

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA**



**DIVISIÓN OCEANOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFÍA BIOLÓGICA**

**“ESTRUCTURA POBLACIONAL DEL ERIZO MORADO  
*Strongylocentrotus purpuratus* A LO LARGO DE LA COSTA DEL  
PACÍFICO DE BAJA CALIFORNIA, MÉXICO.”**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN CIENCIAS EN ECOLOGIA MARINA**

**PRESENTA:**

**NADIA CITLALI OLIVARES BAÑUELOS**

**Ensenada, Baja California, México**

*Si tuviéramos sólo un momento en donde nuestra alma pudiera recostarse y ser feliz por un segundo, elegiría aquel en donde el viento,  
el mar y esta península se encontraran en un hermoso paisaje, en un cactus, en un sol eterno, en un frío o calor intenso.*

*Sería la más tramposa del universo, ya que a cada paso, en cada segundo recorrido por esta hermosa tierra, haría que mi alma fuera  
eternamente feliz.*

*A ti Papi. Hombre inigualable.*

*A Tatian y Nona, mis hermosas hermanas.*

*A Luis, el hombre sabio.*

*Al mar, inmenso tesoro.*

*A las Baja Californias, a su tierra seca y su olor a mar, a su alma libre que poco a poco encadena a sus encantos.*

*A mi México, seguiré luchando aunque cueste trabajo.*

*A esto, que nos costo la vida juntos.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a las siguientes instituciones por el apoyo otorgado:

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada con el número 164625-OIBN780628.
- Al Centro de Investigación Científica y de Estudios Superiores de Ensenada (CICESE) por el apoyo otorgado durante la realización de este trabajo, así como al personal que labora en dicha institución.
- A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) campus Ensenada.
- Al financiamiento del proyecto AMELIS CONACyT proyecto premio al joven investigador J37689 to Dr. Lydia B. Ladah, y UC MEXUS Key Intertidal Species Project, Dr. Lydia B. Ladah.
- Al Departamento de Ecología (ahora Oceanografía Biológica) por la beca otorgada durante el trimestre Septiembre-Noviembre de 2003. Particularmente al Dr. Oscar Sosa, Dr. Ernesto García, al Ocean. César Almeda y a todo el personal.
- A la sección de apoyo gráfico: José María Domínguez Olachea y Francisco Javier Ponce Isguerra, por el apoyo brindado para la impresión de los posters.

A los siguientes laboratorios y especialmente a las personas que me apoyaron e hicieron grata mi estancia dentro y fuera de ellos.

- A los laboratorios de Biología Molecular y Ecología Molecular de la Facultad de Ciencias y Facultad de Ciencias Marinas de la UABC, respectivamente. Al Dr. Jorge de la Rosa Vélez, por brindarme dichas instalaciones para realizar el trabajo de laboratorio, el apoyo, paciencia y comentarios.
- Al laboratorio de Ecología del Plancton Marino, Oceanología, CICESE. Al Dr. Helmut Maske y al M. en C. Antonio Almazán por el apoyo recibido para realizar las lecturas espectrofotométricas.
- A los miembros de mi comité.

Muchas Gracias

- A Luis Enríquez por su apoyo incondicional a pesar de que nunca quisiste ser parte del comité. Realmente no tengo como pagarte, te aprecio mucho, te admiro y sabes que esta tesis no pudo haberse logrado sin todo tu apoyo, tus comentarios y el tiempo invertido. ¡¡¡GRACIAS!!!
- A la Dra. Lydia Ladah por el apoyo recibido con el material y reactivos, así como el haberme aceptado como su tesista y brindarme todas las facilidades para realizar este trabajo, a su equipo de trabajo y su paciencia. Gracias Lydia.
- También gracias a toda las facilidades otorgadas por la Cooperativa de Buzos y Pescadores de Isla Natividad, B.C.S., quienes contribuyeron con la colecta de muestras de esa zona.

Muy Especialmente:

- A mi Papá por haberme apoyado en todo momento y en todo lugar, siempre de los siempres. ¡¡TE amo mucho Papi!! Porque ahora vamos a cumplir los demás planes... Y porque sigamos construyendo el nuevo futuro...
- A mi Tatian, por todos tus consejos, por todo tu apoyo, tus palabras, por hacerme crecer y madurar, siempre seremos las dos. Porque sin ti no se que haría y a pesar de todas esas cumbre borrascosas seguiremos luchando a veces sin importar el precio mas que seguir creciendo.
- A la Familia González Flores por su inmenso y enorme apoyo y cariño. Porque mi estancia en Ensenada no hubiera sido tan acogedora y encantadora sin ustedes y su calor de hogar. A Rosalba, Segio, Marina y Mayra y los canes. ¡Muchas Gracias!
- A Jonathan, por toda la compañía, la risa, la amistad y todo lo que somos nosotros. Por empezar como el mosquetero y convertirte en un amigo inigualable.
- A Sergio Scarry por tu amistad, tu amor, tu cariño, felicidad y todo el tiempo compartido juntos. Por todo el apoyo e información que me otorgaste incondicionalmente en todo lo relacionada a erizos y sacarme de mis dudas. Así como el ayudarme a elucidar sobre las discusiones en el proceso para entender a estos seres picudos y porque sea el inicio de muchos trabajos.
- Al Biol. Mar. Efraín...Botellito, gracias por tu apoyo de siempre y por todo el amor que me das. Y algún día seremos felices.
- A los Cachitos Berenice Velásquez. ¡Gracias Amiguita! Por todos los momentos de simplada por las risas por todo lo que pasamos juntas. Al Cachito mayor Leonardo Castillo (Cachito), gracias por tu amistad, consejos y tu grata compañía
- A Toño por tu amistad y por todos los gratos momentos compartidos.
- Al Ocean. Julio Palleiro, por sus comentarios, su apoyo, el tiempo dedicado y porque comencemos un vínculo de colaboración en el ámbito de los erizos.
- A todos aquellos que contribuyeron el la colecta de erizos que son y en algún momento formaron parte del I.C.E. Team: Dra. Lydia Ladah, Alma Giles, Jorge Acosta, Rodrigo Yael, Itzel, Miguel Ángel “Vaquero”, Lorenzo Álvarez, Andrés Ortínez, Rodrigo Beas, Omar López y Francisco Casillas.
- Y a todos aquellos con quienes se compartieron buenos momentos y quienes cuidaron a Nizca. Jorge Acosta, Alfredo Castillo, Brigitte Gavio, Ana Laura “la China”, Rodrigo Beas, Sonia Valle, Edith Suazo, Adriana Orozco, Lorenzo, Luz, Al equipo de Futbol femenino, al laboratorio del Cachito, Carmén, Diana, Omar, Edna, Arturo, Nizca, etc., etc.
- Y una vez más a la Biología Marina, a mi México, a esta hermosa Península. Y por supuesto... al delicioso erizo morado...A los que SI creyeron en mi ☺

**RESUMEN** de la tesis de **Nadia Citlali Olivares Bañuelos**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en ECOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California. Abril de 2004.

**ESTRUCTURA POBLACIONAL DEL ERIZO MORADO *Strongylocentrotus purpuratus* A LO LARGO DE LA COSTA DEL PACÍFICO DE BAJA CALIFORNIA, MÉXICO.**

**Resumen aprobado por:**

---

**Dra. Lydia B. Ladah.**  
**Director de tesis**

El erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*, se distribuye desde Alaska hasta Baja California Sur, México. Este organismo es considerado como un recurso de importancia comercial. Al igual que otros invertebrados de larvas planctotróficas, esta especie desarrolla sus funciones biológicas en la columna de agua y el bentos de la zona intermareal y submareal. La homogeneidad genética de la población ha sido analizada por diversos autores a través del ADNmt y sólo algunos autores han detectado estructura genética. Esta estructura se ha explicado mediante el efecto de las características físicas y biológicas de cada sitio de distribución. En México, esta población no ha sido evaluada genéticamente y tampoco cuenta con un programa de manejo que regule su captura. Este estudio evaluó genéticamente la población del erizo morado que se distribuye en la península de Baja California (en particular de nueve localidades de la costa del Pacífico), para conocer si existe una estructura genética, ya que algunas localidades en donde se distribuye tienen características oceanográficas específicas. Se analizó un fragmento que comprendió al gen de CO I del ADNmt del erizo morado mediante RFLP's y dicho fragmento indicó que existe una sutil estructura poblacional ( $F_{ST}$ : 0.023,  $p < 0.0010$ ). Los bajos valores de  $F_{ST}$  y la presencia de tres haplotipos comunes en todas las localidades, indican que el erizo morado tiene una distribución prácticamente homogénea. Dicha homogeneidad puede ser favorecida por el transporte de la Corriente de California, la cual puede propiciar una extensa dispersión de larvas. La sutil estructura poblacional encontrada puede relacionarse a reclutamientos locales propiciados por características oceanográficas tales como surgencias y giros. En el mar adyacente a las localidades de La Chorera, Punta Baja y las localidades del sur, se presentan características oceanográficas como surgencias, fuerte afluencia de vientos y giros que posiblemente favorezcan reclutamientos locales, ya que es en estas localidades es en donde se presentó la mayor cantidad de haplotipos privados con altas frecuencias, así como altas diversidades haplotídicas. Estos resultados sugieren que, las localidades de Punta Baja y La Chorera pueden funcionar como centros de reclutamiento o bien, como posibles fuentes de variación haplotídica.

**Palabras clave:** Erizo morado, RFLP's, ADNmt, CO I, península de Baja California.

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Nadia Citlali Olivares Bañuelos** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in MARINE ECOLOGY. Ensenada, Baja California, México. June of 2004.

**POPULATION STRUCTURE OF THE PURPLE SEA URCHIN *Strongylocentrotus purpuratus* ALONG THE PACIFIC COAST OF BAJA CALIFORNIA PENNINSULA, MÉXICO.**

**Abstract approved by:**

---

**Dra. Lydia B. Ladah.**  
**Thesis director**

The purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, is distributed from Alaska to Baja California Sur, México. This organism is considered an important fisheries resource. Like other invertebrates with planktotrophic larvae, it develops its biological functions in the water column in the subtidal and intertidal zone. The genetic homogeneity of the population had been studied by different authors by analyzing the mt DNA. Some report population genetic structure in the purple sea urchin and they suggest that this structure was the result of the effect of the physical and biological features of each site of distribution. In México, the purple sea urchin population has not been evaluated genetically before and does not presently have a fisheries management program. In this study, a genetic evaluation of the purple sea urchin population along the Baja California peninsula is presented, where populations showed a genetic structure, especially in the sites where oceanographic features like upwelling eddies exist. RFLP's of a fragment of the CO I gene of the mtDNA were analyzed from purple sea urchins from nine sites along the pacific coast of the Baja California peninsula in México. The results of the RFLP analysis of the CO I fragment indicates a fine genetic structure ( $F_{ST}$ : 0.023,  $p < 0.0010$ ). The lower value of the  $F_{ST}$  and the presence of three common haplotypes between sites indicates that the purple sea urchin population has a homogenous distribution, and this homogeneity could be obtained by the extensive larval dispersion influenced by the California Current. The population structure could be the result of the relationship of local recruitment influenced principally by upwelling and eddies. In the adjacent areas of La Chorera, Punta Baja and sites in Central Baja California, there are important oceanographic features, were larger values of haplotype diversity and where the greatest private haplotypes with the highest frequencies occurred. These results suggest that Punta Baja and La Chorera could act as recruitment zones or as a dispersion center of haplotype variation.

**Key words:** purple sea urchin, RFLP's, mtDNA, CO I, Baja California peninsula.

# ÍNDICE

<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....</b>	<b>5</b>
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>6</b>
<b>IV. 1. Área de estudio. ....</b>	<b>6</b>
<b>IV. 2. Metodología de campo, estimación de densidades y recolección de muestras genéticas. ....</b>	<b>8</b>
<b>IV. 3. Trabajo de laboratorio.....</b>	<b>10</b>
<b>IV. 3. 1. Extracción de ADN, cuantificación de ADN, diseño de cebadores y técnica de PCR. ....</b>	<b>10</b>
<b>IV. 3. 2. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). ....</b>	<b>13</b>
<b>IV. 4. Análisis de datos moleculares. ....</b>	<b>14</b>
<b>IV. 4. 1. Distribución de frecuencias de haplotipos. ....</b>	<b>15</b>
<b>IV. 4. 2. Diversidad haplotídica. ....</b>	<b>15</b>
<b>IV. 4. 3. Relaciones entre haplotipos. ....</b>	<b>15</b>
<b>IV. 4. 4. AMOVA. ....</b>	<b>17</b>
<b>V. RESULTADOS.....</b>	<b>18</b>
<b>V. 1. Análisis de datos moleculares. ....</b>	<b>18</b>
<b>V. 1. 1. Distribución de frecuencias de haplotipos. ....</b>	<b>19</b>
<b>V. 2. Densidades de erizos por localidad. ....</b>	<b>28</b>
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>29</b>
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>VIII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>41</b>
<b>IX. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>42</b>
<b>APENDICE I.....</b>	<b>53</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b>	<b>Área de estudio. Cada recuadro con la inicial representa a las localidades en donde se realizaron las recolecciones de los organismos.</b>	<b>7</b>
<b>Figura 2.</b>	<b>Selección de cuadrantes aleatorios. Cada cuadro representa un cuadrante de 1 m<sup>2</sup>. La distancia entre cada cuadro representaba a los números aleatorios, en donde cada paso era aproximado a 1 m.</b>	<b>9</b>
<b>Figura 3.</b>	<b>Mapa del ADNmt del erizo morado (<i>S. purpuratus</i>) reportado por Jacobs <i>et al.</i> (1988). La sección coloreada represente la región amplificada por PCR de 2093 pb; El fragmento de 590 pb corresponde al fragmento amplificado por Edmands <i>et al.</i> (1996).</b>	<b>12</b>
<b>Figura 4.</b>	<b>Mapa de cortes de restricción de las enzimas probadas en el fragmento de CO I. La columna izquierda indica el nombre de las enzimas y los números indican el número de cortes de cada enzima; los números superiores corresponden a pares de bases y al tamaño total del fragmento. Las franjas en vertical al centro de la figura representan el sitio de corte.</b>	<b>14</b>
<b>Figura 5.</b>	<b>Haplotipos o patrones de bandeo de cada una de las enzimas de restricción utilizadas en el fragmento de CO I (Acc II, EcoT14 I y Rsa I). Las columnas del extremo derecho e izquierdo representan una escalera molecular de 250 pb, en donde cada una de las bandas representa un peso conocido. La columna de la parte central de la figura ubicada en el extremo izquierdo representa el número total de bandas de todos los haplotipos. Las columnas restantes representan a cada uno de los haplotipos, los cuales son representados con las letras A, B, C y D.</b>	<b>18</b>
<b>Figura 6.</b>	<b>Distribución de frecuencias del fragmento de CO I. Los números en las gráficas representan a los haplotipos presentes en cada localidad y sus frecuencias en porcentajes de acuerdo a la Tabla V, cada gráfica también indica el número de individuos analizados en cada localidad.</b>	<b>22</b>

## Lista de Figuras (continuación)

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 7.</b>	<b>Diagrama de análisis de Red de Expansión Mínima (Minimun Spanning Network) del fragmento de CO I. El círculo negro marcado con la letra R representa al erizo rojo. El tamaño de los círculos representa proporcionalmente a las frecuencias de cada uno de los haplotipos y la distancia entre ellos representa las distancias proporcionales entre los haplotipos.</b>	<b>23</b>
<b>Figura 8.</b>	<b>Diagramas de Red de Expansión Mínima o Minimun Spanning Network para el fragmento de CO I. El círculo negro representa al erizo rojo. El tamaño de los círculos representa proporcionalmente a las frecuencias de cada uno de los haplotipos y la distancia entre ellos representa las distancias proporcionales entre los haplotipos. Cada localidad tiene un arreglo diferente indicando con color sombreado los haplotipos presentes en cada localidad.</b>	<b>24</b>
<b>Figura 9.</b>	<b>Cladograma de consenso bootstrap elaborado por el método de Neighbord Joining para el fragmento de CO I. Los números dentro de las ramas, representan el número de veces que se repite ese arreglo para esa rama o ramas. Las claves al final de las ramas corresponden a cada uno de los haplotipos. Los círculos ubicados en el extremo derecho corresponden a cada una de las localidades, las cuales se representan con sus iniciales y en distintas tonalidades.</b>	<b>26</b>
<b>Figura 10.</b>	<b>Valores promedio de las densidades de erizos morados de cada localidad y la fecha en que se tomaron dichas densidades. En la localidad de San Carlos (SC) no se obtuvieron datos, debido a condiciones oceanográficas fueron desfavorables. Todas las densidades corresponden a ocho cuadrantes.</b>	<b>28</b>

## Lista de Tablas

<b>Tabla</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
Tabla I.	Distancias entre los sitios de colecta. Las iniciales corresponden a las localidades mencionadas anteriormente y los números a la distancia en kilómetros entre las localidades.	8
Tabla II.	Fechas de recolección de erizos por localidad, número de cuadrantes realizados por cada localidad y erizos recolectados de cada localidad. Las comillas en la línea del número de cuadrantes, indican que debido a condiciones climatológicas no se pudieron tomar las densidades y en estos casos sólo se recolectaron los organismos.	9
Tabla III.	Cebadores diseñados para la amplificación del fragmento de CO I.	11
Tabla IV.	Total de haplotipos registrados para el fragmento de CO I. La columna del extremo izquierdo representa a cada uno de los haplotipos. El arreglo en las líneas horizontales muestra cada haplotipo encontrado para cada enzima y en su conjunto. La columna del extremo derecho muestra el número total de individuos que presentaron dicho haplotipo.	19
Tabla V.	Frecuencias de los haplotipos de CO I encontrados por localidad. En la columna izquierda se encuentran los haplotipos. En la parte superior se muestra a las localidades y la parte central indica las frecuencias de cada haplotipo en cada localidad.	20
Tabla VI.	Diversidades haplotídicas del fragmento de CO I. En la columna izquierda se encuentran las localidades analizadas. Cada localidad tiene el número de individuos analizados, las densidades totales de erizos y la diversidad haplotídica.	21
Tabla VII.	Análisis de AMOVA del fragmento de CO I. Se muestran los resultados entre poblaciones y dentro de las poblaciones, así como el coeficiente de variación genética y el valor $p$ .	27
Tabla VIII.	Matriz de significancia del fragmento de CO I de los valores de $F_{st}$ y $p$ , obtenida en el AMOVA.	27

## I. INTRODUCCIÓN

El erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* es un equinodermo regular de la familia Strongylocentrotidae. Se distribuye en las costas del Pacífico nororiental desde Alaska hasta Isla Cedros, Baja California, México (Ricketts y Calvin, 1962; Sagarin y Gaines, 2002). El erizo morado desarrolla su ciclo de vida en la columna de agua y el bentos de la zona intermareal y submareal. Es un organismo dioico, que alcanza su madurez sexual a una talla aproximada de 2.5 cm en el diámetro de la testa (Morriss *et al.*, 1980). Su reproducción es externa y puede ocurrir entre los meses de septiembre a julio (Tegner, 2001). Una vez que ha sido fecundado el ovocito, se desarrolla una larva planctotrófica *equinopluteus* que permanece en la columna de agua entre 16 y 39 días (Barnes, 1965; Tegner, 2001) durante la primavera y el verano, pero también se ha reportado una permanencia de la larva hasta por 21 semanas (Strathmann, 1978). La dispersión y el transporte de las larvas se ve fuertemente afectada por diversos factores como: la disponibilidad de alimento, los patrones de corrientes, temperatura, giros, transporte de Ekman, vientos y surgencias (Parrish *et al.*, 1981).

Cuando la larva ha terminado su etapa de desarrollo enfrenta la metamorfosis y se asienta o recluta en el bentos de la zona intermareal y submareal entre los meses de enero y agosto (Pearse, 1980; Ebert *et al.*, 1994; Harrold *et al.*, 1991). Sin embargo, existen varios factores que pueden perturbar el reclutamiento (Ebert y Russell, 1988). Entre ellos: el acceso a la gran variedad de alimento (Hinegardner, 1969, Cameron y Schroeter, 1980; Morris *et al.*, 1980), la disponibilidad del hábitat (Pearse *et al.*, 1970; Tegner y Dayton, 1977), así como

eventos oceanográficos. En este último caso, estos eventos oceanográficos pueden ser influenciados por la Corriente de California, o bien por eventos costeros locales, como las zonas de fuerte afluencia de surgencias en donde se puede dar un reclutamiento escaso y esporádico (Pearse y Hines, 1987; Ebert *et al.*, 1994; Kalvas y Hendrix, 1997).

Como se ha mencionado anteriormente, desde el desarrollo de la vida larvaria hasta el reclutamiento del erizo morado, existen factores físicos y biológicos que pueden afectar su distribución poblacional (Tegner y Dayton, 1981; Canedo-López *et al.*, 1999) y su demografía (Ebert, 1968; Gonor, 1972). Al mismo tiempo, estos mismos factores y sus efectos pueden propiciar una homogeneidad en la población de esta especie (Burton, 1983, 1986). Durante la permanencia del erizo morado en el bentos, el número poblacional también puede ser regulado por el medio ambiente (Morriss *et al.*, 1980), la disponibilidad de alimento, la interacción con otros organismos de la misma especie, la depredación (Cowen, 1983, 1985; Dayton, 1975; Eastes y Duggins, 1995; Tegner y Dayton, 1981; Tegner y Levin, 1983), la competencia, (Ebert, 1968, Canedo-López *et al.*, 1999) y la pesquería (ya que sus órganos reproductores o gónadas tienen un valor comercial).

Las variaciones en la demografía y en los distintos factores físicos y biológicos pueden provocar que en algunos sitios de distribución del erizo morado pudieran sucederse diferencias que influyan en la información genética de esta población. Es decir, posiblemente existen diferencias entre algunas localidades que puedan influir en la homogeneidad de la población. Algunos autores, como Palumbi y Wilson (1990) y Flowers *et al.* (2002) analizaron el ADN mitocondrial de erizos morados. Dichos autores concluyen

que no importan las diferencias que puedan existir entre las localidades a lo largo de los sitios de distribución del erizo morado, éste no presenta una estructura poblacional. Sin embargo, Edmans *et al.* (1996) mencionan que el efecto de las características físicas y biológicas de cada sitio de distribución también podría referirse a la presencia de una estructura poblacional en el erizo morado y realiza estudios de alozimas y secuencias de un fragmento del gen de CO I del ADN mitocondrial en una corta escala geográfica. Dichos autores reportan la existencia de diferencias significativas entre las localidades y por lo tanto la existencia de una estructura poblacional.

Entonces, se puede decir que el estudio de las poblaciones del erizo morado, *S. purpuratus* ha sido extenso, no sólo en el ámbito de la estructura de sus poblaciones a nivel descriptivo, sino también en el molecular. Sin embargo, es importante señalar que aún cuando la evaluación genética de su población ha sido analizada, ésta no ha sido integrada a los programas de manejo para la pesquería implantados en Canadá y E.U.A (Pleschner, 1992; Tegner, 2001). Al igual que otros programas de manejo para erizo, sólo se han tomado en cuenta parámetros demográficos que han permitido establecer una talla mínima de captura, el análisis de sus densidades y de su estructura de tallas (Workman, 1999).

En México, la pesquería del erizo morado no ha sido regulada, debido a que dicha pesquería tiene una menor demanda en el mercado internacional, comparada con la pesquería del erizo rojo (*S. franciscanus*). Sin embargo, la explotación del erizo morado ha aumentado debido a que la población del erizo rojo ha disminuído (Pineda, 1973 en Gallo y Flores, 1982; Pérez y Calderón-Aguilera, 1996; Palleiro *et al.*, 1993, 1995, 2003) y por tal

motivo, se ha considerado implementar un programa de manejo que regule su pesquería (Palleiro com. pers., 2003<sup>1</sup>).

Thorrold *et al.* (2002) mencionan que el acceso a las marcas utilizadas para el estudio de las poblaciones actualmente se apoya de los marcadores genéticos. Y como se ha observado, los modelos pesqueros más exitosos involucran un sentido interdisciplinario ya que han sido diseñados específicamente para una población. Es así, que el aprovechamiento genético utilizado en las capturas evita la endogamia y la pérdida de la deriva genética (FAO, 1981, Munro, 1993). El presente trabajo pretende contribuir con el programa de manejo del erizo morado *S. purpuratus* que se distribuye en la costa del Pacífico de la península de Baja California, mediante una evaluación genética. Dicha evaluación se realizará a través de la técnica de RFLP's (por sus siglas en inglés Restriction Fragment Length Polimorphisms) tal como lo recomiendan Edmands *et al.* (1996), Parker *et al.* (1995) y Avise (1994).

---

<sup>1</sup> Palleiro Nayar, Julio S. Centro Regional de Investigaciones Pesqueras de Ensenada, B.C. Instituto Nacional de Pesca.

## **II. HIPÓTESIS DE TRABAJO.**

Acorde a lo expuesto, la hipótesis de este trabajo es la siguiente:

A lo largo de la costa de Baja California existen procesos físicos particulares, tales como giros y eventos de surgencia, que influyen en la dispersión de gametos y larvas del erizo morado. Dichos procesos favorecen la ocurrencia de eventos locales de reclutamiento que se reflejarían en la existencia de poblaciones discretas bien diferenciadas.

## **III. OBJETIVOS.**

**III. 1.** Evaluar el polimorfismo de un fragmento del ADNmt del erizo morado de la costa occidental de la península de Baja California, México.

**III. 2.** Determinar si existe una estructura genética en la población del erizo morado de la costa occidental de la península de Baja California, México.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **IV. 1. Área de estudio**

Para la recolección de muestras genéticas se seleccionaron nueve localidades de playas rocosas, las cuales se distribuyeron a lo largo de la costa occidental de la península de Baja California (Figura.1). Las fechas de visita a las localidades y las distancias entre cada una variaron (Tabla I y Tabla II). Los erizos se recolectaron de la zona intermareal de estas playas a excepción de Isla Todos Santos y Bahía Tortugas (lugares en donde se recolectó de la zona submareal). Las localidades fueron las siguientes:

1. **SM** = San Miguel B. C., México (31.9003° N -116.745° O).
2. **CK** = Campo Kennedy, B. C., México (31.7276 ° N -116.7276° O).
3. **ITS** = Isla Todos Santos, B. C., México (31.8033° N -116.7874° O).
4. **LCh** = La Chorera, B. C., México (30.4706 ° N -116.04750° O).
5. **PB** = Punta Baja, B. C., México (29.93013° N -115.8058° O).
6. **SC** = Punta San Carlos, B. C., México (29.6166° N -115.5120° O).
7. **PR** = Punta Rompiente, B. C. S, México (27.7171° N -114.9978° O).
8. **BT** = Bahía Tortugas, B. C. S., México (27.7171° N -114.9978° O).
9. **IN** = Isla Natividad, B. C. S., México (27.8688° N -115.1620° O).

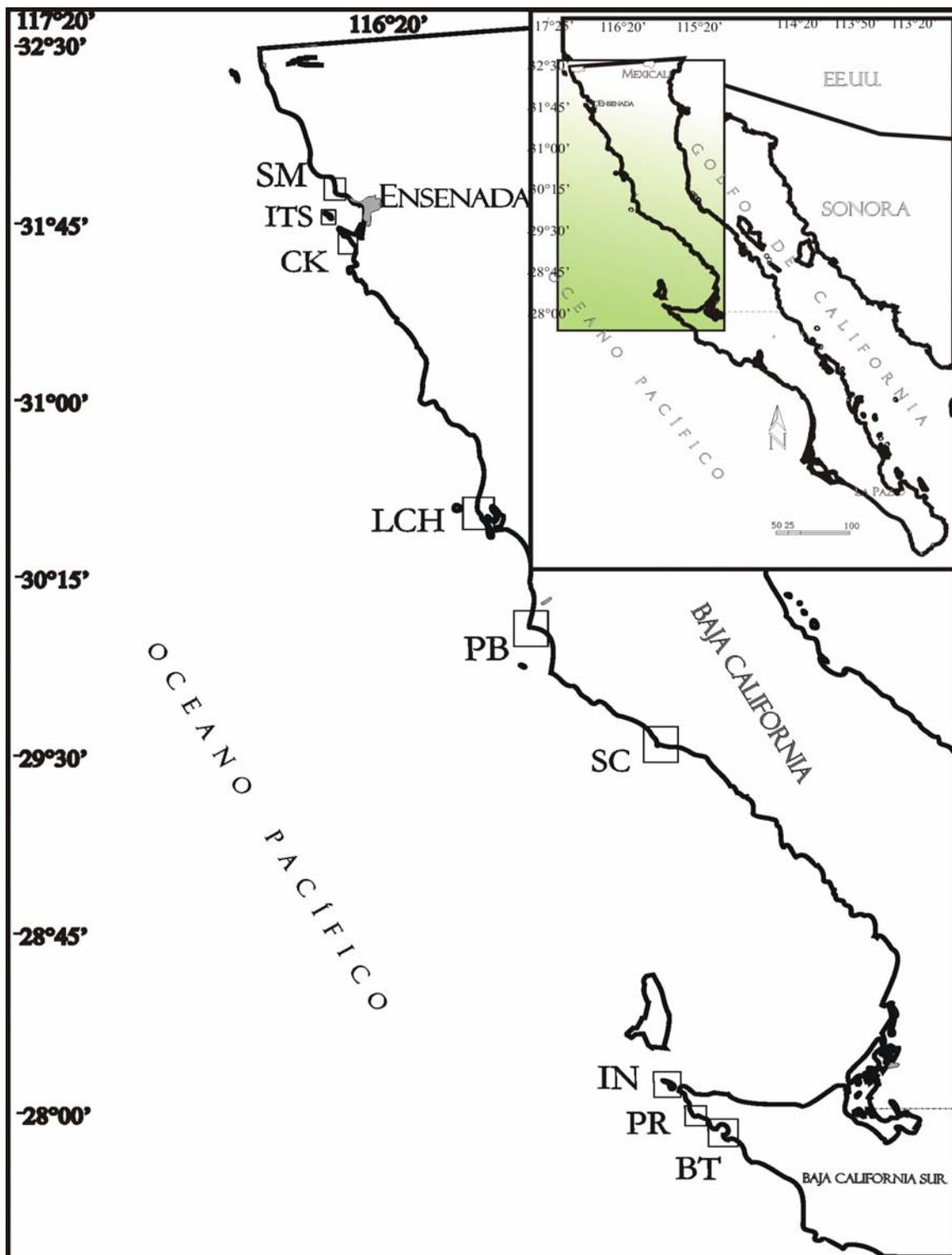


Figura 1. Área de estudio. Cada recuadro con la inicial representa a las localidades en donde se realizaron las recolecciones de los organismos.

**Tabla I. Distancias entre los sitios de colecta. Las iniciales corresponden a las localidades mencionadas anteriormente y los números a la distancia en kilómetros entre las localidades.**

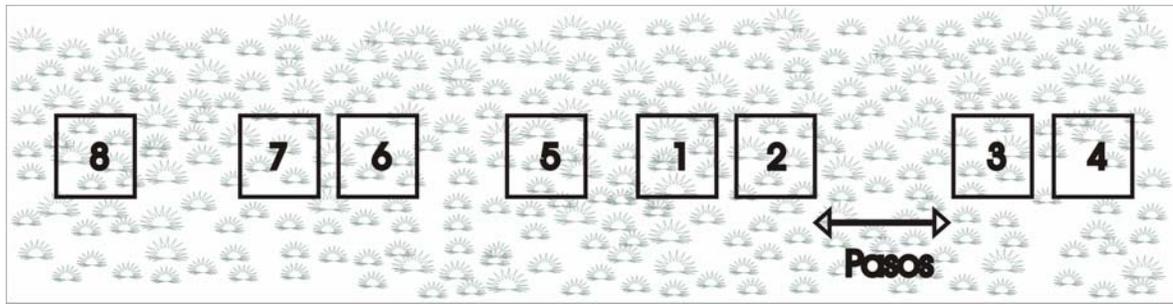
	SM	CK	ITS	LCh	PB	SC	IN	PR	BT
SM									
CK	21.25								
ITS	11.25	15							
LCh	171.25	150	168.75						
PB	236.25	212.25	224.25	63.75					
SC	285	261	274.5	112.5	48.75				
IN	483	459	472.5	310.5	239.25	198			
PR	503.75	479.75	493.25	331.25	260	218.75	20.75		
BT	539.5	515.5	529	367	295.75	337.5	35.75	15	

#### **IV. 2. Metodología de Campo: estimación de densidades y recolección de muestras genéticas.**

La estimación de densidades y la recolección de organismos fueron durante la marea más baja del día. Las densidades ( $\delta$ ) del erizo morado se determinaron por cuadrantes aleatorios (Amborse, 2002). La distancia entre cada cuadrante correspondió a números aleatorios (Zar, 1999) y se cuantificó por pasos (simulando un metro). En cada localidad visitada se colocaron al menos ocho cuadrantes de  $1 \text{ m}^2$  paralelos a la línea de costa (Tabla II, Figura. 2). Se estimaron las densidades de todas las localidades de acuerdo a la ecuación (1) a excepción de Punta San Carlos, en donde las condiciones climatológicas no lo permitieron.

$$\delta = \bar{x} N / \text{unidad de área} \quad (1)$$

En donde,  $\delta$  = densidad,  $\bar{x}$  = media y N= número total de organismos.



**Figura 2.** Selección de cuadrantes aleatorios. Cada cuadro representa un cuadrante de 1 m<sup>2</sup>. La distancia entre cada cuadro representaba a los números aleatorios, en donde cada paso era aproximado a 1 m.

**Tabla II.** Fechas de recolección de erizos por localidad, número de cuadrantes realizados por cada localidad y erizos recolectados de cada localidad. Las comillas en la línea del número de cuadrantes, indican que debido a condiciones climatológicas no se pudieron tomar las densidades y en estos casos sólo se recolectaron los organismos.

Localidades	SM	ITS	CK	LCh	PB	SC	IN	PR	BT
<b>Fecha de recolección</b>	3 Nov. 2002	13 Mar. 2003	30 Nov. 2003	16 Dic. 2002	19 Dic. 2002	18 Dic. 2002	19 May. 2003	20 Feb. 2003	19 Feb. 2003
<b>No. de cuadrantes</b>	15	" "	8	15	16	" "	" "	8	" "
<b>Erizos recolectados</b>	49	8	50	49	53	52	10	26	11

De cada localidad se recolectaron erizos al azar sin importar la talla. El tamaño de muestra de cada localidad varió debido a las abundancias de erizos de cada una (Tabla II). Los organismos recolectados se transportaron vivos al laboratorio en una hielera con hielo y agua de mar, sin exceder los cuatro días. Los organismos de La Chorera, Bahía Tortugas, Isla Natividad y Punta Rompiente se preservaron en etanol al 70% debido a la permanencia en el campo.

### **IV. 3. Trabajo de Laboratorio.**

El trabajo de laboratorio se llevo a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Baja California campus Ensenada. De cada erizo recolectado se extrajeron los tejidos de las gónadas y del sistema digestivo y muscular de la linterna de Aristóteles. Cada tejido se etiqueto y preservó por separado a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  como lo recomiendan Dawson *et al.* (1998). Los tejidos preservados en etanol al 70% se rehidrataron y congelaron a la misma temperatura que las demás muestras.

#### **IV. 3. 1. Extracción de ADN, cuantificación de ADN, diseño de cebadores y técnica de PCR.**

Para la extracción de ADN se tomaron entre 100 y 120 mg de tejido homogeneizado de las gónadas o de la membrana peristomeal de cada organismo. Se emplearon dos métodos de extracción de ADN total (Apéndice I). El primero comprende el protocolo estándar de fenol-cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989) y el segundo fue un protocolo de extracción de sales, en donde se modifico el tiempo de extracción (Miller *et al.*, 1988; Milligan, 1998). La cuantificación de ADN se realizó a través de la técnica de electroforesis en gel.

Debido a que se tuvo problema con cien extracciones de ADN éstas se cuantificaron mediante un espectrofotómetro de luz UV (Perkin Elmer Labda 40) en diluciones de 1:3000  $\mu\text{l}$ . El radio de absorbancia se midió de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

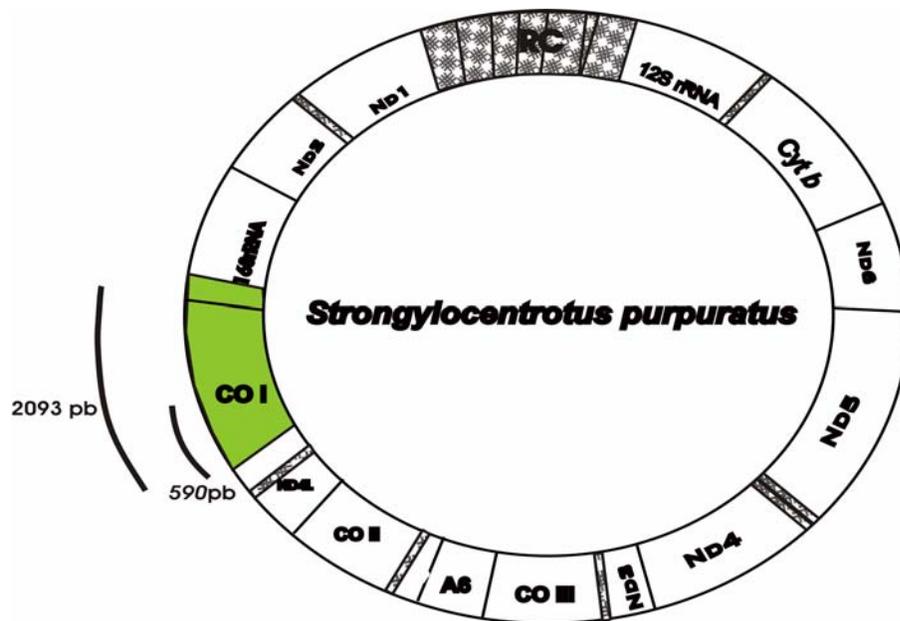
Radio de absorbancia = $A_{\lambda 260} / A_{\lambda 280}$	(4)
Concentración = $A_{\lambda 260} * \text{Factor}$	(5)

Una vez que se conoció la cantidad de ADN total extraído de cada muestra se amplificaron dos fragmentos del ADN mitocondrial a través de la técnica de PCR (por sus siglas en inglés; Avise, 1994) o reacción en cadena de la polimerasa. Esta técnica requiere de cebadores, los cuales se diseñaron con el programa PRIMER SELECT (WINSTAR, Inc. Ver. 3.05a). En el diseño de cebadores se utilizaron las secuencias conocidas de las dos regiones utilizadas ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov); GeneBank número de acceso X12631; Jacobs *et al.*, 1988). Este diseño también consideró los parámetros de porcentajes de G y C, la longitud y la temperatura de alineación para obtener a los más óptimos, la posibilidad de dimerizaciones (asociación entre dos moléculas), los dobleces que pudiese sufrir un cebador y los apareamientos erróneos. Los cebadores utilizados fueron reconstituidos en diciembre de 2002 y se almacenaron a  $-20^{\circ}$  C en una concentración 100  $\mu$ M. Las concentraciones de trabajo fueron de 10  $\mu$ M en 0.1X TE pH 7.5 (Tabla III).

**Tabla III. Cebadores diseñados para la amplificación del fragmento de CO I.**

Cebadores	Tamaño (pb) del fragmento amplificado	Región blanco	Secuencia y dirección de los cebadores
Par 1	2093	CO I	EPCOILf: 5' GTTAAACGGCCGCTGTATCTTG 3' EPCOILr: 5' GGTGATTCCTCCCGTTGAG 3'

El fragmento amplificado comprendió al gen de citocromo oxidasa I (CO I). Este fragmento contempló al fragmento de 590 pares de bases (pb) reportado por Edmands *et al.* (1996; Figura. 3).



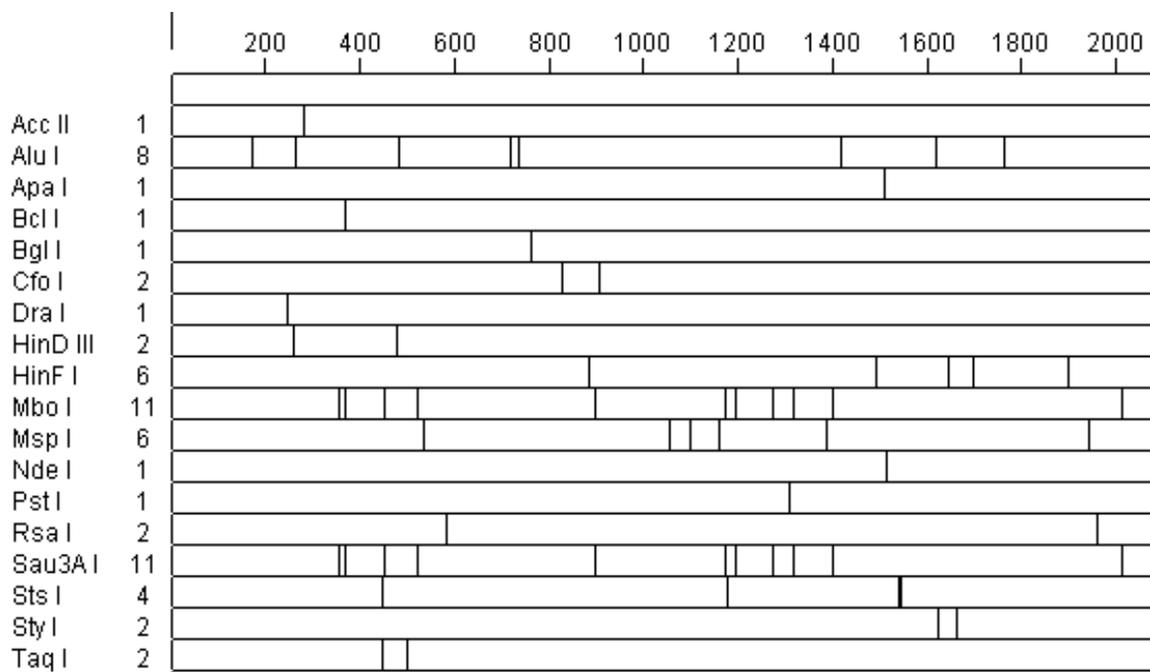
**Figura. 3.** Mapa del ADNmt del erizo morado (*S. purpuratus*) reportado por Jacobs *et al.* (1988). La sección coloreada representa la región amplificada por PCR de 2093 pb; El fragmento de 590 pb corresponde al fragmento amplificado por Edmands *et al.* (1996).

Las reacciones de PCR se realizaron en 25 y 60  $\mu$ l. En el fragmento de CO I se utilizaron 30  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$  de ADN, amortiguador de PCR 1x, Tris-HCl pH 8.4 22mM, KCl 55mM, DNTPs mix 220  $\mu$ M,  $\text{MgCl}_2$  4.95mM y Tween 20 0.05%.

El ciclo optimizado se realizó en un termociclador Perkin Elmer 480. En el fragmento de CO I se realizó una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, se continuó con 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C y 2 min a 72°C, con una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos obtenidos se visualizaron con una electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

### IV. 3. 2. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

Con la ayuda del programa MAPDRAW de WINSTAR Inc. ver. 3.05a se realizó un mapa teórico de corte con las secuencias reportadas por Jacobs *et al.* (1988) para conocer las enzimas de restricción que cortaban al fragmento de CO I amplificado. Las enzimas seleccionadas fueron aquellas que mostraran menos de 12 cortes de restricción para poder tener una buena visualización en la electroforesis de gel de agarosa (Figura. 4). Estas enzimas se probaron en veintidos productos de PCR de todas las localidades. Una vez que se identificaron las enzimas polimórficas del fragmento de CO I se realizaron las digestiones. En estas digestiones se utilizaron entre 400-600 ng de ADN de producto de PCR del fragmento de CO I, 5 unidades  $\mu\text{l}^{-1}$  de enzima, amortiguador 1X y de acuerdo a cada enzima, las especificaciones correspondientes al fabricante. Los cortes de restricción hechos por las enzimas en el fragmento digerido se visualizaron de acuerdo a la migración de los fragmentos en un campo electrico. Es decir, se corrió una electroforesis con geles de agarosa al 1.8% (80 volts, 100 min) teñidos con bromuro de etidio ( $0.5 \text{ } \Phi\text{g ml}^{-1}$ ) y se reconocieron los patrones de corte de cada enzima. Cada uno de los geles producto de la electroforesis se fotografió con una cámara Polaroid con película 667 blanco y negro. Las fotografías se analizaron visualmente y con ayuda del programa Kodak™ ver. 1.0. Cada patrón de corte diferente se determinó como un haplotipo.



**Figura 4.** Mapa de cortes de restricción de las enzimas probadas en el fragmento de CO I. La columna izquierda indica el nombre de las enzimas y los números indican el número de cortes de cada enzima; los números superiores corresponden a pares de

bases y al tamaño total del fragmento. Las franjas en vertical al centro de la figura representan el sitio de corte.

#### **IV. 4. Análisis de datos moleculares.**

Una vez identificados los haplotipos del fragmento de CO I amplificado se analizó la distribución de frecuencias de los haplotipos por cada localidad, así como la diversidad haplotídica de cada localidad. También se analizó la relación entre los haplotipos a través de un análisis de Red de Expansión Mínima (Minimum Spanning Network) y un cladograma. Y por último se realizó un Análisis de Variancia Molecular (AMOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre las localidades que indicarían la presencia o ausencia de una estructura genética en la población del erizo morado.

##### **IV. 4. 1. Distribución de frecuencias de haplotipos.**

Los haplotipos del fragmento de CO I amplificado estuvieron representados con distintas frecuencias en cada una de las localidades. Y para conocer cual era la frecuencia de cada haplotipo se aplicó la siguiente ecuación (6):

$pi = x_i / n$	(6)
----------------	-----

En donde,  $pi$  = Frecuencia haplotídica,  $x_i$  = número de organismos que presentan dicho haplotipo y  $n$  = número total de organismos por localidad. Una vez conocidas las frecuencias de cada haplotipo se representaron porcentualmente en gráficas de pastel.

#### **IV. 4. 2. Diversidad haplotídica.**

La diversidad haplotídica ( $\pi$ ) se obtuvo con el programa Arlequín ver. 2.0 (Excoffier *et al.*, 1992). La diversidad haplotídica se expresó de acuerdo a la equivalencia esperada por heterocigocidad y se define como la probabilidad de que dos haplotipos homólogos escogidos al azar sean diferentes en la muestra (Nei y Tajima, 1981; Excoffier *et al.*, 1992).

#### **IV. 4. 3. Relaciones entre haplotipos.**

Para observar las relaciones entre los haplotipos obtenidos se realizó un análisis de Red de Expansión Mínima (Minimum Spanning Network). Para este análisis fue necesario calcular una matriz de distancias de proporción del fragmento amplificado, dicha matriz se calculó con el programa RESTDIST (PHYLIP ver. 6.0; Felsenstein, 1988). La matriz de distancias de proporción representó a la variación genética que se encontraba en el ADNmt, la cual fue cuantificada por el número promedio de las sustituciones por sitio (presencia o ausencia de cortes de restricción) entre los haplotipos (Kruskal, 1956; Prim, 1957 en Excoffier *et al.*, 1992). Con el programa ARLEQUIN ver. 2.0 (Scheider *et al.*, 2000, Excoffier *et al.*, 1992) se pudo considerar a cada haplotipo como una OTU's (Unidades Taxonómicas Operacionales), lo cual permitió representar los eventos mutacionales entre cada haplotipo y las frecuencias de cada haplotipo y así poder observar las relaciones entre los haplotipos. Estos resultados fueron interpretados mediante un diagrama de Red de Expansión Mínima. Dicho diagrama representa a cada haplotipo como un círculo. El tamaño de cada círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipo. Los haplotipos se ubican de acuerdo a la

relación que exista entre cada uno de ellos y la distancia entre cada círculo representa los eventos mutacionales entre ellos.

En el caso del cladograma también fue necesaria la matriz de distancias de proporción mencionada anteriormente (RESTDIST, PHYLIP ver. 6.0; Felsenstein, 1988). Con esta matriz se realizó un remuestreo de bootstrap (SEQBOOT, PHYLIP ver. 6.0 (Felsenstein, 1988) en donde se contemplaron 6 sitios de corte y 100 remuestreros. Los datos obtenidos se analizaron por el método de Neighbour Joining el cual construye distintos árboles filogenéticos o cladogramas que muestran las posibles relaciones entre los haplotipos, este método se obtuvo con el programa NEIGHBOUR (PHYLIP ver. 6.0; Felsenstein, 1988). Los distintos árboles obtenidos se condensaron con el programa CONSENSE (PHYLIP ver 6.0; Felsenstein, 1988).

#### IV. 4. 4. AMOVA.

El Análisis de Variancia Molecular (AMOVA; Wright, 1969, Excoffier *et al.*, 1992) se realizó con el programa WINAMOVA ver 1.04 y Arlequín ver. 2.0 (Excoffier *et al.*, 1992), el cual cuantificó la variancia genética del ADNmt del fragmento amplificado. Las pruebas de significancia se realizaron a partir de 1023 permutaciones a partir de las matrices de distancias calculadas anteriormente. Dicho análisis se realizó para poder establecer la existencia de diferencias significativas en distintos niveles jerárquicos (por ejemplo, entre las distintas localidades y dentro de las localidades). El coeficiente de diferenciación genética  $F_{ST}$  se determinó de acuerdo al programa Arlequín que emplea la siguiente ecuación (7):

$$F_{ST} = \frac{f_0 - f_1}{1 - f_1} \quad (7)$$

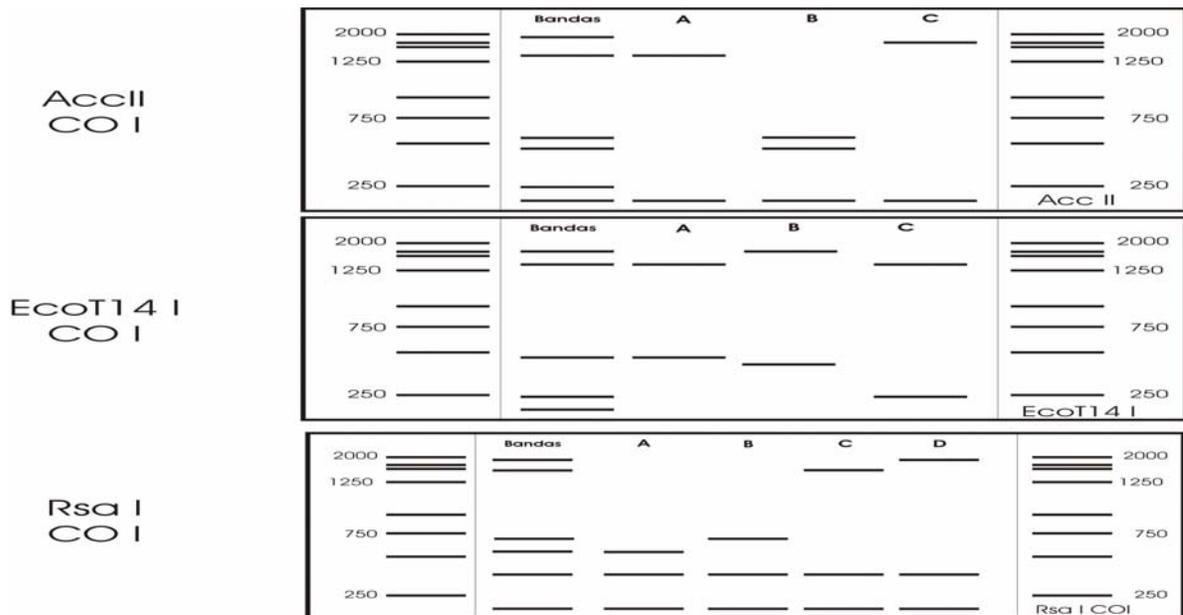
En donde:  $f_0$  = es la probabilidad de la identidad por descendencia de dos diferentes genes presentes en la misma poblaciones,  $f_1$  = es la probabilidad de identidad de dos genes presentes en diferentes poblaciones. Este coeficiente de diferenciación genética es probado por estadística no paramétrica descrita por Excoffier *et al.* (1992), el cual permuta haplotipos individuales o poblacionales entre individuos, poblaciones o entre grupos y posterior a cada permutación se computa un estadístico de distribuciones nulas (WINAMOVA 1.04 y Arlequín ver. 2.0.; Excoffier *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 1997; Wright, 1951, 1965, 1969).

## V. RESULTADOS.

Los datos genéticos basados en el análisis de la variación del fragmento amplificado de CO I sugieren que existe una ligera estructura de las poblaciones.

### V.1. Análisis de datos moleculares.

En el fragmento de CO I las enzimas que mostraron polimorfismo fueron: Acc II (isoesquizómero de Tha I), Pst I, Rsa I, EcoT14 I (isoesquizómero de Sty I) y Taq I. Sin embargo, sólo se utilizaron Acc II, EcoT14 I y Rsa I. Las enzimas Acc II y EcoT14 I presentaron tres haplotipos cada una y Rsa I mostró cuatro haplotipos (Figura. 5).



**Figura 5. Haplotipos o patrones de bandeo de cada una de las enzimas de restricción utilizadas en el fragmento de CO I (Acc II, EcoT14 I y Rsa I). Las columnas del extremo derecho e izquierdo representan una escalera molecular de 250 pb, en donde cada una de las bandas representa un peso conocido. La columna de la parte central de la figura ubicada en el extremo izquierdo representa el número total de bandas de todos los haplotipos. Las columnas restantes representan a cada uno de los haplotipos, los cuales son representados con las letras A, B, C y D.**

### V. 1. 2. Distribución de frecuencias de haplotipos.

El resultado de la digestión del fragmento de CO I con tres enzimas de restricción fue el hallazgo de trece haplotipos distintos distribuidos en 126 organismos, según la Tabla IV.

**Tabla IV. Total de haplotipos registrados para el fragmento de CO I. La columna del extremo izquierdo representa a cada uno de los haplotipos. El arreglo en las líneas horizontales muestra cada haplotipo encontrado para cada enzima y en su conjunto. La columna del extremo derecho muestra el número total de individuos que presentaron dicho haplotipo.**

Haplotipos	Enzimas			n
	Acc II	EcoT14 I	Rsa I	
<i>SpCO I-1</i>	A	A	A	1
<i>SpCO I-2</i>	A	A	B	2
<i>SpCO I-3</i>	A	A	C	54
<i>SpCO I-4</i>	A	A	D	1
<i>SpCO I-5</i>	A	B	C	8
<i>SpCO I-6</i>	A	C	B	1
<i>SpCO I-7</i>	A	C	C	1
<i>SpCO I-8</i>	B	A	C	20
<i>SpCO I-9</i>	B	B	A	2
<i>SpCO I-10</i>	B	B	B	2
<i>SpCO I-11</i>	B	B	C	32
<i>SpCO I-12</i>	B	B	D	1
<i>SpCO I-13</i>	B	C	D	1
<b>TOTAL</b>				126

La distribución de frecuencias de haplotipos encontrados para la región de CO I (Tabla V, Figura. 6) muestra a tres haplotipos presentes en todas las localidades (*SpCO I-3*, *SpCO I-8* y *SpCO I-11*). PB tiene el mayor número de haplotipos y también tiene tres haplotipos privados (*SpCO I-3*, *SpCO I-6* y *SpCO I-7*). SM e ITS fue la localidad con menor número

de haplotipos y sólo compartió a uno de sus haplotipos (*SpCO I-10*) con CK. Las localidades de CK y SC presentaron cinco haplotipos. LCh e IN, PR y BT presentaron seis haplotipos. El haplotipo *SpCO I-4* fue privado de LCh. Los haplotipos *SpCO I-9* y *SpCO I-13* fueron privados de IN, PR y BT. El haplotipo *SpCO I-5* sólo no esta presente en las localidades de SM e ITS e IN, PR y BT.

**Tabla V. Frecuencias de los haplotipos de CO I encontrados por localidad En la columna izquierda se encuentran los haplotipos. En la parte superior se muestra a las localidades y la parte central indica las frecuencias de cada haplotipo en cada localidad.**

<b>Haplotipos</b>	<b>SM e ITS</b>	<b>CK</b>	<b>LCh</b>	<b>PB</b>	<b>SC</b>	<b>IN PR y BT</b>
<i>SpCO I-1</i>	0	0	0	3.704	0	0
<i>SpCO I-2</i>	0	0	0	0	4.545	6.25
<i>SpCO I-3</i>	28	47.4	35.3	55.56	45.45	43.75
<i>SpCO I-4</i>	0	0	5.88	0	0	0
<i>SpCO I-5</i>	0	10.5	17.6	3.704	9.091	0
<i>SpCO I-6</i>	0	0	0	3.704	0	0
<i>SpCO I-7</i>	0	0	0	3.704	0	0
<i>SpCO I-8</i>	24	15.8	11.8	18.52	9.091	12.5
<i>SpCO I-9</i>	0	0	0	0	0	12.5
<i>SpCO I-10</i>	4	5.26	0	0	0	0
<i>SpCO I-11</i>	44	21.1	23.5	11.11	31.82	18.75
<i>SpCO I-12</i>	0	0	5.88	0	0	0
<i>SpCO I-13</i>	0	0	0	0	0	6.25

Las diversidades haplotídicas indicaron que la localidad de LCh tuvo la mayor diversidad haplotídica, mientras que PB fue la de menor diversidad (Tabla VI). Sin embargo, al comparar si esta diversidad estaba relacionada a la densidad de cada localidad, no se

encontró una relación entre aquellas localidades que tenían la mayor densidad con aquellas de mayor diversidad haplotídica.

**Tabla VI. Diversidades haplotídicas del fragmento de CO I. En la columna izquierda se encuentran las localidades analizadas. Cada localidad tiene el número de individuos analizados, las densidades totales de erizos y la diversidad haplotídica.**

<b>Localidades</b>	<b>n</b>	<b>Densidad</b>	<b>Div. Haplot.</b>
<b>SM e ITS</b>	25	25	$0.6967 \pm 0.0498$
<b>CK</b>	19	50.62	$0.7310 \pm 0.0805$
<b>LCh</b>	17	4.25	$0.8162 \pm 0.0607$
<b>PB</b>	27	23.25	$0.6638 \pm 0.0876$
<b>SC*</b>	22	n.d.	$0.7076 \pm 0.0679$
<b>IN PR y BT</b>	16	1.75	$0.7833 \pm 0.0852$

\* En la localidad de SC no se pudieron obtener datos de densidades de erizos.

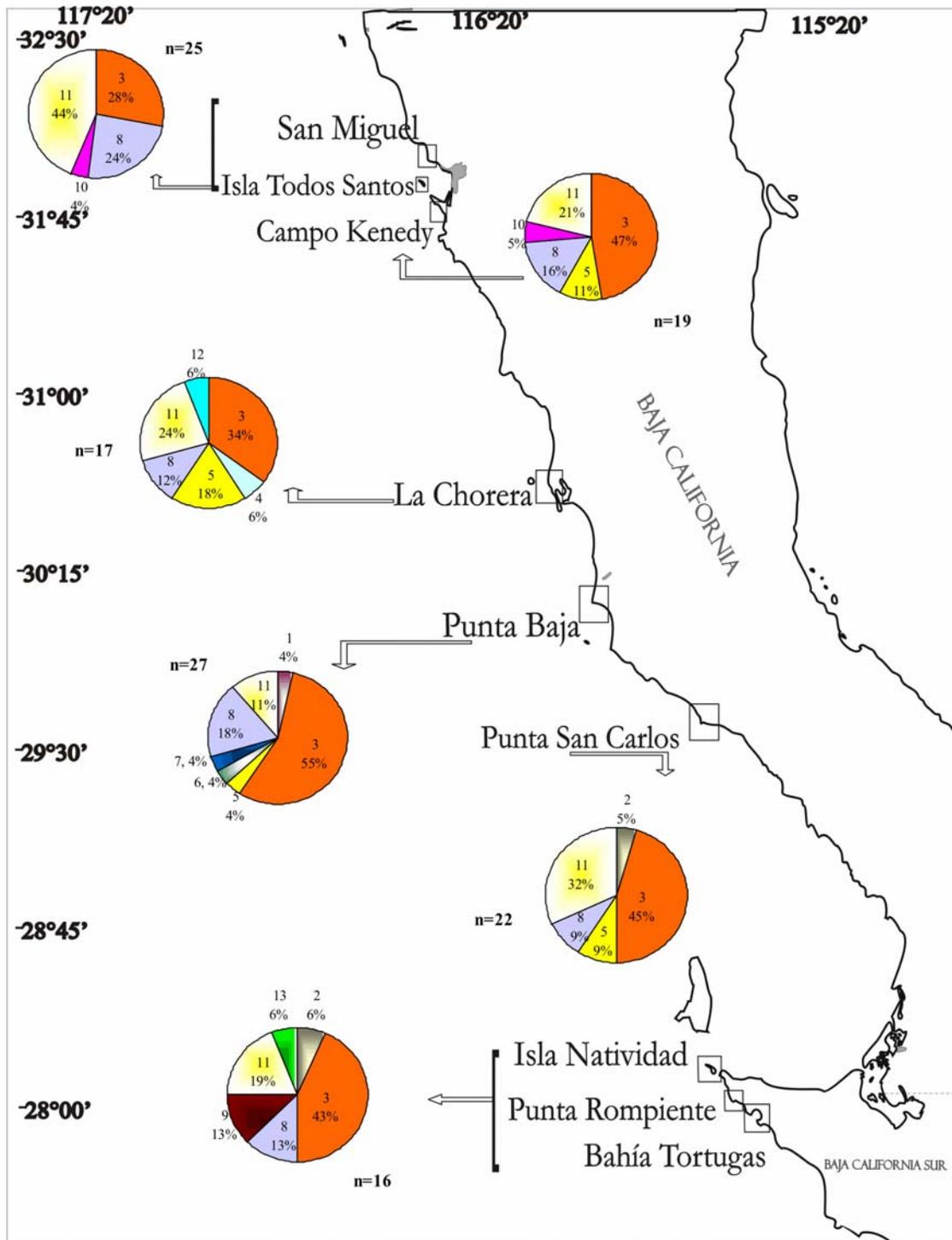
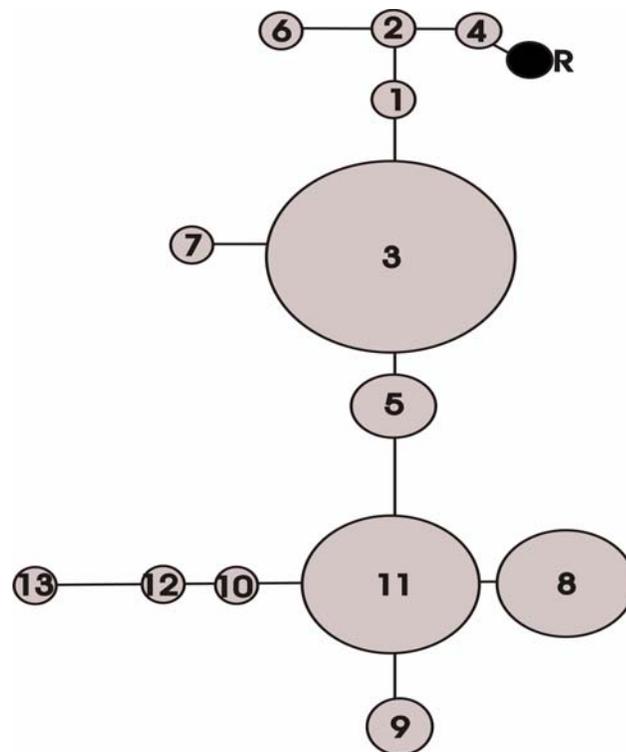
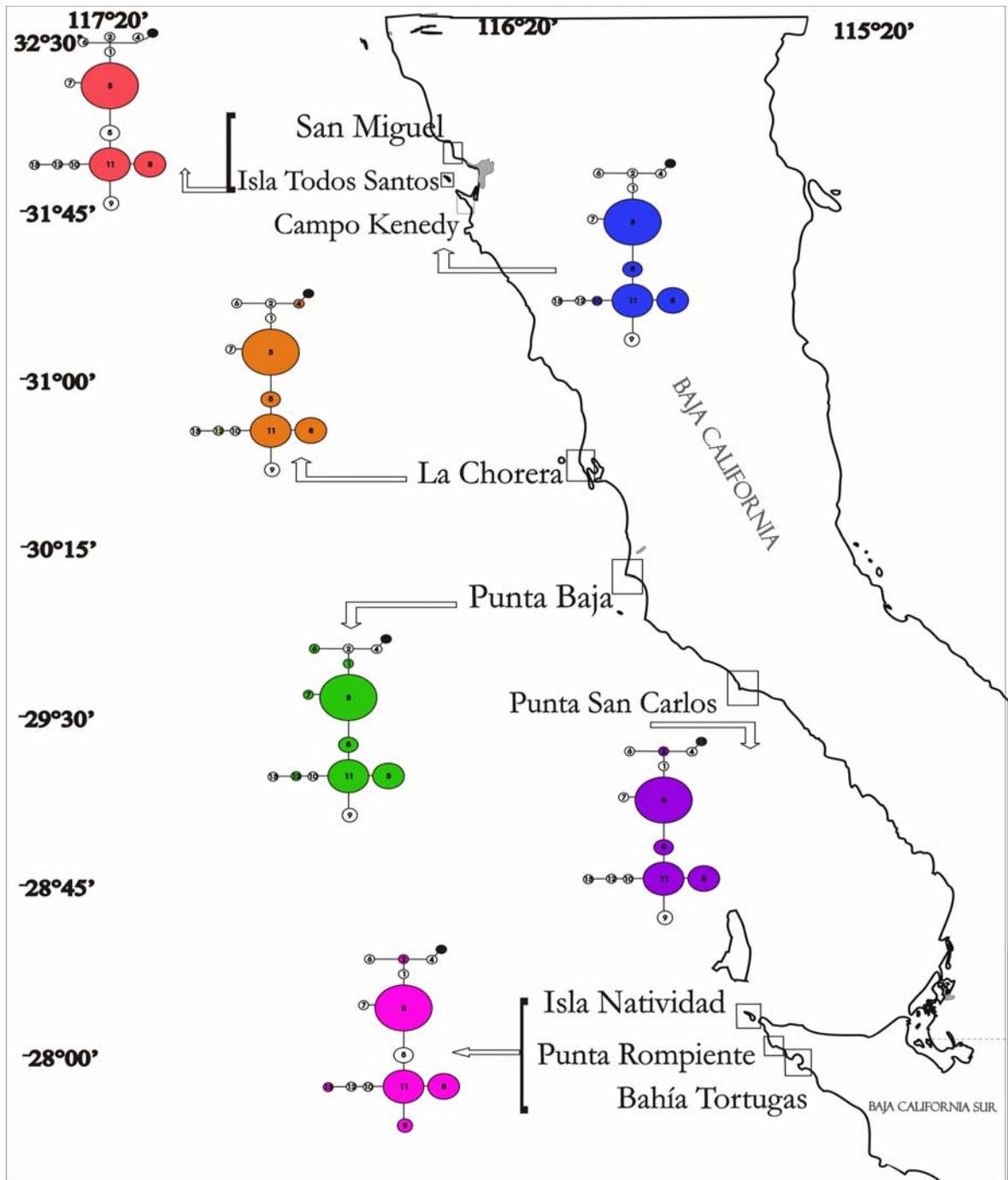


Figura. 6. Distribución de frecuencias del fragmento de CO I. Los números en las gráficas representan a los haplotipos presentes en cada localidad y sus frecuencias en porcentajes de acuerdo a la Tabla V, cada gráfica también indica el número de individuos analizados en cada localidad.

El diagrama del análisis de Red de Expansión Mínima del fragmento de CO I (Figura. 7) mostró a los haplotipos de mayor frecuencia en la parte central. Los de menor frecuencia se encontraron en los extremos o bien radiando de aquellos que son más frecuentes. En este caso y de acuerdo a lo dicho para dicho análisis (Excoffier *et al.*, 1992) se considera a los haplotipos centrales y de mayor frecuencia como los haplotipos ancestrales, mientras que los que radian de estos haplotipos y cuyas frecuencias son menores se consideran como haplotipos recientes. El erizo rojo se ubicó cerca del haplotipo *SpCO I-4*. En este caso, para cada localidad el arreglo es semejante entre si y se observa que las localidades de PB y LCh fueron las que presentan un mayor número de haplotipos recientes (Figura.8).



**Figura. 7.** Diagrama de análisis de Red de Expansión Mínima o Minimum Spanning Network del fragmento de CO I. El círculo negro marcado con la letra R representa al erizo rojo. El tamaño de los círculos representa proporcionalmente a las frecuencias de cada uno de los haplotipos y la distancia entre ellos representa las distancias proporcionales entre los haplotipos.



**Figura. 8.** Diagramas de Red de Expansión Mínima o Minimum Spanning Network para el fragmento de CO I. El círculo negro representa al erizo rojo. El tamaño de los círculos representa proporcionalmente a las frecuencias de cada uno de los haplotipos y la distancia entre ellos representa las distancias proporcionales entre los haplotipos. Cada localidad tiene un arreglo diferente indicando con color sombreado los haplotipos presentes en cada localidad.

El cladograma de bootstrap de consenso del fragmento de CO I (Figura. 9) muestra tres grupos con valores bien representados (mayores al 50%). Uno de los grupos tiene a un solo haplotipo (*SpCO I-4*), el cual sólo está presente en LCh; este haplotipo se consideraría como el más ancestral de todos y es el que se encuentra más relacionado con el erizo rojo. Este haplotipo es el que también se encuentra más relacionado en el diagrama de red de expansión mínima. Otro de los grupos relaciona a dos haplotipos (*SpCO I-12* y *SpCO I-13*), que sólo se encuentran presentes en LCh y las localidades del sur (IN, PR y BT). En este grupo se observa que estos haplotipos fueron divididos recientemente, lo cual también coincide con el diagrama de red de expansión mínima, ya que se observa que estos haplotipos se radian de uno de los haplotipos más frecuentes (*SpCO I-11*). Por último, el grupo en donde se encuentran los haplotipos restantes, engloba a todos los haplotipos de las localidades de PB, SM e ITS, CK y SC. Dentro de este grupo se dividen otros dos grupos, los cuales no tienen tan buenos valores como los grupos anteriores. En uno de los grupos se encuentran dos de los haplotipos de mayor frecuencia y comunes entre todas las localidades (*SpCO I-11* y *SpCO I-08*) y al mismo tiempo se encuentran los haplotipos *SpCO I-09* y *SpCO I-10*. Este grupo también coincide con el diagrama de red de expansión mínima. Por otro lado, en el otro grupo se encuentra también uno de los haplotipos comunes entre las localidades *SpCO I-03* y la mayoría de los haplotipos restantes corresponden a la localidad de PB.

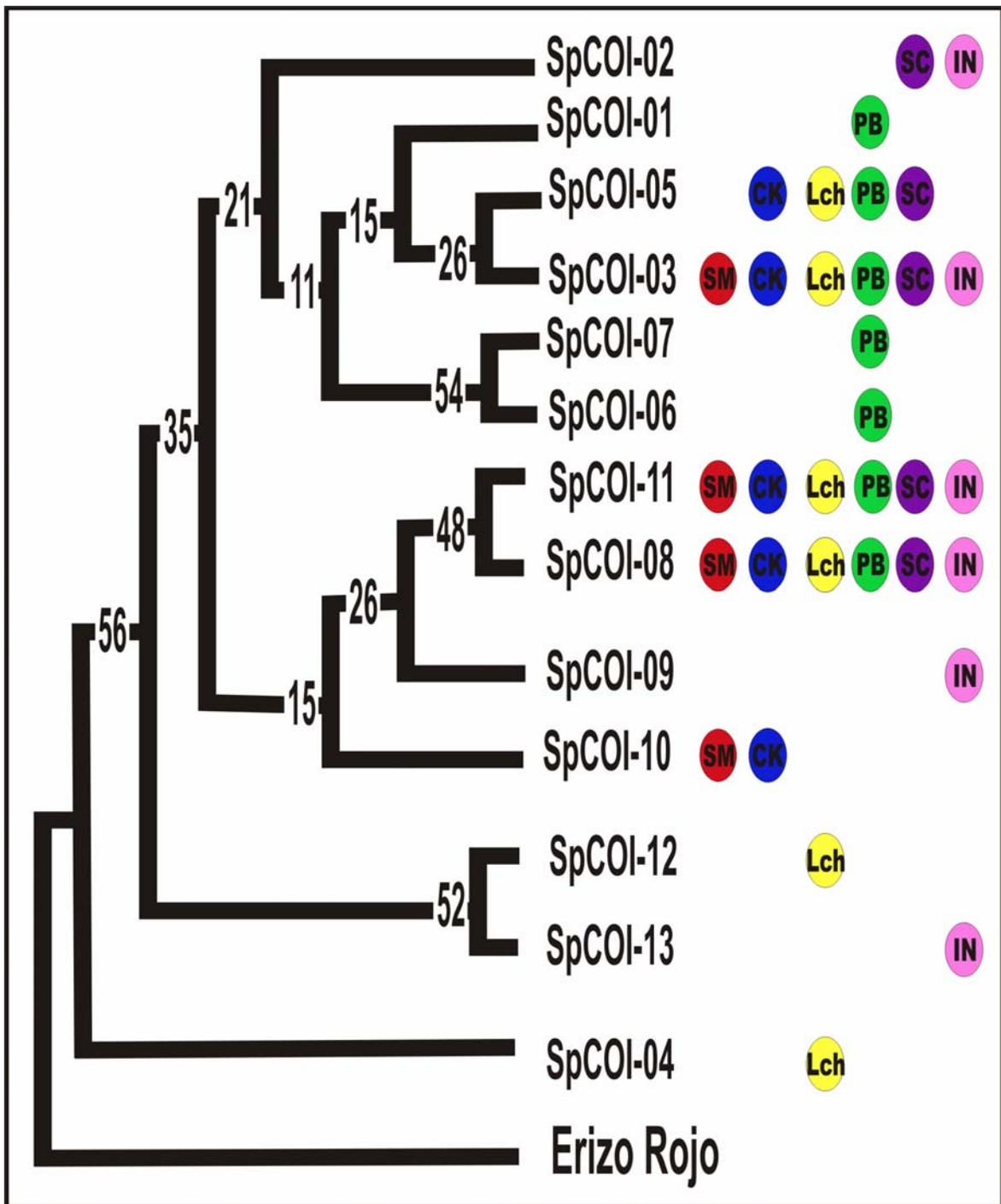


Figura. 9. Cladograma de consenso bootstrap elaborado por el método de Neighbour Joining para el fragmento de CO I. Los números dentro de las ramas, representan el número de veces que se repite ese arreglo para esa rama o ramas. Las claves al final de las ramas corresponden a cada uno de los haplotipos. Los círculos ubicados en el extremo derecho corresponden a cada una de las localidades, las cuales se representan con sus iniciales y en distintas tonalidades.

El AMOVA realizado para el fragmento de CO I (Tabla VII) indicó que existen diferencias significativas entre las localidades. Los porcentajes de variación son mayores dentro de las poblaciones que entre las poblaciones. El valor de  $F_{ST}$  es bajo, sin embargo el valor de  $p$  indica que es significativo. La matriz de significancia de los valores de  $F_{ST}$  y  $p$  (0.05) muestra que la localidad de Punta Baja y San Miguel e Isla Todos Santos son diferentes entre si (Tabla VIII).

**Tabla VII. Análisis de AMOVA del fragmento de CO I. Se muestran los resultados entre poblaciones y dentro de las poblaciones, así como el coeficiente de variación genética y el valor  $p$ .**

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la variancia	Porcentaje de variación
<b>Entre poblaciones</b>	5	0.1147	0.000360 Va	2.28%
<b>Dentro de poblaciones</b>	120	1.8503	0.015419 Vb	97.72%
<b>Total</b>	125	1.9650		

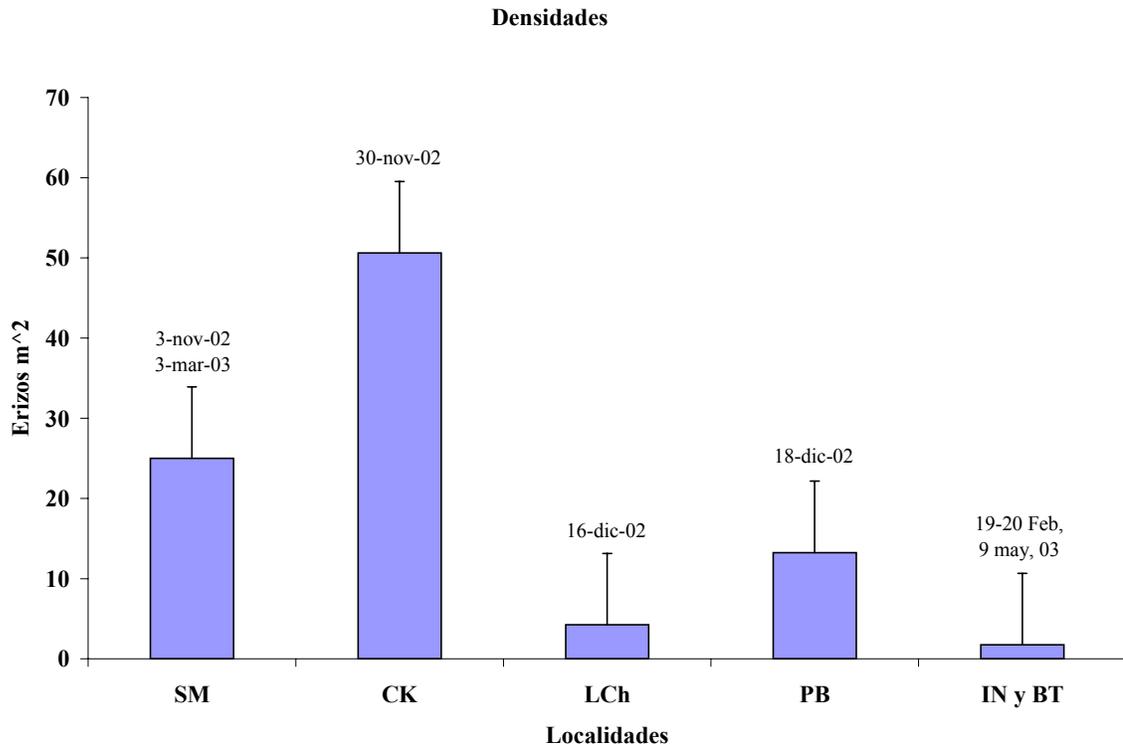
**Coefficiente de diferenciación genética  $F_{ST}$  : 0.023,  $p < 0.0010$**

**Tabla VIII. Matriz de significancia del fragmento de CO I de los valores de  $F_{ST}$  y  $p$ , obtenida en el AMOVA.**

Localidades	SM e ITS	CK	LCh	PB	SC	IN, PR y BT
SM e ITS						
CK	-					
LCh	-	-				
PB	+	-	-			
SC	-	-	-	-		
IN, PR y BT	-	-	-	-	-	

## V. 2. Densidades de erizos por localidad.

Las densidades estimadas mostraron que Campo Kennedy tuvo la mayor densidad de todas las localidades, mientras que Isla Natividad- Bahía Tortugas presento la menor (Figura. 10). En la localiad de San Carlos no se pudieron obtener las densidades debido a la dificultad de las condiciones climatológicas.



**Figura 10.** Valores promedio de las densidades de erizos morados de cada localidad. En la localidad de San Carlos (SC) no se obtuvieron datos, debido a condiciones oceanográficas fueron desfavorables. Todas las densidades corresponden a ocho cuadrantes. Las fechas arriba de cada columna indican cuando se tomaron las densidades.

## VI. DISCUSIÓN.

Los resultados de este estudio indicaron la existencia de una sutil estructura poblacional en el análisis de RFLP's de CO I. Estos datos coinciden con lo reportado anteriormente en otros ámbitos de sus distribución, en donde los resultados reportados por distintos autores han diferido (Britten *et al.*, 1978; Palumbi y Wilson, 1990; Edmands *et al.*, 1996; Flowers *et al.*, 2002). Sin embargo, la estructura genética del fragmento de CO I de 2093 pb tuvo una buena resolución y coincide con lo reportado por Edmands *et al.* (1996), quienes reportan una estructura poblacional en el erizo morado *S. purpuratus*. En el caso de Edmands *et al.* (1996) se utilizan dos marcadores moleculares diferentes al utilizado en el presente trabajo: alozimas y secuencias. Pese a estas diferencias, los resultados en este trabajo coinciden y muestran otras semejanzas que más adelante se mencionaran. La importancia de este trabajo radica principalmente en la evaluación genética de la población del erizo morado *S. purpuratus* que se distribuye en la costa del Pacífico de la península de Baja California. Ya que en estudios previos sólo se han realizado evaluaciones de la genética poblacional de esta especie en distintas localidades de E.U.A (Britten *et al.*, 1978; Palumbi y Wilson, 1990; Edmands *et al.*, 1996; Flowers *et al.*, 2002).

Algunas de las diferencias entre los distintos reportes realizados, residen principalmente en el tamaño de muestra, las localidades analizadas y los marcadores moleculares empleados. Por ejemplo, los reportes de Palumbi y Wilson (1990) y Flowers *et al.* (2002) indicaron la ausencia de una diferenciación genética en el erizo morado. Por un lado, Palumbi y Wilson (1990) analizaron el ADNmt total del erizo morado con enzimas de restricción, su tamaño

de muestra fue escaso (n=39) y sólo se estudiaron dos localidades (Washington y San Francisco, E.U.A.). Posiblemente, dicho reporte no representó significativamente a la población o bien, ambas localidades representaban un intervalo de distribución de la especie en donde la población tiende a una homogeneidad. Flowers *et al.* (2002) analizaron secuencias de un fragmento de 358 pb del gen de CO I del ADNmt. El tamaño de muestra utilizado por éstos últimos autores incrementó (n= 283) y estudiaron siete localidades de California, E.U.A. Por otro lado, Edmands *et al.* (1996) reportaron una estructura poblacional mediante el empleo de alozimas y secuencias de 305 pb del gen de CO I del ADNmt. Edmands *et al.* (1996) también analizaron un tamaño de muestra mayor al utilizado por Palumbi y Wilson (1990; n=147) y estudiaron localidades de California, E.U.A. y Baja California, Méx.

A pesar de que existe un mayor número de publicaciones que indican que la población de erizo morado no está estructurada (Palumbi y Wilson, 1990; Flowers *et al.*, 2002), Flowers *et al.* (2002) mencionan que pese a sus resultados obtenidos, al realizar un análisis de sus secuencias obtenidas y de las reportadas por Edmands *et al.* (1996) se indica la existencia de una sutil estructura poblacional, entre sus localidades del norte y del sur; ya que Flowers *et al.* (2002) tiene localidades más norteñas que Edmands *et al.* (1996), pero no tan sureñas como éstos últimos.

En los reportes mencionados anteriormente, los marcadores moleculares que se utilizaron son considerados como herramientas confiables que indican la presencia o ausencia de estructura genética en una población (Avice, 1994). No obstante, el empleo de RFLP's y

ADNmt también proporciona información confiable sobre la estructura genética a pesar de no conocer específicamente el tipo y los sitios de cambio que ocurren en la secuencia (Awise, 1994). Sin embargo, Edmands *et al.* (1996) mencionan dentro de sus perspectivas el análisis del fragmento completo de CO I cortado con enzimas de restricción (ambos conceptos realizados en el presente estudio), ya que tres de los sitios más polimorficos son sitios de reconocimiento de las enzimas Sty I y Tha I, ambas isoformas de las enzimas Acc II y EcoT14 I (utilizadas en este trabajo). Siguiendo con estas recomendaciones a pesar de no emplear un marcador como la secuenciación, los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo reportado por Edmands *et al.* (1996) y Flowers *et al.* (2002).

Entre las similitudes obtenidas con los reportes anteriores, encontramos que los bajos valores de los coeficientes de variación genética o valores de  $F_{ST}$  obtenidos en este estudio, coinciden con lo reportado en poblaciones de invertebrados con larvas planctotróficas (Edmands *et al.*, 1996; Flowers *et al.*, 2002; Kyle y Boulding, 2000; Palumbi y Wilson, 1990). Estos bajos valores de  $F_{ST}$  indican que una población determinada tiene una dispersión homogénea, pero el hecho de que dichos valores presenten diferencias significativas puede hablar de que la estructura poblacional es sutil, ya que como se observó en la tabla de diferencias de proporciones, sólo las localidades de Punta Baja y San Miguel e Isla Todos Santos son diferentes entre sí.

La homogeneidad en una población también puede observarse en sus frecuencias haplotídicas. Flowers *et al.* (2002) reportan la presencia de tres haplotipos comunes en

todas las localidades. En el presente estudio, el fragmento de CO I analizado indicó que también existen tres haplotipos comunes en todas las localidades cuyas frecuencias son altas. Sin embargo, no podemos decir que se trata de los mismos haplotipos reportados por Flowers *et al.* (2002). La presencia de haplotipos comunes entre las localidades puede hablar de un efecto vinculado a una extensa dispersión de larvas entre las distintas localidades (Marcus, 1977; Hedgecock, 1986; Burton, 1983; Kyle y Boulding, 2000; Palmer y Strathman, 1981 en Hines, 1986) y a mayor porcentaje de ciertos haplotipos estos tendrán una mayor probabilidad de reclutarse en diferentes localidades y por lo tanto de encontrarse con mayor frecuencia.

La dispersión de ciertos haplotipos comunes entre las localidades puede verse favorecida por el ciclo de vida de esta especie. A partir de la liberación de gametos y hasta el momento de la metamorfosis, el erizo morado permanece en la columna de agua. Esto puede ocurrir desde finales del invierno hasta el verano (Gonor, 1972; Clatlyne, 1969). La fecundación de los gametos es casi inmediata y posteriormente se comienza a desarrollar una larva planctotrófica equinopluteos. Esta larva puede permanecer en la columna de agua durante un periodo de tiempo largo o corto (Strathman, 1978). La permanencia de esta larva en la columna de agua puede verse alterada por diversos factores, entre ellos la disponibilidad de alimento o los sistemas de corrientes. Al mismo tiempo, esta larva de erizo morado puede tener una dispersión de pocos metros o varios kilómetros a lo largo de la costa. La dispersión de las larvas de erizo morado puede ser favorecida por el flujo de la Corriente de California que a finales del invierno va en dirección al sureste, pero se intensifica hacia el sur durante el inicio de la primavera (Hickey, 1979; Venrick *et al.*, 2003; Lavaniegos *et al.*,

2003). Sin embargo, esta dispersión de larvas también puede ocurrir a lo largo de todo el año (Tegner y Dayton, 1981) y al mismo tiempo puede verse afectada por giros y surgencias que se suceden durante todo el año en algunos lugares como en la localidad de Punta Baja. Esta última particularidad puede favorecer a reclutamientos locales o bien una dispersión de larvas a localidades que se encuentren cercanas al norte o sur.

Hasta ahora, se han presentado algunos argumentos que pueden explicar la homogeneidad de la población. Pero por otro lado, en el fragmento de CO I existen diferencias significativas entre las localidades y como ya se ha dicho una sutil estructura poblacional. La presencia de dicha estructura puede deberse en parte por la deriva de reclutas provenientes de grupos específicos de padres, antes de que dichas cohortes fueran muestreadas y aquellos genotipos diferentes en el tiempo y el espacio pudieron haberse visto favorecidos por distintos procesos demográficos (Thorrold *et al.*, 2002). Sin embargo, esta sutil estructura poblacional también puede estar relacionada con los asentamientos y reclutamientos locales, los cuales pueden ser propiciados por diversos factores. Entre estos factores podemos encontrar eventos oceanográficos como: surgencias (Miller y Emllet, 1997; Morgan *et al.*, 2000), relajación de las surgencias, el bajo efecto del viento en la costa e incrementos en la temperatura y salinidad (Wing *et al.*, 2003). Sin embargo, estos asentamientos y reclutamientos también se pueden ver limitados por inconstancias anuales en el aporte de larvas (Buchanan, 1967 en Wing *et al.*, 2003; Ebert *et al.*, 1994; Paine, 1986, Pearse y Haines, 1987; Miller y Emllet, 1997; Wing *et al.*, 1995, 2003).

Así también, las diferencias entre localidades indican la presencia de características específicas que limitan el flujo de haplotipos y propician reclutamientos locales en algunas localidades más que en otras. Como se ha mencionado anteriormente, las localidades que mostraron diferencias entre sí (de acuerdo a la matriz de significancia del fragmento de CO I) fueron San Miguel y Punta Baja. Además, Punta Baja es una localidad con características oceanográficas y genéticas que la hacen diferir con las demás. Y son éstas características las que sugieran que posiblemente Punta Baja sea una localidad que funcione como un centro de dispersión de haplotipos.

Entre las características oceanográficas de Punta Baja, podemos mencionar que es una localidad altamente productiva. Ladah (com. pers. 2003<sup>1</sup>) menciona que esta localidad tuvo la mayor densidad de algas intermareales durante el 2003 y Lavaniegos *et al.* (2002) y Venrick *et al.* (2003) reportaron para Punta Baja niveles de clorofila *a* mayores a los 8 mg m<sup>-3</sup>. Sin embargo, esto último también coincide para las localidades que se encuentran en Punta Eugenia. Ebert (1983) menciona que la comida abundante provoca un desarrollo acelerado en las larvas, lo cual puede ser un factor que favorezca el reclutamiento local. También, se han reportado reclutamientos asociados a eventos de surgencias (Ebert, 1967) y Punta Baja es una localidad con una alta afluencia de surgencias costeras de bajas temperaturas (Lavaniegos *et al.*, 2002; Venrick *et al.*, 2003). Este factor puede favorecer tanto una dispersión de larvas a las localidades aledañas, las cuales se puedan reclutar al norte y al sur de Punta Baja y al mismo tiempo, también se puede favorecer un reclutamiento local. En esta localidad también se ha reportado la presencia de giros costeros (Lavaniegos *et al.*, 2002; Venrick *et al.*, 2003). Dichos giros pudieran explicar la presencia

de algunos haplotipos comunes entre Punta Baja y La Chorera y al mismo tiempo contribuir con reclutamientos locales.

Entre las características genéticas se encontró a Punta Baja como la localidad con el mayor número de haplotipos privados, los cuales se pueden considerar como ancestrales y más relacionados al erizo rojo de acuerdo al diagrama de red de expansión mínima y el cladograma de Neighbour Joining. Al mismo tiempo, esta localidad presentó la menor diversidad haplotídica del fragmento de CO I, mientras que la localidad de La Chorera fue la localidad con la mayor diversidad haplotídica. Es preciso indicar que la diversidad haplotídica no sólo representa a la localidad con el mayor número de haplotipos, sino a las localidades cuyas frecuencias haplotídicas estén bien representadas por la población.

Las frecuencias haplotídicas del fragmento de CO I son diferentes entre las localidades. La Chorera y Punta Baja son las localidades con mayor número de haplotipos compartidos y posiblemente ocurra un flujo de larvas entre las localidades del norte y del sur hacia las del centro o bien, viceversa. Como se ha mencionado anteriormente, el tiempo que permanece la larva del erizo morado en la columna de agua varía y la dispersión puede ser local, o bien, ocurrir en cientos de kilómetros (Miller y Emlet, 1997; Palmer y Strathmann, 1981 en Hines, 1986; Scheltema, 1971 en Hines, 1986,). Al mismo tiempo, en una misma masa de agua se pueden encontrar diferentes estadios de larvas de erizo morado, lo que puede ser explicado al menos por dos procesos. El primero comprende un desove propiciado por la advección de poblaciones de adultos; mientras que el segundo refleja una mezcla en la escala horizontal de las masas de agua que contienen larvas de diferentes edades (Miller y

Emlet, 1997) y posiblemente provenientes de diferentes localidades, lo que indica cierto grado de flujo genético. Lo anterior, explicaría la presencia de haplotipos comunes y privados entre las localidades analizadas.

En cuanto a los haplotipos privados reportados en la zona de estudio analizada, podemos argumentar que se favorecen por la baja dispersión de las larvas producidas a finales del invierno y principios de primavera (Miller y Emlet, 1997). Ya que durante los meses de abril y mayo se han reportado velocidades bajas en las corrientes cercanas a la costa, así como una frecuente decadencia o fuerza reversible de los vientos (Huyer *et al.*, 1979, Strub *et al.*, 1987). Durazo y Baumgartner (2002) y Venrick *et al.* (2003) observan la presencia de varios giros en las corrientes. Uno de estos giros se localiza al sur de California, E.U.A y norte de Baja California, México. Este giro impacta a las localidades de San Miguel e Isla Todos Santos y Campo Kennedy y podría explicar uno de los haplotipos comunes del fragmento de CO I de baja frecuencia. Otro de los giros se localiza entre La Chorera y Punta Baja y es particularmente específico y de corta cobertura. Lo anterior puede explicar la gran diversidad haplotídica que se encuentra en estas dos zonas y la presencia de haplotipos privados de bajas frecuencias del fragmento de CO I. Y por último, un tercer giro se ubica en Punta Eugenia, zona cercana a Isla Natividad-Punta Rompiente-Bahía Tortugas. En esta última zona también se presentó una diversidad haplotídica considerable así como haplotipos privados con altas frecuencias del fragmento de CO I. Por otro lado, Durazo y Baumgartner (2002) mencionan la presencia de flujos de las masas de agua de la Corriente de California que van entre La Chorera y Punta San Carlos y entre Punta San Carlos y Punta Eugenia. Esto explicaría la presencia de ciertos haplotipos privados del

fragmento de CO I compartidos por separado entre Punta San Carlos y La Chorera y por otro lado entre Punta San Carlos, Campo Kennedy e Isla Natividad- Punta Rompiente- Bahía Tortugas.

Las localidades del sur (Isla Natividad- Punta Rompiente- Bahía Tortugas) también tienen haplotipos privados, pero con frecuencias mayores. Como se ha mencionado, esta zona también comparte características oceanográficas particulares, como el caso de Punta Baja. Lo anterior, hablaría de la sobrevivencia y de una adaptación individual ante en el ambiente (Ebert, 1968; Piersma y Drent, 2003) que favorezca la permanencia de ciertos haplotipos. Es importante mencionar que esta zona ha tenido cambios continuos en las condiciones ambientales a lo largo de los años, tales como un mayor efecto del fenómeno de El Niño, mayor competencia de sitios de asentamiento disponibles y al mismo tiempo un menor número de costas rocosas. Probablemente estos factores propicien un cambio en la población (Ebert, 1967, Levitan, 1988, 1989, Piersma y Drent, 2003).

Ya que no se realizó un estudio de asentamiento larval y reclutamiento y debido a que el muestreo fue puntual, no se conocen las edades de los reclutas y por lo tanto no se puede tener una conexión precisa entre los eventos de asentamiento y los eventos hidrográficos (Miller y Emler, 1997). Sin embargo, a través del análisis de Red de Expansión Míxima y el cladograma de Neighbour Joining pudimos visualizar a groso modo las relaciones entre los haplotipos y así poder visualizar el efecto de cada uno de los haplotipos respecto a los demás a través de un valor porcentual. Aún cuando la mayoría de los valores de bootstrap no son tan altos para CO I, se observa que probablemente, los haplotipos más frecuentes

son los más ancestrales y los de menor frecuencia los más recientes. Ambos análisis en CO I indicaron que todas las localidades tienen altas frecuencias de los haplotipos más ancestrales y sólo en Punta Baja, La Chorera e Isla Natividad- Punta Rompiente- Bahía Tortugas se encuentran los haplotipos más recientes. Punta Baja es la localidad que concentra a los haplotipos más recientes y aunado a todas las características mencionadas anteriormente, posiblemente se trata de una zona de importancia para la dispersión de los haplotipos recientes. Si comparamos a las localidades de San Miguel e Isla Todos Santos, Campo Kennedy y Punta San Carlos, observamos que están conformados por los haplotipos más ancestrales y más frecuentes. Mientras que la zona de Isla Natividad- Punta Rompiente- Bahía Tortugas se considera como una zona conservada intermedia, ya que se encuentran altas frecuencias de haplotipos recientes específicos y los ancestrales.

Punta Baja esta integrada genéticamente por haplotipos de origen reciente de acuerdo a los análisis de Minimum Spanning Network y de Bootstrap; de acuerdo al AMOVA de CO I presenta diferencias con respecto a San Miguel e Isla Todos Santos. Al mismo tiempo, Punta Baja se caracteriza como una zona de frecuentes afluencias de surgencias y alta productividad primaria. Dicho lo anterior podemos decir que existen fundamentos que indican que Punta Baja es una localidad que funciona como una fuente de variación genética y con la cual se deben tener las precauciones necesarias para su manejo. Por otro lado, Isla Natividad- Punta Rompiente- Bahía Tortugas fue la localidad que presentó haplotipos específicos de origen reciente. Esta localidad se encuentra en el límite sur de distribución y por lo tanto sus condiciones oceanográficas difieren de las demás localidades

(Ladah *et al.*, 1999), sin embargo la población de erizo morado que ahí se distribuye se estructura como el resto de la población.

Finalmente, en un esquema general, el presente trabajo coincide con lo propuesto por Edmands *et al.* (1996). Sin embargo, en este caso, las localidades analizadas se encuentran cercanas al límite sur de distribución y en el límite sur de distribución. Aquí también, se observó una mayor diversidad genética conforme se acercaba al límite sur de distribución de la especie, y muy probablemente dicha diversidad es favorecida por el flujo de la Corriente de Baja California, el cual va de norte a sur. Esto es porque aquellas mutaciones o cambios que se vayan suscitando más al sur de la distribución de esta población, serán menos probables de distribuirse hacia el norte que hacia el sur. Lo anterior resulta claro al observar que las localidades que fueron diferentes corresponden a la localidad más norteña (San Miguel) con una localidad de la parte central (Punta Baja). No obstante, la presencia de haplotipos privados con altas frecuencias en las localidades del sur, indican que existe un flujo que probablemente ocurra de localidad en localidad hacia las localidades del centro que no son diferentes con las localidades del norte.

## **VII. CONCLUSIONES.**

Existe una sutil estructura genética en las poblaciones del erizo morado *S. purpuratus* que se distribuye a lo largo de la costa de Baja California, con base en el análisis del polimorfismo de un fragmento del gen de CO I. Dicha estructura puede estar influenciada por la presencia de procesos físicos particulares, tales como: giros, eventos de surgencia y alta productividad primaria, los cuales favorecen la ocurrencia de eventos locales de reclutamiento. Al mismo tiempo, estos factores pueden influir en la dispersión de gametos y larvas del erizo morado y así generar una población discreta bien diferenciada. En este caso, Punta Baja es la localidad en donde posiblemente se estén favoreciendo reclutamientos locales. Punta Baja es la localidad con mayor número de haplotipos privados, los cuales en su gran mayoría indican ser de un origen reciente, por lo que también se considera a esta localidad como una fuente de variación haplotídica, ya que comparte un mayor número de haplotipos con otras localidades.

Por otro lado, La Chorera y las localidades del sur también tienen haplotipos privados con altas frecuencias. Ambas localidades tienen bajas densidades de erizo por metro cuadrado, pero altos valores de diversidad haplotídica. Además de presentar haplotipos más relacionados con el erizo rojo y los cuales se llegan a presentar como grupos específicos en los cladogramas.

## **VIII. RECOMENDACIONES**

Se debe considerar con particular cuidado para el manejo pesquero de la población a las localidades de Punta Baja, La Chorera y las localidades del sur (Isla Natividad, Punta Rompiente y Bahía Tortugas), ya que probablemente dichas localidades sean favorecidas por la alta ocurrencia de eventos locales de reclutamiento.

Así también, se recomienda realizar un análisis posterior que comprenda la presencia de diferentes cohortes en cada localidad, para ver observar la presencia de eventos locales de reclutamiento. Y al mismo tiempo, incrementar el número de enzimas de restricción polimórficas para dar un mayor sustento en el análisis.

Finalmente, es importante considerar estudios de dispersión y asentamiento larval para conocer más sobre los eventos de reclutamiento de erizo morado que ocurren en las costas de la península de Baja California, México.

## IX. LITERATURA CITADA

- Ambrose, R.F. 2002. Transects, quadrats, and other sampling units. 91-115 pp. En: Methods for performing monitoring, impact, and ecological studies on rocky shores (Murray, S.N., R.F. Ambrose, y M. N. Dethier, eds.). OCS Study MMS 01-070, E.U.A. Minerals Management Service, Pacific OCS Region. 400 pp.
- Avisé, J. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman y Hallan, New York.
- Barnes, R.L. 1965. Invertebrate Biology. W.B. Saunders Company. E.U.A. 632 pp.
- Burton, R. S. 1983. Protein polymorphisms and genetic differentiation of marine invertebrate populations. Marine Biology letters. 4: 193-206.
- Burton, R. S. 1986. Evolutionary consequences of restricted gene flow among natural populations of the copepod *Tigriopus californicus*. Bull. Mar. Sci. 39: 526-535.
- Buchanan, J. M. 1967. Dispersion and demography of some in faunal echinoderm population. Symposium of Zoological Society London. 20: 1-11. En: Inter-annual variability in larval supply to populations of three invertebrate taxa in the northern California Current. (Wing, S.R., L. W. Bostford, L. E. Morgan, J. M. Diehl y C. J. Lundquist eds.). 2003. Estuarine coastal and shelf science. 57: 859-872.
- Cameron, R. A. y S.C. Schroeter. 1980. Sea urchin recruitment: effect of substrate selection on juvenile distribution. Mar Ecol. Prog. Ser. 2: 243-247.
- Canedo-López, y M.J. Dreyfus-León. 1999. Aplicación de un modelo bioeconómico a la pesquería del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* de la costa noroccidental de Baja California, México. Ciencias Marinas. 25 (3): 325-344.

- Chatlynne, L.G. 1969. A histochemical study of oogenesis in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Biol.Bull. 136: 167-184.
- Cowen, R.K. 1983. The effect sheephead (*Semicossyphus pulcher*) predation on the red sea urchin (*Strongylocentrotus franciscanus*) populations: an experimental analysis. Oecologia 58: 249-255.
- Cowen, R.K. 1985. Large scale pattern on recruitment by the labrid *Semicossyphus pulcheri*: causes and implications. J. Mar. Res. 43: 719-742.
- Dawson, M.N., K.A. Rascoff y D.K. Jacobs. 1998. Field preservation of marine invertebrate tissue for DNA analyses. Molecular Marine Biology and Biotechnology. 7(2): 145-152.
- Dayton, P.K. 1975. Experimental studies of algal canopy interactions in a sea otter dominated kelp community at Amchitka, Alaska. US Natl Mar. Ser. Fish. Bull. 73(2): 230-237.
- Durazo, R. y T.R. Baumgartner. 2002. Evolution of oceanographic conditions off Baja California. Progress in Oceanography. 54: 7-31.
- Ebert, T.A. 1967. Negative growth and longevity in the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson). Science 157: 557-558.
- Ebert, T.A. 1968. Growth rates of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* related to food availability and spine abrasion. Ecology. 49: 1075-1091.
- Ebert, T.A. 1977. An experimental analysis of sea urchin dynamics and community interactions on a rock jetty. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 27: 1-22.
- Ebert, T.A. 1996. Adaptive aspects of phenotypic plasticity in echinoderms. Oceanologica Acta. 19(3-4): 347-355.

- Ebert, T.A. y M.P. Russell. 1988. Latitudinal variation in size structure of the west coast purple urchin: a correlation with headlands. *Limnol. Oceanogr.* 33: 286-294.
- Ebert, T.A., S.C. Schroeter, J.D. Dixon y P. Kalvas. 1994. Settlement patterns of red and purple sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus* and *S. purpuratus*) in California, USA. *Marine Ecology progress Series.* 111: 41-52.
- Edmands, S., P.E. Moberg y R.S. Burton. 1996. Allozyme and mitochondrial DNA evidence of population subdivision in the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Marine Biology.* 126: 443-450.
- Excoffier L, P.E. Smouse y J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- FAO. 1981. Conservation of genetic resources of fish: problems and recommendations. *FAO Fisch. Tech. Pap.* FAO Rome. 217. 43 pp.
- Felsenstein, J. 1988. PHYLIP: Phylogeny inference package. Version, 3.1. University of Washington Seattle.
- Flowers, J., M., S. C. Schroeter y R.S. Burton. 2002. The recruitment sweepstakes has many winners: genetic evidence from the sea urchin *Stongylocentrotus purpuratus*. *Evolution.* 56 (7): 1445-1453 p.
- Gallo, R. J.P. y J. Flores. 1982. Modelo de relación trófica entre moluscos, equinodermos y crustáceos de la comunidad bentónica de la costa noroccidental de Baja California, México. *Ann. Ins. Cien. Del Mar y Limnol. UNAM.* 9(1): 55-66

- Gonor, J.J. 1972. Gonad growth in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson) (Echinodermata: Echinoide) and the assumptions of the gonad index methods. J. Exp. Biol. Ecol. 10: 89-103.
- Harrold, C., S. Lisin, K. H. Light y S. Tudor. 1991. Isolating settlement from recruitment of sea urchins. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 147: 81-94.
- Hedgecock, D. 1986. Pelagic larval dispersal and gene flow. Bull. Mar. Sci. 39 (2): 550-554.
- Hickey, B.M. 1979. The California Current System: hypotheses and facts. Prog. Oceanogr. 8: 191-279.
- Hinegarner, R.T. 1969. Growth and development of the laboratory cultured sea urchin. Biol. Bull. 137: 465-475.
- Hines, A.H. 1986. Larval problems and perspectives in life histories of marine invertebrates. Bull. Mar.Sci. 39 (2): 506-525.
- Huyer, A., R.L. Smith y J.C. Sober. 1979. The spring transition in currents over the Oregon continental shelf. J. Geophys. Res. 84: 6995-7011.
- Jacobs HT, D. J. Elliott, V. B. Math y A. Farquharson. 1988. Nucleotide sequence and gene organization of sea urchin mitochondrial DNA. Journal of Molecular Biology. 202: 185-217.
- Kalvass, P. E. y J. M. Hendrix. 1997. The California red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*, fishery: catch, effort and management trends. Mar.Fisch Rev. 59 (2): 1-17.
- Kruskal, J.B. 1956. On the shortest spanning subtree of a graph and the traveling salesman problem. Proc. Amer. Math. Soc. 7: 48-50. En: Excoffier L, P.E. Smouse y J.M.

- Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Kyle, C.J. y E. G. Boulding. 2000. Comparative population genetic structure of marine gastropods (*Littorina* spp.) with and without pelagic larval dispersal. *Marine Biology*. 137: 835-845.
- Ladah, L.B., J.A. Zertuche-González y G. Hernández-Carmona. 1999. Giant kelp (*Macrocystis pyrifera*, Phaeophyceae) recruitment near its southern limit in Baja California after mass disappearance during ENSO 1997-1998. *J. Phycol* 35: 1106-1112.
- Lavaniegos, B. E., L.C. Jiménez- Pérez y G. Gaxiola-Castro. 2002. Plankton response to El Niño 1997- 1998 and La Niña 1999 in the Southern region of the California Current. *Progress in Oceanography*. 54: 33-58.
- Levitan, D.R. 1988. Density-dependent size regulation and negative growth in the sea urchin *Diadema antillarum* Philippi. *Oecologia* 76: 627-629.
- Levitan, D.R. 1989. Density-dependent size regulation in *Diadema antillarum*: effects on fecundity and survivorship. *Ecology*. 70: 1412-1424.
- Marcus, N.H. 1977. Genetic variation within and between geographically separated populations of the sea urchin, *Arbacia punctulata*. *Biol. Bull.* 153: 560-576.
- Miller, B.A. y R.B. Emlet. 1997. Influence of nearshore hydrodynamics on larval abundant and settlement of sea urchins *Strongylocentrotus franciscanus* y *S. purpuratus* in the Oregon upwelling zone. *Marine Ecology Progress Series*. 148: 83-84.

- Miller S.A., D.D. Dykes y H.F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nuc Acids Res* 16: 1215.
- Milligan B.G. 1998. Total DNA Isolation Cap. 2. *En*: A.R. Hoelzel (ed.). *Molecular Genetic Analysis of Populations*. Oxford University Press. 468 pp.
- Morgan, L.E., S.R. Wing, L.W. Bostford, C.J. Lundquist y J.M. Diehl. 2000. Spatial variability in red sea urchin (*Strongylocentrotus franciscanus*) cohort strength relative to alongshore upwelling variability in northern California. *Fisheries oceanography*. 9: 83-98.
- Morriss, R.H., D. P. Abboott y E.C. Haderlie. 1980. *Intertidal invertebrates of California*. Stanford University Press.
- Munro, P. 1993. Genetic aspects of conservation and cultivation of giant clams. *ICLARM. Conf.Proc.* 39, 47 p.
- Nei M. y F. Tajima. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97: 145-163.
- Paine, R.T. 1986. Benthic community-water column coupling during the 1982-1983 El Niño; are community changes at high latitudes attributed to cause or coincidence?. *Limnology and Oceanography*. 31: 351-360.
- Palleiro-Nayar, J.S., D. Aguilar-Moreno y J.J. Romero-Martínez. 1993. Informe de la temporada de pesca 1992-1993 de erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*) en B.C. Proyecto equinodermos. CRIP. Ensenada. INP. 53-54.

- Palleiro-Nayar, J.S., D. Aguilar-Moreno y J.J. Romero-Martínez. 1995. Evaluación de erizo rojo y morado en la Bahía del Rosario. Informe Interno CRIP Ensenada.
- Palleiro-Nayar, J.S., D. Aguilar-Moreno y J.J. Romero-Martínez. 2003. La pesca del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* en Baja California. CRIP Ensenada. INP.
- Palmer, A.R. y R.R. Strathmann. 1981. Scale of dispersal in varying environments and its implications for life histories of marine invertebrates. *Oecologia*. 48:308-318. En: Hines, A.H. 1986. Larval problems and perspectives in life histories of marine invertebrates. *Bull. Mar.Sci.* 39 (2): 506-525.
- Palumbi, S.R. y A.C. Wilson. 1990. Mitochondrial DNA diversity in the sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus* and *S. droebachiensis*. *Evol.* 44: 403-415.
- Parrish, R., C. Nelson y A. Bakun. 1981. Transport mechanisms and reproductive success of fishes in the California Current. *Biol. Oceanogr.* 1: 175-203.
- Parker, P.G., A.A. Snow, M.D.Schug, G.C. Booton y P.A. Fuerst. 1998. What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Ecology*. 79(2): 361-382.
- Pearse, J. S. 1980. Synchronization of gametogenesis en the sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus* and *S. franciscanus*. En: *Advances in invertebrate reproduction*. Clark, W.H. y T.S. Adams (eds.). Elsevier North Holland, N.Y. 53-68.
- Pearse, J. S. y A.H. Hines. 1987. Long-term population dynamics of sea urchins in a Central California kelp forest: rare recruitment and rapid decline. *Mar.Ecol.Progr.Ser.* 39: 275-283.

- Pearse, J.S., M.E. Clarck, D. L Leighton, C. T. Mitchell y W.J. North. 1970. Marine waiste disposal and sea urchin ecology. En: Kelp Habitat Improvement Project, Annual Report, 1 July 1969-30 June 1970, Appendix. Bulletin U.S. 72: 670-684.
- Pérez. S. M. y L.E. Calderón-Aguilera. 1996. Desarrollo de una nueva pesquería en Baja California: Erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*). Oceanología. Vol. 2(10): 7-16.
- Piersma, T. y J. Drent. 2003. Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. TRENDS in Ecology and Evolution. 18 (5): 228-233.
- Pineda, B.J. 1976. Surge una nueva pesquería. Inst. Nal. Pesc. Centro de promoción pesquera de El Sauzal, B.C. Bol. Informativo. 8: 10-11.
- Pleschner, D.B. 1992. Purple rage. Pacific Fishing.
- Prim, R.C. 1957. Shortest connection networks and some generalizations. Bell. Syst. Tech. J. 36: 1389-1401. En: Excoffier L, P.E. Smouse y J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131: 479-491.
- Ricketts, E. F. y J. Calvin. 1939. Between Pacific tides (3<sup>rd</sup> Rev. ed. 1962 by J.W. Hedgpeth. Stanford University Press. XII 516).
- Sagarin, R.D. y S.D. Gaines. 2002. Geographical abundance distributions of coastal invertebrates: using one-dimensional ranges to test biogeographic hypotheses. Journal of Biogeography. 29: 985-998.
- Sambrook J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning a Laboratory Manual. 2nd. edition. Cold Spring Harbor New York.

- Scheltema, R.S. 1971. Larval dispersal as a means of genetic exchange between geographically separated populations of shallow water benthic marine gastropods. *Biol.Bull.* 140: 284-322. En: Hines, A.H. 1986. Larval problems and perspectives in life histories of marine invertebrates. *Bull. Mar.Sci.* 39 (2): 506-525.
- Schneider, S., J. M. Keuffer, D. Roessly y L. Excoffier. 1997. Arlequin version 1.1. A software package for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva Switerland.
- Smith, P.J. 1999. Genetic resources and fisheries: policy aspects. En: R.S.V. Pullin, D.M. Bartley and J. Kooimain (eds.) *Towards policies for conservation and sustainable use of aquatic genetic resources. ICLARM. Conf. Proc.* 59, 277p.
- Strathmann, R. R. 1978. Length of pelagic period in echinoderms with feeding larvae from the Northeast Pacific. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 34: 23-27.
- Strub, P.T., J.S. Allen, A. Huyer y R.L. Smith. 1987. Seasonal cycles of currents, temperature, winds and sea level over the northeast Pacific continental shelf: 35°N to 48°N. *J. Geophys Res.* 92: 1507-15266.
- Tegner, M.G. 2001. The ecology of *Strongylocentrotus franciscanus* y *S. purpuratus*. 307-331 pp. *En: Edible sea urchins: Biology and Ecology.* J.M. Lawrence (ed). Elsevier. E.U.A. 419 pp.
- Tegner, M. J. y P. K. Dayton. 1977. Sea urchin recruitment patterns and implications of commercial fishing. *Science* 196: 324-326.
- Tegner, M. J. y P.K. Dayton. 1981. Population structure, recruitment and mortality of two sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus* y *S. purpuratus*) in a kelp forest. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 5: 255-268.

- Tegner, M. J. y P. K. Dayton. 2001. Ecosystems effects of fishing in kelp forest communities. *ICES. J. Mar Sci.* 57: 579-589.
- Tegner, M.J. y L.A. Levin. 1983. Spiny lobsters and sea urchins: analysis of a predator-prey interaction. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 73: 125-150.
- Thorrold, S. R., G.F. Jones, M. E. Hellberg, R. S. Burton, S. E. Swearer, J. E. Niegel, S. G. Morgan y R.R., Warner. 2002. Quantifying larval retention and connectivity in marine populations with artificial and natural markers. *Bull. Mar. Sci.* 70(1): 291-308.
- Venrick, E., S. J. Brograd, D. Checkley, R. Durazo, G. Gaxiola-Castro, J. Hunter, A. Huyer, K.D. Hyrenbach, B. E. Lavaniegos, A. Mantyla, F. B. Shwing, R. L. Smith, W. J. Sydeman y P.A. Wheeler. 2003. The state of the California Current 2002-2003: tropical and subarctic influences vie for dominance. *Cal COFI Report*. Vol 44. 60 pp.
- Wing, S.R., L. W. Bostford, J.L. Largier y L.E. Morgan. 1995. The spatial structure of relaxation events and crab settlement in the northern California upwelling system. *Marine Ecology Progress Series*. 128: 199-211.
- Wing, S.R., L. W. Bostford, L.E. Morgan, J. M. Diehl y C. J. Lundquist. 2003. Inter-annual variability in larval supply to populations of three invertebrate taxa in the northern California Current. *Estuarine Coastal and Shelf Science*. 57: 859-872.
- Workman G. 1999. A review of the biology and fisheries for purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*, Stimpson, 1957) and discussion of the assessment needs of a proposed fishery. Canadian stock assessment Secretariat research document. Fisheries and Oceans Canada. 58/163. 58 p.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* 15: 323-354.

Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by  $F$  statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*. 19: 395-420.

Wright, S. 1969. *Evolution and the genetics of populations, the theory of gene frequencies*. The University of Chicago Press, Chicago IL. Vol. 2.

Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*, 4<sup>a</sup> Ed.. Upper Saddle River, N.J. Prentice-Hall.

## **APENDICE I.**

### **Protocolos de Extracción de ADN.**

La rehidratación de las gónadas y las membranas peristomeales en alcohol concentrado al 70% se rehidrataron mediante lavados sucesivos en etanol al 50%, etanol 25%, agua destilada y amortiguador TE pH 8.0 (0.1 M Tris, 0.001 M EDTA) y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Los dos protocolos de extracción de ADN que se emplearon para todas las muestras tuvieron resultados similares.

#### **1. Protocolo de extracción de fenol-cloroformo.**

En un tubo eppendorf de 1.5 ml se colocaron entre 100-120 mg de tejido de gónada o membrana peristomeal de erizo. Posteriormente, se añadió amortiguador de extracción (0.01 M Tris, 0.001 M EDTA pH 8.0, 0.1 M NaCl), SDS 0.1% y 0.25 mg Proteínasa K y se dejó reposar durante 12 horas a temperatura ambiente ( $T^{\circ}\text{C}$ ) en un rotor. La purificación del DNA se efectuó aislando la parte orgánica con extracciones sucesivas con fenol-cloroformo. Finalmente el DNA se precipitó de la fase acuosa con isopropanol al 99% y el exceso de sales removido con isopropanol al 30%. El ADN obtenido se resuspendió en TE pH 8.0 y su concentración fue determinada por medio de corrimiento electroforético (geles de agarosa al 0.7%. 100 volts por 30 min) contra concentraciones estándar de DNA. Finalmente las muestras de ADN fueron diluidas para homogenizar la concentración (15-30 ng por microlitro).

## **2. Protocolo de extracción de sales**

Para el caso del protocolo de extracción de sales también se colocaron entre 100-120 mg de tejido de gónada o membrana peristomeal de erizo en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Así también se agregó amortiguador de extracción (0.2 M Tris, 0.025 M EDTA, 0.25 M NaCl, 0.5% SDS, 2% CTAB, 0.1% PVPP, 0.2% B-mercaptoetanol) durante 20 minutos a 65°C. Transcurrido el tiempo, se agregó 0.5 mM de LiCl y se dejó reposar durante 2 min a T°C ambiente. De la mezcla obtenida se tomó 1 ml del sobrenadante y se realizó una purificación 1:1 de cloroformo isoamil alcohol 1:24. Finalmente el ADN se precipitó de la fase acuosa con isopropanol al 99% y el exceso de sales removido con isopropanol al 30%. También en este protocolo el ADN se resuspendió en TE ph 8.0 y su concentración fue determinada por medio de corrimiento electroforético (geles de agarosa 0.7%, 100 volts, 30 min) contra concentraciones estándar de ADN. Finalmente las muestras de DNA fueron diluidas para homogenizar la concentración (15-30 ng por microlitro).