



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México

**ANALISIS DE LA VARIABILIDAD INTRAESPECIFICA DURANTE LA FASE
EXPONENCIAL DE CRECIMIENTO DE LOS JUVENILES DE *Octopus maya* A
TRAVES DE LOS MODELOS DE CRECIMIENTO, MARCADORES
MOLECULARES Y BALANCE DE ENERGIA**

T E S I S

que para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias
(Biología Marina)

p r e s e n t a

Lic. Felipe Andrés Briceño Jacques

Director de Tesis: Dr. Carlos Rosas Vázquez

Comité Tutorial: Dr. Roberto Arreguín Espinoza

Dra. María Leticia Arena Ortíz

Dra. Maite Mascaró Miquelajauregui

Dra. Cristina Pascual Jiménez

México D.F., 2009



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.

Este trabajo fue realizado en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI) de la U.N.A.M. con sede en Sisal (Estado de Yucatán), bajo la dirección del Dr. Carlos Rosas Vázquez y con el apoyo de los siguientes proyectos: PAPIIT IN 202909 y CONACYT-Basico (CB-2005-01-50118), ambos otorgados al Dr. Carlos Rosas. Se agradece su participación en el proyecto a los siguientes técnicos académicos: Programa Pulpo: Biol. Claudia Caamal, Ing. Richard Mena e Ing. Luis Lázaro Jiménez Yan; Laboratorio Central: M.en C. Ariadna Berenice Sánchez Arteaga y Biol. Honorio Cruz López; Laboratorio de Biología Molecular: Dr. Gabriel Lizama; Laboratorio de Ecología: M. en C. Maribel Badillo.

El desarrollo de la presente maestría fue posible gracias al Programa de Becas de Posgrado de la Organización de Estados Americanos (OEA) (2007 – 2009).

Se agradece a las siguientes instituciones el financiamiento brindado para la realización de la estancia de investigación en el *Tasmanian Aquaculture Fisheries Institute* (TAFI) de la Universidad de Tasmania (abril – julio 2009): Al Programa de Movilidad Internacional de Estudiantes (PROMIE) de la Coordinación de Estudios de Posgrado de la UNAM, junto con el apoyo económico Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología de de la misma institución. A la OEA por financiar el viaje hacia Tasmania.

Dedicado a mis vivos y a mis muertos, en ellos descansa mi futuro

AGRADECIMIENTOS

A mí padres y hermanos, menores y mayores: por todo el cariño y fuerza entregada en estos dos importantes años de mi vida; por creer en mis sueños y siempre cultivarlos, por hacer de la distancia distancia unos cuantos kilómetros. Por darme el título de “ciudadano del mundo” y “satélite”, permitiéndose siempre aventurarme a lo inalcanzable.

A mi supervisor, Dr. Carlos Rosas Vázquez y al Comité Tutorial: Dr. Roberto Arreguín S., Dra. Leticia Arena O., Dra. Maite Mascaró M. y Dra. Cristina Pascual J. A todos ellos mis más sinceros agradecimientos por compartir conmigo sus conocimientos durante las diferentes fases de mi maestría. A dos personas que hicieron que literalmente “la raza hablara por el espíritu”: a Carlos Rosas, por creer en mí, mostrarme el vaso siempre “medio lleno”, por su misticismo, paciencia y americanismo, por hacer del CIAC una realidad, por enseñarme que la ciencia se hace con la cabeza en conjunto con el corazón. A Maite, por mostrarme las probabilidades de encontrar los vientos correctos para “izar las velas”; por invitarme a filosofar y reflexionar en una escala exponencial y por evidenciar que los modelos de crecimiento son completamente vivenciales. A ambos mil gracias, por siempre abrir la puerta ante mi mar de dudas.

A los técnicos académicos que me ayudaron en la realización de las etapas de este proyecto: Bio. Claudia Caamal, Ing. Richard Mena, Ing. Luis Lázaro Jimenez Yan, Bio. Marcos Ponce e Iván Hernández del Programa Pulpo, siempre dispuestos a ayudarme (¡grande pulperos!); a la M.C Ariadna Sánchez y al Bio. Honorio Cruz del Laboratorio Central por su amabilidad y simpatía; al Dr. Gabriel Lizama del Laboratorio de Biología Molecular y a la M.C Maribel Badillo del Laboratorio de Ecología por su ayuda durante las respirometrías. A la Leti Arena, al Dr. Lizama y a la Vet. Gabriela Chávez por mostrarme las bondades de la genética y por mover los engranajes del Despliegue Diferencial.

Al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología (PCMyL), liderado por Dr. Vilaclara, y a todo el equipo de mujeres que contribuyeron minimizar las distancias entre el posgrado y la UMDI: a Diana Juárez por su amistad y su atención; a Gabriela Almaráz por la ayuda en los fondos obtenidos; a Lupita Godoy y Chantal Ruiz por su amabilidad y paciencia ante mi ignorancia administrativa.

A la Organización de Estados Americanos (OEA), por financiar mis estudios en México. Especiales agradecimientos a mí asesora LASPAU Paulina Savage, por creer en mí y apoyarme constantemente en gestiones “imposibles”; a Rodrigo Rubilar de la Agencia de Cooperación Internacional (AGCI) de Chile por ver en mí mis ganas de estudiar en el

extranjero.

A mis compañeros del PCMyL en la UMDI- Sisal: a José Luis Bonilla, Silvia Hinojosa, Omar Ávila y familia, Arturo George, Reyna Calva, David Gutiérrez, Carlos Maldonado y Mauricio Emerenciano. Gracias por su amistad y fraternidad durante estos dos años.

Al personal de la UMDI que ayudó, directa o indirectamente, en la realización de mi maestría. Al Lic. Javier Apodaca por toda la ayuda computacional brindada y su “chilanga” simpatía; a Gabriel Taboada por su amabilidad y buena onda; al personal administrativo: a Raúl, Samia, Magda, Eric y Janet. Al gran “Mex” y a sus “Palomitas”. A todos ellos gracias por su paciencia y atención ante mis necesidades.

A las múltiples combinaciones de amig@s que cultivé en Sisal: con especial cariño a mi hermano Pana, alias “José Luis Bonilla”: por tu amistad a “prueba de balas”, por la alegría y carisma, las manos ante los bajones, ¡siempre una raza panita! (*Blessing and more fire!*). A las personas que hicieron que la separación de mi país sea realmente a la “Mexicana”: a Elis Monroy y su hermosa familia, por nuestro cariño y amistad atemporal (¡siempre tomando yoghurt!); a Quetzalli Hernández por su compañerismo y vigor y a Alejandra Iraseman por su ternura y amistad. A todo el elenco de “planeta Sisal”: a mi gran amigo Mauricio Emerenciano por compartir pláticas, sueños y esperanzas; a la “liviandad” y fidelidad de Alejandro Ramírez, por toda la intimidad magmeana que se desbordó, por las “vibes” liberadas y por hacer de la música un regalo; a la “tremenda” Gaby Chávez, por tú inteligencia y desplante ante la vida. A mis hermanitas: Zzabi Correa, por su sencillez y amor hacia los animales y a Catalina Cuellar por traernos fuerza y armonía; a Carlos Maldonado mostrar la templanza; a “Sargent”, Nuria, Pablo, Lenin y Esther, por las conexiones chidas alcanzadas. A los enlazadores: Américo, Hélène y Danae, por hacer de la casualidad un verdadero regalo; a Eliana y Daniel (“Portuga”) por cariño y amistad; a Gina y a su sonrisa; a doña Geny y su familia, y a Choni y su envidiable humildad. A aquellas personas con las que formé vínculos especiales durante las meditaciones, gracias a Cris, Ariadna y Arturo, por toda es “Luces”. A Fidel y Bijoux, por siempre hacerme sentir acompañado. A todos los personajes que conformaron las mágicas historias que deleitaron mi corazón: a “Major Tomm & Dr. Ziggy”, a la “C”; a “Jimbo & Pumbi” y a “Crusoe & Viernes”.

Quiero agradecer con mucha admiración y respeto a la mujer que a decidido acompañarme en esta última parte del camino a casa. Por ser un verdadero regalo que Sisal me dejó en su orilla, con precisión desde nuestro nacimiento. A tí Elsa Gärtner: por tu amor, por siempre invocar mi

felicidad; por tú magia y tus verdes; tú perseverancia y conciencia global. Por nuestra convicción que nos ha permitido avanzar en este tierno caminar que hemos emprendido.

Por estos dos años vividos en Sisal, por ser éste un verdadero laboratorio de crecimiento personal; en el que la calma, seguridad y atmósfera reflexiva no hicieron más que constituirlo una verdadera burbuja. Por sus efectos (positivos y negativos); por mostrarme la realidad y la fantasía caprichosamente, representando un lugar no contaminado y libre del llamado “efecto Babylon”. Por todo lo “vivido, comido y bailado”. Por toda mi imaginación desprendida en los momentos de soledad, la “burbuja” en mí corazón.

Por mí, por ti y por todos. Salud y que ¡viva la “América Latida”!

INDICE

RESUMEN GENERAL.....	(9)
ABSTRACT.....	(11)
I. CAPITULO 1:	(12)
INTRODUCCION GENERAL	
1.1 ANTECEDENTES.....	(13)
1.1.1 Características y particularidades del crecimiento en cefalópodos.....	(14)
1.1.2 Fuentes de variación a nivel intra-específico.....	(15)
1.2 HIPOTESIS DE LA INVESTIGACIÓN.....	(19)
1.3 OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	(21)
1.3.1 Objetivo general.....	(21)
1.3.2 Objetivos específicos.....	(21)
1.3.3 Capítulos.....	(21)
1.4 JUSTIFICACION DE LA ESPECIE.....	(24)
II. CAPITULO 2:	(25)
“MODELANDO EL CRECIMIENTO DE JUVENILES (HERMANOS) DE <i>Octopus maya</i> USANDO GLMM: ¿ES EL CRECIMIENTO DEPENDIENTE DEL TAMAÑO INICIAL?”	
RESUMEN.....	(26)
I. INTRODUCCIÓN.....	(27)
II. MATERIALES Y METODOS.....	(30)
2.1 Origen de los organismos.....	(30)
2.2 Diseño experimental.....	(30)
2.2.1 Experimento 1 (E1).....	(30)
2.2.2 Experimento 2 (E2)	(31)
2.3 Evaluación del peso de eclosión (E2)	(32)
2.4 Análisis de crecimiento.....	(32)
2.4.1 Primer análisis: Relación entre P15 y P75.....	(34)
2.4.2 Segundo análisis: Modelo exponencial de crecimiento.....	(35)
III. RESULTADOS	
3.1 Evaluación del peso de eclosión.....	(37)
3.2 Supervivencia.....	(37)
3.3 Análisis de crecimiento.....	(38)
3.3.1 Primer análisis: Relación entre P15 y P75.....	(39)
3.3.2 Segundo análisis: Modelo exponencial de crecimiento (E2)	(41)
IV. DISCUSION.....	(43)
4.1 Evaluación del peso de eclosión.....	(43)
4.2 Relación entre P ₁₅ y P ₇₅	(43)
4.3 Modelo exponencial de crecimiento.....	(46)
V. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	(52)
ANEXOS	
ANEXO 1: Análisis gráfico de residuales.....	(60)

III. CAPITULO 3:	(62)
“MARCADOS MOLECULARES ASOCIADOS AL CRECIMIENTO DE <i>Octopus maya</i> “	
RESUMEN	(63)
I. INTRODUCCION	(63)
II. MATERIALES Y METODOS	(65)
2.1 Análisis de Expresión de Transcritos (AET)	(65)
AET ₁ : ET asociada al peso inicial a los 15 y 70 días de edad	(65)
AET ₂ : ET asociada a la variación del crecimiento (VC) a los 165 días de edad	(65)
2.2 Despliegue Diferencial (DD)	(65)
2.2.1 Preparación de material y reactivos	(66)
2.2.2 Extracción de tejido	(66)
2.2.3 Extracción de RNA y evaluación de su calidad	(66)
2.2.4 Pools de muestras	(68)
2.2.5 Amplificación de DNAc por RT-PCR	(68)
2.2.6 Desnaturalización en gel de Policridamida (PAGE)	(68)
2.2.7 Tinción y revelado de gel	(69)
2.2.8 Criterios de selección de bandas diferenciales	(69)
2.2.9 Elusión y Reamplificación de DNA	(69)
2.2.10 Secuenciación	(70)
III. RESULTADOS	
3.1 DD	(71)
3.2 Análisis bioinformático	(72)
IV. DISCUSION	(77)
V. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	(81)
ANEXOS	
ANEXO 1: Reactivos y soluciones empleadas para el DD	(86)
ANEXO 2: Protocolo de Promega para recuperación de cDNA	(87)
ANEXO 3: Secuencias (S)	(88)
IV. CAPITULO 4:	(90)
“DEMANDA DE ENERGÍA DURANTE LA LA FASE EXPONENCIAL DE CRECIMIENTO EN <i>Octopus maya</i> : EXPLORANDO EL EFECTO DEL TAMAÑO INICIAL Y LA EDAD”	
RESUMEN	(91)
I. INTRODUCCION	(92)
II. MATERIALES Y METODOS	(96)
2.1 Consumo de oxígeno disuelto (VO ₂) en función del peso corporal (Pc)	(96)
2.2 Balance de energía (BE) durante la fase exponencial de crecimiento	(97)
2.3 Energía de asimilación (As) y eficiencia gruesa de asimilación (EGA) en función del Pc y edad	(97)
2.4 Análisis estadísticos	(98)
III. RESULTADOS	(99)
3.1 VO ₂ en función de Pc	(99)
3.2 BE durante el crecimiento exponencial	(100)
3.3 Estimación de As en función de Pc a diferentes edades	(100)
3.4 Relación entre EGA y Pc	(101)
IV. DISCUSION	(103)
4.1 Modelo metabólico durante la fase exponencial de crecimiento	(103)

4.2	Balance de energía durante la fase exponencial de crecimiento.....	(103)
4.2.1	Energía de producción de biomasa (P).....	(103)
4.2.2	Energías de respiración (R) y de excreción de amonio (U).....	(104)
4.3	As y EGA en relación con el peso corporal y a la edad.....	(106)
4.4	Aplicaciones y futuras consideraciones.....	(107)
V.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	(108)
V.	CAPITULO 5	(115)
CONCLUSIONES GENERALES		
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS GENERALES.....	(118)

RESUMEN GENERAL

Una de las características más interesantes de los cefalópodos es el crecimiento heterogéneo (CH) entre individuos de edades similares, teniendo fuertes implicaciones ecológicas dado el importante rol que este grupo juega en el ecosistema marino al ser simultáneamente depredadores y presas. El tamaño inicial a su vez es altamente variable en los cefalópodos, desconociendo el efecto de éste en la generación de CH entre individuos mantenidos en condiciones controladas (temperatura y alimentación). En el siguiente estudio se utilizó al pulpo *Octopus maya* como modelo biológico para analizar la variabilidad intraespecífica durante la fase exponencial de crecimiento (FEC) de dos poblaciones de juveniles hermanos. Para ello se utilizaron diferentes abordajes mediante las siguientes herramientas: modelos de crecimiento estimados con GLMM (*Generalized Linear Mix Modeling*) para estimar la influencia del peso inicial (PI) en la tasa de crecimiento y cómo el peso incrementa en función del tiempo (Capítulo 2); mediante el despliegue diferencial (DD) para explorar la expresión de transcritos (ET) asociados al tamaño inicial y variabilidad en el tiempo (Capítulo 3); y por medio del balance de energía (BE) para una mejor comprensión de las demandas de energía durante la FEC. El efecto del tamaño inicial fue analizado por medio de la categorización arbitraria de tres tamaños iniciales (tratamientos) (“pequeños medianos y grandes”), definidos por el peso a los 15 días de edad (P_{15}). Los animales fueron mantenidos individualizados para una mejor definición de la FCE desde la eclosión hasta los 105 días de edad bajo condiciones de ambiente controlado. Los resultados obtenidos con los modelos de crecimiento determinaron que: (i) no existe una relación entre el peso de eclosión y los días de nacimiento; (ii) la tasa de crecimiento es independiente del peso inicial, sin embargo éste condiciona el peso alcanzado en el tiempo; (iii) el peso en función de la edad se ajusta a un modelo exponencial ($P_t = 0,01 \text{Exp}^{0,03 * \text{edad}}$), definiéndose la forma en que la varianza del peso se incremente en función de la edad mediante la incorporación de una estructura de varianza ($\epsilon_i \sim N(0, \sigma^2 [\text{ tiempo }_i]^{2\delta}; \delta = 0.2042)$). La aplicación de la técnica de DD permitió determinar que las categorías de PI no presentan una ET, sino es la edad (15 y 70 días) la que genera niveles de expresión (inducción, represión y sobreexpresión) bajo estas condiciones experimentales. Trece secuencias fueron obtenidas de la ET (inducidos y sobre inducidos) a los 15, 70 y 105 días de edad. Estas presentaron una alta homologación con microsatélites de otras especies de octópodos, mensajeros y genes que codifican para enzimas metabólicas, promotores de crecimiento, proteínas musculares y enzimas asociadas a respuestas de estrés en otras taxas. La aplicación de algunas secuencias como marcadores moleculares asociados al crecimiento de la especie es propuesta. A su vez el BE se demostró que durante la FCE, el crecimiento (P) representa entre un 65% (15 días) y un 90% (105 días) de la energía ingerida (I), la respiración (R) entre un 13% y 5% a los 15 y 105 días de edad respectivamente, y la excreción de desechos nitrogenados entre 17% y 4% de I para

ambas edades. Durante la FEC los juveniles de *O. maya* que la asimilación ($As=R+P$) está en función del peso corporal y la edad. La As varía significativamente en función de la edad y el peso corporal (Pc), siendo más variables a edades inferiores de 45 días y a un Pc menor a 1 g. La energía bruta de asimilación ($\%EBA=\%As/I$) es condicionada también por la edad de los juveniles: animales de 15 días presentaron un $\%EBA$ de $79.58\% \pm 8.76$ y mínimo y máximo de 57% y 89%, caracterizándose posterior a esta edad una $\%EBA$ superior a 95%. Los resultados obtenidos en esta investigación aportan importantes antecedentes sobre el papel del tamaño inicial en el crecimiento de juveniles de *O. maya*, contribuyendo con ello a una mejor comprensión del crecimiento durante las fases tempranas de cefalópodos.

Palabras clave: *Octopus maya*; fase exponencial de crecimiento; crecimiento heterogéneo; GLMM; despliegue diferencial; marcadores moleculares; Balance de Energía.

ABSTRACT

Cephalopods growth is highly variable and influenced by biotic and abiotic factors. The individual growth heterogeneity (IGH) can have ecological implications in cephalopods populations considering its important ecological role (like predator and prey) in marine ecosystems. Initial size (IS) is highly variable on cephalopods and its influence can be considerable under controlled conditions (temperature and feed). In this study the Yucatan octopus *Octopus maya* was used such a biological model to analyze intraspecific variability during the exponential growth phase (EGP) within of two juvenile siblings populations. Different approaches and tools were used to get an integral analysis: (i) Modelling by GLMM (Generalized Linear Modeling Mix) to estimate the influence of initial weight (IW) on growth rate (GR) and to know how the individual weight and its variability increase along time (Chapter 2); (ii) Exploring the genetic responses by differential display (DD) assessing the effect IW and growth variability (GV) on mRNA populations (transcripts expression, TE) (Chapter 3); and estimating the energy balance (EB) to understand the age and body weight (BW) influence on physiological demands such growth and respiration during the EGP. The effect of IW was analyzed, establishing three size categories (treatments) (small, medium and large) defined by wet weight at 15 days old (WW_{15}). The juveniles were kept individually for a better definition of the EGP from hatching to 105 days of age. The results of growth models determined that: (i) there is no relationship between hatch weight and hatching days; (ii) the GR is independent of IW but final weight (FW) is dependent of IW; (iii) the exponential model was adjusted at 105 days ($FW = 0.01 \text{ Exp}^{0.03 \cdot \text{age}}$), defining how the weight variance increase along time by a structure of variance incorporated within exponential growth model ($\epsilon_i \sim N(0, \sigma^2 [\text{age } i]^{2\delta}, \delta = 0.2042)$). The DD showed there were not differential bands (DB) between IW categories, meanwhile BD between ages was found. Thirteen sequences were obtained at 15, 70 and 105 days old. They had a high homology with microsatellites from other species of octopuses, messengers and genes encoding metabolic enzymes, growth promoters, muscle proteins and enzymes associated with stress responses in other taxa. The application of some sequences as molecular markers associated with growth of the species has been proposed. The EB during the FCE showed: a high demand of the energy invested in production of biomass (P) representing 65% (15 days) and 90% (105 days) of ingested energy (I); the energy invested in respiratory metabolism (R) used between 13% (15 days) and 5% (105 days) of (I) and the energy lost in nitrogen metabolism (U) 17% and 4% (I) at respective ages. During the EGP juveniles of *Octopus maya* are very efficient and the assimilation energy ($As = R + P$) was a function of body weight (BW) and age. Assimilated gross efficiency (% AGW = % As / I) was conditioned by age and BW as well: earliest juveniles (15 days old) showed a high variability of %AGW ($79.58\% \pm 8.76\%$) (Maximum: 57% and Minimum: 89%) compared with advanced ages characterized with a constant %AGW (~95%). This study provides important background of the effect of initial on IGH during early stages of *O. maya*.

Keywords: *Octopus maya*; exponential growth phase, individual growth heterogeneity; GLMM models, Differential Display; molecular markers; Energy Balance.

INTRODUCCION GENERAL

1.1 ANTECEDENTES

Los cefalópodos son moluscos marinos que aparecieron a partir del periodo Cámbrico Superior (Era Paleozoica) hace unos 570 a 500 millones de años atrás (Kröger, 2005). Este grupo se distribuye en todos los océanos y en la mayoría de los mares, habitando desde la superficie hasta los 7,000 metros de profundidad. Por su fisiología y ciclos de vida son depredadores oportunistas en diferentes ecosistemas, siendo sensibles a cambios ambientales tanto naturales como antropogénicos. A su vez son presa de grandes peces, mamíferos marinos y aves, ubicándose en un nivel intermedio de la cadena trófica (Hanlon y Messenger, 1996). Este grupo presenta una alta abundancia por tener puestas múltiples, varias micro cohortes anuales, zonas de puestas asociadas a áreas de alta productividad primaria y por la elevada fecundidad potencial (250.000 a 10 millones de huevos) (Rocha *et al.*, 2001).

Las pesquerías de cefalópodos son importantes para la economía de varios países. La escala industrial de la actividad se inicia en los cincuenta (Lipíński *et al.*, 1998), aumentando de forma continua a partir de 1970 por considerarlos una fuente alternativa de proteína por efecto de la sobreexplotación de peces marinos teleósteos (Caddy y Rodhouse, 1998). La constante demanda en el mercado mundial, principalmente en Asia y Europa, ha generado una fuerte presión extractiva en algunas poblaciones silvestres de pulpos, calamares y sepias, llegando algunas de ellas a niveles de sobreexplotación (Lipíński *et al.*, 1998). Las estadísticas de la FAO (2005) indican que la explotación en este grupo durante las últimas décadas ha alcanzado los 3 a 4 millones de toneladas (t) anuales. La pesquería del pulpo ha aumentado en las últimas dos décadas en 100,000 t, reportándose para el 2005 un total de 350,000 t (FAO, 2005).

Como respuesta a este escenario el cultivo de pulpo se plantea como una alternativa sustentable de producción. Sus ciclos de vida corto y adaptabilidad al cautiverio son importantes características biológicas que hacen de estos animales excelentes candidatos para la acuicultura. Su interés en varios países ha impulsado el desarrollo de la tecnología para la producción intensiva de varias especies de importancia comercial: especies como *Octopus vulgaris* en España (Moxica *et al.*, 2004; Iglesias *et al.*, 2007), *Octopus mimus* y *Enteroctopus megalocyathus* en Chile (Cortes *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 2006) y *Octopus maya* en México (Domingues *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2007 y

2008) han sido importantes para el proceso de diversificación de la acuicultura local y regional. Aún considerando las potencialidades del cultivo de pulpos, la producción intensiva de larvas, y por ende, juveniles, es un “cuello de botella”. Estas limitaciones están asociadas al desconocimiento de la biología de los estados tempranos, principalmente asociados a la nutrición (Moxica *et al.*, 2004; Iglesias *et al.*, 2007).

1.1.1 Características y particularidades del crecimiento en cefalópodos

El crecimiento en este grupo es uno de los más acelerados del reino animal, siendo superior a muchos poiquiloterms y similar al alcanzado en mamíferos (Calow, 1987). Sus altas tasas de crecimiento son producto de elevadas tasas metabólicas (Pörtner y Zielinski, 1998; Moltschaniwskyj, 2004), debido a que las proteínas son la principal moneda energética en estos animales (Hanlon *et al.*, 1991; Lee, 1994; Rosas *et al.*, 2007). En octópodos (pulpos) las proteínas son utilizadas en un alto porcentaje para el crecimiento (cerca de un 90% en *Octopus vulgaris*, Houlihan *et al.*, 1999). Éstas son incorporadas durante la alimentación, generando elevadas tasas de ingestión como respuesta a su alta demanda proteica (Houlihan *et al.*, 1999). Los requerimientos de aminoácidos, como es esperable, son también altos ya que de estos depende la homeostasis (Lee, 1994).

Si bien el análisis del crecimiento obtenido en cautiverio tiene sus limitaciones a la hora de su extrapolación en las poblaciones naturales de cefalópodos (Pech y Moltschaniwskyj, 1999), la contribución de estos estudios ha sido importante para caracterizar el proceso al cerrar los ciclos de vidas de varias especies, sobretodo en aquellos octópodos con ciclo holobentónica. Estas especies se caracterizan por la incorporación inmediata de un juvenil al bentos denominadas “juveniles” (Young y Harman, 1989; Boletzky, 1997) y que se diferencian de aquellas especies con ciclo merobentónico que presentan una etapa planctónica (“paralarvas”) (Young y Harman, 1989) (por ejemplo: *Octopus vulgaris*, Villanueva y Norman, 2008). Especies holobentónicas como *O. digueti* (DeRusha *et al.*, 1989), *O. joubini* (Forsythe, 1984), *O. ocellatus* (Segawa y Namoto, 2002), *O. bimaculoides* (Forsythe y Hanlon, 1988), *O. pallidus* (Leporati *et al.*, 2007) y *O. maya* (Van Heukelem, 1976) han sido importantes referentes para la comprensión del crecimiento y las implicaciones de éste en los ciclos de vida.

La mayoría de los estudios de crecimiento en octópodos en laboratorio han identificado dos fases de crecimiento (patrón bi-fásico): una fase inicial de acelerado crecimiento (modelo exponencial), seguido de una fase más lenta (modelo potencial) (Forsythe y Van Heukelem, 1987; Semmens *et al.*, 2004). La duración de estas fases dependerá de factores abióticos y bióticos, presentando una plasticidad frente a variaciones de temperatura (Semmens *et al.*, 2004) y disponibilidad de alimento (Koueta y Boucaud-Comou, 1999; André *et al.*, 2008). Si bien en los análisis de crecimiento poblacional no se ha observado la existencia de dicho patrón de crecimiento, una reciente investigación basada en un modelo bioenergético ha podido explicar que ambas fases también podrían estar presentes en el crecimiento poblacional (André *et al.*, 2009).

1.1.2 Fuentes de variación a nivel intraespecífico

El crecimiento heterogéneo (CH) a nivel intraespecífico y la plasticidad ante variaciones ambientales son una de las principales características del proceso en estos animales (Moltschaniwskyj, 2004; Pecl *et al.*, 2004; Semmens *et al.*, 2004; Leporati *et al.*, 2007). La temperatura es uno de los factores ambientales que gobierna el crecimiento, generando una fuerte influencia en la generación de CH entre individuos de una misma cohorte o microcohorte durante las etapas tempranas (Pecl *et al.*, 2004). Dicho efecto, conocido como “efecto Forsythe” (Forsythe, 1993 y 2004), ha sido validado en algunas especies (ejemplo: *Sepioteuthis australis*, Pecl *et al.*, 2004; *O. pallidus*, Leporati *et al.*, 2007). La variación del consumo de alimento también ha sido identificado como responsable del CH (Koueta y Boucaud-Camou, 1999; André *et al.*, 2008), al igual que la maduración sexual y género (Semmens *et al.*, 2004). La elevada variabilidad de tallas en individuos pertenecientes a mismas cohortes y microcohortes puede influir en la dinámica poblacional, la reproducción y supervivencia larval, repercutiendo en la abundancia a escala local (Leporati *et al.*, 2007).

La hipótesis que sustenta el “efecto Forsythe” indica que pequeñas variaciones en la temperatura ambiental durante la fase exponencial de crecimiento (en los primeros 2 a 4 meses) pueden generar marcadas diferencias en el crecimiento de individuos de una misma edad (ejemplo: *Octopus digueti*, DeRusha *et al.*, 1987), amplificándose considerablemente en función del tiempo (Forsythe, 1993 y 2004). El efecto se intensifica por las trayectorias cóncavas-ascendente del crecimiento (no-asintótico)

(Moltschaniwskyj, 2004). Sin embargo, parte de la variación del crecimiento no puede ser explicada cuando se analiza el crecimiento bajo temperatura y alimentación estable, siendo el tamaño inicial uno de los factores que podría estar condicionando el crecimiento de estos animales (Leporati *et al.*, 2007). Aún no se dispone de suficiente información para indicar si el crecimiento de los pulpos es tamaño-dependiente durante la fase exponencial de crecimiento, siendo de importancia al considerar que los tamaños de eclosión de varias especies presentan elevados coeficientes de variación.

El crecimiento de un individuo está dado por cambios relativos del tamaño de los órganos, siendo generalmente expresados de forma conservativa durante su ontogénea: el crecimiento relativo de órganos es generalmente alométrico en juveniles e isométrico en la fase de crecimiento de adultos. Diferencias en el crecimiento alométrico como una función de factores bióticos como el sexo, nutrición y temperatura permiten inferir la forma en que los individuos localizan la energía hacia los órganos a lo largo de su ciclo de vida (Moltschaniwskyj, 2004).

En niveles de organización biológica inferiores, la distribución de tamaños y frecuencia de fibras musculares y estimaciones de síntesis de proteínas permiten una mejor comprensión de las curvas de crecimiento, posibilitando a su vez un mejor entendimiento de cómo el proceso de cambio de crecimiento es una función del tamaño y de la edad (Moltschaniwskyj, 2004; Farias *et al.*, 2009). Cerca de un 90% de la biomasa de un cefalópodos corresponde a musculatura, por lo que el estudio de la dinámica muscular podría indicar la forma en que estos animales crecen (Semmens *et al.*, 2004).

La dinámica de fibras musculares en cefalópodos se caracteriza por dos procesos: la hiperplasia (generación de nuevas fibras musculares) y la hipertrofia (aumento del tamaño de las fibras) (Moltschaniwskyj, 2004). A diferencia de peces teleósteos y otros invertebrados, en donde la combinación de ambos procesos ocurre sólo en las etapas juveniles y la hipertrofia define el crecimiento hasta alcanzar el tamaño máximo, las fibras musculares de los cefalópodos pueden estar en hipertrofia y la hiperplasia independiente del tamaño o de la edad (ejemplo: *Sepia elliptica*, Martínez y Moltschaniwskyj, 1999) y el tamaño final no es limitado por el número final de fibras producidas (Moltschaniwskyj, 2004).

Desde el punto de vista fisiológico, la inversión de energía asociada a ambos procesos no es directamente proporcional a la ganancia de peso en un individuo: mientras que durante la hiperplasia la creación de nuevas fibras y estructuras están asociadas a un mayor gasto energético y a una baja ganancia de peso, la hipertrófia es más eficiente en términos de energía ya que el aumento de las fibras musculares puede ser alcanzada por el incremento del fluido intracelular repercutiendo en una mayor ganancia de peso (André *et al.*, 2008).

La variación del crecimiento en función del tiempo a nivel intraespecífico ha sido denominado en peces como “*growth depensation*” (*GD*) (sensu Pfister y Stevens, 2002), siendo ampliamente estudiado en diferentes especies de peces teleósteos (Umino *et al.*, 1997; Stefánsson *et al.*, 2000; Smith y Fuiman, 2003) y discutido en otras taxas por Pfister y Stevens, 2002. La presencia de *GD* puede ser atribuida a la desproporcionalidad en la adquisición del alimento, diferencias genéticas, interacción social y diferencias sexuales, siendo en las etapas tempranas principalmente al inicio de la alimentación (Umino *et al.*, 1997). Umino *et al.*, (1997) demostraron efectos genéticos en el crecimiento y habilidad competitiva de clones de *Carassius langsdorffii* en función del abastecimiento de alimento durante la fase larval.

La relación entre los efectos genéticos y el CH es una verdadera “caja negra” en lo que cefalópodos se refiere. Antecedentes provenientes de poblaciones han determinado que la variación del crecimiento entre individuos de una misma población tienen un fuerte componente genético y no solo ambiental en cefalópodos en *S. lessonana* (Triantafillos *et al.*, 2004). La múltiple paternidad reportada en cefalópodos (Shaw y Boyle, 1997; Naud *et al.*, 2004; Voight y Feldheim, 2009) ha sido considerada recientemente como uno de los factores que debería ser estudiado, dada su supuesta participación en la generación de crecimiento heterogéneo entre individuos de una misma puesta (Leporati *et al.*, 2007; André *et al.*, 2008). Lamentablemente en la actualidad no existen marcadores moleculares asociados al crecimiento en cefalópodos, ni en lo particular en *O. maya*.

Algunas preguntas en relación al crecimiento y la variación genética pueden ser planteadas en condiciones controladas: ¿existe una expresión diferencial de genes asociada a factores bióticos, como el caso del tamaño inicial, que condicionen un

crecimiento particular entre individuos provenientes de una misma puesta (hermanos)?; si ésta existiera, ¿ello nos indicaría que genéticamente los organismos están destinados a ser “peores o mejores” creciendo?; ¿cuánta de esta capacidad de crecimiento es heredada de sus padres? Más preguntas podrían ser planteadas, todas ellas denotando un gran vacío en lo que los genes de crecimiento de cefalópodos se refieren. El estudio de la variación genética y de heredabilidad del crecimiento en aquellas especies de pulpos se plantea como importante para el desarrollo de programas de mejoramiento genético mediante “familias” (Iglesias *et al.*, 2007), tal como ha sido desarrollado en el cultivo de peces (Gjedrem, 2000; Gjerdea *et al.*, 2004).

Antecedentes fisiológicos y energéticos permiten definir la curva de crecimiento cambian típicamente con el tamaño corporal (Pauly, 1998), generándose CH por diferencias en estos términos. Un abordaje que aportaría información para la comprensión del CH a edad conocida sería la aplicación de modelos bioenergéticos que permitan conocer la forma en que los individuos administran la energía proveniente del alimento para satisfacer las demandas fisiológicas asociadas al crecimiento y metabolismo (Lucas, 1993; Wells y Clarke, 1996). El balance de energía durante las fases tempranas de octópodos es prácticamente nulo. Si bien se dispone de modelos metabólicos, de excreción de amonio y de ingestión de alimento en función del tamaño en algunas especies (*O. ocellatus*, Segawa y Namoto, 2002; *O. maya* y *E. megalocyathus*, Farías *et al.*, 2009), no se han reportado antecedentes que permitan caracterizar la forma en los individuos asimilan la energía durante su su ciclo de vida, sobre todo si los requerimientos nutricionales cambian a lo largo de éste (Farías *et al.*, 2009).

1.2 HIPOTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

(1) En condiciones de laboratorio, el crecimiento en octópodos se caracteriza por presentar dos fases: una fase exponencial, seguida de una fase potencial, en la cual, aun cuando el crecimiento disminuye con la edad nunca llega a la fase asintótica (Van Heukelem y Forsythe, 1987). Así mismo se sabe que la tasa de crecimiento es modulada por varios factores entre los cuales se destacan la temperatura y la alimentación (Semmens *et al.*, 2004). En relación al efecto de la temperatura (“efecto Forsythe”), pequeñas diferencias durante las fases tempranas (embriónica y post-embriónicas) pueden marcar fuertes diferencias, aún en animales de la misma edad. Considerando que los estadios tempranos crecen bajo una función exponencial, pequeñas diferencias entre individuos durante esta etapa serán amplificadas a través del ciclo de vida (Pech *et al.*, 2004). Sin embargo, la temperatura y el alimento no explican toda la evidente variación en tallas para animales de la misma edad, registrándose un amplio rango de tamaños después de un periodo de crecimiento en individuos mantenidos bajo idénticas condiciones (Forsythe, 1993; Leporati *et al.*, 2007). Pech *et al.*, (2004) demostraron teóricamente que paralarvas más grandes alcanzarían el doble de tamaño que paralarvas más pequeñas, asumiendo que los individuos experimentaron condiciones ambientales similares y bajo una misma tasa de crecimiento, independiente del tamaño inicial.

(2) Por otro lado, el crecimiento de un individuo está dado por cambios relativos al tamaño de los órganos, siendo generalmente expresados de forma conservativa durante su ontogénesis: el crecimiento relativo de órganos es generalmente alométrico en juveniles e isométrico en la fase de crecimiento de adultos. Diferencias en el crecimiento alométrico como una función de factores bióticos como el sexo, nutrición y temperatura permiten inferir la forma en que los individuos canalizan la energía hacia los órganos a lo largo de su ciclo de vida (Moltschaniwskyj, 2004). En términos de energía, el peso corporal condiciona la forma en que un individuo invierte la energía del alimento debido a que los requerimientos nutricionales cambian en función de la biomasa corporal y la edad (Andrews *et al.*, 1972; Farías *et al.*, 2009).

Hipótesis (1): Tasa de crecimiento independiente del tamaño inicial y la edad

Juveniles tempranos de *O. maya* de origen (hermanos) y edad conocida, mantenidos bajo condiciones ambientales relativamente iguales (temperatura y alimento), pueden

crecer a la misma tasa independientemente del tamaño inicial. Dicho crecimiento, al igual que otras especies de octópodos, tendrá una fase exponencial posterior a la eclosión en la que la variación del tamaño inicial será amplificada en función de la edad. Esta condición sería respaldada a nivel genético al no esperar una asociación entre la variabilidad del peso al inicio y durante el ciclo de vida y la expresión diferencial de transcritos, siendo esta última un reflejo de la ontogénia.

Hipótesis (2): La forma en que los cefalópodos utilizan la energía fisiológicamente util (EFU) durante las fases tempranas de su ciclo de vida a lo largo de la fase exponencial de crecimiento estaría dada por una condición asociada a la biomasa corporal y la edad. Si bien esta fase implicaría una amplificación de diferencias en el tamaño inicial entre individuos, la variabilidad asociada no reflejaría una condición fisiológica diferencial bajo condiciones estables de temperatura y alimentación dado que esta diferencia no está asociada con la edad sino con una tasa de crecimiento influenciada por el tamaño al nacer.

1.3 OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DE LA TESIS

1.3.1 *Objetivo general*

- Analizar la variabilidad intraespecífica durante la fase exponencial de crecimiento de los juveniles de *Octopus maya* mediante modelos de crecimiento, marcadores molecular y balance de energía.

1.3.2 *Objetivos específicos*

- Determinar la influencia del tamaño inicial en el crecimiento exponencial y modelar dicha fase usando modelos mixtos del tipo GLMM;
- Analizar la expresión diferencial de transcritos mediante la aplicación de la técnica de despliegue diferencial para el efecto del tamaño inicial y la edad;
- Estimar el balance de energía y la eficiencia de asimilación en función de peso y edad durante la fase exponencial de crecimiento.

1.3.3 *Capítulos*

La siguiente investigación fue estructurada en tres capítulos principales asociados respectivamente a los objetivos específicos. A continuación se presenta una breve descripción de cada uno de estos:

Capítulo 2: En este capítulo se utilizaron juveniles tempranos de *Octopus maya* de origen conocido (hermanos) como caso de estudio para la modelación del crecimiento durante la fase temprana de la especie; esta investigación fue dirigida por las siguientes preguntas: ¿es el crecimiento independiente del tamaño inicial en individuos mantenidos bajo condiciones similares (temperatura y alimentación controlada)?; ¿es el crecimiento durante la fase temprana de *Octopus maya* un modelo exponencial al igual que otros octópodos? Ambas interrogantes fueron respondidas independientemente utilizando modelos mixtos del tipo GLMM (*Generalized Linear Mixed Models*), asegurando con ello los requisitos de la regresión lineal y la obtención de parámetros de crecimiento fidendignos (tasa de crecimiento). La variación del peso en función de la edad fue modelada aportando nuevos antecedentes en la especie y en cefalópodos.

Capítulo 3: En este capítulo se presentan los primeros avances en la exploración de genes asociados al crecimiento en *O. maya*. Marcadores moleculares asociados al crecimiento fueron propuestos al analizar la expresión diferencial de transcritos mediante la técnica de Despliegue Diferencial. Dos análisis fueron realizados: (i) el efecto del tamaño inicial y edad en la expresión de bandas diferenciales; y (ii) el efecto de la variabilidad del peso en individuos de la misma edad y mismo peso inicial en la expresión de transcritos. La homologación con mensajeros y genes que codifican a proteínas asociadas al metabolismo, promotores de crecimiento, crecimiento muscular y respuestas frente a condiciones de estrés fueron obtenidas, incorporando nuevos elementos en la comprensión del crecimiento desde el punto de vista genético y aportando en el transcriptoma de la especie, siendo este último importante para direccionar nuevas interrogante en esta temática y en múltiples áreas de la biología de *O. maya*.

Capítulo 4: Este capítulo fue dirigido para analizar si los cefalópodos durante la fase exponencial de crecimiento están condicionados por el tamaño inicial en términos de la EFU. Dos preguntas principales fueron planteadas: ¿es posible que la variación del peso condicione desde el inicio la EFU, generando con ello un crecimiento heterogéneo?; ¿cuándo las demandas fisiológicas asociadas a un individuo creciendo exponencialmente son excedidas al ser abastecimiento de energía de alimentación una función potencial de su peso corporal? Ambas preguntas fueron respondidas estimando los componentes del balance de energía (crecimiento y respiración principalmente) utilizando para ello los modelos fisiológicos establecidos previamente para la especie (Farias *et al.*, 2009). Este es el primer estudio de bioenergética para juveniles de *O. maya* y nuevos antecedentes sobre la fisiología de los cefalópodos durante las etapas tempranas del ciclo de vida de cefalópodos ha sido planteada.

La presente investigación plantea el uso de *Octopus maya* como modelo biológico para una mejor comprensión del crecimiento exponencial en octópodos y para analizar el efecto de factores bióticos como el tamaño inicial en la generación de crecimiento heterogéneo en individuos de edades similares. La contribución científica de este estudio justamente está dado por cómo éste ha sido planteado y desarrollado, entendiéndose el crecimiento como un conjunto de procesos en diferentes niveles de

organización biológica (biomasa corporal, órganos y genes). De esta forma, la caracterización mediante la aplicación de diversas técnicas como las aquí empleadas hacen de estos resultados una base importante para futuras investigaciones en la especie y un referente a nivel de cefalópodos. Los resultados reportados en este estudio podrán ser útiles para futuros estudios orientados a la búsqueda de los orígenes del crecimiento heterogéneo y plasticidad, sobretodo en su relación con las variaciones ambientales; sobretodo en la actual tendencia de utilizar a los cefalópodos como modelos para diagnosticar posibles alteraciones en el ecosistema marino por efecto del cambio climático. La identificación de marcadores moleculares permitirá direccionar nuevas líneas asociadas al proceso de domesticación de *O. maya*, siendo la selección sexual y la heredabilidad interesantes aspectos que contribuirán a optimizar el cultivo. En este mismo sentido, la aplicación puede ser más plausible, complementándose con los importantes avances en esta área desde diversos puntos de vista. Futuras investigaciones sobre el diseño de alimentos promotores del crecimiento, al igual que la condición metabólica bajo diferentes condiciones ambientales (temperatura y oxígeno, por ejemplo) son factibles al conocer las demandas energéticas durante la fase de mayor incremento de biomasa en función del tiempo.

1.4 JUSTIFICACION DE LA ESPECIE

El pulpo *Octopus maya*, o pulpo de Yucatán, es una especie endémica de la Península de Yucatán (Voss y Solis, 1966), que se distribuye desde Ciudad del Carmen (Campeche) hasta Isla Mujeres (Solis, 1967; Solis-Ramírez, 1994, 1997). La especie se caracteriza por presentar una fecundidad relativamente baja (1,000- 2,000), compensada con huevos de gran tamaño que generan individuos bentónicos posterior a la eclosión (ciclo holobentónico) de un peso aproximado de 0.1 gramos (Van Heukelem, 1976; Van Heukelem, 1983). En condiciones de cultivo su esperanza de vida es inferior a los 12 meses, finalizando su ciclo biológico con la muerte posterior al desove en hembras (semelparí) (Van Heukelem, 1983).

La extracción pesquera de esta especie varían entre 9,000 y 16,000 ton en la plataforma continental del norte de la Península de Yucatán; estimándose una densidad de 1,482 individuos/km² y una biomasa de 23,943 ton (SAGARPA, 2005). La demanda internacional y su alto valor en los mercados han establecido a esta especie como uno de los recursos pesqueros más importantes en México, ubicándose en el tercer lugar después del camarón y el atún (Hernández-Flores *et al.*, 2001). Este escenario económico, junto con la desaparición de fuentes laborales asociada a cultivos marinos (camaroneras, por ejemplo), ha generado un aumento en la flota pesquera que explota el recurso.

El cultivo de *O. maya* se inicia en México a comienzos de la década de los '60 en el Instituto Nacional de Pesca, proponiéndose las primeras condiciones de cultivo en el país. En Estados Unidos estudios científicos orientados a la investigación biomédica, principalmente en Hawai (Van Heukelem, 1977) y en Texas (Galveston), permitieron establecer las principales bases biológicas para el mantenimiento de la especie al cerrar su ciclo biológico por varias generaciones (Hanlon y Forsythe, 1985). El elevado crecimiento de esta especie en condiciones de ambiente controlado, con una tasa promedio del 4.1 % peso/día a 25 °C (Hanlon y Forsythe, 1985), junto la alta conversión alimenticia del orden del 60 %, expresan su alta capacidad de adaptación a este medio (Boletzky & Hanlon, 1983) y su aceptación a alimento fresco y artificial (Domínguez *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2007). Esto ha permitido alcanzar pesos finales arriba de 1 Kg en 4 meses y sobre 3 kilos en 9 meses (Hanlon y Forsythe, 1985).

**MODELANDO EL
CRECIMIENTDE JUVENILES
(HERMANOS) DE
Octopus maya USANDO GLMM:
¿ES EL CRECIMIENTO DEPENDIENTE DEL TAMAÑO INICIAL?**

*...cada vez más de cerca y entonces jugamos al cíclope,
nos miramos cada vez más de cerca y
nuestros ojos se agrandan....*

Rayuela, Capítulo 7
Julio Cortázar
(1914 – 1984)

RESUMEN

Se analizó el efecto del tamaño inicial durante la fase exponencial de crecimiento de dos poblaciones (hermanos) de juveniles de *Octopus maya* mantenidos bajo condiciones de ambiente controlado (temperatura y alimento). Los juveniles fueron individualizados desde su nacimiento, siendo seleccionados en función del peso a los 15 días de edad (P_{15}) para establecer tres categorías de tamaño inicial: pequeños, medianos y grandes. Se evaluó la influencia del día de eclosión sobre el peso de eclosión de una de las poblaciones. Para ambas se realizaron modelos lineales (P_{15} vs Peso a los 75 días de edad, P_{75}) para la comparación entre las categorías, siendo posteriormente modelado el peso en función del tiempo. Se utilizaron los modelos mixtos GLMM (*Generalized Linear Mixed Models*) como herramienta para asegurar los requisitos de la regresión lineal y la incorporación de la variación del peso en función del tiempo. Los animales eclosionaron en un periodo de 8 días, sin existir influencia de estos en el peso de eclosión ($F = 1.927$; $p = 0.108$). Los modelos lineales determinaron que no existe un efecto de las categorías de tamaños en el crecimiento (misma tasa de crecimiento), siendo el peso final dependiente del peso inicial. Se modeló el crecimiento exponencial hasta los 105 días de edad (*Peso final: $0.11 * Exp^{0.03 * edad}$*), integrándose la variación del peso en el tiempo al análisis mediante la aplicación de una estructura de varianza ($\epsilon_i \sim N(0, \sigma^2 [\text{tiempo}_i]^{2\delta})$; $\delta = 0.2042$) (AIC = 251.4).

I. INTRODUCCION

Comparado con otros procesos biológicos, la comprensión del crecimiento en los cefalópodos ha sido uno de los principales intereses en la investigación durante las últimas décadas. Su relevancia se origina por el papel central que juegan estos organismos en el ecosistema marino, siendo a la vez depredadores y presas importantes de muchas otras especies (Hanlon y Messenger, 1996; Jackson, 2004), así como por su implicación para poner en práctica un manejo sustentable de sus pesquerías (Leporati *et al.*, 2007). Estos estudios han sido desarrollados mediante métodos indirectos y directos (Semmens *et al.*, 2004), y los resultados generados muestran que los cefalópodos presentan características de crecimiento muy particulares: (i) son, entre los metazoos, los invertebrados con mayor crecimiento, similar a lo reportado en homeotermos (mamíferos) y superior al de los peces (Calow, 1987); (ii) presentan un crecimiento no-asintótico (Moltschaniwskyj, 2004); (iii) su crecimiento tiene una elevada plasticidad al estar fuertemente gobernado por factores abióticos y bióticos, principalmente como la temperatura (Forysthe y Van Heukelem, 1987; Forsythe, 1993; Pecl *et al.*, 2004), la cantidad y calidad del alimento (André *et al.*, 2008; Koueta y Boucaud-Camou, 1999), y la maduración sexual (Semmens *et al.*, 2004); (iv) el crecimiento está representado por un patrón bifásico, con una fase exponencial de acelerado crecimiento, seguido de una de forma potencial con una progresiva disminución del crecimiento (Forysthe y VanHeukelem, 1987; Semmens *et al.*, 2004); y (v) el crecimiento presenta una elevada variabilidad intraespecífica (Pecl *et al.*, 2004; Leporati *et al.*, 2007).

La presencia de un crecimiento heterogéneo a nivel individual (CH) en cefalópodos, derivado de la ausencia en una relación entre la edad y el tamaño, ha sido bien documentado a nivel de cohortes y microcohortes (Cortez *et al.*, 1999; Markaida *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2007; Leporati *et al.*, 2008) y en poblaciones de origen conocido (cultivo) (Leporati *et al.*, 2007). El CHI tiene implicaciones considerables en la dinámica de las poblaciones, la estructura de edad y talla, reproducción, supervivencia larval y abundancia a escala local (Leporati *et al.*, 2007). Varias investigaciones han demostrado el efecto de la temperatura en la generación de CH entre cohortes, siendo pequeñas variaciones en el periodo de eclosión las que determinarían marcadas diferencias en el “historial de crecimiento” a nivel intraespecífico (“efecto Forsythe” Pecl *et al.*, 2004). Bajo condiciones de ambiente controlado (temperatura y alimentación), la elevada

variabilidad de tamaños para una edad particular ha sido asociado al tamaño inicial (Forsythe, 1993; Leporati *et al.*, 2007), siendo éste altamente variable a nivel intra e interespecífico. Elevados coeficientes de variación del peso inicial han sido observados en algunas especies de octópodos (Tabla 1).

Tabla 1: Coeficientes de variación (CV) del tamaño inicial de algunas especies de cefalópodos bentónicos.

Especie	Peso (g) \pm DE (n)	CV (%)	Referencia
<i>O. digueti</i>	0.040 \pm 0.010 (21)	25	DeRusha <i>et al.</i> , 1987
<i>O. pallidus</i>	0.274 \pm 0.010 (32)	3.65	Leporati <i>et al.</i> , 2007
<i>O. vulgaris</i>	0.138 \pm 0.011 (30)	7.97	Villanueva, 1995
<i>E. megalocyathus</i>	0.110 \pm 0.017 (18)	15.45	Ortiz <i>et al.</i> , 2006
<i>O. joubini</i>	0.035 \pm 0.006 (20)	17.14	Forsythe, 1984
<i>O. bimaculoides</i>	0.150 \pm 0.040 (20)	26.67	Forsythe y Hanlon, 1988
<i>O. maya</i>	0.110 \pm 0.020 (11)	16.51	VanHeukelem, 1976
<i>O. ocellatus</i>	0.132 \pm 0.030 (10)	22.72	Segawa y Namoto, 2002

Aunque se sabe que en peces marinos, pequeñas diferencias de tamaño en las etapas tempranas son amplificadas y acumuladas a lo largo del ciclo de vida (Vigliola y Meekan, 2002), no es posible saber, con la información disponible hasta ahora, si la tasa de crecimiento en cefalópodos es tamaño-dependiente en relación al tamaño inicial. Las primeras exploraciones fueron realizadas por Pecl *et al.*, (2004) al simular el crecimiento de paralarvas de *Sepioteuthis australis*, utilizando como supuesto “una misma tasa de crecimiento mensual (% peso/día)”, que aumentada en un 1% en los meses de mayor temperatura. Los autores señalaron la importancia de la validación empírica del supuesto, recomendando la individualización de los animales desde su eclosión. Siguiendo dichas recomendaciones, Leporati *et al.*, (2007) reportaron en juveniles hermanos de *O. pallidus* una relación directa entre el peso inicial y el peso final, siendo superior el crecimiento en aquellos juveniles más grandes en comparación a los más pequeños. Sin embargo, las comparaciones sobre la tasa de crecimiento en función del tamaño inicial no fueron realizadas y el supuesto no fue corroborado.

Atendiendo a esto último, se hace necesario contemplar dentro del diseño experimental la variación asociada al tamaño inicial de los individuos, para conocer su contribución al incremento en la heterogeneidad observada a lo largo del tiempo, tal como ha sido

sugerido para el análisis del crecimiento en peces (Gardeur *et al.*, 2001). Una herramienta que podría complementar este tipo de sugerencias experimentales son los modelos mixtos, los cuales permiten modelar la gran variabilidad existente en el tamaño entre individuos de una misma población a lo largo del tiempo. Al incorporar en el modelo componentes que modifican la estructura de la varianza (residuales), los modelos mixtos permiten obtener estimadores más confiables de los coeficientes que determinan el incremento en tamaño corporal a lo largo del tiempo. Dentro de la familia de modelos mixtos están los GLMM (*Generalized Linear Mix Models*), los cuales pueden ser aplicados en datos no normales y en los que efectos aleatorios son presentes (Bolker *et al.*, 2008; Zuur *et al.*, 2009).

Octopus maya es una especie endémica de la Península de Yucatán (Solis, 1967), con gran interés para su cultivo durante las últimas décadas (Van Heukelem, 1977; Hanlon y Forsythe, 1985; Domínguez *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2007). Esta especie es un interesante modelo biológico para generar hipótesis en relación al CH entre individuos hermanos. Atendiendo a la problemática planteada, la siguiente investigación tuvo como objetivos: (i) determinar la relación entre el día y el peso de eclosión, (ii) evaluar el supuesto planteado por Pecl *et al.*, (2004), poniendo a prueba la hipótesis de que las tasas de crecimiento son independientes del peso inicial bajo condiciones de ambiente (temperatura y alimentación) controlado; (iii) modelar el crecimiento exponencial durante la etapa temprana en juveniles, analizando cómo la variabilidad de los pesos iniciales se amplifican en función del tiempo.

Con esto en mente, los datos obtenidos durante el experimento se utilizaron para realizar dos tipos de análisis. El primero para determinar si individuos de diferente categoría de peso inicial presentan tasas de crecimiento diferentes, y el segundo para modelar el incremento en peso en función del tiempo.

II. MATERIALES Y METODOS

2.1 *Origen de los organismos*

Los juveniles de *O. maya* utilizados en esta investigación fueron obtenidos en el Laboratorio de Producción Experimental de Pulpo de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicado en Sisal (Yucatán, Mexico), mediante el acondicionamiento reproductivo de hembras silvestres. Se analizó el crecimiento de dos poblaciones de juveniles: Población 1 (eclosionada en febrero 2008) y Población 2 (eclosionada en julio 2008), siendo consideradas como experimentos independientes. Las hembras fueron capturadas en la zona costera adyacente a la población de Sisal, utilizando el arte de pesca artesanal llamado “jimba”.

2.2 *Diseño experimentales*

2.2.1 *Experimento 1 (E1)*

Los juveniles utilizados en E1 provinieron de huevos incubados artificialmente a 28 °C (ver Figura 1b). Iniciada la eclosión de los primeros juveniles la puesta fue trasladada cuidadosamente a un estanque de eclosión (20 litros) ($28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$). La eclosión se llevó a cabo durante cinco días bajo estas condiciones, distribuyéndose en función del día de nacimiento en estanques de 500 litros conectados a un sistema de recirculación. Los juveniles fueron mantenidos durante dos semanas con pasta de jaiba (95% carne de la jaiba *Callinectes sapidus* y 5% de grenetina) y adultos vivos de *Artemia salina* (Rosas *et al.*, 2008), siendo ambos tipos de alimento ofrecidos a saciedad. Se utilizaron conchas del gasterópodos *Megalongena corona bispinosa* como refugio, en una proporción de 3 refugios por individuo. A los 15 días de edad se seleccionaron 84 individuos de los estanques, siendo pesados individualmente (± 0.01 g) y considerándose éste peso (P_{15}) como el inicial para la evaluación del crecimiento. El criterio para utilizar P_{15} como inicial fue tomando en cuenta que esta especie, al igual otros cefalópodos, tiene un crecimiento no-neto durante los primeros 10 días de vida (Vidal *et al.*, 2002; Moguel *et al.*, 2009).

A partir del P_{15} se establecieron tres categorías arbitrarias de tamaño inicial: (i)

“pequeños” (P), $P_{15} \leq 0.14\text{g}$ (n=28); (ii) “medianos” (M), $0.16\text{g} \geq P_{15} \leq 0.19\text{g}$ (n=28); (iii) “grandes” (G), $0.21\text{g} \geq P_{15}$ (n=28). Los juveniles posteriormente fueron individualizados en dispositivos de 300 ml (ver Figura 1d) con flujo constante de agua de mar proveniente de un sistema de recirculación (tratada con filtro UV, ozonificador y fraccionador de espuma), siendo la temperatura mantenida a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ con un calefactor/enfriador y el fotoperiodo controlado a 12 horas luz – 12 horas oscuridad. Cada animal fue alimentado dos veces por día con la pasta de jaiba a saciedad. El periodo de experimentación fue de 75 días, durante los cuales se evaluó la supervivencia individual durante la alimentación. Se registró el peso de los individuos que sobrevivieron a los 75 días edad (P_{75}).



Figura 1: Áreas del Cultivo Experimental de *Octopus maya* de la UNAM (UMDI-Sisal). (a) Sala de maduración de hembras; (b) incubadores artificiales; (c) sala de pre-engorda y (d) dispositivos de 300 ml utilizados para el seguimiento del crecimiento individualizado.

2.2.2 Experimento 2 (E2)

En este experimento se dispuso de juveniles que eclosionaron dentro del sistema de incubación descrito con el fin de evitar cambios bruscos de temperatura al momento de la eclosión, evitando con ello la eclosión prematura reportada en otras especies (Villanueva y Norman, 2008). La temperatura de eclosión (28°C) resultó ser la misma

que los embriones experimentaron durante el período de incubación. Se obtuvo un total de 197 juveniles durante un periodo de eclosión de 8 días. Veinticuatro horas después de la eclosión del primer grupo de juveniles se controló el peso de todos los recién eclosionados (peso al día 1, $P_1; \pm 0.01g$), siendo inmediatamente individualizados en los dispositivos descritos en el experimento anterior. Los animales fueron mantenidos hasta los 15 días con alimento vivo (sub-adultos y adultos de *Artemia*) y trozos de jaiba (*Callinectes sapidus*), ambos ofrecidos a saciedad. A esta edad los animales fueron nuevamente pesados individualmente ($\pm 0.01g$) con el fin de establecer los tratamientos bajo las mismas categorías de tamaños del E1. Los pesos de las categorías para este experimento fueron las siguientes: (i) P, $P_{15} \leq 0.10$ g (n=30); (ii) M, $0.11g \geq P_{15} \leq 0.12g$ (n=45); (iii) G, $P_{15} \geq 0.13g$ (n=30). Se evaluó el crecimiento a los 15, 45, 75 y 105 días de edad a una temperatura de $27^\circ (\pm 1^\circ C)$. La mortalidad fue cuantificada diariamente durante los periodos de alimentación para el análisis de supervivencia de cada tratamiento.

2.3 Evaluación del peso de eclosión

Con la finalidad de evaluar el efecto del día de la eclosión en el peso de individuos a las 24 h de haber eclosionado (P_1) se aplicó un ANOVA a los valores de P_1 de E2, utilizando el día de eclosión (del 1^{ero} al 8^{avo} día) como niveles del factor categórico en el modelo. Para asegurar que se cumpliera con los requisitos del ANOVA (homogeneidad de varianzas, y distribución normal) se utilizaron técnicas de regresión y análisis de residuales.

2.4 Análisis de crecimiento

Para analizar el crecimiento individual, comúnmente se usan métodos de ajuste de regresión del peso (variable dependiente o de respuesta) contra tiempo (variable independiente o explicativa). Las dificultades con estos métodos es que la relación raramente es lineal, y si lo es, es sólo para períodos de tiempo cortos y muy específicos; y, que las mediciones de los individuos no son independientes en el tiempo, requisito indispensable de cualquier ajuste de regresión (Zar, 1999; Zuur *et al*; 2007). Otro abordaje metodológico es usar una regresión del peso de cada individuo en un tiempo posterior (conocido y fijo) contra su peso en un tiempo anterior. Este método asegura que la función X-Y sea lineal, y los datos, siempre que estén identificados individualmente, y sean independientes. La ecuación de esa recta describe entonces, un

tipo de crecimiento relativo, cuya pendiente representa la proporcionalidad que guarda la diferencia entre dos individuos en un tiempo posterior (2) con respecto a la diferencia entre esos mismos individuos en un tiempo anterior (1). Si la pendiente de la recta es mayor (o menor) que 1, significa que la diferencia en peso entre individuos se incrementa (o disminuye) conforme pasa el tiempo, y su valor representa la magnitud por la cual dicha diferencia se incrementa (o disminuye) para ese periodo de tiempo en particular. Si la pendiente es igual a 1, significa que la diferencia en peso entre individuos se mantiene similar durante ese periodo de tiempo. Es importante hacer notar que ésta pendiente no es una tasa de crecimiento (definida como incremento en peso por unidad de tiempo), y no puede, por tanto, ser interpretada como tal. Por su parte, el intercepto de la recta representa el peso final que adquiere el individuo más pequeño del juego de datos.

En este contexto, la comparación de pendientes de diferentes rectas brinda información sobre la magnitud en que la diferencia en peso entre individuos cambia transcurrido el tiempo experimental dependiendo de la recta a la que pertenecen. La comparación de los interceptos brinda información sobre la tasa de crecimiento de los individuos pertenecientes a cada recta, porque interceptos diferentes indicarían que dos individuos con valores similares de peso inicial pueden adquirir pesos finales diferentes. Dado que el tiempo transcurrido es fijo para todos los individuos, dicha diferencia necesariamente implica tasas de crecimiento distintas. Mientras que esta manera de analizar el crecimiento permite corroborar indirectamente si individuos de distintas categorías (diferentes rectas) en una población presentan tasas de crecimiento diferentes, no permite hacer estimativas de los parámetros de la ecuación de crecimiento, la tasa de crecimiento (incremento en peso por unidad de tiempo) y el intercepto (el peso mínimo teórico).

Con esto en mente, los datos obtenidos durante ambos experimentos se utilizaron para realizar dos tipos de análisis (Figura 2). Uno primero para determinar si individuos de diferente categoría de peso inicial presentan tasas de crecimiento diferentes, y uno segundo para modelar el incremento en peso en función del tiempo. El primer análisis utilizó los datos del E1 y E2 por separado, y ajustó dos modelos a la relación lineal entre P_{75} y P_{15} de cada individuo. El segundo utilizó únicamente los datos del E2, y ajustó un modelo a la relación exponencial del peso de todos los individuos en función

del tiempo (edad), para este caso hasta los 105 días.

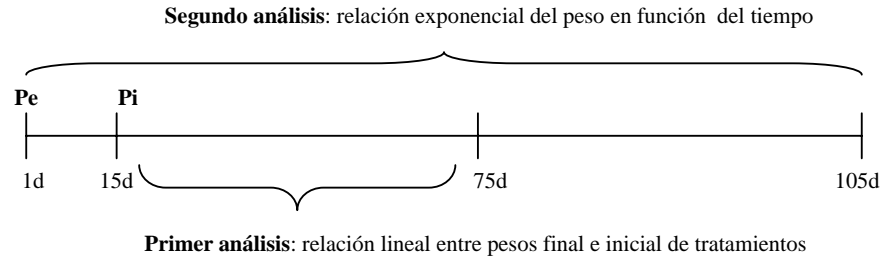


Figura 2: Diagrama representativo del análisis del crecimiento en función de los días (d) de la fase exponencial de crecimiento de *Octopus maya*: (i) El primer correspondió a modelos lineales (E1 y E2) derivados de la relación entre el peso inicial ($P_i = P_{15}$) y peso a los 75 días de edad, con la finalidad determinar si la tasa de crecimiento es la misma para las categorías de P_i . (ii) El segundo consistió en ajustar un modelo exponencial para la relación entre peso y la edad desde la eclosión hasta los 105 días de edad (E2), determinándose la tasa de crecimiento y la forma en que la variación del peso se expresa a lo largo del tiempo.

2.4.1 Primer análisis: Relación entre P_{15} y P_{75}

El supuesto asumido por Pecl *et al.* (2004) de que individuos de distinto tamaño tienen “tasas de crecimiento iguales” fue evaluado mediante la siguiente hipótesis: “las diferencias entre los pesos (ΔP) iniciales (P_{15}) y pesos alcanzados en un tiempo posterior (P_{75}) aumentan en función del tiempo ($\Delta P_{15} < \Delta P_{75}$) en juveniles individualizados de *O. maya* de una misma población (hermanos) mantenidos bajo condiciones de ambiente controlado”.

Para ello, se utilizó el siguiente modelo de regresión lineal:

$$P_{75\ i} = \alpha + P_{15\ i} \beta + \varepsilon_i$$

Donde: α es el intercepto; β es la pendiente ($\Delta P_{75} / \Delta P_{15}$); ε_i es el error intrínseco, $y \sim N(0, \sigma^2)$.

Ambos modelos lineales fueron ajustados utilizando modelos mixtos del tipo GLMM (*Generalized Linear Mix Modelling*), asegurándose el cumplimiento de los requisitos de la regresión lineal (normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia) (Zuur *et*

al., 2009). Se aplicó un ANCOVAR (análisis de covarianza) del P_{75} , utilizando como covariable el P_{15} , y como factor categórico el grupo de tamaño inicial asignado (P, M y G).

Se llevó a cabo una exploración de datos a partir de los siguientes gráficos: (i) de puntos tipo (“*Cleveland dotplots*”) para identificar datos extremos; (ii) histogramas y gráficos de cuantiles (“*Q-Q plots*”) para cerciorarse de la distribución normal; (iii) gráficos X-Y (“*Scatterplots*”) para asegurar una relación lineal; (iv) gráficos X-Y entre todas las variables explicativas para detectar co-linealidad (Zuur *et al.*, 2007). La regresión lineal fue ajustada con GLS (*General Least Square*) mediante REML (*Restricted Maximum Likelihood*) con método que permite comparar modelos con distintas estructuras de varianzas (EV). El modelo con la EV óptima fue seleccionado tomando en consideración el valor de AIC (*Akaike Information Criteria*)¹.

Mediante pruebas de hipótesis (F y L ratio (verosimilitud)), las pendientes de los diferentes grupos se evaluaron a partir del término de la interacción (“ P_{15} x factor tamaño inicial”), mientras que los interceptos se evaluaron a partir del factor categórico en el modelo (Sokal y Rohlf, 1995). Los residuales fueron analizados por inspección visual (Montgomery y Peck, 1992; Draper y Smith, 1998), mediante la elaboración de los siguientes gráficos: (i) residuales estandarizados *versus* los valores predichos por la ecuación (“*fitted values*”) y *versus* P_{15} , con una función suavizadora (“*smoother*”) para detectar potenciales patrones en los residuales; (ii) residuales estandarizados *versus* cada nivel del factor categórico, (iii) residuales estandarizados *versus* P_{15} para cada nivel del factor (“*Coplots*”).

2.4.2 Segundo análisis: Modelo exponencial de crecimiento

Dadas las características del análisis aplicado a la segunda población de *O. maya*, se modeló la fase temprana (exponencial) del crecimiento, es decir, durante los primeros 105 días de edad. Los datos fueron explorados mediante inspección visual utilizando los siguientes gráficos: de puntos tipo (“*Cleveland dotplots*”) para identificar datos

¹ AIC es un criterio estadístico derivado de la teoría de la información que sirve como herramienta para escoger el mejor modelo. Representa una medida de la bondad de ajuste, a la vez penaliza por el número de parámetros en el modelo. El AIC puede ser calculado para cada combinación de variables explicativas incluidas en un modelo, y el modelo con el menor valor de AIC se considera el óptimo. Su fórmula es: $AIC = n \log(SS \text{ residual}) + 2(p+1) - n \log(n)$ (Akaike, 1974).

extremos; histogramas y gráficos de cuantiles (“*Q-Q plots*”) para cerciorarse de la distribución normal; gráficos X-Y (“*Scatterplots*”) para identificar la naturaleza de la relación entre el peso y el tiempo (Zuur *et al.*, 2007). A partir de la información obtenida en la exploración de datos se procedió a aplicar un ajuste con GLS mediante REML que permitiera modelar linealmente la relación entre el logaritmo natural del peso (transformado) en función del tiempo, incorporando estructuras de correlación y de varianza (GLMM) para asegurar el cumplimiento de los requisitos de la regresión lineal (normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia). El modelo con las estructuras óptimas de correlación y varianza fue seleccionado tomando en consideración el valor de AIC. Una vez comprobada la significancia de los parámetros de la regresión (mediante pruebas de F y t), se llevó a cabo la validación del modelo mediante la inspección visual de los residuales estandarizados *versus* tiempo y los residuales estandarizados *versus* los valores predichos por el modelo (“*fitted values*”) (Montgomery y Peck, 1992; Draper y Smith, 1998). La tendencia de las varianzas de pesos en el tiempo fue cuantificada y derivada de la aplicación de la mejor estructura de varianza (menor AIC) que permitiera cumplir con la homogeneidad de las varianzas del modelo lineal.

Todos los análisis estadísticos y los modelos fueron realizados con el *software* libre “R – Project”, en tanto que las gráficas fueron obtenidas con Brodgar 2.5.7 (Highland Statistics, Ltd.).

III. RESULTADOS

3.1 Evaluación del peso de eclosión

La siguiente gráfica muestra los P₁ en función de los días de eclosión del E2. El promedio de P₁ más bajo se obtuvo en el día 5 (0.103g, n = 6) y el más alto en el día 6 (0.121g, n=7). Dado que el mayor número de juveniles eclosionaron los días 1 (26.90%), 2 (19.80%), 3 (9.64%), 4 (18.27%), y 8 (15.23%), el ANOVA se aplicó únicamente para esos datos. Los resultados mostraron la ausencia de diferencias significativas entre los P₁ correspondientes a los pulsos máximos de eclosión ($F = 1.927$; $p = 0.108$).

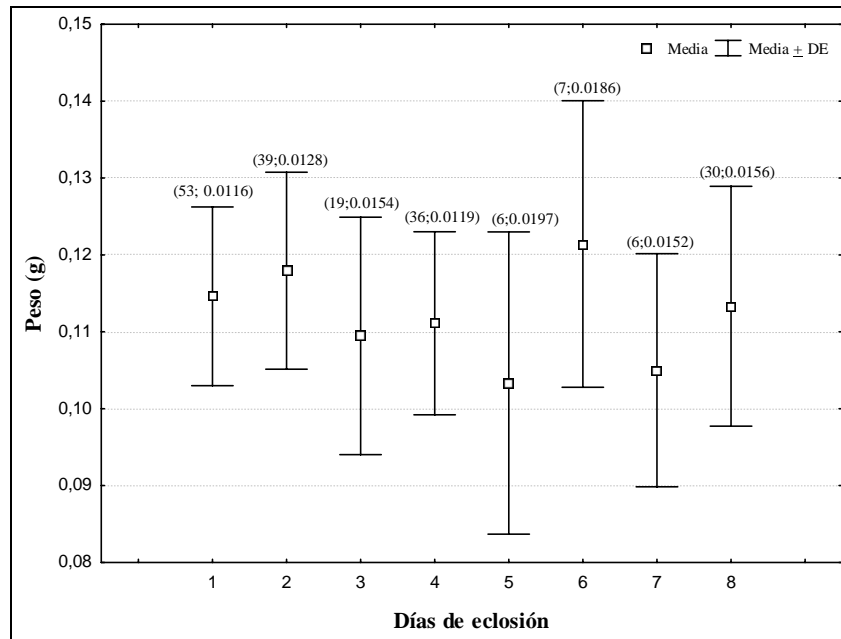


Figura 3: Peso medio (\pm desviación estándar) de juveniles de *O. maya* 24 h después de eclosionar (P₁) para cada uno de los días que duró la eclosión de la camada en condiciones de ambiente controlado (n= numero de individuos; \pm desviación estándar).

3.2 Supervivencia

Las supervivencias de ambos experimentos se presentan en la Figura 4. En el E1 la mortalidad fue baja hasta los 50 días en los tres tratamientos, incrementándose fuertemente entre los 65 y los 70 días, dando como resultado el término del experimento a los 75 días con 100% de mortalidad. El E2 tuvo una duración mayor que se extendió desde 24 horas post-eclosión (día 1) hasta los 105 días de edad. Durante este experimento se presentaron dos periodos de alta mortalidad: entre los 7 y 32 días de

edad y entre los 88 y 95 días de edad. Los individuos pertenecientes a G presentaron una supervivencia estable a partir del día 33 de edad finalizando con un 64.52%, no así P y M que finalizaron ambos con un 50% de la población.

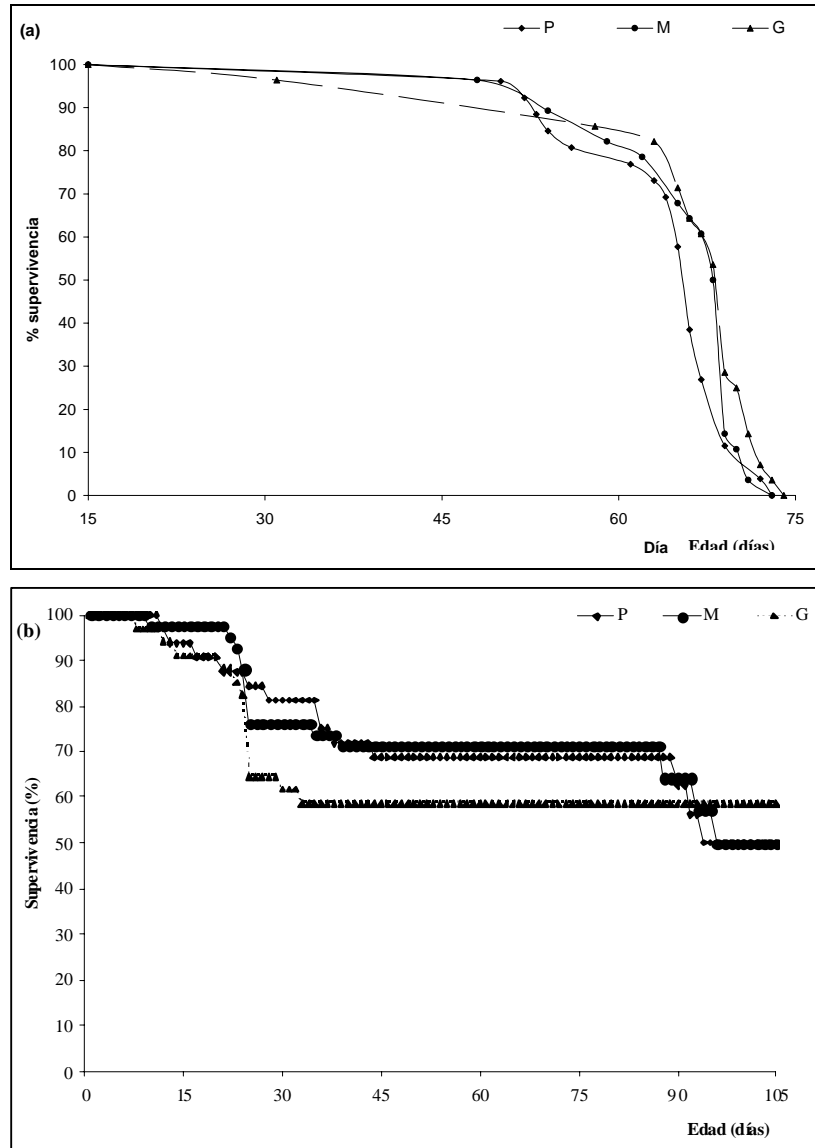


Figura 4: Supervivencia de juveniles de *O. maya* mantenidos individualizados y categorizados en función del peso a los 15 días de edad: “pequeños” (P), “medianos” (M) y “grandes” (G) en E1 (a) y E2 (b). En E1 los juveniles fueron alimentados con pasta de jaiba y mantenidos a $27.5 (\pm 1^\circ\text{C})$, y en el E2 se alimentó con dietas vivas hasta los 15 días y trozos de jaiba hasta los 105 días de edad a $27.2 (\pm 1^\circ\text{C})$.

3.3 Análisis del crecimiento

3.3.1 Primer análisis: Relación entre P_{15} y P_{75}

Los modelos lineales que mejor se ajustaron a los datos de ambos experimentos fueron aquellos donde P_{75} sólo depende significativamente de P_{15} ($F = 84.25$ y $F = 23.62$; $p <$

0.001, respectivamente). La siguiente tabla muestra los ANOVAs secuenciales para la variable explicatoria en estructura fija (Tabla 2).

Tabla 2: ANOVA secuencial para evaluar la significancia de la interacción en los modelos lineales.

Experimentos	Modelo lineal	g.l	F	Valor-p
E1	Peso inicial (A)	1	87.03	<0.001
	Tratamiento (B)	2	1.30	0.30
	Interacción (AxB)	2	1.54	0.23
E2	Peso inicial (A)	1	22.96	<0.001
	Tratamiento (B)	2	0.14	0.87
	Interacción (AxB)	2	0.95	0.40

El ANCOVAR determinó que no existen diferencias significativas en las pendientes de los modelos lineales de cada tratamiento para ambos experimentos, indicando que las diferencias en peso a través del tiempo fueron similares para las tres categorías de peso inicial en las que fueron clasificados los organismos de cada población. Ambas poblaciones presentaron interceptos estadísticamente similares a 0 (Tabla 3), indicando que los pulpos de ambas poblaciones incrementaron su peso inicial en la misma magnitud. Dado que tanto el E1 y E2 tuvieron una duración de 60 días, estos resultados indican que los pulpos de ambas poblaciones presentaron tasas de crecimiento similares. La primera población presentó una pendiente ligeramente menor ($\beta \sim 3$) en comparación a la segunda ($\beta \sim 5.5$), indicando que durante los 60 días que duraron ambos experimentos, la diferencia entre el peso inicial (P_{15}) de dos individuos fue amplificado 5 veces en la segunda, en tanto que lo hizo sólo 3 veces en la primera. Las pendientes de ambos modelos, sin embargo, no fueron comparadas estadísticamente.

Para cumplir con el requisito de homogeneidad de las varianzas, ambos modelos fueron inicialmente ajustados utilizando diversas estructuras de varianza. De todas las estructuras utilizadas, los modelos con los valores mínimos de AIC fueron los que utilizaron una estructura de varianza del tipo $\varepsilon \sim N(0, [\sigma^2 \cdot P_{15}])$ (AIC=-67.31 y AIC=113.80) para E1 y E2, respectivamente (ver residuales en Anexo 1). En ambos casos, la validación final de los modelos mostró la ausencia de patrones en los residuales, conformándose así a los requisitos del análisis por regresión. Los modelos

finales, con los valores observados y predichos son presentados en la Figura 4.

Tabla 3: Coeficientes de las regresiones lineales derivadas de la relación P15 y P75 para el análisis de crecimiento de juveniles individualizados de *O. maya* obtenidos en condiciones de ambiente controlado (α =intercepto; β =pendiente; σ = varianza; EE=error estándar).

Experimentos	Coefficientes	Valor	EE	Valor-t	p
E1	α	-0.023	0.056	-0.42	0.68
	β	3.010	0.328	9.18	< 0.001
	σ	0.268			
E2	α	0.327	0.193	1.70	0.09
	β	5.523	1.136	4.86	< 0.001
	σ	1.312			

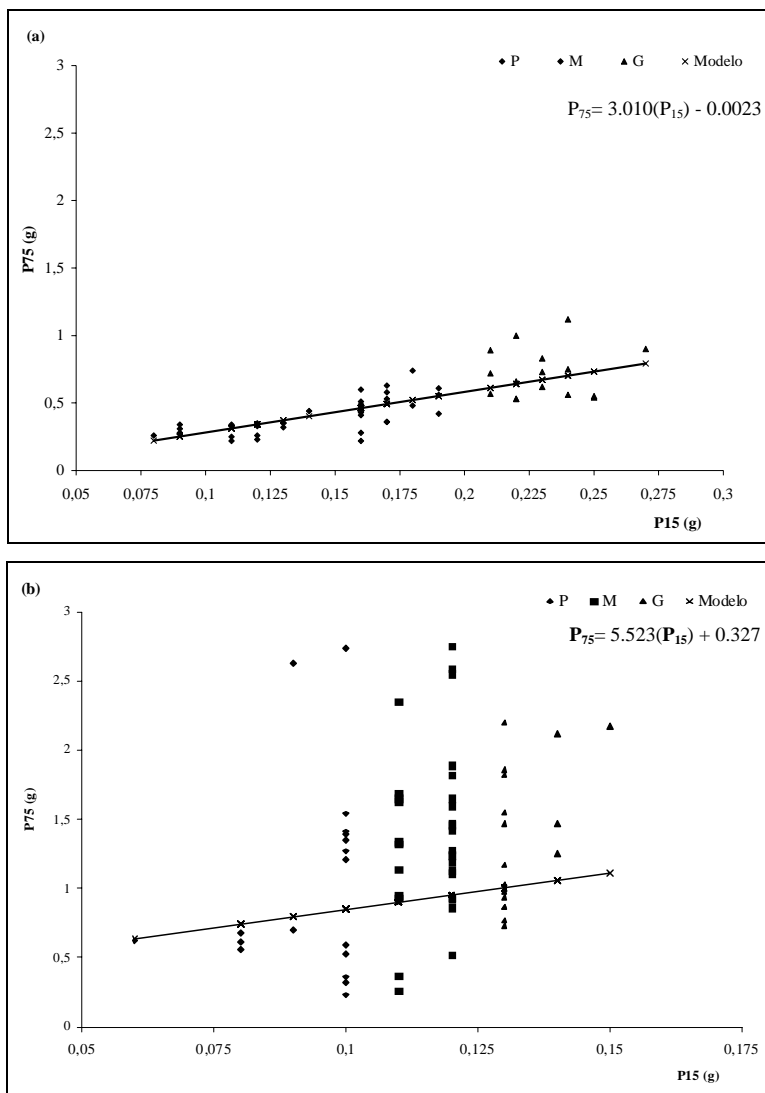


Figura 4: Relación lineal entre el peso a los 15 días (P_{15}) y a los 75 días (P_{75}) de edad en juveniles de *O. maya* individualizados pertenecientes a las categorías de tamaño inicial de. E1: “pequeños” (P), $P_{15} \leq 0.14g$ (n=28); (ii) “medianos” (M), $0.16g \geq P_{15} \leq 0.19g$ (n=28); (iii) “grandes” (G), $0.21g \geq P_{15}$ (n=28). E2 (b) P: $P_{15} \leq 0.10g$; (n=30); M: $0.11g \geq P_{15} \leq 0.12g$; (n=45); G: $P_{15} \geq 0.13g$; n=30. Todos los puntos pertenecen a la misma recta, cuya ecuación es: (a) $P_{75}=3.010(P_{15})- 0.0023$; (b) $P_{75}=3.523(P_{15})+ 0.327$.

3.3.2 Segundo análisis: Modelo exponencial de crecimiento (E2)

La relación exponencial entre el peso y el tiempo fue modelada utilizando datos previamente transformados (logaritmo natural del peso) con la finalidad de linealizar dicha relación (ver Figura 5). La falta de independencia temporal (el peso fue registrado repetidamente para los mismos individuos a lo largo del tiempo) resultó en la presencia de un patrón cíclico en los residuales. Por lo anterior, se procedió a incorporar una estructura de correlación en la fracción aleatoria del modelo (ϵ_i). Los valores AIC, dieron como resultado el uso de una estructura de correlación espacial esférica (AIC= 319.45). Siguiendo lo estipulado por Pinheiro y Bates (2000) se decidió incluir la estructura espacial esférica debido a que: (i) los valores de AIC mostraron una mejoría en el modelo que incluía dicha estructura y (ii) la validación gráfica de los residuales mostró que el patrón observado anteriormente desaparecía con este tratamiento (Anexo 1).

La heterogeneidad de la varianza fue identificada a partir del incremento en la variación del peso en el tiempo conforme se incrementa el tiempo, siendo modelada mediante la inclusión de una estructura de varianza del tipo ($\epsilon_i \sim N(0, \sigma^2 [\text{tiempo}_i]^{2\delta})$), lo cual mejoró aún más el valor de AIC (AIC = 251.4). Dicha mejora fue significativa (L. ratio =70.00; $p < 0.001$). Finalmente, la inspección gráfica de los residuales demostró una distribución de la dispersión residual uniforme y sin ningún patrón (ver Anexo 1c). Los coeficientes del modelo de crecimiento exponencial son presentados en la Tabla 4.

Tabla 4: Coeficientes del modelo exponencial de crecimiento de juveniles individualizados de *O. maya* a 27 °C ($\pm 1^\circ$) (α =intercepto; β =pendiente; EE=error estándar).

Coefficientes	Valor	EE	Valor-t	P
α	-2.182	0.022	-100.92	<0.001
β	0.030	0.001	48.60	<0.001
σ	0.209			

Los pesos individuales observados y predichos por el modelo en función del tiempo ($F = 2361.85$; $p < 0.001$). Se observa en esta gráfica un aumento de la dispersión de los pesos de los individuos al aumentar la edad de éstos, lo cual fue cuantificado mediante la estructura de varianza utilizada, misma que define una amplificación de la varianza

por el incremento en tiempo y elevado a un coeficiente delta ($\delta = 0.2042$).

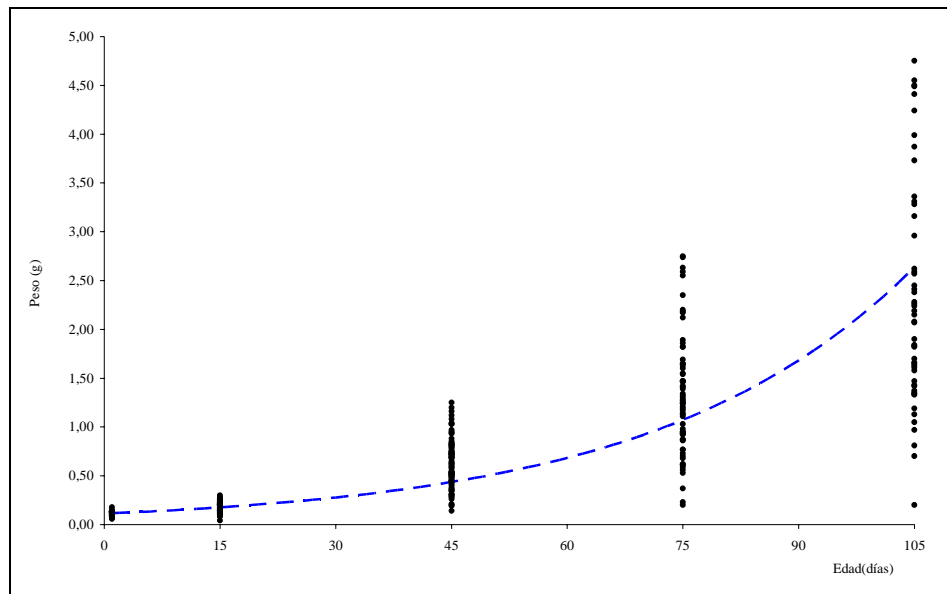


Figura 5: Relación entre el peso y la edad en juveniles tempranos de *O. maya* mantenidos individualizados a 27°C (± 1). Los puntos representan los datos individuales del peso y la línea segmentada (azul) la curva de ajuste exponencial ($Peso = 0.113e^{0.03*edad}$). La aplicación de una estructura de varianza [$\epsilon_i \sim N(0, \sigma^2)$ [tiempo i]^{2 δ} , donde $\delta=0,204$ permitió modelar la varianza del peso en función del tiempo.

IV. DISCUSION

4.1 Evaluación del peso de eclosión

La gran variabilidad asociada al tamaño en el momento de la eclosión ha sido reportada en varias especies cefalópodos bajo condiciones de ambiente controlado (VanHeukelem, 1976; Forsythe, 1984; DeRusha *et al.*, 1987; Forsythe & Hanlon, 1988; Villanueva, 1995; Domínguez *et al.*, 2002; Segawa & Namoto, 2002; Ortiz *et al.*, 2006; Leporati *et al.*, 2007). En el caso de *O. maya*, la eclosión ocurre a lo largo de un periodo entre 5-8 días, periodo lo suficientemente largo para considerar al tiempo como responsable de al menos una parte de dicha variación. Aunque el día de eclosión pudiera constituir un factor de influencia sobre el crecimiento posterior, los resultados del presente estudio muestran la ausencia de diferencias significativas entre el P_1 y el día de eclosión. La influencia del día de eclosión en la variación de tamaños iniciales ha sido escasamente reportada en cefalópodos (Choe, 1963; Ikeda *et al.*, 1999; Steer *et al.*, 2003). Mientras que Minton (2004) reporta resultados similares para *Sepia pharaonis*, Ikeda *et al.*, (1999) muestran que longitud del manto de paralarvas de *Sepioteuthis lessoniana* provenientes de una misma hembra e incubadas a 25°C presentaron una directa relación con el periodo en que eclosionaron, y consideraron la posición del huevo en la puesta como el mecanismo explicando dicha relación. Por otra parte, la directa relación entre el desarrollo embrionario y la temperatura ambiental ha sido ampliamente reportada en cefalópodos (Boletzky 1987; Boletzky 1997; Oosthuizen *et al.*, 2002), siendo el tiempo de depositación de los huevos un factor que podría producir una baja sincronización de la eclosión entre individuos de una misma puesta. El fenómeno ha sido reportado recientemente en algunas peces marinos bentónicos (e.g *Amphiprion melanopus* Green *et al.*, 2006), pudiendo ser validado en futuras investigaciones en *O. maya* dado el gran tamaño de los huevos (Van Heukelem, 1977).

4.2 Relación entre P_{15} y P_{75}

A partir de los modelos lineales que relacionan P_{15} y P_{75} se estableció que los individuos de ambas poblaciones de juveniles de *O. maya* presentan la misma proporción en la diferencia entre pesos en un tiempo anterior y uno posterior (pendientes similares) independientemente de la categoría de tamaño en el que fueron clasificados inicialmente. De la misma manera, los juveniles de pesos iniciales similares incrementaron su peso en la misma magnitud en el mismo intervalo de tiempo,

indicando tasas de crecimiento estadísticamente similares tanto para P como M y G. Así, los pesos adquiridos en el tiempo fueron condicionados por el adquirido al inicio de su ciclo de vida. Si consideramos las diferencias de peso en el tiempo como una capacidad de transformar biomasa, y ésta, como una tasa de crecimiento, podemos señalar que los juveniles de esta especie crecen de la misma forma aunque dependiente del peso inicial. Esto pudo ser validado en dos poblaciones de hermanos provenientes de dos hembras distintas, ambas poblaciones siendo obtenidos en condiciones de cultivo (origen conocido) y mantenidas a temperatura estable y alimentación controlada. Dadas estas características experimentales, el estudio valida empíricamente el supuesto de Pecl *et al.*, (2004), y corrobora la hipótesis de que los juveniles de *O. maya* crecen de la misma forma independiente de su tamaño inicial.

Las diferencias entre las pendientes de ambas poblaciones indican un efecto particular del peso inicial sobre el peso final. Los individuos de la población 1 presentaron una pendiente más baja ($\beta \sim 3$) en comparación a la población 2 ($\beta \sim 5.5$), indicando que los individuos de esta última tiene la capacidad de amplificar las diferencias en el tamaño inicial en una magnitud mayor en el tiempo, dando como resultado mayores pesos finales. Esto quiere decir que un mismo intervalo de peso inicial, o pequeñas diferencias de éste, generarán pesos en el tiempo superiores en la población 2 en comparación a la 1, siendo amplificada por 5.5 en la segunda y por 3 en la primera. Esto quiere decir que el efecto del tamaño inicial es particular de cada población y por tanto, las fuentes que generan las diferencias están más bien ligadas al origen de los organismos, el cual al final determina la capacidad de aumentar el peso en el tiempo.

Las fuentes asociadas a la variación del tamaño de eclosión de paralarvas han sido clasificadas en tres efectos (Pecl *et al.*, 2004): (i) efecto ambiental de gran escala, (ii) efecto de pequeña escala asociado al microambiente del huevo y (iii) el efecto maternal. En este estudio la temperatura de incubación y de cultivo de los juveniles fue estable y no similar entre ambos experimentos, siendo posible descartar el “efecto Forsythe” de esta discusión. El efecto del microambiente del huevo está asociado directamente a la configuración de las puestas en algunas especies de cefalópodos (Steer *et al.*, 2003) y en peces bentónicos (Green *et al.*, 2006), y por ende, en la sincronización en el desarrollo embrionario entre hermanos. El tamaño de larvas provenientes de huevos bentónicos pueden estar directamente relacionados con la ubicación que le da la hembra a sus

huevos, modificándose la interacción del embrión con el ambiente (Bernardo, 1996). En relación al periodo de eclosion, las hembras del género *Octopus* se caracterizan por realizar la postura de los huevos de forma secuencial, siendo estos colocados en filamentos que convergen en pedúnculos que son los que le dan estabilidad a la puesta. Diferencias en los tiempos de depositación podrían determinar un tamaño de embrión particular, generándose diferencias a las primeras horas al contacto con su ambiente. Al respecto, Green *et al.* (2006) encontraron diferencias entre los tamaños de los embriones puestos en la periferia y en el centro de posturas del pez bentónico *A. melanopus*. Estas diferencias están asociadas a la posición dentro de la puesta derivada del día de depositación, siendo los embriones del centro más grandes que los de la periferia. En *S. sepioidea*, LaRoe (1971) reportó eclosiones más rápidas en huevos ubicados en la zona distal del racimo que en la zona basal, sugiriendo que las condiciones del microambiente que rodean a cada embrión podrían estar modulando las condiciones particulares de cada uno de estos, y por lo tanto, sus características al nacer. Entre los factores relacionados con la posición del huevo y la fisiología del embrión se encuentran las observaciones realizadas en la cantidad de fluido perivitelino en embriones que se encuentran en distinta posición. Estudios realizados en calamares han demostrado que en este fluido se encuentra un tranquilizante natural que evita la eclosión prematura de los embriones (Marthy *et al.*, 1976). Debido a que la cantidad de fluido cambia con la posición del embrión es de esperar que diferentes posiciones afecten el momento preciso en que los embriones eclosionan y por tanto el tamaño al nacer. Complementariamente, huevos dentro de puestas más pequeñas se desarrollan más rápido que huevos dentro de puestas más grandes y huevos ubicados en la zona distal de las cápsulas se desarrollan más rápido en *Eupryma tasmanica* (Steer *et al.*, 2004). Las concentraciones de oxígeno pueden condicionar el tamaño del embrión y la tasa de crecimiento de éste, asociándose éste a la ubicación de los huevos en las puesta de *A. melanopus* (Green *et al.*, 2006).

La condición nutricional de la hembra y/o a los antecedentes genéticos son antecedentes que pueden determinar las características de la descendencia. Si bien ambas hembras usadas fueron sometidas a la misma dieta para la inducción al desove, es posible que existan diferencias en el “historial de alimentación” de las hembras previo al acondicionamiento. Steer *et al.*, (2004) señalan una directa relación entre el tamaño de la paralarvas y el *status* nutricional de las hembras de *E. tasmanica*, siendo menor el

tamaño de las paralarvas en hembras estresadas con alimentación de baja calidad de lípidos. En relación al tamaño de la hembra y su influencia en su descendencia no existe un patrón en cefalópodos: mientras que Sakaguchi *et al* 2002 modeló el tamaño de paralarvas de *O. vulgaris* en función del peso de las hembras, Steer *et al.*, (2004) no encontró una correlación entre el peso de hembras y el peso promedio de paralarvas de *E. tasmanica*.

4.3 Modelo exponencial de crecimiento

El modelo exponencial generado en el presente estudio integra al análisis la variabilidad del peso en la medida que se incrementa la edad, variabilidad no considerada dentro de los modelos existentes hasta la fecha (Tabla 5). La variación en las tasas de crecimiento exponencial estimadas para otras especies de octópodos permite resaltar diferencias importantes no sólo entre especies sino entre distintos estudios sobre la misma especie. Por ejemplo, la tasa de crecimiento exponencial determinada en este estudio fue inferior a lo reportado por Van Heukelem (1976) para *O. maya*.

En tanto que diferencias en el crecimiento exponencial a nivel intra e interespecífico pueden estar determinadas por factores abióticos y bióticos (Forsythe y Van Heukelem, 1987; Semmens *et al.*, 2004), la alta dispersión del peso conforme aumenta el tiempo contribuye de manera marcada a la baja precisión en la estimativa de los coeficientes del modelo. Es interesante hacer notar que las mayores tasas de crecimiento fueron obtenidas en estudios donde los organismos no fueron individualizados, sugiriendo que el crecimiento pudo ser afectado tanto por las condiciones particulares de cada tipo de cultivo (e.g canibalismo), como por las diferencias de temperatura, dietas, etc., que determinan la tasa de crecimiento en estos organismos (Forsythe y Van Heukelem, 1987; Semmens *et al.*, 2004; André *et al.*, 2008). Por ejemplo, mientras que Van Heukelem (1976) alimentó a los juveniles de *O. maya* sólo con alimento vivo, en éste y otros estudios (Rosas *et al.*, 2008) los animales fueron alimentados con pasta o con fragmentos de jaiba fresca. Utilizando también pasta o fragmentos de jaiba fresca en el Laboratorio Experimental de Cultivo de Pulpo de la UNAM en Sisal se cultivaron juveniles de *O. maya* desde la eclosión y hasta los 30g de peso vivo. Los animales recién eclosionados fueron mantenidos en ambiente controlado en tanques de 8m², en una densidad de 125 pulpos m² hasta alcanzar un peso de 2g. Posteriormente los pulpos fueron trasladados a tanques exteriores de 3m de diámetro en donde se mantuvieron en

densidades de 7 pulpos m². Este ejercicio se llevó a cabo 9 veces durante el año 2008, durante los cuales se obtuvo la relación entre peso y edad de 1628 animales medidos durante 129 días de cultivo (Rosas *com. pers.*). Al modelar el crecimiento con GLMM de estos datos, coeficientes relativamente similares fueron identificados.

Tabla 5: Tasa de crecimiento exponencial (TEC) (post-eclosión) y su duración (días) en especies del género *Octopus* a diferentes temperaturas (T °C) obtenidas en condiciones de laboratorio (R²=coeficiente de determinación).

Especie (T°)	Pi (g)	TCE	R ²	Tiempo (días)	T(°C)	Referencias
<i>O. digueti</i> (25°C)**	0.040	0.065	0.999	70	25	DeRusha <i>et al.</i> , 1987
<i>O. vulgaris</i> ** (P)	0.0014	0.081	0.985	60	21.2	Villanueva, 1995
<i>O. joubini</i>	0.045	0.066	0.992	28	25	Forsythe y Hanlon, 1981
<i>O. briareus</i>	0.065	0.048	0.970	140	25	Hanlon, 1987
<i>O. ocellatus</i> *	0.189	0.046	0.916	80	20	Segawa y Namoto, 2002
<i>O. ocellatus</i> *	0.179	0.059	0.944	60	25	Segawa y Namoto, 2002
<i>O. pallidus</i> *	0.245	0.014	0.784	114	14 → 18	Leporati <i>et al.</i> , 2007
<i>O. pallidus</i> *	0.276	0.018	0.896	114	18 →14	Leporati <i>et al.</i> , 2007
<i>O. maya</i> **	0.100	0.061	0.999	105	25	Van Heukelem, 1976
<i>O. maya</i> **	0.100	0.040	0.810	129	28	Rosas, 2009 (<i>com. pers.</i>)
<i>O. maya</i> *	0.110	0.030	0.889	105	27	Presente estudio

*individualizados; **no individualizados; (P) paralarvas.

Mientras que la tasa de crecimiento durante la fase exponencial puede depender de muchos factores (Forsythe y Van Heukelem, 1987; Semmens *et al.*, 2004; Moltschaniwskyj, 2004), la duración de dicha fase de muchas especies de octópodos está asociada principalmente a la temperatura (e.g *O. bimaculoides* Forsythe y Hanlon, 1988). Para el caso de este estudio, los pulpos fueron mantenidos a temperatura constante de 27°C y la duración de la fase exponencial fue la misma que la reportada en *O. maya* por Van Heukelem (1976). Datos no reportados y correspondientes al peso de los mismos juveniles a los 165 días indican que a esta edad la especie comienza a desacelerar su crecimiento, probablemente como consecuencia del final de la fase exponencial y el inicio de la fase potencial del crecimiento. Si bien se llegó a este resultado explorando el patrón de los residuales en función de la edad, se hace necesario validar dicha edad como el umbral de cambio de fase, tal como ha sido validado en otros octópodos (Semmens *et al.*, 2004).

Si este fuera el caso algunas observaciones pueden ser planteadas. Los pesos máximos alcanzados a los 165 días (10 g) fueron muy inferiores a los pesos promedios (766 g) reportados por Van Heukelem (1976), comenzando ambos modelos con juveniles de 0.1 g. Si bien los orígenes de dichas diferencias pueden estar asociados múltiples factores experimentales y bióticos, es posible que la reducción de pesos asociados al cambio de fase estén indicando un estado prematuro de maduración sexual, siendo este proceso uno de los principales factores que incide en el cambio de fase de octópodos (Semmens et al, 2004). El fenómeno de precocidad en machos de *O. maya* bajo condiciones similares ha sido reportado por Ávila-Poveda et al (2009) en individuos de pesos similares (~ 10g), así como también se ha observado la reducción de tamaños en *Eledone cirrhosa* sexualmente maduros cuando han estado sometidos a altas temperaturas y escaso alimento (Boyle & Knobloch, 1984).

Todos los modelos de crecimiento exponencial reportados en la literatura utilizan al coeficiente de determinación (r^2) como un indicador indirecto del grado de variabilidad entre el peso y la edad, asumiendo un buen ajuste entre ambas variables al obtener valores altos. En estos términos, el presente estudio entrega estimativas confiables de la media del peso para cada edad, debido a que se modeló la variabilidad asociada a los valores predichos y se estimó la magnitud ($\delta=0.204$) y forma de cómo ésta se incrementa conforme la edad avanza. Considerando esto, el modelo de crecimiento de *O. maya* aquí generado tiene mayor precisión en cuanto a la predicción del peso en función de la edad. Una representación teórica de la secuencia lógica del análisis y las implicaciones en el comportamiento del peso de un juvenil de *O. maya* en función de la edad se presentan en la Figura 6.

El aumento de la variación del tamaño en función del tiempo de individuos se ha denominado “*growth depensation*” (Ricker, 1958; Pfister & Stevens 2002) y ha sido ampliamente reportado en cohortes de peces (Umino *et al.*, 1997; Stefánsson *et al.*, 2000; Smith y Fuiman, 2003) y en otras taxas (ver Pfister & Stevens 2002). Se puede sugerir que una parte de la variación de estos datos no está siendo explicada por la variabilidad intrínseca del peso inicial, ó bien, que las pequeñas variaciones observadas en el peso inicial adquieren significados mayores en la medida en que los organismos crecen, como resultado de procesos biológicos responsables de dicha amplificación y que no fueron considerados en el modelo. Una vez que se cuenta con un procedimiento

confiable para estimar la magnitud en la que la variación residual del peso se incrementa con la edad, resulta metodológicamente más sencillo investigar los factores que contribuyen al aumento de la variación del tamaño en una edad determinada.

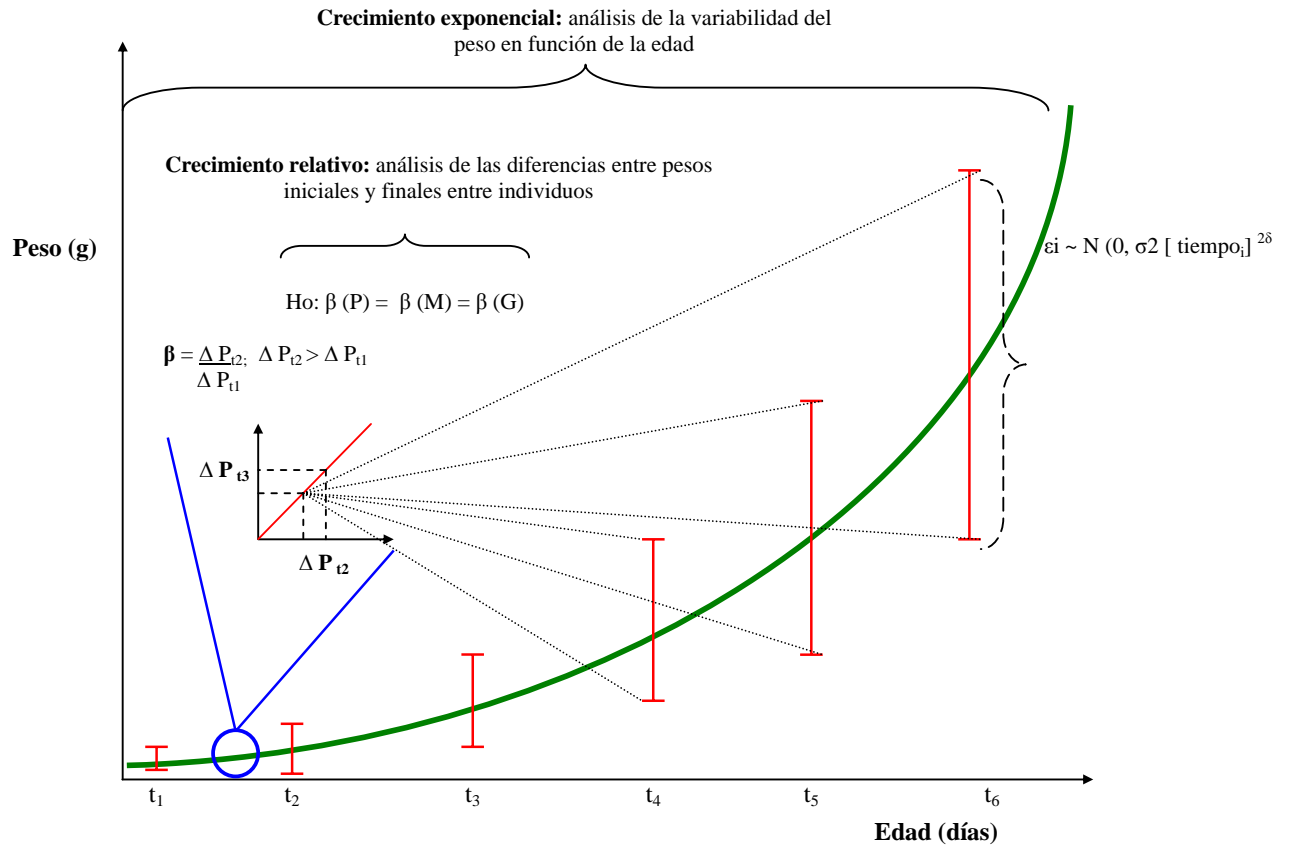


Figura 5: Diagrama representativo del análisis de crecimiento durante la fase temprana de *O. maya* realizado en este estudio. El modelo lineal de la relación peso inicial y peso en el tiempo permite analizar la forma como se comportan las diferencias en el peso, en una cierta cantidad de tiempo transcurrido, para todos los individuos de una misma población, siendo su peso final condicionado por el peso inicial. Estas diferencias en los pesos en el tiempo, son amplificadas de una manera particular derivado de una serie de factores biológicos que condicionan el crecimiento en estos animales. De esta forma, pequeñas diferencias en los tamaños iniciales se amplifican en el tiempo de una forma definida, identificada en este estudio como i) la estructura de varianza en el modelo de crecimiento exponencial, y ii) la magnitud de la pendiente en el modelo derivado de la relación entre el peso final e inicial. La cuantificación del patrón de variación de los pesos de individuos de una misma puesta es importante para la predicción de pesos en el tiempo, lo cual es imposible de obtener de la mayoría de los estudios que han modelado el crecimiento en octópodos. En términos probabilísticos, al integrar el parámetro delta en el modelo exponencial es posible predecir con un nivel de confianza que los pesos ajustados tienen una alta probabilidad que los valores medios sean justamente los representativos de la población.

En individuos provenientes de una misma madre, las diferencias genéticas entre individuos provenientes de padres diferentes han sido planteadas, sobretodo al ser la paternidad múltiple un fenómeno reportado en varias especies de cefalópodos (Shaw y

Boyle, 1997; Shaw y Sauer, 2004; Naud *et al.*, 2005; Voight y Feldheim 2009). Aunque no se ha determinado con precisión si la paternidad múltiple está asociada al proceso de selección sexual en cefalópodos (i.e. competencia espermática y/o “*cryptic female choice*”), la participación de dos o más tipos de espermias en una sola hembra podría ser la explicación de la variabilidad observada en individuos-hermanos mantenidos a temperatura constante (Leporati *et al.* 2007).

Una de las consecuencias de las diferencias genéticas podría estar en la forma como cada individuo hereda de sus padres ciertas características que lo hacen crecer más o menos rápidamente, siendo la alimentación y la eficiencia con la que usan los nutrientes del alimento un atributo interesante de analizar. Las diferencias en las tasas de alimentación y conversión alimenticia pueden generar heterogeneidad en el crecimiento individual ya que estas afectan la forma en que cada organismo canaliza los nutrientes para crecer (Koueta y Boucaud-Comou, 1999; Semmens *et al.*, 2004; André *et al.*, 2008). Otra fuente de variación podría estar asociada a la particular dinámica de fibras musculares caracterizada por la hiperplasia y hipertrofia (en extenso en Moltshaniwskyj, 2004). La inversión de energía asociada a ambos procesos no es directamente proporcional a la ganancia en peso de un individuo: mientras que durante la hiperplasia la creación de nuevas fibras y estructura está asociada a un mayor gasto energético y a una baja ganancia de peso, la hipertrofia es más eficiente en términos de energía ya que el aumento de las fibras musculares puede ser alcanzada por el incremento del fluido intracelular, repercutiendo en una mayor ganancia de peso (André *et al.*, 2008). Futuros estudios que permitan correlacionar el crecimiento muscular con tamaños y tasa de ingestión se hacen necesarios para validar empíricamente estas hipótesis.

Ya sea por un factor genético asociado con la forma individual de desarrollar la dinámica muscular, o por la vía del aprovechamiento de los nutrientes del alimento para crecer, se ha sugerido que los cefalópodos cuentan con mecanismos adaptativos complejos que garantizan una reproducción permanente en las comunidades donde habita (Nesis, 2002; Rocha *et al.*, 2003). La posibilidad de que juveniles provenientes de la misma madre puedan llegar a la edad reproductora en distinto tiempo puede ser una ventaja para la dispersión de la población, y por tanto, de la progenie que nació toda dentro de un mismo periodo de eclosión. Esto además abre la posibilidad de evitar la consanguinidad, ya que el entrecruzamiento entre hermanos se reduce al presentarse una

maduración diferencial asociada con las diferencias de tamaño. Estudios realizados en el cangrejo *Neohelice granulata* han demostrado la existencia de estrategias poblacionales asociadas con las características particulares del entorno ecológico en el cual son liberadas las larvas, poniendo en evidencia que entre los invertebrados las adaptaciones fisiológicas son consecuencia de la amplia plasticidad genética para responder a las variaciones ambientales de la zona costera (Bas *et al.*, 2008).

El sexo ha sido identificado como un factor que condiciona el crecimiento en cefalópodos, determinando los destinos de la energía ingerida y la acumulación de biomasa (Forsythe y VanHeukelem, 1987; Semmens *et al.*, 2004). Aunque en los cefalópodos la reproducción no detiene el crecimiento, existe un proceso diferencial asociado al sexo (Semmens *et al.*, 2004). La identificación temprana del sexo en individuos de pesos inferiores a 10 gramos en *O. maya* (Ávila-Poveda *et al.*, 2009) es un interesante precedente. Aunque no se conocen los efectos que el desarrollo sexual temprano tiene sobre el peso de los animales al nacer, es posible que éste, junto con otras características biológicas, sean los factores que determinan las complejas adaptaciones que estos organismos han desarrollado.

La variabilidad en el crecimiento de los cefalópodos y en particular de *O. maya* no constituye una fuente de error en la medición del crecimiento, sino una adaptación plástica que no hemos acabado de comprender (Semmens *et al.* 2004). La multidimensional interacción entre variables que determinan esta variabilidad debe de ser estudiada desde distintas ópticas en aras de entender mejor la dinámica de las poblaciones tanto por su valor de conservación, como por su valor pesquero y de cultivo (Dominguez *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2008).

V. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19 (6): 716–723.

André, J., Pecl, G., Semmens, J.M, y E. Grist. 2008. Early life-history processes in benthic octopus: Relationships between temperature, feeding, food conversion, and growth in juvenile *Octopus pallidus*. *J. Exp. Mar. Bio. Eco.* 354: 81-92.

Avila-Poveda, O., Colin-Flores, R. y C. Rosas. 2009. Gonad development during the early life of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda). *Biol. Bull.* 216: 94–102.

Bas, C., Spivak, E. y A. Klaus. 2008. Variation in early developmental stages in two populations of an intertidal crab, *Neohelice (Chasmagnathus) granulata*. *Helgol. Mar. Res.* 62: 393–401.

Bernardo, J.H., 1996. Maternal effects in animal ecology. *Am. Zool.* 36, 83–105.

Boletzky, S.V. 1987. Embryonic phase. En; P.R. Boyle (Ed.), *Cephalopod Life Cycles Vol. II.* Academic Press, London. 5 – 31.

Boletzky, S.V. 1997. Developmental constraints and heterochrony: A new look at offspring size in cephalopod mollusks. *Geobios* 30 (2): 267-275.

Bolker, B., Brooks, M., Clark, C., Geange, J.R.P, Stevens, M.H y J-S. White. 2008. Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 127-135.

Calow, P. 1987. Fact and theory-an overview. En; P.R. Boyle (Ed.), *Cephalopod Life Cycles Vol. II.* Academic Press, London. 351 – 365.

Choe, S. 1966. On the eggs, rearing, habits of the fry, and growth of some cephalopods. *Bull. Mar. Sci.* 16 (2): 330-348.

Cortez, T, González, A.F. y A. Guerra. 1999. Growth of *Octopus mimus* (Cephalopoda,

Octopodidae) in wild populations. [Fisheries Research 42 \(1-2\)](#): 31-39.

DeRusha, R.H., J.W. Forsythe y R.T. Hanlon, 1987. Laboratory growth, reproduction and

life span of the Pacific pygmy octopus, *Octopus digueti*. Pacific Science 41: 104-121.

Domingues, P.M.T., Sykes, A. y J.P Andrade. 2002. The effects of temperature in the life cycle of two consecutive generations of the cuttle.sh *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758), cultured in the Algarve (South Portugal). Aquacult. Int., 10, 207–220.

Domingues, P., López, N., Muñoz, J.A, Maldonado, T., Gaxiola, G. y C. Rosas. 2007. Effects of an artificial diet on growth and survival of the Yucatan octopus, *Octopus maya*. Aquac. Nutr. 13:1 – 9.

Draper, N. y H. Smith. 1998. Applied Regression Analysis. 3era edición. Hardcover. 736 pp.

Forsythe, J.W. 1984. *Octopus joubini* (Mollusca: cephalopoda): a detailed study of growth through the full life cycle in a closed seawater system. Journal of Zoology, London **202**, 393–417.

Forsythe, J.W., 1993. A working hypothesis of how seasonal temperature change may impact the field growth of young cephalopods. En: Okutani, T., R.K. O’Dor, & T.

Kubodera
(eds.), Recent Advances in Cephalopod Fisheries Biology, Tokay University Press,

Tokyo:
133-143.

Forsythe, J.W. 2004. Accounting for the effects of temperature on squid growth in nature: from hypothesis to practice. Mar. Freshw. Res. 55: 331 – 339.

Forsythe, J.W. y R. Hanlon. 1981. First rearing of *Octopus joubini* Robson, 1929 on mysidacean and caridean shrimps. Bull. Am. Malacol. Union, 1981: 42 – 45.

Forsythe, J.W y R. Hanlon. 1988. Effect of temperature on laboratory growth, reproduction and life span of *Octopus bimaculoides*. Mar. Bio. 98: 369 – 379.

Forsythe, J.W. y W.F. Van Heukelem, 1987. Growth. En: P.R. Boyle (ed.), Cephalopod

life cycles, Vol. II. Academic Press, London. Pp. 135-156.

Gardeur, J.N., Paspatis, M., G lineau, A., y Boujard, T. 2001. Biostatistical implications

of individual variability in growth in rainbow trout and Atlantic salmon. Aquaculture 195:

51-59.

Green, B., Kenneth, A. y M. McCormick. 2006. Position of egg within a clutch is linked to size at hatching in a demersal tropical fish. J. Exp. Mar. Biol. Eco. 329: 144 – 152.

Hanlon, R.T., 1983. *Octopus briareus*. En: Boyle P.R. (ed.), Cephalopod life cycles, Vol. I. Academic Press, London. Pp 251-266.

Hanlon, R. y J.W. Forsythe, 1985. Advances in the laboratory culture of octopuses for biomedical research. Lab. Anim. Sci. 35:33–40.

Hanlon, R.T. y J.B. Messenger, 1996. Cephalopod behaviour. University Press, Cambridge.

232 pp.

Houlihan, DF, McMillan DN, Agnisola C, Genoino IT y L. Foti, 1990. Protein synthesis and growth in *Octopus vulgaris*. Mar. Biol. 106:251-259.

Ikeda, Y., Wada, Y., Arai, N. y W. Sakamoto. 1999. Note on size variation of body and statoliths in the oval squid *Sepioteuthis lessoniana* hatchlings. J. Mar. Biol. Assoc. UK.

79:

757 – 759.

Jackson, G. 2004. Cephalopods growth: historical context and future directions. Mar.

Freshw. Res. 55: 327 – 329.

Jackson, D., Wotherspoon, S y C. H. Jackson. 2007. Temporal life history plasticity of the Southern Ocean squid *Todarodes filippovae* from waters of Tasmania, Australia. Mar. Biol. 150:575–584

Koueta N. y E. Boucaud-Camou, 1999. Food intake and growth in reared early juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda). J. Exp. Mar. Bio. Eco. 240 : 93-109.

LaRoe, E.T. 1971. The culture and maintenance of the loliginid squid *Sepioteuthis sepioidea* and *Doryteuthis plei*. Mar. Biol. 9: 9-25.

Leporati, S., Pecl, G. T. y J.M Semmens. 2007. Cephalopod hatchling growth: effects of initial size and seasonal temperatures. Mar. Biol. 151:1375 – 1383.

Leporati, S., Semmens, J.M y G.T Pecl, 2008. Determining the age and growth of wild octopus using stylet increment analysis. Marine Ecology Progress Series 367 : 213 – 222.

Oosthuizen, A., Roberts, M.J y W.H.H Sauer. 2002. Temperature effects on the embryonic development and hatching success of the squid *Loligo vulgaris reynaudii*. Bulletin of Marine Science, 71 (2): 619 – 632.

Markaida, U., Quiñónez-Velázquez, C y O. Sosa-Nishizaki. 2004. Age, growth and maturation of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Gulf of California, Mexico. Fisheries Research 66: 31–47.

Marthy, H., Hauser, R. y A. Scholl. 1976. Natural tranquiliser in cephalopods eggs. Nature 261: 496 – 497.

Minton, J.W. 2004. The pattern of growth in the early life cycle of individuals *Sepia pharaonis*. Marine and Freshwater Research 55: 415 – 422.

Moguel, C., Mascaró, M., Ávila-Poveda, O., Caamal, C., Sánchez, A., Pascual, C. y C.

Rosas (en prensa). Morphological, physiological, digestive and behavioural changes during post embryonic development of *Octopus maya* (Voss and Solis).

Moltschaniwskyj, N. 2004. Understanding the process of growth in cephalopods. *Marine and Freshwater Research*, 55:379 – 386.

Moltschaniwskyj, N y G.D Jackson. 2000. Growth and tissue composition as a function of feeding history in juvenile cephalopods. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 253: 229 –241

Montgomery, D. C. y E. A. Peck. 1992. *Introduction to Linear Regression Analysis*, 2da edition, John Wiley & Sons, New York.

Nesis, K. 2002. Life styles strategies of recent cephalopods. *Bulletin of Marine Science*, 71 (2): 561 – 579.

Ortiz, N., Ré, M.A. y F. Márquez, 2006. First description of eggs, hatchlings and hatchling behaviour of *Enteroctopus megalocyathus* (cephalopoda: octopodidae). *Journal of Plankton Research* 28, 881–890.

Pauly, D. 1998 . Why squid, though not fish, may be better understood by pretending they are. *S. Afr. J. Mar. Sci.* 20: 47 - 58.

Pecl, G. y Moltschaniwskyj, N. (1999). Somatic growth processes: how are they modified in captivity?. *Proceedings of the Royal Society of London. Serie B. Biological Sciences*, 266, 1133 – 1139.

Pecl, G., Steer, M.A. y K. Hodgson. 2004. The role of hatchling size in generating the intrinsic size-at-age variability of cephalopods: extending the Forsythe hypothesis. *Mar. Fresh. Res.* 55: 387 – 394.

Pfister, C. A y F. R Stevens. 2003. The genesis of size variability in plants and animals. *Ecology* 83 (1): 59 – 72.

Pinheiro, J. C. y D.M, Bates. 2000. *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*, Springer, New York.

Ricker, W.E. 1958. Handbook of computations for biological statistics of fish populations. Fisheries Research Board of Canada Number 119.

Rocha, F., Guerra, A. y A. González. 2001. A review of reproductive strategies in Cephalopods. Biol. Rev. 76: 291-304.

Rosas C, Cuzon G, Pascual C, Gaxiola G, López N, Maldonado T y P. Domingues, 2007. Energy balance of *Octopus maya* fed crab and artificial diet. Mar Biol. 152:371–378.

Rosas, C., Tut, J., Baeza, J., Sánchez, A., Sosa, V., Pascual, C., Arena, L., Domingues, P., y G. Cuzon, 2008. Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. Aquaculture 275: 291–297.

Sakaguchi, H., Araki, A. y A. Nakazono. 2002. Factors influencing body size of hatchlings, and relationships between fecundity and body weight of female *Octopus vulgaris*. Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Oceanography 66: 79 - 83.

Semmens, J.M., Pecl, G.T., Villanueva, R., Jouffre, D., Sobrino, I., Wood, J.B y P. R. Rigby. 2004. Understanding octopus growth: patterns, variability and physiology. Marine and Freshwater Research 55: 367 – 377.

Shaw, P.W y P. Boyle. 1997. Multiple paternity within the brood of single females of *Loligo forbesi* (Cephalopoda: Loliginidae), demonstrated with microsatellite DNA markers. Marine Ecology Progress Series (160): 279-282.

Shaw, P.W y W. Sauer. 2004. Multiple paternity and complex fertilization dynamics in the squid *Loligo vulgaris reynaudii*. Marine Ecology Progress Series (270): 173-179.

Smith, M.S y L. A. Fuiman. 2003. Causes of growth depensation in red drum, *Sciaenops ocellatus*, larvae. Environmental Biology of Fishes 66: 49 – 60.

Solis, M.J. 1967. Aspectos biológicos del pulpo *Octopus maya* Voss y Solis. Inst.

Nacional Investig. Biol. Pesqueras (México), Publicación Num. 18, 90 p.

Sokal, R. R. y F. J. Rohlf. 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3rd edition. W. H. Freeman y Com.: New York. 887 pp.

Steer, M.A, Moltshaniwskyj, N.A y A.R, Jordan. 2003. Embryonic development of southern calamary (*Sepioteuthis australis*) within the constraints of an aggregated egg mass. Marine and Freshwater Research 54: 217 – 226.

Steer, M.A, Moltshaniwskyj, N.A, Nichols, P.D y M. Miller, 2004. The role of temperature and maternal ration in embryo survival: using the dumpling squid *Euprymna tasmanica* as a model. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 307:73–89

Stefánsson, M.O., Imsland, A.K., Jenssen, M.D, Jonassen, S.O., Stefansson y R. Fitzgerald. 2000. The effect of different initial size distributions on the growth of Atlantic halibut. J. Fish. Biol. 56: 826 – 836.

Umino, T., Arai, K. y H. Nakagawa. 1997. Growth performance in clonal carp, *Carassius langsdorfii*. Effects of genetic difference and feeding history. Aquaculture. 155: 271 – 283.

Van Heukelem, W.F. 1976. Growth, bioenergetics and life-span of *Octopus cyanea* y *Octopus maya*. PhD. Dissertation. University of Hawai, Honolulu, HI.

Van Heukelem, W.F. 1977. Laboratory maintenance, breeding, rearing and biomedical research potential of the Yucatan octopus (*Octopus maya*). Lab. Anim. Sci. 27, 852-859.

Vidal, E., DiMarco, P., Wormuth, J. y G. Lee. 2002. Influence of temperature and food at availability on survival, growth and yolk utilization in hatchlings squid. Bull. Mar. Sci, 71 (2): 915 – 931.

Vigliola, V. y M.G Meekan. 2002. Size at hatching and planktonic growth determine post-settlement survivorship of a coral reef fish. Oecologia 131:89–93.

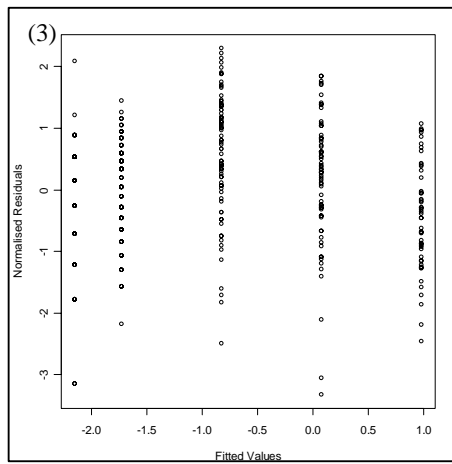
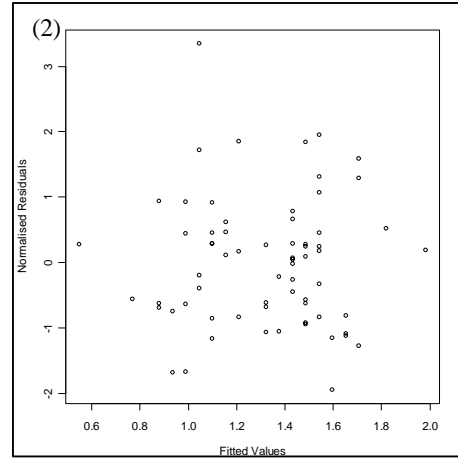
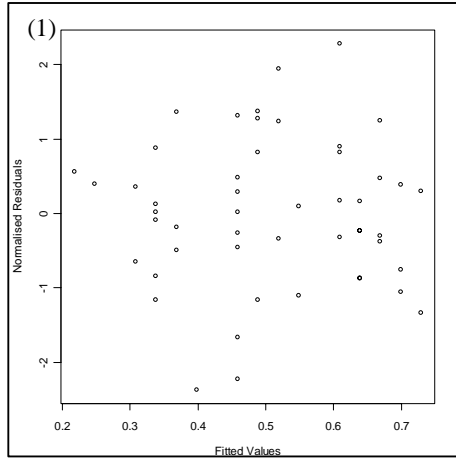
Villanueva, R., 1995. Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus vulgaris* from hatching to settlement. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science, 52: 2639-2650.

Zar, J. H. 1999. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall. London. 663 pp.

Zuur, A., F., Ieno, E.N y G.M Smith, 2007. Analysing Ecological Data Series: Statistics for Biology and Health. XXVI Hardcover 672 pp.

Zuur, A. F., Ieno, E.N., Walker, N.J., Saveliev, A.A y G. M, Smith, 2009. Mixed effects models and extensions in *ecology* with R. XXII Hardcover 574 pp

ANEXO 1:
ANÁLISIS GRÁFICO DE RESIDUALES



(1) Residuales normalizados Modelo Lineal E1; (2) Residuales normalizados Modelo Lineal E2; (3) Residuales normalizados Modelo Exponencial (E2).

MARCADOS MOLECULARES ASOCIADOS
AL CRECIMIENTO DE
Octopus maya

*Yo me multiplico incansablemente.
Estreno manos y bocas todos los días,
cambio de piel, de ojos y de lengua,
y me pongo un alma cada vez
que es preciso.*

En el saco de mi corazón
Jaime Sabines
(1926 – 1999)

RESUMEN

La expresión de transcritos (ET) asociadas al efecto del tamaño inicial (Análisis ET₁, AET₁) y variación del crecimiento (VC) (AET₂) en juveniles hermanos de *Octopus maya* mantenidos en condiciones de ambiente controlado fue obtenida usando la técnica de Despliegue Diferencial (DD). En el AET₁ los animales fueron categorizados en “pequeños” (P) y “grandes” (G) a los 15 días de edad (P₁₅ y G₁₅) (Capítulo 2), siendo evaluadas ambas categorías también a los 70 días de edad (P₇₀ y G₇₀). Para el AET₂ se utilizaron individuos de igual P₁₅ pero con crecimientos máximos (máx.) y mínimos (mín.) a los 165 días de edad (C_{165max} y C_{165min}). Bandas diferenciales (BD) inducidas (+), reprimidas (-) y sobreexpresadas (++) fueron evaluadas en ambos análisis utilizando dos juegos de cebadores (P1T1 y P6T7). En el AET₁ no se observaron BD entre P₁₅ y G₁₅, ni entre P₇₀ y G₇₀, indentificándose BD (+), (-) y (++) en ambas categorías en función de la edad (ejemplo: (+) P₁₅ y (+) G₁₅ vs (-) P₇₀ y (-) G₇₀). Para el AET₂ no se encontró un patrón asociado a la VC, indentificándose BD (+) y (++) para C_{165max} y C_{165min}. Los resultados del AET₁ indican que, bajo estas condiciones experimentales, el peso inicial (P₁₅) no condiciona la ET, sino más bien la edad. En el AET₂ no se obtuvieron BD que indiquen una condición diferencial entre aquellas ambas categorías de crecimiento. Un total de 13 secuencias fueron obtenidas a partir de la selección de BD de ambos análisis. Estas presentaron altos niveles de homologación con: marcadores moleculares de otras especies de cefalópodos, mensajeros de enzimas metabólicas, promotores de crecimiento, proteínas musculares y mensajeros asociados a respuestas de estrés en otras taxas, siendo discutida su interpretación en *O. maya*. Este es el primer estudio en donde se explora el transcriptoma para la especie, siendo las secuencias presentadas un referente para futuras investigaciones para la exploración de genes asociados al crecimiento en cultivo.

I. INTRODUCCION

Los cefalópodos son animales con acelerado crecimiento, siendo las condiciones bióticas y abióticas las que pueden influir en una respuesta diferencial en sus diferentes niveles de organización (tamaño corporal, órganos, tejidos y células) (Moltschaniwskyj, 2004). La variación del crecimiento (VC), conocido a nivel intraespecífico (cohortes, microcohortes y poblaciones de cultivo) como crecimiento heterogéneo (CH), es una de las características más interesantes del crecimiento en este grupo (Semmens *et al.*, 2004). Variaciones ambientales durante el periodo de eclosión y fases tempranas pueden generar CH entre individuos de edades similares (por ejemplo el efecto de la temperatura, denominado “efecto Forsythe”, Forsythe 1993 y 2004), al igual que la alimentación (Koueta N. y E. Boucaud-Camou, 1999; André *et al.*, 2008), la maduración sexual y el sexo (Semmens *et al.*, 2004). Sin embargo, el efecto genético puede contribuir a la VC en algunas especies de cefalópodos a nivel poblacional (*Sepioteuthis australis*, Triantafillos *et al.*, (2004).

El tamaño inicial (TI) ha sido propuesto como un factor que contribuye en la VC (Pecl *et al.*, 2004), sobretodo cuando las variaciones ambientales son reducidas (temperatura y alimentación controlada, por ejemplo) (Leporati *et al.*, 2007). Altos coeficientes de variación de TI son frecuencias en condiciones de cultivo (ver Introducción, Capítulo 2), siendo necesaria una caracterización en términos genéticos para evaluar su potencial influencia en la generación CH dado su desconocimiento en comparación a los peces (ejemplo: *Carassius langsdorfii*, Umino *et al.*, 1997). La relación entre la VC y la variación genética ha sido de interés para la investigación de especie acuícolas, tanto para peces (Gjerde *et al.*, 2004; Gjedrem, 1984), moluscos (Gjedrem, 1984; Bricchette *et al.*, 2001) y crustáceos (Gjedrem, 1984; Lutz y Wolters, 1989). La importancia de obtener altas tasas de crecimiento en acuicultura radica en la necesidad de obtener máximos tamaños de cosecha que permiten una mayor rentabilidad (Gjedrem, 1984), siendo el CH una condición negativa que limita la obtención de tamaños homogéneos. Complementariamente, la heredabilidad del crecimiento y su selección genética ha sido foco de interés para el desarrollo de varios cultivos (Gjedrem, 1984), proponiéndose como futuras líneas de investigación en el cultivo de pulpo para alcanzar un escalamiento productivo de la actividad (Iglesias *et al.*, 2007).

Los avances tecnológicos de las herramientas de biología molecular permiten estudiar los patrones de expresión génica en situaciones particulares haciendo posible la identificación de genes que pueden ser asociados con procesos del desarrollo o del establecimiento de actividades metabólicas. Las herramientas moleculares para analizar la expresión génica han tenido un gran avance en los últimos años. En este sentido la técnica de despliegue diferencial (DD) (Lian y Pardee, 1992; Liang y Pardee, 1993) permite visualizar y comparar el patrón de expresión de genes entre dos o más muestras a partir de poblaciones de RNAm desconocidos. Brevemente, el DD amplifica la región 3'(-OH) terminal de poli-A de los RNA mensajeros (RNAm), seguida por el fraccionamiento de los segmentos amplificados en un gel de secuenciación. La técnica se caracteriza por su baja complejidad, bajo costo y alta capacidad de análisis de muestras simultáneas, siendo su principal limitante los numerosos falsos positivos que presentan (Stein y Lian 2002). Una de las aplicaciones del DD es que permite detectar genes que se reprimen, se inducen o simplemente modifican los niveles de expresión como respuesta a los factores de estudio (por ejemplo: estado de desarrollo, actividad metabólica e inducción a estrés). Los segmentos diferenciales pueden recuperarse y ser secuenciados, para su posterior análisis bioinformático y potencialmente utilizados para la generación de sondas específicas, siendo útiles para escrutar bancos de cDNA y para monitorear niveles de transcritos. La obtención de marcadores moleculares es factible al desarrollar esta técnica.

El presente capítulo es complementario al estudio de modelación de crecimiento expuesto en el capítulo anterior (Capítulo 2) y aporta nuevos antecedentes sobre las respuestas genéticas asociadas a la VC en el cultivo de *Octopus maya*, concentrándose en la fase exponencial de crecimiento (FEC). Debido a que la especie no ha sido molecularmente estudiada y no se cuenta aún con su genoma, la siguiente investigación se concentró en el transcriptoma (población de RNAm) de juveniles tempranos. El efecto del peso inicial (Pi) y la VC sobre la expresión de transcritos (ET) fueron analizados al aplicar la técnica de DD en muestras provenientes de juveniles categorizados en función de su Pi y mantenidos en condiciones ambientalmente estables (temperatura y alimentación). Dos preguntas orientaron este estudio: ¿es posible asociar niveles de expresión diferencial de transcritos en función del peso inicial?; ¿la VC en función del tiempo está dada una respuesta genética diferencial entre hermanos?.

Los objetivos de este estudio fueron los siguientes: (i) aportar al conocimiento del

transcriptoma de la especie bajo condiciones de ambiente controlado; (ii) determinar si existen transcritos expresados en relación a la variación de pesos al inicio y durante la FEC.

II. MATERIALES Y METODOS

El estudio fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI-Sisal, UNAM). Las muestras analizadas provinieron de las poblaciones descritas el capítulo anterior. El término “hermanos” fue utilizado para definir aquellos “juveniles proveniente de una misma hembra, compartiendo un 50% de los genes”, no integrándose a la definición el número de machos que participó en la fertilización de los huevos.

2.1 *Análisis de Expresión de Transcritos (AET)*

2.1.1 *AET₁: ET asociada al peso inicial a los 15 y 70 días de edad*

La influencia del peso inicial (P_i) en la expresión de transcritos (ET) fue evaluada, utilizando para ello individuos pertenecientes a las categorías de peso inicial “pequeños” (P) y “grandes” (G) del Experimento 1 del Capítulo 2 (punto 2.2.1), a las edades de 15 (P_{15} y G_{15}) y 70 (P_{70} y G_{70}) días. Comparaciones dentro las categorías y entre las edades fueron realizadas: P_{15} vs G_{15} ; P_{70} vs G_{70} ; P_{15} vs P_{70} ; G_{15} vs G_{70} .

2.1.2 *AET₂: ET asociada a la varación del crecimiento (VC) a los 165 días de edad*

Para este análisis se trabajó con la segunda población (Experimento 2) detallada en el punto 2.2.2 (Capítulo 2). Se evaluó la ET asociada a la VC entre individuos de la categoría “medianos” de $P_i = 0.12g$ a los 165 días de edad. Para ello se utilizaron 4 individuos con pesos máximos ($8.39g \pm 2.86g$) ($C_{165max.}$) y 4 con pesos mínimos ($1.72g \pm 0.25g$) ($C_{165min.}$).

Los individuos utilizados para ambos análisis fueron sedados utilizando un baño de agua fría (aprox. $10^{\circ}C$). Luego se procedió a pesarlos ($\pm 0.01g$) y congelarlos rápidamente en nitrógeno líquido ($-196^{\circ}C$) para después ser mantenidos en un congelador a $-80^{\circ}C$ hasta la extracción del RNA.

2.2 *Despliegue Diferencial (DD)*

Las etapas del DD fueron realizadas simultáneamente en los individuos respectivos para

ambos análisis con la finalidad de reducir los errores asociados a la técnica. Como control para ambos análisis se utilizó tejido muscular proveniente de un ejemplar silvestre (adulto) de la especie. Un diagrama de las etapas de esta técnica es presentada gráficamente en la Figura 1.

2.2.1 Preparación de material y reactivos

Uno de los principales puntos críticos para una correcta extracción de RNA es evitar las RNAsas (enzimas muy estables que no requieren co-factores para su funcionamiento). Para ello se trató el material utilizado (material de vidrio y de plástico, mortero y pistilo) con hidróxido de sodio (NaOH) al 5% por 1 horas, siendo luego enjuagadas con agua tratada con DEPC (Dietilpírocarbonato, anexo 1) (0.1% v/v, esterilizada). Posteriormente los materiales fueron muflados a 500°C por 4 horas. Todas las soluciones fueron preparadas usando agua tratada con DEPC. Los reactivos utilizados en la extracción de RNA son especificados en el Anexo 1.

2.2.2 Extracción de tejido

El tejido seleccionado para el DD fue músculo proveniente de la zona intermedia entre la corona branquial y brazos (ver figura 1), debido que ambas zonas presentan mayor crecimiento (Semmens *et al.*, 2004). La cantidad de músculo extraído en promedio fue de 5 µg. El tejido fue cortado y manipulado rápidamente con un bisturí para no deteriorar la calidad del RNA.

2.2.3 Extracción de RNA y evaluación de su calidad

La extracción del RNA fue realizada de forma individual utilizándose el protocolo de Valenzuela *et al* (2005). La calidad de RNA fue verificada mediante electroforesis en geles de agarosa ultrapura al 1% (0.3 g agarosa / 30 ml TAE) con *buffer* TAE 1x. El gel fue corrido con 1.5 µl de RNA de cada muestra y 2 µl *buffer* de carga (0.25% azul de bromofenol, 0.25% bromuro de etidio y 30% glicerol en agua con DEPC) y corrido a 100 volts (45 minutos). El fraccionamiento del RNA fue evaluado en un transiluminador de luz ultravioleta. Las soluciones utilizadas son especificadas en el Anexo 1.

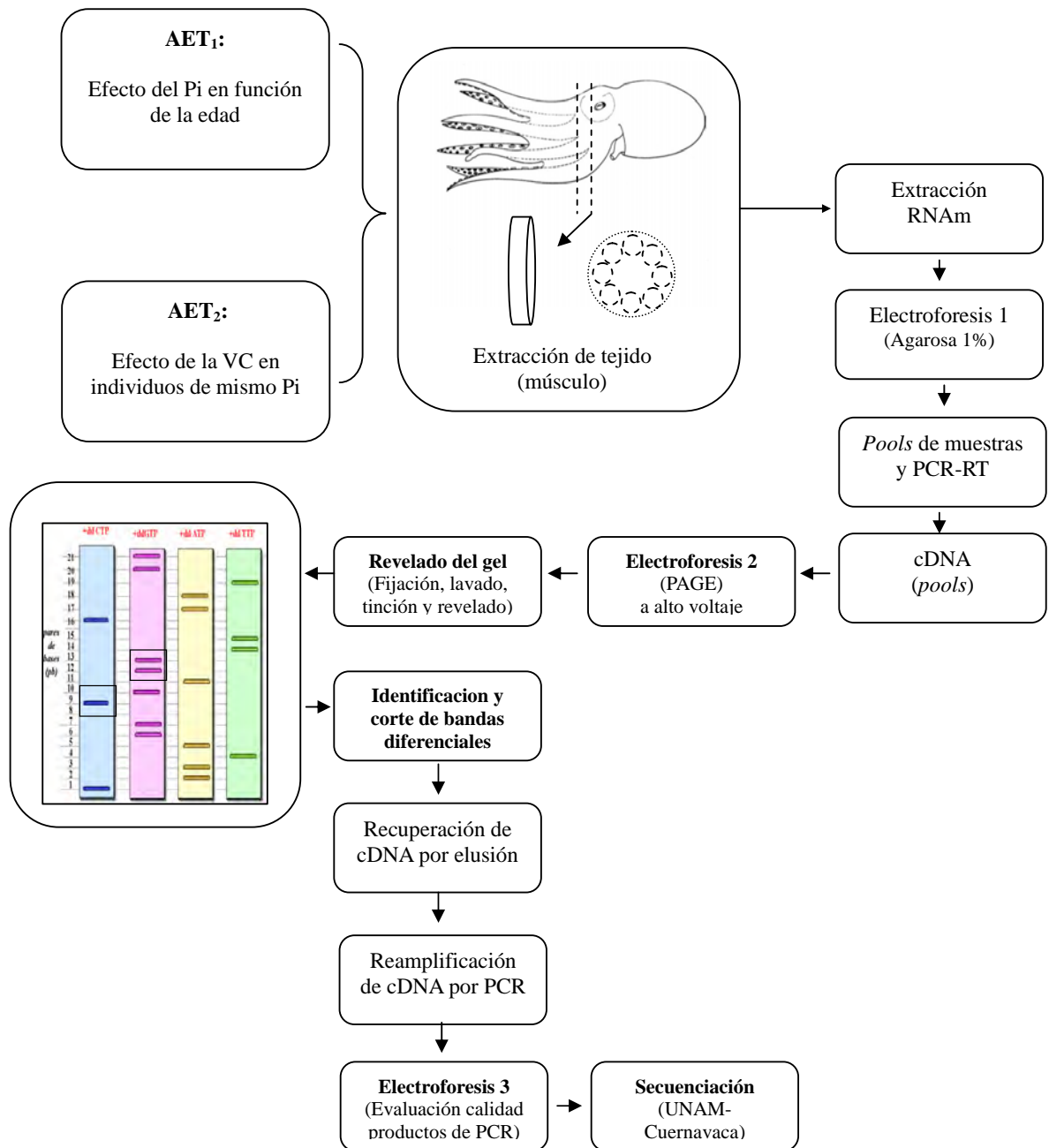


Figura 1: Etapas del despliegue diferencial (DD) aplicado muestras provenientes de juveniles hermanos de *Octopus maya*. Dos análisis de expresión diferencial (AED) fueron realizados: El primero (AED1) para evaluar el efecto del peso inicial (Pi) sobre la ET de individuos categorizados en función de su peso inicial (“pequeños y grandes”) a los 15 y 70 días de edad. El segundo (AED2) consistió en evaluar la ET en la variación de crecimiento (VC) observada en individuos de un mismo Pi pero con pesos extremos (crecimiento máximo y mínimo) a los 165 días de edad. Los individuos utilizados en ambos análisis fueron mantenidos individualizados y bajo temperatura y alimentación controlada. El RNAm de muestras de tejido muscular fue utilizado para el DD. La obtención de cDNA fue realizado con usando la enzima transcriptasa reversa en PCR (PCR-RT). Un gel de gel de poliacridamida-urea (PAGE) al 6% fue corrido a alto voltaje; siendo las bandas diferenciales observadas posterior al revelado del gel. El cDNA es recuperable por elusión y reamplificado por PCR. La calidad de éste es evaluada en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. Para este estudio la secuencia fueron obtenidas en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca.

2.2.4 Pools de muestras

Las muestras fueron puleadas con el fin de eliminar la variabilidad individual. Se homogenizaron los RNA's totales de los individuos para obtener 1ng/ μ l de muestra. Para el AET₁ se formaron los siguientes pools: P₁₅ (n=2), G₁₅ (n=3), P₇₀ (n=4) y G₇₀ (n=4). Para el AET₂ los *pools* fueron: C_{165máx.} (n= 3) y C_{165 mín.} (n=4).

2.2.5 Amplificación de DNAc por RT-PCR

Los cDNA's de cadena sencilla fueron obtenidos a partir de los mRNA's mediante la transcriptasa reversa (RT) (*Super script*TM III-one step), siguiendo el protocolo de Invitrogen Cat.N°1254-026. Dos pares de juego de cebadores fueron utilizados: 2 arbitrarios P (P₁ y P₆) y 2 oligo-DT de anclaje T (T₁ y T₇), siendo los juegos P₁T₁ (A) y P₆T₇ (A'). Las secuencias son especificadas a continuación en la siguiente tabla (Tabla 1):

Tabla 1: Secuencia de los cebadores utilizados (arbitrario, P₁ y P₆; oligo-DT de anclaje, T₁ y T₇) con sus respectivas concentraciones.

Identificación	Secuencia	Concentración (pM/ μ l)
P1	ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGGA	28
P6	ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGTG	27.30
T1	CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTAA	25.2
T7	CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTGA	28.59

Los cebadores P arbitrarios fueron diseñados por la empresa CLONTECH y sintetizados por el IBT-UNAM en Cuernavaca (Morelos); estos fueron basados en la secuencias nucleotídicas de las regiones codificantes de los mRNA's eucariontes. Los ciclos del PCR fueron: 1x (55°C 30'), 1x (94°C 5', 40°C 5', 68°C 5'), 2x (94°C 2', 40°C 5', 68°C 5'), 35x (94°C 1', 60°C 1', 68°C 2'), 1x (10'), 1x (4°C ∞).

2.2.6 Desnaturalización en gel de Policridamida (PAGE)

Los cDNA's fueron desnaturalizados en un gel de policridamida-urea al 6% (70 ml), compuesto por: 14 ml TBE (5x), 10.5 ml de acrilamida-bisacrilamida (38.9% – 1.1%), 29.4 g de urea 7M, 300 μ l de TEMED y 500 μ l de persulfato de amonio (0.1%). La electroforesis se realizó en una celda de secuenciación Bio-Rad®. El gel fue pre-corrido con TBE 1x (*buffer*) a 5,000 volts (30 mA) por 20 minutos. Previo a la carga de los cDNA los pozos fueron lavados minuciosamente con TBE (1x) para eliminar restos de acrilamida no polimerizada,

posteriormente estos fueron cargados 5 μ l de cDNA (*pool*) y 3 μ l de marcador especificado en el punto 2.2.2. El gel fue corrido siguiendo el protocolo de Liang y Pardee, (1992) a 70 W por 3:15 horas. Dicho tiempo está asociado al tamaño de los fragmentos esperados, porosidad de la matriz, separación de las bandas para escindirlas, tamaño del gel y el tipo de buffer.

2.2.7 Tinción y revelado de gel

Los pasos para la tinción y revelado del gel fueron los siguientes: (1) la fijación del gel fue realizada sumergiendo éste en una solución de ácido acético al 10%, siendo agitado horizontalmente por 20 minutos. (2) Para el enjuague del gel se utilizó agua ultra pura, realizándose 3 veces cada 2 minutos. (3) La tinción fue hecha con una solución compuesta por nitrato de plata (2 %) y de formaldehído al 37% (3 ml) en 2 litros de agua pura. El gel fue agitado constantemente por 30 minutos. (4) Para el revelado del gel se utilizó una solución de carbonato de calcio, siendo agitado hasta la aparición de las bandas. (5) Para detener el revelado se aplicó nuevamente el ácido acético (ver 1) como solución *stop*. Revelado el gel es puesto en un transiluminador de luz blanca para la identificación de las bandas diferenciales de los cDNA's. Las soluciones utilizadas en estos pasos son especificadas en el Anexo 2.

2.2.8 Criterios de selección de bandas diferenciales

Los siguientes criterios fueron utilizados para la indentificación de bandas diferenciales (BD), clasificadas como: inducidas (+), reprimidas (-), disminuidas (<+) y sobre inducidas (++) en función de grupos referenciales. Para el caso del AET₁ se tomó como grupo referencial a G para ambas edades (G₁₅ y G₇₀), siendo comparado con P a las edades respectivas. Por ejemplo: la presencia de bandas sólo en G₁₅ y no en P₁₅ se denominará como BD (+) G₁₅; la ausencia en G₁₅ y presencia en P₁₅ será identificada como BD (-) G₁₅ y BD (+) P₁₅; la ausencia en ambos grupos a una edad determinada será denominada solamente como BD (-) G₁₅ y/o BD (-) G₇₀. Si existiera una mayor concentración del cDNA en P₁₅ en comparación a G₁₅, la nomenclatura a utilizar sería: G₁₅ (<+) y P₁₅ (++)). Este mismo criterio fue utilizado para el AET₂ siendo el grupo de referencia C_{165máx}.

2.2.9 Elusión y Reamplificación de DNA

La recuperación de DNA de las bandas diferenciales fue realizado siguiendo el protocolo de Promega (Wizard® SV Gel and PCR *clean-up* System) (especificado en el Anexo 3). Se resuspendió el cDNA purificado en 20 μ l Agua Sigma por 15 minutos a 94°C, siendo esta

suspensión tomada como el paso de templado del PCR.

Los cDNA's de las bandas fueron reamplificados con PCR utilizando el protocolo de Promega. Para ello se utilizaron los siguientes componentes, todos ellos mezclados a temperatura ambiente, para producir una reacción de 25 µl/banda por duplicado (50 µl/banda): (i) 10 µl de *buffer* 5X (Green Go Taq® Flexi Buffer); (ii) 4 µl de solución MgCl₂; (iii) 1 µl de Mix nucleótidos para PCR; (iv) 0.5 µl de Primer P (*sense primer*); (v) 0.5 µl de Primer T (*anti-sense primer*); (vi) 0.25 µl de enzima Go Taq® Hot Start polimerasa; 5 µl de DNA templado y 28.75 µl agua libre de nucleasas. La amplificación fue realizada en los siguientes ciclos: 1x (94°C 5'), 20x (94°C 1', 60), 1x(68°C 10'). Se evaluó la calidad de los productos del PCR en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, para ello se utilizaron 5 µl de cDNA y 2 µl de marcador señalado en el punto 2.2.2.

2.2.10 Secuenciación

Los productos de la PCR fueron secuenciados por el método *Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based* en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Morelos). Las secuencias fueron analizadas mediante la búsqueda de homología en el sitio Web del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI) usando herramientas de la familia BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov), las cuales realizan una búsqueda en la base de datos del *Gene Bank* para obtener los valores de E y % de homología. El estimador E corresponde a un algoritmo que implica la homología y qué probabilidad hay de que una secuencia se pueda emparentar con otra; mientras más pequeño sea éste, un valor más significativo se obtendrá.

III. RESULTADOS

3.1 DD

Los resultados obtenidos de la electroforésis del DD muestran diferencias en las poblaciones de transcritos en ambos análisis de ET, siendo algunos ejemplos visualizados en la Figura 2. Las características de las BD seleccionadas para la secuenciación son presentadas en la Tabla 2.

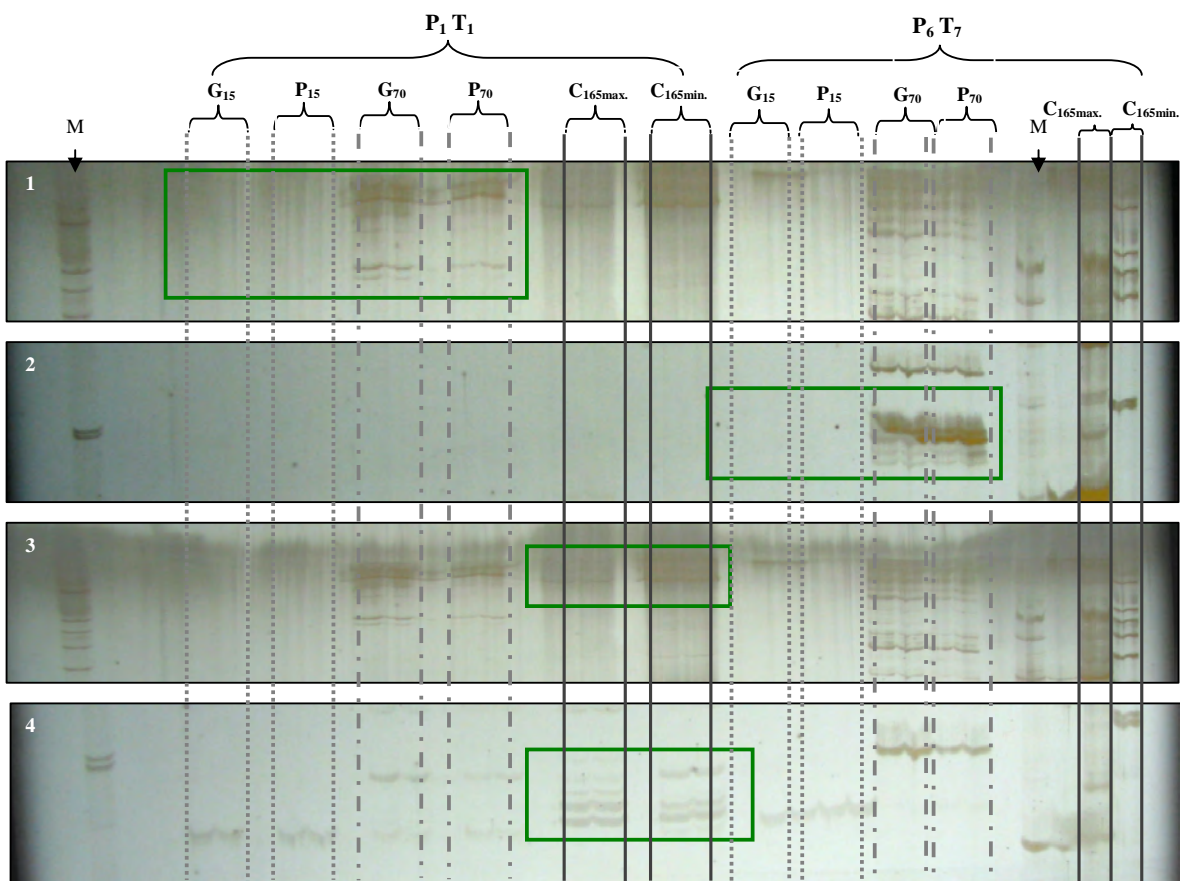


Figura 2: Expresión de transcritos (ET) obtenidos en el DD para el análisis del transcriptoma asociados a la variabilidad de peso inicial (Pi) y del crecimiento (VC) edad de juveniles hermanos en *O. maya* mantenidos bajo condiciones de ambiente controlado (temperatura y alimentación). Bandas diferenciales (BD) inducidas (+), reprimidas (-) y sobre inducidas (++) fueron identificadas en ambos análisis. Gel de PAGE (6%) corrido a 70W por 3:15 horas según Liang y Pardee (1992). (< 300 pb). (M = marcador molecular) Las siguientes secciones permiten visualizar las BD:

Sección 1: (recuadro verde) Se observa la expresión de BD asociadas a los 70 días para ambas categorías de Pi: BD (+) P₇₀ y G₇₀ y BD, y (-) en G₁₅; BD de peso molecular entre 1500 y 900 pb (cebadores P₁T₁).

Sección 2: Se observa la expresión de BD asociadas a los 15 días en P y G: BD (+) en G₁₅ y P₁₅ y BD (-) en G₇₀. BD de pesos moleculares de aproximadamente de 400 pb (cebadores P₆T₇).

Sección 3: Se observan BD (< +) en C₁₆₅máx. y (+) C₁₆₅mín. (cebadores P₁T₁)

Sección 4: Se observan BD (+) en C₁₆₅máx y C₁₆₅mín. (cebadores P₁T₁)

Tabla 2: Bandas seleccionadas para secuenciación: inducidas (+), reprimidas (-), (<+) disminuidas y sobre inducidas (++) . Pooles provenientes de pequeños (P) y grandes (G) a los 15 y 70 días de edad (AET₁), y de individuos de crecimiento máximo (C_{165máx.}) y mínimo (C_{165mín.}) a los 165 días de edad (AET₂).

AET	(+)	(-)	(<+)	(++)	N Bandas	P.M (pb)	Cebadores
1	G ₇₀ y P ₇₀	G ₁₅ y P ₁₅	No	No	3	1500 - 900	T1P1
1	G ₇₀ y P ₇₀	G ₁₅ y P ₁₅	No	No	3	1500 - 900	T6P7
2	C _{165máx.}	C _{165mín.}	No	No	3	400 – 600	T1P1
2	No	No	C _{165máx.}	C _{165mín.}	1	422 – 615	T1P1
2	No	No	C _{165mín.}	C _{165máx.}	1	485 – 650	T1P1

3.2 Análisis bioinformático

Un total de 13 secuencias fueron obtenidas a partir de las 11 bandas seleccionadas del DD, siendo descritas en el Anexo 3. La siguiente tabla (Tabla 3) muestra los resultados de la búsqueda por *Blast* en las bases de datos de *GeneBank*, principalmente en aquellas secuencias seleccionados en donde se obtuvieron altos niveles de homologación y bajo valor-E, siendo estas discutidas para su eventual interpretación del crecimiento de *Octopus maya*.

Las secuencias S1 y S2 fueron obtenidas de bandas inducidas tanto en P como en G a los 70 días, siendo reprimidas en ambas categorías a los 15 días de edad. Estas secuencias presentaron altos niveles de homologación con los siguientes genes: (i) Precursores de mensajeros relacionados con la oxidasa, la caseína, quinasa 1 y miosina de cadena pesada en la orquídea (*Dendrobium grex*); (ii) mensajeros asociados a la resistencia de la enfermedad de la hoja (“*leaf blast*”) en el arroz (*Oryza sativa*); (iii) mensajeros asociados al factor de elongación 2 del calamar *Loligo peleai* y al grosor de grasa en el porcino *Sus scofra*. (iv) microsatélites del octópodos polar *Graneledone boreopacifica* (Voight y Feldheim, 2009).

Las secuencias S4, S6 y S7 corresponden al experimento 2 y provienen de bandas (+) en animales de mayor crecimiento a los 165 días de edad. Estas también se alinearon con mensajeros de proteínas metabólicas de *Dendrobium grex* y de resistencia de *Oryza sativa*. La secuencia S5, obtenida a partir de una banda (++) de individuos de máximo peso los 165 días, tuvo un alto grado de empalme con los microsatélites de *G. boreopacifica*. En oposición, la S8 de una banda (++) en el mismo grupo de animales se alinearon con el RNAm de resistencia en *Oryza sativa* y con el mensajero *otg14* asociados a genes de floración en *Dendrobium grex*. La S9, proveniente de bandas (+) en P₇₀ y G₇₀ tiene un nivel de

homologación alto con la fenilalanina amonialiasa en *Dendrobium grex*, con la proteína ribosomal L-9 y L-14 en tilapia (*Oreochromis niloticus*) y genes expresados en condiciones de sequía en *Arachis hypogaea* (cacahuate). Esta secuencia fue asociada también a las proteínas metabólicas, estructurales y de resistencia de *Dendrobium grex* y *Oryza sativa* respectivamente.

Las S10 y S11 fueron obtenidas con los juegos de cebadores T6P7 en bandas (+) asociadas a los 65 días de edad en ambas categorías de tamaño (P y G). Estas se alinearon con el microsatélite 87 de *G. boreopacifica* y con genes asociados al metabolismo del pez plano *P. americanos* (ATP asas), promotores de crecimiento, como el precursor de catepsina aislado del parásito *Ixodes ricinus* y genes asociados a la hormona de desarrollo gonadal (GTH) en el esturión *Acipenser gueldenstaedtii*.

Tabla 3: Principales nombres y funciones de secuencias (S) encontradas al aplicar el DD para analizar la expresión de genes diferenciales asociadas al tamaño inicial y a la edad de juveniles de *Octopus maya*. Se especifica el origen de las secuencias, indicándose si estas fueron inducidas (+) y sobre inducidas (++)

Secuencia	Cebadores	Locus	PPCH	Valor -E	% Homología	Tamaño (pb)	Origen
S1	T1P1	AF107591.1	<i>Dendrobium grex</i> , mRNA oxidasa (otg14)	0.019	100%	422	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S1	T1P1	AF107587.1	<i>Dendrobium grex</i> , precursor de mRNA (otg6)	0.066	100%	432	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S1	T1P1	AF448491.1	<i>Oryza sativa</i> , mRNA de resistencia a enfermedad en hoja	0.23	96%	615	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S1	T1P1	AY702202.1	<i>Loligo pealei</i> , mRNA del tipo factor-2 de elongación	0.81	96%	1015	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S1	T1P1	AY626262.1	<i>Sus scrofa</i> , marcador molecular asociado al grosor de grasa	0.81	100%	413	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S1	T1P1	AF107592.1	<i>Dendrobium grex</i> , mRNA caseína quinasa I (otg16)	0.81	100%	385	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S1	T1P1	AF107585.1	<i>Dendrobium grex</i> , mRNA miosina de cadena pesada (otg2)	0.81	100%	665	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S2 (*)	T1P1	EU687435.1	<i>Graneledone boreopacifica</i> , microsatélite Gra69	2e-09	76%	650	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S2 (*)	T1P1	EU687441.1	<i>Graneledone boreopacifica</i> , microsatélite Gra14	1e-07	73%	485	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S2	T1P1	EU687447.1	<i>Graneledone boreopacifica</i> , microsatélite Gra87	0.002	70%	469	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S4	T1P1	AF107591.1	<i>Dendrobium grex</i> , mRNA otg14	0.067	100%	422	(+) C _{165máx.}
S4	T1P1	AF107587.1	<i>Dendrobium grex</i> , precursor de mRNA (otg6)	0.067	100%	432	(+) C _{165máx.}
S4	T1P1	AF448491.1	<i>Oryza sativa</i> , mRNA de resistencia a enfermedad en hoja	0.23	100%	615	(+) C _{165máx.}
S4	T1P1	AF107592.1	<i>Dendrobium grex</i> , mRNA caseína quinasa I (otg16)	0.82	100%	385	(+) C _{165máx.}
S5 (*)	T1P1	EU687435.1	<i>Graneledone boreopacifica</i> , microsatélite Gra69	2e-09	76%	650	(++) C _{165min.}

S5 (*)	T1P1	EU687441.1	<i>Graneledone boreopacifica</i> , microsatélite Gra14	1e-07	73%	485	(++) C _{165min} .
S6	T1P1	AF107591.1	<i>Dendrobium grex</i> , mRNA (otg14)	0.092	100%	422	(+) C _{165máx}
S6	T1P1	AF448491.1	<i>Oryza sativa</i> , mRNA de resistencia a enfermedad en hoja	0.32	100%	615	(+) C _{165máx}
S8	T1P1	AF107591.1	<i>Dendrobium grex</i> , mRNA (otg14)	0.086	100%	422	(+) C _{165máx}
S8	T1P1	AF448491.1	<i>Oryza sativa</i> , mRNA de resistencia a enfermedad en hoja	0.30	100	615	(+) C _{165máx}
S9 (*)	P6T7	AF100336.1	<i>Dendrobium grex</i> , mRNA fenilalanina amonía-liasa (ovg43)	7e-05	96%	402	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S9 (*)	P6T7	EU848300.1	<i>Oreochromis niloticus</i> , mRNA proteína ribosomal L-9	3e-04	100%	372	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S9 (*)	P6T7	DQ812977.1	<i>Arachis hypogaea</i> , mRNA clon PTDI	3e-04	100%	147	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S9	P6T7	EU848299.1	<i>Oreochromis niloticus</i> , mRNA proteína ribosomal L-14	0.011	100%	260	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S9	P6T7	AF448491.1	<i>Oryza sativa</i> , mRNA de resistencia a enfermedad en hoja	0.081	93%	615	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S9	P6T7	AF107592.1	<i>Dendrobium grex</i> , mRNA caseína quinase I (otg16)	0.081	100%	385	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S9	P6T7	AF107585.1	<i>Dendrobium grex</i> , mRNA miosina de cadena pesada (otg2)	0.081	100%	665	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S10' (*)	P6T7	EU687447.1	<i>Graneledone boreopacifica</i> , microsatélite Gra87	2e-08	71%	469	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S10' (*)	P6T7	AF100336.1	<i>Dendrobium grex</i> , mRNA fenilalanina amonía-liasa (ovg43)	1e-06	100%	402	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S10' (*)	P6T7	EU848300.1	<i>Oreochromis niloticus</i> , mRNA proteína ribosomal L-9	5e-04	100%	372	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S10' (*)	P6T7	DQ812980.1	<i>Arachis hypogaea</i> , mRNA clon PTDS-1	5e-04	100%	114	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S10' (*)	P6T7	AF107592.1	<i>Dendrobium grex</i> , mRNA caseína quinase I (otg16)	5e-04	100%	385	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S11 (*)	P6T7	DQ812977.1	<i>Arachis hypogaea</i> , mRNA clon PTDI	1e-04	100%	147	(+) P ₇₀ y G ₇₀

S11 (*)	P6T7	EU848300.1	<i>Oreochromis niloticus</i> , mRNA proteína ribosomal L-9	1e-04	100%	372	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S11 (*)	P6T7	AF100336.1	<i>Dendrobium greg</i> , mRNA fenilalanina amonia-liasa (ovg43)	1e-04	100%	402	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S11	P6T7	AF156790.1	<i>Pleuronectes americanus</i> , mRNA subunidad beta H+/K+-ATPasa	0.010	93%	1103	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S11	P6T7	EU128750.2	<i>Ixodes ricinus</i> , mRNA precursor catepsina C precursor	0.037	93%	1581	(+) P ₇₀ y G ₇₀
S11	P6T7	AY333426.1	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> , mRNA sub unidad beta LH (GTHII)	0.037	93%	599	(+) P ₇₀ y G ₇₀

(*) Secuencias con valor-E más bajo (< 1 e-04)

IV. DISCUSION

Mediante la aplicación de la técnica de DD se pudo explorar el transcriptoma de juveniles hermanos de *Octopus maya* durante la fase exponencial de crecimiento, siendo el primer estudio para la especie. El DD ha sido ampliamente utilizado para analizar los transcriptomas en diferentes taxas, sobretodo en situaciones extremas o de estrés (Chia *et al.*, 2001; Maqbool *et al.*, 2008) y en respuestas asociadas a cambios de dieta (ejemplo: *Litopenaeus vannamei* Chavez, 2009), siendo validada en esta especie y bajo estas condiciones experimentales. A continuación se discuten los resultados obtenidos en ambos análisis de expresión de transcritos.

La ausencia de bandas diferenciales entre las categorías de peso inicial (PI) para ambas edades complementa los resultados obtenidos en el Capítulo 2, demostrando la independencia del crecimiento en edades posteriores (70 días) ante el peso inicial. La presencia de un patrón de bandedo asociados a las edades, igualmente expresada en ambas categorías de PI, nos permite inferir que existen respuestas genéticas asociadas con la edad de los individuos. Los mensajeros homologables a las secuencias derivadas del análisis de variación de crecimiento fueron las mismas que las identificadas para el análisis del efecto del tamaño inicial, siendo incorporadas ambas en una misma discusión.

Secuencias (S) asociadas a los 70 días de edad fueron homologables a codificantes para proteínas asociadas al metabolismo, crecimiento y proteínas estructurales durante la floración de *D. grex* (Yu y Goh, 2000). Clones de mensajeros para la oxidasa (otg14), caseína quinasa I (otg16), fenilalanina-amonioliasa (ovg43), precursor de RNAm (otg6) y de miosina de cadena pesada (MCP) (otg2) presentaron alta homologación y bajo valor-E. Los clones otg (*orchid transitional growth*) y ovg (*orchid vegetative growth*) fueron obtenidos durante la caracterización de la transición floral de *D. grex* por Yu y Goh (2000). Si bien estas proteínas están asociadas a plantas y la búsqueda de interpretación puede ser obviada (Chávez, 2009), la compatibilidad de las secuencias con estos mensajeros nos permiten hacer algunas exploraciones e inferencias sobre el crecimiento somático de *O. maya*.

Por ejemplo, la caseína quinasa I es una enzimas selectiva de serina/treonina que participa como regulador de rutas de señales de traducción en la mayoría de las células en eucariontes. Esta enzima ha sido también asociada con las quinasas del neurofilamento en el axoplasma de

calamares (Floyd *et al.*, 1991), pudiendo ser un futuro referente sobre transcritos asociados al sistema nervioso de *O. maya* durante su ontogénia. La presencia de esta enzima puede estar relacionada por el tipo de tejido utilizado para el DD, el cual correspondió a la corona branquial (cefalopodio) que es una de las zonas de mayor crecimiento en cefalópodos junto con los brazos (Semmens *et al.*, 2004), siendo también una de las principales vías sensoriales en cefalópodos (Hanlon y Messenger, 1996). Futuras investigaciones en esta área podrían utilizar como marcadores moleculares las secuencias encontradas dado su alto nivel de empalme dentro de los locus identificados (por ejemplo: S10, valor-E = 5×10^{-4}).

La homologación con mensajeros de MCP a los 70 días de edad nos permite hacer ciertas extrapolaciones sobre dinámica muscular de los juveniles. La MCP es una proteína miofibrilar que está presente en la musculatura en vertebrados e invertebrados (Hoper y Thuma, 2005), incluyendo a los cefalópodos (Matulef *et al.*, 1998). Su presencia también ha sido identificada durante la hidrólisis de células musculares de brazos de *O. vulgaris*, siendo esta parte del cuerpo una de mayor nivel de actividad hidrolítica (entre 40 y 500 veces más que peces) (Hurtado *et al.*, 1999), no descartándose un estado de hidrólisis en las muestras procesadas.

En peces teleósteos la presencia de MCP está asociada a la hiperplasia (Rescán, 2005), proceso de formación de nuevas fibras que ocurre principalmente en las etapas más tempranas en vertebrados y algunos invertebrados, no siendo este el caso de los cefalópodos. La dinámica muscular en cefalópodos está dada por la combinación de hipertrofia (aumento celular) e hipertrófia (Moltschaniwsky, 2004), independiente de la edad y el tamaño (Martínez y Moltschaniwsky, 1999). Ambos procesos presentan una inversión de energía diferencial que no está asociada directamente a la ganancia en peso de un individuo (André *et al.*, 2008): mientras que la hiperplasia está asociada a un mayor gasto energético y a una baja ganancia de peso, la hipertrófia a su vez es más eficiente en términos de energía ya que el aumento de las fibras musculares puede ser alcanzada por el incremento del fluido intracelular repercutiendo en una mayor ganancia de peso (André *et al.*, 2008). Se propone el uso de esta secuencia como marcador molecular para la indentificación del estado de hiperplasia en la especie.

Los procesos de dinámica celular son controlados por factores endocrinos específicos presentes en la sangre y por factores de crecimiento en peces (Rescán, 2005). La presencia de MCP es complementada con la homologación (S11) con un mensajero del gen que participa

en la transcripción de la sub-unidad β -LH de la gonadotropina (GhTII), sub unidad que es responsable del desarrollo gonadal durante los estados inmaduros de peces teleósteos (Hurvitz *et al.*, 2005). Si bien el sistema endocrino de *O. maya* no ha sido caracterizado y la asociación con este mensajero debe ser especulativa, un reciente estudio en la especie puede ser tomado como precedente al evidenciar histológicamente la maduración precoz en machos (< 10 gramos) en condiciones de cautiverio. Ciertas condiciones de cautiverio podrían forzar la maduración sexual anticipada en algunas especies de octópodos bajo regímenes de alta temperatura y escaso alimento (Boyle y Knobloch, 1984), ampliando nuevos antecedentes sobre los factores bióticos que generan variabilidad en el crecimiento de muchas especies de cefalópodos, como es el caso del sexo (Semmens *et al.*, 2004; Triantafillos *et al.*, 2004)

La homologación con enzimas asociados a respuestas de estrés en plantas es aventurada debido al desconocimiento de las enzimas metabólicas de *O. maya*, sin embargo algunos antecedentes pueden servir como precedentes. La fenilalanina-amonioliasa (FAL) es una enzima reguladora de la síntesis y acumulación de fenilpropanoides en diferentes tejidos y especies de plantas, demostrando su presencia un estado de estrés (Unitani y Asahi, 1980). El locus AF448491.1 correspondiente al gen de resistencia de la enfermedad de la hoja en *Oryza sativa* fue homólogo a la S9. Además se obtuvo homologías con transcritos asociados a condiciones de sequía en el cacahuete *Arachis hypogaea*. La presencia de los tres mensajeros podría demostrar una respuesta de los juveniles de *O. maya* ante las condiciones mantenimiento. Esta aventurada observación puede ser complementada la alta mortalidad obtenida en la población 1 de la cual se obtuvieron los juveniles (ver Figura 4, punto 3.2, Capítulo 2).

La presencia de bandas diferenciales en función de la edad puede estar asociada a una serie de cambios que experimenta *O. maya* al pasar de una alimentación endógena (vitelo) a exógena durante los 10 primeros días de vida (Moguel *et al.*, *en prensa*). Se plantea la posibilidad de que algunos mensajeros estén codificando genes asociados al metabolismo durante la ontogenia de la especie. Esta aseveración es respaldada al obtener homología de la S11 con la subunidad- β de la bomba H⁺/K⁺ (ATPasa) aisladas del estómago del pez plano *Pleuronectes americanus* durante su estadio larval (Douglas *et al.*, 1999). Estos mensajeros también se alinearon con RNAs que codifican una catepsina aislada del estomago de la garrapata *Ixodes ricinus* (Sojka *et al.*, 2008). La catepsina es una enzima proteolítica que se encuentra en tejidos animales y que cataliza la hidrólisis de proteínas a polipéptidos, siendo su actividad

identificada como un promotor de crecimiento.

Uno de los principales resultados obtenidos en esta investigación fue la elevada homología que presentaron las secuencias S2, S5 y S10 con los microsátélites (Gr14, Gr69 y Gr87) del análisis de paternidad múltiple en el octópodo bentónico *Graneledone boreopacifica* (Voight y Feldheim, 2009). Su importancia radica en que actualmente no se dispone de secuencias de regiones microsátélites para *O. maya*, pudiendo ser éstas usadas para el diseño de nuevos microsátélites y que permitan complementar el reciente estudio realizado en el análisis poblacional de diferentes localidades de la Península de Yucatán (Juárez, 2009).

Los microsátélites son pequeñas secuencias formadas por pocos nucleótidos, generalmente entre 2 a 4, los cuales se repiten de forma continua en una locación particular de los cromosomas (Leclercq *et al.*, 2007). Ellos están presentes en todos los organismos eucariontes, principalmente en regiones intergénicas. El interés de los microsátélites se debe: (i) a que algunos están involucrados en funciones moleculares, como la recombinación o regulación de factores de transcripción; (ii) y a su aplicación como marcadores moleculares en biología poblacional. Las altas tasas de mutación son el resultado de un extenso polimorfismo dentro de las poblaciones, siendo la mayoría de los microsátélites selectivamente neutrales (Leclercq *et al.*, 2007).

La aplicación de la herramienta molecular del DD impacta desde múltiples aristas el conocimiento de *Octopus maya* al ser esta una técnica que permite la exploración de genes. La exploración del transcriptoma aquí realizado, de igual modo, orientará futuras investigaciones que requieran de una mayor resolución de los genes que se inducen o reprimen bajo ciertas condiciones ambientales y metabólicas con miras a la optimización de la engorda. Para ello, de igual modo, se prevee la necesidad de abrir nuevas investigaciones en genética aplicada al cultivo intensivo de pulpo ya sea evaluando la heredabilidad del crecimiento por la constitución de “familias” que permitan alcanzar un crecimiento homogéneo y maximizado, necesario para el escalamiento de la actividad.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- André, J. 2009. Modelling the population dynamics of a benthic octopus species: exploring the potential impact of environment variation and climate change. Tesis PhD (Doctor of Philosophy in Quantative Marine Science), University of Tasmania. pp. 220.
- André, J., Pecl, G., Semmens, J.M, y E. Grist. 2008. Early life-history processes in benthic octopus: Relationships between temperature, feeding, food conversion, and growth in juvenile *Octopus pallidus*. *J. Exp. Mar. Bio. Eco.* 354: 81-92.
- André, J., Grist, E.P.M., Semmens, J.M., Pecl, G., Segawa, S., 2009. Effects of temperature on energetics and the growth pattern of benthic octopuses. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 374, 167-179.
- Avila-Poveda, O., Colin-Flores, R. y C. Rosas. 2009. Gonad development during the early life of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda). *Biol. Bull.* 216: 94–102.
- Boyle, P. R., y D. Knobloch. 1984a. Male reproductive maturity in the octopus *Eledone cirrhosa* (Cephalopoda: Octopoda). *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 64: 573–579.
- Buresch, K. M., Hanlon, R. T., Maxwell, M. R. y S. Ring. 2001. Microsatellite DNA markers indicate a high frequency of multiple paternity within individual field collected egg capsules of the squid *Loligo pealeii*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 210, 161–165.
- Brichette, I., Reyero, M.I. y C. García. 2001. A genetic analysis of intraespecific competition fro growth in mussel culture. *Aquaculture* 192: 155 – 169.
- Chávez G. 2009. Estudio de genes con expresión diferencial de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) en respuesta a dietas elaboradas con fuentes convencionales y alternativas de proteína. Tesis Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 56.
- Calow, P. 1987. Fact and theory-an overview. En; P.R. Boyle (Ed.), *Cephalopod Life Cycles* Vol. II. Academic Press, London. 351 – 365.
- Chia, J-S., Lee, Y-Y., Huang, P-T., y J-Y, Chen. 2001. Identification of Stress-Responsive

Genes in *Streptococcus mutans* by Differential Display Reverse Transcription-PCR. *Infect. Immun.* 69(4): 2493–2501.

Douglas, S.E., Gawlicka, A., Mandla, S. and Gallant, J.W. 1999. Ontogeny of the stomach in winter flounder: characterization and expression of the pepsinogen and proton pump genes and determination of pepsin activity. *J. Fish Biol.* 55 (5): 897-915.

Forsythe, J.W., 1993. A working hypothesis of how seasonal temperature change may impact the field growth of young cephalopods. En: Okutani, T., R.K. O'Dor, & T. Kubodera (eds.), *Recent Advances in Cephalopod Fisheries Biology* Tokay University Press, Tokyo. Pp. 133-143.

Forsythe, J.W. 2004. Accounting for the effects of temperature on squid growth in nature: from hypothesis to practice. *Mar. Freshw. Res.*, 55:331 – 339.

Floyd, C., Grant, P., Gallant, P. E., y H. Pant. 1991. Principal neurofilament-associated protein kinase in squid axoplasm is related to casein kinase I. *J. Biol. Chem.* 266:4987-4994.

Gjerde, B., Terjesen, B.F., Barr, Y., Lein, I y I. Thorland. 2004. Genetic variation for juvenile growth and survival in atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 236: 167 – 177.

Gjedrem, T. 1983. Genetic variation in quantitative traits and selective breeding in fish and shellfish. *Aquaculture* 33: 51 – 72.

Hanlon, R.T. y J.B. Messenger, 1996. *Cephalopod behaviour*. University Press, Cambridge. 232 pp.

Hooper, S y F. Thuma. 2005. Invertebrate muscles: muscle specific genes and proteins. *Physiol. Rev.* 85: 1001–1060.

Hurtado, J.L., Borderias J, Montero, P. y H. An H. 1999. Characterization of proteolytic activity in octopus (*Octopus vulgaris*) arm muscle. *J Food Biochem* 23:469-483

Hurvitz,A., Degani,G., Goldberg,D., Din,S.Y., Jackson,K. Y B. Levavi-Sivan. 2005. Cloning of FSHbeta, LHbeta, and glycoprotein alpha subunits from the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*), beta-subunit mRNA expression, gonad development, and steroid levels in immature fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 140 (1): 61-73.

Iglesias, J., Sánchez, F.J., Bersano, J.G.F., Carrasco, J.F. , Dhont, J., Fuentes, L., Linares, F., Muñoz, J.L., Okumura, S., Roo, J., van der Meeren, T., Vidal, E.A.G y R. Villanueva. 2007. Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture* 266: 1-15.

Juarez, O. 2009. Determinación de la filogenia y divergencia genética poblacional de *Octopus maya* usando marcadores moleculares. Tesis de grado, Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 69.

Leclercq, S., Rivals, E. y P. Jarne. 2007. Detecting microsatellites within genomes: significant variation among algorithms. *BMC Bioinformatics* 8 :125.

Leporati, S., Pecl, G. T. y J.M Semmens. 2007. Cephalopod hatchling growth: effects of initial size and seasonal temperatures. *Mar. Biol.* 151:1375 – 1383.

Liang P, A. y B.A Pardee. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, Aug 14, 257(5072):967-71.

Liang P, A. y B.A Pardee. 1993. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Research* 21, 3269-3275

Lutz, C. y W. Wolters. 1989. Estimation of heredabilities for growth, body size, and processing traits in red swamp crawfish, *Procambarus clarkia* (Girard). *Aquaculture* 78: 21-33.

Martinez, P. y N. Moltschaniwskyj. 1999. Description of growth in the tropical cuttlefish *Sepia elliptica* using muscle tissue. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 79: 317 – 321.

- Matulef, K., Sirokman, K., Perreault-Micale, CL., y A.G Szent-Györgyi. 1998. Amino-acid sequence of squid myosin heavy chain. *J. Muscle. Res. Cell. Motil.* 19: 705–712.
- Moguel, C., Mascaró, M., Ávila-Poveda, O., Caamal, C., Sánchez, A., Pascual, C. y C. Rosas (en prensa). Morphological, physiological, digestive and behavioural changes during post embryonic development of *Octopus maya* (Voss and Solis).
- Moltschaniwskyj, N. 2004. Understanding the process of growth in cephalopods. *Marine and Freshwater Research*, 55:379 – 386.
- Maqbool, A., Zahur, M., M. Irfan, M., M. Younas, M., Barozai, K., Rashid, B., Husnain, T. y S. Riazuddin. 2008. Identification and expression of six drought-responsive transcripts through differential display in desi cotton (*Gossypium arboreum*). *Molecular Biology*, 42 (4):412 – 498.
- Naud, M-J., Shaw, P., Hanlon, R., y J.N. Havenhand. 2005. Evidence for biased use of sperm sources in wild female giant cuttlefish (*Sepia apama*). *Proc. R. Soc. B.* 272, 1047–1051.
- Pecl, G., Steer, M.A. y K. Hodgson. 2004. The role of hatchling size in generating the intrinsic size-at-age variability of cephalopods: extending the Forsythe hypothesis. *Mar. Fresh. Res.* 55: 387 – 394.
- Rescan, PY. 2005. Muscle growth patterns and regulation during fish ontogeny *General and comparative endocrinology*, 142: 111-6.
- Ricker, W.E. 1958. Handbook of computations for biological statistics of fish populations. Fisheries Research Board of Canada Number 119.
- Semmens, J.M., Pecl, G.T., Villanueva, R., Jouffre, D., Sobrino, I., Wood, J.B y P. R. Rigby. 2004. Understanding octopus growth: patterns, variability and physiology. *Marine and Freshwater Research* 55: 367 – 377.

- Shaw, P.W y P. Boyle. 1997. Multiple paternity within the brood of single females of *Loligo forbesi* (Cephalopoda: Loliginidae), demonstrated with microsatellite DNA markers. *Marine Ecology Progress Series* (160): 279-282.
- Shaw, P.W y W. Sauer. 2004. Multiple paternity and complex fertilization dynamics in the squid *Loligo vulgaris reynaudii*. *Marine Ecology Progress Series* (270): 173-179.
- Sojka, D., Franta, Z., Horn, M., Hajdusek, O., Caffrey, C.R., Mares, M. y P. Kopacek. 2008. Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. *Parasit Vectors* 1 (1): 7.
- Stein, J. y P. Liang. 2002. Differential display technology: a general guide. *Cell. Mol. Life. Sci.* 59: 1235 – 1240.
- Triantafillos, L. 2004. Effects of genetic and environmental factors on growth of southern calamary, *Sepioteuthis australis* from southern Australia and northern New Zealand. *Marine and Freshwater Research*, 55: 439 - 446.
- Uritani, I y T. Asahi. 1980. Respiration and related metabolic activity in wounded and infected tissue. En: “The biochemistry of plants”, Vol. 2: 463 – 485. Press. Inc.
- Vidal, E., DiMarco, P., Wormuth, J. y G. Lee. 2002. Influence of temperature and food at availability on survival, growth and yolk utilization in hatchlings squid. *Bull. Mar. Sci.* 71 (2): 915 – 931.
- Villanueva, R., 1995. Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus vulgaris* from hatching to settlement. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 52: 2639-2650.
- Voight, J. y K. Feldheim, 2009. Microsatellite inheritance and multiple paternity in the deep-sea octopus *Graneledone boreopacifica* (Mollusca: Cephalopoda). *Invertebrate Biology* 128(1): 26–30.
- Yu, H y C-J, Goh. 2000. Identification and characterization of three orchid MADS-box genes of the *API/AGL9* subfamily during floral transition. *Plant Physiol* 123: 1325–1336.

ANEXO 1

REACTIVOS Y SOLUCIONES EMPLEADAS PARA EL DD

- (I) Dietilpircarbonato (DEPC) (0.1% v/v, esterilizada): con la finalidad de inactivar las ribonucleasas por modificación covalente, el DEPC es un agente alquilante muy activo con capacidad para alquilar los aminoácidos de las proteínas, alterando su estructura y en consecuencia su actividad biológica, produce una etoxiformación de los residuos de histidina de las RNAsas, destruyendo su actividad hidrolítica.
- (II) Reactivos para la extracción de RNA:
1. Trizol: Su acción permite la lisis de la membrana plasmática de la célula; es un agente caotrópico para la desnaturalización de proteínas y solubilización del tejido. (Tiocianato de Guanidina 0.8M, Tiocianato de Amonio 0.4M, Acetato de Sodio 0.1M pH 5.0, Glicerol 5% y Rojo de Fenol 0.1%).
 2. Cloroformo:Alcohol Isoamílico (24:1): Permite separar carbohidratos, lípidos y proteínas, al igual que los compuestos fenólicos; su uso permite precipitar los ácidos nucleicos.
 3. Isopropanol: Permite precipitar el RNA total.
 4. Citrato de sodio 0.8 M/Cloruro de Sodio 1M: Otorga al RNA total una mayor densidad permitiendo ser separado del DNA genómico.
- (III) Buffers de carga: 50mM Tris, 1mM Ácido acético, 2mM EDTA pH8.5.
- (IV) Soluciones para el DD
1. Preparación placas: Blinder (1 ml): 5 µl de blind (marca) en 1 ml de etanol; se incorpora después 30 µl de solución de ácido acético:agua sigma (1:10).
 2. Revelado del gel: (2.1) Solución de fijación: Se utilizó ácido acético glaceado, el cual fue compuesto por 200 ml de ácido acético glaceado en 1,800 ml de agua ultra pura. La solución debe ser utilizada sólo una vez. (2.2) Solución de tinción: 2 g de nitrato de plata y 3 ml de formaldehído al 37% en 2 litros de agua pura. (2.3) Solución de revelado: Se disolvió 60 g (1 paquete) de carbonato de sodio (Na₂CO₃) en 2 L de agua ultrapura. Esta fue mantenida en refrigeración (10°C) previo a su uso. Inmediatamente antes de ser utilizada, se adicionó 3 ml de formalina al 37% y una alícuota de 400 µl tiosulfato de sodio (10 mg/ml) para completar la

solución.

ANEXO 2

PROTOCOLO DE PROMEGA (Wizard® SV Gel and PCR *clean-up* System)

PARA RECUPERACION DE cDNA.

I. Disolución del fragmento de gel: Cada fragmento de gel fue puesto en un tubo de centrifugación, adicionándose 10 µl de una solución de *membrane solutions* por cada 10 mg de fragmento de gel. Cada tubo fue homogenizado e incubado entre 50 y 65°C hasta que los fragmentos estuvieran completamente disueltos.

II. Binding DNA: Los fragmentos de gel disueltos fueron colocados en una mini columna compuesto por un filtro para la purificación del DNA. Cada mini columna fue colocada en un tubo nuevo de recolección (1.5 ml) para luego ser centrifugadas a 13,000 rpm por 1 minuto. Los filtros con DNA fueron nuevamente colocados en otro tubo de recolección nuevo.

III. Lavado: Se adicionó 700 µl de la solución de lavado *Membrane Wash Solutions* (con etanol añadido) a los filtros con el DNA. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 1 minuto. Luego se extrajeron los filtros, adicionándose en cada uno de ellos 500 µl de solución de lavado. Se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm por 5 minutos. Nuevamente el filtro fue extraído y colocado en un tubo de colección nuevo; ambos fueron centrifugados sin taparse para permitir la evaporación del etanol.

IV. Elución: La microcolumna con filtro fue cuidadosamente en un tubo de 1.5 ml, adicionándose a ésta 20 µl de agua libre de nucleasas. Luego fueron incubadas a temperatura ambiente por 1 minuto y centrifugadas posteriormente a 13,000 rpm por 1 minuto.

ANEXO 3
SECUENCIAS (S)

S1(T1ab1)

GCAACTTGTTCGATTATTGACATTCCTTGGGCGCTTGTTAAGGATTGACCGCTGG
TTAGCGGCTTGAGGCAACCGCTGATACAGCCATTGGTGCCTAGTATTTCTTCTTCA
TTTACTGTACTGTAAACAGTTTTTCTTGTACCCGTTTTGACTGATAAGCAAGACTAA
ATTGAATGCCTATTATAACAGAAAATGTTATTGGATCTAGCATTGCAGATATTTTCATT
CCCCAGCATTTAGTGAGGGTTAATAAAAAAGA.

S2(T1ab1)

TAGAGCTGTATTTGACCGGCCTCCTTCTTAGTAGCAGGGTTATGAAAGTAAGCACA
TTGTTTTGTTGATCATCCTTTAAATCTTTAGGTTTCACAGATTTTGTAGTTCCAGAAA
TAGTGACAGTTTGTAGTGTATGAATCAAGGATTTTCAAACCTGTTATCAACATTCCA
TGGATGTTACCTTGTCTTGTATTTTTCAAACCACATTGGTGACCGGTGGGCAGCT
GATTTCCACAACAGAACATATCTTTTCATTGTAGTCCCCAGCATTTAGTGAGGGTTA
AATAAAAACCTCACTTACTGCTGGGTGTTAAAAAATAATATCCCTCACCATAG
GGGA

S3 (T1ab1)

GCCTTACATATATAGCGGAGACGTAGGAATTAGCAGCAATGCTCCGCGACTCGTAG
AAGATCTGTCATCTGATATCTTGTACAATTAGGTCGTGTCCTGTAAGTTACAGCTT
CGAAGTGCGACTCATGCTTACAGATTCGCGCAATCGTACATCGATCAGGCTC
AGTAGCATTGCATGACAGTATAGTCAGCTTAAAAGAATCCTCCCATTG

S4 (T1ab1)

CACGTACAATAAGGCTGTTTAAACGGAGTTGAGCTGTTATTAGTTACCATAGCAACA
GGCTGGTAGTGGAGGTGATAGTGGGTTGGGGCAGGGGAGAGTTAGAACAAATTCC
AAGACTGGAACAAAAGCCAATCTTAAGGAATTTATCCTAAAACAGTGAAATCATAG
GGGGAAGGGTCATTGTCCAGTTAATGAACACATTAAGTCTCCTCGACGAGTGCG
ACTCAATTAGAATCCCCAGCATTTAGTGAGGGTTAATAAA

S5 (T1ab1)

ACGAGCTCTTTTTGAGCGTACTCCTTCTTAGTAGCAGGGTTATGAAAGTAAGCAC
ATTGTTTTGTTGATCATCCTTTAAATCTTTAGGTTTCACAGATTTTGTAGTTCCAGAA
ATAGTGACAGTTTGTAGTGTATGAATCAAGGATTTTCAAACCTGTTATCAACATTCC
ATGGATGTTACCTTGTCTTGTATTTTTCAAACCACATTGGTGACCGGTGGGCAGCT
GATTTCCACAACAGAACATATCTTTTCATTGTAGTCCCCAGCATTTAGTGAGGGTTA
ATAAAAACCTCACTTCCCCCTGGGGGTTAAAAAATAATTTTCCCCTCCCACA
AAGGAGG

S6 (T1ab1)

AGTACAATTCGGTTGGATTTTAGTGGTTAGCTTTTATTGTTTATGCTTGTTTTTAATT
ACTTGTTTAGTTTATTATTATTATTATTATTTTCCTTTAAATAATGAAGGTTTCATT
TTTGCTTGTCTTCCAGATAAGTTGGTTTTTTTTAGCGAAAATTACACAGAGCCCC
TATTGTTAAGAGGAAAGGGGCTGTCACTGGTAATTTGCCTGGCCCCCAGCATTTAG
TGAAGGATTAATAAACCCCCCTGATGCTGAAAAAATAATCCCCCCC
CTCCGGGGGGGGGG

S7 (T1ab1)

ATTAACCCTCACTAAATGCTGTATG

S8 (T1ab1)

CTGCTACTGCTGGGGTAGAATGACCGATCAGAGGTTGCTGAGAGTACGTGAATAGA
TTAAAGAAGAAATTAAGAGATTTGGTAACGTTAGTATTATGAAAGTCGGGCATTAC
TTCAGCAGCTAGGTTAACCATTTTTTCTCAATTTTGTAAGGTGATGAAATATGTGA
AGCGATGGTTGCCCTTCTAACACTGCCTGAGCGTACTACCGGGACTGAAATATGTA
AAATTGCTGTGAACGATATCTTCTCGACAAATTGACATTTCAAAAAGTACTATCCG
TCACAACAGATGGTGTCCCCAGCATTTAGTGAGGGTTAATAAAAA

S9 (P6ab1):

GCTCATCTCCAGGCTGGGACCACATTCTATATGCTCCTACACAATTCAGGCTCACAA
TGCATAAATTCACTGAACACAATTTATTTTCTCAACAAGCCCTGCTCTATTTAACA
TTATCCCAAACAATCATAAAAAAAGATATCACTCAGCATAATGAATAC

S9' (T7ab1):

TTCTCTGGGTATCGTTAATAGAGCAGGGCTTGTTGAGGAAAATAAATTGTGTTTCA
GTGAATTTATGCCTTGTGAGCCTGAATTGTGTAGGGAGCATATAGAATGTGGTCCCA
GCCTTGGTTGATCTGAGCTGAGTGACCCAGCATTTAGTGAGGGTTAATCTGATACT
GTACACGTATACCTCAAAAAAAAAGATATCACTCAGCATAATGA

S10 (T7ab1):

ACAGTCATAGAGAGGAGGGTTAATCATACTTTACTGGAGTTTTGTTGGTGAGGGGG
AGCTTTTCGCTTTACTTCCACCCTCCTTCCAACCACCGCATAGTGCCATACTTTA
ACACATATAAACACGATGAGCCGCAGGCGCCCCAACTTTTGTGGGAATACAAACA
CGGAGTGGTTTTAATACACAAAGCACTGTCAAAAAGAAGGACTCACTCCCTGAGA
GAAACACAGAACTTTTCTTTTCATTGACAAACCAACAATGATTGAGGGTTAATAA
AAGTCTCGCGAGAGAAAGAGAAGGAGATGACCC

S10' (P6ab1):

GGGAAAATTACCTCGCGTTCTCTCGCATAGGAGGGATACGCTGACACCGTCCCCCA
TCACTCGTGTGTGAACGACACCCTGAAGTCCATGGAATGTTGATAAAAGTTTTGAA
AATCCTTGATTCATACACTACAACTGTCACTATTTCTGGAATAACAAATCTGTGA
AACCTAAAGATTTAAAGGATGATCAACAAAAAATGTGCTTACTTTTCATAACCCTG
CTACTAAGAAGGTGGCCGGTCAAAGTTCCTAAATCAAAAAAAAAGATATCAC
TCAGCATAATGATAAA

S11(T7ab1):

GACTCTATTCGATTGGGTTTGCTGCTTTAGCTTTTAATTGTTTTAATGCATTGTTTTTA
TTACTTGTTTAGTTTATTATTATTATTATTTTCTTTAAATAATGAAGGTTTCATTTTTG
CTTGTCCTTCCAGATAAAATGGATTTTTTTATCAAAAAAACTAAAAGCCCCCTATT
GATCAAAGCAAAGGAACTGTCACAAGCTATTTGACTGATCCCAATCAAATGAATT
CCTTAAAAAAAATAAATAACTCACTCAAAAAGAAGGA

S11' (P6ab1):

CAATACGATCCCGCTCTGCTAATTTTATCTAACATAGGGGGCTCTGTGTAATTTTCGC
TAAAAAAAACCAACTTATCTGGAAGAACAAGCAAAAATGAAACCTTCATTATTTAA
AGGAAAATAATAATAATAAACTAAACAAGTAATTAAAAACAATGCATTA AAC
AATTAAGCTAAAGCACCAATAACAATCGAAATGAATTCCTTCAAAAAAAAAG
ATATCACTCAGCATAATGAAATA

**DEMANDA DE ENERGÍA DURANTE LA LA FASE
EXPONENCIAL DE CRECIMIENTO EN *Octopus maya*:
EXPLORANDO EL EFECTO DEL TAMAÑO INICIAL Y LA EDAD**

*Te quiero en mi paraíso;
es decir, que en mi país
la gente vive feliz
aunque no tenga permiso.*

Te quiero
Mario Benedetti
(1920 – 2009)

RESUMEN

Las demandas energéticas durante las etapas tempranas de los cefalópodos son prácticamente escasas, siendo difícilmente evaluadas por las limitaciones asociadas a su mantenimiento. Especies holobnetónicas como *O. maya* son interesantes modelos para plantear hipótesis sobre la relación entre el tamaño inicial y el uso de la energía fisiológicamente útil (EFU). El consumo de oxígeno y simulaciones de balance de energía fueron realizados para una población de entre 15 y 105 días de edad con base a modelos obtenidos para la especie (Farias *et al.*, 2009); la asimilación y la eficiencia bruta de asimilación (EBA) energía de la alimentación (I) fueron estimadas en función del peso corporal. Los componentes (P, R y U) del balance de energía en función de la edad indican que la especie invierte entre un 60 y 90% de I a los 15 y 105 días respectivamente. La respiración representa un gasto del 13% (15 días) al 5% (105 días). El peso corporal condiciona el uso de la energía en los juveniles, siendo altamente variable a los 15 días (EBA=79.58% \pm 8.76; máx.=89.01%; mín. 57%) y estable a partir de los 45 días a un peso corporal de 1 gramos (> 90%).

I. INTRODUCCION

Por ser animales de crecimiento acelerado (Calow, 1987), las altas tasas de crecimiento en cefalópodos son producto de elevadas tasas metabólicas (Pörtner & Zielinski, 1998; Moltshaniwskyj, 2004), siendo las proteínas la principal moneda energética en estos animales (Hanlon *et al.*, 1991; Lee, 1994; Dominguez *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2007). En octópodos las proteínas son utilizadas en un alto porcentaje para el crecimiento (cerca de un 90% en *Octopus vulgaris*, Houlihan *et al.*, 1999). Estas son incorporadas durante la alimentación, lo que provoca elevadas tasas de ingestión, en donde, como parte de las proteínas, los amino ácidos juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostásis (Lee, 1994).

El crecimiento es el resultante de una serie de transformaciones energéticas que experimenta el alimento ingerido y del balance entre los usos y los destinos de esa energía ingerida. Por esa razón el conocimiento de los factores que modulan el uso de la energía permite estructurar modelos de crecimiento (O' Dor y Wells, 1987). Una forma de evaluar el presupuesto energético de un organismos es utilizando los modelos emanados de la fisiología energética los cuales pueden cuantificar el intercambio y transformación de la energía y materia entre los organismos vivos y su medio ambiente (Lucas, 1993). Esta herramienta, cuando es aplicada en estudios nutricionales permite comprender cómo los nutrientes modulan los mecanismos fisiológicos relacionados con la transformación de la energía del alimento en biomasa (Rosas *et al.*, 2007).

El balance energético (BE) es estimado a partir de la siguiente ecuación (Lucas, 1993): $I = H + U + R + P$; donde I es la energía ingerida, H es la energía perdida en heces, N es la energía perdida por productos del metabolismo de las proteínas, R es la energía invertida en los procesos metabólicos y P es la energía invertida en la producción de tejidos y gametos. Del total de la energía ingerida hay una fracción que se pierde durante los procesos digestivos y que es denominada energía absorbida (Ab). Esta fracción de I puede ser calculada como $Ab = I - H$. Una vez que la materia es absorbida las moléculas básicas (péptidos y amino ácidos, ácidos grasos y carbohidratos simples) son aprovechados tanto como fuentes de moléculas y de energía abasteciendo las necesidades propias para la construcción de nuevas moléculas. Durante ese proceso, las proteínas, los péptidos y muchos amino ácidos son reducidos a expresiones simples o utilizados como fuentes de energía lo que da lugar a la producción de

los desechos nitrogenados (U). En los organismos acuáticos estos desechos están formados principalmente de amonio (NH_3), aunque también suelen producirse algunas otras moléculas como la urea o las creatininas (Regnault, 1979; Regnault, 1981). La diferencia entre la energía de I y la pérdida en H y en U da como resultado la energía asimilada (As), la cual, de acuerdo con Lucas (1993) puede definirse como $As = I - (H + U)$ o bien como $As = R + P$ la cual representa a la cantidad de energía fisiológicamente útil (EFU), tanto para el mantenimiento de la homeostásis (R) como para el crecimiento (P) (Rosas et al., 2007). Una forma de estimar cuánta de la energía del alimento es destinada a EFU puede ser obtenida a partir del cálculo de la eficiencia bruta de asimilación ($EBA = \%As/I$), la cual ha sido utilizada como un índice que permite hacer comparaciones intra e interespecíficos. Estudios previos han demostrado que entre los cefalópodos los valores de EBA son cercanos al 90%, demostrando con esto que este grupo de organismos marinos es altamente eficiente en transformar lo que ingieren en EFU (Wells et al., 1983)

Los modelos bioenergéticos (MB) en cefalópodos son escasos (Rosas et al., 2007), y por lo tanto la información energética en este grupo se torna difícil de obtener (André et al., 2009). Las investigaciones existentes pueden ser separadas en dos grupos: (1) aquellos estudios de adaptación ecológica (ecofisiología), como los realizados en las especies *O. maya* (Van Heukelem, 1976; Farias et al., 2009), *O. vulgaris* (O'Dor y Wells, 1987; Wells y Clarke, 1996; Katsanevaskis et al., 2005 a y b), *Paraledone charcoti* (Daly y Peck, 2000), *E. megalocyathus* (Farias et al., 2009), *Sepia apama* (Grist y Jackson, 2004), *O. pallidus* y *O. ocellatus* (André et al., 2009) y (2) en evaluaciones nutricionales orientadas a la elaboración de dietas artificiales para la acuicultura (*O. vulgaris*, Petza et al., 2006; *E. megalocyathus*, Pérez et al., 2006; *O. maya*, Rosas et al., 2007 y 2008; Aguila et al., 2008). Otra característica de estos estudios es que muchos ellos han sido acotados a fases sub adultas y/o adultas, dadas las facilidades de mantenimientos en comparación a las fases tempranas, sobretudo en aquellas especies en que el ciclo se inicia con un estado planctónico como es el caso de *O. vulgaris*. Gracias a estudios realizados en las especies holobentónicas (incorporación de un juvenil al bentos después de la eclosión), como *O. maya*, *E. megalocyathus*, *O. ocellatus* y *O. pallidus*, se han podido obtener modelos escalares que describen la relación entre el tamaño corporal y la tasa de ingestión de alimento, la tasa metabólica y la tasa de excreción de amonio (Van Heukelem, 1976; Segawa y Hanlon, 1988; Segawa y Namoto, 2002; Farias et al., 2009; André et al., 2009).

Diversos autores han señalado que el crecimiento en los cefalópodos tiene dos tipos de comportamiento. Los juveniles tempranos crecen primero en forma exponencial y luego en forma potencial (Van Heukelem, 1976; Hanlon y Wolterding, 1989; Villanueva, 1995; Domingues *et al.*, 2004; André *et al.*, 2009). Estudios recientes han demostrado que, a partir de MB es posible predecir el momento en el cual la energía del alimento ya no satisface las demandas para el crecimiento exponencial, el cual entonces se desacelera para pasar a una forma potencial, más común entre los organismos marinos y en la que las exigencias fisiológicas de la producción de biomasa es biológicamente posible (Grist y Jackson, 2004; André *et al.*, 2009). Umbrales de biomasa y edades de cambio simulados bajo diferentes escenarios térmicos han demostrado también la forma en que las variaciones de temperatura modulan el uso y destino de la energía coadyuvando a la comprensión de los efectos que este parámetro tiene en el ciclo de vida de los cefalópodos (André *et al.*, 2009).

Los cefalópodos son animales que expresan una alta variabilidad de tamaños durante el crecimiento aún proviniendo de una misma micro cohorte o poblaciones mantenidas bajo condiciones controladas (Semmens *et al.*, 2004). Aunque esta variación no ha sido del todo comprendida los estudios realizados en dos poblaciones de *O. maya* individualizados y mantenidos bajo las mismas condiciones ambientales y nutricionales han permitido establecer con precisión que las diferencias en peso al nacer no afectan la tasa de crecimiento, la cual es hasta los 105 días de vida expresada por un modelo exponencial (Capítulo 2).

Desde finales del siglo XIX se sabe que el uso de EFU esta ligada con el peso, debido principalmente a que las demandas de energía cambian con la biomasa corporal de los organismos (Andrews *et al.*, 1972; Storey y Storey, 1978; Clarke y Johnston, 1999; Gillooly *et al.*, 2001; Gillooly *et al.*, 2002; Clarke, 2004; Clarke y Fraser, 2004; Pörtner *et al.*, 2005); Farías *et al.*, 2009). Es decir, la tasa de transferencia de energía para realizar las funciones básicas y para el crecimiento responde a las demandas que de forma potencial, tienen los tejidos y órganos que requieren de la energía y materia ingerida en el alimento. Si los cefalópodos en sus primeros días de vida tienen una tasa de crecimiento exponencial, es posible que las demandas excedan la tasa de abasto de energía (EFU) que en forma potencial se produce a partir de la energía ingerida. ¿Cuándo las demandas exceden a la oferta de energía en los juveniles tempranos de *O. maya*? ¿Las diferencias de peso corporal de los organismos al nacer afectan la forma en que los individuos utilizan la energía ingerida?

Con base en lo anterior el presente estudio ha sido diseñado para cubrir los siguientes objetivos (1) establecer el modelo metabólico general de la especie considerando tamaños post-eclosión; (2) estimar el balance de energía basado en antecedentes bibliográficos de la especie; (3) analizar la asimilación y su eficiencia en relación al peso corporal y para diferentes edad.

La información generada a partir de estos resultados permitirá establecer como las demandas de energía al inicio del ciclo de vida de *O. maya* y durante la fase de crecimiento exponencial son satisfechas a partir de la energía ingerida que en los cefalópodos, al igual que en la mayoría de los organismos marinos, se expresa de forma potencial.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

El siguiente estudio tiene dos componentes: uno experimental, en el cual se estimaron los parámetros del modelo que define la relación del consumo de oxígeno y el peso corporal en juveniles tempranos de las dos poblaciones previamente descritas en el capítulo 2; y una simulación del balance de energía mediante el uso de modelos energéticos descritos para la especie en función del peso corporal.

2.1 *Consumo de oxígeno disuelto (VO₂) en función del peso corporal (Pc)*

La relación entre el VO₂ de un animal y su Pc es expresado por el modelo potencial (Zeuten, 1953): $VO_2 = a Pc^b$; en donde el exponente b de la ecuación indica la magnitud de cambio del consumo de oxígeno con respecto al peso corporal. Se evaluó el consumo de oxígeno (VO₂) (mgO₂/h/animal) en 42 juveniles de *O. maya* (0.25 a 4.0 gramos) provenientes de las poblaciones 1 (eclosión en febrero del 2008) y 2 (eclosión en julio del 2008); el mantenimiento de ambas poblaciones es especificado en el capítulo 2. El VO₂ fue determinado a los 45 (n=18) y 75 (n=6) días edad en la población 1, y a los 75 días de edad para la segunda población (n=18); ambas corridas experimentales fueron realizadas a una temperatura promedio de 25 °C. Se utilizó un respirómetro de flujo continuo compuesto por cámaras respirométricas conectadas a un sistema de recirculación (Rosas et al., 2007) (ver Figura 1). Cada juvenil fue ubicado en una cámara respirométrica de 125 ml (acrílico) (Experimento 1) y 110 ml (vidrio) (Experimento 2) con un flujo aproximado de 0.1 litros/min. Todos los individuos fueron aclimatados a las cámaras durante 6 horas previas al inicio de las corridas experimentales. En cada cámara se colocó un refugio (concha de moluscos o PVC) para minimizar el estrés asociado a estas condiciones. Las mediciones fueron realizadas en horario nocturno (6 PM - 9AM). Se utilizó una cámara sin pulpo (con refugio) como cámara control.

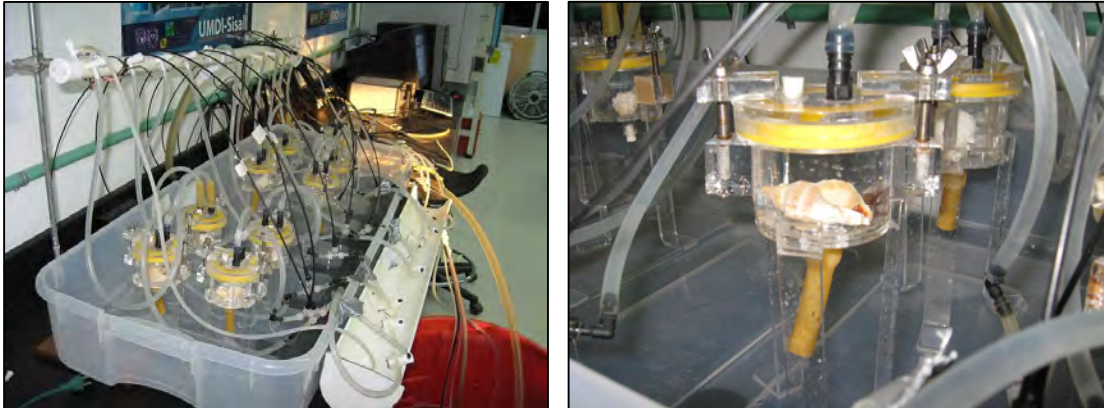


Figura 1: (izquierda) Respirómetro de circuito cerrado (sistema de recirculación) conectado a un oxímetro de 10 canales ($OXY-10 \pm 0.01 \text{ mg l}^{-1}$). (derecha) Cámara respirométrica de acrílico de 125 ml con refugio.

2.2 Balance de energía (BE) durante la fase exponencial de crecimiento

El balance de energía (BE) durante la fase exponencial de crecimiento fue estimado considerando la ecuación (Lucas, 1993): $I = R + P + U$; el BE fue estimado a los 15, 45, 75 y 105 días de edad, todas ellas representativas de la fase exponencial de crecimiento de la especie según pudo ser validado en el capítulo 2. Para cada edad fue estimada una ganancia de peso (peso final – peso inicial) (g) con base en los pesos de la población de juveniles-hermanos (Experimento 2, Capítulo 2). La respiración fue obtenida al aplicar el modelo metabólico en función del peso derivado de la actividad anterior. La U fue estimada con el modelo de excreción de amonio en función del peso corporal ($NH_3 = 0.75Pc^{0.43}$) desarrollado por Farías *et al.*, (2009) para la especie con animales de entre 0.5 a 1,350 peso húmedo (ph) alimentados con pasta de jaiba. Cada componente del BE fue expresado en $\text{kJ día}^{-1} \text{ animal}^{-1}$. El consumo de oxígeno fue transformado en R usando $14,3 \text{ Jmg}^{-1}$ (Lucas, 1993); la ganancia de peso fue transformada en unidades de energía (P) utilizando $10,01 \text{ kJ/g}$ peso seco obtenido para el tejido de *O. maya* por Rosas *et al.*, (2007). Se calcularon las proporciones %R/I, %P/I y %U/I para cuantificar cuánta de la energía del alimento es invertida en cada componente del BE.

2.3 Energía de asimilación (As) y eficiencia gruesa de asimilación (EGA) en función del Pc y edad

La energía de asimilación ($As = R+P$) o metabolizable incluye la energía canalizada en el metabolismo respiratorio y aquella empleada para la producción de biomasa y tejido reproductivo (Rosas *et al.*, 2007). La eficiencia gruesa de asimilación (EGA) corresponde fracción de energía proveniente del alimento que va destinada a satisfacer los procesos

fisiológicos asociados a la asimilación. Estos indicadores energéticos fueron relacionados con el peso corporal (P_c) para ambas categorías de tamaños iniciales (“pequeños y grandes”) (P y G) y a las edades especificadas en el punto anterior.

2.4 *Análisis estadístico*

Los parámetros del modelo metabólico (a y b) en función del peso corporal para los individuos de ambos experimentos fueron estimados a partir de la regresión lineal de mínimos cuadrados entre Log-VO_2 y Log-P_c . La probabilidad de correlación entre ambas variables fue estimada mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Este análisis fue realizado con el programa STATISTICA-6.

Para el análisis de la relación entre As (% de I) y P_c a las diferentes edades fue realizado previamente una inspección visual de residuales verificando la distribución normal de éstos. Se utilizó la transformación de raíz cuadrada de As (STATISTICA-6). Posteriormente y confirmado los requisitos para la regresión lineal, las pendientes y los interceptos de las regresiones se compararon mediante un análisis de covarianza (ANCOVAR). Este análisis fue realizado con el programa R versión 2.8.0.

III. RESULTADOS

3.1. VO₂ en función de P_c

La relación entre el peso y el VO₂ de los juveniles de ambas edades es presentada en la figura 2(a). Dicha relación tuvo una elevada dispersión sobretodo en aquellas mediciones realizadas en individuos con pesos entre 0.5 y 1 g; si bien el coeficiente de determinación fue bajo ($r^2=0.21$), la correlación entre ambas variables es significativa ($p<0.01$). Al integrar estos resultados al modelo general de la especie (modelo integrado=VO₂ juveniles (Farias *et al.*, 2009) se obtuvo el modelo integrado de $VO_2 (P_c)=1.23 (P_c)^{0.64}$; ($r^2=0.93$) (Figura 2b). Se obtuvo una tasa metabólica mas baja en el modelo integrado que en el general (0.64 vs 0.67).

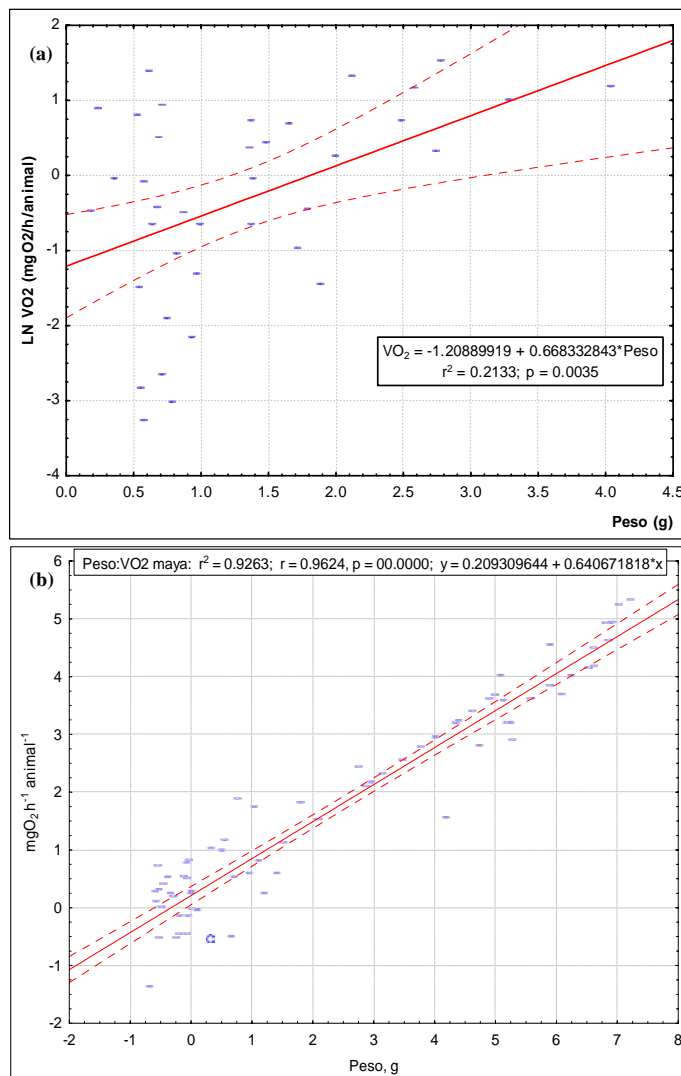


Figura 2: (a) Modelo metabólico de juveniles tempranos de *O. maya* a 25 °C (0.2 a 4 g) a los 45 y 75 días de edad. (b) Modelo metabólico integrado (VO₂ juveniles+Farias et al., 2009) para pesos corporal de 0.2 a 1,350 g.

3.2 Balance de energía (BE) durante el crecimiento exponencial

Del total de la energía ingerida, el 65% correspondió a la energía canalizada hacia la producción de biomasa, siendo directamente proporcional a la edad y finalizando con valores de 91,49% y 94,30% para P y G respectivamente (ver Figura 3). La energía asociada al consumo de oxígeno para esta especie durante la fase juvenil osciló entre 0,14 a 0,48 $\text{kJd}^{-1}\text{animal}^{-1}$ en G y entre 0,11 a 0,71 $\text{kJd}^{-1}\text{animal}^{-1}$ para P. Para ambas categorías R representó un gasto por sobre el 13% de I al inicio y valores inferiores al 5% al finalizar la evaluación, evidenciándose una tendencia inversamente proporcional a la edad. Dicha tendencia, como es esperado, también fue obtenida para la energía U; valores iniciales por sobre el 17% y finales cercanos al 4% de I caracterizaron la excreción de amonio durante esta fase de crecimiento.

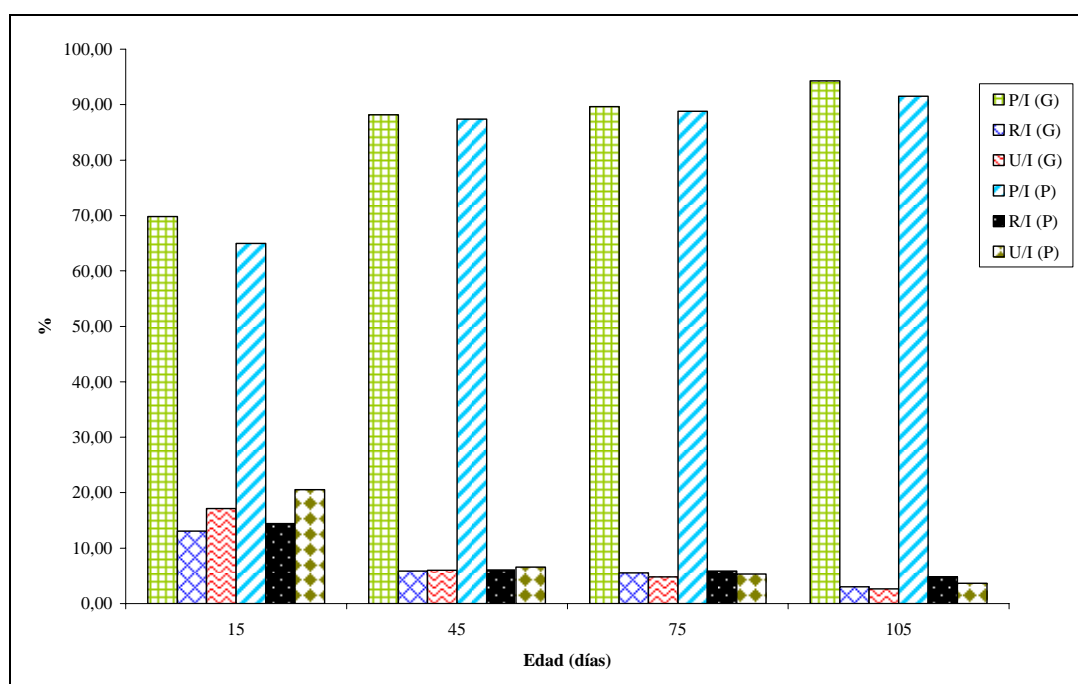


Figura 3: Proporción de la energía del alimento (I) destinada para producción de biomasa (P), respiración (R) y excreción de amonio (U) para las categorías de tamaño inicial de “grandes” (G) y “pequeños” (P) entre los 15 y 105 días de edad.

3.2 Estimación de As en función de Pc a diferentes edades

La relación entre la energía de asimilación (As) y el peso corporal (Pc) a diferentes edades durante el crecimiento exponencial de G y P mostró diferencias significativas entre las pendientes, los interceptos e la interacción de estos con la edad. Así se observó que la asimilación depende del peso corporal, que la edad condiciona la asimilación y que la asimilación con respecto al peso corporal varía en función de la edad. A partir de esta última

inferencia es posible señalar que animales de menor edad presentan una asimilación que varía más rápido en función del peso que en animales mayores (ver Figura 4).

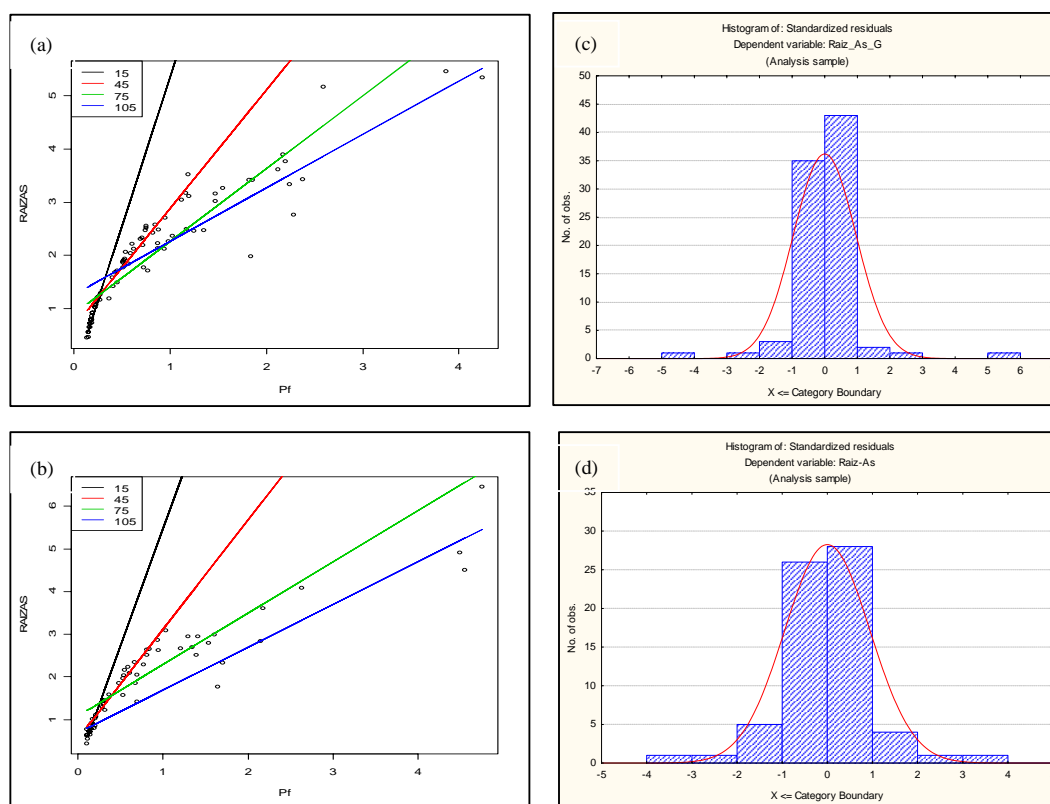


Figura 4: Relación entre la energía de asimilación ($As=R+P$) y el peso corporal (Pf) en cuatro edades (15, 45, 75 y 105 días) para las categorías de peso inicial: (a) G (“grandes”) y (b) P (“pequeños”). Análisis de residuales: distribución normal del As al aplicar raíz cuadrada en G (c) y P (d).

Tabla1: Tabla de ANCOVAR para la relación entre As y peso corporal a diferentes edades en individuos “grandes” y “pequeños”.

Tratamiento	Interacción	g.l	Sum. Cuad.	Media Cuad.	F	P
Grandes	Peso	1	89.062	89.062	1195.076	< 2.2e-16 ***
	Edad	3	7.187	2.396	32.147	9.778e-14 ***
	Peso*edad	3	3.275	1.092	14.651	1.084e-07 ***
Pequeños	Peso	1	76.570	76.570	1215.032	< 2.2e-16 ***
	Edad	3	7.937	2.646	41.980	1.189e-14 ***
	Peso*edad	3	3.557	1.186	18.815	1.109e-08 ***

3.4 Relación entre EGA y el Pc

El comportamiento de la eficiencia bruta de asimilación ($\%EBA=\%As/I$) en función del peso corporal a distintas edades durante el crecimiento de animales “grandes y pequeños” mostró que la edad condiciona la forma en que la energía del alimento (I) es invertida en la asimilación ($As=R+P$) (Fig.5).

Animales de 15 días de edad presentaron una EBA promedio de $79.58\% \pm 8.76$ (DE) ($89.01\% - 57\%$) (máx. -mín), la cual resultó ser inferior que a edades mayores y con mayor variabilidad. A medida que los animales crecieron, la eficiencia se mantuvo prácticamente constante mostrando así el poco efecto que tuvo peso corporal en la EBA. Para el caso de los animales “pequeños”, las edades también condicionaron las eficiencias en función del peso. La EBA fluctuó más a temprana edad, siendo las edades mayores las que mostraron una eficiencia superior al 95%.

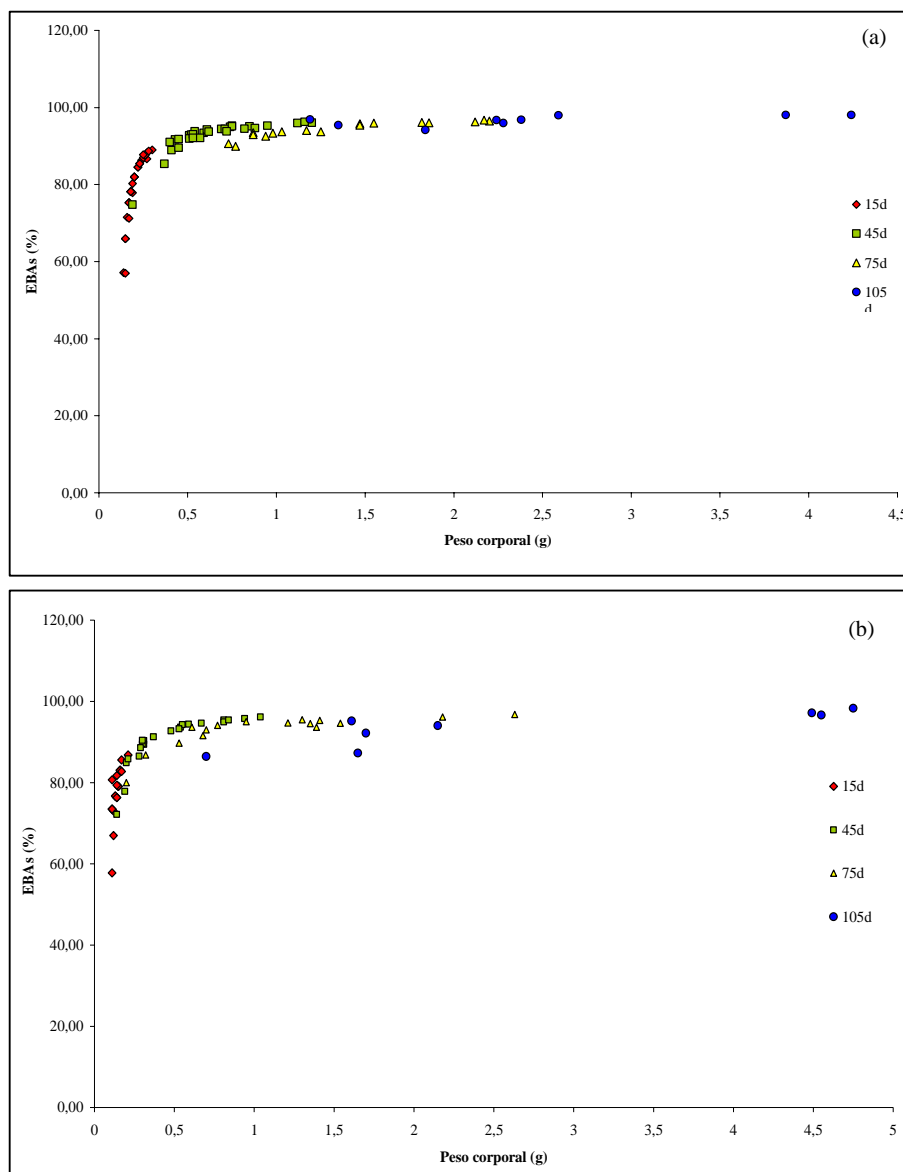


Figura 5: Eficiencia bruta de asimilación (EBA=%As/I) en función del peso corporal y diferentes edades durante la fase exponencial de crecimiento para las categorías de peso inicial para G (a) y P (b). Edades de 15 (rombo rojo), 45 (cuadrado verde), 75 (triángulo amarillo) y 105 (círculo azul) días.

IV. DISCUSION

4.1 Modelo metabólico durante la fase exponencial de crecimiento

El consumo de oxígeno (VO_2) en 42 juveniles con entre 0.2 a 4 g reportados en esta estudio permitieron tener mas antecedentes sobre las demandas metabólicas en función del peso durante la fase temprana de *Octopus maya*, contribuyendo con ello al modelo general (0.5 y 1,350 g) reportado por Farias *et al.*, (2009). Al igual que en otros taxas, la relación entre el metabolismo y el peso en cefalópodos esta dado por un relación alométrica ($VO_2=a P_c^b$) (Zeuther, 1953; Bertalanffy, 1957). Antecedentes sobre el metabolismo en juveniles de esta especie fueron publicadas previamente por Segawa y Hanlon (1988) (0.11 a 81.23 gramos) ($VO_2=227P_c^{0.9}$), sin embargo sus valores son discutibles al utilizar cámaras respirometricas cerradas (Farias *et al.*, 2009). El modelo integrado ($VO_2 (P_c)=1.23 (P_c)^{0.64}$; $r^2=0.96$) presentó una pendiente mas baja que lo reportado por Farias *et al* (2009) (0.64 vs 0.69); sin embargo el coeficientes de determinación fue mas alto en el modelo integrado ($r^2 = 0.96$ vs 0.93). Las pendientes aquí reportadas son cercanas al intervalo descrito para otras especies del genero *Octopus*, el cual puede oscilar entre 0.70 y 0.95 para *O. vulgaris*, entre los 13 y 28°C (O'Dor y Wells, 1987; Katsanevakis *et al.*, 2005 a y b). Diferencias en las pendientes de ambos modelos pueden estar dadas por: (i) la influencia de los pesos superiores en el modelo general; (ii) diferencias en la relación entre el volumen de la cámara y el tamaño del individuo; (iii) variación en las lecturas de VO_2 por el tipo de oxímetro utilizado. Dada la sensibilidad de este ultimo, se hace necesario establecer un coeficiente de corrección que permita estandarizar las medidas para tener una mayor precisión con el fin de saber si la variabilidad esta asociada al error del instrumento o bien refleja, al igual que el peso, otra característica mas del proceso en cefalópodos.

4.2 Balance de energía durante la fase exponencial de crecimiento

4.2.1 Energía de producción de biomasa (P)

Como fue propuesto (Capítulo 2), y a partir de un modelo exponencial de crecimiento se estableció que los juveniles de *O. maya* tienen una tasa de crecimiento de 0,03 g/día sostenida durante los primeros 100 días de vida. Para *O. maya*, mantener una biomasa en crecimiento exponencial implicó canalizar aproximadamente entre el 60% (15 días) y el 90% (105 días de edad) de la energía proveniente del alimento. Para una biomasa de 1,000 g se ha reportado que *O. maya* y *E. magalocyathus* invierten alrededor del 70% de I en P. En contraste Van Heukelem (1987) reportó para *O. maya* proporciones de P/I (%) de 19% a 30°C y de 9,6% a

20°C. En juveniles de *O. cyanea* (otra especie tropical) también Van Heukelem (1987) reportó valores de P/I% de 57% en organismos alimentados *ad libitum*. Las diferencias podrían estar asociadas a las dietas utilizadas, tiempo de análisis, al sexo, el estado general de los animales y al valor energético del tejido usado para la transformación del peso en unidades de energía.

4.2.2 Energías de respiración (R) y de excreción de amonio (U)

En el presente estudio se reportó que los juveniles de *O. maya* destinan el 13% para R durante los primeros 105 días de vida. En sub adultos de *O. maya* Rosas *et al.*, (2007) estimaron que R representó el 23% de I, para animales con pesos promedio de 637g y que fueron alimentados con con pasta de jaiba. Por su parte, Van Heukelem (1987) obtuvo para la misma especie un gasto de energía asociado a la respiración en individuos de peso inicial de 4 gramos del orden del 11.7% y 6% a temperatura de 30°C y 20°C respectivamente, aunque estos valores fueron obtenidos a partir de mediciones realizadas utilizando respirómetros cerrados. El uso de cámaras metabólicas abiertas o de flujo ha sido ampliamente documentado y recomendado pues en este tipo de sistemas el oxígeno disuelto consumido por el organismo no se convierte en una limitante del metabolismo (Bishop *et al.*, 1980; Dall y Smith, 1986; Renaud, 1986; Rosas *et al.*, 1998; Childress y Seibel, 1998; Bridges, 2001). La mayoría de los vertebrados y muchos invertebrados son oxiconformes ya que no tienen la capacidad de mantener el consumo de oxígeno independiente de la concentración de oxígeno del medio (Rosas *et al.*, 1997; Rosas *et al.*, 1999). En las cámaras cerradas la medición se realiza a partir de la evaluación de la diferencia entre la concentración de oxígeno antes y después del cerrado de la cámara, exponiendo simultáneamente al animal a la reducción de oxígeno disuelto que es consumido durante el periodo del ensayo. Así, y al ser oxiconformes, lo que realmente ocurre en la cámara respirométrica es que el organismo reduce el metabolismo en función del nivel presente en el agua de la cámara, modulando su consumo a partir de la concentración del gas que disminuye. Por esta razón, es frecuente encontrar en la literatura que los valores del consumo de oxígeno de organismos acuáticos medidos en cámaras cerradas sean menores a los observados en sistemas de flujo abierto, en donde los animales no experimentan limitación alguna, ya que el oxígeno disuelto que ingresa a la cámara se mantiene constante. Aunque los datos reportados por Van Heukelem (1987) podrían servir de base para comprender los efectos de la temperatura en el metabolismo de los pulpos, por el método utilizado para realizar esas mediciones es evidente que los parámetros del balance energético fueron sub estimados ya que el método para medir el VO₂ limitó el propio metabolismo de los pulpos experimentales.

El estudio de Van Heukelem (1987) también reportó que las proporciones asociadas a R disminuyen en función del peso corporal, siendo de 8.6%, 6,7% y 2,7% para biomásas de 25, 250 y 2500 gramos respectivamente. Al igual que la gran mayoría de los organismos pluricelulares, el metabolismo por unidad de peso ($\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), cuando se relaciona con la biomasa, se reduce ya que la demanda de energía por g de peso de un animal con mayor biomasa es menor que la que requiere un organismo con menor biomasa (Gillooly *et al.*, 2001; Gillooly *et al.*, 2002). En el caso de los cefalópodos este comportamiento es aún más dramático pues en ellos las demandas energéticas no solo son mayores como consecuencia de un peso menor (y una mayor relación superficie-volumen), sino como acción directa de una demanda metabólica mayor asociada con el crecimiento exponencial que estos animales tienen. Así en los juveniles tempranos de *O. maya* la mayor tasa metabólica por unidad de peso registrada es sin duda un reflejo de la cantidad de energía que los animales requieren para realizar los procesos metabólicos.

El metabolismo es la suma del catabolismo y el anabolismo (Hochachka, 1970). El catabolismo implica la degradación de moléculas con la consecuente captación de energía mientras que el anabolismo implica el uso y aprovechamiento de la energía y moléculas para la formación de biomasa. En el caso de los cefalópodos y en particular de *O. maya* es altamente posible que, al tener un crecimiento exponencial, el anabolismo sea la mayor prioridad ya que de este depende la producción de biomasa. A partir de las moléculas y la energía disponible, el catabolismo deberá de ser lo suficientemente intenso como para satisfacer las demandas que de forma exponencial exigen la síntesis de biomasa, implicando, sin duda una tasa de ingestión de alimento que soporte tales demandas. Estudios recientes realizados en *O. maya* han demostrado que los juveniles tempranos pueden llegar a ingerir hasta el 50% de su peso/día, lo que demuestra que efectivamente es a través del alimento que se satisfacen las necesidades de energía de la fase de crecimiento exponencial.

La energía de excreción (U) pudo ser estimada al aplicar el modelo alométrico para la especie entre los 0.5 a 1.350 gramos por Farias *et al.*, (2009), los cuales reportan que un 10.51% del alimento es invertido por pérdida de excreción para una biomasa de 1,000 gramos. Durante el crecimiento exponencial, la estimación indica que los juveniles destinan entre un 17,12% en animales “grandes” y un 20,55% en pulpos “pequeños” a los 15 días de edad y un 2,64% y 3,68% al finalizar los 105 días para ambas categorías respectivamente. Aunque las pérdidas asociadas a las heces no fueron estimadas es de suponer que el comportamiento de la

producción de estos desechos siga un comportamiento similar al de la tasa de ingestión. Es interesante hacer notar que la eficiencia con que los pulpos absorben la energía es particularmente alta. Del cálculo de la diferencia entre la energía ingerida y las heces producidas, Aguila *et al* (2007) reportaron eficiencias de absorción de 90% en *O. maya* lo que demuestra que un bajo porcentaje del alimento ingerido es perdido como materia fecal.

4.3 As y EGA en relación con el peso corporal y a la edad

Animales de ambas categorías de peso inicial presentaron una As asociada con el peso corporal y que depende de la edad de los individuos. Juveniles de 15 días de edad presentaron una mayor dependencia al peso corporal en comparación a edades avanzadas. Posterior a esta edad, los individuos comienzan a estabilizar la energía destinada para el metabolismo respiratorio y el crecimiento, canalizándose sobre un 90% del alimento para satisfacer las demandas de energía. Estos resultados están dentro de lo reportado para los cefalópodos, los que se caracterizan por tener eficiencias por sobre el 90%. Estudios realizados en *O. maya* demostraron que la dieta es un factor modulador de la eficiencia de As. Animales alimentados con un pellet diseñado para camarones y adicionado con harina de calamar mostraron una As% de 6% mientras que en organismos alimentados con carne de jaiba la As% fue del 90% (Rosas *et al.*, 2007). EBA de 95 y 97% fueron reportadas por Daly y Peck (2000) para *Pareledone charcoti* alimentados con kril (*Euphausia superba*) y de 96.5% para *O. cyanea* utilizando jaiba (Van Heukelem 1976).

La edad como factor que condiciona la asimilación aporta nuevos antecedentes sobre la fisiología de la especie, siendo más variable su eficiencia en animales de menor edad dentro del periodo evaluado. Las causas de esta particularidad en la forma en que los juveniles invierten la energía del alimento podrían estar asociadas a varias causas. Durante los primeros 10 días de vida, *O. maya* atraviesa por una serie de cambios morfológicos, enzimáticos, bioquímicos y conductuales al pasar de una alimentación endógena (reservas vitelinas) a una exógena (Moguel *et al.*, *en prensa*), lo que podría condicionar esta capacidad de asimilar el alimento. Por otra parte, la dinámica del crecimiento del tejido muscular en cefalópodos es compleja (Moltschaniwskyj, 2004) y también podría condicionar las demandas fisiológicas, sobretudo por el crecimiento de los organismos dependiendo de si están generando nuevas células (hiperplasia) o aumentando las existentes (hipertrofia). La diferenciación sexual temprana podría ser considerada como un factor que condiciona este proceso, sobretudo si se ha reportado un desarrollo gonadal precoz en la especie (Avila-Poveda *et al.*, 2009).

4.4 Aplicaciones y futuras consideraciones

Los resultados reportados en este capítulo son un aporte para la especie y para los cefalópodos en general, contribuyendo a la comprensión de cómo estos organismos intercambian y transforman la energía durante la fase de crecimiento más acelerado. A partir de las estimaciones de los componentes de energía del BE es posible estimar una línea-base para el diseño de dietas formuladas para maximizar el crecimiento durante esta etapa en condiciones de cultivo y para simular ciertas condiciones que permitan una mejor comprensión de la fisiología de las poblaciones naturales. Al ser la edad un factor que marca diferencias en la eficiencia de la asimilación del alimento, es posible que los manejos asociados a éstas permitan optimizar el proceso de engorda de la especie y así optimizar la fase de mayor crecimiento de estos animales.

La disminución de la tasa de crecimiento posterior a la fase exponencial de crecimiento ha sido reportada para varias especies de octópodos bentónicos (DeRusha et al., 1987; Forsythe y Hanlon, 1988; Segawa y Namoto, 2002). Recientes investigaciones han desarrollado modelos bioenergéticos que explican por qué ocurre el cambio de fase en algunas especies de cefalópodos (Gris y Jackson, 2004; André et al., 2009), pudiéndose ser validado en *O. maya* al disponer de un modelo de ingestión para la fase juvenil. La incorporación de la temperatura en futuros estudios de la bioenergética de esta especie permitiría explorar también cómo los procesos metabólicos asociados a la respiración pueden ser alterados ante la variación de las condiciones ambientales. El incremento de la temperatura de los océanos y el proceso de acidificación de éstos por efecto del calentamiento global podrían condicionar la inversión de la energía de la alimentación para satisfacer los requerimientos energéticos, sobretodos los asociados al metabolismo y la producción de biomasa en las poblaciones naturales de *O. maya*, aportando nuevos elementos a los ya publicados en otras especies de cefalópodos (André et al., 2009 a y b). Más análisis que integren otros factores, como el sexo, gastos metabólicos asociados al transporte y selección de presas también serán necesarios para contribuir al conocimiento de las demandas fisiológicas de la especie con el objetivo de seguir complementando la información para encontrar los orígenes de la elevada variabilidad del crecimiento en cefalópodos.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aguila, J., Cuzon, G., Pascual, C., Domingues, P., Gaxiola, G., Sánchez, A., Maldonado, T., y C. Rosas. 2007. The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss and Solis) diet: digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance. *Aquaculture* 273:641–655.

André, J., Pecl, G., Semmens, J.M, y E. Grist. 2008. Early life-history processes in benthic octopus: Relationships between temperature, feeding, food conversion, and growth in juvenile *Octopus pallidus*. *J. Exp. Mar. Bio. Eco. Ser.*, 354: 81-92.

André, J., Grist, E.M., Semmens, J.M., Pecl, G.T y S. Segawa. 2009. Effects of temperature on energetics and the growth pattern of benthic octopuses. *J. Exp. Mar. Bio. Eco. Ser.*, 374: 167–179.

Andre, J., Pecl, G.T., Grist, E.P, Semmens, J.M, Haddon, M. y S. Leporati. 2009. *Modelling size-at-age in wild immature female octopus: a bioenergetics approach*. *J. Exp. Mar. Bio. Eco. Ser.*, 384: 159-174.

Andrews,J.W., Sick, L.V. y G.J. Baptist. 1972. The influence of dietary proteins and energy levels on growth and survival of penaeid shrimp. *Aquaculture*, 1, 341-347.

Avila-Poveda, O., Colin-Flores, R. y C. Rosas. 2009. Gonad development during the early life of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda). *Biol. Bull.*, 216: 94–102.

Bishop,J.M., Gosselink,J.G. y J. Stone. 1980. Oxygen consumption and hemolymph osmolality of brown shrimp *Penaeus aztecus*. pp. 741-757.

Bridges, C.R. 2001. Modulation of haemocyanin oxygen affinity: Properties and physiological implications in a changing world. *J. Exp. Biol.* 204, 1021-1032.

Calow, P. 1987. Fact and theory-an overview. En; P.R. Boyle (Ed.), *Cephalopod Life Cycles* Vol. II. Academic Press, London. 351 – 365.

Childress, J.J. y B.A Seibel. 1998. Life stable low oxygen levels: adaptations of animals to oceanic oxygen minimum layers. *The Journal of Experimental Biology* 201, 1223-1232.

Clarke, A. 2004. Is the universal temperature dependence of metabolism? *Functional Ecology* 18, 252-256.

Clarke, A. y K.P.P Fraser. 2004. Why does metabolism scale with temperature? *Functional Ecology* 18, 243-251.

Clarke, A. y N.M Johnston. 1999. Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *Journal of Animal Ecology* 68, 893-905.

Dall, W. y D.M, Smith. 1986. Oxygen consumption and ammonia-N excretion in fed and starved tiger prawns *Penaeus esculentus* Haswell. *Aquaculture* 55, 23-33.

Daly, H.I y L. S. Peck. 2000. Energy balance and cold adaptation in the octopus *Pareledone charcoti*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 245:197-214.

DeRusha, R.H., J.W. Forsythe y R.T. Hanlon, 1987. Laboratory growth, reproduction and life span of the Pacific pygmy octopus, *Octopus digueti*. *Pacific Science*, 41: 104-121.

Domingues, P., Sykes, A., Sommerfield, A., Almansa, E., Lorenzo, A. y P. Andrade. 2004. Growth and survival of cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758) of different ages fed crustaceans and fish. Effects of frozen and live prey. *Aquaculture* 229, 239-254.

Domingues, P., López, N., Muñóz, J.A, Maldonado, T., Gaxiola, G. y C. Rosas. 2007. Effects of an artificial diet on growth and survival of the Yucatan octopus, *Octopus maya*. *Aquac. Nutr.* 13:1 - 9.

Farias, A., Uriarte, I., Hernandez, J., Pino, S., Pascual, C., Caamal, C., Domingues, P y C. Rosas. 2009. How size relates to oxygen consumption, ammonia excretion, and ingestion rates in cold (*Enteroctopus megalocyathus*) and tropical (*Octopus maya*) octopus species. *Mar. Biol.*, 156 (8): 1547-1558.

Forsythe, J. W y R.T, Hanlon, 1988. Effect of temperature on laboratory growth, reproduction and life span of *Octopus bimaculoides*. *Mar. Biol.*, 98: 369 - 379.

Gillooly, J.F., Brown, J.H., West, G.B., Savage, V. M y E.L. Charnov. 2001. Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science* 293, 2248-2251.

Gillooly, J.F., Charnov, E.L., West, G.B., Savage, V.M. y J.H Brown. 2002. Effect of size and temperature on developmental time. *Nature* 417, 70-73.

Grist, E.P. y G. D Jackson, 2004. Energy balance as a determinant of two-phase growth in cephalopods. *Marine and Freshwater Research*, 55:395 - 401.

Hanlon, R.T. y M. R Wolterding. 1989. Behavior, body patterning, growth and life history of *Octopus briareus* cultured in the laboratory. *Amer. Malac. Bull.* 7, 21-45.

Hanlon, R., Turk, P. y P. Lee. 1991. Squid and cuttlefish mariculture: An update perspective. *J. Ceph. Biol.* 2(1), 31-40.

Hochachka, P.W. 1970. The organization and control of metabolism in the crustacean gill. *Comp. Biochem. Physiol.* 33, 529-548.

Houlihan, D.F., McMillan D.N., Agnisola C., Genoino I.T. y L. Foti, 1990. Protein synthesis and growth in *Octopus vulgaris*. *Mar. Biol.*, 106:251-259.

Katsanevakis, S., Protopapas, N., Miliou, H. y G. Verriopoulos. 2005a. Effect of temperature on specific dynamic action in the common octopus *Octopus vulgaris* (Cephalopoda). *Mar Biol (Berl)* 146: 733–738.

Katsanevakis, S., Stefanopoulou, S., Miliou, H., Moraitou-Apostolopoulou, M. y G. Verriopoulos. 2005b. Oxygen consumption and ammonia excretion of *Octopus vulgaris* (Cephalopoda) in relation to body mass and temperature. *Mar. Biol.* 146:725–732

Lee P. G. 1994. Nutrition of cephalopods: fueling the system. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 25, 35-51.

Leporati, S., Pecl, G. T. y J.M Semmens. 2007. Cephalopod hatchling growth: effects of initial

size and seasonal temperatures. *Mar. Biol.* 151:1375 – 1383.

Leporati, S., Semmens, J.M y G.T Pecl, 2008. Determining the age and growth of wild octopus using stylet increment analysis. *Marin Ecology Progress Series* 367 : 213 – 222.

Lucas, A. 1993. *Bioenergétique Des Animaux Aquatiques*. Masson, Paris.

Moguel, C., Mascaró, M., Ávila-Poveda, O., Caamal, C., Sánchez, A., Pascual, C. y C. Rosas (en prensa). Morphological, physiological, digestive and behavioural changes during post embryonic development of *Octopus maya* (Voss and Solis).

Moltschaniwskyj, N. 2004. Understanding the process of growth in cephalopods. *Marine and Freshwater Research*, 55:379 – 386.

Moltschaniwskyj, N y G , Jackson. 2000. Growth and tissue composition as a function of feeding history in juvenile cephalopods. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 253: 229 –241.

O'Dor, K & Wells, M.J (1978). Reproduction versus somatic growth: hormonal control in *Octopus vulgaris*. *J. Exp. Bio.* 71: 15 – 31.

Pauly, D. 1998 . Why squid, though not fish, may be better understood by pretending they are. *S. Afr. J. Mar. Sci.* 20: 47 - 58.

Pecl, G, Steer, M.A. y K. Hodgson. 2004. The role of hatchling size in generating the intrinsic size-at-age variability of cephalopods: extending the Forsythe hypothesis. *Mar. Fresh. Res.* 55: 387 – 394.

Petza, D., Katsanevakis, S. y G. Verriopoulos. 2006. Experimental evaluation of the energy balance in *Octopus vulgaris*, fed ad libitum on a high-lipid diet. *Mar Biol* 148:827–832.

Pérez, M., López, D., Aguila, K & González, M. L. 2007. Feeding and growth in captivity of the octopus *Enteroctopus megalocyathus* Gould, 1852. *Aquac. Res.* 37: 550 – 555.

Pörtner, H-O y S. Zielinski. 1998. Environmental constraints and the physiology of

performance in squid. S. Afr. J. Mar. Scie. 20: 207-221.

Pörtner,H.O., Storch,D. y O. Heilmayer. 2005. Constraints and trade-offs in climate-dependent adaptation: energy budgets and growth in a latitudinal cline. Sci. Mar. 69, 271-285.

Regnault, M. 1979. Ammonia excretion of the sand-shrimp *Crangon crangon* (L.) during moult cycle. J. Comp. Physiol. 133, 199-204.

Regnault,M., 1981. Respiration and ammonia excretion of the shrimp *Crangon crangon* (L.) metabolic response to prolonged starvation. Journal Comparative Physiology 141, 549-555.

Renaud,M.L., 1986. Detecting and avoiding oxygen deficient sea water by brown shrimp *Penaeus aztecus* (Ives) and white shrimp *P. setiferus* (Linnaeus). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 98, 283-292.

Rosas,C., Martinez,E., Gaxiola G., Díaz,E., Brito,R. y L. Soto. 1998. Effect of dissolved oxygen on the energy balance and survival of *Penaeus setiferus* juveniles. Mar Ecol Prog Ser 174, 67-75.

Rosas,C., Martinez,E., Gaxiola,G., Brito,R., Sanchez,A. y L.A Soto. 1999. The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Linnaeus) juveniles. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 234(1), 41-57.

Rosas,C., Sanchez,A., Diaz-Iglesia,E., Brito,R., Martinez,E., Soto,L.A., 1997. Critical dissolved oxygen level to *Penaeus setiferus* and *Penaeus schmitti* postlarvae (PL sub(10-18)) exposed to salinity changes. Aquaculture 152(1-4), 259-272.

Rosas C, Cuzon G, Pasa micual C, Gaxiola G, López N, Maldonado T y P. Domingues, 2007. Energy balance of *Octopus maya* fed crab and artificial diet. Mar Biol. 152:371–378.

Rosas, C., Tut, J., Baeza, J., Sánchez, A., Sosa, V., Pascual, C., Arena, L., Domingues, P., y G. Cuzon, 2008. Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. Aquaculture 275: 291–297.

Semmens, J.M., Pecl, G.T., Villanueva, R., Jouffre, D., Sobrino, I., Wood, J.B y P. R. Rigby. 2004. Understanding octopus growth: patterns, variability and physiology. Marine and

Freshwater Research 55: 367 – 377.

Segawa, S y R. T. Hanlon. 1988. Oxygen consumption and ammonia excretion rates in *Octopus maya*, *Loligo forbesi* and *Lolliguncula brevis* (Molluscs: Cephalopoda). Mar Behav Physiol 13:389–400.

Segawa, S y A. Nomoto. 2002. Laboratory growth, feeding, oxygen consumption and ammonia excretion of *Octopus ocellatus*. Bull Mar Sci 71:801–813

Solis, M.J. 1967. Aspectos biológicos del pulpo *Octopus maya* Voss y Solis. Inst. Nacional Investig. Biol. Pesqueras (México), Publicación Num. 18, 90 p.

Storey, K.B., Storey, J.M., 1978. Energy metabolism in the mantle muscle of the squid *Loligo pealeii*. J. Comp. Physiol. 123, 169-175.

Van Heukelem, W.F. 1976. Growth, bioenergetics and life-span of *Octopus cyanea* y *Octopus maya*. PhD. Dissertation. University of Hawaii, Honolulu, HI.

Van Heukelem, W.F. 1977. Laboratory maintenance, breeding, rearing and biomedical research potential of the Yucatan octopus (*Octopus maya*). *Lab. Anim. Sci.* 27, 852-859.

Vidal, E., DiMarco, P., Wormuth, J. y G. Lee. 2002. Influence of temperature and food at availability on survival, growth and yolk utilization in hatchlings squid. Bull. Mar. Sci, 71 (2): 915 – 931.

Villanueva, R., 1995. Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus vulgaris* from hatchling to settlement. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52, 2639-2650.

Von Bertalanffy, L. 1957. Quantitative laws in metabolism and growth, Q. Rev. Bioi. 32: 217-231.

Wells, M. J. y A. Clarke. 1996. Energetics: the costs of living and reproducing for an individual cephalopod. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 351: 1083 - 1104.

Wells MJ, O'Dor RK, Mangold K y J. Wells J. 1983. Feeding and metabolic rate in octopus. *Mar Behav Physiol* 9:305–317.

Zeuthen. E. 1953. Oxygen uptake as related to body size in organisms. *Quart. Rev.Biol.* 28, 1-12.

CONCLUSIONES GENERALES

La presente investigación utilizó como caso de estudio dos poblaciones de juveniles hermanos de *Octopus maya* obtenidos en condiciones de cultivo y mantenidos a temperatura y alimentación controlada, centrándose en el análisis de variabilidad del crecimiento durante las etapas tempranas con énfasis en el tamaño inicial. Para ello el diseño experimental se basó en la categorización arbitraria del tamaño inicial en función del peso alcanzado a los 15 días de edad. Se aplicaron modelos de crecimiento basado en los modelos mixtos del tipo GLMM (*Generalized Linear Mixed Models*), marcadores moleculares derivados de la aplicación del Despliegue Diferencial y mediante el Balance de Energía para obtener un análisis integral del proceso. A continuación se presentan las principales conclusiones obtenidas bajo estas condiciones:

Juveniles tempranos de *Octopus maya* provenientes de una misma madre (hermanos) y mantenidos bajo condiciones de ambiente controlado (temperatura estable y alimentación fija) son capaces de crecer a la misma tasa independiente de las categorías de tamaño inicial especificadas en función del peso alcanzado a los 15 días de edad; sin embargo, el peso final alcanzado a los 75 días de edad depende del peso a los 15 días. La especie experimenta un crecimiento exponencial hasta los 105 días de edad ($27^{\circ}\text{C} \pm 1$), siendo definido por la función $\text{Peso} = 0.11 * \text{Exp}^{(0.03 * \text{edad})}$, permitiendo la incorporación de una estructura de varianza, derivada del análisis realizado con los modelos mixtos del tipo GLMM, definir la relación entre la variación del peso y la edad ($\epsilon_i \sim N(0, \sigma^2 [\text{tiempo}_i]^{2\delta}; \delta = 0.2042)$).

En relación a las respuestas genéticas, las categorías de tamaño inicial establecidas no condicionaron la expresión de transcritos (ET) y analizadas por medio del Despliegue Diferencial. La edad, sin embargo, fue identificada como el principal factor que generó niveles de ET. Un total de trece secuencias fueron analizadas derivadas de BD a los 15, 70 y 105 días de edad. Éstas presentaron una alta homologación con microsatelites de otras especies de octópodos principalmente; al igual que mensajeros de genes que codifican para enzimas metabólicas, promotores de crecimiento, proteínas musculares y enzimas asociadas a respuestas de estrés obtenidas en otras taxas. Se propone el uso de las secuencias como potenciales marcadores moleculares asociados al crecimiento para *O. maya*.

En términos energéticos, el crecimiento exponencial de *O. maya* demanda 60% y 90% de I para individuos de 15 y 105 días de edad respectivamente. La respiración es mayor en individuos de menor edad (13%, 15 días), disminuyendo en función de la edad hasta alcanzar

valores inferiores al 5% de I (105 días. A su vez, los juveniles de esta especie son regulan su la asimilación y energía bruta de asimilación de energía en función del peso corporal y la edad de los individuos. Es así como juveniles de menor edad (ejemplo: 15 días) presentan una elevada variación en el uso de la energía de I ($79.58\% \pm 8.76$; máx.=89.01%; mín. 57%), estabilizándose a partir de los 45 días a un peso corporal de 1 gramos (> 90%). g

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

André, J., Pecl, G., Semmens, J.M, y E. Grist. 2008. Early life-history processes in benthic octopus: Relationships between temperature, feeding, food conversion, and growth in juvenile *Octopus pallidus*. *J. Exp. Mar. Bio. Eco. Ser.*, 354: 81-92.

Andre, J., Pecl, G., Grist, E., Semmens, J., Haddon, M y Leporati, S. 2009. Modelling size-at-age in wild immature female octopus: a bioenergetics approach. *J. Exp. Mar. Bio. Eco. Ser.*, 159-174.

Boletzky, S.v. 1997. Developmental constraint and heterochrony: a new look at offspring size in cephalopods mollusc. *GEOBIOS, M.S.n° 21*: 267 – 275.

Boletzky, S. y R.T Hanlon, R. 1983. A review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod molluscs. *Memoirs of the National Museum Victoria*. 147, No. -14.

Caddy, J. F., y P.G Rodhouse. 1998. Cephalopod and groundfish landings: evidence for ecological change in global fisheries? *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 8: 431-444.

Calow, P. 1987. Fact and theory-an overview. En; P.R. Boyle (Ed.), *Cephalopod Life Cycles Vol. II*. Academic Press, London. 351 – 365.

Cortez, T., A.F. González y A. Guerra, 1999. Growth of cultured *Octopus mimus* (Cephalopoda: Octopodidae). *Fisheries Research*, 40(1): 81-90.

DeRusha, R., J.W Forsythe y R.T. Hanlon, 1987. Laboratory growth, reproduction and life span of the pacific pigmy octopus, *Octopus digueti*. *Pacific Science*, Vol. 41 (1-4): 104 – 121.

Domingues, P., López, N., Muñoz, J.A, Maldonado, T., Gaxiola, G. y C. Rosas. 2007. Effects of an artificial diet on growth and survival of the Yucatan octopus, *Octopus maya*. *Aquac. Nutr.* 13:1 – 9.

FAO. 2005. Global production statistics 1950 – 2005. UN Food Agric. Org., disponible en: www.fao.org.

Farias, A., Uriarte, I., Hernandez, J., Pino, S., Pascual, C., Caamal, C., Domingues, P y C. Rosas. 2009. How size relates to oxygen consumption, ammonia excretion, and ingestion rates in cold (*Enteroctopus megalocyathus*) and tropical (*Octopus maya*) octopus species. Mar. Biol., 156 (8): 1547-1558.

Forsythe, J.W. 1984. *Octopus joubini* (Mollusca:Cephalopoda): a detail study of growth through the full cycle in a closed seawater system. Journal of Zoology 202: 393-417.

Forsythe, J.W., 1993. A working hypothesis of how seasonal temperature change may impact the field growth of young cephalopods. En: Okutani, T., R.K. O'Dor, & T. Kubodera (eds.), *Recent Advances in Cephalopod Fisheries Biology* Tokay University Press, Tokyo. Pp. 133-143.

Forsythe, J.W. 2004. Accounting for the effects of temperature on squid growth in nature: from hypothesis to practice. Mar. Freshw. Res., 55:331 – 339.

Forsythe, J.W. y R, T., Hanlon. 1988. Effect of temperatura on laboratory growth , reproduction and life span of *Octopus bimaculoides*. Marine Biology 98: 369-379.

Forsythe, J.W. y W.F Van Heukelem. 1987. Growth. En: Boyle, P.R. (Ed.), *Cephalopods Life Cycle*. Vol. II. Academic Press, London.pp. 135 - 156.

Hanlon, R. y W. Forsythe. 1985. Advances in the laboratory culture of octopuses for biomedical research. Lab Anim Sci 35:33–40.

Gjedrem, T., 2000. Genetic improvement of cold-water fish species. Aquaculture Research 31: 25– 33.

Gjerdea, B., Terjesenb, B.F., Barrb, Y., Leinb, I. y I.Thorland. 2004. Genetic variation for juvenile growth and survival in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Aquaculture 236: 167–177.

Hanlon, R.T y J.B. Messenger. 1996. Cephalopod behavior. Cambridge Univ. Press, Cambridge. Pp. 232

Hanlon, R.T, Turk, P. y P. Lee. 1991. Squid and cuttlefish mariculture: An update perspective. J. Ceph. Biol. 2(1), 31-40.

Hernandez Flores, A., Solis Ramirez, M., Espinoza Mendes, J.C., Aguilar, R.M. y F.R, Gil. 2001. Pulpo. En: Sustentabilidad y Pesca Responsable en México. Evaluación y Manejo. INP /SAGARPA. 1111 pp.

Houlihan, DF, McMillan DN, Agnisola C, Genoino IT y L. Foti, 1990. Protein synthesis and growth in *Octopus vulgaris*. *Mar. Biol.*, 106:251-259.

Iglesias, J., Sánchez, F.J., Bersano, J.G.F., Carrasco, J.F. , Dhont, J., Fuentes, L., Linares, F., Muñoz, J.L., Okumura, S., Roo, J., van der Meeren, T., Vidal, E.A.G y R. Villanueva. 2007. Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture* 266: 1-15.

Koueta, N. y E. Boucaud-Camou. 1999. Food intake and growth in reared early juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* . 240 : 93-109.

Kröger, B. 2005. Adaptive evolution in Paleozoic coiled cephalopods. *Paleobiology* 31:253_68.

Lee P. G. 1994. Nutrition of cephalopods: fueling the system. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 25, 35-51.

Leporati, S., Pecl, G. T. y J.M Semmens. 2007. Cephalopod hatchling growth: effects of initial size and seasonal temperatures. *Mar. Biol.* 151:1375 – 1383.

Lipinski, M.R., Butterworth, D.S., Augustyn, C.J., Brodziak, J.K.T., Christy, G., des Clers, S., Jackson, G.D., O'Dor, R.K., Pauly, D., Purchase, L.V., Roberts, M.J., Roel, B.A., Sakurai, Y. y W. H.H. Sauer. 1998. Cephalopod fisheries: a future global upside to past overexploitation of

living marine resources?. S. Afr. J. Mar. Sci. 20: 463-469.

Lucas, A. 1993. Bioenergétique Des Animaux Aquatiques. Masson, Paris.

Moxica, C., Linares, F., Otero, J. J., Iglesias, J. y F. J. Sánchez. 2002. Cultivo intensivo de paralarvas de pulpo, *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, en tanques de 9 m³. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 18 (1-4): 31-36.

Moltschaniwskyj, N. 2004. Understanding the process of growth in cephalopods. Mar. Fresh. Res, 55:379 – 386.

Pauly, D. 1998 . Why squid, though not fish, may be better understood by pretending they are. S. Afr. J. Mar. Sci. 20: 47 - 58.

Pecl, G. y N.A. Moltschaniwskyj. 1999. Somatic growth processes: how are they affected by captivity? .Proc. Royal Society London B 266:1-7

Pecl G, Steer MA y K. Hodgson. 2004. The role of hatchling size in generating the intrinsic size-at-age variability of cephalopods: extending the Forsythe hypothesis. Mar. Fresh. Res. 55 :387 – 394.

Pérez, M., López, D., Aguila, K y M.L González. 2007. Feeding and growth in captivity of the octopus *Enteroctopus megalocyathus* Gould, 1852. Aquac. Res. 37: 550 – 555.

Pfister, C.A y F.R Stevens. 2003. The genesis of size variability in plants and animals. Ecology 83 (1): 59 – 72.

Pörtner, H-O y S. Zielinski. 1998. Enviromental constraints and the physiology of performance in squid. S. Afr. J. Mar. Scie. 20: 207-221.

Rocha, F., Guerra, A. y A. González. 2001. A review of reproductive strategies in Cephalopods. Biol. Rev., 76: 291-304.

Rosas C, Cuzon G, Pasa micual C, Gaxiola G, López N, Maldonado T y P. Domingues, 2007. Energy balance of *Octopus maya* fed crab and artificial diet. Mar. Biol. 152:371–378.

Rosas, C., Tut, J., Baeza, J., Sánchez, A., Sosa, V., Pascual, C., Arena, L., Domingues, P., y G. Cuzon, 2008. Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. Aquaculture 275: 291–297.

SAGARPA, 2005. Evaluación de la población de pulpo (*octopus maya*) en la Península de Yucatán 2005. Informe pp. 10. Acceso directo:
<http://www.inp.sagarpa.gob.mx/Dictámenes/dictamen%20de%20pulpo%202005.pdf>).

Segawa, S y R. T. Hanlon. 1988. Oxygen consumption and ammonia excretion rates in *Octopus maya*, *Loligo forbesi* and *Lolliguncula brevis* (Molluscs: Cephalopoda). Mar Behav Physiol 13:389–400.

Semmens, J.M., G.T. Pecl, R. Villanueva, D. Jouffre, I. Sobrino, J.B. Wood y P.R. Rigby. 2004. Understanding octopus growth: patterns, variability and physiology. Marine and Freshwater Research 55, 367 – 377.

Solis, M.J. 1967. Aspectos biológicos del pulpo *Octopus maya* Voss y Solis. Inst. Nacional Investig. Biol. Pesqueras (México), Publicación Num. 18, 90 p.

Solis-Ramirez, M.J. 1994. La pesquería del pulpo del golfo de México y Caribe mexicano. Err. Atlas Pesquero y Pesquerías Relevantes de México. C.D. Multimedia. Secretaria de Pesca, INP. CENEDIC. Univ. de Colima, México.

Solis-Ramirez, M.J. 1997. The Octopus maya fishery of the Yucatán Peninsula. Err. Lang, Hochberg & Ambrose (Eds.). The Fishery and Market Potential of Octopus in California, CMSC: pp. 1-10.

Smith, M.S y L. A. Fuiman. 2003. Causes of growth depensation in red drum, *Sciaenops ocellatus*, larvae. Environmental Biology of Fishes 66: 49 – 60.

Stefánsson, M.O., Imsland, A.K., Jenssen, M.D, Jonassen, S.O., Stefansson y R. Fitzgerald.

2000. The effect of different initial size distributions on the growth of Atlantic halibut. *J. Fish. Biol.* 56: 826 – 836.

Umino, T., Arai, K. y H. Nakagawa. 1997. Growth performance in clonal carp, *Carassius langsdorfii*. Effects of genetic difference and feeding history. *Aquaculture*. 155: 271 – 283.

Van Heukelem, W.F. 1976. Growth, bioenergetics and life-span of *Octopus cyanea* y *Octopus maya*. PhD. Dissertation. University of Hawaii, Honolulu, HI.

Van Heukelem, W.F. 1977. Laboratory maintenance, breeding, rearing and biomedical research potential of the Yucatan octopus (*Octopus maya*). *Lab. Anim. Sci.* 27, 852-859.

Van Heukelem, W.F., 1983. *Octopus maya*. En: Boyle, P.R. (Ed.), *Cephalopods Life Cycles*. Vol I. Species Accounts. Academic Press, London. pp. 311-323.

Villanueva, R. y M. Norman, 2008. Biology of the planktonic stages of benthic octopuses. *Oceanography and marine biology: an annual review*, 2008, 46, 105-202

Young, R. E., y R. F. Harman. 1988. “Larva”, “paralarva” and “subadult” in cephalopod terminology. *Malacologia*, 29: 201–208.

Wells, M. J. y A. Clarke. 1996. Energetics: the costs of living and reproducing for an individual cephalopod. *Phil.Trans. R. Soc. Lond. B* 351: 1083 - 1104.