



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TÍTULO DE LA TESIS

Determinación de la Filogenia y divergencia
genética poblacional de *Octopus maya*
utilizando marcadores moleculares.

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

PRESENTA:
OSCAR EDUARDO JUÁREZ VALDEZ

TUTOR(A)
Dra. MARÍA LETICIA ARENA ORTIZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Juárez Valdez Oscar Eduardo 01 735 352 60 92 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 40406615-2</p>
<p>2. Datos del tutor Dra. María Leticia Arena Ortiz</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dr. Carlos Arturo II Becerra Bracho</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dr. Carlos Rosas Vásquez</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Dr. Píndaro Díaz Jaimes</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 M. en C. Fabiola Ramírez Corona</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Determinación de la filogenia y divergencia genética poblacional de <i>Octopus maya</i> utilizando marcadores moleculares. 68p 2008</p>

Agradecimientos

En primer lugar quiero dar las gracias por su apoyo incondicional a mis padres y a toda mi familia, todo se lo debo a ellos. Muchas gracias por su interés, y por la constante curiosidad que tienen en mi trabajo.

Este trabajo no sería posible sin la participación del gran equipo de personas que integran a la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación Sisal, todos y cada uno de ellos aportaron un granito de arena en la realización de la presente Tesis, y el financiamiento de los proyectos Ciencia básica 24743 y FoMix CONACYT – gobierno de Campeche “Aspectos de la biología pesquera, cultivo y repoblación de *Octopus maya*” de los cuales el Dr. Carlos Rosas Vásquez es el responsable. En especial quiero agradecer a mi directora de Tesis, Dra. Leticia Arena Ortiz por abrirme las puertas a éste gran equipo, y brindarme su confianza que me permitió enfrentar éste reto, además de aportar todas y cada una de las “armas” con las que logramos llevar a cabo éste proyecto.

Agradezco a los Técnicos académicos Dr. Gabriel Lizama Uc y Dr. Alfredo Gallardo Torres, por su atenta participación en el trabajo de laboratorio y campo respectivamente; a Josefina Santos y al CRIP de Campeche, por las facilidades y colaboración proporcionada en el muestreo de Campeche; así como a Fernando Mex Esquivel por su ayuda y entusiasmo durante el trabajo de campo. También agradezco al IBT UNAM por las facilidades para sintetizar y secuenciar las cadenas de ADN, que se utilizaron en este trabajo.

Quiero agradecer también al equipo del Taller de Ecología y Paleoecología Marina de la Facultad de Ciencias, sobre todo a los doctores Raúl Gio Arguez, Adolfo Gracia Gasca, Manuel Uribe Alcocer y Píndaro Díaz Jaimes, quienes han influido en mi camino como científico además de contribuir con su conocimiento en el desarrollo de ésta tesis.

Ningún reto puede ser superado sin motivación y agradezco a todos mis amigos y al cálido pueblo sisaleño el haberme dotado de ella, por haberme adoptado, por esos ratos agradables, que hicieron de mi estancia en Sisal una de las experiencias más enriquecedoras y alegres de mi vida.

Índice

INTRODUCCIÓN.....	4
CAPÍTULO I.....	7
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN.....	9
OBJETIVO.....	10
MATERIAL Y MÉTODO	11
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN	25
REFERENCIAS	29
CAPÍTULO II	31
RESUMEN	32
INTRODUCCIÓN.....	33
OBJETIVOS.....	36
HIPÓTESIS.....	36
MATERIAL Y MÉTODO	36
RESULTADOS	40
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIÓN.....	52
REFERENCIAS	53
IMÁGENES	55
CAPÍTULO I.....	55
CAPÍTULO II.....	57
APÉNDICE I	58
APÉNDICE II.....	63
GLOSARIO	65

Introducción

La biodiversidad es diversidad genética. Ésta diversidad genética es organizada para su estudio genealógicamente a través de diversas escalas temporales: desde su organización en unidades familiares y la estructura genética poblacional dentro de las especies, hasta magnitudes de divergencia genética entre especies que han sido separadas filogenéticamente, hace millones de años en el pasado evolutivo (Avice 2004). Una de las metas de la biología de la conservación es preservar la diversidad genética en cualquiera de los niveles de la jerarquía filogenética; con el fin de rescatar cuanto más sea posible del Árbol de la Vida (Mace *et al.* 2003; en Avice 2004). Otra meta es promover la continuidad de los procesos ecológicos y evolutivos que sostienen la biodiversidad (Bowen 1999, Crandall *et al.* 2000, Moritz 2002; en Avice 2004).

Bajo ésta filosofía y metas de la Biología de la Conservación, surge la Genética de la Conservación cuya labor ha sido enfocada principalmente al estudio de los efectos de la endogamia y la pérdida de variación genética adaptativa en pequeñas poblaciones (Frankham 1995; en Avice 2004).

En el presente estudio se utilizan técnicas de biología molecular como herramientas básicas, para interpretar la historia evolutiva de *Octopus maya*, (un pulpo endémico de la Península de Yucatán que le da soporte a una pesquería muy importante en esa región) y para identificar procesos evolutivos que han delineado la diversidad genética de la especie. Tal estudio está motivado por conocer de manera más profunda a una especie cuya conservación es de gran interés (lo que se abordará más adelante) y por lo tanto la finalidad del estudio es que el conocimiento obtenido sea aplicado a la conservación de *O. maya*.

Los principios teóricos fundamentales de la síntesis evolutiva (Futuyma 2005) en los que se apoya ésta tesis, son:

- Los genes mutan, usualmente de manera lenta, a formas alternativas estables conocidos

como alelos. La variación generada se incrementa por la recombinación de los alelos en distintos sitios.

- El cambio evolutivo es un proceso poblacional: en su forma más básica, implica un cambio en las abundancias relativas (proporciones o frecuencias) de organismos individuales con diferentes genotipos dentro de una población.
- La tasa de mutación es muy baja para llevar a una población de un genotipo a otro, por sí misma. El cambio en las proporciones genotípicas en una población puede ocurrir por dos procesos principales: fluctuaciones aleatorias en las proporciones (deriva génica), ó cambios no aleatorios debidos a la superioridad reproductiva y/o de sobrevivencia de algunos genotipos comparados con otros (selección natural). El flujo génico restringido también conduce a la variación en las frecuencias de un gen o genotipo en el espacio (Templeton 2006). La selección natural, la deriva génica y el flujo génico pueden operar simultáneamente.
- Las poblaciones naturales son genéticamente variables, por lo que pueden evolucionar rápidamente cuando las condiciones ambientales cambian.
- Las poblaciones de una especie en diferentes regiones geográficas, difieren en características que tienen bases genéticas.
- Las diferencias entre especies y entre poblaciones de una misma especie, están frecuentemente basadas en diferencias de varios genes, muchos de los cuales tienen un pequeño efecto fenotípico.
- Las diferencias entre poblaciones geográficas de una especie son frecuentemente adaptativas y por lo tanto consecuencia de la selección natural, también existen diferencias entre poblaciones que no son adaptativas y son consecuencia de la deriva génica operando sobre mutaciones neutras.

- Los principios que explican la evolución de las poblaciones y las especies puede ser extrapolada a la evolución de taxa superiores.

El trabajo está escrito en dos capítulos, el primero dedicado a los aspectos macro evolutivos (sobre el nivel de especie) de *Octopus maya*, y el segundo se enfoca a los aspectos micro evolutivos (por debajo del nivel de especie) del recurso en cuestión. Se han separado los capítulos debido a que los aspectos macroevolutivos y los microevolutivos tienen objetivos independientes, responden a distintas preguntas, además de que plantean sus propias hipótesis, por lo tanto sus resultados así como las discusiones derivadas de estos se manejan de manera independiente en cada capítulo.

El capítulo de macroevolución resuelve preguntas que hacen referencia a eventos evolutivos antiguos, cuando ésta especie tuvo origen, hace varios millones de años, en otras palabras, conoceremos cuándo y como fue el origen de *O. maya*. Aquí nuestras moléculas de referencia son genes mitocondriales que evolucionan lo suficientemente lento para proporcionar información que se acumula gradualmente desde hace millones de años.

El capítulo de microevolución resuelve preguntas de eventos evolutivos recientes en la especie y nos da información de la estructura genética de las poblaciones, que la conforman.

En este capítulo conoceremos índices de variabilidad genética de la población que nos ayuden a realizar un mejor manejo de éste importante recurso. Para tal propósito se utilizan fragmentos de ADN repetitivo (microsatélites) que evolucionan muy rápidamente proporcionando información que se acumula desde tiempos recientes.

Referencias

- Avice J. (2004) Molecular Markers, Natural History and Evolution. Segunda Edición. Sinauer Associates, Inc. USA. 684p.
- Bowen B. (1999) Preserving genes, ecosystems, or species? Healing the fractured foundations of conservation policy. *Molecular Ecology* 8: S5-S10.
- Crandall K., Beninda-Edmonds O., Mace G. & Wayne R. (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution* 15: 290-295.
- Futuyma D. (2005) Evolution. Sinauer Associates, Inc. USA. 603p.
- Templeton A. (2006) Population Genetics and Microevolutionary Theory. John Wiley & Sons, Inc. USA. p 168.

Capítulo I

Análisis macroevolutivo de *Octopus maya*

“Determinación de la filogenia de *Octopus maya* utilizando los genes mitocondriales citocromo oxidasa I, citocromo oxidasa III y 16S rRNA”.

Capítulo I:

Determinación de la filogenia de *Octopus maya* utilizando los genes mitocondriales citocromo oxidasa I, citocromo oxidasa III y 16S rRNA.

*“Las relaciones filogenéticas
entre varias aves, plantas u hongos
son fascinantes para la persona
que ha desarrollado interés en el conocimiento
de estos organismos –
rastrear nuestro propio origen
hacia 2 billones de años atrás
no puede fallar en
sacudir nuestra imaginación”*

Douglas Futuyma

Resumen

Con el objetivo de conocer a una escala geográfica global las relaciones filogenéticas en el género *Octopus* así como de aportar conocimiento para esclarecer el origen y evolución de *Octopus maya*, en el presente estudio se hace una colección de las secuencias 16S rRNA, citocromo oxidasa I y III de ADN mitocondrial de pulpos representantes de las principales cuencas oceánicas, y se obtienen por primera vez tales secuencias en *O. maya*; para utilizarlas en la construcción de árboles filogenéticos.

Éstos árboles sugieren que *O. maya* se originó a partir de un ancestro que ocupó tanto la cuenca del Pacífico como la del Atlántico debido a que las especies con las que muestra menor distancia genética (*O. bimaculatus* y *O. bimaculoides*), actualmente solo se distribuyen en el Pacífico cuando *O. maya* habita en el Golfo y Caribe de México.

Al cumplirse la hipótesis de equidad en la tasa evolutiva de las secuencias en los taxa analizados, se estimó un tiempo de divergencia de las secuencias de *O. maya* de 4 millones de años lo cuál coincide con el cierre del Istmo de Panamá que separó a las cuencas del Atlántico y el Pacífico, y se concluye que fue ésta la causa del proceso de especiación que dio lugar a *O. maya* y a otras especies del Pacífico americano.

Las distancias genéticas que muestran las secuencias de *O. maya*, con respecto a los demás pulpos (promedio de 25%), caen dentro de distancias congenéricas en otros taxa animales vertebrados e invertebrados. Estos resultados apoyan la permanencia de *O. maya* dentro del género *Octopus*.

Introducción

Si el postulado de Darwin de que las especies cada vez se diferencian más unas de las otras es correcto, entonces somos capaces de inferir la historia que dio lugar a los diferentes taxa, midiendo su grado de similitud o diferencia. La hipótesis de Darwin de la descendencia con modificación a partir de un ancestro común provee un fundamento científico para la clasificación de los organismos porque explica las similitudes entre las especies como el resultado de una historia evolutiva real (Futuyma 2005).

Por lo tanto, el análisis filogenético – el estudio de las relación evolutiva entre las especies – ha estado cercanamente asociado con la clasificación y la nomenclatura de los organismos (taxonomía).

Las relaciones filogenéticas entre los cefalópodos vivientes son pobremente comprendidas, el género *Octopus* incluye aproximadamente 200 especies (Hochberg et al., 1992; en Barriga et al., 1995), de las cuales, menos de 50 han sido descritas con detalle y sus relaciones filogenéticas aún no han sido determinadas (Barriga et al., 1995; Warnke et al., 2004).

Uno de los problemas más importantes en la construcción de bases taxonómicas y filogenéticas para Octopodinae es la identificación, selección y estandarización de caracteres morfológicos, principalmente debido a la plasticidad corporal de éstos animales y la falta de estructuras duras específicas (Pérez - Losada et al., 2002). Dadas estas dificultades los datos moleculares son muy útiles para revisar las relaciones filogenéticas dentro del género *Octopus*.

Los análisis filogenéticos moleculares en pulpos se han basado principalmente en aloenzimas y en ADN mitocondrial, tal como las regiones de genes codificantes de las sub unidades I, II y III de *citocromo oxidasa* (CO), *16S rRNA*, etc. (Oosthuizen et al., 2004). El conocimiento de la filogenia molecular del género ha ido en aumento en las últimas décadas a medida que se acumulan nuevas secuencias de ADN en bases de datos. Se han realizado estudios utilizando el gen de la *citocromo oxidasa* III (COIII) para algunas especies del

Pacífico Norte (Barriga et al., 1995), del Océano Atlántico (Söller et al., 2000) y pulpos de aguas someras australianas (Guzik et al., 2005), tales estudios han contribuido parcialmente a la resolución de las relaciones evolutivas en el género *Octopus*, sin embargo no existe ningún estudio que incluya en un mismo análisis a pulpos del género representativos de las principales cuencas oceánicas del mundo.

El estatus filogenético de *Octopus maya* fue revisado en 2002 por Pérez - Losada et al., utilizando 30 loci de aloenzimas. Los autores concluyeron que *O. maya* muestra una distancia genética que la coloca fuera del género *Octopus*; además sugieren que su origen ocurrió a través de un proceso de vicarianza, cuando el cierre del Istmo de Panamá separó las cuencas de los océanos Atlántico y Pacífico. Sin embargo, tal estudio muestra una imagen poco precisa e incompleta de la evolución de ésta especie ya que en el análisis solo se incluyen a las especies *O. vulgaris*, *O. mimus* y *O. maya*.

Con el propósito de tener un panorama global y más claro de las relaciones evolutivas del género *Octopus*; y de aportar el conocimiento que permita esclarecer el origen y evolución de *O. maya*, el presente estudio tiene el objetivo de construir árboles filogenéticos que incluyen a todas las especies cuyos genes mitocondriales 16S rRNA, COI y COIII han sido publicados en el GenBank, y se incluye en el análisis por primera vez a *O. maya*.

Objetivo

- Determinar el estatus de *Octopus maya* con respecto al género *Octopus*, así como las relaciones filogenéticas entre *O. maya* y las especies del género *Octopus* mediante la reconstrucción de la filogenia con base en la comparación de secuencias de genes mitocondriales.
- Determinar el tiempo de divergencia de las secuencias analizadas de *O. maya*.

Material y Método

Espécimen

Se analizó un pulpo identificado como *Octopus maya*.

Extracción de ADN

Para la estandarización del método de extracción de ADN genómico, se utilizaron 20 mg. de tejido de músculo fresco de un brazo de *Octopus maya*, que fue capturado frente a la costa de Sisal Yucatán, México. El tejido fue congelado con Nitrógeno líquido durante su traslado desde el punto de captura hasta el Laboratorio Central de la UMDI – UNAM, Sisal. Una vez en el laboratorio el tejido se guardó a -80 °C, hasta su utilización.

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo mediante un método no publicado (ver Apéndice I).

Diseño de primers y aislamiento de genes.

Para obtener primers de los genes mitocondriales codificantes para las subunidades I y III del complejo proteico *citocromo oxidasa* (CO) así como para la subunidad *16S* de RNA ribosomal de *Octopus maya*, se tomó como base el genoma mitocondrial completo de *Octopus vulgaris*, (una especie que ha sido muy estudiada dentro del género) de donde se obtuvieron las secuencias de los genes COI, COIII y 16S rRNA.

Cada una de las secuencias de los genes fue alineada, por separado, a la secuencia del genoma mitocondrial completo de *O. vulgaris*, con el propósito de ubicar las regiones aledañas a los genes, de donde se diseñaron los primers. La alineación se llevó a cabo con el software MEGA4 (Tamura *et al.* 2007) utilizando el algoritmo *ClustalW*. Las secuencias flanqueantes se utilizaron a) como primers en el sentido 5' – 3' y b) como secuencias *molde* para obtener los primers en el sentido contrario (las secuencias de los primers se otorgan bajo petición). Las secuencias de los genes utilizados están disponibles en la base de datos GenBank (claves de acceso: genoma mitocondrial de *O. vulgaris*, [AB158363](#); 16S rRNA,

EF016336; COI, EF016328 y COIII, EF016319.) donde fueron obtenidas.

La optimización de los oligonucleótidos se llevó a cabo utilizando el software en línea NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>), donde fueron examinados en busca de problemas en las secuencias como la formación de dímeros, o estructuras tipo *Loop*, además se determinó la temperatura de fusión de los primers diseñados.

PCR

Se utilizó el par de primers diseñados para cada gen, en reacciones PCR que se llevaron a cabo en un volumen final de 15 μL conteniendo 7.5 μL de JumpStart™ PCR reaction Mix (Sigma), 1 μL de cada primer (25 pM), 1 μL de ADN molde (250 ng / μL) y 4.5 μL de agua (Sigma).

La amplificación se llevó a cabo mediante el siguiente programa de temperaturas: desnaturalización de ADN a 94 °C por 3 minutos; seguido por 35 ciclos a 93 °C por 30 segundos, 55 °C (para los genes COI y COIII, y 60 °C para la subunidad 16S rRNA) por 30 segundos y 72 °C por 2 minutos; con una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Para el programa de amplificación se tomó como base al programa utilizado en Guzik *et al.* 2005, pero se modificaron las temperaturas de alineamiento de los primers según la temperatura de fusión del par de primers utilizados en cada una de las reacciones PCR. Además se agregó un paso último de extensión basado en el programa utilizado en Söller *et al.* 2000.

Los productos de la PCR fueron verificados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2%. Posteriormente las bandas de interés fueron recuperadas y purificadas a partir del gel de agarosa mediante columnas de purificación Freeze "N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns™ de la marca Bio-Rad® siguiendo las especificaciones del proveedor.

Los genes asilados se reamplificaron en reacciones PCR idénticas a las que hicieron posible

su amplificación por primera vez. Nuevamente fueron verificados los fragmentos mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2% y purificados mediante las columnas de purificación antes mencionadas.

Clonación de secuencias

Se procedió a ligar los productos de PCR confirmados en vectores de clonación PGEM[®]-T easy, Promega[®] (Cat.No. A1360) como especifica el proveedor (2x Rapad Ligation Buffer, T4 DNA Ligase 5µl, PGEM[®]-T easy 1µl, T4 DNA Ligasa 1µl y producto de la reamplificación por PCR 1µl en 10µl de Agua ultrapura) durante toda la noche a 4°C para aumentar la eficiencia de la ligación. Se tomaron 5µl de la ligación para transformar bacterias *E.coli* DH5_α previamente preparadas químicamente con Cloruro de Rubidio (TfbI, TfbII) para transformarlas por medio de Choque Térmico (42°C 50" → 4°C 2'), se extendieron en cajas preparadas con medio Psi (ψ) líquido (Extracto de levadura 5g, Tryptona 20g, Sulfato de Mg 5g y Agar 15g /por Litro, pH 7.6) con Ampicilina (10mg/ml) y X-gal (20µl) y se dejaron incubando a 37°C por 16 horas. El vector de clonación PGEM[®]-T easy, Promega (Cat.No. A1360) está flanqueado por sitios de reconocimiento para EcoRI (Hedgpeth *et al.* 1972) y NotI, contiene un gen de resistencia contra la Ampicilina (*Amp^r*) y una delección en la región 5' del gen *LacZ* para la β-galactosidasa que permite hacer la selección de colonias por color, pues el fragmento insertado permite la inactivación del péptido y no es posible ver el cromóforo X-gal. Las bacterias que incorporaron el vector sin inserto fueron α-complementadas, degradaron el X-gal (se ven azules) y no fueron seleccionadas. Las colonias blancas que acoplaron el vector sin α-complementación fueron tomadas como positivas.

Se sembraron 5 colonias positivas por cada caja (es decir, por cada gen) en tubos con medio ψ por 12 horas a 37°C, 250rpm y se extrajeron los plásmidos clonados por el método de Mini-preparación por lisis alcalina con recuperación por Sílica (Lakshmi *et al.* 1998).

Se corroboró la presencia de los insertos en los plásmidos (cada gen en plásmidos distintos) por medio de la digestión con la enzima de restricción EcoRI (Hedgpeth *et al.* 1972). Una vez digeridos, los fragmentos fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Los plásmidos que presentaron correctamente el inserto fueron enviados al Instituto de Biotecnología de la UNAM, en Cuernavaca Morelos, donde finalmente fueron secuenciados.

Análisis de Datos

Se recibieron tres secuencias de cada gen amplificado. Éstas se utilizaron para obtener la secuencia consenso de cada gen, tras su alineamiento mediante el algoritmo *ClustalW*.

Todas las secuencias del género *Octopus* disponibles en el GenBank correspondientes a los genes COI, COIII y 16S rRNA, además de dichas secuencias obtenidas en *Octopus maya*, fueron alineadas (cada gen por separado) mediante el algoritmo *ClustalW* en el software MEGA4 (Tamura *et al.* 2007).

La alineación de las secuencias de las distintas especies de pulpo, permitió la identificación de regiones homólogas en sus genes, que se utilizaron para crear una matriz de caracteres, para cada gen: en las columnas de la matriz, cada posición nucleotídica sirvió como un carácter con cinco estados posibles (A, G, C, T ó ausencia) y en sus filas se incluyeron las secuencias alineadas de las distintas especies de pulpos. Ésta matriz de caracteres se utilizó para realizar el análisis filogenético.

Las distancias genéticas congénicas son relativamente cortas en la jerarquía taxonómica, por lo tanto para la construcción de árboles filogenéticos se utilizó el método de Neighbor-Joining (Saitou *et al.* 1987) que funciona bien al igual que otros métodos filogenéticos, cuando la distancia estimada es relativamente poca (Holder 2003), pero se utilizó éste algoritmo dada su simpleza computacional (Tamura *et al.* 2004).

Las distancias genéticas entre los taxa fueron estimadas bajo el modelo de sustitución

nucleotídica Tamura - Nei 1993 (Figura 1.) La probabilidad de una sustitución de una base a otra de manera instantánea fueron estimados a partir de la matriz de caracteres implementando el método de Máxima Verosimilitud Compuesta (Tamura *et al.* 2004). Las frecuencias nucleotídicas utilizadas en el modelo, también se obtuvieron a partir de la matriz de caracteres. Se utilizó el Neighbor-Joining para agrupar las secuencias (del mismo gen) de los taxa analizados, a través de la construcción de una matriz (para cada gen) de distancias genéticas estimadas entre pares de taxa.

Se construyeron árboles independientes para cada gen y se construyó un árbol concatenando los genes de la citocromo oxidasa I, III y 16S r RNA (solo con los taxa que tienen los tres genes disponibles en el GenBank) buscando la construcción de una matriz de caracteres más informativa con respecto a la evolución del genoma mitocondrial de las especies analizadas.

El sustento de las ramas de los árboles filogenéticos se examinó mediante un remuestreo por *Bootstrap* (Felsenstein 1985) de 1000 repeticiones, en otras palabras, se tomaron de la matriz de caracteres, 1000 muestras aleatorias con reemplazo y con cada una se graficó un árbol filogenético. El porcentaje de los árboles réplica donde la agrupación de los taxa fue igual, se presenta como el sustento de cada rama.

Una vez construidos los árboles, se probó la hipótesis de que las secuencias analizadas en cada árbol evolucionan a la misma tasa, mediante la prueba de tasas relativas de Tajima (1993). Éste es un método simple y rápido que compara, mediante una χ^2 , el número de mutaciones únicas entre pares secuencias, con respecto a una tercera secuencia (taxón externo). Bajo la hipótesis de tasas iguales de evolución, el número de mutaciones únicas entre los pares de secuencias no debe mostrar diferencias significativas (Tajima 1993).

La prueba de hipótesis tiene como objetivo saber en cuáles árboles y en cuáles ramas es posible determinar el tiempo de divergencia de las secuencias, si la hipótesis de tasas iguales de evolución es aceptada.

Se realizaron pruebas de tasas relativas de Tajima, para cada par de secuencias analizadas, pero no se muestran en los resultados todas las comparaciones, solamente se muestran tres pares de secuencias en los genes donde las diferencias fueron significativas (se rechaza la hipótesis de tasas iguales). También se muestran los valores de p de la prueba χ^2 en los pares de secuencias que se utilizaron en la construcción de ramas linearizadas (Takezaki *et al.* 2004). Para calibrar el reloj molecular se utilizó una tasa evolutiva convencional para ADN mitocondrial de 2% cada millón de años (Avice 2004).

Todo el análisis filogenético se llevó a cabo en el software MEGA4 (Tamura *et al.* 2007).

Figura 1. *Modelo de sustitución nucleotídica de Tamura – Nei (1993) utilizado para estimar las distancias genéticas (d) entre pares de secuencias.*

$$d_{ij} = 4(g_A g_C k_1 + g_T g_C k_2 + g_R g_Y) b_{ij}$$

En esta fórmula g_A , g_G , g_T y g_C representan las frecuencias de los nucleótidos A, G, T y C respectivamente, en la matriz de caracteres; k_1 y k_2 , representan las proporciones de la tasa transición/tasa de transversión para las purinas y para las pirimidinas respectivamente (Tamura *et al.* 2004); $g_R = g_A + g_G$ y $g_Y = g_T + g_C$; b_{ij} representa la tasa de transversión entre pares de secuencias (Tamura *et al.* 1993).

Resultados

Patrón de sustitución nucleotídica.

En las Tablas 1, 2 y 3 cada celda muestra la probabilidad de una sustitución de una base (fila) a otra (columna) de manera instantánea obtenida mediante el método de Máxima Verosimilitud Compuesta (Tamura *et al.* 2004). Solo las celdas en las filas deben de compararse. Las tasas de transición diferentes se muestran en negritas y las de las transversiones se muestran en itálicas. Las diferencias en la composición nucleotídica de las secuencias fueron consideradas en la comparación evolutiva. (Tamura *et al.* 2002). Fueron incluidas en el análisis las posiciones primera, segunda, tercera y no codificantes de los codones. Todas las posiciones con datos faltantes fueron eliminadas de la matriz de caracteres. Se incluyó un total de 374 posiciones en el análisis final. Todos los cálculos se

llevaron a cabo en el software MEGA4 (Tamura *et al.* 2007).

Tabla 1. *Estimación del Patrón de Sustitución Nucleotídica (Tamura et al. 2004) de la subunidad 16S rRNA entre los taxa analizados.*

	A	T	C	G
A	-	7.76	2.39	11.59
T	7.59	-	5.36	3.93
C	7.59	17.37	-	3.93
G	22.34	7.76	2.39	-

En el gen de la subunidad 16S de rRNA, las frecuencias nucleotídicas son 0.35 (A), 0.358 (T/U), 0.11 (C), y 0.182 (G). La proporciones transición/transversión son $k_1 = 2.945$ (purinas) y $k_2 = 2.239$ (pirimidinas).

Tabla 2. *Estimación del Patrón de Sustitución Nucleotídica (Tamura et al. 2004) del gen COIII entre los taxa analizados.*

	A	T	C	G
A	-	8.47	3.99	2.65
T	6.9	-	14.88	2.64
C	6.9	31.56	-	2.64
G	6.9	8.47	3.99	-

En el gen COIII, las frecuencias nucleotídicas son 0.313 (A), 0.385 (T/U), 0.181 (C), y 0.12 (G). La proporciones de transición/transversión son $k_1 = 1.001$ (purinas) y $k_2 = 3.726$ (pirimidinas).

Tabla 3. *Estimación del Patrón de Sustitución Nucleotídica (Tamura et al. 2004) del gen COI, entre los taxa analizados.*

	A	T	C	G
A	-	5.48	3.17	2.48
T	4.57	-	22.57	2.51
C	4.57	38.96	-	2.51
G	4.52	5.48	3.17	-

Las frecuencias nucleotídicas del gen COI son 0.29 (A), 0.348 (T/U), 0.202 (C), and 0.16 (G). Las proporciones de transición/transversión son $k_1 = 1.05$ (purinas) y $k_2 = 3.482$

(pirimidinas).

Reconstrucción de Árboles Filogenéticos

La historia evolutiva de la subunidad 16S de rRNA (Fig. 2), del gen COIII (Fig. 3) y del COI (Fig. 5), en el género *Octopus*, así como de los tres genes concatenados (Fig. 6) fueron inferidas utilizando el método de Neighbor – Joining (Saitou *et al.* 1987). El árbol consenso del *bootstrap* inferido de 1000 réplicas (Felsenstein 1985) se muestra para representar la historia evolutiva de los taxa analizados. Los porcentajes de los árboles réplica donde los taxa asociados fueron agrupados juntos en la prueba *bootstrap* (con 1000 réplicas) se muestran a un lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas usadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron estimadas usando el método de Máxima Verosimilitud Compuesta (Tamura *et al.* 2004) bajo el modelo evolutivo de Tamura – Nei (1993). Las diferencias en la composición nucleotídica fueron consideradas en las comparaciones evolutivas. Se incluyeron las posiciones primera, segunda, tercera y no codificantes de los codones. Todas las posiciones con datos faltantes fueron eliminadas. El análisis filogenético se llevó a cabo en el software MEGA4 (Tamura *et al.* 2007).

La Figuras 2 y 3, coinciden en que las secuencias de *O. maya* se agrupan con las secuencias de pulpos que habitan en el Pacífico americano, y que al igual que *O. maya* son pulpos que presentan manchas circulares de pigmento bajo los ojos llamadas ocelos, sugiriendo que éstas especies comparten un mismo ancestro.

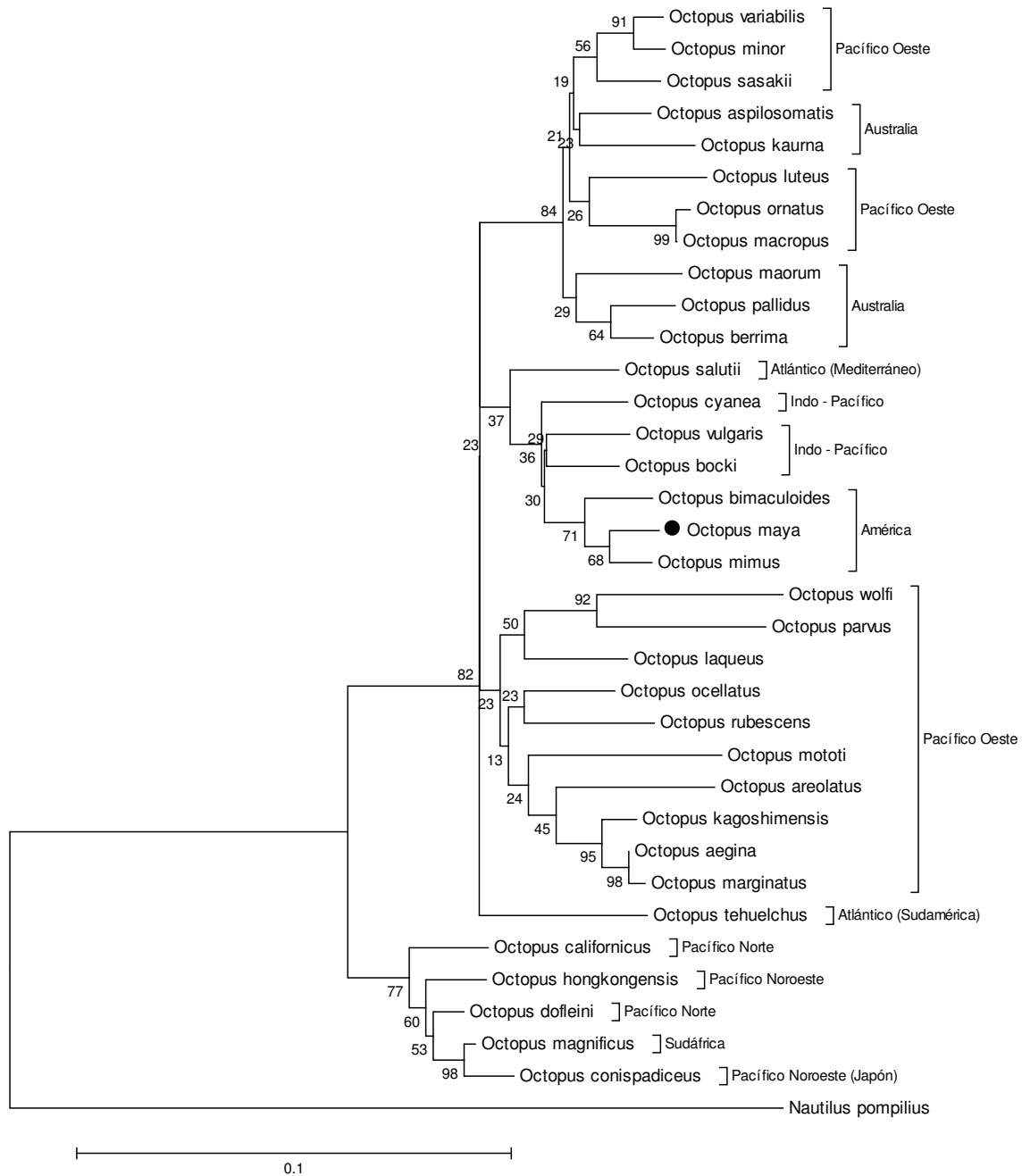


Figura 2. Relaciones evolutivas de la 16S rRNA en el género *Octopus*. La secuencia de *O. maya* fue agrupada en el 71% de los árboles con las de *O. bimaculoides* y *O. mimus*, pulpos que habitan el Pacífico americano, mientras *O. maya* se distribuye en el Atlántico (Golfo de México).

Se incluyó un total de 288 posiciones en el análisis final.

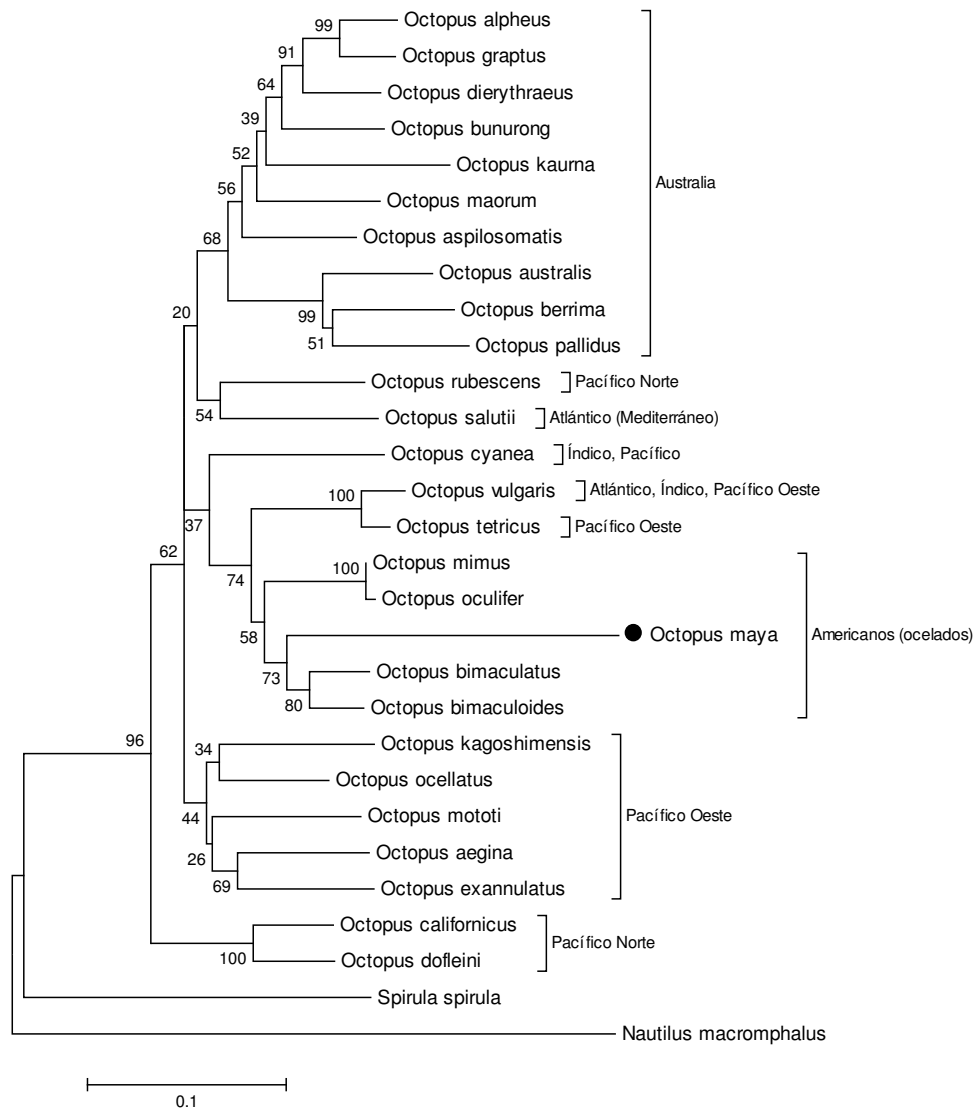


Figura 3. Relaciones Evolutivas de la COIII en el género *Octopus*. En el grupo donde se observa la secuencia de *O. maya*, todos los pulpos comparten la presencia de ocelos y además habitan en el continente americano aunque *O. maya* habita en el Golfo de México y el resto en el Océano Pacífico. Se incluyó un total de 452 posiciones en el análisis final.

De éstas dos secuencias la COIII reveló de forma mas clara la relación de *O. maya* con los pulpos del Pacífico americano, éste árbol fue utilizado para llevar acabo la estimación del tiempo de divergencia del grupo. La hipótesis de que los pares de secuencias evolucionan a la misma tasa en éste gen, fue probada usando a *Nautilus macromphalus* como grupo externo en

la prueba de tasas relativas de Tajima (1993). En la Tabla 4, se muestran los valores de p de la prueba χ^2 con un grado de libertad. Los valores de p menores a 0.05 son utilizados para rechazar la hipótesis nula de tasas iguales de evolución entre las secuencias. Solo se realizó la prueba de tasas relativas para *O. maya* ya que es el taxón que muestra la distancia genética más grande dentro de la rama analizada. El análisis se llevó a cabo en el software MEGA4 (Tamura *et al.* 2007).

Tabla 4. Prueba de tasas relativas de Tajima (1993), del gen COIII para *O. maya* y sus taxa más cercanos.

Par de secuencias	Valor de p de la χ^2	Tasas iguales de evolución
<i>O. maya</i> – <i>O. vulgaris</i>	0.15	Se acepta
<i>O. maya</i> – <i>O. bimaculoides</i>	0.15	Se acepta
<i>O. maya</i> – <i>O. bimaculatus</i>	0.09	Se acepta
<i>O. maya</i> – <i>O. mimus</i>	0.26	Se acepta
<i>O. maya</i> – <i>O. oculifer</i>	0.27	Se acepta

Ningún par de secuencias de COIII analizadas, mostró diferencias significativas en su tasa de evolución, con una significancia de 0.05.

El árbol de la Figura 3, fue linearizado (Fig. 4) asumiendo tasas de evolución iguales en todos los linajes (Takezaki *et al.* 2004), Se estima que la divergencia entre estas secuencias ocurrió hace más de tres millones de años en el continente americano. La posible causa de ésta divergencia es el cierre del Istmo de Panamá que se estima que ocurrió en el mismo momento geológico (Stanley 2005).

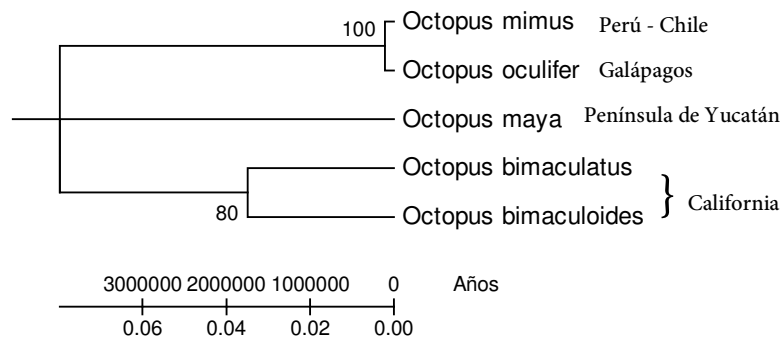


Figura 4. Estimación del tiempo de divergencia (Takezaki *et al.* 2004) de la COIII de cinco pulpos ocelados americanos. Los taxa agrupados en ésta subrama del árbol basado en las secuencias de COIII, cumplen con la hipótesis de tasas iguales de evolución y su divergencia se estima que ocurrió hace aproximadamente 4 millones de años.

La Figura 5, muestra las relaciones evolutivas de la COI en el género *Octopus*, donde nuevamente las secuencias más cercanas a la de *O. maya* fueron secuencias de pulpos que habitan la cuenca del Pacífico. Podemos observar que el género se divide en dos clados principales, las ramas internas del clado superior muestran bajo soporte en la prueba de Bootstrap, mientras que en el clado inferior todas las agrupaciones tienen un soporte superior al 60%. *O. maya* es el taxón que muestra la distancia más larga con respecto al nodo del cual diverge sugiriendo una tasa de evolución más rápida con respecto a los demás taxones.

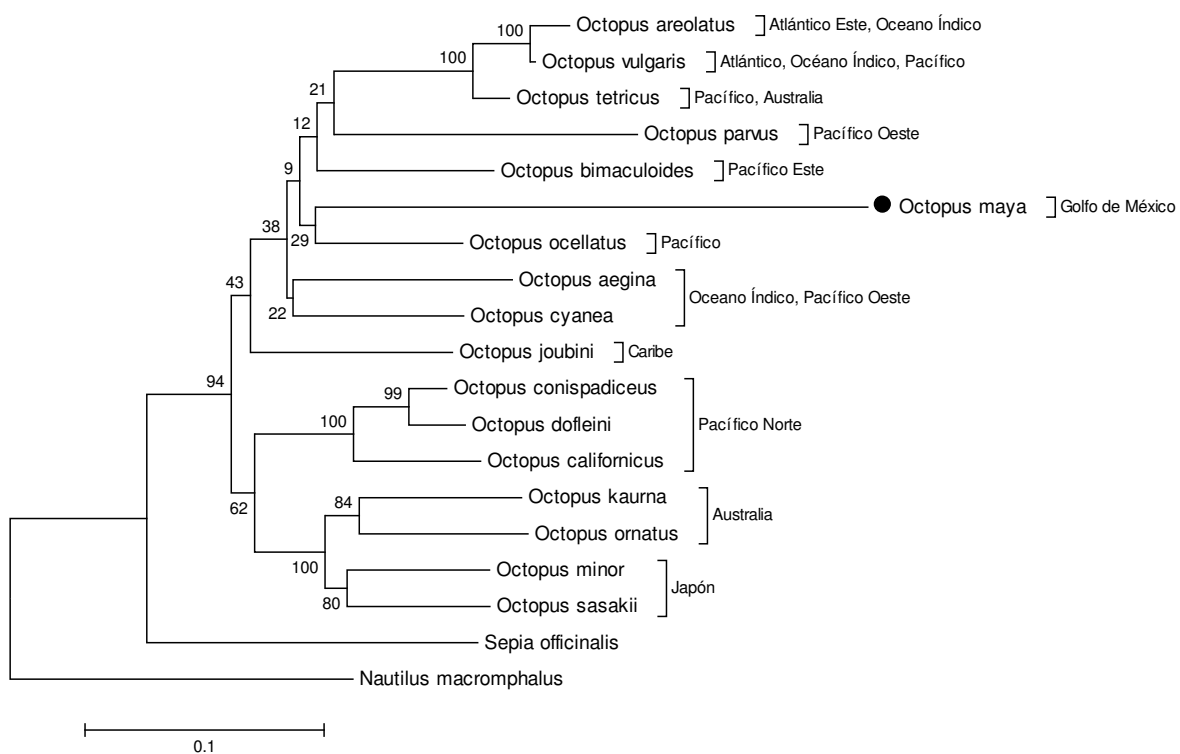


Figura 5. Relaciones evolutivas de la COI en el género *Octopus*. Se muestra el árbol óptimo con una suma de la longitud de las ramas = 1.75797168. Se incluyó un total de 492 posiciones en el análisis final.

La hipótesis de que los pares de secuencias evolucionan a la misma tasa en el COI, fue probada usando a *Nautilus macromphalus* como grupo externo en la prueba de tasas relativas de Tajima (1993). En la Tabla 5, se muestran los valores de p de la prueba χ^2 con un grado de libertad. Los valores de p menores a 0.05 son utilizados para rechazar la hipótesis nula de

tasas iguales de evolución entre las secuencias. Solo se realizó la prueba de tasas relativas para *O. maya* ya que es el taxón que muestra la distancia genética más grande con respecto a todos los demás taxa del árbol. El análisis se llevó a cabo en el software MEGA4 (Tamura *et al.* 2007).

Tabla 5. Prueba de tasas relativas de Tajima (1993), del gen COI para *O. maya* y sus taxa más cercanos.

Pares de secuencias	Valor de p de la χ^2	Tasas de evolución iguales
<i>O. maya</i> – <i>O. bimaculoides</i>	0.00	Se rechaza
<i>O. maya</i> – <i>O. parvus</i>	0.00	Se rechaza
<i>O. maya</i> – <i>O. ocellatus</i>	0.00	Se rechaza

Las secuencias de las especies genéticamente más cercanas a *O. maya*, según el árbol filogenético del gen COI, mostraron diferencias significativas en la tasa de evolución con respecto a la secuencia de *O. maya*, con una significancia del 0.05.

Es importante destacar que en cada uno de los tres árboles anteriores la mayoría de las agrupaciones de taxa, corresponden a agrupaciones biogeográficas. En estos casos los taxones genéticamente más cercanos también son los geográficamente más cercanos, dando un soporte independiente a tales agrupaciones, aunque podemos observar que esto no sucede para todos los taxa.

Se reconstruyó un árbol concatenando las tres secuencias obtenidas en *O. maya* y las mismas secuencias de las especies del género presentes en el GenBank (Fig. 6). Éste fue el árbol que presentó el mayor sustento ya que todas sus ramas mostraron valores de bootstrap por arriba del 60%.

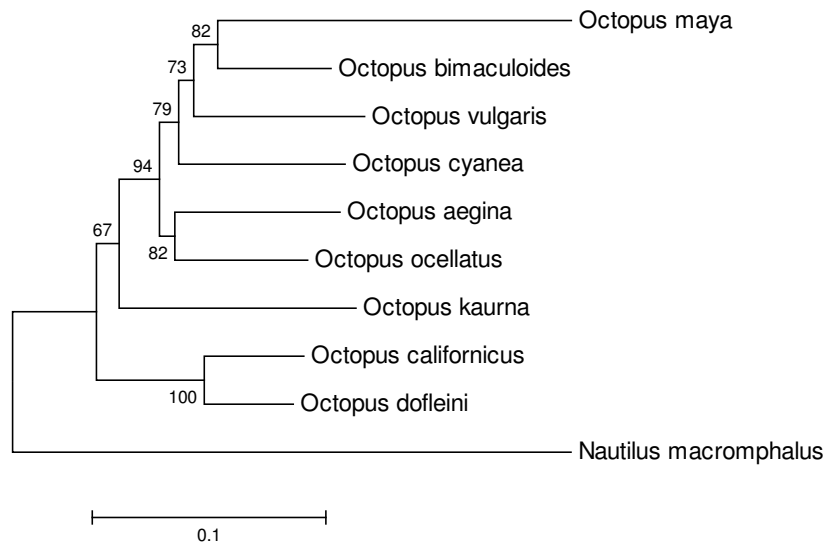


Figura 6. *Relaciones evolutivas de los genes COI, COIII y 16S rRNA concatenados, en el género Octopus.* El árbol con las secuencias concatenadas muestra mayor soporte que los árboles de secuencias sencillas. Se incluyó un total de 1266 posiciones en el análisis final.

Aunque solo los genes 16S r RNA y COIII mostraron evidencia de evolucionar a la misma tasa en todos los linajes, el árbol concatenado de la Figura 6, fue linearizado (Takezaki *et al.* 2004). La finalidad de la linearización es la comparación de los tiempos de divergencia estimados a partir de: a) un gen que evoluciona estrictamente a la misma tasa en todos los linajes (Fig. 4) contra b) la concatenación de tres genes donde uno de ellos no evoluciona a la misma tasa en todos lo linajes (Fig.7).

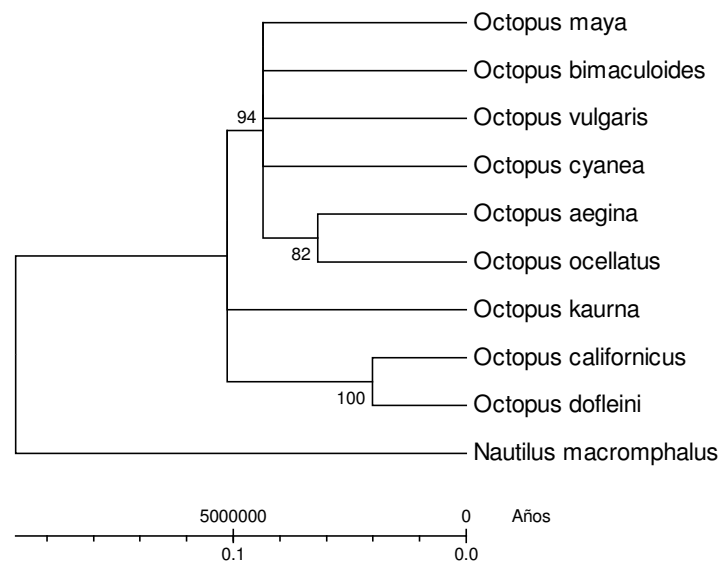


Figura 7. *Estimación del tiempo de divergencia (Takezaki et al. 2004) de los genes COI, COIII y 16S rRNA concatenados en el género Octopus.* La divergencia de las secuencias de éstos genes en *O. maya* se estima que ocurrió hace aproximadamente 4 millones de años.

Tanto la linearización del árbol de la COIII, así como la de las tres secuencias concatenadas mostraron un tiempo de divergencia de *O. maya* cercano a los cuatro millones de años, sugiriendo que la formación del Istmo de Panamá dio lugar a un importante proceso de especiación de los pulpos de América tropical.

Discusión

Los distintos árboles construidos coinciden en que las secuencias de *Octopus maya* divergen a partir de un ancestro que habitaba en la cuenca del Pacífico, también sugieren que éste ancestro fue el mismo para los pulpos de California *Octopus bimaculoides* y *Octopus bimaculatus*. Cabe destacar que el ancestro común de estas especies debió tener un ciclo de vida con fase larvaria, (aunque tanto *O. maya* como *O. bimaculoides* poseen un ciclo de vida con desarrollo directo, es decir en ausencia de fase larvaria), ya que éste ciclo de vida se ha determinado como el estado ancestral de este carácter y no ha presentado regresiones a lo largo de las ramas en otras filogenias de pulpos (Guzik 2004). Tal ancestro, según el árbol de la COIII, está cercanamente relacionado con el que le dio origen a los pulpos sudamericanos *Octopus mimus*, que se distribuye desde Perú hasta Chile (Pérez – Losada *et al.* 2002), y *Octopus oculifer* el cual es endémico de las islas Galápagos.

En los árboles se observa que las distancias genéticas entre los taxa analizados, son muy distintas entre cada gen, siendo el 16S rRNA la secuencia que muestra las distancias menores, seguida del gen de la COIII. El gen de la COI muestra las distancias genéticas más largas. Estas diferencias no son sorprendentes ya que cada gen es como una ventana a la historia evolutiva con un resolución temporal distinta (Avice 2004). Cada gen da lugar a estructuras moleculares con distintas funciones y por lo tanto con distinta restricción al cambio. Por tal motivo cada gen mostró distancias genéticas distintas entre los taxa analizados. Al presentar las distancias más cortas entre los taxa, la subunidad 16S rRNA parece tener mayor restricción al cambio, es decir acumuló menos mutaciones en su historia evolutiva. Por otro lado la COI mostró tener menor restricción al cambio de los tres genes analizados, acumulando más mutaciones en el mismo tiempo. Ésta mayor tasa de evolución generalizada en los taxa analizados dificultó la resolución de la filogenia basada en éste gen, ya que al presentar mayor variabilidad entre las secuencias fue más complejo determinar sus

relaciones y por lo tanto varios nodos de éste árbol presentan bajos valores del bootstrap.

Se aceptó la hipótesis de que las secuencias de los taxa analizados evolucionan a tasas iguales, para el 16S rRNA así como para el gen de la COIII debido a que estas secuencias pasaron la prueba de Tajima de tasas relativas (Tajima 1993). Una rama del árbol filogenético obtenido a partir de la COIII, se linearizó, porque muestra de manera más clara las relaciones evolutivas de *Octopus maya*, además de que las secuencias mostraron equidad en la tasa evolutiva. Al linearizar la rama fue posible estimar el tiempo de divergencia de estas secuencias, el cual fue aproximadamente de 4 millones de años. La estimación concuerda con la realizada en Pérez-Losada *et al.* 2002, y apoya la hipótesis de que *O. maya* se originó en un momento muy cercano al cierre de el Istmo de Panamá, cuando se separaron las cuencas oceánicas del Atlántico y el Pacífico.

La matriz de distancias genéticas pareadas, de los tres genes concatenados, indica que *O. maya* tiene un rango de divergencia que va de del 20 % al 30 %, con un promedio de 25.6 %. Entre los vertebrados existen distancias congénicas aún mayores al 30 % de divergencia, aunque el promedio es cercano al 10% (Johns 1998). Probablemente los invertebrados estén cerca de este promedio. Ball *et al.* (2005) encontraron distancias que van de 3.3 % a 25.8 % entre especies congénicas de algunos insectos (tomando en cuenta la bastedad de invertebrados que existen en el planeta, estimar un promedio de sus distancias genéticas representa un trabajo muy arduo y largo, quizá imposible). Estos argumentos me parecen válidos para decir que *O. maya* muestra distancias genéticas que se mantienen dentro del rango de distancias congénicas en otras especies animales incluyendo vertebrados e invertebrados.

El árbol filogenético de los tres genes concatenados también fue linearizado (Figura 7) aunque se rechazó la hipótesis nula de que las secuencias analizadas evolucionan bajo tasas iguales. Esto se llevó a cabo porque la hipótesis de tasas de evolución iguales, se aceptó para

dos de los tres genes (COIII y 16S rRNA) cuando la prueba se realizó por separado para cada gen.

Cuando se linearizaron los árboles, al aceptar la hipótesis de que las secuencias de los taxa evolucionan a la misma tasa, las distancias genéticas se reducen en el caso de *O. maya*, incluso a valores menores del 10% de divergencia (Figura 4 y Figura 7).

Estos resultados son argumentos a favor de la inclusión de *O. maya* en el género *Octopus*, sin embargo, esta es la historia evolutiva de tres genes que nos dan una aproximación a la historia evolutiva de las especies y no debe interpretarse como la su historia evolutiva real.

Aunque los árboles basados en secuencias de ADN son herramientas muy útiles para entender la evolución del grupo dada su gran variabilidad fenotípica además de tener un registro fósil escaso (Strugnell *et al*, 2005), primero es necesario secuenciar una gran cantidad de genes y genomas, generando la mayor cantidad de caracteres disponibles para resolver su filogenia.

Referencias

- Avise J. (2004) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Segunda Edición. Sinauer Associates, Inc. USA. p. 684.
- Ball S., Hebert P., Burian S. & Webb J. (2005) Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *Journal of the North American Benthological Society*. 24(3): 508–524.
- Barriga Sosa I, Beckenbach K, Hartwick B, Smith M. (1995) The molecular phylogeny of five eastern North Pacific octopus species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4:163-174
- Bowen B. (1999) Preserving genes, ecosystems, or species? Healing the fractured foundations of conservation policy. *Molecular Ecology* 8: S5-S10.
- Crandall K., Beninda-Edmonds O., Mace G. & Wayne R. (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution* 15: 290-295.
- Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Futuyma D. (2005) *Evolution*. Sinauer Associates, Inc. USA. p. 603
- Guzik T. (2004) *Molecular phylogenetics and the evolutionary history of reproductive strategies in benthic shallow-water octopuses (Cephalopoda: Octopodinae)*. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in Zoology and Tropical Ecology within the School of Tropical Biology James Cook University. p. 147.
- Guzik T., Norman M. & Crozier R. (2005) Molecular phylogeny of the benthic shallow-water octopuses (Cephalopoda: Octopodinae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 37:235–248.
- Hedgpeth J., Goodman H. & Boyer H. (1972) DNA nucleotide sequence restricted by the RI endonuclease. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences. USA*. 69:3448–3452.
- Holder M. & Lewis P. (2003) Phylogeny estimation: Traditional and Bayesian approaches. *Nature Reviews Genetics* 4: 275-284.
- Johns G. & Avise J. (1998) A Comparative Summary of Genetic Distances in the Vertebrates from the Mitochondrial Cytochrome *b* Gene. *Molecular Biology and Evolution*. 15(11):1481–1490.
- Lakshmi R., Baskar V. & Ranga U. (1998) Extraction of superior-quality plasmid DNA by a combination of modified alkaline lysis and silica matrix. *Analytical Biochemistry*. 272:112–115.
- Mace G., Gittleman J. & Purvis A. (2003) Preserving the tree of life. *Science* 300: 1707-1709.
- Oosthuizen A., Jiwaji M., & Shaw P. (2004) Genetic analysis of the *Octopus vulgaris* population on the coast of South Africa. *South African Journal Science*. 100:603–607.

Pérez - Losada M., Guerra A. & Sanjuan A. (2002) Allozyme divergence supporting the taxonomic separation of *Octopus mimus* and *Octopus maya* from *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopoda). *Bulletin of Marine Science*. 71(2): 653-664.

Saitou N. & Nei M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4:406-425.

Solís M., Arreguín-Sánchez F. & Seijo J (1997). Pesquería de pulpo de la plataforma continental de Yucatán, p. 61-80. En: Flores-Hernández D., Sánchez-Gil P., Seijo J. & 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.

Söller, R., Warnke, K., Saint-Paul, U., Blohm, D., (2000). Sequence divergence of mitochondrial DNA indicates cryptic biodiversity in *Octopus vulgaris* and supports the taxonomic distinctiveness of *Octopus mimus* (Cephalopoda: Octopodidae). *Marine Biology*. 136 (1): 29–35.

Stanley S. (2005) *Earth System History*. W. H. Freeman and Company. USA. p. 567.

Strugnell, J; Norman, M; Jackson, J; Drummond, A; Cooper, A. (2005) Molecular phylogeny of coleoid cephalopods using a multigene approach; the effect of data partitioning on resolving phylogenies in a Bayesian framework. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37. 426 – 441.

Tajima F (1993) Simple methods for testing molecular clock hypothesis. *Genetics* 135:599-607.

Takezaki N., Rzhetsky A. & Nei M. (2004) Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. *Molecular Biology and Evolution* 12:823-833.

Tamura K. & Nei M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.

Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.

Tamura K. & Kumar S. (2002) Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitution pattern among lineages *Molecular Biology and Evolution* 19:1727-1736.

Tamura K., Nei M. & Kumar S. (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *PNAS* 101:11030-11035.

Warnke K., Söller R., Blohm D. & U. Saint – Paul (2004) A new look at geographical and phylogenetic relationships within the species group surrounding *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda): indications of very wide distribution from mitochondrial DNA sequences. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 42: 306–312.

Capítulo II

Análisis microevolutivo de *Octopus maya*

“Determinación de la divergencia genética en la población silvestre de *Octopus maya* utilizando ADN microsatélite”

Capítulo II:

Determinación de la divergencia genética en la población silvestre de *Octopus maya* utilizando ADN microsatélite.

Resumen

El pulpo *Octopus maya* es una especie endémica de la península de Yucatán donde soporta una importante pesquería, la cuál, históricamente se ha manejado como una población homogénea, porque no se han identificado stocks genéticamente divergentes.

Con el objetivo de optimizar el manejo de ésta pesquería en base a la identificación de stocks de pesca y su variabilidad genética, en éste estudio se comparan cuatro secuencias congénicas microsatélite de individuos de *O. maya* de tres localidades de la península (Seybaplaya Campeche, Sisal y El Cuyo, Yucatán), mediante los índices F_{st} y F_{is} , el equilibrio Hardy Weinberg (H-W) en las localidades y las distancias genéticas (Nei, 1978) entre éstas.

Dos de cuatro loci analizados muestran diferencias significativas (F_{st}) entre “El Cuyo” y “Seybaplaya”, éstos loci fueron los más polimórficos, lo que sugiere un proceso de divergencia muy reciente.

El F_{is} promedio fue de -0.026, sin embargo El Cuyo, fue la única localidad que mostró un valor positivo de 0.117. También mostró déficit de heterocigosis en 2 loci y se considera que tiene cierto grado de endogamia mientras que Sisal y Seybaplaya se consideran en equilibrio H-W.

Las distancias genéticas van del 1.9% al 5.5 % y son mayores a las obtenidas con aloenzimas. Los resultados se consideran preliminares con respecto a la modificación del manejo de ésta pesquería y motivan un monitoreo de la población más amplio con microsatélites específicos.

Introducción

El pulpo *Octopus maya* es una especie endémica, propia de la península de Yucatán. Se sabe que se encuentra en los estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo (desde las aguas adyacentes a Cd. del Carmen, a más allá de Isla Mujeres), donde sustenta una importante pesquería (Solís - Ramírez, 1962; van Heukelem, 1977; en Solís - Ramírez *et al.*, 1997), la cual genera 15,000 empleos directos y una derrama económica anual de aproximadamente 360 millones de pesos (INP, 2006).

La pesquería de *O. maya* se desarrolla a partir de 1949 y su valor comercial ha motivado que se establezcan flotas pesqueras a lo largo del área de distribución de la especie. A nivel regional *O. maya* es la principal especie del recurso pulpo; en 2004 la especie participó con el 63% de la captura total de pulpo. (INP, 2005). La importancia del recurso ha ido en aumento, año tras año, se suman más pescadores a su captura debido a que representa una derrama económica muy importante en las comunidades de pescadores de la península, así como para las empresas que exportan este producto y/o lo comercializan en el interior del país. Este aumento en la demanda del recurso ha generado conflictos sociales entre grupos de pescadores a lo largo de la península; algunos grupos defienden la pesca local, o sea que pescan solo cerca de sus comunidades, pero muchos suelen “perseguir” el recurso, sin importar su ubicación, no importa si es dentro o fuera de sus comunidades (comunicación personal con pescadores de la región). Basándose en la inexistencia de barreras físicas y/o biológicas que impidan el intercambio genético de los individuos en su área de distribución, se ha considerado que la especie constituye una población genéticamente homogénea y por lo tanto el manejo de la pesquería así como los modelos pesqueros en los que se apoya, se aplican de manera generalizada en toda el área.

Sin embargo, como consecuencia de características como el desarrollo directo a partir del huevo, es decir que carece de larva; además de presentar una conducta territorial (Solís - Ramírez *et al.*, 1997), la especie pudiese formar unidades genéticas discretas. Estos aspectos

son de gran importancia para el aprovechamiento y regulación de éste recurso (INP, 2006), ya que tales unidades genéticas podrían poseer diferencias en su dinámica poblacional y por tanto ser consideradas como unidades de pesca independientes.

En las especies marinas, los procesos demográficos y la productividad de las pesquerías pueden variar considerablemente entre poblaciones o stocks. Si hay un intercambio restringido de individuos entre los stocks estos pueden formar unidades discretas con genotipos divergentes (Begg and Waldman 1999, en Kassahn *et al.* 2003).

El concepto de stock se refiere a grupos semi discretos, o unidades poblacionales de un recurso, con atributos definibles asumiendo que son homogéneos, para propósitos de manejo particulares (Begg *et al.* 1999). Se ha argumentado que los marcadores utilizados en su identificación deben ser heredables (Begg *et al.* 1999); tal concepto implica la necesidad de definir un marcador genético para diferenciar entre los stocks del recurso.

Una suposición común en el campo de la “genética de la conservación” es que mientras mayor es la heterocigosis promedio de las poblaciones, mayores son sus probabilidades de sobrevivencia sobre tiempos ecológicos o evolutivos (Awise 2004).

La importancia de un manejo adecuado, de la pesquería de *Octopus maya* basado en índices de variabilidad genética, crece al tratarse de una especie endémica, ya que su viabilidad como recurso sustentable depende de tal variabilidad genética, además de la problemática social que representa.

Aún los stocks grandes pueden sufrir de erosión génica por resultado de la deriva génica, endogamia, cuellos de botella prolongados o baja adecuación por fijación de alelos deletéreos (Ryman *et al.*, 1995; en Maltagliati *et al.* 2002). Al ser una especie altamente explotada durante mucho tiempo, pudiesen presentarse cuellos de botella en la población.

El conocimiento de la estructura genética de una especie además de ofrecer datos valiosos para formular programas efectivos de manejo en especies explotadas, puede ser usados para

predecir si un stock reducido puede ser repoblado exitosamente por migrantes (Utter, 1991; Pierce and Guerra, 1994; en Maltagliati *et al.* 2002). La identificación de los stocks es la base para desarrollar una estrategia adecuada de manejo de cualquier pesquería asociada a éstos. (Begg and Waldman 1999, en Kassahn *et al.* 2003).

En un estudio utilizando aloenzimas, Pérez - Losada en 2002 obtuvo valores bajos de variabilidad en *O. maya* lo cual puede poner en riesgo el potencial adaptativo de una especie con tales características. Actualmente se ha fallado en la identificación de stocks a lo largo del área de distribución de la especie (Tello *et al.* 2007). Sin embargo nunca se han utilizado marcadores moleculares lo suficientemente precisos para tal propósito.

En éste trabajo se utilizan secuencias de ADN microsatélite, pequeñas secuencias (usualmente conformadas por dos, tres o cuatro nucleótidos) que se repiten de manera consecutiva en una locación particular de los cromosomas, con variación en el número de copias repetidas que dan lugar a distintos alelos, proporcionando datos genotípicos de los organismos y que presentan altas tasas de mutación, incluso mayor a la de las aloenzimas (Awise, 2004).

Actualmente no existen loci de microsatélites desarrollados en *O. maya*, sin embargo se ha logrado la identificación de poblaciones divergentes, en estudios similares en otras especies, cuando se utilizan microsatélites desarrollados en especies congénéricas (Forbes *et al.* 1995, Hille *et al.* 2002, Akemi *et al.* 2006). En el presente estudio se utilizan loci de microsatélites que fueron desarrollados en *Octopus vulgaris* (Gretorex *et al.* 2000).

Este capítulo se pretende comenzar a caracterizar la estructura genética de las poblaciones naturales con el afán de establecer puntos estratégicos tanto en el tiempo como en el espacio para el monitoreo continuo de la dinámica y variabilidad genética poblacional de *O. maya*, o de sus stocks, en caso de que los marcadores utilizados permitan su identificación.

Objetivos.

- Determinar la estructura genética poblacional de *Octopus maya*, con el propósito de definir unidades de pesca.
- Determinar índices de variabilidad genética que informen a cerca del potencial adaptativo de las tres localidades muestreadas (equilibrio Hardy-Weinberg e Índices de Fijación de Wrigth).
- Aplicar la información obtenida en la planificación de programas de manejo del recurso a largo plazo, mediante el diseño de un monitoreo continuo del recurso.

Hipótesis.

Se probarán las siguientes hipótesis:

1. Hipótesis nula: *O. maya* es una especie que consta de una sola población
Hipótesis alternativa: *O. maya* es una especie que consta de más de una población.
2. Hipótesis nula: Las secuencias microsatélite analizadas se distribuyen de manera homogénea entre las localidades, y dentro de las localidades, según el modelo de H-W.
Hipótesis alternativa: Las secuencias microsatélite analizadas, no se distribuyen de manera homogénea entre las localidades, según el modelo H-W.
Las secuencias microsatélite analizadas, no se distribuyen de manera aleatoria dentro

Material y Método

Muestreo

La captura de 30 individuos de *O. maya* se llevó a cabo frente a los puertos de;

- a) Seybaplaya Campeche (N 19° 38.53', W 090° 41.58') el 24 de mayo de 2007,
- b) Sisal Yucatán (N 19° 40.45', W 090° 43.00') los días 27, 29 y 31 de mayo de 2007;
- c) y El Cuyo Yucatán (N 21° 31.10', W 087°41.08') el día 27 de Septiembre de 2007.

Mediante la técnica artesanal utilizando jaibas como carnada (gareteo) fueron capturados

individuos de *O. maya* en Seybaplaya y el Cuyo, y se regresaron al mar después de obtener una pequeña muestra de tejido del brazo. Cada muestra de tejido se colocó dentro de un tubo hermético de 2mL y se almacenó en un tanque que contenía nitrógeno líquido hasta llegar a la UMDI donde se almacenaron en un ultracongelador a -80 °C. Los individuos capturados en Sisal se llevaron vivos, dentro de un tanque con agua marina a bordo de la lancha, a la UMDI donde se almacenaron en el mismo congelador a -80 °C.

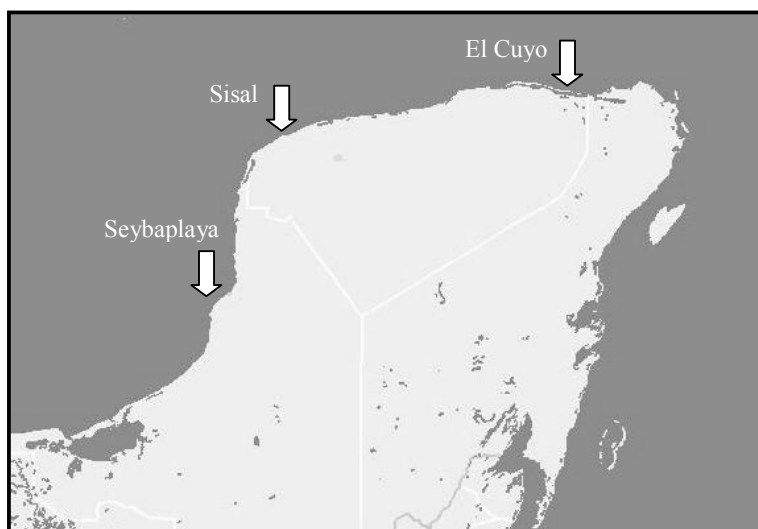


Figura 1. *Puntos de captura de Octopus maya* Las flechas indican la ubicación de los puertos en donde se capturaron los individuos de *O. maya* que se utilizaron en el análisis.

Extracción de ADN y amplificación de secuencias microsatélite.

Se extrajo el ADN genómico de 30 individuos de cada localidad muestreada mediante un protocolo no publicado (ver Apéndice I).

PCR

Los primers fueron diseñados utilizando el programa en línea Primer3, utilizando las secuencias microsatélites obtenidas de la base de datos GenBank (acceso).

La optimización de los primers se llevó a cabo en el programa en línea NetPrimer, donde los oligonucleótidos fueron corregidos manualmente para evitar la formación de *loops* o dímeros. Además se obtuvieron las temperaturas de fusión para cada par de primers. Los

oligonucleótidos finalmente se sintetizaron en el Instituto de Biotecnología UNAM en Cuernavaca Morelos.

Se utilizó el par de primers diseñados para cada microsatélite, en reacciones PCR que se llevaron a cabo en un volumen final de 15 μL conteniendo 7.5 μL de JumpStart™ PCR reaction Mix (Sigma), 1 μL de cada primer (25 pM), 1 μL de ADN molde (250 ng / μL) y 4.5 μL de agua grado biología molecular (Sigma).

La amplificación se llevó a cabo mediante el siguiente programa de temperaturas: desnaturalización de ADN a 94 °C por 3 minutos; seguido por 35 ciclos a 93 °C por 45 segundos, 55 °C por 45 segundos y 72 °C por 45 minutos; con una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Los ciclos de la PCR están basados en el programa utilizado en Casu *et al.* 2002, pero se añade un paso previo de desnaturalización basado en Guzik *et al.* 2005 y un paso final de extensión según Söller *et al.* 2000.

La amplificación de los fragmentos se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

Separación y visualización de alelos

Después de amplificar cada microsatélite en todos los individuos de las tres localidades, los productos de la PCR fueron desnaturalizados, y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% y urea 7M, en una celda de secuenciación Bio-Rad®, posteriormente los alelos fueron teñidos con Nitrato de Plata siguiendo un protocolo no publicado, el cuál es una adaptación derivada de los protocolos de Creste *et al.* (2001) y Beidler *et al.* (1982) y donde también se especifican los pasos de desnaturalización, así como la preparación detallada del gel y las condiciones de la electroforesis. Tal protocolo no publicado se anexa en su forma original como Apéndice II. Se realizaron electroforesis para cada loci de manera separada pero se incluyeron como control un producto PCR tomado al azar, de cada uno de

los loci restantes para verificar el tamaño de las bandas.

Análisis de Datos

Los genotipos de los individuos determinados a partir del patrón de bandas de las electroforesis, fueron revisados en el software Microchecker 2.2.3, en busca de la presencia de alelos nulos. Cuando la presencia de alelos nulos fue evidente, se procedió al ajuste de genotipos mediante el algoritmo de Brookfield (1996), con el propósito de utilizar la mayor cantidad de datos posible en el análisis posterior del polimorfismo

El análisis del polimorfismo de los alelos observados en los geles de poliacrilamida, se llevó a cabo en el software Arlequin 3.11 y GENETIX, los cuales están especializados en tales análisis.

Se probó la hipótesis nula de que las secuencias se distribuyen de manera homogénea dentro de las localidades, es decir, si las secuencias cumplen con el modelo de Hardy – Weinberg (H-W) aplicando el método de Guo & Thomson 2002, en el software Arlequin 3.11®, el cual está basado en la generación de tablas de contingencia de alelos a través de una cadena de Markov.

Una consideración importante del modelo H-W es que supone poblaciones ideales, es decir, que la población carece de presiones evolutivas derivadas de la selección natural, deriva génica, migración ni mutaciones. Cuando una población no cumple con el equilibrio de H-W, se debe a que existen presiones evolutivas generadas por alguna de las cuatro fuerzas evolutivas mencionadas.

En el presente trabajo se utilizan secuencias neutras, se les llama así porque no están bajo selección natural directa, debido a que no son secuencias codificantes, no dan pie a alguna estructura y no se conoce a cerca de su funcionalidad.

Para hacer un balance evolutivo entre mutación, deriva génica y migración (como ya se dijo antes, en éste caso la selección natural no entra en juego), se probó la hipótesis nula de que

los alelos se distribuyen de manera homogénea entre las localidades ó si existen distintas proporciones de los alelos en las distintas localidades. Éste análisis es conocido como el índice de Fijación de los alelos, disponibles en la población, en cada una de las localidades; propiamente dicho se llevó a cabo el estadístico F_{st} de Slatkin (1995), mediante el software Arlequin 3.11®. Éste índice nos dice si las localidades muestran diferencias significativas en sus frecuencias alélicas, cargando la balanza hacia la deriva génica y mostrando un evento de divergencia genética, ó de manera opuesta, que tales diferencias no son significativas (con distribución de alelos en las localidades de manera homogénea), cargando la balanza del lado de la migración mostrando que las localidades integran a una misma población, o sea una misma unidad genética o stock.

Se probó la hipótesis nula de que los alelos se distribuyen de manera homogénea en los genotipos de los individuos, dentro de las localidades mediante la correlación F_{is} , modificada por Weir & Cockerham (1984), mediante el software GENETIX. Éste también es un índice de fijación de los alelos pero se refiere a la fijación de los alelos en los individuos dentro de las localidades. Ésta correlación nos dice en caso de ser positiva, que existe una proporción de homocigotos mayor a la que se estima bajo el modelo de H-W, lo cual podría ser ocasionado a través de eventos de endogamia. Si la correlación es negativa entonces las localidades presentan un déficit de homocigotos con respecto al modelo de H-W.

Finalmente se obtuvieron las distancias genéticas entre las distintas localidades utilizando el método de Nei (1972).

Resultados

Fue posible amplificar 4 loci de microsatélites derivados de *Octopus vulgaris* (Greatorex *et al.*, 2000) sin embargo sólo en 3 loci fue posible determinar los 30 genotipos sin ambigüedad alguna y en el cuarto locus fue posible determinar 25 genotipos.

En la prueba de equilibrio de H-W solo se incluyeron los loci donde fue posible observar a los 30 genotipos de cada localidad sin ambigüedad. Podemos observar (Tabla 1) que en la localidad de “El Cuyo, Yucatán”, dos de tres loci mostraron déficit de heterocigotos (P-value < 0.05). En “Sisal, Yucatán” todos los loci se encuentran en equilibrio según lo esperado por el modelo H-W (P-value < 0.05). En Seybaplaya, los loci dos y tres se encuentran en equilibrio H-W mientras que el locus 1 mostró déficit significativo de heterocigotos.

Tabla 1. Prueba de equilibrio Hardy – Weinberg (Guo & Thompson 1992, Levene 1949) en tres localidades de la población de *Octopus maya*. Se muestran en negritas los P-values menores a 0.05.

Localidad	Locus	# Genot.	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value	s.d.
El Cuyo Yucatán	1	30	0.68000	0.84735	0.07317	0.00023
	2	30	0.58621	0.63823	0.00005	0.00001
	3	30	0.31034	0.52692	0.00321	0.00006
Sisal Yucatán	1	30	0.80000	0.85959	0.19380	0.00035
	2	30	0.51724	0.55112	0.62295	0.00047
	3	30	0.62069	0.45977	0.09545	0.00028
Seybaplaya Campeche	1	30	0.76000	0.83020	0.02586	0.00015
	2	30	0.65517	0.55475	0.15773	0.00031
	3	30	0.44828	0.54144	0.20972	0.00042

El locus 1, mostró alelos nulos, en éste caso se ajustaron los genotipos mediante el algoritmo de Brookfield (1996) antes de realizar la prueba de H-W. La localidad de “El Cuyo Yucatán” muestra déficit significativo de heterocigosis con respecto al modelo de H-W en los loci 2 y 3. En la localidad de Sisal, todos los loci se encuentran en equilibrio, mientras que en Seybaplaya el locus 1 muestra déficit significativo de heterocigosis.

Los valores de Fst (Slatkin, 1995) se muestran en la Tabla 2. y representan las diferencias genéticas entre pares de localidades basadas en las diferencias en sus frecuencias alélicas.

Los valores de probabilidad se obtuvieron implementando permutaciones de individuos en las localidades. De los cuatro loci analizados, dos loci muestran diferencias significativas entre Seybaplaya, Campeche y El Cuyo, Yucatán. El resto de los loci no mostraron diferencias significativas entre los pares de localidades. Cuando los loci son analizados de manera conjunta las diferencias entre las localidades no son significativas (P-value < 0.05).

Se puede observar en la Figura 2, que los loci que muestran diferencias significativas coinciden en ser los loci más polimorficos, es decir los loci más variables son los que muestran diferencias significativas entre éstas dos localidades.

Tabla 2. *Índices de Fijación Fst (Slatkin, 1995), para cada locus entre pares de localidades de la población de Octopus maya. Se muestra en negritas los Fst significativos y los P-values menores a 0.05. Después del nombre de cada locus se proporciona la clave de acceso en el GenBank.*

Etiqueta	Localidad
1	El Cuyo, Yucatán
2	Sisal, Yucatán
3	Seibaplaya, Campeche

Locus 1 AF197132 (30 genotipos) Fst

	1	2	3
1	*		
2	.02838	*	
3	.04734	0	*

Fst P-values

Número de permutaciones: 110

	1	2	3
1	*		
2	0.06306+-0.0194	*	
3	0.01802+-0.0121	0.71171+-0.0287	*

Locus 2 AF197131 (30 genotipos) Fst

	1	2	3
1	*		
2	0.00410	*	
3	0.00471	0.04496	*

Fst P-values

Número de permutaciones: 110

	1	2	3
1	*		
2	0.37838+-0.0424	*	
3	0.23423+-0.0433	0.05405+-0.0148	*

Locus 3 AF197134 (30 genotipos) Fst

	1	2	3
1	*		
2	0	*	
3	0	0.01739	*

Fst P-values

Número de permutaciones: 110

	1	2	3
1	*		
2	0.52252+-0.0354	*	
3	0.54955+-0.0345	0.12613+-0.0242	*

Locus 4 AF197130 (25 genotipos) Fst

	1	2	3
1	*		
2	0	*	
3	0.02680	0.00968	*

FST P-values

Número de permutaciones: 110

	1	2	3
1	*		
2	0.60360+-0.0526	*	
3	0.02703+-0.0139	0.10811+-0.0297	*

Cuatro loci juntos (25 individuos)

FST P-values

Número de permutaciones: 110

	1	2	3
1	*		
2	0.14414+-0.0337	*	
3	0.07207+-0.0297	0.09910+-0.0252	*

Los loci 1 y 4, muestran diferencias significativas entre las localidades de “El Cuyo, Yucatán” y “Seybaplaya, Campeche” (P-value < 0.05), sin embargo los loci 2 y 3 no muestran diferencias significativas para ningún par de localidades (P-value > 0.05). Al analizar los cuatro loci juntos, las localidades no mostraron diferencias significativas.

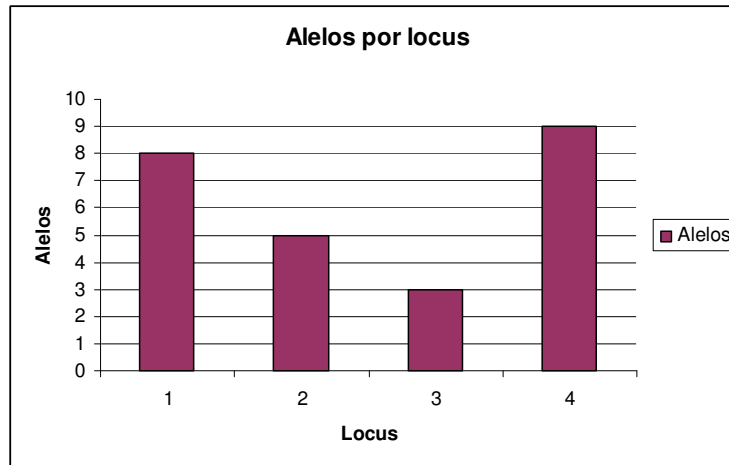


Figura 2. *Número de alelos por cada locus analizado en la población de Octopus maya. Los loci 1 y 4 muestran mayor polimorfismo, también son los loci que muestran diferencias significativas entre “El Cuyo, Yucatán” y “Seybaplaya, Campeche”.*

Se obtuvieron los índices Fis (Weir & Cockerham, 1984) por cada locus en cada una de las localidades, y se muestra el promedio de los cuatro loci en cada localidad en la Tabla 3. Estos resultados muestran un exceso de heterocigotos según lo esperado por el modelo de H-W, en Sisal Yucatán, así como en Seybaplaya Campeche (Fis negativo). Sisal, el punto central del muestreo realizado en éste trabajo, muestra el mayor exceso de heterocigotos de las tres localidades. De modo contrario al extremo Este del muestreo, El Cuyo mostró déficit de heterocigotos, es decir muestra menor proporción de heterocigotos que los esperados por el modelo de H – W. Estos resultados sugieren que la zona central del área de distribución de la especie es la zona más variable y que mientras nos acercamos a los extremos esta variabilidad va disminuyendo, siendo más drástica la pérdida de variabilidad en la localidad de El Cuyo que muestra los mayores valores de Fis.

Tabla 3. Índices de Fijación Fis (Weir & Cockerham, 1984) promedio de los loci analizados en tres localidades de la población de Octopus maya.

Valores obtenidos tras el ajuste de genotipos (Brookfield, 1996) cuando se presentaron alelos nulos.

El Cuyo	Sisal	Seybaplaya	Promedio
0.117	-0.105	-0.092	-0.026

Valores obtenidos tras eliminar el locus que presentó alelos nulos (“locus 1”).

El Cuyo	Sisal	Seybaplaya	Promedio
0.08	-0.164	-0.05	-0.044

Tras realizar el ajuste de genotipos en el locus con alelos nulos, así como tras su eliminación, “El Cuyo” al noreste de la Península de Yucatán, muestra el índice de fijación positivo de los alelos en los individuos. De manera contraria “Sisal” y “Seybaplaya” muestran exceso de heterocigosis. El mayor exceso de heterocigosis lo presenta “Sisal”, el punto geográficamente central entre las localidades.

Se obtuvieron las distancias génicas de Nei ‘72 y Nei ‘78 para cada locus y par de localidades muestreadas y se muestran en la Tabla 4 las distancias genéticas promedio de los cuatro loci analizados por cada par de localidades, que están basadas en las diferencias de las frecuencias alélicas entre éstas. Las distancias muestran que el par El Cuyo – Sisal, es el más cercano genéticamente y el par El Cuyo – Seybaplaya es el par genéticamente más distante, lo cuál coincide con sus distancias geográficas y está relacionado con la forma de la Península (Sisal está geográficamente en medio de Seybaplaya y El Cuyo, pero entre Sisal y El Cuyo la costa es prácticamente plana, mientras que entre Sisal y Seybaplaya se forman ángulos a lo largo de la costa, que probablemente influyen el flujo genético así como las distancias genéticas entre las localidades).

Tabla 4. *Distancias genéticas pareadas (Nei, 1972), para tres localidades de la población de Octopus maya.*

Localidades	El Cuyo	Sisal	Seybaplaya
El Cuyo	*		
Sisal	0.046	*	
Seybaplaya	0.082	0.049	*

Distancias genéticas pareadas (Nei, 1978), para tres localidades de la población de Octopus maya.

Localidades	El Cuyo	Sisal	Seybaplaya
El Cuyo	*		
Sisal	0.019	*	
Seybaplaya	0.055	0.032	*

Tanto las distancias obtenidas por el método de Nei '72 como las obtenidas por el de Nei '78 son congruentes al comparar los cuatro loci juntos: la menor distancia genética la encontramos entre “El Cuyo” y “Sisal”, ambas localidades se encuentran en la costa norte de Yucatán. La mayor distancia la presentan las localidades de “El Cuyo” y “Seybaplaya”, las cuales también muestran la mayor distancia geográfica.

Discusión.

Dos de los cuatro loci de microsatélites analizados mostraron divergencia entre las localidades de “Seybaplaya Campeche” y el “Cuyo Yucatán” los cuales son los puntos que se encuentran a ambos extremos del muestreo realizado, es decir los puntos genéticamente más distantes son también los puntos geográficamente más lejanos.

Como se observa en la Figura 1, los loci que muestran tales diferencias significativas en términos de frecuencias alélicas (F_{st}), son precisamente los loci que muestran mayor polimorfismo (mayor número de alelos por locus). Un polimorfismo alto está relacionado con una alta tasa de evolución. Si los loci más polimorfos son loci que están evolucionando más rápidamente, nos estarían proporcionando información de mutaciones muy recientes, indicando que ha ocurrido un proceso de divergencia y que los loci con una tasa de evolución más lenta no son capaces de identificarlo.

Cuando los loci fueron analizados de manera conjunta, las diferencias entre localidades no fueron significativas, y por lo tanto no es posible con estos datos, rechazar la hipótesis de

que la especie está conformada por una población genéticamente homogénea, sin embargo al existir loci divergentes, es real la posibilidad de encontrar nuevos loci que permitan una clara distinción entre poblaciones.

Las distancias genéticas de Nei '72 y Nei '78 son congruentes con los valores de F_{st} , ya que muestran que la distancia genética mayor ocurre en los extremos del muestreo.

Tales distancias son en órdenes de magnitud mayores a las distancias determinadas mediante el estudio de aloenzimas (Tello et al. 2007) donde van del 0.04% al 0.7%. Los microsatélites revelaron distancias que van de 1.9 al 5.5% de divergencia sugiriendo que éstos marcadores son más sensibles que las aloenzimas para identificar diferencias poblacionales en *O. maya*.

Con respecto al equilibrio H-W dentro de las localidades podemos observar que “El Cuyo” muestra un déficit significativo de heterocigotos en dos de tres loci, mientras que “Seybaplaya” sólo muestran déficit de heterocigotos en uno de los locus.

El déficit general de heterocigotos en la localidad de “El Cuyo” al Noreste de la Península de Yucatán puede tener varias causas como la presencia de endogamia ó que tales loci de microsatélite estén asociados a otras secuencias que se encuentran bajo selección natural, donde se favorece la homocigosis.

La endogamia puede generarse si la localidad tiene un número reducido de reproductores, aumentando la probabilidad de la reproducción entre individuos consanguíneos. En el caso de *O. maya*, la actividad pesquera puede ser un factor que facilite la endogamia, ya que al capturar grandes volúmenes de éste recurso año con año (sobre todo en los casos de pesca fuera de los periodos legales, cuando las probabilidades de capturar organismos pre-reproductores y de reducir el reclutamiento aumentan), las poblaciones tienen decrementos importantes no solo en sus tamaños sino también en los alelos disponibles a las siguientes generaciones.

Los valores de F_{is} , concuerdan con los resultados del equilibrio H-W, mostrando que “El

Cuyo” tiene los mayores valores de alelos idénticos en los individuos, haciendo evidente que en tal localidad existe cierto grado de endogamia, sin embargo éste acontecimiento pudiese ser compensado con la alta migración que mantiene con la localidad de “Sisal”. Existe migración suficiente entre éstas dos localidades, al grado de que éstas son genéticamente homogéneas. Se dice que esto juega un papel compensatorio ya que “Sisal” por el contrario muestra el mayor exceso de heterocigotos, es decir posee mayor variabilidad genética, por lo tanto, al tener un flujo genético con “El Cuyo”, “Sisal” está “inyectando” variabilidad genética a ésta localidad reduciendo continuamente los efectos de la endogamia.

“Seybaplaya” muestra valores de equilibrio en dos de tres loci analizados, mientras que Sisal muestra todos los loci en equilibrio. En general se puede decir que estas dos localidades se encuentran en equilibrio H-W y pudiese estar relacionado con que tales localidades tengan abundantes reproductores reduciendo la probabilidad de reproducción entre consanguíneos.

Es muy importante realizar el monitoreo de éstos índices de variabilidad genética en el futuro para corroborar si el déficit de heterocigotos continúa como una tendencia en la localidad de “El Cuyo,” y para conocer si se mantiene la migración con “Sisal”. Si se identifica tal tendencia y se observa una limitada conexión con la fuente de variabilidad, se tendrán que tomar medidas preventivas para evitar problemas graves de endogamia en “El Cuyo”.

También es muy importante continuar el estudio en localidades aún más extremas (con respecto al área de distribución de la especie) que las que aquí se analizaron, porque al observar una relación entre distancia genética y distancia geográfica es posible identificar más poblaciones divergentes a medida que abarquemos localidades geográficamente más distanciadas.

Aunque “Seybaplaya” y “El Cuyo” son divergentes según dos loci, ambas mantienen flujo genético con Sisal, haciéndolas parte de una misma meta-población, por lo tanto aún no se

recomienda hacer ajustes locales a los parámetros de pesca de éste recurso hasta no abarcar toda su área de distribución y encontrar una mayor proporción de loci divergentes en nuevos estudios y así tener la certeza de cómo se dan las conexiones entre las distintas localidades que conforman su área de distribución.

Estos resultados sugieren que la localidad “Sisal” es la fuente de variabilidad genética de la especie, y por lo tanto es un sitio candidato a ser un área protegida de éste recurso con el fin de preservar la mayor variabilidad genética. Si en el futuro alguna localidad sufriera de endogamia, pudiera contrarrestarse al introducir en tal sitio, reproductores provenientes de “Sisal” que aportarían mayor variabilidad genética en tal lugar.

Con respecto a estudios similares en distintas especies de cefalópodos, se obtuvieron valores de Heterocigosis Esperada entre 0.45 y .85, los cuales son muy cercanos a los obtenidos en *Octopus vulgaris* que van de 0.50 a 0.84, en un estudio donde se utilizó un locus de microsatélite (Maltagliati *et al.*, 2002). Mientras que la Heterocigosis Observada que va de 0.31 a 0.8, se mantiene en un rango cercano al reportado en *O. vulgaris* de 0.31 a 0.65 (Maltagliati *et al.* 2002). En tal estudio, Maltagliati encontró déficit de heterocigosis en la mayoría de las localidades que analizó, el presente estudio también presenta déficit de heterocigosis en la mayoría de los loci analizados, pero no en todas las localidades. Estos datos no apoyan la hipótesis de Maltagliati de que el déficit de heterocigotos es una tendencia dentro del grupo de los moluscos.

Aunque los valores de heterocigosis parecen altos, se han reportado valores aun mayores en especies tales como *Sepia officinalis* donde la Heterocigosis Observada fue de 62.5% (Shaw & Pérez-Losada, 2000; en Maltagliati *et al* 2002), *Loligo opalescens*, 77.2% (Reichow & Smith, 2001; en Maltagliati *et al* 2002), *L. forbesi*, 74% (Shaw *et al* 1999; en Maltagliati *et al* 2002), *L. pealeii* de 66 a 88% (Buresch *et al* 2006), etc. Las especies reportadas en estos casos coinciden en ser especies pelágicas con una capacidad de dispersión sobresaliente, que

favorece la migración y el flujo génico, contrarrestando la pérdida de variabilidad genética a través de deriva génica, incrementando la heterocigosis en sus poblaciones.

En cuanto a la divergencia genética de la población se ha observado un patrón general en donde los estudios que han encontrado diferencia genética significativa entre las localidades estudiadas, tal divergencia está relacionada con la presencia de barreras física, o hidrológicas entre tales localidades; mientras que los estudios que no muestran diferencias significativas entre las localidades estudiadas carecen de barreras físicas e hidrológicas evidentes, aunque existen excepciones (Buresch *et al* 2006). En este trabajo se observa divergencia significativa en los puntos extremos del muestreo en dos de cuatro loci, los cuales también son los más polimorficos y sugieren que la divergencia es muy reciente. Tal divergencia aparentemente ocurre en ausencia de barreras físicas y oceanográficas, sin embargo recientemente se han modelado giros en las corrientes oceanográficas que afectan en cierta medida el área de distribución de *O. maya*, facilitando la divergencia entre las localidades a los extremos del muestreo (Fig. 3). Este modelo muestra varios giros simultáneos dentro del Golfo de México, nótese el mes de mayo cuando se forman dos giros contiguos pero en sentido contrario a la mayor velocidad de todo el año, favoreciendo una dispersión divergente de *O. maya* ya que la población en tal momento del año suele estar dominada por organismos juveniles cuya dispersión es más susceptible a ser influenciada por las corrientes oceánicas. Este modelo explica parcialmente la causa de la divergencia de dos loci identificada en éste trabajo. Otro factor que facilitaría ésta divergencia en ausencia de barreras físicas evidentes es la capacidad limitada de dispersión que caracteriza a esta especie, ya que carece de etapa larvaria (Solís - Ramírez *et al.* 1997), reduciendo al mínimo su dispersión pasiva.

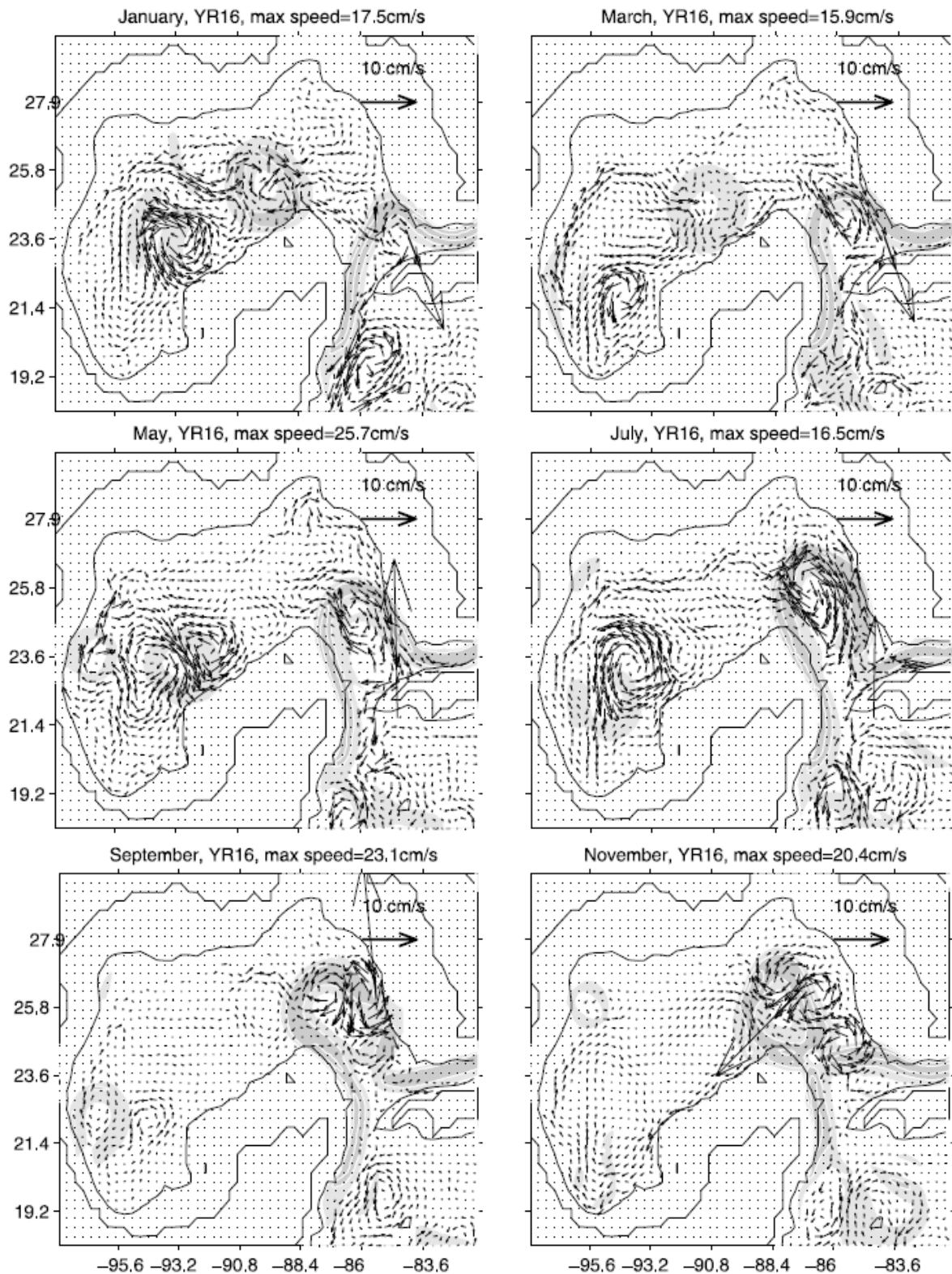


Figura 3. Modelo anual del patrón de circulación oceánica dentro del Golfo de México (Romanou *et al* 2004). Los vectores muestran la dirección de los giros de las corrientes, en la parte superior de los mapas se muestran las velocidades máximas de las corrientes en centímetros por segundo. Figura tomada de Romanou *et al* (2004).

Conclusión.

Según el análisis de cuatro loci de microsatélites, no se rechaza la hipótesis nula de que *O. maya* se compone de una población genéticamente homogénea, sin embargo se plantea que es posible rechazarla al analizar nuevos loci, ya que la mitad de los loci analizados resultaron divergentes. Aunque los puntos geográficamente extremos son genéticamente los más distantes, ambos tienen flujo génico con el punto central, formando una gran población, donde el centro de su distribución es aparentemente la fuente de variabilidad genética, la cual se reduce de manera que nos movemos a los extremos. El extremo Este de la Península de Yucatán muestra déficit significativo de heterocigotos en la mayoría de los loci analizados y valores positivos de endogamia, éstos valores deben ser corroborados en estudios de nuevos loci.

Es muy importante continuar este tipo de estudios utilizando microsatélites a través del tiempo, y abarcando el mayor espacio de su distribución para identificar las tendencias microevolutivas de la población y para hacer planes eficientes de manejo del recurso a largo plazo.

Referencias

- Akemi A., Pereira J., Angelici C., Gobbi A., Romero C. & Gimenes M. (2006) Heterologous microsatellite primer pairs informative for the whole genus *Arachis*. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 4: 665-675.
- Avise J. (2004) *Molecular markers, natural history and evolution*. Second Edition. Sinauer Associates. USA. pp 92-93.
- Begg G., Friedland K., Pearce J. (1999) Stock identification and its role in stock assessment and fisheries management: an overview. *Fisheries Research* 43: 1-8.
- Beidler J., Hilliard P. & Rill R. (1982) Ultra sensitive staining of nucleic acids with silver. *Analytical Biochemistry* 196: 374-380.
- Brookfield J. (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency, *Molecular Ecology*, 5: 453-455.
- Buresch K., Gerlach G. & 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. *Marine Ecology Progress Series*. Vol. 310: 263-270.
- Casu M., Maltagliati F., Meloni M., Casu D., Binelli G., Curini-Gallietti M., Castelli A. (2002) Genetic Structure of *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) from Mediterranean Sea as revealed by a microsatellite locus. *Italian Journal of Zoology*, 69: 295-300.
- Cockerham C. & Weir B. (1987) Correlations, descent measures: Drift with migration and mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA. Vol. 84: 8512-8514.
- Creste S., Tulmann A. & Figueira A. (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequence gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 299-306.
- Forbes S., Hogg J., Buchanan F., Crawford A. & Allendorf F. (1995) Microsatellite evolution in congeneric mammals: Domestic and Bighorn Sheep. *Molecular Biology and Evolution*. 12(6): 1106-1113.
- Greatorex E., Jones C., Murphy J., Key L., Emery A., & Boyle P. (2000) Microsatellite markers for investigating population structure in *Octopus vulgaris* (Mollusca: Cephalopoda). *Molecular Ecology*, 9: 641-642.
- Guo S. & Thompson E. (1992) Performing the exact test of Hardy – Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372.
- Guzik T., Norman M. & Crozier R. (2005) Molecular phylogeny of the benthic shallow-water octopuses (Cephalopoda: Octopodinae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 37: 235-248.
- Hille A., Janssen I., Menken S., Schlegel M. & and Thorpe R. (2002) Heterologous Amplification of Microsatellite Markers From Colubroid Snakes in European Natricines (Serpentes: Natricinae). *The Journal of Heredity* 93(1): 63-66.

Kassahn K., Donellan S., Fowler A., Hall K., Adams M. & Shaw P. (2003) Molecular and morphological analyses of the cuttlefish *Sepia apama* indicate a complex population structure. *Marine Biology*.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. *Bulletin of Marine Sciences*, 7(1): 473-486.

Nei M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-90.

Pérez M., Wakida A., Burgos R., Santos J., Cervera K., Espinosa J., Mena C., Ramírez F., Cob E. & Medina M. (2005) Evaluación de la población de pulpo (*Octopus maya*) en la península de Yucatán 2005. Secretaría de Agricultura, Ganadería y desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de la Pesca.

Pérez M., Burgos R., Wakida A. & Santos J. (2006) Evaluación de la población de pulpo (*Octopus maya*) en la península de Yucatán 2006. Secretaría de Agricultura, Ganadería y desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de la Pesca.

Pérez - Losada M., Guerra A. & Sanjuan A. (2002) Allozyme divergence supporting the taxonomic separation of *Octopus mimus* and *Octopus maya* from *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopoda). *Bulletin of Marine Science*. 71(2): 653-664.

Romanou A., Chassignet E. & Sturges W. Gulf of Mexico circulation within a high-resolution numerical simulation of the North Atlantic Ocean. *Journal of Geophysical Research*. Vol. 109: 1-25.

Slatkin M. (1995) A Measure of Population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencies. *Genetics* 139: 457-462

Solís – Ramírez M., Arreguín – Sánchez F. & Seijo J (1997). Pesquería de pulpo de la plataforma continental de Yucatán, p. 61-80. En: Flores-Hernández D., Sánchez-Gil P., Seijo J. & 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.

Söller R., Warnke K., Saint-Paul U., Blohm D., (2000). Sequence divergence of mitochondrial DNA indicates cryptic biodiversity in *Octopus vulgaris* and supports the taxonomic distinctiveness of *Octopus mimus* (Cephalopoda: Octopodidae). *Marine Biology*. 136 (1): 29–35.

Tello J., Escamilla J., Rodríguez L., Góngora A. & Carrillo J. (2007) Estructura Genética del Pulpo *Octopus maya* en los Estados de Campeche y Yucatán en la Península de Yucatán. *Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute*. Vol. 58: 387-391.

Weir B. & Cockerham C. (1984) Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*. Vol. 38, No. 6: 1358-1370.

Imágenes

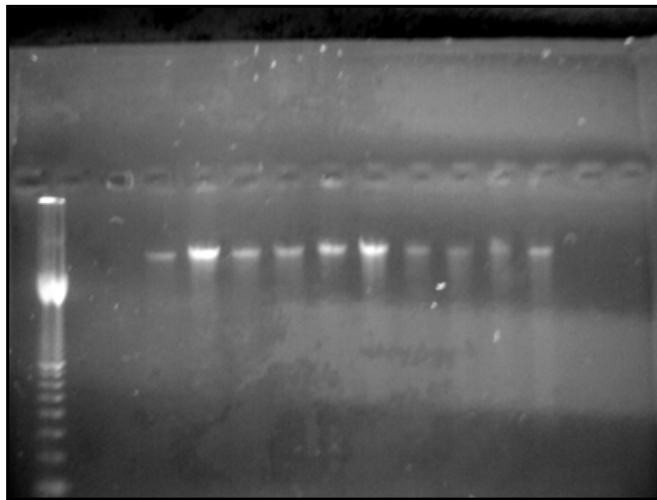
Capítulo I

Captura del pulpo *Octopus maya*.



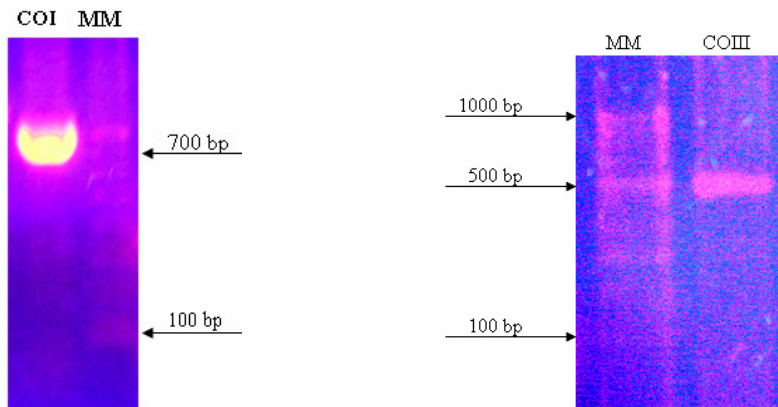
La imagen muestra la captura por el método artesanal utilizando una jaiba como carnada.

Extracción de ADN de *O. maya*



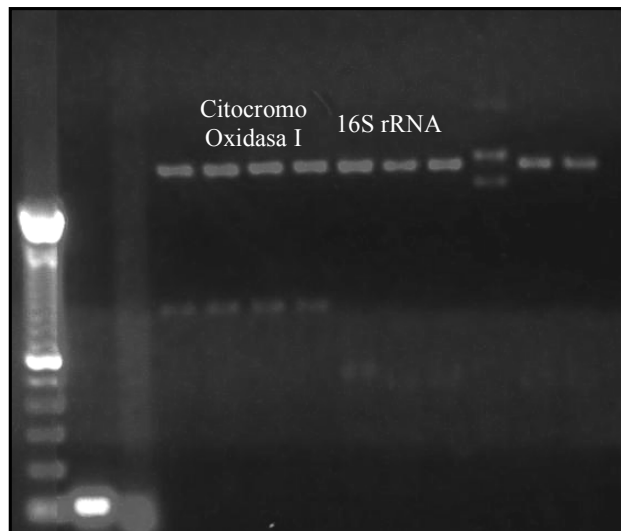
Extracción de ADN genómico de distintos individuos de *O. maya*.

Amplificación de genes



Amplificación de los genes citocromo oxidasa I (izquierda) y citocromo oxidasa III (derecha), teñidos con bromuro de etidio.

Plásmidos e Insertos



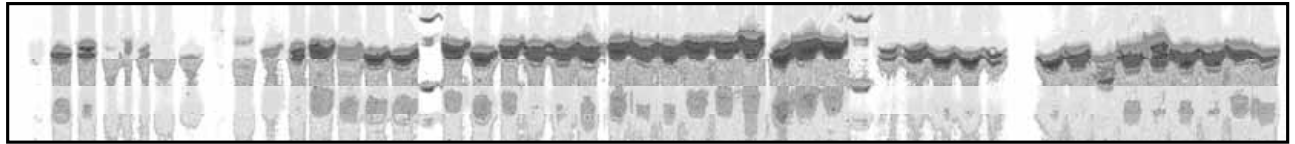
Digestión con EcoRI de los vectores de clonación, las bandas superiores corresponden a los plásmidos y las bandas inferiores corresponden a los genes (insertos). Ignorar los primeros dos carriles, los siguientes cuatro corresponden a la COI y tres siguientes a la 16S rRNA.

Capítulo II

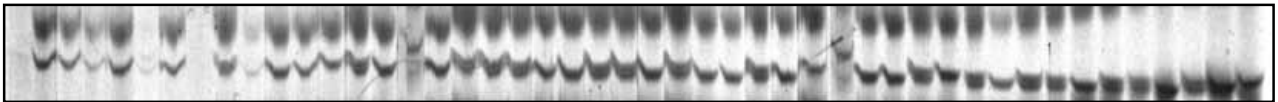
Visualización de alelos de microsatélite.



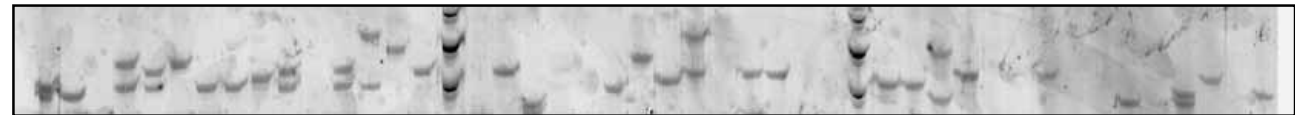
Locus 1



Locus 2



Locus 3



Locus 4

Amplificación y visualización en geles de poliacrilamida – urea, de 4 distintos loci de microsatélites, en la población natural de *O. maya*.

APÉNDICE I

Rápido y eficiente método de extracción de ADN de *Octopus maya*

Introducción.

La clase Cefalópoda (Phylum Mollusca), es un grupo morfológicamente muy diverso. La resolución de su filogenia se ha dificultado por la presencia de homoplasias entre sus caracteres morfológicos, en conjunto con un registro fósil muy pobre (Strugnell *et al*, 2005). Por lo tanto los caracteres morfológicos en los cefalópodos resultan insuficientes para comprender sus relaciones evolutivas así como los procesos microevolutivos que ocurren en sus poblaciones debido a la gran plasticidad fenotípica que presentan a nivel de especie.

Los caracteres moleculares como las secuencias de ADN han resultado muy útiles tanto para esclarecer tales relaciones evolutivas, así como para identificar eventos de divergencia entre poblaciones, ya que comparando secuencias específicas de ADN es posible agrupar tanto especies y poblaciones a través de sus mutaciones compartidas en el material hereditario (Avice, 2004). Para realizar un estudio filogenético robusto es necesaria la extracción de ADN genómico integro, ya que involucra la comparación de largas secuencias de ADN. Al comprar la misma secuencia en distintas especies o poblaciones, tal secuencia podría ser muy similar, o conservada, en los organismos que se estén comparando y sean solo algunos sitios en la secuencia los que presenten mutaciones, por lo tanto entre más nucleótidos sean incluidos en la comparación de secuencias, tal comparación será más informativa (Avice, 2004).

Un estudio poblacional por otro lado requiere de la extracción de numerosos individuos, siendo este paso en la investigación el que en algunas ocasiones consume mayor tiempo y recursos económicos.

Los kits comerciales de extracción de ADN logran obtener material genético de buena calidad en tejidos de cefalópodos sin embargo estos kits suelen ser costosos, y para un estudio poblacional que incluya una gran cantidad de individuos también involucra una gran inversión monetaria.

Alternativamente existen varios métodos de extracción de ADN, efectivos en diversas especies pero que en *Octopus maya*, no han mostrado extracciones óptimas (reportadas en este estudio).

El tejido de músculo fresco congelado de los brazos o tentáculos de los cefalópodos es una excelente fuente para extraer ADN puro de buena calidad, sin embargo, los pulpos en relación a otros cefalópodos, presentan altos niveles de proteína muscular, baja solubilidad de las proteínas musculares, así como la formación de agregados proteicos cuando el músculo es congelado (Ruiz – Capillas *et al*, 2003) siendo las proteínas el componente histológico más complicado de digerir y excluir durante la extracción, interfiriendo en la purificación del ADN.

El presente protocolo es una alternativa a los kits de extracción de ADN ya que es posible obtener ADN genómico de una calidad, concentración y pureza equiparable a la de los kits o incluso superior, y extracciones más puras en comparación con otros protocolos utilizados en *Octopus maya*, además de ser un método que consume relativamente poco tiempo.

Material y Método.

Origen del tejido

Para la extracción de ADN genómico se utilizaron 20mg. de músculo fresco de brazo de pulpo *Octopus maya*, capturado frente a la costa de Sisal Yucatán, México; congelado con nitrógeno líquido y almacenado a -80°C .

Reactivos

- 1 Buffer de extracción de ADN: 100 mM Tris-HCl (pH 8); 50 mM EDTA (pH 8); 500 mM NaCl; 2% SDS (w/v); 2% b-mercaptoetanol (v/v).
- 2 Proteinasa K (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
- 3 RNAsa (Promega $\text{\textcircled{R}}$)
- 4 Fenol – Cloroformo (1:1)
- 5 Eter de Petróleo
- 6 Acetato de Sodio 3M
- 7 Etanol 100% y 70%

Protocolo de extracción

1. El tejido se coloca en un mortero estéril, se vierte una pequeña cantidad de nitrógeno líquido y se macera con un pistilo estéril. Se añaden 400 μL de Buffer de extracción de ADN, se homogeniza utilizando el pistilo y se recupera el homogenizado en un tubo de 1.5 mL.
2. Se añaden 20 μL Proteinasa K, y se incuban los tubos en baño maría a 65°C , hasta que el tejido quede totalmente digerido (aproximadamente 15 minutos).
3. Se añaden 2 μL de RNAsa y se incuban los tubos a 37°C por 10 minutos.
4. Se agregan 500 μL de fenol – cloroformo (1:1), los tubos se invierten varias veces de manera gentil y se centrifugan a 12 000 g por 3 minutos, se recupera la fase superior y se pasa a un tubo nuevo.
5. Repetir la extracción con fenol - cloroformo dos veces más.
6. Se añaden 500 μL de éter de petróleo, los tubos se invierten varias veces de forma gentil y se centrifugan a 12 000 g por 3 minutos. Se desecha la fase acuosa totalmente.
7. Se añaden 50 μL de acetato de sodio 3M y agitar los tubos ligeramente.
8. Se adiciona 1000 μL de etanol al 100%, los tubo se incuban a -20°C durante toda la noche. Se centrifugan los tubos a 14 000 r x m, por 10 minutos. Se descarta el etanol.
9. Se lava la pastilla de ADN adicionando 1000 μL de etanol al 70%, se centrifugan los tubos a 14 000 rxm por 10 minutos y se elimina el etanol.
10. Resuspender la pastilla de ADN en 25 μL de agua pura.

Comparación con otros protocolos

Se extrajo el ADN genómico de *Octopus maya*, mediante el presente protocolo y por los siguientes protocolos: a) Manual Técnico del kit de purificación de ADN genómico WizardTM (Promega $\text{\textcircled{R}}$), b) Protocolo de AquaPure Genomic DNA KitTM (Bio – Rad $\text{\textcircled{R}}$), c) Protocolo de Rong – Cheng, L. *et al.* 2001, y d) Protocolo de Kocher *et al.* 1989.

Para la extracción se utilizó 20mg de tejido muscular fresco de brazo de *Octopus maya*. La concentración de ADN de las extracciones se midió en un espectrofotómetro a 260nm y se obtuvo el cociente 260 / 280 nm (Stephenson 2003) para verificar la pureza del ADN extraído.

Para comparar la calidad de los distintos protocolos de extracción se realizó una electroforesis en agarosa al 1.2%, se cargaron en el gel cada una de las extracciones con, distintos volúmenes de ADN por extracción, de tal modo que todas tuvieran la misma concentración de ADN (440 ng/μL).

Amplificación por PCR de COIII y COI de Octopus maya

Tras la extracción del ADN genómico de *Octopus maya* mediante el presente protocolo y utilizando primers diseñados para amplificar los genes de la Citocromo oxidasa I y Citocromo oxidasa III (la secuencia de los primers, se otorga bajo petición) se realizaron PCR en un volumen final de 15 μL conteniendo 7.5 μL de JumpStart™ PCR reaction Mix (Sigma), 1μL de cada primer (25 pM), 1μL de ADN molde (250 ng/μL) y 4.5 μL de agua (Sigma). La amplificación con ambos juegos de primers, se realizó mediante desnaturalización del ADN a 94° C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 93 ° C por 30 segundos, 55 ° C por 30 segundos y 72 ° C por 2 minutos y con una extensión final a 72° C por 10 minutos.

Resultados y Discusión.

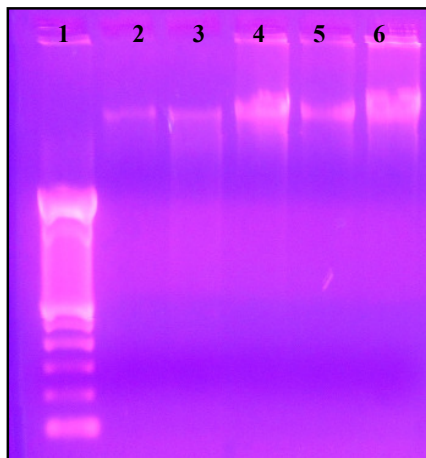
Las extracciones con los métodos previamente reportados lograron extraer entre 110 - 459 ng/μL de ADN y obtuvieron cocientes 260 / 280nm menores a 1.8, con excepción del protocolo de Kocher *et al.* 1989, cuyo cociente fue de 2.09. Con éste protocolo se obtuvo una concentración de 1127 ng/μL y un cociente 260 / 280nm de 1.87, siendo este protocolo el que logró obtener ADN de mayor pureza (Stephenson 2003).

La Figura 1, muestra las distintas extracciones de ADN genómico tras la electroforesis en agarosa al 1.2%. El ADN obtenido mediante éste protocolo (carril 6) no muestra barridos (véase el barrido de el tercer carril) ni señales de degradación.

En cuanto al tiempo de la extracción, los protocolos proporcionados en los kits comerciales logran extracciones sumamente rápidas, incluso con ellos se pueden realizar más de una sesión de extracciones al día, al igual que con protocolo de Rong – Cheng *et al.* (2001). Los protocolos Kocher *et al.* 1989 (dos noches de precipitación del ADN) y el presente (una noche de precipitación del ADN), sacrifican tiempo pero obtienen mejores resultados en cuanto a concentración y pureza del material genético.

Tras la extracción del ADN genómico y su uso directo en PCR, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 700 pb de gen de la Citocromo oxidasa I y un fragmento de aproximadamente 500 pb de gen de la Citocromo oxidasa III de *Octopus maya*.

Figura 1. Electroforesis en agarosa al 1.2%, extracciones de ADN genómico de O. maya, por distintos protocolos: 1) Marcador 100 pb, 2) Wizard[®] (Promega), 3) AquaPure Genomic DNA Kit (Bio – Rad), 4) Kocher *et al.* (1989), 5) Rong – Cheng *et al.* (2001), 6) presente protocolo.



Todos los protocolos logran obtener una buena calidad de ADN, pero se puede apreciar que en el sexto “carril” la banda es más gruesa que las demás.

Conclusión.

El presente protocolo, es un método rápido y efectivo para aislar ADN genómico de *Octopus maya*, con el que fue posible extraer cerca de 25µg de ADN por cada 20mg de tejido, tal ADN además de ser muy abundante fue bastante puro con un cociente cercano al 1.8 el cual indica ADN totalmente puro (Stephenson, 2003), por lo tanto puede ser usado en reacciones PCR directamente, sin tratamientos adicionales de purificación. Éste protocolo utiliza reactivos muy accesibles para la mayoría de los laboratorios, esta es una ventaja ya que los kits de extracción suelen ser costosos.

Bibliografía

Awise, J. (2004) Molecular Markers, Natural History and Evolution. Sinauer. Segunda Edición. USA. pp: 5 – 20.

Kocher, T., Thomas, K., Meyer, A., Edwards, V., Villablanca, F., 1989. dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. V 86, 6196-6200

Rong – Cheng, L. Zai – Song, D; Liang – Bi, L; Ting – Yun, K. (2001) A Rapid and Efficient DNA Minipreparation Suitable for Screening Transgenic Plants. Plant Molecular Biology Reporter 19: 379a–379e.

Ruiz – Capillas, C; Moral, A; Morales, J; Montero, P. (2003) Characterization and Functionality of Frozen Muscle Protein in Volador (*Illex coindetii*), Pota (*Todaropsis eblanae*), and Octopus (*Eledone cirrhosa*). Journal of Food Science. Vol 68, Nr. 7.

Stephenson, F. (2003) Calculations in molecular Biology and Biotechnology. Academic press. USA. pp: 91 – 92.

Strugnell, J; Norman, M; Jackson, J; Drummond, A; Cooper, A. (2005) Molecular phylogeny of coleoid cephalopods using a multigene approach; the effect of data partitioning on resolving phylogenies in a Bayesian framework. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37. 426 – 441.

Apéndice II

Silver stain detection of SSRs in denaturing polyacrilamide gels

Adaptado de Creste *et al* 2001, (el cual es una adaptación de Beidler *et al.* 1982) por J. Kornelis van Dijk

Gel de corrida:

Soluciones stock :

Etanol ácido 0.5% Ácido Acético Glaciar en 95 % Etanol
(500µl in 100ml)

Solución

Acrilamida : Urea 29 g. acrilamida
1 g. Bis acrilamida
100 ml H₂O ultrapura
50 ml 10 x TBE
210 g urea
H₂O ultrapura to 500ml
Filtrar con papel, almacenar a 4°C (botella oscura)

Buffer Desnaturalizante 49 ml 98% formamida desionizada, 1 ml (10mM) 0.5M
EDTA pH 8
0.125 gr (0.25%) Azul de Bromofenol
0.125 gr (0.25%) Xylenecyanol

1. Tratar la placa de cristal con 4 µl de “Bind Silane” en 1 ml de etanol ácido.
2. Después de 5 minutos limpiar la placa con ethanol al 95%.
3. Tratar la placa plástica con 1 ml de “Sigmacote” y limpiar 5 minutos después con ethanol al 95%.
4. Preparar gel (6% Poliacrilamida, 7 M urea) mezclando 90 ml de la solución acrilamida: urea con 90µl de persulfato de amonio al 25% y 90µl TEMED (1µl por ml de gel).
5. Introducir el gel en el espacio entre ambas placas del la celda y dejar polimerizar por lo menos una hora.
6. Pre-correr el gel a 80-85 W (85 mA, 1900 V) por 60 minutos, hasta que la temperatura del gel llegue a los 50°C en un buffer de corrida TBE 1X.
7. Añadir 30 µl de colorante de carga a 20µl de reacción de amplificación, desnaturalizar por 3 minutos a 95°C. posteriormente poner las muestras en hielo.
8. Aplicar la muestra (5-8µl) en el gel.
9. Correr el gel a 80-85W por 100-150 minutos a 45-50°C.

Tinción del gel:

Soluciones stock:

Solución de Fijación:	Ethanol 10%, Ácido Acético 1%	(5x usable)
Solución de tratamiento previo:	Ácido Nítrico al 1.5%	(5x usable)
Solución de Tinción:	AgNO ₃ al 2%, 1.5 ml formaldehído al 37%	(6x usable)
Solución de revelado:	30 g Na ₂ CO ₃ ; Aforar a un litro con H ₂ O ultrapura. Antes de usarse; añadir 1.5 ml 37% formaldehído y 1 ml tiosulfato (20 mg/ml). Usar la solución fresca y fría.	
Solución “Stop” para detener la reacción:	Ácido acético al 5%	(5x usable)

1. Fijar el gel por 10 minutos con la solución de fijación (1 litro).
2. Lavar el gel con H₂O ultrapura por un minuto.
3. Tratar el gel con un litro de la solución de tratamiento previo por 3 minutos agitando gentilmente.
4. Lavar el gel con un litro de H₂O ultrapura por un minuto.
5. Impregnar el gel con un litro de la solución de tinción, por 25 minutos agitando gentilmente.
6. Lavar el gel por 15 segundos (1x) con H₂O ultrapura.
7. Revelar el gel aplicando la solución de revelado (12°C) y agitar gentilmente por 10- 15 minutos hasta que las bandas aparezcan con la intensidad deseada. Remover la solución.
8. Detener la reacción de revelado con un litro de solución “Stop”, por 5 minutos.
9. Lavar el gel con un litro de H₂O ultrapura.
10. Dejar secar el gel durante toda la noche.
11. Escanear el gel.

Referencias

Beidler J., Hilliard P. & Rill R. (1982) Ultra sensitive staining of nucleic acids with silver. *Analytical Biochemistry* 196: 374-380.

Creste S, Tulmann A. & Figueira A. (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequence gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 299-306.

Glosario

ADN (ácido desoxirribonucleico): Polímero compuesto normalmente por 4 tipos de desoxirribonucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster, el cual codifica la información genética. En estado nativo, el ADN es una doble hélice formada por dos cadenas antiparalelas. Es la molécula biológica en la que reside la información genética de todos los seres vivos y se encuentra formando parte de los llamados cromosomas, que son a su vez estructuras que se localizan en el núcleo de las células de animales y vegetales superiores.

ARN (ácido ribonucleico): polímero de ribonucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster, se forman por la transcripción del ADN o en algunos virus por la copia de una ARN molde. Existen tres tipos de ARN celulares ARN ribosomal, ARN mensajero y ARN de transferencia cumplen diferentes funciones en la síntesis de Proteínas.

Alelo: Son las formas alternativas de un gen o de una secuencia específica.

Alloenzima: Son las formas alternativas de una enzima específica.

Amplificación de secuencias: Proceso por el cual fragmentos de ADN pueden ser multiplicados. Los procesos normales involucran técnicas como PCR o clonación en organismos de reproducción rápida.

Árbol Filogenético: es la representación gráfica de las relaciones entre las especies, en base a las similitudes y diferencias de sus características.

Cefalópodo: del griego κεφαλή (*kephalé*), "cabeza" y ποδός (*podós*), "pie", son una clase de invertebrados marinos dentro del filo de los moluscos. Existen cerca de 800 especies, comúnmente llamados pulpos, calamares, sepias y nautilus.

Clonación (molecular) de ADN: Conjunto de métodos que permite la incorporación y eventual amplificación, a través de su replicación repetida, de un fragmento específico (una molécula) de ADN en un organismo, y su eventual transferencia a su progenie. Esta técnica permite así obtener una población o clona de organismos en donde todos ellos llevan una copia de la molécula original de DNA. Constituye uno de los procedimientos centrales de las técnicas de la ingeniería genética.

Citocromo Oxidasa: proteína involucrada en el proceso que genera energía biológica. En los organismos eucariontes generalmente se localiza en las mitocondrias.

Codón: Secuencia de tres nucleótidos en el ADN o ARN que codifica para un aminoácido durante la transcripción o traducción, también se le conoce como triplete. De los 64 posibles codones, tres de ellos son codones de alto que no son específicos para ningún aminoácido. Los aminoácidos correspondientes para cada codón son casi iguales en todos los organismos, a esto se conoce como código genético universal

Congenerico: que corresponden al mismo género dentro de la clasificación jerárquica de los organismos.

Cuello de botella genético: Cuando una población decrece rápidamente, también decrece su variabilidad genética, reduciendo así la variabilidad de las siguientes generaciones, a través de la endogamia.

Delección: Pérdida de un segmento en la secuencia de ADN.

Deriva génica: Cambios aleatorios en las frecuencias alélicas dentro de una población debido a la variación en la muestra de gametos de una generación a otra.

Distancia genética: Porcentaje de diferenciación entre dos o más moléculas de ADN, o dos o más proteínas.

Dímero: Enlace entre dos moléculas similares o monómeros.

Electroforesis: Separación de un grupo de moléculas por medio de su migración a través de una matriz polimérica, por medio de la aplicación de un campo eléctrico.

Endémico(a): Especie biológica exclusiva de un lugar, área o región geográfica, y que no se encuentra de forma natural en ninguna otra parte del mundo.

Endogamia: Es la reproducción entre organismos consanguíneos, que resulta en la pérdida de variabilidad genética en las poblaciones. En las poblaciones que han sufrido de endogamia, predominan los alelos idénticos por descendencia. Algunas consecuencias de la endogamia, relacionadas con la pérdida de variabilidad genética son decrementos en el crecimiento, sobrevivencia y fertilidad de la progenie.

Estructura genética: Existencia de dos o más grupos genéticamente aislados (en ausencia de flujo génico), que conforman a una especie.

Enzima de restricción: Enzima que reconoce y rompe secuencias pequeñas específicas dentro de la molécula de doble cadena del ADN (sitio de restricción). Estas enzimas están ampliamente distribuidas en bacterias y se usan en técnicas de biología molecular.

Filogenia: Estudio de las relaciones entre las especies.

Flujo génico: Es la reproducción de un organismo emigrante en una localidad foránea. De ésta forma el emigrante transporta material genético de una localidad a otra y por lo tanto ambas localidades comparten ciertos alelos. Es suficiente un que un emigrante por generación se reproduzca en una localidad foránea para que ambas localidades se consideren parte de una misma población.

Gen: Unidad física y funcional de la herencia, que lleva información de una generación a la siguiente. En términos moleculares un gen es la secuencia de ADN necesaria para la síntesis de un polipéptido funcional o una molécula de ARN.

GenBank: Base de datos pública del National Institutes of Health de Estados Unidos de América, que publica secuencias de ADN y proteínas de cualquier organismo (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

Genoma: El conjunto de todo el material genético que tiene un organismo vivo en cada una de sus células. En el caso de las bacterias es el material genético presente en su único cromosoma.

Genotipo: Constitución genética total de una célula o un organismo. También se denomina así a los alelos de uno o más loci específicos.

Heterocigosis: En organismos diploides, para un determinado locus, el alelo paterno y el materno son distintos.

Homocigosis: En organismos diploides, para un determinado locus, el alelo paterno y el materno son iguales.

Loci: Conjunto de locus.

Locus: Sitio específico de localización de un gen dentro del cromosoma. Todos los alelos de un gen en particular ocupan el mismo locus.

Loop: Estructura en forma de bucle generada en una secuencia de ADN debido a que algunos de sus nucleótidos se enlazan entre sí.

Marcador molecular: Fragmentos específicos de material genético (ADN o ARN) que se utilizan para la clasificación de organismos vivos.

Mitocondria: Organelo de las células eucariotas cuya función principal es proporcionar energía a la célula.

Microsatélite: Son pequeñas secuencias (usualmente conformadas por dos, tres o cuatro nucleótidos) que se repiten de manera consecutiva en una locación particular de los cromosomas, con variación en el número de copias repetidas que dan lugar a distintos alelos (frecuentemente más de 20 en poblaciones naturales), proporcionando datos genotípicos de los organismos.

Molde: Secuencia de ADN que sirve como guía para la síntesis de moléculas de ADN complementario o ARN durante la replicación o la transcripción.

Mutación: Cambio en la secuencia ADN de un organismo, usualmente en un solo gen que lleva a un cambio en, o la pérdida de su función normal. Las mutaciones son causa de variación hereditaria y, por ende, en parte también de la evolución. Se sabe que todos los organismos experimentan mutaciones en su ADN debido a factores ambientales, tales como las radiaciones solares, interacción con productos químicos o infecciones virales. Son varios los tipos de cambios que puede sufrir el ADN, y éstos pueden alterar desde un solo nucleótido, hasta cromosomas completos.

Nucleótido: Monómero de los ácidos nucleicos ADN y ARN, compuestos por una base, un azúcar y un fosfato. Existen cinco bases nitrogenadas en los ácidos nucleicos de los seres vivos; tres de ellas guanina (G), citosina (C) y adenina (A) están presentes en el ADN y ARN. Además, en el ADN existe también timina (T) y en el ARN en vez de timina hay uracilo (U).

Oligonucleótido: Molécula de DNA de bajo número (de 5 a 200) de nucleótidos. Se utilizan como cebadores en procesos de polimerización y amplificación de ADN, por técnicas de PCR.

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa): Técnica para la amplificación específica de un segmento de ADN dentro de una mezcla compleja por medio de varios ciclos de síntesis de ADN por la ADN polimerasa de *Thermophilus* a partir de pequeños cebadores de ADN. Seguidos por calentamiento para separar las cadenas complementarias y llevar a cabo un nuevo ciclo de síntesis.

Pirimidina: Molécula formada por un anillo heterocíclico que se encuentra en los ácidos nucleicos, las pirimidinas que normalmente se encuentran en el ADN son citosina y timina en el ARN esta última es reemplazada por uracilo.

Plásmido: Molécula de ADN circular extracromosomal capaz de auto replicarse dentro de una célula, comúnmente utilizado como vector de clonación.

Primers (o cebadores): Oligonucleótido que contiene un grupo extremo 3' libre que es complementario con una cadena molde de ADN y funciona como punto de inicio para la adición de nucleótidos para copiar la cadena molde en la PCR.

Purina: Compuesto básico que contiene dos anillos heterocíclicos unidos y que se presenta en los ácidos nucleicos, las purinas normalmente encontradas en ADN y ARN son adenina y guanina.

Polimórfico: Que presenta más de una forma.

Taxa: Conjunto de taxones, en éste trabajo un taxón se refiere a una especie.

Transición: Mutación en la que una pirimidina es sustituida por una diferente, ó una purina es sustituida por una purina diferente.

Transversión: Mutación en la cual una pirimidina es sustituida por una purina o viceversa.

Transformación: Alteración del fenotipo de un organismo como resultado de la inclusión de ADN foráneo.

Vector de Clonación: Elemento genético que se replica dentro del organismo huésped, usado para introducir ADN dentro de una célula huésped con el propósito de clonarlo. Los vectores más usados son plásmidos, cósmidos, YAC's y genomas de bacteriófagos modificados.

16S rRNA (Subunidad 16S de ARN ribosomal): Molécula de RNA presente en la mitocondria que participa en el ensamblaje de las proteínas, ya que es parte estructural y funcional del ribosoma.