

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
MAESTRIA EN CIENCIAS, EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

Identificación de la unidad de *Octopus maya* utilizando microsatélites.

Que para obtener el grado de Maestría en Ciencias

Presenta:

Oscar Eduardo Juárez Valdez

Ensenada, Baja California

Noviembre 2011

Comité de tesis

Directora de tesis: Dra. Leticia Arena Ortíz (UMDI-Sisal, UNAM)

Tutor Académico: Dr. Faustino Camarena Rosales, UABC

Sinodal: Dr. Luis Enríquez Paredes, UABC.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

**IDENTIFICACIÓN DE LA UNIDAD DE PESCA DE *Octopus maya*
UTILIZANDO MICROSATÉLITES**

TESIS

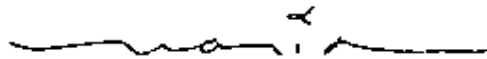
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

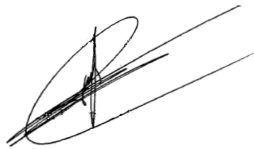
PRESENTA

OSCAR EDUARDO JUÁREZ VALDEZ

APROBADO POR:



Dra. María Leticia Arena Ortíz
Directora de Tesis



Dr. Faustino Camarena Rosales
Sinodal



Dr. Luis Enríquez Paredes
Sinodal

Contenido

AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	4
CAPÍTULO 1.	
DESARROLLO DE MICROSATÉLITES PARA <i>Octopus maya</i>	6
INTRODUCCIÓN	6
MÉTODO.	8
RESULTADOS	13
DISCUSIÓN	14
CONCLUSIÓN.	15
TABLA	17
CAPITULO 2.	
IDENTIFICACIÓN DE LA UNIDAD DE PESCA DE <i>Octopus maya</i>, UTILIZANDO MICROSATÉLITES ESPECÍFICOS.	21
INTRODUCCIÓN.	21
OBJETIVO.	24
MÉTODO.	24
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIÓN	32
TABLAS	34
FIGURAS	40
APÉNDICE: TEMPERATURAS SUPERFICIALES DEL GOLFO DE MÉXICO EN 2010.	43
PROTOCOLOS	45
PROTOCOLO A. EXTRACCIÓN DE ADN UTILIZANDO FENOL:CLOROFORMO	45
PROTOCOLO B. EXTRACCIÓN DE ADN UTILIZANDO SALES.	46
LITERATURA CITADA.	47

Agradecimientos

Agradezco a mi familia por el apoyo total que me ha brindado y que ha hecho posible la realización de todos mis proyectos en la vida como los fueron este posgrado y tesis.

A los doctores Faustino Camarena, Luis Enríquez, Leticia Arena y Carlos Rosas por sus aportaciones intelectuales, el material de laboratorio suplementado y las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis, en especial por darme la oportunidad de realizar mi estancia académica en Inglaterra la cual no solo ha sido parte esencial en el desarrollo de mi investigación, sino de mi desarrollo personal.

A las instituciones que han participado en este proyecto, la UABC, la UMDI-UNAM Sisal, la UADY, el CINVESTAV Mérida, el Instituto Tecnológico de Mérida, Ecosur de Campeche y la Royal Holloway University of London, especialmente al Dr. Paul Shaw y al Dr. Niall McKeown, ya que su aportación en el desarrollo metodológico de este trabajo fue fundamental y por todas sus atenciones durante mi estancia en Londres. Este trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo económico de la beca CONACYT 329532/236442, del fondo UC-MEXUS-CONACYT CN09-348, que otorgó los recursos para realizar el trabajo de laboratorio en Royal Holloway University of London, y del Fondo mixto Yucatán - CONACYT 108675, quién otorgó parte de los recursos para el desarrollo de los experimentos en México.

A la familia Harris-Mayoral por la calidez y todas sus atenciones.

A Andrea, que ha estado a mi lado haciendo esta experiencia aun más agradable, memorable, convirtiéndola en una de las etapas más importantes de mi vida.

Resumen

El pulpo endémico *Octopus maya* es uno de los principales recursos pesqueros de la península de Yucatán. Representa la mayor parte de las capturas de pulpo en México. Históricamente la pesquería se ha manejado como una sola unidad de pesca, sin embargo existen indicios de que la especie podría constar de más de una población y de que el recurso está sobreexplotado. Los caracteres fenotípicos no son adecuados para identificar poblaciones, debido a la plasticidad morfológica de los pulpos. Los marcadores genéticos pueden ser una herramienta adecuada para discriminar poblaciones y definir unidades de manejo. Los microsatélites presentan la mayor variabilidad intraespecífica entre los marcadores moleculares y han sido eficientes para identificar poblaciones. Este estudio se presenta en dos capítulos, con objetivos y resultados propios. El primero está dedicado al aislamiento de microsatélites específicos para *O. maya*. En el segundo capítulo se seleccionan ocho de los microsatélites aislados con el objetivo de evaluar la estructura y variabilidad genética de la especie. Fueron aislados fragmentos genómicos que contienen microsatélites por el método de hibridación selectiva de Glenn y Schable (2005). Los fragmentos obtenidos fueron clonados y secuenciados. De 73 fragmentos secuenciados, 39 contenían tanto microsatélites como secuencias flanqueantes de suficiente tamaño para el diseño de los cebadores. Se verificaron 28 pares de cebadores con los que fue posible amplificar 20 microsatélites, once de estos resultaron polimórficos. Finalmente fueron seleccionados ocho microsatélites para el análisis genético de la población. Los resultados del análisis poblacional sugieren que no hay diferencias significativas entre las localidades, donde Sabancuy y Río Lagartos presentan la mayor diferenciación entre estas. Los datos muestran que ha existido un alto flujo génico entre las

localidades muestreadas, en tiempos evolutivos. Según el análisis de componentes principales, las distancias genéticas de los individuos se mantienen en un mismo rango independientemente de su localidad de procedencia. Por otro lado, las distancias promedio por localidad, no corresponden exactamente a sus distancias geográficas. Aunque se observó una moderada variación espacial en los niveles de heterocigosis, ésta no fue significativa. En el análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg, dos de ocho loci mostraron déficit de heterocigotos a nivel poblacional. El F_{is} promedio mostró endogamia significativa a nivel poblacional. Dzilam es la localidad que contribuye en mayor medida a esta endogamia. Debido a que la endogamia tiende a reducir la adecuación de los organismos, estos resultados son indicios de que la pesquería podría no estar optimizada. Se concluye que la especie consta de una sola unidad de manejo. Se recomienda que el futuro manejo se enfoque en preservar la variabilidad genética para la conservación del recurso, monitorear a largo plazo los índices de endogamia y la heterocigosis dentro de las localidades. Es de gran importancia la preservación del hábitat para el mantenimiento de la conectividad entre las localidades y el flujo génico.

Abstract

The endemic *Octopus maya* represents one of the most important fisheries in Yucatan peninsula. Mayor octopus catches in Mexico belong to this species. Historically the fishery has been managed as a single unit, but some signs suggest that there could be more than one population and that the resource could be overexploited. Due to octopuses' morphologic plasticity, the phenotypic characters are not suitable for population discrimination. Genetic markers could be the correct instrument to identify populations and define management units. Microsatellites show the mayor intraspecific variation among molecular markers, and have been efficient for population discrimination. This study is divided in two chapters, each with its own objectives and results. The first is dedicated to the isolation of microsatellite markers specifically for *O. maya*. In the second chapter eight microsatellite loci were analyzed with the objective of evaluating the population genetic structure and variability. Genomic fragments that contained microsatellites were isolated via selective hybridization, following Glenn and Schable (2005) method. Obtained fragments were cloned and sequenced. From 73 fragments sequenced, 39 contained microsatellites as well as flanking sequences suitable for primer design. A total of 28 primer pairs were tested, 20 microsatellites were amplified and 11 of them were polymorphic. Finally eight loci were selected for the population genetic analysis. Results show no significant differences between localities, where the most distant localities were the most genetically divergent, and high migration of octopuses between localities in an evolutionary time frame. The principal components analysis shows that individual genetic distances are independent of individuals' provenance. The average genetic distances between localities,

do not correspond to geographic distances. Subtle spatial variations in heterozygosity were observed but they were not significant. According to Hardy – Weinberg equilibrium analysis, two from eight loci showed heterozygote deficiency at population level. Average F_{is} was significant suggesting some inbreeding at population level. Dzilam contributes the largest part to inbreeding index. Since inbreeding tends to reduce fitness in natural populations, the fishery may not be optimized. A management approach that preserves genetic variability is required for species conservation. In that sense, the long term genetic monitoring of inbreeding index, and heterozygosity levels within localities, as well as promoting habitat connectivity are proposed actions to improve management.

Capítulo 1.

Desarrollo de microsatélites para *Octopus maya*

Introducción

Los microsatélites son secuencias simples de 1 a 6 nucleótidos, repetidas de manera consecutiva, presentes en todos los genomas eucariontes y procariontes analizados hasta la fecha, los cuales se ubican tanto en regiones codificantes como no codificantes y se caracterizan por un alto grado de polimorfismo en sus tamaños (Zane et al, 2002). Los distintos tamaños representan a los distintos alelos del microsatélite, los cuales resultan valiosos para el estudio de las poblaciones ya que son útiles para la evaluación de la variabilidad genética. La información generada permite estudiar con mayor exactitud la estructura genética y establecer las relaciones entre distintas poblaciones. Tal información debe ser considerada en la toma de decisiones para poner en práctica planes de conservación (Aranguren – Méndez et al, 2005). El conocimiento de la estructura genética de una especie nos ayuda a discriminar entre unidades genéticas que se caractericen por diferencias en parámetros poblacionales así como patrones de reclutamiento y mortalidad (Maltagliati et al, 2002).

El pulpo endémico *O. maya*, es uno de los principales recursos pesqueros de la península de Yucatán, por lo que resulta importante un monitoreo de su variabilidad a nivel genético, ya que a través de este es posible determinar los niveles de erosión génica resultado de la deriva génica, endogamia, o cuellos de botella prolongados (Ryman et al, 1995).

Los microsatélites han sido exitosamente aplicados al problema de la discriminación entre unidades de pesca en especies de peces (en Murphy et al, 2002) y cefalópodos (Shaw et al, 1999). Han sido extensamente utilizados en estudios poblacionales proporcionando loci altamente polimórficos, que han permitido identificar estructura genética a fina escala (Cabranes et al, 2008).

Entre una gran variedad de marcadores genéticos, los microsatélites se consideran los más poderosos debido a su excepcional variabilidad y relativa facilidad para analizarlos (Goldstein y Pollock, 1997), por lo que proveen las bases para un mejor manejo de cualquier población y por consiguiente de pesquerías sustentables (Cabranes et al, 2008).

Para el análisis de los microsatélites es preciso amplificarlos por PCR, en consecuencia deben desarrollarse primers o cebadores del ADN que los flanquean. Estas regiones del ADN se encuentran entre las más variables en el genoma, por lo que los sitios de unión a los cebadores no suelen conservarse entre especies, lejana o moderadamente relacionadas (en Glenn y Schable, 2005). Muchas especies, entre ellas *O. maya*, no cuentan con cebadores de microsatélite a la fecha. Los microsatélites heterólogos que se han amplificado anteriormente en *O. maya* se consideran insuficientes para poder discriminar entre poblaciones (Juárez et al, 2010). Por lo tanto es necesario desarrollar y analizar una mayor cantidad de loci para identificar las unidades de pesca sin ambigüedad. Actualmente la estrategia predominante para el desarrollo de microsatélites es la captura vía hibridación, ya que permite la selección de fragmentos que contienen microsatélites antes de realizar la clonación de tales fragmentos (Glenn y Schable, 2005). La técnica de hibridación selectiva para el desarrollo de microsatélites se ha usado con éxito en anfibios, peces,

mamíferos, reptiles, insectos, nematodos, hongos, plantas y corales (Glenn y Schable, 2005).

El presente trabajo tiene el objetivo de desarrollar cebadores de microsatélites para *O. maya*, que serán útiles para conocer la estructura y diversidad genética de la especie lo cual constituye la base para el adecuado manejo de la pesquería.

Método.

Extracción y digestión del ADN.

Individuos de *O. maya* capturados en Sisal, Yucatán fueron utilizados para extraer el ADN siguiendo el Protocolo A (ver el apéndice de protocolos), utilizando fenol-cloroformo (1:1). Las extracciones se verificaron con una electroforesis en agarosa al 1%, por 30 minutos a 120V. Se cuantificó el ADN usando un espectrofotómetro Nanodrop®. Se eligió el ADN de dos individuos según la calidad y pureza del ADN obtenido, para hacer la digestión con enzimas de restricción.

Se utilizaron 20 µL de ADN a una concentración de 100 ng/µL para cortarlo con la enzima Rsa I, en una reacción compuesta por: 2.5 µL de 10x Ligase Buffer (NEB®), 0.25 µL 5M NaCl, 1 µL Rsa I 10u/µL (NEB®) y el ADN 100ng/µL. La reacción se llevó a cabo en un termociclador a 37°C por una hora.

Los fragmentos obtenidos de ambos individuos fueron combinados en un mismo tubo para usarlos en los pasos posteriores, aumentando así la variabilidad de los fragmentos en una misma muestra.

Ligación de fragmentos a los adaptadores

Los fragmentos fueron ligados a secuencias de enlace o “adaptadores” (SuperSNX24 Forward: 5'GTTTAAGGCCTAGCTAGCAGAATC

SuperSNX24+4P Reverse: 5'pGATTCTGCTAGCTAGGCCTTAAACAAAA), las cuales son secuencias complementarias. Inicialmente los adaptadores fueron unidos entre si para obtener secuencias de cadena doble y de esta manera poder ligarlas a los fragmentos de ADN. Para ello se mezclaron 100 μL de cada adaptador a una concentración de $10\mu\text{M}$ con 4 μL de 5M NaCl, para posteriormente calentar la mezcla a 95°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente por cinco minutos. La reacción de ligamiento tuvo la siguiente composición: 7 μL de la mezcla de secuencias de enlace (adaptadores), 1 μL de 10X Ligase Buffer (NEB®) y 2 μL del ADN digerido. La cual fue incubada a temperatura ambiente durante la noche.

Se realizó un PCR para observar si la reacción fue exitosa. La PCR consistió en (2.5 μL de 10X PCR Buffer (BioLine®), 1.3 μL de adaptadores a $10\mu\text{M}$, 1.5 μL de dNTP Mix $2.5\mu\text{M}$ (BioLine®), 2 μL de MgCl_2 $25\mu\text{M}$, 13 μL de dH_2O , 0.2 μL de Taq Polimerasa $5\text{u}/\mu\text{L}$ (BioLine®), y 2 μL de producto de la ligación bajo el siguiente programa: 95°C por 2 min. y 20 ciclos de 95°C por 20 seg., 60°C por 20 seg., 72°C por 1.5 min. Este programa y composición de PCR fue el mismo que se utilizó para verificar el enriquecimiento de las secuencias que contienen microsatélites.

Enriquecimiento de fragmentos con microsatélites vía hibridación selectiva.

Los fragmentos que contienen microsatélites fueron enriquecidos mediante el método de hibridación selectiva (Glenn y Schable, 2005) usando dos mezclas de oligonucleótidos biotinados: Mix 2 = $(\text{AG})_{12}$, $(\text{TG})_{12}$, $(\text{AAC})_6$, $(\text{AAG})_8$, $(\text{AAT})_{12}$, $(\text{ACT})_{12}$, $(\text{ATC})_8$; y Mix 4 = $(\text{AAAT})_8$, $(\text{AACT})_8$, $(\text{AAGT})_8$, $(\text{ACAT})_8$, $(\text{AGAT})_8$. Los fragmentos de ADN hibridados con los oligonucleótidos biotinados fueron

capturados selectivamente con streptavidina usando Dynabeads kilobase BINDER kit (DynaL Biotech®) siguiendo el protocolo del fabricante. El ADN hibridado fue recuperado del complejo biotina-streptavidina utilizando TRIS 10mM a 85°C por 3 minutos. Para verificar que el enriquecimiento de las secuencias fue exitoso, el producto del enriquecimiento fue usado en una PCR, usando el mismo programa y composición mencionados anteriormente, de igual manera utilizando los adaptadores como cebadores de la reacción.

Clonación de los fragmentos con microsatélites

Los fragmentos enriquecidos fueron ligados a un vector usando el kit de clonación TOPO – TA Cloning Kit® (Invitrogen®), según las especificaciones del proveedor.

Los vectores con inserto, fueron utilizados para transformar células competentes TOP 10 cells Invitrogen® (catálogo K4500-40), en medio de cultivo LB – Amp (50µg/mL). Las clonas positivas se seleccionaron de las genotecas obtenidas, tomando las colonias directamente de la caja y colocándolas en 50µL de agua bidestilada. Estas colonias fueron sometidas a 95°C por 15 minutos para provocar lisis celular y liberar el ADN. De cada colonia se utilizaron 2µL en PCRs compuestas por: 2 µL 10X PCR Buffer (BioLine®), 1 µL de MgCl₂ 50mM (BioLine®), 1 µL de M13reverse primer (Invitrogen®), 1 µL de M13forward primer (Invitrogen®), 0.4 µL dNTP Mix 10mM (BioLine®), 0.08 µL Taq polimerasa 5u/µL (BioLine®), 12.52 µL de H₂O (Sigma®), para un volumen final de 20 µL, bajo el siguiente programa de amplificación: 95°C por 3 min.; luego, 35 ciclos a 95°C por 20 seg., 50°C por 20 seg., 72°C por 1.5 min.

Secuenciación de los fragmentos con microsatélites.

Para estandarizar la reacción de secuenciación, fueron seleccionados 16 insertos. Se eligieron los fragmentos de mayor tamaño y los productos con mayor concentración.

Los productos fueron limpiados usando 0.5 μL de la exonucleasa Exo I 10u/ μL (Amersham Biosciences®), 1 μL de fosfatasa alcalina de camarón SAP 1u/ μL (Amersham Biosciences®), y 3.1 μL de H_2O , para 20 μL de producto PCR. La reacción se incubó en un termociclador a 37°C por 1 hora.

Posteriormente la presencia de los productos fue verificada en un gel de agarosa al 1% y su concentración cuantificada utilizando un espectrofotómetro (Nanodrop®).

Posteriormente se realizaron las reacciones de secuenciación para cada uno de los insertos. Cada reacción consistió en: 0.25 μL de Big Dye Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems®), 3.75 μL de 5X Sequencing Buffer (Applied Biosystems®), 1 μL de T7primer (Invitrogen), 4 μL de H_2O y 1 μL de inserto, bajo el siguiente programa de temperaturas: 96°C por 1 min, 96°C por 10seg., 50°C por 5 seg., y 60°C por 4 min.

El protocolo de limpieza con isopropanol se utilizó en cada muestra, que posteriormente fueron resuspendidas en 10 μL de Hi-Di Formamida (Applied Biosystems®).

La determinación de las secuencias se llevó a cabo en un secuenciador automático ABI3500® (Hitachi®), y mediante el servicio de secuenciación comercial (Macrogen Inc., Corea).

Estandarización de la amplificación de los microsatélites.

Los cebadores requeridos para la posterior amplificación de los microsatélites se diseñaron a partir de las secuencias obtenidas, mediante el programa en línea Primer 3 (Rozen y Skaletsky, 2000). El ADN de dos individuos fue tomado al azar de la muestra total y con estos se llevaron a cabo las PCR usando los cebadores diseñados para la amplificación de los microsatélites. Se probaron 28 pares de cebadores, se realizaron PCRs en gradiente de temperatura (de 40 a 60°C), así como de cloruro de magnesio (de 1 a 3mM) con el fin de optimizar las condiciones de amplificación para cada locus. Las reacciones consistieron en: 4µL de ADN genómico 10ng/µL, 1 µL de 10X PCR buffer (BioLine), 1µL de cebador Forward 10pM, 1µL cebador Reverse 10pM, 0.1µL de dNTP Mix 10mM (BioLine), 0.04µL de Taq polimerasa 5u/µL (BioLine), se ajustó la concentración óptima de cloruro de magnesio para cada locus con agua H₂O grado biología molecular para un volumen final de 10µL. Las reacciones se llevaron a cabo bajo el siguiente programa de amplificación: 94°C por tres minutos, seguido por 35 ciclos que consistieron en 93°C por 30 segundos, la temperatura óptima identificada para cada loci por un minuto y 72°C por 30 segundos, se añadió un paso de extensión a 72°C por 15 minutos. Se seleccionaron 10 loci para genotipar a los individuos que conforman la muestra obtenida de *O. maya*, en base a la presencia, limpieza y nitidez de los productos observados en geles de agarosa al 2%, tras una electroforesis de 45 minutos a un voltaje de 100V. Finalmente se eligieron aleatoriamente 8 individuos del total de la muestra, para evaluar el nivel de polimorfismo de los microsatélites obtenidos. Se amplificaron los microsatélites seleccionados en cada uno de los ocho individuos utilizando el programa de PCR antes mencionado, así como las temperaturas y las concentraciones óptimas de

MgCl₂ identificadas para cada loci. Los productos se observaron en geles de agarosa al 2% bajo las condiciones de electroforesis anteriormente mencionadas.

Resultados

Mediante el protocolo de extracción utilizado fue posible obtener ADN genómico de buena calidad y de pureza adecuada (Figura 1). El ADN fue digerido exitosamente mediante la enzima RSA I, (Figura 2). Los fragmentos obtenidos fueron unidos exitosamente a las secuencias de enlace o adaptadores (Figura 3).

El enriquecimiento de las secuencias que contienen microsatélites mediante la hibridación selectiva permitió recuperar fragmentos con microsatélites tanto en la mezcla de oligonucleótidos "Mix2" así como en "Mix4" (Figura 4).

El ligamiento de los fragmentos con microsatélites a los plásmidos así como la transformación de las bacterias fue eficiente permitiendo la clonación efectiva de los insertos. Se observaron en su mayoría genotecas con sólo clones positivas (sin colonias azules) indicando que el inserto estuvo presente en todas las colonias. Un total de 144 colonias de la genoteca resultante fueron examinadas via PCR para verificar la presencia del inserto (Figura 5).

Los insertos fueron limpiados y secuenciados (Figura 6). Se obtuvieron las secuencias de 73 insertos, de las cuales 51 presentaron microsatélites, 39 de éstas incluyen regiones flanqueantes que permitieron el diseño de cebadores específicos. A partir de 28 pares de cebadores verificados, se lograron amplificar 20 microsatélites, tras obtener las condiciones óptimas para la amplificación de los mismos. Resultaron polimórficos 11 loci y 9 fueron

monomórficos. Fueron estandarizadas correctamente las reacciones de amplificación y secuenciación de 10 microsatélites. Estos loci mostraron alelos claramente identificables tras su análisis en el secuenciador (Tabla 1).

Discusión

Los cebadores de microsatélite obtenidos son los primeros desarrollados específicamente para *O. maya*, por lo que resultan de gran utilidad para examinar la variabilidad genética de la población con fines de optimizar su manejo. Los microsatélites específicos han resultado informativos respecto a los índices y patrones de variabilidad genética de poblaciones silvestres en diversas especies (Shaw et al, 1999; Avise, 2004; Templeton, 2007).

Fueron aislados principalmente microsatélites conformados por tetra nucleótidos, a diferencia de estudios con otras especies de *Octopus* como *O. vulgaris* y *O. maorum* donde se amplificaron en mayor proporción di nucleótidos y tri nucleótidos (Greatorex et al, 2000; Doubleday et al, 2009).

La cantidad de microsatélites polimórficos para el genotipado de la población de *O. maya* obtenida en este estudio, es mayor al número de loci analizados anteriormente (Juárez et al, 2010), incrementando las herramientas disponibles para el análisis de su variabilidad genética, contribuyendo así en el manejo y conservación de la especie. Analizando 144 clonas fue posible obtener mayor cantidad de loci útiles que en *O. vulgaris* (Greatorex et al, 2000) donde fueron obtenidos 6 microsatélites tras analizar 3500 clonas, sin enriquecimiento previo. También fueron obtenidos más loci que en *O. maorum* (Doubleday et al, 2009) donde se analizaron 175 clonas de genotecas enriquecidas y fueron estandarizadas las condiciones de amplificación de 5 microsatélites. Los resultados obtenidos concuerdan con los de Guillemaud et al. (2000), en el pez

Coris julis, donde a partir genotecas enriquecidas, se analizaron 80 clonas y se estandarizaron 10 microsatélites polimórficos, de los cuales 8 fueron útiles al no presentar problemas de genotipado. La eficiencia similar en el aislamiento de los microsatélites en ambos estudios, aún cuando son especies evolutivamente distantes, sugiere que tal eficiencia radica en el método más que en el tipo de organismo estudiado. El enriquecimiento de fragmentos con microsatélites ha resultado una estrategia práctica ya que deben examinarse relativamente pocas colonias en comparación a otras metodologías que no incluyen enriquecimiento. Esta estrategia resulta en menos tiempo invertido en el análisis de colonias. Por otro lado, las estrategias que no incluyen enriquecimiento previo a la clonación requieren examinar miles de colonias (Behergaray y Sunnucks, 2000) para obtener la misma cantidad, o incluso menos microsatélites polimórficos útiles.

Conclusión.

Se determinaron las condiciones de amplificación de 11 loci polimórficos de microsatélites específicos para *O. maya*. Estos loci fueron obtenidos tras analizar un total de 144 clonas y secuenciar 73 insertos durante su desarrollo. Un total de 51 secuencias mostraron microsatélites, de los cuales 39 incluyeron las secuencias flanqueantes que permitieron el diseño de los cebadores. Los marcadores obtenidos permiten la aplicación de estadígrafos que podrían coadyuvar en el manejo de la pesquería de esta especie. Son útiles para estimar índices precisos de variabilidad genética y estructura poblacional. Además representan una herramienta útil para estudios de paternidad y heredabilidad en esta especie, con aplicación en su cultivo.

Este trabajo así como estudios anteriores (Greatorex et al, 2000; Behergaray y Sunnucks, 2000; Zane et al, 2002; Doubleday et al, 2009) muestran que el enriquecimiento de fragmentos con microsatélites previo a la clonación, resulta en el análisis de menos clonas que en otras técnicas para el asilamiento de microsatélites, ilustrando la practicidad de ésta estrategia.

Tabla 1

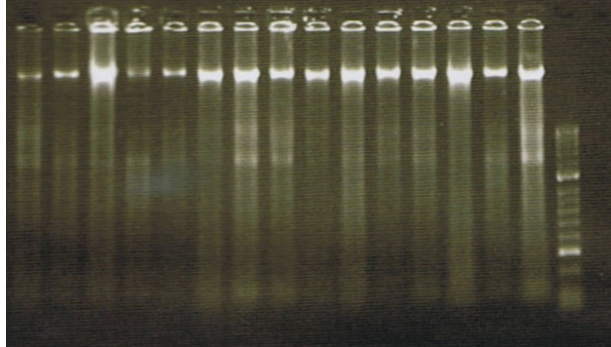
Condiciones de amplificación de los loci estandarizados.

Loci	Repetición	Temp.	MgCl ₂ conc.	Tamaño de alelo	Número de alelos	Cebadores
O2-02	GT x 17	60	1.5mM	209-251	21	F-CTATAGCCTCAGGCCAACCA R-TAAATGGCGATTGTGGAACC
O2-07	GAT x 18	60	1.5mM	181-208	9	F- ATCAGTCAAACCGTCCAACC R- CGGAACATTGTTTCTCATTCA
O2-27	GT x 21	40	1.5mM	254-274	10	F-GCAGAGAGCTTCCATTTTGG R-CATCCACGTTCTGTGTGGAG
O2-37	ATG x 18	60	1.5mM	136-175	13	F-GGCCAACTCTCTGTCAAACC R-GGACAATCTCCCAAACAACC
O4-01	TATG x 9, TATC x 8	60	1mM	207-263	14	F-CGCTCGCACACTACACAGAC R-CCCTCTATGTTTAGCCCCTTG
O4-10	TAGA x 9, TAGA x 14	62	2mM	*	*	F-CTCCTTTTAACGGGTGTTGG R-CTATGTTGAGCCCTGTGTGG
O4-11	GT x 10, GA x 6	60	1.5mM	240-258	9	F-TAAACTGCCGACCCTTTGAC R-AAGATGGGGGCAAAGAATG
O4-18	ATGT x 9	60	1.5mM	140-194	11	F-TCCGGGAGCATATTTCTTTG R-AGTTCCCTCTCCAGACGATG
O4-20	GATA x 18	56.8	1.5mM	184-244	15	F-CGTGAATCATCGAAAAAGACTG R-ACTCACTCTCCGCACAGGTC
O4-29	TACA x 10, TACA x 13	56.8,60	1.5mM	227-251	6	F-GGTCGCATGCTCACACATAC R-ACAGCCAGGCACTTATCAGC
O4-40	CATA x 14	56.8	1.5mM	165-209	11	F-CTTTGATTCCCCACCTACC R-CGGACGTAAAACAAAATGAGC

*Los productos del locus O4-10 presentan un patrón de varias bandas que dificulta la identificación de los alelos. El resto de los loci muestran alelos de fácil identificación.

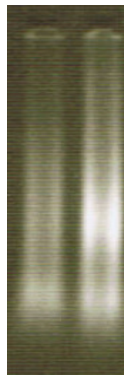
Figuras

Figura 1. Extracciones de ADN de *Octopus maya*, utilizando fenol-cloroformo.



Este método permite extraer ADN altamente concentrado, libre de contaminación.

Figura 2. Digestión de ADN genómico de dos ejemplares de *Octopus maya*, usando la enzima Rsa I (cada carril muestra un ejemplar distinto).



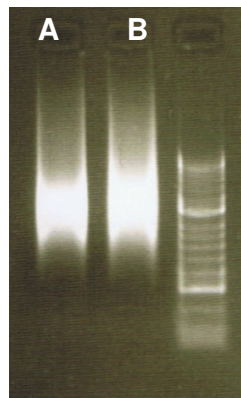
La digestión exitosa del ADN es el primer paso para la selección de fragmentos que contienen microsatélites

Figura 3. Productos PCR de fragmentos ligados exitosamente a los las secuencias de enlace (cada carril corresponde a un ejemplar distinto).



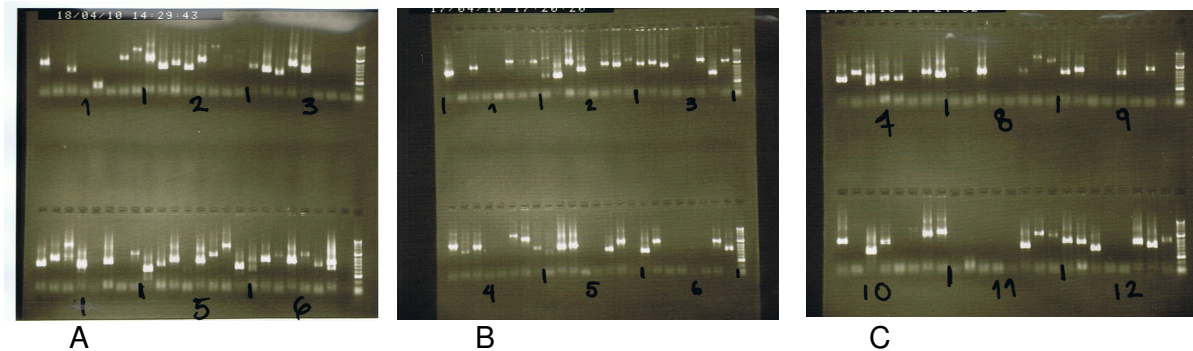
Las secuencias de enlace funcionan como cebadores a los fragmentos obtenidos, para recuperar aquellos que poseen microsatélites durante el enriquecimiento.

Figura 4. Productos PCR del ADN enriquecido con microsatélites, los carriles corresponden a distintas mezclas de oligonucleótidos.



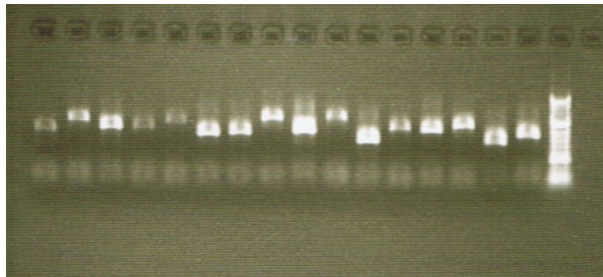
A: "Mix2", B: "Mix4". Ambas mezclas de oligonucleótidos biotinados fueron eficientes en la hibridación selectiva, por lo que se obtuvo una alta concentración de fragmentos con microsatélites en ambos casos, y están listos para su posterior clonación.

Figura 5. Productos PCR de las clonas positivas examinadas en las distintas genotecas



A. genoteca “Mix2”, B. genoteca “Mix4-1”, C. genoteca “Mix4-2”. Los productos indican la presencia de insertos en las clonas examinadas, lo que corresponde a la correcta clonación de los fragmentos con microsatélite.

Figura 6. Insertos seleccionados para estandarizar la secuenciación.



Productos PCR de los insertos de distintas clonas, cada carril corresponde a distintos fragmentos que contiene microsatélites, que fueron limpiados para posteriormente estandarizar la reacción de secuenciación.

Capítulo 2.

Identificación de las unidades de pesca de *Octopus maya*, utilizando microsatélites específicos.

Introducción.

El pulpo cuatro ojos mexicano, *Octopus maya*, es una especie endémica de la península de Yucatán. A nivel regional *O. maya* es la principal especie de la pesquería del pulpo. Recientemente su importancia como recurso pesquero ha aumentado, lo cual se refleja en el crecimiento de su producción en los últimos diez años (SAGARPA-CONAPESCA, 2009). Representa un valioso recurso económico tanto para las comunidades pesqueras así como para las empresas que suministran los mercados nacionales e internacionales. Se calcula que su producción genera aproximadamente 360 millones de pesos anuales (INAPESCA, 2010). Históricamente se ha considerado que la especie consta de una sola población homogénea, y se ha manejado como una unidad de pesca porque no se han identificado poblaciones divergentes.

Aunque la producción se ha incrementado, la biomasa del recurso ha sido fluctuante con una tendencia a la baja. En 2002 se estimó una biomasa de 22.737 t; en 2004 se estimaron 25.944 t, en 2007 fueron 20.753t y en 2008 fue de 16.219 t. Se ha observado también que la cuota establecida anual de captura ha variado entre 44% y 50% de la biomasa estimada. Sin embargo, las capturas reales han variado entre 30% y 76% de la biomasa estimada. Resulta por lo tanto relevante conocer si una captura del 76% de la biomasa estimada ha afectado negativamente a la variabilidad genética de la especie.

Ante la alta variabilidad observada en la producción de *O. maya* a lo largo de su ámbito de distribución (INAPESCA, 2002, 2004, 2007, 2008, 2010) y las

diferencias en la talla de los ejemplares capturados en distintas localidades, reportadas por los pescadores a lo largo de la península (González y de la Rosa et al, 1998), surge la hipótesis de que la especie presenta más de una población. Es por tanto necesaria una revisión a nivel genético de su situación actual. Esto permitirá verificar la existencia de distintas unidades de pesca, y optimizar la gestión pesquera.

La disminución de la población por excesos en la explotación pesquera puede tener enormes implicaciones socioeconómicas negativas. Adicionalmente el conjunto de alelos de la especie está restringido a los individuos que habitan la península, debido a su endemismo. En este contexto, la administración de la pesquería debe considerar que la sostenibilidad de la población está estrechamente vinculada a su variabilidad genética (Awise, 2004). Otro punto a verificar mediante el análisis de la heterocigosis de la población es el supuesto de que la pesquería de *O. maya* se encuentra sobreexplotada (Norman, 2003).

En las especies marinas, los procesos demográficos y la productividad de las pesquerías pueden variar considerablemente entre poblaciones las cuales constituyen las unidades de manejo. Comprender la estructura genética de la población proporciona información sobre los patrones de la conectividad y el aislamiento entre las poblaciones, (Utter, 1991; Pierce y Guerra, 1994; en Maltagliati et al, 2002) para identificar las poblaciones de carácter genético único, así como las poblaciones en mayor riesgo de extinción (Awise, 2004). Esta información resulta fundamental para la gestión eficaz de una pesquería, proporciona una base para definir las unidades de manejo (Begg y Waldman, 1999, en Kassahn et al, 2003). La identificación de las unidades de manejo es

central para el aprovechamiento de las poblaciones naturales y es crucial para el monitoreo de los efectos de las actividades humanas sobre la abundancia de las especies (Palsbøll et al, 2006). Para propósitos de las pesquerías se recomienda que en su identificación se utilicen marcadores heredables (Begg et al, 1999). Como hemos descrito en el primer capítulo de este documento, los microsatélites son muy útiles para hacer estudios a nivel de población e identificar las unidades de pesca.

Los estudios de variabilidad genética llevados a cabo utilizando aloenzimas no han identificado distintas unidades de pesca a lo largo del área de distribución de esta especie (Tello et al, 2007). Posteriormente se identificaron dos loci de microsatélites heterólogos que mostraron diferencias significativas entre pulpos provenientes de Seybaplaya al sur de Campeche y de El Cuyo, en la punta Oriente de Yucatán (Juárez, 2010). Tal estudio mostró que las diferencias entre las localidades muestreadas no fueron significativas. No obstante se utilizaron solo cuatro microsatélites y se consideraron insuficientes para identificar las diferencias poblacionales.

Mediante el uso de microsatélites específicos ha sido posible identificar unidades de pesca, en diversas especies de cefalópodos (Shaw et al, 1999; Pérez – Losada et al, 2002), aún en ausencia de barreras físicas o hidrológicas evidentes (Buresch et al, 2006). Tomando en cuenta lo anterior en este estudio se profundizará el monitoreo de la variabilidad genética a mayor escala espacial, utilizando microsatélites polimórficos específicos para esta especie.

Objetivo.

Identificar unidades de pesca de *Octopus maya*, mediante el análisis de la variabilidad genética mostrada por microsatélites específicos.

Método.

Recolecta de ejemplares.

Fueron capturados 40 ejemplares de *O. maya* en cada uno de los puertos de Sabancuy, Campeche, Sisal, Dzilam y 26 ejemplares de Río Lagartos en la Península de Yucatán (Figura 1), durante la temporada de pesca de 2010. La captura se realizó mediante la técnica artesanal de gareteo y se tomó una porción de brazo de cada pulpo, los cuales posteriormente fueron regresados vivos al mar.

Extracción de ADN y cuantificación

A partir de las porciones de brazo de los ejemplares capturados, se procedió a la extracción del ADN vía sales, siguiendo el Protocolo B (en apéndice de protocolos). Las extracciones se verificaron con una electroforesis en agarosa al 1%, por 30 minutos a 120V. La cuantificación del ADN se llevo a cabo utilizando un espectrofotómetro Nanodrop®. En base a la concentración de cada extracción de ADN se realizó una alícuota de cada muestra a una concentración aproximada de 10 ng/μL, para ser utilizadas en las reacciones de PCR.

Genotipado de la población de *O. maya*.

Los microsatélites de cada ejemplar fueron amplificados en reacciones PCR en un volumen de 12.5μL, que contienen 0.125μL de TRIS-HCL 1M, 1.25 μL de KCL 500mM, 0.375μL de MgCl₂ 50mM (para una concentración final de

1.5mM), 0.19 μ L de dNTPs 10mM (Promega®), 1.1 μ L de Taq polimerasa 5u/ μ L (BioLine®), 6.71 μ L de H₂O, 0.375 μ L de cebador Forward 20pM, 0.375 μ L de cebador Reverse 20pM para cada microsatélite y 2 μ L de ADN genómico 10ng/ μ L de cada pulpo en cada reacción; bajo el siguiente programa de amplificación: 94°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos a 93°C por 30 segundos, la temperatura de alineamiento óptima de cada loci por un minuto y 72°C por 30 segundos, seguido por un ciclo final de extensión a 72°C por 15 minutos. Se utilizaron cebadores fluorescentes, lo que permite la identificación de los alelos mediante un secuenciador. Se modificó la concentración de MgCl₂, según la concentración óptima para cada microsatélite. Finalmente el producto de las reacciones de PCR fueron genotipados, utilizando un servicio de secuenciación comercial. Se utilizó el software GeneMarker®, para la visualización de los alelos de cada individuo, los alelos fueron determinados a ojo y se creó una base de datos para su posterior análisis estadístico.

Control de calidad

Se realizaron repeticiones de las reacciones para un individuo de cada localidad muestreada (controles positivos) para verificar que las reacciones fueron correctas y consistentes, además se realizaron reacciones sin agregar ADN (controles negativos) para verificar si existe algún reactivo contaminado. Los genotipos obtenidos se verificaron en busca de alelos nulos o errores de genotipado con el software Micro-Checker (Van Oosterhout et al, 2004).

Análisis de datos

La estructura genética de la muestra obtenida fue analizada a partir de los genotipos resultantes de la combinación de los ocho microsatélites, mediante los índices F_{st} , F_{is} y F_{it} a través de un AMOVA implementando 10000

permutaciones. El F_{st} de Slatkin fue calculado entre pares de localidades implementando 10000 permutaciones. El equilibrio de Hardy – Weinberg fue verificado para todas las localidades en conjunto implementando una cadena de Markov con 10000 pasos, así como el desequilibrio de ligamiento entre los loci utilizados y se calculó el número de migrantes entre las localidades muestreadas, estos cálculos fueron obtenidos mediante el software Arlequin 3.11. La diferenciación D_{st} entre los pares de localidades fue calculada mediante el software SMOGD (Crawford, 2010), a través de un bootstrap con 1000 repeticiones. Las distancias genéticas entre todos los pares de individuos, así como las distancias genéticas promedio entre pares de localidades, fueron obtenidas con el macro GENALEX (Peakall y Smouse, 2006) sobre una hoja de cálculo. El análisis de componentes principales fue realizado a partir de las matrices de distancia genética para observar cómo se distribuyen los individuos así como las localidades en base a su distancia genética.

Resultados

Fueron analizados 34 individuos de Campeche, 35 de Dzilam, 26 de Río Lagartos, 35 de Sabancuy y 36 de Sisal, los cuales no mostraron evidencia de alelos nulos o errores de genotipado en ninguno de los loci analizados.

El análisis del Equilibrio de H-W (Tabla 1) muestra que a nivel poblacional existen dos de ocho loci (O4-11 y O2-02) que muestran déficit de heterocigotos y por lo tanto se encuentran fuera del equilibrio de H-W. En el análisis de Desequilibrio de ligamiento (Tabla 2), solo dos de ocho loci (O4-20 y O2-18) muestran ligamiento significativo entre sí, por lo que el resto de los loci utilizados se estarían segregando de manera independiente.

El F_{st} global resultó no significativo, indicando que la estructura genética no es significativa, el F_{is} promedio así como el F_{it} resultaron positivos y significativos, indicando que a nivel global y local existe cierto grado de endogamia (Tabla 3). En la comparación entre las localidades, los mayores valores de D_{st} promedio, así como de la distancia genética de Nei (sin sesgo) se observan entre Río Lagartos y Sabancuy (Tabla 4), éstas son las localidades que presentan mayor distancia geográfica. El par Sisal – Campeche presentó el valor más alto de F_{st} (Tabla 5), aun cuando son localidades geográficamente cercanas, sin embargo los valores de p del F_{st} entre todos los pares de localidades resultaron no significativos, por lo que se considera que las localidades mantienen suficiente flujo genético entre ellas, de modo que constituyen una sola población.

El análisis de los loci por separado, el locus O4-01 presenta mayor diferenciación entre las localidades, en este locus Río Lagartos muestra diferencias significativas con el resto de las localidades (Tabla 6). Los valores de N_m (Tabla 7), el cual refleja el número de migrantes entre los pares de localidades, indican que el par Sisal - Campeche tiene el menor flujo génico entre las localidades, a pesar de su cercanía geográfica, sin embargo el número de migrantes es similar entre todas las localidades. La heterocigosis observada promedio (Tabla 8) es menor en Dzilam, y es mayor en Campeche y Río Lagartos. Este patrón de diversidad genética es similar al mostrado por los valores de F_{is} (Tabla 8) donde Dzilam presenta mayor endogamia, a diferencia de Campeche y Río Lagartos cuyos índices de endogamia son negativos.

El análisis de componentes principales muestra que las distancias genéticas individuales se mantienen en el mismo rango sin importar la localidad en la que fueron capturados los individuos (Figura 2). Los ejes principales en la figura 2,

constituyen el 50% de la variabilidad total. El análisis de componentes principales de las distancias genéticas promedio por localidad (Figura 3) acomoda a las localidades con una distribución distinta a la de su ubicación geográfica. Los ejes representados en la figura 3, constituyen el 80% de la variabilidad total.

Discusión

El análisis de los ocho microsatélites en conjunto muestra que no hay diferencias significativas entre las localidades, indicando que el flujo génico entre todas las localidades en general ha sido alto en tiempos evolutivos. Los valores de diferenciación, distancia genética y número de migrantes observados sugieren que los pulpos mantienen un flujo genético mayor entre los pares de localidades Sabancuy-Campeche y Sisal-Dzilam. Por otro lado el par Sabancuy-Río Lagartos presentó la mayor distancia genética, así como el menor flujo génico. Estas son las localidades más distantes en este estudio, coincidiendo con Juárez, et al. (2010) donde también las localidades más distantes (Seybaplaya y El Cuyo) fueron las más divergentes genéticamente. El análisis de componentes principales de la distancia genética individual muestra que los pulpos dentro de las localidades presentan distancias genéticas relativamente grandes, similares a las distancias que muestran respecto a individuos de otras localidades. Esto sugiere que las diferencias ocurren principalmente dentro de las localidades y no entre ellas. Tales resultados podrían estar relacionados con el hecho de que las hembras pueden ser fecundadas por varios machos (Dr. Carlos Rosas, comunicación personal). La paternidad múltiple en *O. maya* posiblemente incrementa tanto la variabilidad

como las distancias genéticas de la progenie de una misma hembra cuando es fecundada por machos que provienen de distintas localidades.

A la luz de estos resultados, el sistema de apareamiento podría seguir un modelo donde los individuos de “x” localidad se reproducen con los individuos locales y además con los de su localidad contigua principalmente, donde los alelos se transfieren de una localidad a otra de manera encadenada, con las distintas localidades formando los eslabones de esta cadena.

Considerando que las distancias genéticas promedio entre las localidades no concuerdan exactamente con sus distancias geográficas; que hay variaciones espaciales en la heterocigosis, que la temperatura más favorable para la reproducción de la especie está alrededor de los 26°C y que esta especie no es capaz de regular su temperatura corporal (Rosas et al, 2006); surge la hipótesis sobre un posible un patrón migratorio delineado por el cambio en la temperatura oceánica sobre la plataforma continental de la península de Yucatán, principalmente en la época reproductiva. Tal migración hacia posibles zonas reproductivas, sería fundamental para el mantenimiento de la unidad genética de la población, favoreciendo la conectividad entre las localidades. El Apéndice de temperaturas superficiales del Golfo de México muestra la variación de las temperaturas durante el 2010. En diciembre cuando comienza la veda, con el fin de proteger el principal evento reproductivo de la especie, hay un descenso general de la temperatura sobre la plataforma continental de la península de Yucatán, donde la temperatura óptima para la reproducción de *O. maya* se restringe a la zona que abarca las localidades de Sabancuy, Campeche y Sisal, y a una segunda zona hacía la punta Oriente de la Península que se ubica cerca de Río Lagartos (Figura 1). Campeche y Río

Lagartos presentaron los valores más altos de heterocigosis, y no mostraron endogamia. Tales localidades presentan la temperatura óptima para la reproducción en sincronía con tal etapa dentro del ciclo de vida de la especie, por lo que podrían representar zonas reproductivas.

Los resultados de la estructura genética son similares a los obtenidos anteriormente en esta especie utilizando microsatélites heterólogos (Juárez et al, 2010). Ambos estudios presentaron locus aislados que muestran estructura significativa, pero ninguno demostró estructura significativa al analizar los loci en conjunto. Los niveles de heterocigosis (0.50-0.88) concuerdan con estudios previos en *O. maya* (Juárez et al, 2010) y *O. vulgaris* (Casu et al, 2002).

Es importante para el futuro manejo de la pesquería tomar en cuenta la presencia de dos loci fuera del equilibrio de H-W por déficit de heterocigotos, y los valores significativos de endogamia tanto local como a nivel poblacional.

Tanto la presencia de loci con déficit de heterocigotos como la endogamia significativa ya habían sido reportados anteriormente en esta especie (Juárez et al, 2010). El déficit de heterocigotos representa una variabilidad genética reducida con respecto a una situación de equilibrio (Avise, 2004). Diversos estudios muestran que una reducción en los niveles de heterocigosis se correlaciona con una reducción en componentes de la adecuación de los organismos, tales como sobrevivencia, crecimiento, fecundidad y desarrollo estable. En general, las poblaciones con baja variabilidad genética son más susceptibles a enfermedades infecciosas y agentes parasíticos (Avise, 2004).

Con base en lo anterior, los resultados de variabilidad genética obtenidos pueden ser indicios de que el estado actual de la pesquería no es el óptimo.

Una de las principales causas de una variabilidad genética reducida es la

endogamia (Templeton, 2006). Dzilam contribuye a la endogamia global en mayor medida que el resto de las localidades, sugiriendo que en tal localidad existe menor número de reproductores y/o la explotación comercial ha sido mayor ahí. En general, las capturas han sido mayores a las recomendadas para fines de conservación (Jurado-Molina, 2010). Adicionalmente los eventos de marea roja podrían afectar negativamente la variabilidad genética, al reducir rápidamente el número de efectivo de la población. En 2008 se desarrolló una marea roja en la península de Yucatán durante el periodo de veda del recurso. En tal año se obtuvo la producción mínima de los últimos años (5,800 toneladas en Yucatán).

Por otro lado, tanto el déficit de heterocigotos en dos loci, así como la endogamia promedio significativa a nivel poblacional, pudieron ser afectados por diversos factores ambientales desde tiempos antiguos, en el pasado evolutivo de la población. En este sentido, resulta relevante conocer la historia evolutiva de la población, estimar su variabilidad genética en el pasado evolutivo, y compararla con la variabilidad genética actual. Estos datos aportarían información para saber si la actividad humana ha afectado negativamente a la variabilidad de la especie.

En cuanto al manejo de la pesquería se recomienda que deba procurarse la conservación de la especie, favoreciendo su variabilidad genética. Para lograr tal meta, se ha recomendado promover el mantenimiento de corredores en el hábitat que faciliten la dispersión natural y el flujo génico entre las localidades que constituyen la población (Simberloff et al, 1992) para evitar extinciones locales. También se recomienda el monitoreo continuo de la abundancia, índices de endogamia y variabilidad genética (Schwartz et al, 2006) en las

distintas localidades dónde se captura la especie. El monitoreo genético ofrece una gran oportunidad para examinar las poblaciones a través del tiempo para determinar cuándo alcanzan los umbrales críticos que demandan acciones de manejo (Schwartz et al, 2006).

Ante la discusión aquí generada, otro punto a considerar para el futuro manejo de la pesquería es conocer en qué medida los cambios en la temperatura del océano estarían afectando los patrones de distribución, de abundancia local y posible migración entre las localidades, para resolver cuestiones en relación a los riesgos existentes para la especie en caso de un gradual calentamiento del océano en el futuro cercano.

Conclusión

Se considera que la pesquería de *O. maya* consta de una sola unidad de manejo, que abarca toda la Península de Yucatán, debido a que no se observaron diferencias significativas entre las localidades muestreadas. Estos resultados indican que todas las localidades muestreadas han mantenido cierto flujo genético en tiempos evolutivos. Esto concuerda con los resultados obtenidos en esta especie utilizando microsatélites heterólogos (Juárez et al, 2010).

Por otro lado, la presencia de endogamia y déficit de heterocigotos en ciertos loci podría ser indicio de que el manejo de la pesquería no es el óptimo. Dado que la endogamia tiende a reducir la adecuación de las poblaciones naturales (Hedrick, 2001; Avise, 2004) es importante darle un monitoreo con estudios más robustos que incluyan más ejemplares y tomar medidas necesarias para evitarla.

El futuro enfoque del manejo de la pesquería requiere preservar la variabilidad genética para la conservación del recurso, además de monitorear a largo plazo los índices de endogamia y la heterocigosis dentro de las localidades. También se recomienda la preservación del hábitat para favorecer la conectividad y el flujo génico entre las localidades. El manejo a largo plazo debe considerar la historia evolutiva de la población para conocer si otros factores, anteriores y ajenos a la explotación comercial, han afectado negativamente a su variabilidad genética.

Tablas

Tabla 1. Equilibrio de Hardy – Weinberg, para todas las localidades en conjunto.

Locus	Obs. Het.	Exp. Het.	<i>p-value</i>	s.d.	Steps done
O2-18	0.53988	0.50263	0.36663	0.00166	10100
O4-20	0.85625	0.88676	0.82782	0.00193	10100
O4-11	0.66667	0.68132	0.00495	0.00055	10100
O2-02	0.79730	0.85394	0.00000	0.00000	10100
O2-37	0.73743	0.78574	0.36010	0.00181	10100
O2-07	0.56111	0.57409	0.72703	0.00183	10100
O4-40	0.86420	0.84914	0.05287	0.00111	10100
O4-01	0.74691	0.79928	0.14772	0.00207	10100

Los loci O4-11, O2-02, muestran déficit significativo de heterocigotos, mientras que el resto de los loci se encuentran en equilibrio H-W.

Tabla 2. Desequilibrio de ligamiento entre los loci analizados. Tabla de valores significativos (nivel de significancia 0.050)

Locus	O2-18	O4-20	O4-11	O2-02	O2-37	O2-07	O4-40	O4-01
O2-18		+	-	-	-	-	-	-
O4-20	+		-	-	-	-	-	-
O4-11	-	-		-	-	-	-	-
O2-02	-	-	-		-	-	-	-
O2-37	-	-	-	-		-	-	-
O2-07	-	-	-	-	-		-	-
O4-40	-	-	-	-	-	-		-
O4-01	-	-	-	-	-	-	-	

Los signos (+) indican valores de ligamiento significativo. Únicamente los loci O4-20 y O2-18 se encuentran significativamente ligados, se considera que el resto de los loci se segregan independientemente.

Tabla 3. Índices de Fijación promedio (AMOVA locus por locus)

Índice	<i>p-value</i>
$F_{is} = 0.02353$	0.04583
$F_{st} = 0.00296$	0.99940
$F_{it} = 0.02642$	0.03849

F_{is} como el F_{it} resultaron positivos significativos, mientras que el F_{st} entre las localidades no fue significativo.

Tabla 2. Comparación entre localidades: Diferenciación (D_{st}) promedio sobre la diagonal, Distancia Genética de Nei (unbiased) bajo la diagonal.

	Campeche	Dzilam	Río Lagartos	Sabancuy	Sisal
Campeche	--	0.01668	0.02151	0.00837	0.02781
Dzilam	0.01120	--	0.01988	0.02246	0.00985
Río Lagartos	0.01136	0.01108	--	0.03923	0.03409
Sabancuy	0.00000	0.01788	0.01968	--	0.02020
Sisal	0.01623	0.00530	0.01695	0.00823	--

La mayor diferenciación (D_{st}), así como la mayor distancia genética la muestra el par Río Lagartos – Sabancuy, que son las localidades que se encuentran a mayor distancia geográfica.

Tabla 3. F_{st} : Valores de F_{st} sobre la diagonal, valores de p bajo la diagonal

	Campeche	Dzilam	Río Lagartos	Sabancuy	Sisal
Campeche	--	0.00133	0.00511	0.00098	0.00624
Dzilam	0.33644	--	0.00067	0.00366	0
Río Lagartos	0.09304	0.43721	--	0.00526	0.00541
Sabancuy	0.35846	0.22714	0.12121	--	0.00258
Sisal	0.05614	0.53065	0.10097	0.23805	--

La mayor diferencia en los índices de Fijación lo muestra el par Sisal – Campeche. Las diferencias en los Índices de Fijación entre las localidades no son significativas.

Tabla 4. F_{st} locus O4-01 únicamente, valores de p .

	Campeche	Dzilam	Río Lagartos	Sabancuy	Sisal
Campeche	--				
Dzilam	0.66241	--			
Río Lagartos	0.02396	0.02762	--		
Sabancuy	0.11850	0.10930	0.00010	--	
Sisal	0.86566	0.41045	0.03564	0.05267	--

El locus O4-01 mostró mayores valores de diferenciación con respecto al resto de los loci y además muestra diferencias significativas entre Río Lagartos y las demás localidades.

Tabla 5. Valores de Nm

	Campeche	Dzilam	Río Lagartos	Sabancuy	Sisal
Campeche	--				
Dzilam	25.783	--			
Río Lagartos	21.078	25.669	--		
Sabancuy	28.597	24.486	22.548	--	
Sisal	20.661	31.469	21.717	28.529	--

Los valores de migración son muy similares entre todas las localidades sin importar sus distancias geográficas.

Tabla 6. Heterocigosis Observada promedio y F_{is} promedio por localidad

	Sabancuy	Campeche	Sisal	Dzilam	Río Lagartos
Het. Obs.	0.718	0.746	0.712	0.684	0.749
F_{is}	0.035865	-0.028325	0.0232425	0.07125375	-0.0099925

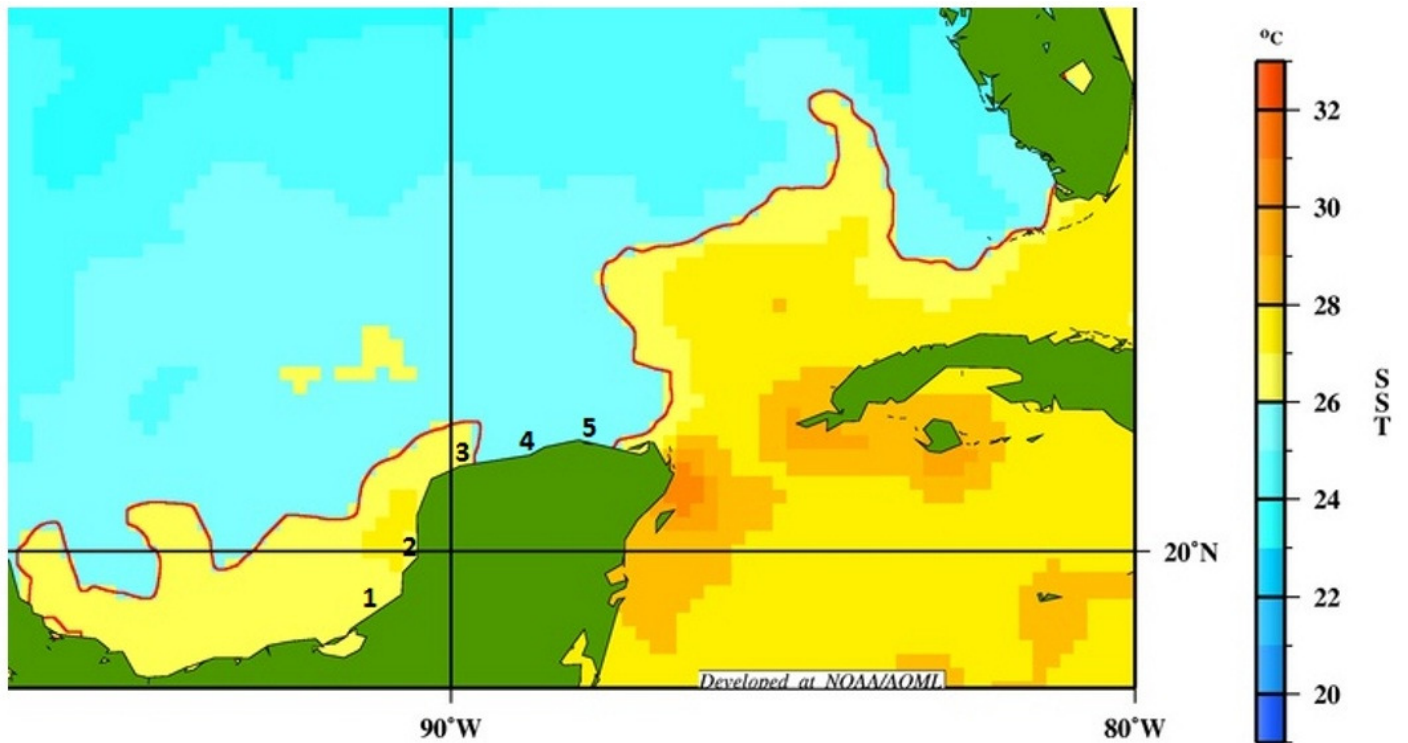
La menor heterocigosis se observa en Dzilam, en donde el F_{is} resultó mayor.

Los mayores valores de heterocigosis se observan en Campeche y Río

Lagartos, las cuales presentan valores negativos de F_{is} .

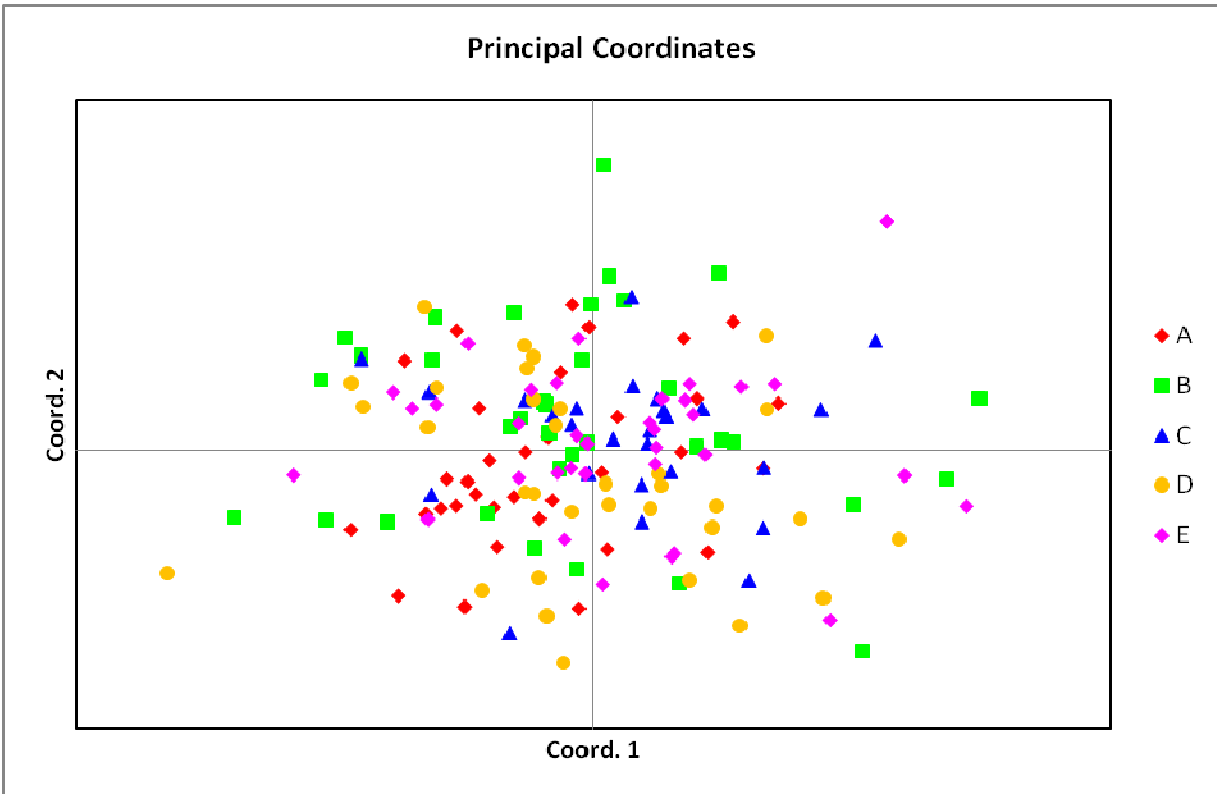
Figuras

Figura 1. Localidades muestreadas y temperatura superficial del Golfo de México en diciembre



En diciembre da inicio la veda de *Octopus maya*, lo que corresponde a la principal época reproductiva de esta especie. 1) Sabancuy, 2) Campeche, 3) Sisal, 4) Dzilam, 5) Río Lagartos.

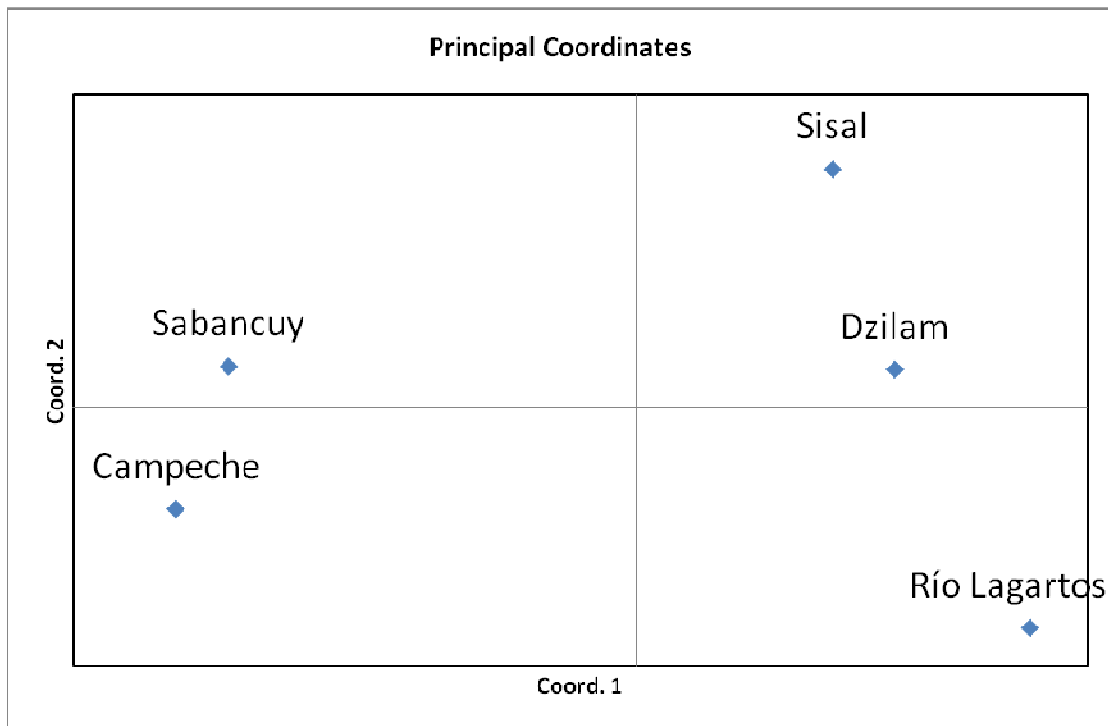
Figura 2. Análisis de componentes principales, de distancias genéticas multilocus individuales.



A) Campeche, B) Dzilam, C) Río Lagartos, D) Sabancuy, E) Sisal.

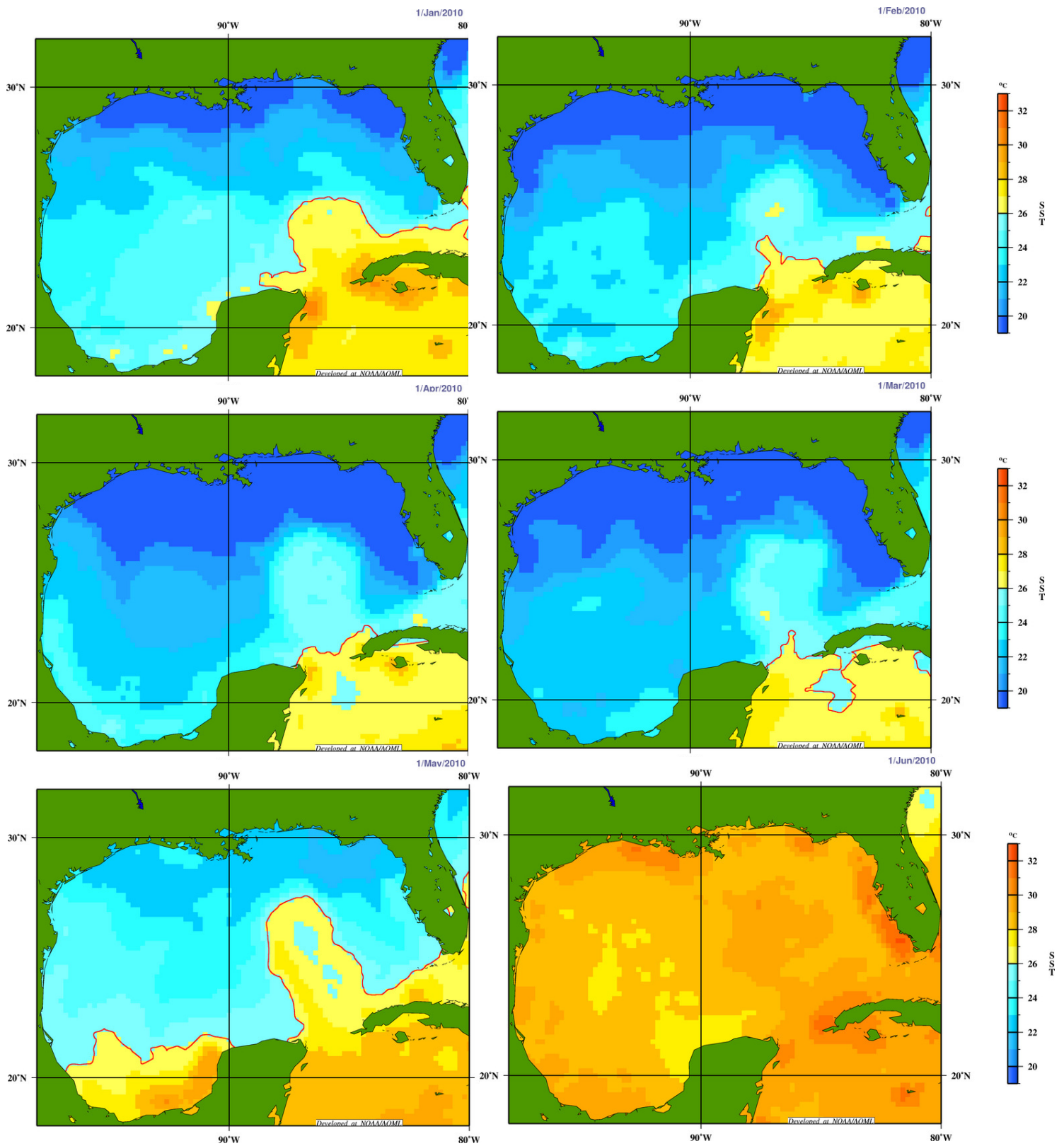
Las distancias genéticas individuales abarcan un mismo rango independientemente de la localidad de procedencia. No se observa estructura poblacional.

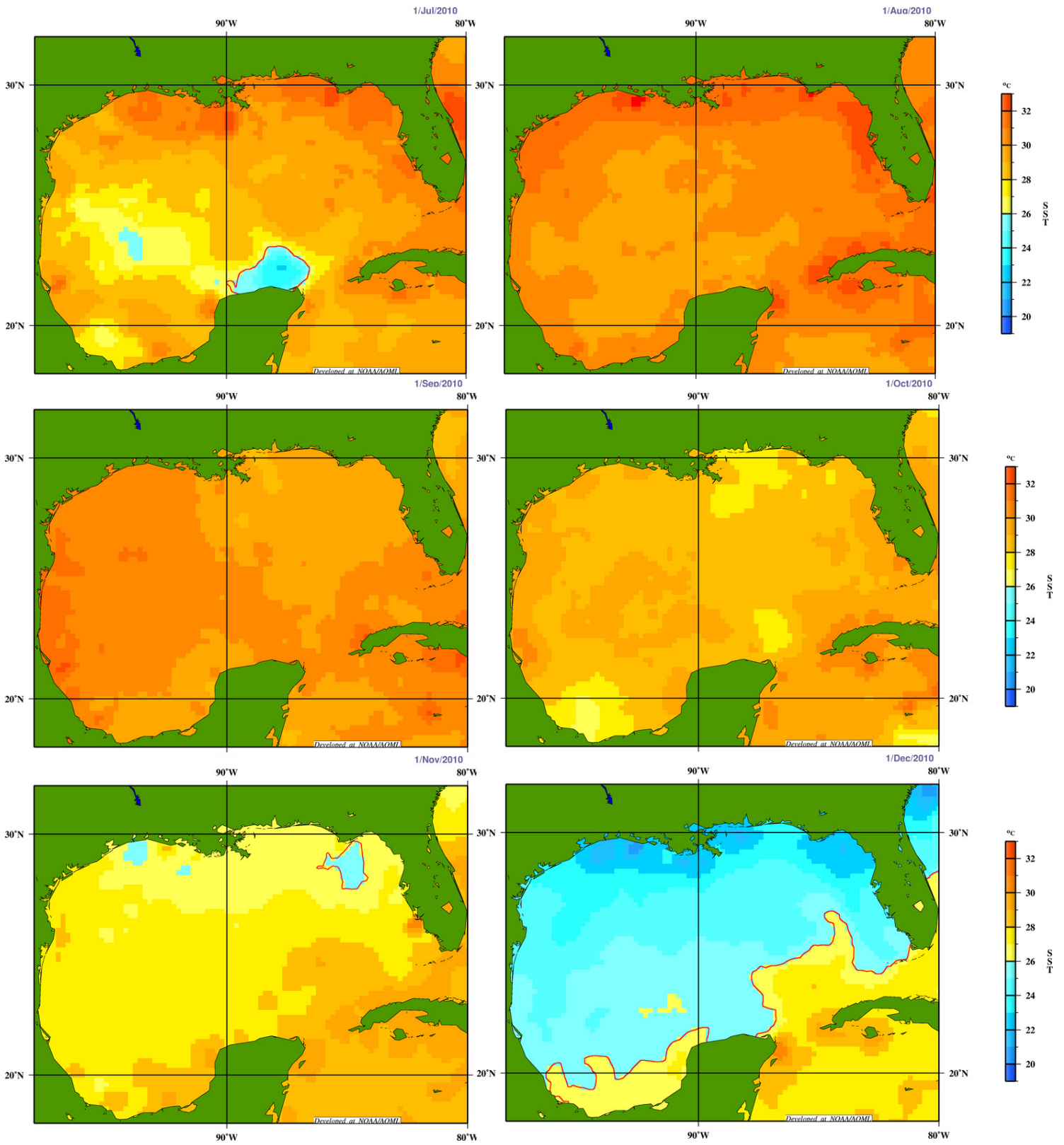
Figura 3. Análisis de componentes principales, distancias genéticas multilocus promedio por población.



Se observa que las distancias genéticas promedio por localidad no corresponden con sus distancias geográficas.

Apéndice: Temperaturas superficiales del Golfo de México en 2010
(NOAA).





Protocolos

Protocolo A. Extracción de ADN utilizando fenol:cloroformo

1. Para la extracción de ADN genómico, se utilizan 20 mg de tejido de brazo de ejemplares de *Octopus maya*.
2. Añadir 400 μ L de Buffer de extracción de ADN (100 mM Tris-HCl, pH 8; 50mM EDTA, pH 8; 500 mM NaCl; 2% SDS; 2% b-mercaptoetanol) a cada muestra.
3. Añadir 20 μ L Proteinasa K 20 mg/mL, e incubar los tubos en baño maría a 65°C, hasta que el tejido quede totalmente digerido.
4. Añadir 2 μ L de RNAsa e incubar los tubos a 37°C por 10 minutos.
5. Agregar 500 μ L de fenol – cloroformo (1:1). Los tubos se invierten varias veces y se centrifugan a 12 000 g por 3 minutos, se recupera la fase superior y se pasan a un tubo nuevo. Repetir la extracción con fenol - cloroformo dos veces más.
6. Añadir 500 μ L de éter de petróleo, los tubos se invierten varias veces y se centrifugan a 12 000 g por 3 minutos. La fase acuosa se desecha totalmente.
7. Añadir 50 μ L de acetato de sodio 3M y agitar los tubos ligeramente.
8. Agregar 1000 μ L de etanol al 100%, incubar las muestras a -20°C durante toda la noche.
9. Centrifugar los tubos a 14 000 r x m, por 10 minutos. El etanol se desecha.
10. Lavar la pastilla de ADN agregando 1000 μ L de etanol al 70%, se centrifugan los tubos a 14 000 rxm por 10 minutos y se elimina el etanol.
11. Resuspender el ADN en 25 μ L de agua pura.

Protocolo B. Extracción de ADN utilizando sales.

1. Para la extracción de ADN genómico, se utilizan 20 mg de tejido de brazo de ejemplares de *Octopus maya*.
2. Añadir en cada muestra 400µL de buffer de extracción (TRIS-HCl 10mM, NaCl 400mM, pH8), 40µL de SDS al 20% y 8µL de Proteinasa K a 20mg/mL.
3. Incubar a 65°C, hasta que el tejido quede digerido en su totalidad.
4. Añadir NaCl 6M a cada muestra e incubar a temperatura ambiente por cinco minutos.
5. Centrifugar las muestras a 10000G por 30 minutos y recuperar el sobrenadante.
6. Añadir 650µL de isopropanol e incubar a -20°C toda la noche para la precipitación del ADN.
7. Centrifugar las muestras a 12000G por 15 minutos, y decantar el isopropanol.
8. Los pellets se lavan con 500µL de etanol al 70%, nuevamente las muestras se centrifugan a 12000G por cinco minutos, se decanta el etanol, se dejan secar los pellets.
9. Se resuspenden en agua ultrapura grado biología molecular.

Literatura Citada.

Awise J. (2004) Molecular markers, natural history and evolution. Second Edition. Sinauer Associates. EEUU. pp 684.

Aranguren-Méndez J. A., Román-Bravo R. Isea W., Villasmil Y. y Jordana J. (2005) Microsatellites (STR's), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review Arch. Latinoam. Prod. Anim. 13(1), 30-42.

Begg G., Friedland K., Pearce J. (1999) Stock identification and its role in stock assessment and fisheries management: an overview. Fish. Res. 43, 1 – 8.

Beheregaray L. B. y Sunnucks P. (2000) Microsatellite loci isolated from *Odontesthes argentinensis* and the *O. erugiae* species group and their use in other South American silverside fish. Mol. Ecol. Primer Notes. 9, 629–644.

Buresch K., Gerlach G. y Hanlon R. (2006) Multiple genetic stocks of longfin squid *Loligo pealeii* in the NW Atlantic: stocks segregate inshore in summer, but aggregate offshore in winter. Mar. Ecol. Prog. Ser. 310, 263-270.

Cabranes C., Fernandez-Rueda P. y Martínez J. L. (2008) Genetic structure of *Octopus vulgaris* around the Iberian Peninsula and Canary Islands as indicated by microsatellite DNA variation. ICES J. Mar. Sci. 65, 12–16.

Casu M., Maltagliati F., Meloni M., Casu D., Binelli G., Curini-Galletti M. y Castelli A. (2002) Genetic structure of *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) from the Mediterranean Sea as revealed by a microsatellite locus. *Ital. J. Zool.*, 69- 295-300.

Crawford N. G. (2010) SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. *Mol. Ecol.* 10, 556-557.

Doubleday Z. A., Semmens J. M., Smolenski A. J., Shaw P. W. (2009) Microsatellite DNA markers and morphometrics reveal a complex population structure in a merobenthic octopus species (*Octopus maorum*) in south-east Australia and New Zealand. *Mar. Biol.* 156, 1183–1192.

Glenn T. C. y Schable N. A. (2005) Isolating microsatellite DNA loci. *Method. Enzymol.* 395, 202-222.

Goldstein D. B. y Pollock D. D. (1997) Launching Microsatellites: A Review of Mutation Processes and Methods of Phylogenetic Inference. *Heredity.* 88, 335-342.

González y de la Rosa M., Santos J., Solís M. (1998) Evaluacion del Pulpo (*Octopus maya*) de la costa norte de Campeche, México. *Proc. Annu. Gulf Caribb. Fish. Inst.* 50, 277-293.

Greatorex E. C., Jones C. S., Murphy J., Key L. N., Emery A. M. y Boyle P. R. (2000) Microsatellite markers for investigating population structure in *Octopus vulgaris* (Mollusca: Cephalopoda) Mol. Ecol. Primer Notes. 9, 629–644.

Guillemaud T., Streiff R., Serrao Santos R., Afonso P., Morato T. y Cancela M. L. (2000) Microsatellite characterization in the rainbow wrasse *Coris julis* (Pisces: Labridae) Mol. Ecol. Primer Notes. 9, 629–644.

Hedrick P. W. (2001) Conservation genetics: where are we now? Trends Ecol. Evol. 16(11), 629-636.

INAPESCA (2002, 2004, 2005, 2007, 2008, 2010) Evaluación de la población de pulpo (*Octopus maya*) en la península de Yucatán. Secretaría de Agricultura, Ganadería y desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de la Pesca.

Jarne P. y Lagoda P. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends Ecol. Evol. 11, 424-429.

Juárez O. E., Rosas C., Arena L. (2010) Heterologous microsatellites reveal moderate genetic structure in the *Octopus maya* population. Fish. Res. 106(2), 209-213.

Jurado-Molina J. (2010) A Bayesian framework with implementation error to improve the management of the red octopus (*Octopus maya*) fishery off the Yucatán Peninsula. *Cienc. Mar.* 36(1), 1–14.

Kassahn K., Donellan S., Fowler A., Hall K., Adams M. y Shaw P. (2003) Molecular and morphological analyses of the cuttlefish *Sepia apama* indicate a complex population structure. *Mar. Biol.* 143, 947 – 962.

Maltagliati F., Belcari P., Casu D., Casu M., Sartor P., Vargiu G., Castelli A. (2002) Allozyme genetic variability and gene flow in *Octopus vulgaris* (Cephalopoda, Octopodidae) from the Mediterranean Sea. *Bull. Mar. Sci.* 7(1), 473 – 486.

Murphy J. M., Balguerías E., Key L. N. y Boyle P. R. (2002) Microsatellite DNA markers discriminate between two *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopoda) fisheries along the Northwest African Coast. *Bull. Mar. Sci.* 71, 545–553.

Norman M. (2003) *Cephalopods a World Guide: Octopuses, Argonauts, Cuttlefish, Squid and Nautilus*. ConchBooks. Germany. pp 274.

Palsbøll J., Bérubé M. y Allendorf F. W. (2006) Identification of management units using population genetic data. *Trends Ecol. Evol.* 22(1), 11-16.

Peakall R., Smouse P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes.* 6, 288-295.

Pérez-Losada M., Guerra A., Carvalho G.R., Sanjuan A. and Shaw P.W. (2002) Extensive population subdivision of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda) around the Iberian Peninsula indicated by microsatellite DNA variation *Heredity.* 89, 417–424

Rosas C, Caamal C., Cázares R., Rodríguez D., Romero M. y Chay D. (2006) Manual preliminar para el cultivo del pulpo *Octopus maya*. Secretaría de Desarrollo Rural y Pesca, Gobierno de Yucatán.

Rozen S. y Skaletsky H. (2000) *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.* In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Humana Press. EEUU. pp 365-386.

Ryman N., Utter F. y Laikre L. (1995) Protection of intraspecific biodiversity of exploited fishes. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 5, 417–446.

SAGARPA-CONAPESCA. Dirección General de Planeación, Programación y Evaluación. Fichas estadísticas por entidad y especie 2008-2009 (http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_estadistica_pesquera_y_acuicola).

Shaw P. W., Pierce G. J., Boyle P. R. (1999) Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi* demonstrated with microsatellite markers. *Mol. Ecol.* 8, 407-417.

Simberloff, D., Farr J. A., Cox J. y Mehlman D. H. (1992) Movement corridors: Conservation bargains or poor investments. *Cons. Biol.* 6, 493-501.

Solís – Ramírez M., Arreguín – Sánchez F. y Seijo J (1997). Pesquería de pulpo de la plataforma continental de Yucatán, p. 61-80. En: Flores-Hernández D., Sánchez-Gil P., Seijo J. y Arreguín – Sánchez F. (Eds.) Análisis y diagnóstico de los Recursos Pesqueros Críticos del Golfo de México. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica. 7, 496p.

Schwartz M. K., Luikart G. y Waples R. S. (2006) Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecol. Evol.* 22(1), 25-33.

Tello J., Escamilla J., Rodríguez L., Góngora A. y Carrillo J. (2007) Estructura Genética del Pulpo *Octopus maya* en los Estados de Campeche y Yucatán en la Península de Yucatán. *Proc. Annu. Gulf Caribb. Fish. Inst.* 58, 387 – 391.

Templeton A. R. (2006) Population genetics and microevolutionary theory. John Wiley and Sons. EEUU. pp 705.

Van Oosterhout C., Hutchinson W. F., Wills D. P. y Shipley P. (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes.* 4, 535–538.

Zane L., Bargelloni L. y Patarnello T. (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.* 11, 1-16.