



**Pontificia Universidad
Católica del Ecuador**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
SEDE MANABÍ**

CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA

TRABAJO DE TITULACIÓN

**IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE PEPINOS DE MAR DE INTERÉS
ECOLÓGICO DE EL REAL (SANTA ELENA)**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
MANEJO SOSTENIBLE DE RECURSOS NATURALES**

**PREVIO AL TÍTULO DE:
BIÓLOGO MARINO**

**AUTOR:
MIGUEL ANGEL BARRERA VERA**

**TUTOR:
FRANCISCO HERNÁN POZO MIRANDA, *M. Sc.***

BAHÍA DE CARÁQUEZ, MARZO 2023

Certificación

En mi calidad de tutor del trabajo de integración curricular, certifico haber revisado el presente manuscrito de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Manabí, cumpliendo la Normativa del Trabajo de Integración Curricular; en consecuencia, es apto para su presentación y sustentación.

Francisco Pozo Miranda. M.Sc.

Tutor del trabajo de integración curricular

C.I.: 0918330952

Aprobación del tribunal

El jurado examinador aprueba el presente trabajo de integración curricular en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Sede Manabí.

Evelyn Arias Cedeño M.Sc.

Primer lector

Gabriel Durán Cobo M.Sc.

Segundo lector

Francisco Pozo Miranda Mg.

Tercer lector

Bahía de Caráquez, marzo de 2023

Declaración de originalidad

Éste manuscrito no contiene ningún tipo de material que ha sido aceptado para la obtención de un título universitario en otra institución, excepto en forma de información de sustento que ha sido debidamente citada en mi trabajo. Este trabajo es de total responsabilidad del autor, quien declara bajo juramento que ninguna sección de esta tesis infringe los derechos de autor de nadie.

CI: 1311654691

Teléfono: 096 128 1841

Email: miguel-bv98@outlook.es

Bahía de Caráquez, marzo de 2023

Declaración de derechos de autor

Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a distribuir este manuscrito de investigación en medios físicos y electrónicos con el fin de promover la divulgación de mis resultados a la comunidad científica y a la sociedad en general. Adicionalmente autorizo el uso de los contenidos de esta investigación como bibliografía para fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, citando como fuente de información al autor de este trabajo.

CI: 1311654691

Teléfono: 096 128 1841

Email: miguel-bv98@outlook.es

Bahía de Caráquez, marzo de 2023

Dedicatoria

Queridos familiares y amigos, quiero dedicar esta tesis de grado a todos aquellos que han estado a mi lado durante este arduo proceso. Su apoyo incondicional, palabras de aliento y motivación han sido fundamentales para alcanzar esta meta.

En especial, agradezco a mis padres por su amor y dedicación, a mis hermanos por su compañía y comprensión en momentos de estrés.

También quiero dedicar este logro a mis profesores y mentores, quienes me han brindado su sabiduría y experiencia, y me han guiado a lo largo de mi formación académica.

Finalmente, esta tesis es también para todas las personas que, como yo, buscan contribuir al conocimiento y aportar al desarrollo de nuestra sociedad.

¡Gracias por ser parte de mi camino y compartir conmigo este logro!

Agradecimiento

Agradezco a la Universidad que me acogió y permitió formarme como profesional dentro de sus instalaciones, gracias a todos los docente y personal que fueron partícipes de este proceso, ya sea de forma directa o indirecta han logrado que mis metas académicas se estén cumpliendo. Agradezco a mi tutor de tesis el Mg. Francisco Pozo, por su guía y orientación en la ejecución de mi proyecto de tesis; de la misma forma con los profesores Gabriel Durán, Eduardo Barahona, Juan Carlos Murillo, Iván Looor y Evelyn Arias que me han instruido e impartido sus conocimientos a lo largo de este recorrido educativo.

Gracias a mis padres Gladys Vera y Miguel Barrera, quienes fueron los promotores en mi proceso educativo, y que sin su ayuda no pudiera estar cumpliendo mis metas de convertirme en un profesional. A mis hermanos Pierina Barrera y Estefano Barrera quienes han estado siempre conmigo como ejemplos de profesionalismo y ética. Y al resto de mi gran familia que de alguna manera me han ayudado e inspirado para seguir mi camino y no perder de vista mis objetivos.

Gracias a mis amigos de carrera Rupert Rivera, Emilio Ayala, Andrés Martínez, Israel Vera, Walter Buenaventura, Pamela Jaramillo, y Tania Toscano con quienes he recorrido el arduo camino del conocimiento para convertirnos en Biólogos marinos.

Agradezco a mis amigos de toda una vida Katherine Milena, Genesis Mera, Issis Mera, Rita Cedeño y Jesús Quintero, quienes me han brindado su más sincera amistad, en donde pasamos por momentos y aventuras inolvidables.

Por último, y más importante gracias a mí por nunca rendirme para cumplir mis metas, siguiendo adelante a pesar de las adversidades, sin dejar que mis objetivos se escapen, siempre teniendo en mente que este no es el final del camino, solo una etapa más que va a culminar.

Resumen

Esta investigación mixta identificó y estableció la distribución de dos especies de pepinos de mar obtenidos en El Real, cantón Santa Elena, mediante análisis morfométrico, taxonómico y molecular, dada la poca información existente sobre este recurso pesquero en el Ecuador. Debido a ello, este estudio descriptivo-explicativo se desarrolló desde octubre de 2022 a marzo de 2023, para lo cual se recolectaron muestras mediante buceo autónomo para su posterior análisis filogenético, realizado mediante el método de *Maximum Likelihood* y el modelo *Tamura-Nei*. Asimismo, las muestras fueron empleadas para la identificación morfológica siguiendo claves taxonómicas. Se extrajo el ácido desoxirribonucleico (ADN) para la identificación molecular, así como para la evaluación filogenética en la plataforma *Barcode of Life Data System (BOLDSystems)* y el software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA5)*. Los resultados del análisis morfológico confirman la identidad de las especies *Holothuria inornata*, cuyas características principales son sus papilas ventrolaterales en poca cantidad con pequeñas papilas dorsales, e *Isostichopus fuscus*, de forma robusta, con superficie ventral clara y notorias papilas dorsales. La evaluación del ADN genómico de las muestras presenta baja calidad, dificultando la visualización del ADN. Los resultados de *BOLDSystems* obtienen la distribución de *Holothuria inornata* reportada en Costa Rica y México. En cambio, *Isostichopus fuscus* muestra mayor distribución en Perú, Ecuador, Costa Rica, Colombia y México. Se concluye que estas dos especies poseen amplia distribución a nivel de América considerando la identificación morfológica, mientras que a nivel molecular poseen pocos reportes de distribución.

Palabras clave: identificación, ecológico, *Holothuroidea*, evaluación filogenética, El Real

Abstract

This mixed research study identified and establish the distribution patterns of sea cucumber in *El Real* in *Santa Elena* Canton, through morphometric, taxonomic and molecular analyses, since there is little information available on this fishery resource in Ecuador. Accordingly, this descriptive explanatory research study was carried out from October 2022 through March 2023, so that some samples were collected through autonomous diving for subsequent phylogenetic analysis, which was done using the Method of Maximum Likelihood Estimate and the Tamura-Nei model. Also, these samples were used for morphological identification following taxonomic keys. Deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted for molecular identification, as well as for phylogenetic evaluation on the platform Barcode of Life Data System (BOLDSystems) and *Molecular Evolutionary Genetics Analysis software (MEGA5)*. The morphological analysis findings confirm the identity of *Holothuria inornata* species, whose major attributes are its ventrolateral papillae reduced in numbers, with small dorsal papillae; and *Isostichopus fuscus*, which is robust with pale ventral surface and prominent dorsal papillae. The genomic DNA analysis of the samples reveals low quality, which makes it difficult to visualize the DNA. The BOLDSystems database findings obtain the distribution of *Holothuria inornata* reported in Costa Rica and Mexico. Conversely, *Isostichopus fuscus* shows a wider distribution in Peru, Ecuador, Costa Rica, Colombia and Mexico. It is concluded that these two species have a wide distribution in America as per the morphological identification, while they have few distribution reports as per the molecular level.

Keywords: identification, ecological, *Holothuroidea*, phylogenetic evaluation, *El Real*

Tabla de contenido

Introducción	13
Metodología	19
Área de Estudio	19
Recolección de Especies	19
Taxonomía.....	20
<i>Extracción de Espículas</i>	20
Morfometría	21
Análisis Metagenómico.....	21
Análisis de Datos.....	22
<i>Alineación de Secuencias:</i>	22
Distribución Espacial	22
Resultados	23
Descripción Taxonómica.....	23
<i>Holothuria inornata:</i>	23
<i>Isostichopus fuscus:</i>	24
<i>Análisis Espículas</i>	26
Análisis Morfométrico	29
Análisis Molecular	30
<i>Holothuria inornata:</i>	31
<i>Isostichopus fuscus:</i>	33
Distribución Espacial	34

<i>Holothuria inornata:</i>	34
<i>Isostichopus fuscus:</i>	35
Discusión	36
Conclusión	39
Literatura Citada	40

Índice de tablas

Tabla 1. Datos morfométricos de las especies de pepinos de mar del estudio.....	29
Tabla 2. Medidas de talla y desviación estándar de la espícula identificada de <i>Holothuria inornata</i> e <i>Isostichopus fuscus</i>	30

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de la zona de muestreo de El Real (Provincia de Santa Elena)	19
Figura 2. Gráfico descriptivo indicando las medidas que se tomaron de las especies de pepinos de mar.....	21
Figura 3. Características de identificación de <i>Holothuria inornata</i> . A: Espécimen recolectado de <i>H. inornata</i> ; B: Papilas ventrolaterales, de tamaño medio, en poca cantidad y terminadas en punta; C: Pequeñas papilas dorsales de coloración semejante al cuerpo.....	23
Figura 4. Características de identificación de <i>Isostichopus fuscus</i> . A: Espécimen recolectado de <i>I. fuscus</i> presentando una superficie dorsal de color pardo y una superficie ventral clara; B: Boca posicionada en la superficie ventral; C: Pies ambulacrales dispuestos en densas bandas; D: Papilas dorsales de disposición irregular y forma cónica.....	25
Figura 5. Espículas en forma de botones abollonados (A), barrotes (B) y placa perforada (C) encontradas en <i>Holothuria inornata</i>	27
Figura 6. Espículas en forma de tabla (A), botones abollonados (B) y “C” (C) encontradas en <i>Isostichopus fuscus</i>	28
Figura 7. Muestras de ADN de las especies de pepinos de mar observadas en un gel de agarosa al 1%. MM: Marcador de peso molecular ABM 100pb plus opti DNA marker.....	31
Figura 8. Árbol filogenético de las secuencias de la región del gen COI de <i>Holothuria inornata</i> tomadas de BoldSystems.....	32
Figura 9. Árbol filogenético de las secuencias de la región del gen COI de <i>Isostichopus fuscus</i> tomadas de BoldSystems.....	33
Figura 10. Mapa donde se indican las regiones de recolección de especímenes de <i>Holothuria inornata</i>	34

Figura 11. Mapa donde se indican las regiones de recolección de especímenes de *Isostichopus fuscus* identificadas mediante análisis moleculares.....**35**

Introducción

La clase *Holothuroidea* del phylum *Echinodermata* engloba a todos los organismos conocidos como pepinos de mar, estos se encuentran predominantemente en aguas tropicales y poco profundas. Los equinodermos de cuerpo blando constituyen un grupo diverso de organismos parecidos a gusanos con un cuerpo gelatinoso, flexible, alargado y con una piel coriácea, desempeñan un papel ecológico importante a través del reciclaje bentónico y la bioturbación, ya que son generalmente carroñeros y se alimentan de desechos en la zona bentónica del océano (Miller & Nat, 2007).

Estos organismos se nutren por medio del consumo de depósitos del fondo marino, como el detritos, sedimento, lodo y arena. Esto les permite obtener materia orgánica para su sistema y desechar al medio materia enriquecida en aminoácidos y demás compuestos que serán útiles para distintos organismos detritívoros e intersticiales. Al enterrarse o alimentarse remueven el sedimento marino lo que evitando la estratificación del fondo y provee de aire al sustrato (Mercier *et al*, 2013). Estos organismos son fundamentales para el balance del CaCO_3 (carbonato de calcio) presente en el mar, garantizando un ambiente sano para los arrecifes de coral y un desarrollo eficiente del ambiente marino (Solís-Marín, 2011).

Los métodos taxonómicos para identificar especies de pepinos de mar en la actualidad son los siguientes: 1) Por observaciones macroscópicas de la morfología externa e interna, que funciona en muy pocas especies (Kamarudin & Rehan, 2015); y 2) mediante observaciones microscópicas que utilizan osículos o espículas, ya que sus formas únicas son la característica más importante para la identificación morfológica de los pepinos de mar, estas pequeñas piezas de material calcificado forman parte del esqueleto de estos organismos, aunque la identificación de especies mediante este método consume mucho tiempo y requiere expertos altamente calificados (Madduppa *et al*, 2017).

Los pepinos de mar se cosechan y comercializan en más de 70 países en todo el mundo. Se explotan en pesquerías industrializadas, semi-industrializadas y artesanales en regiones polares, zonas templadas y tropicales. En algunas pesquerías se pueden explotar más de 20 especies, que deben ser identificadas por los oficiales de pesca y científicos. Los animales procesados, a menudo llamados trepang, se exportan principalmente a los mercados asiáticos, donde los funcionarios de aduanas y comercio deben distinguirlos a nivel de especie (Purcell *et al*, 2012).

En Ecuador la especie de pepino de mar de mayor interés comercial es *Isostichopus fuscus*, debido a la alta demanda de este producto en el mercado asiático, su explotación fue tal que para el 2015 se optó implementar una veda quinquenal 2016 – 2021, para lograr recuperar la población de este recurso, aunque en la actualidad presenta una veda permanente (Guerrero, 2021). De el resto de especies de especies casi no se encuentran registros de explotación.

Isostichopus fuscus presenta un cuerpo alargado y voluminoso, similar a un gusano, posee papilas dorsales redondeadas y papilas ventrolaterales alargadas que se presentan numerosos en sus márgenes laterales bajos, posee patrones claro-oscuros, además que adquieren una coloración marrón o café claro. Presentan un tamaño máximo de 30 cm de longitud aproximadamente, habitan en arrecifes rocosos y con parches de arena entre 0 a 40 m de profundidad con rangos de preferencia entre los 3 a 29 m (Toral-Granda & Martínez, 2007). Esta especie se la puede encontrar en las costas del océano Pacífico desde el golfo de California hasta la costa norte del Perú, es común en las islas del Pacífico oriental como lo son las islas Cocos y Galápagos (Mercier *et al*, 2013). Estudios de variabilidad genética en esta especie han determinado que existe poco flujo genético entre las poblaciones de Sudamérica y México, en donde los modelos de dispersión han corroborado que el flujo está dispuesto de forma horizontal con algunas conexiones verticales importantes entre individuos de altas profundidades (Chávez, 2017).

Por su parte, la especie *Holothuria inornata* también conocida como pepino de mar arenoso se caracteriza por presentar pequeñas papilas dorsales de color semejante al cuerpo, además de poseer algunas papilas ventrolaterales largas terminadas en punta (Rivera-Téllez *et al*, 2021). Estos individuos están presentes en hábitats arenosos-rocosos de aguas someras hasta los 18 m de profundidad, los mismos que pueden llegar a alcanzar una talla máxima de 40 cm de longitud (Alvarado & Solís-Marín, 2013). Se encuentra en el Pacífico y se distribuye desde el norte del Perú hasta el Golfo de California, es una especie común en las Islas Socorro y Clarión en México, Islas Coco en Costa Rica e Islas Galápagos en Ecuador (Solís-Marín *et al*, 2009). Aunque no exista información respecto a la explotación de esta especie en Ecuador, existe otros lugares como México en donde se la enlista como parte de las especies de pepino de mar de mayor explotación. Y también se han desarrollado estudios para evaluar su cultivo (Contreras-Sillero, 2020). Estudios filogeográficos en esta especie han determinado que los patrones oceanográficos y eventos históricos como los factores principales que han determinado la estructura poblacional y dispersión de esta especie, aunque se cree que las poblaciones de origen se hallan extendido desde el sur para el norte (Prieto-Ríos *et al*, 2014).

La identificación taxonómica de algunos grupos de pepinos de mar es compleja, incluso para los expertos, pero en los últimos veinte años, el análisis molecular ha arrojado nueva luz en este campo. La investigación molecular de la clase *Holothuroidea* ha ayudado a aclarar su sistemática y taxonomía. Aunque las filogenias moleculares de los Holotúridos entran en conflicto con la taxonomía existente, que se basa en gran medida en la morfología de las partes calcáreas y la inferencia de los caracteres adquiridos y heredados (Atif *et al*, 2008).

En la actualidad es necesario un enfoque sistemático que combine los aspectos morfológicos y moleculares para avanzar en la evaluación de la biodiversidad mundial de pepinos de mar, de esta forma se pueden evitar los errores en la identificación producidos por

la evolución convergente, donde especies distantes pueden desarrollar fenotipos similares (Ahmed *et al*, 2021).

Ante estos antecedentes es necesario realizar estudios taxonómicos a nivel molecular en busca de establecer la distribución de especies de pepino de mar en el Ecuador. Para ello, este trabajo tuvo los siguientes objetivos, describir la taxonomía de las especies, establecer su morfometría, realizar el análisis molecular y determinar la distribución espacial de las especies.

Metodología

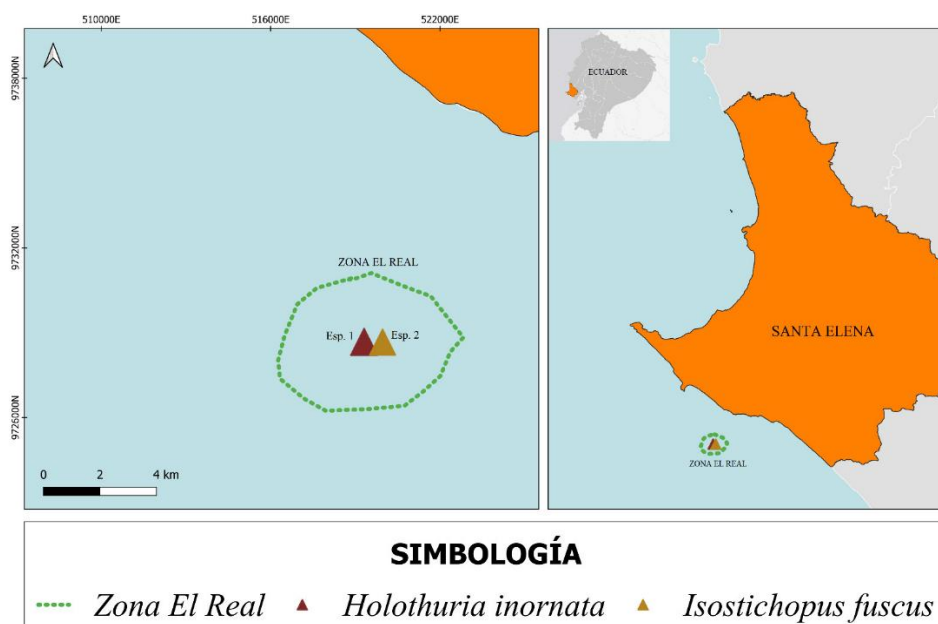
Área de Estudio

Las muestras de estudio se recolectaron en la provincia de Santa Elena, en la zona costera de la comuna El Real, misma que forma parte de la parroquia Chanduy, cantón Santa Elena. La composición de su zona costera se caracteriza por presentar un fondo rocoso-arenoso, comprende una extensión territorial de 76 902 Hectáreas (769,02 km²) (Velasco-Arguello, 2015).

La zona de recolección se individuos se ubica a una latitud y longitud de 2°24'4.47"S y 80°53'37.79"O respectivamente (Figura 1).

Figura 1

Mapa de la zona de muestreo de El Real (Provincia de Santa Elena)



Nota: El mapa fue elaborado mediante el sistema de Información Geográfica QGIS

Recolección de Especies

Debido a la profundidad en la que estos organismos habitaban (superior a los 6 m de profundidad) en la zona de muestreo de El Real, la recolección de individuos de pepino de mar

se realizó mediante inmersiones de buceo. Luego se procedió con la recolección de muestras de individuos que fueron colocados dentro de un frasco de vidrio manteniéndolos con hielo para relajarlos enfriándolos a temperaturas cercanas a la congelación (0°C), para luego ser transportados al laboratorio de análisis.

Las muestras en el laboratorio se limpiaron con agua de mar para eliminar las partículas de arena y residuos, para posteriormente ser usadas para análisis morfométricos. De los especímenes frescos se extrajeron muestras de tejido muscular que fueron fijadas en etanol al 70% para posteriormente ser utilizadas para la identificación molecular de los individuos.

Taxonomía

La identificación taxonómica de los individuos de pepino de mar se realizó utilizando La taxonomía *Holothuroidea (Echinodermata)* del mar del Perú (Prieto-Ríos, 2010), La guía de identificación de los pepinos de mar de interés comercial en México (Rivera-Téllez *et al*, 2021) y La guía de pepinos de mar comercialmente importantes del mundo (Purcell *et al*, 2012).

Extracción de Espículas

La extracción de espículas en los especímenes de pepino de mar se realizó siguiendo la metodología según Hickman (1998).

- Para la extracción de espículas de las muestras se extrajo tejido epitelial del dorso, ano y zona ventral de los organismos.
- Se realizaron los cortes en el tejido epitelial de 1 mm de grosor, 1 cm de largo y ancho.
- Se colocó cada corte en un tubo de ensayo y se lo sumergió con 1 ml de cloro diluido durante 30 minutos.
- Con una pipeta se extrajo una gota de cada tubo de ensayo y se la colocó en un porta y cubre objetos para que las muestras sean observadas al microscopio.
- Las espículas fueron observadas de forma notoria en el enfoque de 10X del microscopio.

- Finalmente, se determinó el tipo de espícula por cada especie y el tamaño de las mismas.

Morfometría

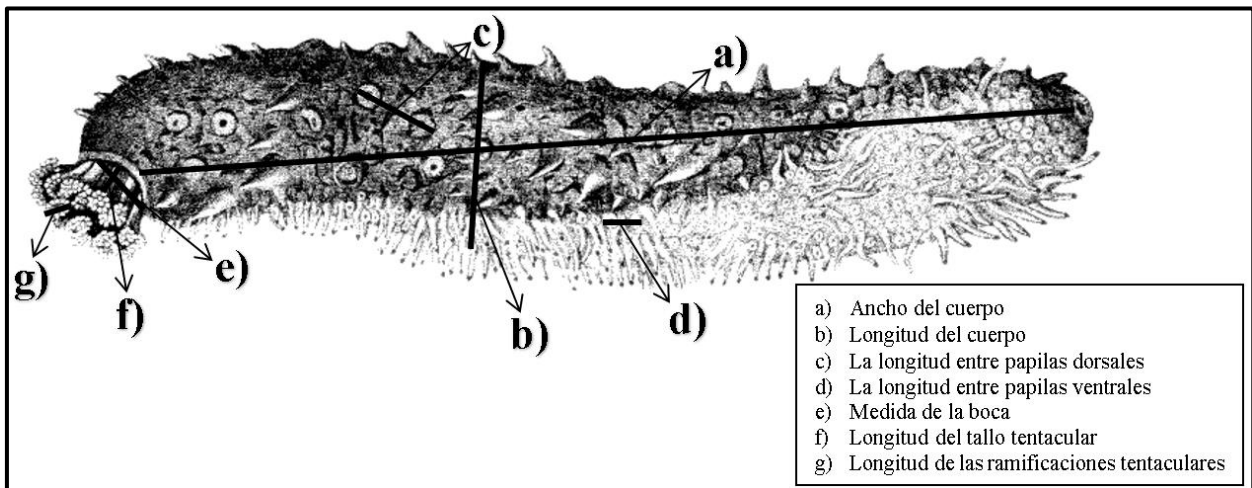
Se tomaron medidas de las secciones y estructuras características de las dos especies

(Figura 2):

- El ancho del cuerpo
- La longitud del cuerpo
- La longitud entre papilas dorsales
- La longitud entre papilas ventrales
- Medida de la boca
- Longitud del tallo tentacular
- Longitud de las ramificaciones tentaculares

Figura 2

Gráfico descriptivo indicando las medidas que se tomaron de las especies de pepinos de mar



Análisis Metagenómico

La identificación molecular fue realizada implementando el método de determinación por metabarcoding COI e ITS para especies animales.

La extracción de ADN de pepinos de mar se realizó utilizando los protocolos de Stewart & Via (1993) y Sokolov (2000), en los que se incluyó un tratamiento adicional para precipitar los polisacáridos presentes en el tejido de los pepinos de mar.

Se evaluó la integridad y calidad del ADN extraído mediante espectrofotometría (a 260/280 nm) de micro volúmenes y visualización en gel de agarosa.

Análisis de Datos

Alineación de Secuencias:

Se utilizó el programa MEGA 5 para realizar la edición y alineación de secuencias, para ello de la especie *Holothuria inornata* se obtuvieron con 228 secuencias de nucleótidos conseguidas del GenBank del NCBI, mientras que para *Isostichopus fuscus* se usaron 31 secuencias obtenidas de BOLDSYSTEMS.

Para la elaboración de los árboles filogenéticos de ambas especies se utilizó el análisis filogenético molecular por método de *Maximum Likelihood* y el modelo Tamura-Nei, debido a que es el método con el que se ha inferido la historia evolutiva.

Distribución Espacial

Luego de realizar la identificación molecular de las especies de pepino de mar, se procedió con la revisión bibliográfica de los reportes de estas especies en la base de datos de Boldsystems (<https://boldsystems.org/>).

Resultados

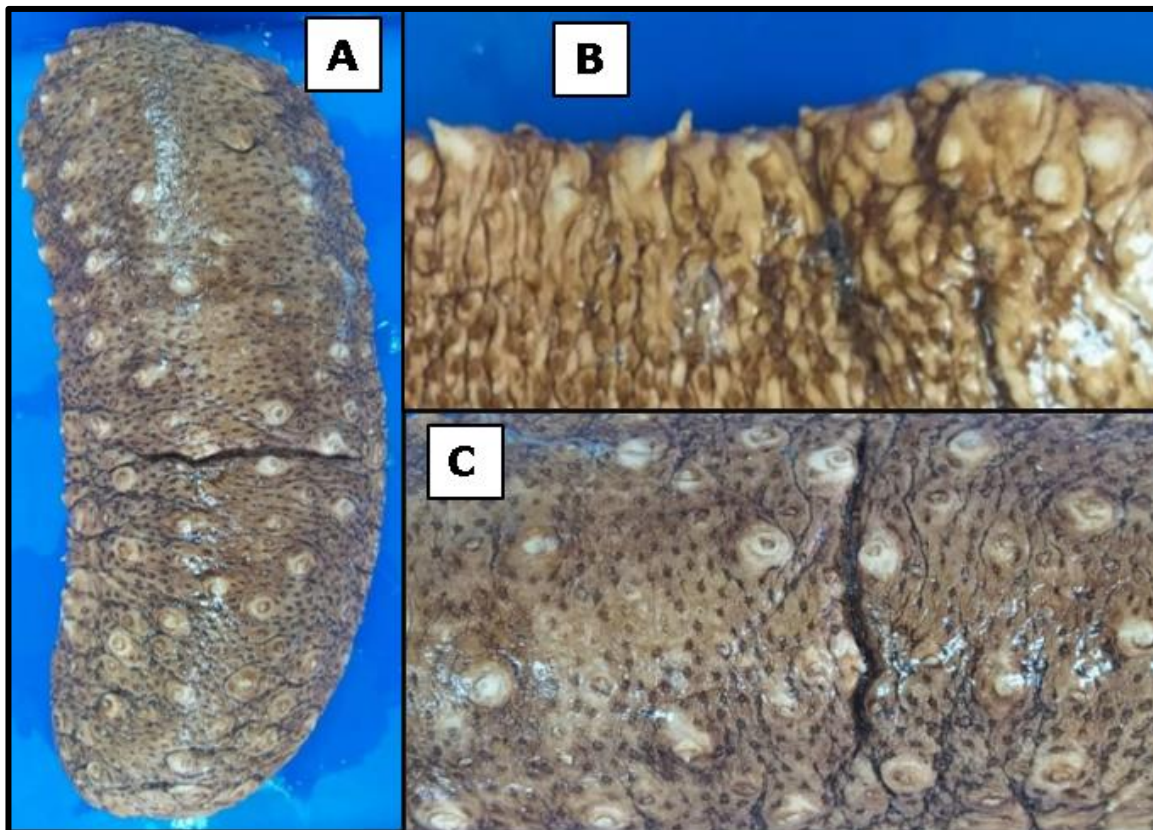
Descripción Taxonómica

Holothuria inornata:

Se logró la identificación de *H. inornata* acorde a características claves como las papilas ventrolaterales, presentes en poca cantidad, tamaño medio de 0,5 cm y que están terminadas con una punta; presenta pequeñas papilas dorsales de 0,7 cm, coloración marrón semejante a la del cuerpo (Figura 3).

Figura 3

Características de identificación de la dermis de Holothuria inornata. A: Especimen recolectado de H. inornata; B: Papilas ventrolaterales, de tamaño medio, en poca cantidad y terminadas en punta; C: Pequeñas papilas dorsales de coloración semejante al cuerpo



A continuación, se presenta la clasificación taxonómica de *Holothuria inornata*:

- **Reino:** *Animalia*

Filo: *Echinodermata*

Clase: *Holothuroidea*

Orden: *Aspidochirotida*

Familia: *Holothuriidae*

Género: *Holothuria*

Especie: *inornata*

Nombre científico: *Holothuria inornata* (Semper, 1868)

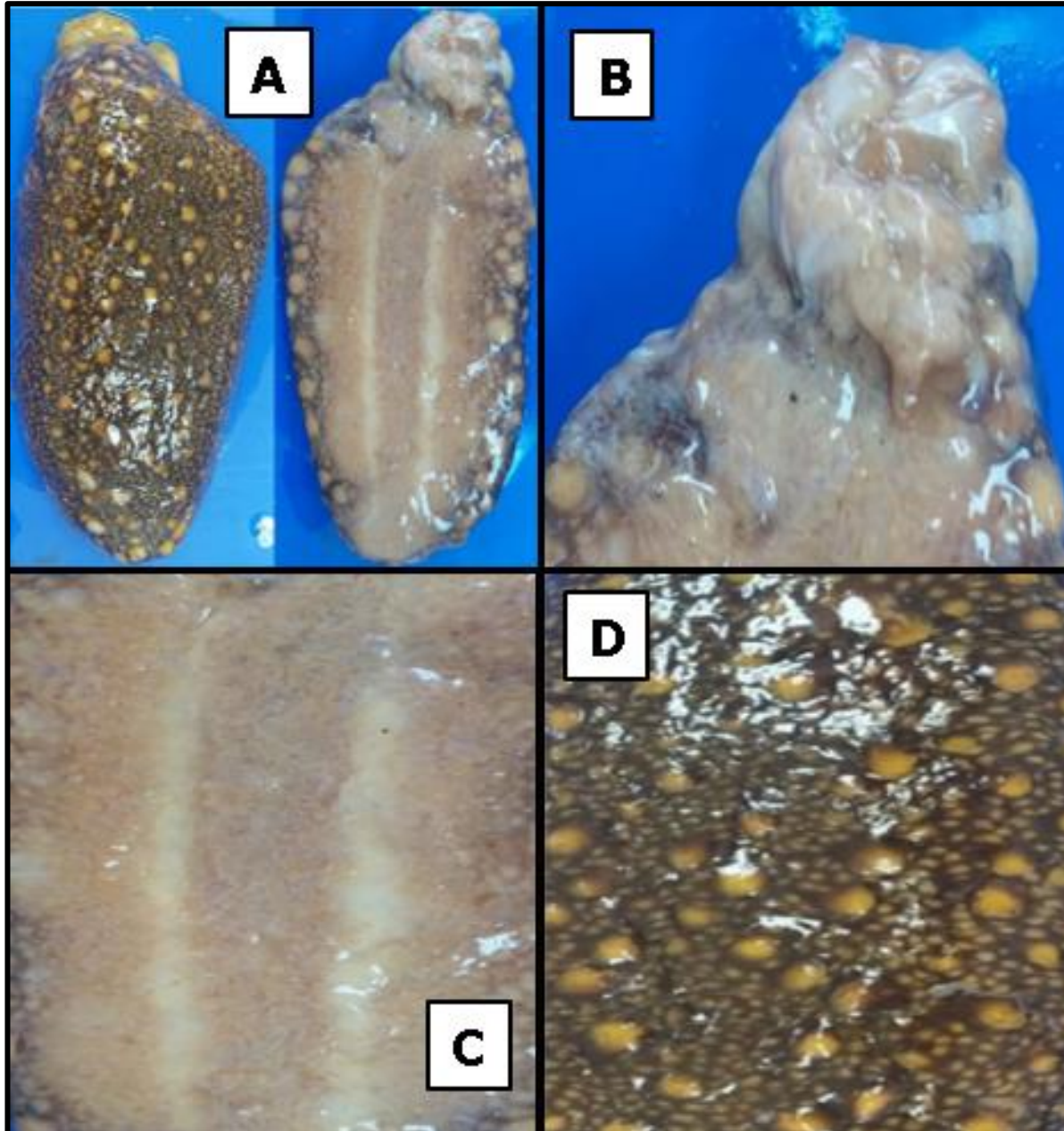
Nombre común: Pepino de mar arenero

Isostichopus fuscus:

En la especie *I. fuscus* se observó una forma robusta, plano-convexa y de bordes gruesos; presenta una superficie dorsal de color pardo y una superficie ventral clara; la boca está situada en la superficie ventral; los pies ambulacrales se observan dispuestos en densas bandas de la superficie ventral; y unas notorias papilas dorsales, de disposición irregular, forma cónica y tamaño medio de 1 cm (Figura 4).

Figura 4

Características de Isostichopus fuscus. A: Especimen recolectado de I. fuscus presentando una superficie dorsal de color pardo y una superficie ventral clara; B: Boca posicionada en la superficie ventral; C: Pies ambulacrales dispuestos en densas bandas; D: Papilas dorsales de disposición irregular y forma cónica



A continuación, se presenta la clasificación taxonómica de *Isostichopus fuscus*:

- **Reino:** *Animalia*

Filo: *Echinodermata*

Clase: *Holothuroidea*

Orden: *Synallactida*

Familia: *Stichopodidae*

Género: *Isostichopus*

Especie: *fuscus*

Nombre científico: *Isostichopus fuscus* (Ludwig, 1875)

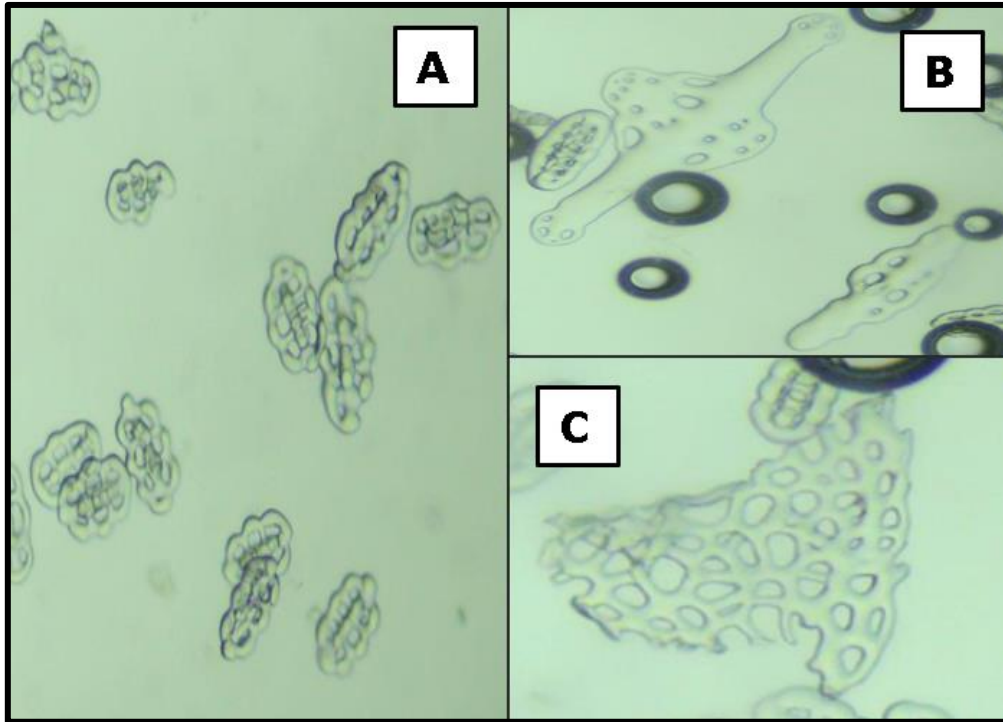
Nombre común: Pepino de mar marrón

Análisis Espículas

En *Holothuria inornata* se pudieron identificar tres tipos de espículas en forma de botones abollonados, barrote y placa perforada los mismos que fueron obtenidos del tejido epitelial del organismo (Figura #5).

Figura 5

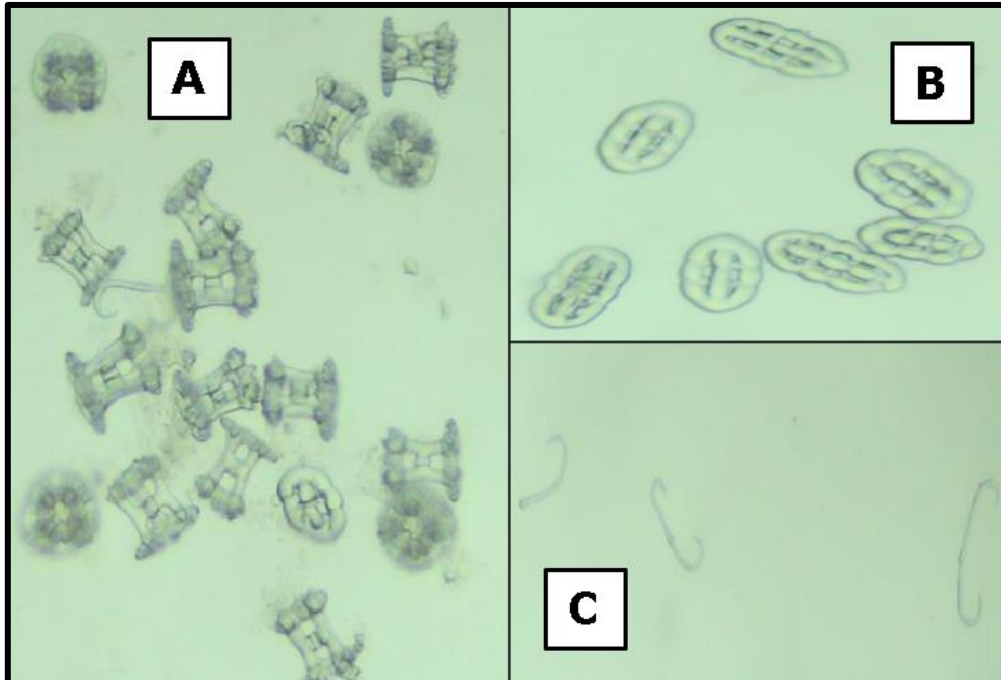
*Espículas en forma de botones abollonados (A), barrote (B) y placa perforada (C) encontradas en *Holothuria inornata**



Mientras que para la especie *Isostichopus fuscus* se pudieron identificar tres tipos distintos de espículas, en forma de tabla, botones abollonados y “C”, las mismas que fueron obtenidas del tejido epitelial del organismo (Figura #6).

Figura 6

Espículas en forma de tabla (A), botones abollonados (B) y "C" (C) encontradas en Isostichopus fuscus



En *Holothuria inornata* se pudo determinar la presencia de un tipo de espícula en forma de botones abollonados, barrote y placa perforada de las que se obtuvo una talla promedio y desviación estándar (DS) de $76,09 \pm 9,17$, $232,46 \pm 72,56$ y $192,98 \mu\text{m}$ (la talla de placa perforada no cuenta con el valor de DS debido a que solo se obtuvo una espícula) respectivamente; mientras que en *Isostichopus fuscus* se obtuvieron espículas en forma de tabla, botones abollonados y "C" con las que se determinó una talla promedio y DS de $41,8 \pm 5,44$, $76,09 \pm 9,17$ y $61,06 \pm 15,03 \mu\text{m}$ respectivamente (Tabla #1).

Tabla 1

*Medidas de talla y desviación estándar de la espícula identificada de *Holothuria inornata* e *Isostichopus fuscus**

Tipo de espículas	<i>H. inornata</i>	<i>I. fuscus</i>	Frecuencia
Barrote	232,46±72,56 µm	-----	Frecuentes
Placa perforada	192,98 µm	-----	Escasos
Botones abollonados	76,09±9,17 µm	72,86±9,86 µm	Abundantes
Tabla	-----	41,8±5,44 µm	Abundantes
“C”	-----	61,06±15,03 µm	Frecuentes

Análisis Morfométrico

En la tabla 2 se observa que la especie *H. inornata* presentó una longitud de 24,4 cm y un peso de 698 g, las medidas promedio entre papilas dorsales y ventrales fueron de 14,5 cm y 9,8 cm respectivamente; mientras que la especie *I. fuscus* al tener un peso de 324 g y una longitud de 17,5 cm, posee medidas promedio entre papilas dorsales y ventrales de 10,5 cm y 15,5 cm respectivamente.

Tabla 2

Datos morfométricos de las especies de pepinos de mar del estudio

Medidas	<i>Holothuria inornata</i>	<i>Isostichopus fuscus</i>
Peso (g)	698	324
Longitud del cuerpo (cm)	24,4	17,5
Ancho del cuerpo (cm)	7,9	7,2
Longitud entre papilas dorsales (mm)	14,5	10,5
Longitud entre papilas ventrales (mm)	9,8	15,5
Medida de la boca (mm)	3	11,5
Tallo de los tentáculos (mm)	4	14
Ramificación de los tentáculos (mm)	7	10,9

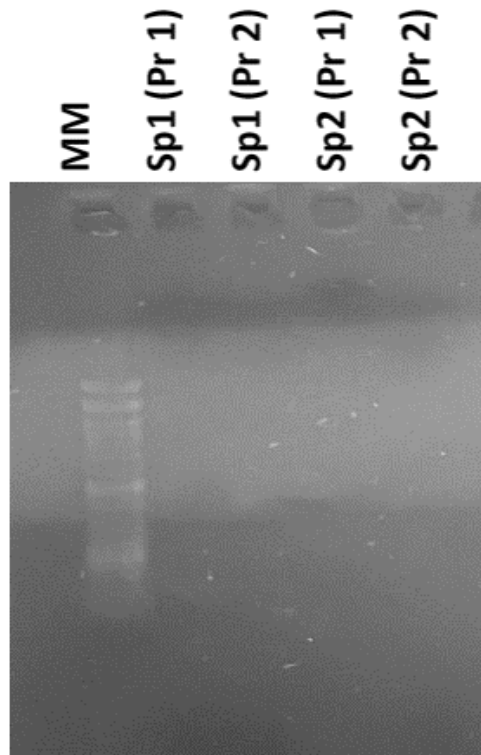
Análisis Molecular

Se evaluaron varios *primers* para la secuenciación de *Holothuria inornata* y *Isostichopus fuscus*, se logró extraer ADN genómico, pero la calidad fue muy baja, siendo así que la visualización del ADN en gel de agarosa al 1% fue mínimo en las especies evaluadas (Figura 7), lo cual dificultó la secuenciación.

Figura 7

Muestras de ADN de las especies de pepinos de mar observadas en un gel de agarosa al 1%.

MM: Marcador de peso molecular ABM 100pb plus opti DNA marker



Nota: Donde **MM**: Es el marcador de ADN, las barras grises debajo son el marcador de peso molecular y sirven para determinar el tamaño aproximado del fragmento de ADN; **Sp1**: Corresponde al ADN de *Holothuria inornata*; **Sp1**: Corresponde al ADN de *Isostichopus fuscus*; **Pr1 y Pr2**: Indican el uso de dos primers distintos para la secuenciación de ADN de las muestras

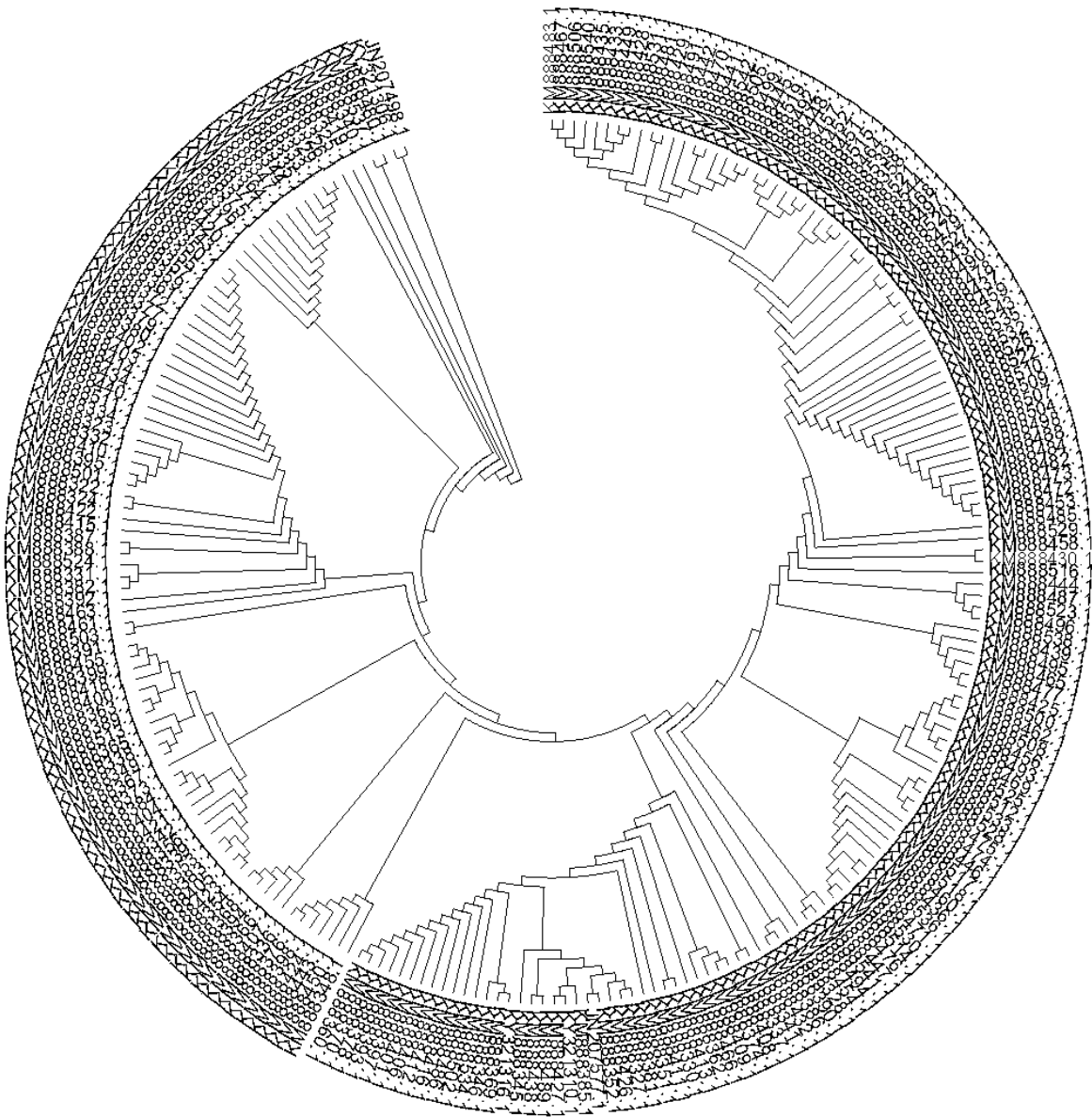
***Holothuria inornata*:**

Se obtuvo el árbol filogenético con la probabilidad logarítmica más alta (-2293,6073). Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente con la revisión de < 100 sitios comunes (cuarta parte del total de sitios). El análisis involucró 228 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1^a+2^a+3^a+Sin-codificación. Se registro un total de 450 posiciones en el conjunto de datos final.

En el árbol filogenético observamos la agrupación de 228 secuencias, que se extrajeron de esta especie reportado en cuatro países (México, El Salvador, Panamá y Perú), y donde podemos determinar a los cinco primeros clados como los más representativos según la descripción molecular cuyos códigos de ascensión son JN207498.1, KY321306.1, KM888480.1, KM888537.1, KM888340.1, KM888419.1, KM888325.1 (Figura 8).

Figura 8

*Árbol filogenético de las secuencias de la región del gen COI de *Holothuria inornata*, secuencias tomadas del GenBank del NCBI*



Nota: La construcción del árbol filogenético se hizo por medio del programa MEGA 5

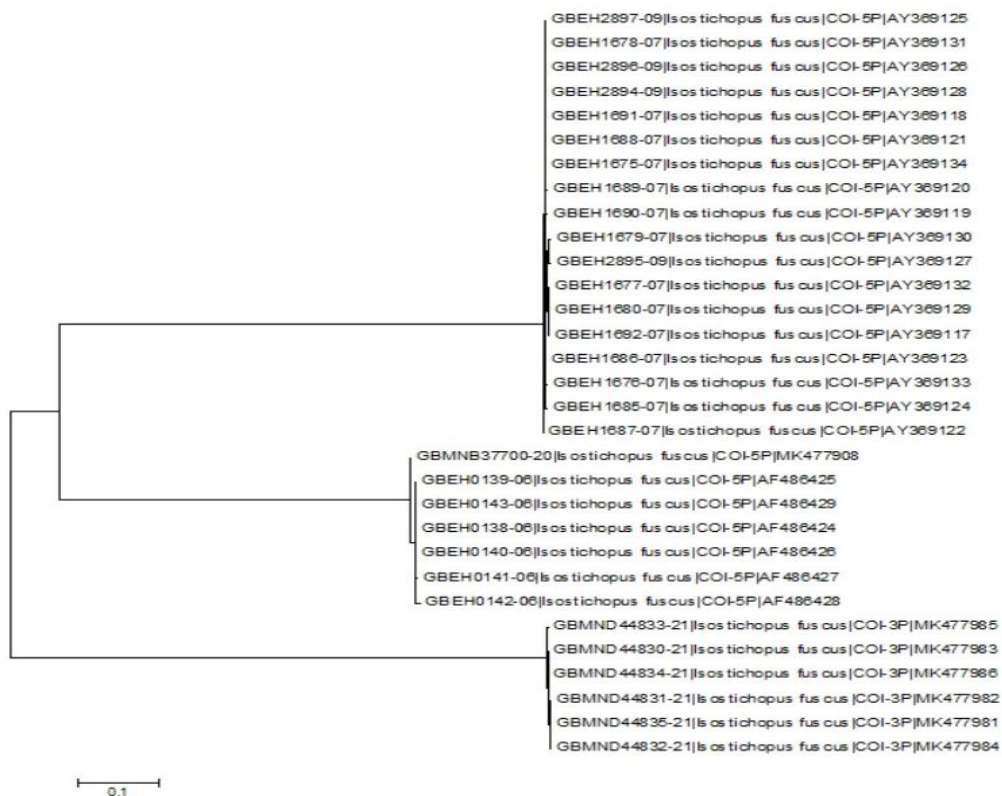
Isostichopus fuscus:

Se estableció un árbol con la probabilidad logarítmica más alta (-1464,9926). Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron de la misma forma que para *Holothuria Inornata*.

El árbol describe las longitudes de las ramas medidas en número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 31 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1^a+2^a+3^a+Sin-codificación. Existió un total de 348 posiciones en el conjunto de datos final. Al construirse el árbol filogenético se generaron 3 clados poblacionales de acuerdo al análisis molecular, los mismos que corresponderían a organismos obtenidos en Ecuador (Galápagos), México y Colombia respectivamente (Figura 9).

Figura 9

Árbol filogenético de las secuencias de la región del gen COI de Isostichopus fuscus tomadas del BoldSystems



Nota: La construcción del árbol filogenético se realizó con el programa MEGA 5

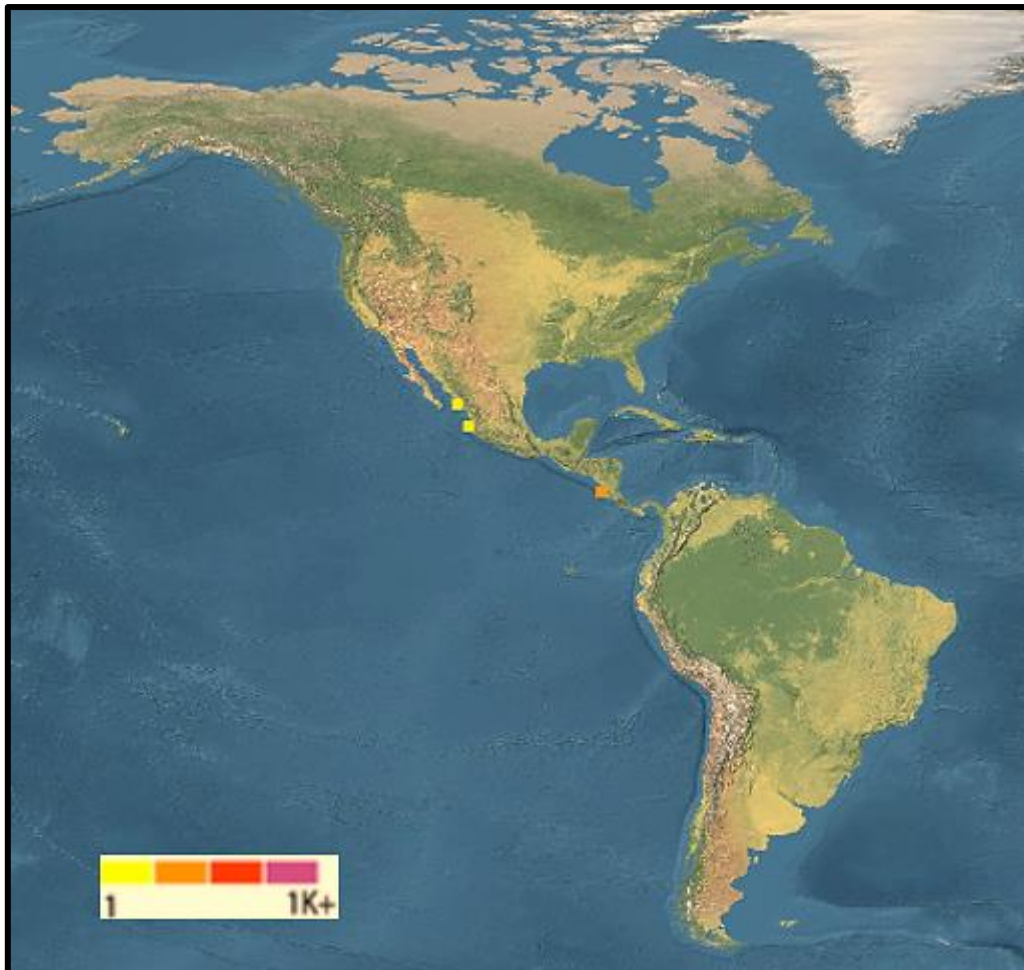
Distribución Espacial

Holothuria inornata:

Respecto a *Holothuria inornata* se ha registrado la recolección de 19 especímenes identificados de forma molecular en 2 países distintos: 11 especímenes en Costa Rica y 8 México (Figura 10).

Figura 10

Mapa de las regiones de recolección de especímenes de Holothuria inornata identificadas mediante análisis moleculares



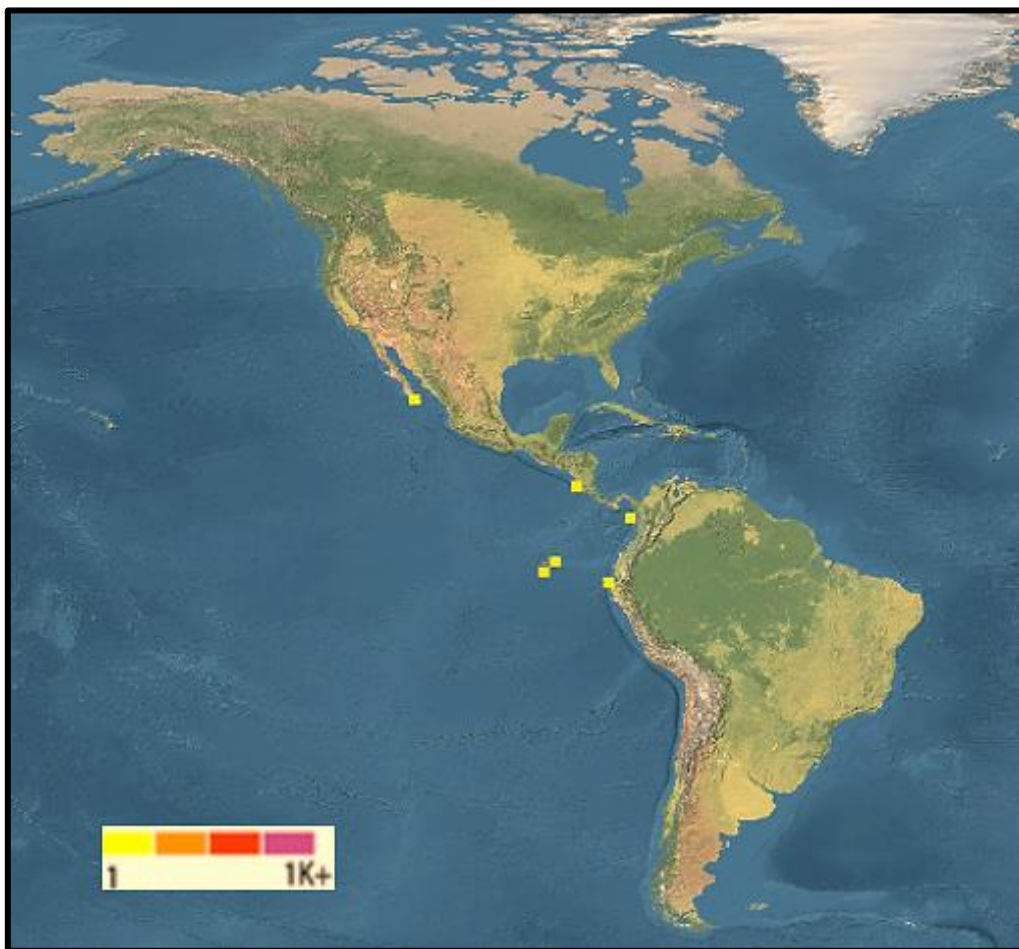
Nota: Mapa obtenido de la web de BoldSystems, la escala de colores de 1 a 1k indican puntos donde se han obtenido de 1-9 (amarillo), de 10-99(anaranjado), de 100-999 (rojo), o > 1 000 (morado) individuos

Isostichopus fuscus:

Los reportes moleculares que se presentan respecto a *Isostichopus fuscus* se ha registrado la recolección de 30 especímenes en 5 países distintos: 8 en Perú, 8 en Ecuador, 6 en Costa Rica, 4 en Colombia y 4 en México (Figura 11).

Figura 11

Mapa de las regiones de recolección de especímenes de Isostichopus fuscus identificadas mediante análisis moleculares



Nota: Mapa obtenido de la web de BoldSystems, presenta la misma escala que el mapa anterior

Discusión

La identificación convencional de los pepinos de mar es un desafío debido a su un desafío debido a su complejidad morfológica. La Especie *Holothuria inornata* se caracteriza por presentar papilas dorsales escasas, dispersas y cónicas; escasas pero evidentes papilas ventrolaterales, terminadas en punta y de tamaño medio; además de un muy bien clasificado anillo calcificado (Sánchez-Bonilla, 2022; Contreras-Sillero, 2020). En el caso de *Isostichopus fuscus*, presenta papilas dorsales de tamaño medio, cónicas y muy notorias; papilas ventrolaterales abundantes en los márgenes laterales bajos; además de un calcáreo anillo de osículos (Vergara-Chen *et al*, 2015; Villafuerte-Parrales, 2022). De *Holothuria inornata* no existe información respecto al tipo es espículas que posee, aunque si existen datos de especies del mismo género como; *Holothuria inhabilis* que posee en su piel espículas en forma de tabla, botones abollonados y de barrotes, mientras que en los tentáculos solo los tiene presentes en forma de barrotes; (Prieto-Ríos, 2010). *Isostichopus fuscus* se la suele identificar debido a la abundante presencia de espículas en forma de tabla y “C” que forman parte de su estructura de soporte (Paulay, 2015; Purcell et al, 2012). En el trabajo realizado por Prieto-Ríos (2010) donde realiza la extracción de espículas de *I. fuscus* describió que en su piel se pueden encontrar espículas en forma de tabla, placa perforada y “C”, mientras que en los tentáculos solo están presentes en forma de barrote. Estas características ayudan en la identificación entre estos dos géneros, pero se dificultan cuando se trata de especies dentro de cada género. Así que es necesario el apoyo de análisis morfométricos para estas especies. En nuestro estudio se determinó que para *H. inornata* con una longitud de 24,4 cm, presentó una distancia del $50\pm 6\%$ entre papilas dorsales y $40,1\pm 5\%$ entre papilas ventrales respecto a la longitud total del cuerpo. Mientras que en *I. fuscus* con una longitud de 17,5 cm, poseía una distancia entre papilas dorsales y ventrales de $60\pm 5\%$ y $89\pm 9\%$ respectivamente, una longitud de tallo de los tentáculos de 14 mm, con una ramificación de 10,9 mm. Aunque cabe recalcar que la mayoría

de los autores reportan otras morfometrías, como se lo puede observar con el trabajo de Ruiz *et al* (2007), en donde se relacionó el peso *Athyonidium chilensis* y el de su contenido intestinal con la medida de su tracto digestivo. También existen investigaciones en donde se ha determinado la estructura de talla entre las especies *Isostichopus badionotus*, *Holothuria mammata*, *H. mexicana*, *I. fuscus*, *H. arguinensis*, *H. tubulosa* y *H. grisea* (Nisperuza-Pérez, 2018). Además, también se han realizado análisis de frecuencias de tallas y relación talla-peso en la especie *Isostichopus badionotus* (Hernández *et al*, 2015).

Ahora bien, la identificación molecular se ha desarrollado para lograr mayor claridad a la sistemática y taxonomía de los pepinos de mar (Ahmed *et al*, 2021); como se presenta en el estudio de Mu *et al* (2018), donde se describió el genoma mitocondrial completo de *Benthodytes marianensis*, con el que se realizó un análisis filogenético que reveló el parentesco con *Peniagone sp.* formando el clado *Elasipodida* de aguas profundas.

En cuanto a la distribución espacial en diversos análisis de diversidad genética realizadas sobre la especie *Holothuria inornata* en distintas localidades, se ha sugerido que estos organismos pueden estar divididos en dos poblaciones; las de sur presentes entre Perú, Panamá, El Salvador y Chiapas, y las del norte distribuidas entre Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Jalisco y Sinaloa (Prieto-Ríos *et al*, 2014). Acorde a lo expresado por Sánchez-Bonilla (2022) que determina que esta especie se mantiene distribuida en las costas del Pacífico entre el golfo de California al Perú. Esta diferenciación entre unidades sudamericanas y mexicanas también fueron descritas por Landini *et al* (2002).

El árbol filogenético de *Isostichopus fuscus* arrojó 3 clados que corresponderían a poblaciones de pepino de mar presentes en las Galápagos-Ecuador, Colombia y México, esta agrupación podría ser resultado de poblaciones cercanas por diseminación de la especie a través de corrientes marinas principalmente entre Ecuador y Colombia. Chávez (2017) determino que entre las poblaciones de *Isostichopus fuscus* de las Islas Galápagos, Ecuador continental y

Bahía Concepción se encuentra a menos distancia genética comparada a poblaciones de México, evidenciado mediante el índice de fijación. Estas afirmaciones se hacen entendible al considerar la amplia distribución de *I. fuscus* que va desde Baja California hasta el sur del Ecuador, en donde se incluyen islas como Cocos, Socorro, Revillagigedos y Galápagos (García-Rojas, 2015). Aun con estos reportes, es necesarios ahondar más investigación en el Ecuador que permita esclarecer mejor la distribución de otras especies de holoturoideos.

Conclusión

- Las papilas ventrolaterales terminadas en punta, y la presencia de espículas en forma de botones abollonados y barrotes son claves para la identificación de *H. inornata*; así mismo las papilas ventrolaterales abundantes en los márgenes laterales bajos y la presencia de espículas en forma tabla y “C” para identificar a *I. fuscus*.
- *H. inornata* presentó una longitud de 24,4 cm y un peso promedio de 698 g, con medidas promedio entre papilas dorsales y ventrales fueron de 14,5 cm y 9,8 cm respectivamente; Mientras *I. fuscus* obtuvo un peso de 324 g y una longitud de 17,5 cm, con medidas promedio entre papilas dorsales y ventrales de 10,5 cm y 15,5 cm respectivamente.
- La calidad del material genético extraído no fue la adecuada para secuenciar el ADN de los pepinos capturados.
- Se determinaron cinco grupos genéticos representativos en *H. inornata* por medio del análisis de filogenia, cuyos códigos de ascensión son JN207498.1, KY321306.1, KM888480.1, KM888537.1, KM888340.1, KM888419.1 y KM888325.1; mientras que para *I. fuscus* se obtuvo tres grupos génicos asociados a poblaciones de Galápagos, México y Colombia. Aunque en ambas especies hizo falta más información a nivel molecular.

Literatura Citada

- Ahmed, Q., Ali, Q. M. & Macdonald, A. H. (2021). Identification of Sea cucumber *Holothuria (Lessonothuria) pardalis* (Selenka, 1867) and *Holothuria (Semperothuria) cinerascens* (Brandt, 1835) (*Family-Holothuriidae*) based on morphological and mitochondrial DNA evidence and phylogenetic analysis from Karachi Coast, Pakistan. *International Journal of Environment and Geoinformatics*, 8(1), 57-64.
- Alvarado, J. J., & Solís-Marín, F. A. (2013). Echinoderm research and diversity in Latin America (pp. 658). Springer Berlin Heidelberg.
- Atif, M., El-Naggar, N. A., Ashaat, H. I. & El-Belbasi, M. S. (2008). Molecular Phylogeny of Egyptian Sea Cucumbers As Predicted From 16s Mitochondrial rRNA Gene Sequences. *World Allied Sciences Journal*, 5(5): 531-542.
- Chávez, J. M. O. (2017). Variabilidad genética de *Isostichopus fuscus* (Ludwig, 1875) en el Pacífico mexicano, mediante marcadores moleculares. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.
- Contreras Sillero, M. E. (2020). Policultivo de *Holothuria inornata* con *Penaeus vannamei* en un sistema Biofloc. Universidad Autónoma de Nayarit. Posgrado en ciencias Biológico Agropecuarias.
- García Rojas, C. E. (2015). Caracterización poblacional del pepino de mar (*Isostichopus fuscus*) en seis bajos de la reserva marina " El Pelado", provincia de Santa Elena-Ecuador, diciembre del 2014-mayo-2015. (Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2015.).
- Guerrero, P. (2021). La pesca de pepino de mar en la Reserva Marina de Galápagos: pasado, presente y, ¿futuro?. WWF-Ecuador.
- Hernández, A., Borroto, R. & Puga, R. (2015). Potencial pesquero del pepino de mar *Isostichopus badionotus* (Selenka, 1867) al sur de Camagüey, Cuba.

- Hickman, C. J. (1998). A field guide to sea stars and other echinoderms of Galápagos. Sugar Spring Press, Lexington, VA, USA. 83 pp.
- Kamarudin K. R. & Rehan M. M. (2015). Morphological and molecular identification of *Holothuria (Merthensiothuria) leucospilota* and *Stichopus horrens* from Pangkor Island, Malaysia. *Trop Life Sci Res*, 26 (1): 87-99.
- Landini, W., Bianucci, G., Carnevale, G., Ragaini, L., Sorbini, C., Valleri, G., Bisconti, M., Cantalamessa, G. & Di Celma, C. (2002). Late Pliocene fossils of Ecuador and their role in the development of the Panamic bioprovince after the rising of Central American Isthmus. *Can. J. Earth Sci*, 39:27–41.
- Madduppa, H., Subhan, B., Anggraini, N. P., Fadillah, R. & Tarman, K. (2017). DNA barcoding reveals vulnerable and not evaluated species of sea cucumbers (*Holothuroidea* and *Stichopodidae*) from Kepulauan Seribu reefs, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 18(3), 893-898.
- Mercier, A., Hamel, J. F., Toral Granda, T. G., Alvarado, J. J., Paola Ortiz, E. & Benavides, M. (2013). *Isostichopus fuscus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013. <https://www.iucnredlist.org/species/180373/1621878>
- Miller, N. (2007). Sea Cucumbers. <http://jrscience.wcp.muohio.edu/fieldcourses05/PapersMarineEcologyArticles/SeaCucumbers.html>
- Mu, W., Liu, J. & Zhang, H. (2018). Complete mitochondrial genome of *Benthodytes marianensis* (*Holothuroidea: Elaspodida: Psychropotidae*): Insight into deep sea adaptation in the sea cucumber. *PloS one*, 13(11), e0208051.
- Nisperuza Pérez, C. A., Padilla Cantero, J. & Quirós-Rodríguez, J. A. (2018). Densidad poblacional y estructura de talla del pepino de mar *Holothuria (Halodeima) grisea* (*Aspidochirotida: Holothuriidae*) en aguas someras del sur del golfo de Morrosquillo, Caribe Colombiano. *Revista de Biología Tropical*, 66(2), 776-787.

- Prieto Ríos, E. (2010). Taxonomía de *Holothuroidea* (*Echinodermata*) del mar del Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas.
- Prieto Ríos, E., Solís Marín, F. A., Borrero Pérez, G. H. & Díaz Jaimes, P. (2014). Filogeografía de *Holothuria* (*Halodeima*) *inornata* Semper, 1868 (*Echinodermata: Holothuroidea*). *Revista peruana de biología*, 21(2), 155-162.
- Purcell, S. W., Samyn, Y. & Conand, C. (2012). Commercially important sea cucumbers of the world. *FAO*.
- Rivera Téllez, E., López Segurajáuregui, G., Fernández, T., Vázquez B. & Mosig, P. (2021). Guía de identificación de los pepinos de mar de interés comercial en México. *CONABIO*.
- Ruiz, J., Ibáñez, C. M. & Cáceres, C. W. (2007). Morfometría del tubo digestivo y alimentación del pepino de mar *Athyonidium chilensis* (Semper, 1868) (*Echinodermata: Holothuroidea*). *Revista de biología marina y oceanografía*, 42(3), 269-274.
- Sánchez Bonilla, A. E. (2022). Composición, abundancia y estructura comunitaria del *Phylum Echinodermata* en la zona rocosa intermareal de la playa de San Lorenzo–Salinas, julio a octubre 2021 (Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2022).
- Sokolov, E. P. (2000). An improved method for DNA isolation from mucopolysaccharide-rich molluscan tissues. *Journal of Molluscan Studies*, 66(4), 573–575.
- Solís Marín, F. A., Arriaga Ochoa, J., Laguarda Figueras, A., Frontana Uribe S. & Durán Gonzales, A. (2009). Holothuroideos (*Echinodermata: Holothuroidea*) del Golfo de California. 1ra. Edición. UNAM. CONABIO. *Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*. 177 pp.

- Solís-Marín, F. A. (2011). Informe final del proyecto INE-UMSNH: Diagnóstico de las poblaciones arrecifales del pepino de mar *Holothuria inornata* (Semper, 1868) en la costa del estado de Michoacán. Convenio INE/PS-031/2011.
- Stewart, C. N. & Via, L. E. (1993). A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques*, 14(5), 748–750.
- Toral Granda, M. V. & Martínez, P. C. (2007). Biología reproductiva y estructura poblacional del pepino de mar *Isostichopus fuscus* (Ludwig, 1875) (*Holothuroidea*) en Caamaño, Islas Galápagos, Ecuador. *Marine Biology*, 151, 2091-2098.
- Velasco Arguello, L. M. (2015). Política pública de prevención de actividades ilícitas. Modelo de gestión de desarrollo local para la camaronera comunitaria Engunga, provincia de Santa Elena. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Maestría en Gestión del Desarrollo Local y Comunitario.
- Vergara Chen, C., Guerra-Lima, Z. I., & Collado, G. (2015). El pepino de mar, *Isostichopus fuscus*, recurso marino en peligro con altas necesidades de manejo. *Tecnociencia*, 17 (2).
- Villafuerte PARRALES, D. A. (2022). Evaluación poblacional del pepino de mar *Isostichopus fuscus* en la reserva marina de Galápagos durante el periodo 2013-2021 (Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2022.).