Boulding. 2006. Genetic structure and phylogeography of the lined shore crab, *Pachigrapsus crassipes*, along the northeastern and western Pacific coasts. *Marine Biology*. 149:213–226.
- Chang, Y., Z. Feng, J. Yu & J. Ding. 2009. Genetic variability analysis in five populations of sea cucumber *Stichopus (Apostichopus) japonicus* from China, Russia, South Korea and Japan as revealed by microsatellite markers. *Mar. Ecol.* 30:455–461.
- Chomyn, A., P. Mariottini, W. J. Cleeter, Cd Ragan, A. Matsuno-Yagi, Y. Hatefi, R. F. Doolittle & Attardi. 1985. Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase. *Nature*. 314:592–597.
- Clark, A. M. & F. E. Rowe. 1971. *Monograph of shallow water Indo-West Pacific Echinoderms*. Trustees of the British Museum (Natural History). Londres.
- Clement, M., D. Posada & K. A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*. 9:1657–1659.
- Coates, A., D. McNeill, M. Aubry, W. Berggren & L. Collins. 2005. An introduction to the geology of the Bocas del Toro archipelago, Panama. *Carib J Sci.* 41:374–391.
- Conand, C. 2004. Present status of world sea cucumber resources and utilization: an international overview, p. 13–23. In A. C. Lovatelli, C. Conand, S. Purcell, S. Uthicke, J.-F. Hamel & A. Mercier (eds.). "Advances in sea cucumber aquaculture and management". FAO, Rome.

- Confalonieri, V. A., A. S. Sequeira, L. Todaro & J. C. Vilardi. 1998. Mitochondrial DNA and phylogeography of the grasshopper *Trimerotropis pallidipennis* in relation to clinal distribution of chromosome polymorphisms. *Heredity*. 81:444–452.
- Crandall, E., M. A. Frey, R. K. Grosberg & P. H. Barber. 2008. Contrasting demographic history and phylogeographical patterns in two Indo-Pacific gastropods. *Molecular Ecology*. 17:611–626.
- Deichmann, E. 1938. Eastern Pacific Expeditions of the New York Zoological Society. XVI. Holothurians from the western coasts of Lower California and Central America, and from Galapagos Islands. *Coolologica*. 23:361–387.
- Deichmann, E. 1958. The Holothuroidea collected by the Velero III and IV during the years 1932 to 1954. Part II. Aspidochirota. *Allan Hancock Pacific Expeditions*. 11(2):239–349.
- de la Lanza, G. 1991. Oceanografía de mares mexicanos. Primera Edición. México. 569 p.
- Domínguez-Domínguez, O. & E. Vázquez-Domínguez. 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*. 32(1):59–70.
- Excoffier L., P. Smouse & J. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131:479–491.
- Fajardo-León, M. C., E. Michel-Guerrero, J. Singh-Cabanillas, J. A. Vélez-Barajas & J. A. Massó-Rojas. 1995. Estructura poblacional y ciclo reproductor del pepino de mar (*Isostichopus fuscus*) en Santa Rosalía, B.C.S., México. INP-SEMARNAP. Ciencia Pesquera N 11 (Nueva época).
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz & R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3:294–299.

- Freeland, J. R. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd. Inglaterra. 338 p.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 147:915–925.
- Galtier, N., B. Nabholz, S. Glémin & G. D. D. Hurst. 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*. 18:4541–4550.
- Gilliland, P. M. 1993. The skeletal morphology, systematics and evolutionary history of holothurians. *Spec Pap Palaeontol*. 47:1-147.
- Godoy, J. A. 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas*. 18(1):23–33.
- Grant, W. S., B. W. Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*. 89:415–426.
- Harding, R. M. 1996. New phylogenies: An introductory look at the coalescent, p 15–22. In P. H. Harvey, A. J. Leigh-Brown, J. Maynard-Smith & S. Nee (eds.). *New uses for new phylogenies*. Oxford University Press. Nueva York.
- Hare, M. P. 2001. Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology and Evolution*. 16:700–706.
- Hastenrath, S. 1985. *Climate and Circulation of the Tropics*. Atmosphere Sciences Library. 46–56 p.
- Hastings, P. 2000. Biogeography of the Tropical Eastern Pacific: distribution and phylogeny of chaenopsid fishes. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 128:319–335.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball & J. R. deWaard. 2003. Biological identification through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond*. 270:313–322.
- Hedrick, P. W. 1999. Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*. 53:313–318.

- Hendler, G., J. Miller, D. Pawson & M. Porter. 1995. *Echinoderms of Florida and the Caribbean Sea Stars, Sea Urchins and allies*. Smithsonian Institution. Hong Kong. 390 p.
- Herrero-Pérezrul, M. D. & E. Chavez-Ortiz. 2003. HYPERLINK  
"http://www.jornada.unam.mx/2003/03/31/eco-g.html"  
<http://www.jornada.unam.mx/2003/03/31/eco-g.html>
- Herrero-Pérezrul, M. D., H. Reyes-Bonilla, F. García-Domínguez & C. E. Cintra-Buenrostro. 1999. Reproduction and growth of *Isostichopus fuscus* (Echinodermata: Holothuroidea) in the southern Gulf of California, Mexico. *Mar. Biol.* 135:521–532.
- Honey-Escandón, M., A. Laguarda-Figueras & F. A. Solís-Marín. 2012. Molecular phylogeny of the subgenus *Holothuria* (*Selenkothuria*) Deichmann, 1958 (Holothuroidea: Aspidochirotida).
- Kerr, A. M. 2000. Evolution and systematics of Holothuroidea (Echinodermata). A Dissertation Presented to the Faculty of the Graduate School of Yale University in Candidacy for the Degree of Doctor of Philosophy.
- Kerr, A. M., D. A. Janies, R. M. Clouse, Y. Samyn, J. Kuszak & J. Kim. 2005. Molecular phylogeny of coral-reef sea cucumbers (Holothuriidae: Aspidochirotida) based on 16S mt rDNA sequence. *Marine Biotechnology*. 7: 53–60.
- Kessler, W. S. 2006. The circulation of the eastern tropical Pacific: a review. *Prog. Oceanogr.* 69:181–217.
- Knowlton, N. & L. A. Weigt. 1998. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265, 2257–2263. (DOI 10.1098/rspb.1998.0568.).
- Lacey, K. M. J., G. P. McCormack, B. F. Keegan & R. Powell. 2005. Phylogenetic relationships within the class Holothuroidea, inferred from 18S rRNA gene data. *Mar. Biol.* 147:1149–1154.

- Landini, W., G. Bianucci, G. Carnevale, L. Ragaini, C. Sorbini, G. Valleri, M. Bisconti, G. Cantalamessa & C. Di Celma. 2002. Late Pliocene fossils of Ecuador and their role in the development of the Panamic bioprovince after the rising of Central American Isthmus. *Can. J. Earth Sci.* 39:27–41.
- Lanteri, A. A. & V. A. Confalonieri. 2003. Filogeografía: Objetivos, Métodos y Ejemplos. 185–193 p.
- Lenormand, T. 2002. Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology and Evolution.* 17:4186–4196.
- Lessios, H. A, B. D. Kessing, J. S. Pearse. 2001. Population structure and speciation in tropical seas: global phylogeography of the sea urchin *Diadema*. *Evolution.* 55:955–975.
- Lovatelli, A. 2004. FAO Fisheries Technical Paper. *In* C. Conand, S. Purcell, S. Uthicke, J. F. Hamel, A. Mercier (eds.). *Advances in sea cucumber aquaculture and management*. N 463. Roma.
- Lucero, M. & M. Mindiola. 2007. Distribución de las corrientes superficiales y subsuperficiales en la Caleta Aeolian-Isla Baltra *Acta Oceanográfica del Pacífico.* 14(1):13–19.
- Lugo, J. H. 1986. Morfoestructuras del fondo oceánico mexicano. *Boletín del Instituto de Geografía. UNAM.* 15:9–40.
- Lunt, D. H., L. E. Whipple & B. C. Hyman. 1998. Mitochondrial DNA variable Lumber tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. *Molecular Ecology.* 7:1441–1455.
- Lynch, M. & P. E. Jarrell. 1993. A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA. *Genetics* 135, 1197–1208.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27:209–220.

- Martinazzo, L. B. 2011. Sistemática, Filogenia y Filogeografía de las Ranas Patagónicas *Atelognathus patagonicus* y *Atelognathus praebasalticus*. Tesis de doctorado, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. 124 p.
- Menard, H. W. & S. M. Smith. 1996. Hypsometry of ocean basin provinces. *Journal Geophysical Research*. 71(18):4305–4325.
- Morón, O. 2000. Características del ambiente marino frente a la costa peruana. Dirección de Oceanografía Química. *Bol. Inst. Mar Perú*. 19(1-2):179–204.
- O’Dea, A., F. Rodriguez, C. De Gracia & A. Coates. 2007. La Paleontología marina en el Istmo de Panamá. *Canto Rodado*. 2:149–179.
- O’Loughlin, P. M., G. Paulay, D. Vanden Spiegel & Y. Samyn. 2007. New *Holothuria* species from Australia (Echinodermata: Holothuroidea: Holothuriidae), with comments on the origin of deep and cool holothuriids. *Memoirs of Museum Victoria*. 64: 35–52.
- Paulay, G. 1989. Marine invertebrates of the Pitcairn Island: species composition and biogeography of corals, molluscs, and echinoderms. *Atoll Research Bulletin* 326:1–28.
- Paulay, G. 2003. The Asteroidea, Echinoidea, and Holothuroidea (Echinodermata) of the Mariana Islands. *Micronesica* 35-36:563–583.
- Pawson, D. L 1978. *Echinoderms fauna of Ascension Island, South Atlantic Ocean. Smithsonian Contribution to the Marine Sciences, N° 2*. Smithsonian Institution Press: Washington. 31 p.
- Pawson, D. L. 1982. Holothuroidea, p. 813-818. In S.P.Parker (eds.) *Synopsis and classification of living organisms*. Vol. 2. McGraw-Hill, New York. 1232 p.
- Pawson, D. L. 1995. Echinoderms of the tropical island Pacific: status of their systematics and notes on their exology and biogeography, p. 171-192. In Maragos, J. E., Peterson, M. N. A., Eldredge, L. G., Bardach, J. E. & Takeuchi, H. F. (Eds.). *Marine and Coastal Biodiversity in the Tropical*

*Island Pacific Region. Volume 1. Species Systematics and Information Management Priorities.* East-West Center, University of Hawaii: Honolulu.

- Pawson, D. L. 2007. Phylum Echinodermata. *In* Zhang, Z.-Q. & W.A. Shear (Eds.). Linnaeus Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy. *Zoot.*, 1668:1–766.
- Pawson, D. L. & H. B. Fell. 1965. A revised classification of the Dendrochirote holothurians. *Brev.* 214:1–7.
- Persekec, M., G. Fritzscha, K. Ramschb, M. Berntb, D. Merkleb, M. Middendorfb, D. Bernharde & P. Stadlerd. 2008. Evolution of mitochondrial gene orders in echinoderms. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 47:855–864.
- Purcell, S., A. Lovatelli, M. Vasconcellos & Y. Ye. 2010. Manejo de las pesquerías de pepinos de mar con un enfoque ecosistémico. FAO documento técnico de pesca y acuicultura. No. 520. Roma.
- Purcell, S., Y. Samyn & C. Conand. 2012. Commercially important sea cucumbers of the world. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes No 6. Roma.
- Quesada-Alpízar, M. & J. Cortés. 2006. Los exosistemas marinos del Pacífico sur de Costa Rica: estado del conocimiento y perspectivas del manejo. *Rev. Biol. Trop.* 54 (Suppl. 1):101–145.
- Ramofafia, C., M. Gervis & B. Johann. 1995. Spawning and early larval rearing of *Holothuria atra*. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin.* 7:2–6.
- Ramos-Ramirez, E. 2013. Biología reproductiva de *Holothuria (Halodeima) inornata* Semper, 1868 en Caleta de Campos, Michoacán, México. Tesis de Licenciatura. Puerto Angel, Oaxaca, México. 53 p.
- Raymond, M. & F. Rousset. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution.* 49:1280–1283.
- Recchi, G. & A. Metti. 1973. Notas de Paleogeografía, Instituto Panamericano de Geografía e Historia. 1 p.

- Reich, M. 2004. Aspidochirote holothurians (Echinodermata) from the Middle Triassic of southern Germany. *In* T. Heinzeller & J. Nebelsick (eds.). Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Echinoderm Conference. Netherlands. Balkema.
- Reyes-Bonilla, H., M. D. Herrero-Pérezrul, S. González-Romero, A. González-Peralta & Y. Ramírez-Hernández. 2008. Abundance of the brow sea cucumber *Isostichopus fuscus* at the National Park Bahía de Loreto. México. *Rev. Biol. Trop.* 56(3):265–271.
- Rodríguez-Gil, L. A. 2007. El pepino de mar como un recurso potencial de la costa del Estado de Yucatán, México. Instituto Tecnológico de Mérida. Laboratorio Aprovechamiento Recursos Marinos. 255–262 p.
- Rogers, A. R. 2002. The theoretical mismatch distribution. *Lecture Notes on Gene Genealogies*. 7:30–46.
- Rowe, F. W. 1969. A review of the Family Holothuriidae (Holothuroidea: Aspidochirotida). *Bulletin of British Museum (Natural History) Zoology*, Londres. 18(4):119–170.
- Ruiz, J. A. 2013. Distribución y abundancia de larvas de langosta roja (*Panulirus interruptus*) en la costa occidental de la península de Baja California durante 2006–2008. Tesis de Maestría, La Paz, B.C.S., México. 55 p.
- Salgado-Rogel, Ma. de L., J. S. Palleiro-Nayar, J. L. Rivera-Ulloa, D. Aguilar-Montero, E. Vázquez-Solórzano & Ma. del C. Jiménez-Quiroz. 2009. La pesquería y propuestas de manejo del pepino de mar *Parastichopus parvimensis* en Baja California, México. *Ciencia Pesquera*. 17(1).
- Samyn, Y. 2003. Shallow-water Holothuroidea (Echinodermata) from Kenya and Pemba Island, Tanzania. *Studies in Afrotropical Zoology* 292:i-iv. 1–158.
- Samyn, Y. & C. Massin. 2003. The holothurian subgenus *Mertensiothuria* (Aspidochirotida: Holothuridae) revisited. *Journal Natural History*. 37: 2487–2519.

- Samyn, Y., W. Appeltans & A. M. Kerr. 2005. Phylogeny of Labidodemas and the Holothuriidae (Holothuroidea: Aspidochirotida) as inferred from morphology. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 144: 103–120.
- Scataglioni, M. A., A. A. Lanteri & V. A. Confalonieri. 2001. Origin of the Boll Weevil populations of Argentina, Brazil and Paraguay: Hypothesis based on the study of two mitochondrial genes, p. 19–20. *In Integrated Pest Management of the Cotton Boll Weevil in Argentina, Brazil and Paraguay-CFC-ICAC/04*. Final International Workshop.
- Scouras, A. K. Beckenbach, A. Arndt & M. J. Smith. 2004. Complete mitochondrial genome DNA sequence for two ophiuroids and a holothuroid: the utility of protein gene sequence and gene maps in the analyses of deep deuterostome phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 31:50–65.
- Semper, C. 1868. *Reisen im Archipel der Philippinen. Zweiter Theil. Wissenschaftliche Resultate. Ester Band. Holothurien*. Leipzig, Verlag von Wilhelm Engelmann. 177 p.
- Shen, X., M. Tiana, Z. Liue, H. Chenga, J. Tanc & X. Menga. 2009. Complete mitochondrial genome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Echinodermata: Holothuroidea): The first representative from the subclass Aspidochirotacea with the echinoderm ground pattern. *Gene*. 439:79–86.
- Sibuet, M. 1999. BENGAL. High resolution, temporal and spatial study of the benthic biology and geochemistry of a north-eastern Atlantic abyssal locality. RRS Discovery cruise 237. 25 Sep.-08 Oct., 1998. Southampton Oceanography Centre Cruise Report N°. 23.
- SiGang, F, H. ChaoQun, W. Jing & Z. LvPing. 2011. Characterization of mitochondrial genome of sea cucumber *Stichopus horrens*: A novel gene arrangement in Holothuroidea. *Science China. Life Sciences*. 54(5):434–441.

- Skillings, D. J., C. E. Bird & R. J. Toonen. 2011. Gateways to Hawai'i: Genetic Population Structure of the Tropical Sea Cucumber *Holothuria atra* Journal of Marine Biology. 16 p.
- Smiley, S. 1994. Holothuroidea, p. 401–471. In F. W. Harrison & F. S. Chia (eds.). Echinodermata. Wiley-Liss. New York. Vol. 14.
- Solís-Marín, F. A. 2003. Systematics and Phylogeny of the Holothurian Family Synallactidae. PhD dissertation. University of Southampton. Faculty of Scienc. 361 p.
- Solís-Marín, F. A., J. Arriaga-Ochoa, A. Laguarda-Figueras, S. Frontana-Urbe & A. Durán-Gonzales. 2009. Holothuroideos (Echinodermata: Holothuroidea) del Golfo de California. 1ra. Edición. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. CONABIO. 177 p.
- Stephan, W. & C. H. Langley. 1992. Evolutionary consequences of DNA mismatch inhibited repair opportunity. Genetics. 132:567–574.
- Tajima, F. 1989. The effect of change in population size on DNA polymorphism. Genetics. 123:597–601.
- Templeton, A. R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*. 7: 381–397.
- Templeton, A. R., E. Routman & C. Phillips. 1995. Separating population structure from population history: A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. Genetics. 140:767–782.
- Thorpe, R. S., D. P. McGregor & A. M. Cumming. 1993. Population evolution of western Canary Island lizard (*Gallotia galloti*): 4-base endonuclease restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA. *Biol. J. Linn. Soc.* 49:219–227.

- Toral-Granda, V. 2008. Galapagos Islands: a hotspot of sea cucumber fisheries in Central and South America, p. 231–253. In V. Toral-Granda, A. Lovatelli & M. Vasconcellos (eds.). Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade. *FAO. Fisheries and Aquaculture Technical Paper*. N° 516. Rome, FAO.
- Tuz, A. & A. Aguilar. 2011. Aprovechamiento del pepino de mar: pesquería potencial para el desarrollo económico y social en la costa norte de la Península de Yucatán. *Bioagrociencias*. 4(2):17–22.
- Uthicke, S. & J. A. H. Benzie. 2000. The effect of beche-de-mer fishing on densities and size structure of *Holothuria nobilis* (Echinodermata: Holothuroidea) populations on the Great Barrier. *Coral Reefs*. 19:271–276.
- Uthicke, S. & J. A. H. Benzie. 2000. Allozyme electrophoresis indicates high gene flow between populations of *Holothuria (Microthele) nobilis* (Holothuroidea: Aspidochirotida) on the Great Barrier Reef. *Marine Biology*. 137:819–825.
- Uthicke, S. & J. A. H. Benzie. 2003. Gene flow and population history in high dispersal marine invertebrates: mitochondrial DNA analysis of *Holothuria nobilis* (Echinodermata: Holothuroidea) populations from the Indo-Pacific. *Mol Ecol*. 12:2635–2648.
- Uthicke, S., J. Benzie & E. Ballment. 1998. Genetic structure of fissiparous populations of *Holothuria (Halodeima) atra* on the Great Barrier Reef. *Marine Biology*. 132:141–151.
- Uthicke, S., M. Byrne & C. Conand. 2009. Genetic barcoding of commercial Bêche-de-mer species (Echinodermata: Holothuroidea). *Molecular Ecology Resources*. 1–13.
- Vázquez-Domínguez, E. 2002. Phylogeography, historical patterns and conservation of natural areas, p. 369–378. In G. Nelson, J. C. Day, L. M. Sportza, J. Loucky & C. Vázquez (eds.). *Protected areas and the regional planning imperative in North America*. Univ. of Calgary Press. Canada.

- Vázquez-Domínguez, E. 2007. Filogeografía y vertebrados, p. 441–466. *In* L. Eguiarte, V. Souza & X. Aguirre (eds.). *La Ecología molecular de plantas y animales*. INE. México.
- Wangenstein, O. S. 2013. Biología y filogeografía del erizo de mar negro *Arbacia lixula* (Echinoidea: Arbacioida). Tesis de doctorado, Universidad de Barcelona, España. 263 p.
- Wares, J. P. & C. W. Cunningham. 2001. Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution* 12, 2455–2469.
- Watterson, G. A. 1984. Allele frequencies after a Bottleneck. *Theoretical Population Biology*. 26:387–407.
- Wegener, A. 1929. *The Origin of Continents and Oceans*. Dutton, Nueva York. 184–185 p.
- Wegener, A. 1966. *The Origin of Continents and Oceans*. Translated by J. Biram, Ed. Dover Publications, Inc., Nueva York; 246 p.
- Wolfe, K. H., W. H. Li & P. M. Sharp. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84:9054–9058.
- World Register of Marine Species.  
<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=241831> on 2013-11-27; O`Loughlin *et al.*, 2007. Visitado: 27 diciembre 2013.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*. 15:323–354.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the genetics of populations - variability within and among natural populations*. The University of Chicago Press. Chicago.
- Wyrski, K. 1965. Surface currents the Eastern Tropical Pacific Ocean. *Interamerican Tropical Tuna Commission Bulletin*. 9(5):269–304.

- Zamora, S., P. Domínguez & P. Vargas. 2012. Equinodermos. El árbol de la vida: Filogenia y evolución de los seres vivos. Cap. 36.
- Zardoya, R. 1994. El genoma mitocondrial de la trucha arcoiris. *Oncorhynchus mykiss*. Tesis de doctorado, Universidad Complutense de Madrid, España. 133 p.
- Zink, R.M. y R.C. Blackwell-Rago. 2000. Species limits and recent population history in the Curve-billed Trasher. *The Condor*. 102:881-886.

# Anexos

## Anexo 1

### **Protocolo de extracción según Honey-Escandón et al. (2012)**

#### **Reactivos utilizados**

1. DNAzol (20 mg/ml)
2. Proteínasa K (20 mg/ml)
3. Etanol 100% (-10 °C)
4. Etanol 95% (-10 °C)
5. Tampón TRIS-EDTA (solución pH 8.0)

#### **Procedimiento**

1. Extraer aproximadamente 5mm<sup>2</sup> de tejido (pies ambulacrales).
2. En un cuadrado de parafilm y con la ayuda de bisturí y pinzas cortar en partes más pequeñas y dejar evaporar el alcohol del tejido.
3. En un tubo Eppendorf colocar el tejido cortado y agregar 750ul de DNAzol, dejar reposar 10 minutos.
4. Luego, agregar 10ul de proteínasa K (si no se disolvió el tejido agregar 5ul más) y utilizar un pistilo para macerar el tejido dentro del tubo por dos o tres minutos.
5. Dejar actuar la solución en el agitador durante 24 horas.
6. Posteriormente centrifugar las muestras a 12 mil rev/min durante 15 minutos.
7. Retirar el sobrenadante del tubo y colocarlo en un tubo nuevo.
8. Desechar el tubo viejo con el pellet.
9. Agregar 400ul de etanol al 100% y almacenar en el congelador por una hora.
10. Centrifugar nuevamente a 12mil rev/min durante cinco minutos.
11. Desechar el sobrenadante y agregar 600ul de etanol al 95%.
12. Centrifugar las muestras a 12mil rev/min durante cinco minutos; este último paso se repetirá una vez más.
13. Desechar el sobrenadante, agregar 50ul de tampón TRIS-EDTA (solución pH 8.0) y agitar el tubo.

## Anexo 2

### **Protocolo de limpieza de ADN**

#### **Reactivos utilizados**

1. *PCR Purification Kit, QUIAquick*
2. Tampón TRIS-EDTA (solución pH 8.0)

#### **Procedimiento**

1. Mezclar pipeteando 250 ul de buffer PB más 50ul de ADN
2. Transferir a la columna y centrifugar 60seg a 13000RPM
3. Descartar el líquido del tubo y colocar la columna nuevamente en el tubo
4. Agregar 750ulde buffer PE y centrifugar 60seg por 13000RPM, descartar el líquido (repetir de una a tres veces dependiendo de la impureza de la muestra)
5. Después de la última adición, centrifugar y descartar el líquido, retornar los tubos a la centrifuga y centrifugar una vez más a 13000RPM por 60seg, para quitar todo el buffer.
6. Transferir las columnas a otro tubo Eppendorf y agregar 50ul de tampón TRIS-EDTA (solución pH 8.0), agitar el tubo y esperar 1minuto.
7. Centrifugar 60seg a 6000RPM y descartar las columnas.

## Anexo 3

### **Protocolo de PCR**

#### ***Reactivos utilizados***

1. PCR Buffer 10x sin MgCl<sub>2</sub> (1x)
2. dNTPs (2.5 mM)
3. MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM)
4. Albúmina de suero bovino (2.5 ug/ul)
5. Taq DNA polymerase (0.05 units/UI)
6. Agua libre de nucleasas,

#### ***Procedimiento de mezcla (15ul)***

- |                      |                          |
|----------------------|--------------------------|
| 1. H <sub>2</sub> O  | 6.84µl                   |
| 2. 10X               | 1.5µl                    |
| 3. dNTP <sub>s</sub> | 1.5µl                    |
| 4. MgCl <sub>2</sub> | 1.5µl                    |
| 5. BSA               | 2.4µl (2.5 ug/ul)        |
| 6. COleF             | 0.3µl (10 mM)            |
| 7. COleR             | 0.3µl (10 mM)            |
| 8. Taq               | 0.06µl                   |
| 9. ADN               | 0.6µl (50 ng/ul de adn). |
| 10. Total            | 15.0µl                   |