

## Variabilidad Genética e Identificación de la Unidad de Manejo de *Octopus maya* Usando Microsatélites Específicos

### Genetic Variability and Management Unit Identification of *Octopus maya* Using Specific Microsatellite Markers

### Variabilité Génétique et Identification de l'Unité de Gestion de *Octopus maya* à l'Aide de Marqueurs Microsatellites Spécifiques

OSCAR JUAREZ<sup>1\*</sup>, FAUSTINO CAMARENA<sup>1</sup>, CARLOS ROSAS<sup>1</sup>, PAUL SHAW<sup>1</sup>, y LETICIA ARENA<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>UABC Km. 103 Carretera Tijuana - Ensenada Ensenada, Baja California, Ensenada C.P. 22860, Baja California, México. \*[peace.is.my.name@gmail.com](mailto:peace.is.my.name@gmail.com). <sup>2</sup>UMDI-Sisal, UNAM Puerto de Abrigo S/N, Yucatan, México. [leticia.arena@ciencias.unam.mx](mailto:leticia.arena@ciencias.unam.mx).

#### ABSTRACT

The endemic *Octopus maya* represents one of the most important fisheries in Yucatan peninsula, since mayor octopus catches in Mexico belong to this species. The fishery has been managed as a single unit, but some signs suggest that there could be different units and that the resource could be overexploited. Genetic markers could be the correct instrument to identify populations and define management units due to octopus's morphologic plasticity. Microsatellites show the mayor intraspecific variation among molecular markers, and have been efficient for population discrimination. This study had two objectives: the isolation of microsatellite markers specifically for *O. maya*; and the evaluation of the population genetic structure and variability using the microsatellites for management optimization. The analysis of eight microsatellites shows no significant differences between localities, and high migration of octopuses between localities in an evolutionary time frame. Considering the principal components analysis of genetic distances, the spatial pattern of genetic variability, and the fact that its reproductive behavior is influenced by temperature, raises the hypothesis about possible migratory patterns delineated by changes in sea temperature over Yucatan's peninsula along the year. According to Hardy Weinberg equilibrium analysis, two loci showed heterozygote deficiency and  $F_{is}$  was significant suggesting inbreeding at population level, where Dzilam contributing the largest part. Since inbreeding tends to reduce fitness in natural populations, the fishery may not be optimized. In that sense, the genetic monitoring of inbreeding and heterozygosity levels within localities, as well as promoting habitat connectivity are proposed actions to improve management.

KEY WORDS: Octopus, genetics, variability, management, microsatellite

#### INTRODUCCIÓN

El pulpo *Octopus maya*, endémico de la Península de Yucatán es uno de los principales recursos pesqueros de tal región, y 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 (Juárez, 2010) y de que el recurso esta sobreexplotado (Norman, 2003), por lo que la situación actual de su variabilidad y estructura genética, requiere ser revisada.

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). Los caracteres fenotípicos no son adecuados para identificar poblaciones, debido a la plasticidad morfológica de los pulpos. Para propósitos de las pesquerías se recomienda que en su identificación se utilicen marcadores heredables (Begg et al. 1999). Los marcadores genéticos puede 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 en otros estudios (Shaw et al, 1999), sin embargo *O. maya* no cuenta con loci de microsatélites específicos a la fecha.

#### OBJETIVOS

Este estudio tuvo dos objetivos principales. El primero fue el aislamiento de microsatélites específicos para *O. maya*. El segundo objetivo fue el análisis de los microsatélites aislados para evaluar la estructura y variabilidad genética de la población, para coadyuvar en la optimización de la gestión pesquera.

#### MÉTODO

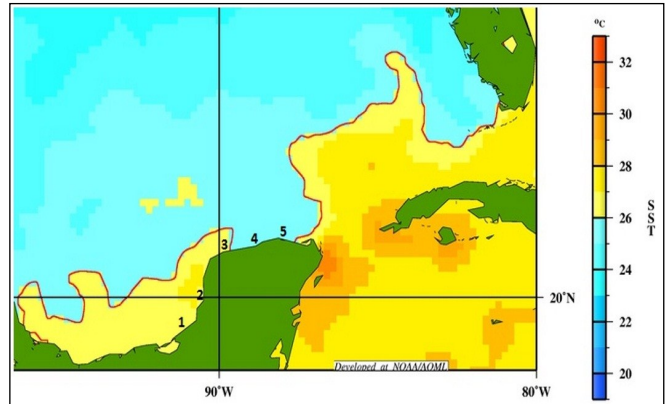
Se extrajo el ADN genómico de dos ejemplares de *O. maya* utilizando fenol:cloroformo, posteriormente se combinó el ADN de ambos y se mezcló en un mismo tubo de 1.5 mL donde se procedió a la digestión con enzimas de restricción.

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 10 u/µL (NEB®) y el ADN 100 ng/µL. La reacción se llevó a cabo en un termociclador a 37°C por una hora. A partir de estos fragmentos, los microsatélites fueron aislados por el método de hibridación selectiva (Glenn y Schable 2005). Los fragmentos de ADN hibridados con

oligos biotinados fueron capturados selectivamente con streptavidina usando Dynabeads kilobase BINDER kit (DynaL Biotech®) siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente los fragmentos seleccionados fueron clonados en células *E. coli* competentes, en un medio selectivo. Finalmente su secuencia se determinó en secuenciador automático (Hitachi 3500®). A partir de las secuencias obtenidas se diseñaron los cebadores para la amplificación de los microsátelites. Se probaron los cebadores diseñados en reacciones PCR, mediante las cuales se identificaron los loci polimórficos, así como sus condiciones óptimas de amplificación.

Para el análisis de la variabilidad y estructura genética de la población fueron capturados 40 ejemplares de *O. maya* de los puertos de Sabancuy, Campeche, Sisal y Dzilam, y 26 ejemplares de Río Lagartos en la Península de Yucatán (Figura 1).

Se eligieron ocho microsátelites para calcular el equilibrio de Hardy – Weinberg y estimar los índices  $F_{is}$ ,  $F_{st}$ ,  $F_{it}$  a nivel poblacional, así como las distancias genéticas y diferenciación ( $D_{st}$ ) entre pares de localidades. Estas distancias fueron utilizadas para realizar el análisis de componentes principales, para identificar diferencias entre las localidades.



**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.

**Tabla 1.** Condiciones de amplificación de los loci estandarizados

Loci	Repetición	Temp.	MgCl <sub>2</sub> conc.	Tamaño de alelo	Número de alelos
<b>O2-02</b>	GT x 17	60	1.5mM	209-251	21
<b>O2-07</b>	GAT x 18	60	1.5mM	181-208	9
O2-27	GT x 21	40	1.5mM	254-274	10
<b>O2-37</b>	ATG x 18	60	1.5mM	136-175	13
<b>O4-01</b>	TATG x 9, TATC x 8	60	1mM	207-263	14
O4-10	TAGA x 9, TAGA x 14	62	2mM	*	*
<b>O4-11</b>	GT x 10, GA x 6	60	1.5mM	240-258	9
<b>O4-18</b>	ATGT x 9	60	1.5mM	140-194	11
<b>O4-20</b>	GATA x 18	56.8	1.5mM	184-244	15
O4-29	TACA x 10, TACA x 13	56.8,60	1.5mM	227-251	6
<b>O4-40</b>	CATA x 14	56.8	1.5mM	165-209	11

Los loci en negritas fueron seleccionados para el genotipado de la muestra de *O. maya*. El locus O4-10 fue amplificado

**Tabla 2.** Equilibrio de Hardy – Weinberg, para todas las localidades en conjunto.

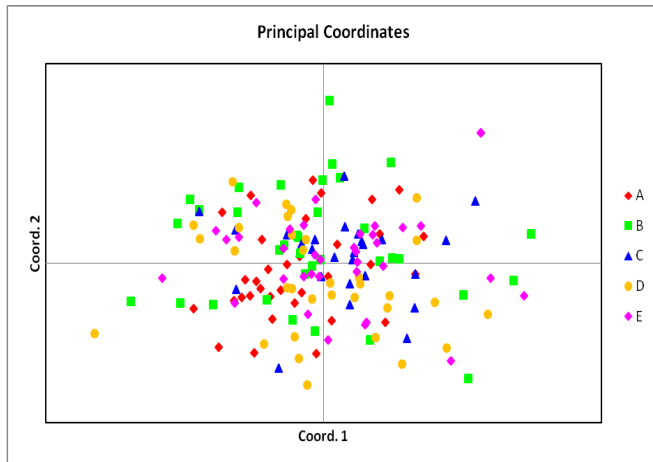
Locus	Obs. Het.	Exp. Het.	p-value	s.d.	Steps done
O2-18	0.53988	0.50263	0.36663	0.00166	10100
O4-20	0.85625	0.88676	0.82782	0.00193	10100
O4-11	0.66667	0.68132	<b>0.00495</b>	0.00055	10100
O2-02	0.79730	0.85394	<b>0.00000</b>	0.00000	10100
O2-37	0.73743	0.78574	0.36010	0.00181	10100
O2-07	0.56111	0.57409	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 3.** Índices de Fijación promedio de la población (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 a nivel poblacional, mientras que el  $F_{st}$  entre las localidades no

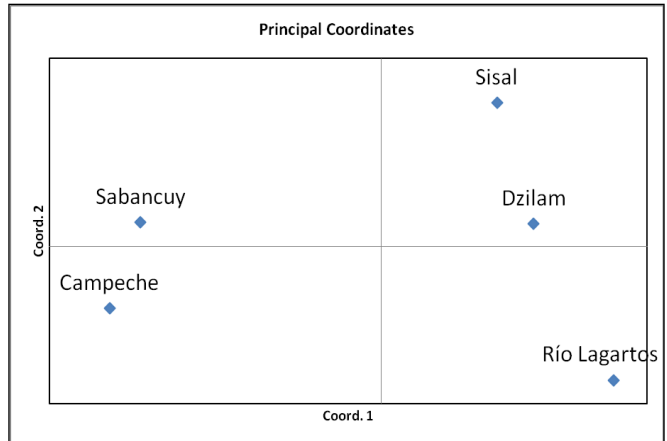


**Figura 2.** Análisis de componentes principales, de distancias genéticas multilocus individuales. A) Campeche, B) Dzilam, C) Río Lagartos, D) Sabancuy, E) Sisal. Los cuadrantes representados muestran una mezcla de genotipos que pertenecen a distintas localidades. No se observa estructura poblacional.

**RESULTADOS**

Se estandarizaron las condiciones de amplificación de once loci de microsatélites (Tabla 1), de los cuales se eligieron ocho microsatélites para realizar el genotipado de la muestra.

Según el análisis del equilibrio Hardy-Weinberg, dos de ocho loci mostraron déficit de heterocigotos a nivel poblacional (Tabla 2). El índice  $F_{st}$  sugiere que la población carece de estructura genética significativa, mientras que el índice  $F_{is}$  muestra endogamia significativa



**Figura 3.** Análisis de componentes principales, distancias genéticas multilocus promedio por población. Se observa que las distancias genéticas promedio colocan las localidades con una distribución similar a la de su ubicación geográfica, con excepción de Campeche cuyo patrón de distancias genéticas no corresponde al de sus distancias geográficas.

**Tabla 4.** Heterocigosis Observada promedio y  $F_{is}$  promedio por localidad.

	Sabancuy	Campeche	Sisal	Dzilam	Río Lagartos
Heterocigosis Observada	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  $F_{is}$ .

**Tabla 5.** 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.

a nivel local y poblacional (Tabla 3), siendo Dzilam la localidad que contribuye en mayor medida a esta endogamia (Tabla 4). Las localidades con mayor diferenciación entre si son Sabancuy y Río Lagartos (Tabla 5) que son las más distantes.

El análisis de componentes principales muestra que las distancias genéticas individuales son similares, sin importar la localidad en la que fueron capturados los individuos (Figura 2), y que las distancias genéticas promedio por localidad colocan a las localidades en una disposición distinta a su ubicación geográfica (Figura 3).

### DISCUSIÓN Y RECOMENDACIONES

Los microsatélites obtenidos resultan los primeros loci específicos de *O. maya*, resultando útiles para obtener los genotipos de la muestra, así como el cálculo preciso de índices de variabilidad y estructura genética.

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).

Considerando que las distancias genéticas promedio entre las localidades no concuerdan exactamente con sus distancias geográficas; que hay variaciones espaciales en la heterocigosis, y que la temperatura más favorable para la reproducción de la especie está alrededor de los 26°C (Rosas et al. 2006); surge la hipótesis de que exista 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 de la población, resaltando la importancia de la conectividad entre las localidades.

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 (Avisé 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, monitoreando a largo plazo los índices de endogamia y la heterocigosis dentro de las localidades, así como fomentar la conectividad y el flujo génico entre éstas. El manejo a largo plazo debe considerar los posibles efectos del incremento en la temperatura oceánica sobre los patrones de distribución, desplazamiento y reproducción de esta especie.

### LITERATURA CITADA

- Avisé, J. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution. Second Edition*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts USA. 684 pp.
- Begg, G., K. Friedland, and J. Pearce. 1999. Stock identification and its role in stock assessment and fisheries management: an overview. *Fisheries Research* **43**:1–8.
- Glenn, T.C. and N.A. Schable. 2005. Isolating microsatellite DNA loci. *Method. Enzymology* **395**:202–222.
- Juárez, O.E., C. Rosas, and L. Arena. 2010. Heterologous microsatellites reveal moderate genetic structure in the *Octopus maya* population. *Fisheries Research* **106**(2):209–213.
- Norman, M. 2003. *Cephalopods a World Guide: Octopuses, Argonauts, Cuttlefish, Squid and Nautilus*. Conch Books. Berlin, Germany. 274 pp.
- Palsbøll, J., M. Bérubé, and F.W. Allendorf. 2006. Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology and Evolution* **22**(1):11–16.
- Rosas, C., C. Caamal, R. Cázares, D. Rodríguez, M. Romero, and D. Chay. 2006. Manual preliminar para el cultivo del pulpo *Octopus maya*. Secretaría de Desarrollo Rural y Pesca, Gobierno de Yucatán, México.
- Shaw, P.W., G.J. Pierce, and P.R. Boyle. 1999. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi* demonstrated with microsatellite markers. *Molecular Ecology* **8**:407–417.