



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**AISLAMIENTO DE MICROSÁTELITES Y FLUJO
GENÉTICO EN *Dosidicus gigas* (D`Orbigny, 1835) ENTRE EL
GOLFO DE CALIFORNIA Y LA COSTA OCCIDENTAL DE
LA PENÍNSULA DE BAJA CALIFORNIA, MÉXICO.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biología Marina)

p r e s e n t a

Ana María Millán Márquez

La Paz, B.C.S. Junio del 2010

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 21 del Mes de Junio del 2010, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

" AISLAMIENTO DE MICROSATÉLITES Y FLUJO GENÉTICO EN *Dosidicus gigas* (Orbigny, 1835) (CEPHALOPODA: OMMASTREPHIDAE) ENTRE EL GOLFO DE CALIFORNIA Y LA COSTA OCCIDENTAL DE LA PENÍNSULA DE BAJA CALIFORNIA, MÉXICO."

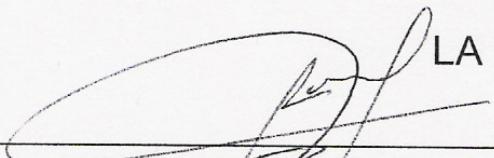
Presentada por el alumno:

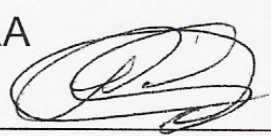
Ana María Millán Márquez

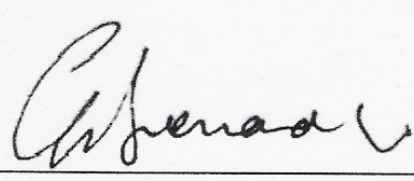
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biología Marina**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA


DR. CÉSAR A. SALINAS ZAVALA
DIRECTOR DE TESIS


DR. PEDRO CRUZ HERNÁNDEZ
CO-TUTOR


PHD. GIACOMO BERNARDI
CO-TUTOR


DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**AISLAMIENTO DE MICROSATÉLITES Y FLUJO GENÉTICO EN *Dosidicus gigas*
(Orbigny, 1835) (CEPHALOPODA: OMMASTREPHIDAE) ENTRE EL GOLFO DE
CALIFORNIA Y LA COSTA OCCIDENTAL DE LA PENÍNSULA DE BAJA
CALIFORNIA, MÉXICO.**

Ana María Millán Márquez

Director de tesis

Dr. César A. Salinas Zavala

Asesores

Dr. Pedro Cruz Hernández

Dr. Giacomo Bernardi

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

La Paz, México

2010



Conformación del Comité

Comité Tutorial y Comité Revisor de Tesis

Dr. César A. Salinas Zavala - Director de tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Pedro Cruz Hernández
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Ph.D. Giacomo Bernardi
Universidad de California, Santa Cruz.

Jurado de Examen

Dr. César A. Salinas Zavala

Dr. Pedro Cruz Hernández

Ph.D. Giacomo Bernardi

Suplente

Dr. Ricardo Pérez Enríquez



RESUMEN

El calamar gigante, *Dosidicus gigas* (D'Orbigny, 1835) es una especie semioceánica y nerítica endémica del Pacífico Oriental, distribuida desde el norte de California E.U.A (43° N) hasta el sur de Chile (20°S), incluyendo el Golfo de California. Habita aguas desde la superficie hasta 1000 metros de profundidad. Particularmente dentro del Golfo de California (México), es considerado uno de los recursos pesqueros más importantes, sin embargo el manejo de la pesquería de éste cefalópodo enfrenta varias dificultades entre las que se encuentran: un corto ciclo de vida, tasa de crecimiento desigual y falta de caracteres morfométricos y/o merísticos debido a la extrema plasticidad morfológica. Con el fin de determinar si existe estructura genética poblacional en *D. gigas*, se aislaron y caracterizaron 10 microsátélites mediante una librería genómica enriquecida. La mayoría de éstos loci presentaron una baja amplificación y un déficit de heterocigotos atribuido a la alta frecuencia de alelos nulos. Finalmente se usaron cinco loci para determinar la variabilidad intraespecífica en tres localidades dentro del Golfo de California y dos en la costa occidental de la península de California durante diferentes años (2005 y 2008). La prueba de F_{ST} pareado dió como resultado que los individuos de *D. gigas* dentro del Golfo de California y en la costa oeste de la península de Baja California pertenecen a la misma población. No hay relación entre la distancia geográfica y la genética (Prueba de Mantel) y la mayor variabilidad esta relacionada con la temporalidad, apoyada por un análisis de varianza molecular (AMOVA) entre grupos de diferentes años (2005 y 2008).

Palabras clave: *Dosidicus gigas*, genética poblacional, microsátélites.



ABSTRACT

The jumbo squid, *Dosidicus gigas* (D'Orbigny, 1835) is a neritic and semioceanic species endemic from the eastern Pacific, ranging from north California, U.S.A (43°N) to south Chile (40°S) including the Gulf of California, inhabiting from the surface, down to 1000 meters depth. Particularly in the Gulf of California, is highly exploited where it's considered one of the most important natural resources of the area. The management of this fishery faces many problems associated with the biology of the species as short life cycle, uneven growth rates and the lack of morphometric and/or meristic characters due to extreme plasticity, makes the studies neither accurate nor consistent. To assess the genetic structure of *D. gigas* 10 microsatellites were isolated and characterized, through an enriched genomic library. Most of the loci exhibited low amplification yield and heterocigosity deficit due to a high null allele frequency. Finally five loci were used to evaluate the intraspecific variability in tree localities in the Gulf and two in the west coast of the peninsula of California, from different years (2005 and 2008). F_{ST} paired test points that *D.gigas* in the sampled area is conformed by a single population, and there is no relationship between the geographic and genetic distance (Mantel test), the highest variability is temporal as indicated by the AMOVA between groups of different years.

Key words: *Dosidicus gigas*, population genetics, microsatellites.



Dedicado a las personas que me apoyaron y se empeñaron a
que terminara... por fin.

A mi familia (Colombia)

A mi nueva familia (Jose y Violeta)



AGRADECIMIENTOS

Escribiendo esta parte de la tesis en cuando siento que realmente he terminado, y no por ser lo último es lo menos importante porque sin la ayuda, colaboración, apoyo y compañía de todas estas personas e instituciones que mencionaré no habría FIN. Por comenzar agradezco al departamento de Posgrado del CIBNOR y CONACYT (Beca No 290527) por recibirme y apoyarme económicamente durante éstos años de estudio. A mi comité tutorial por todos los consejos, comentarios y apoyo incondicional para que ésta tesis culminará de la mejor manera posible.

A los integrantes del laboratorio de Genética Acuícola por su colaboración en el desarrollo de la genoteca. A todos los que conforman el grupo de Cefalópodos por su ayuda para integrarme en el maravilloso mundo del calamar gigante. Quiero agradecer a los laboratorios Long Marine de la Universidad de California y al de la NOAA Southwest Fisheries Science Center, Fisheries Ecology Division en Santa Cruz (EEUU) por su colaboración durante la caracterización y genotipificación de microsatélites. Por el apoyo económico para la estancia en el extranjero gracias a la Beca Mixta y al proyecto UC-Mexus.

Por el comienzo de ésta tesis, que fue hace mucho tiempo, quiero agradecer a Adrián Munguía por introducirme en una dimensión desconocida para mí, la genética. A mis compañeros de maestría no solo le doy las gracias por su paciencia y compañía durante estos dos años de estudio sino también por incluirme en el gran equipo de tocho... bi o



tricampeones??

Gracias...

a mis amigos, Polito y Angie simplemente por estar ahí siempre. A mi familia en Colombia porque ellos dieron los medios, las fuerzas y el apoyo para salir al extranjero y cumplir mis sueños. A mi nueva familia, Jose porque con él pase por las fases de este trabajo y gracias a sus consejos, apoyo o sencillamente su compañía salí libremente de todas. A Violeta porque su sonrisa es un motivo más para seguir adelante.



CONTENIDO

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
AGRADECIMIENTOS	6
CONTENIDO	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABLAS	11
INTRODUCCIÓN	12
JUSTIFICACIÓN	18
ANTECEDENTES	19
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	25
1. Aislamiento y caracterización de marcadores microsatélites en <i>Dosidicus gigas</i>.	25
1.1 Elaboración de la genoteca	25
1.2 Identificación de microsatélites y diseño de iniciadores.....	31
1.3 Genotipificación	33
2. Análisis poblacional en <i>Dosidicus gigas</i>	34
2.1 Área de estudio y muestreo.....	34
2.2 Amplificación de microsatélites y genotipificación.....	36
2.3 Variación genética intrapoblacional en <i>D. gigas</i>	36
2.3.4 Incidencia de alelos nulos y errores durante la genotipificación.....	38
2.4 Variación genética interpoblacional en <i>D. gigas</i>	38
RESULTADOS	39
1. Aislamiento y caracterización de marcadores microsatélites en <i>Dosidicus gigas</i>.	39
1.1 Análisis de clonas y secuencias.....	39



1.2	Iniciadores y pruebas de amplificación	40
1.3	Amplificación de microsatélites y genotipificación.....	42
2.	Análisis genético poblacional en <i>Dosidicus gigas</i>.....	43
2.1	Variación genética intrapoblacional en <i>D. gigas</i>	43
2.2	Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW)	46
2.3	Prueba de desequilibrio de ligamiento (LD).....	47
2.4	Incidencia de alelos nulos y errores durante la genotipificación.	47
2.5	Variación genética interpoblacional en <i>D. gigas</i> en el Pacífico Noreste de México.	48
	DISCUSIÓN	51
1.	Aislamiento y caracterización de microsatélites.....	51
2.	Variabilidad genética en <i>D. gigas</i>	53
3.	Déficit de heterocigotos: artefactos o característica biológica.....	55
4.	Variación interpoblacional y flujo genético en <i>D. gigas</i>	58
5.	Implicaciones para el manejo de la pesquería en el noreste del Pacífico mexicano	61
	CONCLUSIONES	63
	BIBLIOGRAFÍA	65
	ANEXO I	73



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. a. Rango de distribución de <i>D. gigas</i> , distribución original con sombra oscura y posterior expansión en colores claros. b. <i>D. gigas</i> capturado en California central por Ed Ricketts en 1935 (Foto de R. Buchsbaum)	13
Figura 2. Genotipo de los adaptadores SuperSNX24 Fw (Forward) en la parte superior y Rv (Reverse) parte inferior (Tomada de Glenn y Schable, 2005).....	26
Figura 3. Localidades de muestreo en el Golfo de California y en la costa occidental de la península de Baja California. Fotos; izquierda: Pescador de calamar Santa Rosalía, derecha: B/O Francisco de Ulloa.....	35
Tabla IV. Figura 4. Secuencias con microsatélites y el éxito del enriquecimiento por sonda.....	39
Figura 5. Valores promedio en la estimación de número de alelos (N_a) y riqueza alélica (AR) por localidad y año en <i>D. gigas</i>	43
Figura 6. Valores promedio de homocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) por localidad y año en <i>D. gigas</i>	44
Figura 7. Distribución de homocigotos del locus DGI_90 en cada clase de tamaño. Localidad Santa Rosalía 2008. Programa MicroChecker.	48
Figura 8. Regresión lineal entre distancias genéticas y geográficas en <i>D. gigas</i>	49



LISTA DE TABLAS

Tabla I. Parámetros utilizados en el diseño de iniciadores.....	32
Tabla II. Localidades, año, región y número de muestras de <i>D. gigas</i>	35
Tabla III. Relación del número de clonas secuenciadas.....	39
Tabla IV. Figura 4. Secuencias con microsatélites y el éxito del enriquecimiento por sonda.....	39
Tabla V. Motivos de repetición y tipo de microsatélites encontrados en las secuencias.....	40
Tabla VI. Iniciadores y condiciones de PCR para diez loci analizados en individuos de <i>Dosidicus gigas</i> . T_a , temperatura de alineamiento; n , número de individuos; N_a , número de alelos; H_o , heterocigosidad observada; H_e , observada y esperada. (*) Valores significativos.....	41
Tabla VII. Amplificación cruzada en dos especies de omastréfidos. N indica el número de muestras, número de alelos y entre paréntesis el rango de tamaño en pares de bases, - producto de PCR no detectado o ilegible.....	42
Tabla VIII. Variabilidad genética en cinco loci de <i>D. gigas</i> . Indicando el número de individuos por locus (n), número de alelos (N_a), riqueza alélica (AR), número de alelos efectivos (N_e), heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) y valores promedio.....	45
Tabla IX. Estimación de EHW y coeficiente de endogamia (F_{IS}). Heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) y el valor de P . * Desviación significativa del EHW después del ajuste secuencial de Bonferroni.....	46
Tabla X. Frecuencia de alelos nulos por población y locus. Se muestra el estimador de Brookfield 1 (r) y el valor de significancia (P).....	47
Tabla XI. Valores de F_{ST} pareados entre localidades debajo de la diagonal. Encima de la diagonal se muestra el valor de significancia, (* $p < 0.05$). SR: Santa Rosalía, ISPM: Isla San Pedro Mártir, GS: Golfo Sur.....	49
Tabla XII. Análisis de varianza molecular entre los años 2005 y 2008 en <i>D. gigas</i> . (*) Valor de P significativo.....	50



INTRODUCCIÓN

Los estudios poblacionales en cefalópodos se han incrementado en los últimos 25 años dirigidos por la importancia de éstos invertebrados en la ecología marina y como un recurso pesquero global, sin embargo existen dificultades para definir poblaciones o *stocks* y resolver confusiones sistemáticas básicas debido a la alta plasticidad morfológica que poseen (Carvalho y Hauser, 1994). Las características del ciclo de vida de la mayoría de los cefalópodos, tales como reproducción temprana y/o semélpara, poco o ausencia de solapamiento generacional, rápido crecimiento, corto ciclo de vida, vulnerabilidad a la depredación y a la variabilidad ambiental, resultan en amplias fluctuaciones interanuales en abundancia y distribución (Boyle y Boletzky, 1996), generando que el manejo de la pesquería sea difícil o en algunos casos inadecuado.

El calamar gigante, *Dosidicus gigas* (D'Orbigny, 1835) es considerado uno de los más grandes y abundantes de la familia Ommastrephidae, subfamilia Ommastrephinae (Nesis, 1985). La característica morfológica más conspicua que define tanto al género como a la especie es la prolongación de los extremos distales de los brazos en filamentos largos y delgados con 100 a 200 ventosas pequeñas estrechamente agrupadas. Es una especie semioceánica y nerítica endémica del Pacífico Oriental, habita aguas desde la superficie hasta los 1000 metros de profundidad (Nigmatullin et al., 2001), aunque recientemente se ha registrado a profundidades mayores (Gilly, 2010 comunicación personal). Está distribuida desde el norte de California E.U.A hasta el sur de Chile, comúnmente entre



30°N y 20-25°S, dentro del área ecuatorial alcanza su mayor rango meridional hasta los 140°W (Nesis, 1983).

En la última década se ha registrado un incremento en la abundancia y frecuencia de esta especie en el norte, evidenciando una aparente expansión en su rango de distribución, incluyendo Canadá y Alaska (Zeidberg y Robinson, 2007; Field et al., 2007; Cosgrove, 2005; Fig. 1). Algunos autores han relacionado esta expansión con los cambios a largo plazo de la zona de mínimo oxígeno asociados con el cambio climático global (Stramma et al., 2008) y al decremento de los depredadores (Zeidberg y Robinson, 2007).

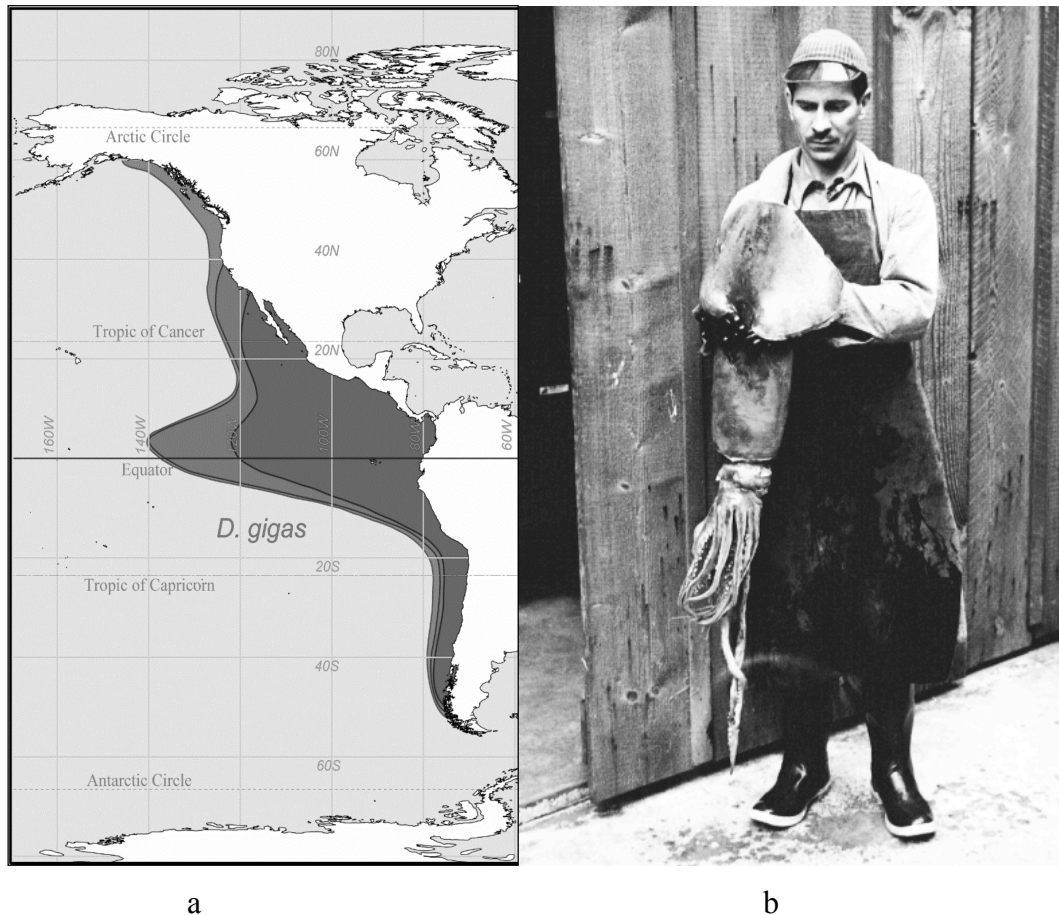


Figura 1. a. Rango de distribución de *D. gigas*, distribución original con sombra oscura y posterior expansión en colores claros. b. *D. gigas* capturado en California central por Ed Ricketts en 1935 (Foto de R. Buchsbaum)



El comportamiento adaptativo de *D. gigas*, y la extensión en su distribución la catalogan como “ especie invasora”, éstas especies se adaptan en respuesta a nuevo ambiente biótico y abiótico, y a las presiones selectivas del nuevo hábitat (Mooney y Cleland, 2001), por ello es importante conocer la estructura poblacional de estas especies y la variación genética en el tiempo que se pudiera dar por éstos procesos adaptativos a nuevas zonas geográficas.

Las mayores concentraciones de *D. gigas* se pueden encontrar en Perú, Chile y en el Golfo de California (México), donde es considerado un importante recurso pesquero. Actualmente existe un vacío de información relacionado con la dificultad para comprender de manera detallada la estructura y dinámica poblacional debido a la alta plasticidad morfológica y a las tasas de crecimiento desiguales (Pierce y Guerra, 1994). Los análisis morfométricos de las capturas de calamar gigante en el Golfo de California precisaron la ocurrencia de un solo *stock* con cinco cohortes en donde cada una, además de realizar migraciones independientes, es diferente tanto en las tasas de crecimiento como de mortalidad (Ehrhardt et al., 1983; Ramirez y Klett-Traulsen, 1985). Una fuerte variabilidad espacial y temporal en la estructura poblacional, principalmente por talla y estado de madurez, a lo largo del Golfo de California ha sido previamente sugerida (Morales-Bohórquez et al., 2001; Markaida y Sosa-Nishizaki, 2001; Bazzino et al., 2007) y apoya la composición de la multicohorte en la población.

La migración de individuos *D. gigas* del Pacífico Mexicano hacia el interior del Golfo de California debido a los requerimientos alimentarios del calamar ha sido propuesta (Erhardt, 1991), sin embargo aun no ha sido confirmada. Recientemente, durante los eventos



climáticos El Niño, el calamar gigante ha sido capturado fuera del Golfo de California y en algunas localidades al sur de la península, en donde habitualmente no existía una pesquería dirigida al recurso, por ello se hace importante conocer el flujo genético entre los diferentes sitios de pesca para dar una mejor pauta al manejo del recurso.

Marcadores moleculares: Microsatélites

En los últimos años, y gracias al avance vertiginoso de las técnicas moleculares, se han usado y desarrollado múltiples marcadores genéticos para evaluar la variación genética de las especies (Awise, 2004). Estas herramientas integran lo que hoy se conoce como marcadores moleculares y se define como proteínas, genes o fragmentos de ADN que permiten distinguir entre diferentes taxa, así como entre poblaciones, incluso a un nivel más detallado de líneas familiares e individuos (Hancock, 1999). Los marcadores moleculares usados en estudios de genética poblacional idealmente deben ser neutros, es decir que la frecuencia de alelos y genotipos de una población con un apareamiento al azar no están sujetos a selección, y cualquier modificación al “equilibrio de Hardy-Weinberg”, estará dada por mutación, migración y/o deriva genética (Frankham et al., 2005). Actualmente los más utilizados son los derivados directamente del ADN, los cuales muestran un elevado polimorfismo y cuyo desarrollo ha permitido la caracterización genética de una amplia diversidad de organismos.

En la década de los ochenta con el desarrollo de la “Reacción en Cadena de la Polimerasa” (PCR por sus siglas en inglés, *Polimerase Chain Reaction*) se amplificaron regiones específicas de ADN, una de éstas conocidas como microsatélites, secuencias cortas de una



a seis pares de bases (pb) repetidas una tras otra (Jarne y Lagoda, 1996) que presentan un elevado polimorfismo debido a diferencias en el número de repeticiones para cada variante alélica.

Aplicación de los microsatélites

Recientemente los microsatélites han llegado a ser los marcadores moleculares de mayor aplicación en diversas ramas de la genética debido a que presentan múltiples ventajas. Se encuentran en gran número en el genoma eucariótico, basándose en su composición están distribuidos de manera diferencial en las regiones intrónicas y exónicas, su herencia es de tipo mendeliano y son marcadores codominantes, lo que permite la visualización de su herencia tanto materna como paterna (Toth et al., 2000).

Una de las características más importantes de estos marcadores es la gran variabilidad que presentan, y aunque el origen de este gran polimorfismo aun permanece en debate, se ha propuesto que el mecanismo de mutación de estas regiones implica el doblamiento de las hebras de ADN durante la replicación (Schlötterer y Tautz, 1991). La tasa de mutación (adición o reducción de unidades de repetición) es muy alta, ha sido estimada entre 10^{-3} y 10^{-5} locus por generación, lo que conlleva a una elevada variación alélica (polimorfismo) y elevados niveles de heterocigosidad (Hancock, 1999). Además de los atributos señalados anteriormente, otra de las ventajas que se ha observado en éstas regiones, es la variación que presentan aún en poblaciones con bajos niveles de diferenciación genética, medida por otros métodos moleculares como aloenzimas y ADN mitocondrial. Por tanto permiten



observar diferencias y estructuras poblacionales antes no detectadas, como en el caso de los cefalópodos (Shaw et al., 1999).

La mayor desventaja en la aplicación de microsatélites es la necesidad de aislar *de novo* para las especies en las cuales van a ser utilizados por primera vez. Al encontrarse usualmente en regiones no codificantes donde la tasa de mutación es más alta que en las codificantes, el uso de iniciadores (*primers*) universales de secuencias conservadas, empleados efectivamente para ADN mitocondrial, resulta problemático en la identificación de microsatélites (Zane et al., 2002). Además el alto polimorfismo observado en una especie no es garantía para hallar la misma variación en especies relacionadas especialmente cuando incrementa la distancia evolutiva (Zane et al., 2002). Actualmente para cefalópodos existen varios registros de microsatélites aislados (Shaw, 1997; Shaw y Pérez-Losada, 2000; Reichow y Smith, 2001; Shaw y Adcock, 2002), sin embargo todos ellos corresponden a especies filogenéticamente distantes del calamar gigante. *D. gigas* pertenece a un género monoespecífico, y difícilmente alguno de estos loci podría amplificar y ser útil en un análisis poblacional.

Este trabajo de tesis está enfocado en primera instancia en el aislamiento y caracterización de microsatélites en *D.gigas* y pruebas de amplificación cruzada; para posteriormente aplicarlos para el análisis de la diversidad y estructura genética en tres localidades dentro del Golfo de California y dos en la costa oeste de la península de Baja California.



JUSTIFICACIÓN

A raíz del aumento en el interés comercial de *D. gigas* y a la alta variabilidad en la estructura poblacional detectada en estudios anteriores (morfológicos), para un manejo adecuado del recurso es importante identificar si hay una estructura genética y, en dado caso el flujo genético que exista entre las localidades de pesca. Por ser una especie con un periodo corto de vida y al ser considerada altamente migratoria, se pretende evaluar la variabilidad y estructura genética de los individuos de *D. gigas* tanto en el Golfo de California como en la Costa Occidental de la península de Baja California (Pacífico Mexicano) por medio de la aplicación de microsatélites, marcadores moleculares altamente variables, con el fin de complementar el conocimiento que se tiene de la población a partir de datos morfológicos.



ANTECEDENTES

Los humanos se han interesado por los cefalópodos desde tiempos remotos, descripciones de un gran número de estos organismos han sido reconocidos desde Aristóteles (~330A.C.) en *Historia Animalium*. En tiempos medievales hasta el final del siglo XIX, los cefalópodos fueron catalogados como criaturas marinas hostiles capaces de atacar barcos, por ello, muchos escritores y artistas se han inspirado en estos organismos para la creación de novelas o películas de ciencia-ficción. Los cefalópodos comprenden a los pulpos, calamares y sepias y se encuentran dentro del phylum Mollusca, sin embargo las características anatómicas y biológicas que no comparten con otros moluscos los hacen una clase (Cephalopoda) muy divergente.

A partir de las expediciones oceánicas profundas realizadas por los rusos, existen un gran número de publicaciones, el Dr. Kir Nesis (1934-2003) fue un pionero y renombrado experto en la biología, sistemática y biogeografía de cefalópodos, y junto con otros autores contribuyó al conocimiento extenso de la familia Ommastrephidae (Zuev et al., 1975; Nesis, 1979; Korzun et al., 1979). Particularmente para *D. gigas* aborda aspectos generales de su reproducción, distribución, alimentación, edad y crecimiento en Perú y Chile (Nesis, 1970; 1983). Recientemente Nigmatullin et al. (2001) realizan una revisión sobre la biología del calamar gigante, indicando la presencia de tres grupos intraespecíficos que se distinguen por la talla de madurez (longitud del manto LM) de machos y hembras. Calamares de talla pequeña (130-260mm machos y 140-340mm hembras) se localizan predominantemente cerca del área ecuatorial, los representantes de tamaño mediano



presentan un solapamiento con el grupo anterior, tanto en talla (240-420mm machos y 280-600mm hembras) como en la distribución. En las periferias norte y sur del rango de distribución de la especie, se encuentran frecuentemente el grupo de calamares de tamaño grande (>400-500mm en machos y 550-1200mm en hembras).

Sobre la biología reproductiva es notable el trabajo de Tafur y Rabi (1997) en Perú, donde señalan que *D. gigas* es una especie con múltiples desoves y crecimiento entre cada uno de ellos, o posiblemente la existencia de dos poblaciones con diferentes tallas de madurez. En el Golfo de California, Markaida et al. (2003) encontraron una predominancia de machos maduros con respecto a hembras maduras sugiriendo que el centro del Golfo de California es un área de alimentación y no de reproducción.

Al interior del Golfo de California se han realizado diversos estudios sobre la pesquería y biología del calamar gigante, Ehrhardt (1983, 1991) realiza un esquema de migración y analiza aspectos reproductivos y de alimentación durante 1980, concluyendo que el *stock* de *D. gigas* esta compuesto por multicohortes, que migran separadamente con una tasa de crecimiento desigual y por lo tanto posiblemente con características biológicas diferentes. Bazzino et al. (2007) reportan una alta variabilidad interanual en la estructura de tallas en la región central del Golfo de California, inducida principalmente por cambios en las condiciones ambientales, como eventos El Niño.

Los estudios de diferenciación genética son particularmente útiles en el entendimiento del movimiento de los genes a lo largo de la población y permiten realizar inferencias de cómo



las fuerzas microevolutivas han interactuado a través de la historia de vida de las especies (Bohonak, 1999). Hasta la fecha existen pocos trabajos utilizando herramientas moleculares en el estudio de la estructura poblacional *D. gigas*. El primero de ellos, Sandoval-Castellanos et al. (2007), mediante RAPDS (*Random Amplified Polymorphic DNA*), y recientemente Staff et al. (en prensa) con NADH subunidad 2 deshidrogenasa, encontraron resultados similares en cuanto a la estructura genética. Ambos detectaron moderados niveles de variabilidad genética entre grupos del hemisferio norte y sur, atribuidos principalmente a condiciones ambientales y corrientes asociadas al ecuador. No detectaron ninguna variación temporal. Los autores recomiendan que por las limitaciones de esos marcadores los patrones de migración de cada grupo, tanto en el norte como en el sur, son aspectos que pueden ser detalladamente estudiados con marcadores moleculares de fina escala.

Actualmente se han desarrollado microsatélites en cefalópodos con la idea de usarlos en investigaciones de estructuración poblacional e identificación de *stocks* para el manejo pesquero de especies como: *Octopus vulgaris* (Greatorex et al., 2000), *Sepia officinalis* (Shaw y Pérez-Losada, 2000) y *Loligo forbesi* (Shaw et al., 1999). En *L. forbesi*, una especie con una elevada movilidad, a través de un estudio con microsatélites se logró detectar estructura poblacional en su distribución a lo largo de la plataforma continental del Noreste del Atlántico, la cual no había sido detectada anteriormente con aloenzimas (Brierley et al., 1993) y ADN mitocondrial (Norman et al., 1994). Por otro lado, en el calamar de California (*Loligo opalescens*) analizando microsatélites se ha observado una



baja estructuración poblacional debido a un elevado flujo genético entre poblaciones de Norte América (Reichow et al., 2001).

Dentro la familia Ommastrephidae el género *Illex* ha sido el más estudiado utilizando microsatélites (Adcock et al., 1999b) mientras que para la subfamilia Ommastrephinae son pocos los trabajos realizados, entre ellos Dillane et al. (2005) en el Atlántico Este y el Mediterráneo sugiere la presencia de tres poblaciones genéticamente aisladas de *Todaropsis eblanae*. El otro trabajo realizado en la familia es el aislamiento de once loci-microsatélites en la especie *Todarodes pacificus* (Iwata et al., 2008).



HIPÓTESIS

Debido a que la variabilidad poblacional encontrada con datos morfométricos, la especie de calamar gigante *Dosidicus gigas* está conformada por diferentes poblaciones entre el Golfo de California y la costa occidental de la península de Baja California.

OBJETIVO GENERAL

Identificar marcadores moleculares microsatélites en el genoma del calamar gigante *Dosidicus gigas* para aplicarlos en el estudio de la estructura genética entre localidades del Golfo de California y la costa occidental de la península de Baja California.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar marcadores moleculares tipo microsatélite en el genoma de *Dosidicus gigas* a partir de la construcción de genotecas enriquecidas.
2. Caracterizar las regiones microsatélites del genoma del calamar gigante basándose en la composición nucleotídica, número de repeticiones y abundancia.



3. Estandarizar la amplificación de microsatélites a partir del diseño de pares de iniciadores para cada microsatélite, tanto en *D. gigas* como por en otras especies de la subfamilia (amplificación cruzada).

4. Estimar la variabilidad y nivel de diferenciación genética entre tres localidades del Golfo de California y dos en la Costa Occidental de la Península de Baja California.

5. Estimar el nivel de diferenciación genética temporal en dos localidades del Golfo de California en los años 2005 y 2008.

6. Determinar el flujo genético de *Dosidicus gigas* entre localidades de muestreo en caso de existir diferencias genéticas.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aislamiento y caracterización de marcadores microsatélites en *Dosidicus gigas*.

Para el desarrollo de marcadores microsatélites de *D. gigas* se construyó una librería genómica enriquecida siguiendo el protocolo propuesto por Glenn y Schable (2005). El uso de estos marcadores ayudará a comprender la estructura intraespecífica de *D. gigas* y permitirá comprobar si existen patrones de segregación y migración al interior de la especie.

1.1 Elaboración de la genoteca

1.1.1 Extracción de ADN genómico

Se extrajo ADN de 20 individuos de *D. gigas* colectados dentro y fuera del Golfo de California mediante el protocolo estándar de fenol/cloroformo (Sambrook et al., 1989). El ADN obtenido fue resuspendido en 100ul de agua Milli-Q (desionizada), se visualizó en un gel de agarosa (1.2%), teñido con bromuro de etidio, empleando un marcador de masa molecular (20ng/ul) para observar la concentración de ADN.

1.1.2 Digestión de ADN

Los fragmentos de ADN deben tener una longitud de aproximadamente 500pb para posteriormente insertarlos en una bacteria. Las enzimas de restricción son una manera fácil de fragmentar el ADN, reconociendo secuencias específicas. En este trabajo se realizó la digestión con dos enzimas diferentes *RsaI* y *Sau3A* utilizando la siguiente reacción:



Tampón de ligasa (10x)	2.5 µl
Enzima (1 µM)	2.5 µl
ADN genómico	10 µl

La calidad y el tamaño del producto de la digestión se observaron en un gel de agarosa 1.2% utilizando una escalera de peso molecular de 100pb (Invitrogen).

1.1.3 Unión de adaptadores

Los fragmentos de ADN obtenidos de la digestión se unieron a los adaptadores SuperSNX24 Fw y SuperSNX24+4P Rv (Fig. 2), este último fosforilado en el extremo 5'. Los adaptadores permiten la amplificación por PCR de los fragmentos y además contienen los sitios de restricción que facilitan la unión de los fragmentos de ADN al vector durante la clonación.



Figura 2. Genotipo de los adaptadores SuperSNX24 Fw (Forward) en la parte superior y Rv (Reverse) parte inferior (Tomada de Glenn y Schable, 2005).

La conformación de los adaptadores en doble cadena es el paso inicial, por ello se mezclaron volúmenes iguales de cantidades equimolares de cada adaptador y se añadió NaCl para obtener una concentración final de 100 mM. Ésta solución se calentó a 95 °C por cinco minutos en un bloque térmico y se dejó enfriar a temperatura ambiente para la formación de doble cadena de los adaptadores. Posteriormente se realizó la siguiente solución:



Adaptadores SuperSNX ds	14 μ l
Xmn1	3 μ l
Tampón de ligasa (10x)	7 μ l
Ligasa ADN	6 μ l

De este volumen se tomaron 15 μ l y se mezclaron con el ADN previamente digerido, se dejó incubar a 16°C durante toda la noche. Transcurrido éste tiempo y para comprobar que la ligación de los adaptadores al ADN fue exitosa, se realizó una PCR con las siguientes condiciones:

Tampón de PCR (10x)	5 μ l
MgCl ₂ (25mM)	4 μ l
dNTPs (2.5mM)	2 μ l
SuperSNX 24 (10 μ M)	2.5 μ l
Taq polymerasa DNA	0.3 μ l
dH ₂ O	34 μ l
ADN ligado	3 μ l

El programa de PCR comenzó con un periodo inicial de desnaturalización a 95°C por 2 minutos, seguido de 20 ciclos a 95°C por 60s, 60°C por 20s y 72°C durante 90s y finalmente un periodo de extensión a 15°C durante 10 minutos. El producto de PCR se observó en un gel de agarosa (1.5%) empleando una escalera de peso molecular de 100 pb.

1.1.4 Enriquecimiento con sondas

El objetivo de este procedimiento es aislar fragmentos de ADN con secuencias de microsatélites complementarias a las sondas utilizadas y separarlas de los demás fragmentos. En este trabajo se utilizaron dos dinucleótidos CT₁₅ y GT₁₅ y dos tetranucleótidos CTGT₁₀ y GATA₁₀ marcados con biotina en el extremo 5'.



- a. PCR: por cada enriquecimiento (sonda) en un tubo de 0.2ml adicionar

Solución 2x Hyb	25µl
Sonda biotilada (1mM)	10µl
ADN unido a los adaptadores	10µl
Agua Mq	5µl

El ciclo de PCR consistía en un periodo inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 min, bajando rápidamente a 70 °C y disminuyendo 0.2 °C cada 5 segundos durante 99 ciclos (i.e. 70°C por 5 s, 69.8°C por 5 s, 69.6°C por 5 s,...) hasta llegar a 50°C por 10 min. Luego disminuyendo 0.5°C cada 5 segundos durante 20 ciclos (i.e. 50°C por 5 s, 49.5 por 5 s, 49 por 5 s,...llegando a 40°C) y finalmente bajar rápidamente a 15°C.

- b. Lavado de perlas: antes de finalizar la reacción de PCR, se tomaron 50µl de perlas en solución (Dynabeads M-280, Invitrogen) y se colocaron en un tubo de 1.5ml. Se adicionaron 250 µl de TE y se agitó. Las perlas se capturaron usando una unidad magnética (MPC) y se realizó un lavado más con TE y dos más con la solución de lavado 1x Hyb. Finalmente las perlas se resuspendieron en 150 µl en solución 1x Hyb.
- c. A cada enriquecimiento (producto de PCR) se le añadieron 150 µl de perlas magnéticas en solución previamente lavadas y se resuspendió la mezcla. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente en un agitador orbital a baja velocidad durante 30 minutos.
- d. Las perlas se capturaron con la MPC removiendo el sobrenadante. Las perlas se sometieron a los siguientes lavados.



- e. Dos lavados con 400 μ l de SSC 2x, 0.1% SDS, capturando las perlas con la MPC y removiendo el sobrenadante.
- f. Dos lavados con 400 μ l de SSC 1x, 0.1% SDS. Inmediatamente después de cada lavado las soluciones fueron calentadas en un *termblock* durante 3 minutos a 65 °C y 68 °C respectivamente en el caso de los dinucleótidos. Para los tetranucleótidos se emplearon diferentes temperaturas, 55 °C después del primer lavado y 58°C después del segundo.
- g. A cada muestra se agregaron 200 μ l de TLE, se agitaron e incubaron a 95 °C por cinco minutos. Transcurrido el tiempo el sobrenadante fue resuspendido en un tubo nuevo, y se añadieron 22 μ l de acetato de sodio 3M, 444 μ l de alcohol etílico 95%. La solución resultante fue colocada en el congelador a -20 °C por 12 horas.
- h. Pasadas las 12 horas se centrifugó la solución por 10 minutos a 13000 rpm, el sobrenadante fue eliminado y se agregaron 0.5 ml de etanol al 70%.
- i. Se centrifugó nuevamente por 10 minutos a 13000 rpm, se removió el sobrenadante cuidadosamente y el restante fue introducido en una centrifuga de vacío para eliminar cualquier residuo de etanol.
- j. El precipitado (ADN) fue resuspendido en 25 μ l de TLE para su hidratación.

1.1.5 PCR de fragmentos de ADN enriquecido

Se incrementó la concentración de ADN por medio de PCR utilizando el iniciador superSNX24 (forward) ligado anteriormente y con la siguiente reacción:



Tampón de PCR (10x)	2.5 µl
MgCl ₂ (25mM)	1 µl
DNTPs (2.5mM)	1.5 µl
SuperSNX 24 (10 µM)	1.3 µl
Taq polimerasa DNA	0.4 µl
DH ₂ O	15.3 µl
ADN ligado	3 µl

El ciclo de PCR consistió en una desnaturalización de 95°C por 2 minutos, 35 ciclos a 95°C por 20s, 60°C por 20s y 72°C durante 90s y finalmente una extensión a 72°C por 30 minutos. Posteriormente se mantuvo a 15°C. El producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1.2% para verificar la amplificación, esperando un barrido alrededor de 500pb.

1.1.6 Inserción de los fragmentos de ADN a un vector de clonación

Los productos de PCR fueron ligados a un plásmido bacteriano pCR 4TOPO siguiendo las especificaciones del proveedor (TOPO TA Cloning kit for sequencing, Invitrogen).

1.1.7 Transformación

En esta etapa de la clonación incluye la incorporación del vector con el inserto (fragmentos ADN del calamar) a una bacteria *E. coli* TOPO TA por medio de choque térmico y siguiendo el protocolo proporcionado en el kit (Invitrogen). También fueron utilizadas células electrocompetentes creadas manualmente siguiendo el protocolo de Shama y Schimke, (1996) y Tung y Chow (1995).

La detección de colonias recombinantes que tuvieran el inserto se efectuó con placas de Agar LB y ampicilina (50mg/ml), y se verificaron tomando una muestra con un palillo



estéril de cada colonia y sumergiéndolo en 5 μ l de agua milli-Q (estéril). Posteriormente las clonas fueron amplificadas con iniciadores universales M13 (Invitrogen).

1.2 Identificación de microsatélites y diseño de iniciadores

1.2.1 Secuenciación

Se seleccionaron para secuenciar aquellas clonas cuyo tamaño oscilara entre los 300 y 1500 pb y tuvieran una concentración de ADN adecuada (aprox. 40ng/ μ l). La secuenciación se realizó utilizando los cebadores universales M13 en ambas direcciones y con el analizador genético ABI 3730, Universidad de California, Berkeley (DNA Sequencing Facility).

1.2.2 Análisis de secuencias y diseño de iniciadores

La edición e identificación de clonas con microsatélites se realizó con el programa Sequencher v. 4.5. (Gene Code Corporation). Se determinó el tipo y número de repeticiones de cada microsatélite y se seleccionaron las secuencias que tuvieran regiones flanqueantes adecuadas para el diseño de iniciadores.

El diseño se realizó mediante el programa Primer 3 v0.4.0 (Rozen y Skaletsky, 2000) siguiendo las condiciones estándar para la amplificación (Tabla I). Se analizaron por medio del programa OligoCalc v3.25 (Oligonucleotide Properties Calculador) las propiedades físicas de los iniciadores, como la formación de estructuras secundarias, dímeros y heterodímeros para garantizar la amplificación del ADN del tejido de calamar.



Tabla I. Parámetros utilizados en el diseño de iniciadores.

Parámetro de los iniciadores	
Mínima longitud	18 pb
Máxima longitud	22 pb
Mínima Tm	55 °C
Máxima Tm	60 °C
Varianza Tm	± 1-2 °C
Mínimo GC	35 %
Máximo GC	65 %
Mínimo longitud del producto	100 pb
Máxima longitud del producto	400 pb

1.2.3 Estandarización y pruebas de amplificación mediante PCR

Se probaron los iniciadores diseñados y se optimizó la amplificación de ADN en ocho muestras de *D. gigas* pertenecientes a regiones geográficas diferentes (Golfo de California, costa occidental de la península de Baja California, costa de California y Chile). La estandarización se realizó con diferentes diluciones de ADN (1: 10, 1:15 y 1:20) y dos programas de PCR:

- a. *High-High*: periodo inicial de desnaturalización a 94 °C (5 min), posteriormente 10 ciclos a 94 °C (30 s), 58 °C (45 s) y 72 °C (45 s), seguido por 20 ciclos a 94 °C (30 s), 54 °C (45 s) y 72 °C (45 s) y finalmente una extensión a 72 °C por 10 min.
- b. *Low-High*: periodo inicial de desnaturalización a 94 °C (5 min), posteriormente 10 ciclos a 94 °C (30 s), 56 °C (45 s) y 72 °C (45 s), seguido por 20 ciclos a 94 °C (30 s), 54 °C (45 s) y 72 °C (45 s) y finalmente una extensión a 72 °C por 10 min.



La amplificación cruzada se evaluó en dos especies pertenecientes a la misma subfamilia de *D. gigas* (Ommastrephinae). Dos individuos de la especie *Eucleoteuthis luminosa* y siete de *Stenoteuthis oualaniensis*.

Se realizó una comparación de las secuencias e iniciadores obtenidos con la base de datos del GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando la herramienta BLAST (por *Basic Local Alignment Search Tool*).

1.3 Genotipificación

La visualización de los genotipos de *D. gigas* se realizó mediante dos técnicas:

- a) Geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 5% y urea al 7.5M a 250v, 100ma y 90wtts, y se revelaron con *Sybr gold* para visualizarse en el escáner FMBIO III Multi Viex (HITASHI) usando una escalera de peso molecular de 10 pb.
- b) Analizador de fragmentos ABI Prism 3730 (Applied Biosystems) y sistema de marcado por fluorescencia siguiendo la metodología propuesta por Schuelke (2000). La variación y patrón alélico de los microsatélites amplificados fue caracterizado mediante el programa GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems). Éste programa determina el tamaño y visualiza los fragmentos de ADN (microsatélites) mediante picos.



2. Análisis poblacional en *Dosidicus gigas*

2.1 Área de estudio y muestreo

En campo se tomaron muestras de 2 cm de longitud del extremo distal de uno de los brazos de *D. gigas* y fueron preservadas en tubos Eppendorf con alcohol al 80%. Algunos datos morfométricos fueron registrados para posteriores análisis en el laboratorio.

Para este estudio se analizaron muestras de tres localidades dentro del Golfo de California; Santa Rosalía (años 2005 y 2008), Isla San Pedro Mártir (2008) y Golfo Sur (2005, 2008) (Fig. 3). De Noviembre a Mayo la pesquería se concentra cerca de la Bahía de Guaymas, Sonora mientras que en Santa Rosalía, B.C.S. el periodo de pesca es de Mayo a Octubre. La flota está conformada por botes abiertos de 20 a 27 pies de eslora (pangas). La faena se realiza durante toda la noche con dos o tres pescadores abordo utilizando como arte de pesca una potera de 40 cm. de longitud.

Para la costa occidental de la península de Baja California se obtuvieron muestras de *D. gigas* durante cruceros del Programa de Investigación del CICESE, conocido como Investigaciones Mexicanas de la Corriente de California (IMECOCAL) a bordo del B/O Francisco de Ulloa durante el año 2008. Las estaciones en donde se colectó la especie fueron nombradas Norte y Centro de la Costa occidental de la Península de California (NCO y CCO respectivamente) (Fig. 3).

En total se obtuvo tejido de *D. gigas* de cinco localidades, tres dentro del Golfo de California y dos en la costa occidental de la península de Baja California (Tabla II).

Tabla II. Localidades, año, región y número de muestras de *D. gigas*.

Localidad	Región	N
Santa Rosalía 2008	Golfo de California	115
Santa Rosalía 2005	Golfo de California	52
Isla San Pedro Mártir 2008	Golfo de California	29
Golfo Sur 2008	Golfo de California	36
Golfo Sur 2005	Golfo de California	42
Norte Costa occidental 2008	Costa Occidental de la Península	57
Centro Costa Occidental 2005	Costa Occidental de la Península	63

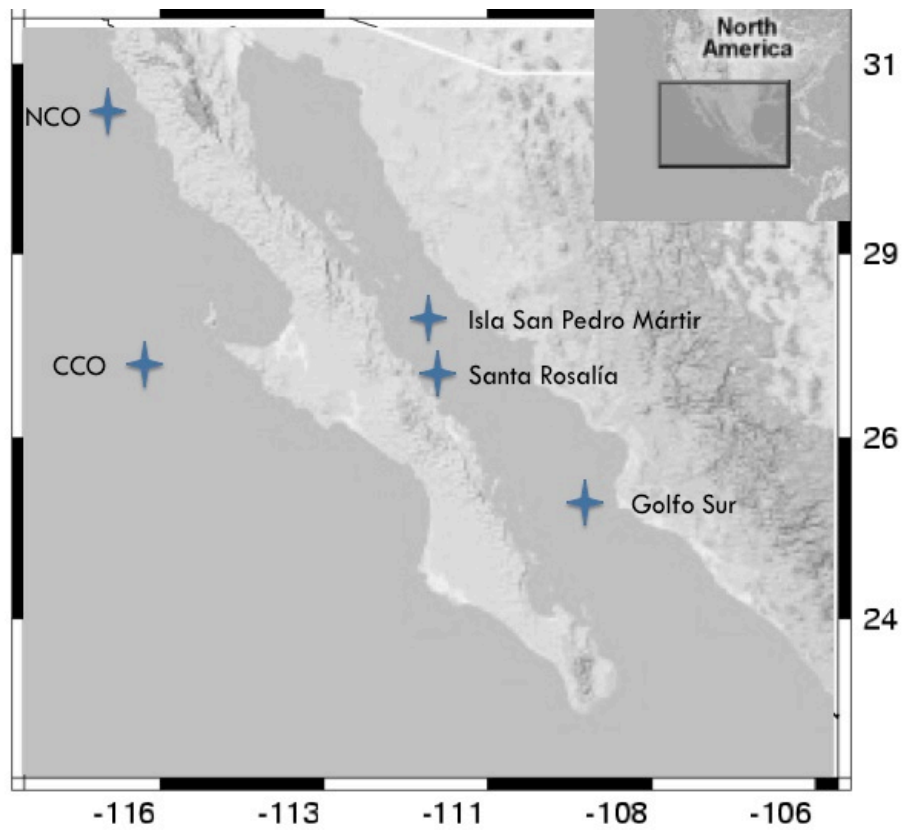


Figura 3. Localidades de muestreo en el Golfo de California y en la costa occidental de la península de Baja California. Fotos; izquierda: Pescador de calamar Santa Rosalía, derecha: B/O Francisco de Ulloa



2.2 Amplificación de microsatélites y genotipificación

La amplificación de la totalidad de las muestras colectadas se realizó con los 10 loci-microsatélites previamente caracterizados, empleando el programa y ciclos de PCR descritos en la sección 1.2.3 en Materiales y Métodos. El polimorfismo y el patrón alélico fue determinado mediante el programa GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems) utilizando el marcado por fluorescencia (sección 1.3 en Materiales y Métodos)

2.3 Variación genética intrapoblacional en *D. gigas*

2.3.1 Diversidad genética

La variación intrapoblacional de la especie se evaluó mediante los estimadores de diversidad genética expresadas por número de alelos por locus (N_a), número de alelos efectivos (N_e), heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) y el índice de fijación (F_{IS}), éstos fueron calculados con los programas GenAlEx 6.3 (Peakall y Smouse, 2006) y GENEPOP 4.0 (Raymond y Rousset, 1995). La riqueza alélica (AR) por población fue determinada mediante el método de rarefacción incorporado en el programa HP-Rare 1.0 (Kalinowsky, 2005), el cual considera el tamaño mínimo de la muestra.

Mediante una prueba de Wilcoxon se determinó si existían diferencias significativas en la variabilidad genética (N_a , AR, H_e , H_o) entre pares de poblaciones mediante el programa estadístico JMP v5 (SAS Institute Inc., 2002)



2.3.2 Prueba de desequilibrio de ligamiento

El desequilibrio de ligamiento (LD) fue determinado entre pares de loci mediante una prueba exacta de Fisher, utilizando el programa GENEPOP v4.0 (Raymond y Rousset, 1995), el cual trabaja bajo los algoritmos de cadenas de Markov y fue ajustado a 10,000 permutaciones con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Esta prueba nos indica si hay dependencia entre genotipos de los loci en una población.

2.3.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg.

El equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) se basa en la ausencia de cualquier fuerza evolutiva que cambie la frecuencia alélica y genotípica en una población, mientras se mantenga un apareamiento aleatorio entre los individuos que la conforman (Hartl y Clark, 1989).

Este fundamento de la genética poblacional fue analizado por locus y población mediante una prueba exacta de Fisher empleando el método de las cadenas de Markov con 10,000 dememorizaciones, 5,000 *batches* (lotes) y 1,000 iteraciones por cada lote utilizando el programa GENEPOP 4.0 (Raymond y Rousset, 1995). El déficit o exceso de heterocigotos fue evaluado a partir del coeficiente de endogamia F_{IS} de Wier y Cockerman (1984), por población y por locus arrojado por el mismo programa. El valor de significancia de esta prueba ($\alpha=0.05$) fue corregido con el ajuste secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).



2.3.4 Incidencia de alelos nulos y errores durante la genotipificación

Se evaluó si las desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg pudieran estar relacionadas a errores en la asignación de genotipos utilizando el programa MicroChecker v 2.2.3 (Oosterhout et al., 2004).

2.4 Variación genética interpoblacional en *D. gigas*

La identificación de la estructura poblacional en el calamar gigante se valoró espacial y temporalmente. Se estimó la estructura genética a partir del índice de fijación F_{ST} de manera global y pareada entre localidades mediante el programa ARLEQUIN v.3 (Excoffier, 2005), incluyendo diferentes años (2008 y 2005). El cálculo del estadístico F permite determinar las diferencias genéticas entre localidades, en donde los valores de $F_{ST} = 0$ indican que no hay diferenciación genética entre ambas localidades, mientras que valores significativamente diferentes a cero son un indicativo de estructura genética.

Se realizó una corrección de Bonferroni para ajustar el valor crítico de significancia en las pruebas múltiples (Rice, 1989). Para observar si existe una relación entre la distancia genética y geográfica se realizó una prueba de Mantel (aislamiento por distancia) en el programa ISOLDE de GENEPOP v4.0 (Raymond y Rousset, 1995).

Se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) mediante el programa ARLEQUIN v.3 (Excoffier, 2005), en donde las localidades con $F_{ST} = 0$, es decir que no evidenciaran una diferenciación genética, se agruparon con el fin de determinar la dimensión de la variabilidad genética contenida dentro y entre las diferentes agrupaciones.



RESULTADOS

1. Aislamiento y caracterización de marcadores microsatélites en *Dosidicus gigas*.

1.1 Análisis de clonas y secuencias

De la librería genómica realizada para la identificación de microsatélites en *D. gigas* se seleccionaron 113 clonas para secuenciar con un tamaño entre los 300 y 1500pb. De las secuencias obtenidas, 34 de ellas presentaban varias inespecificidades imposibilitando la lectura (Tabla III).

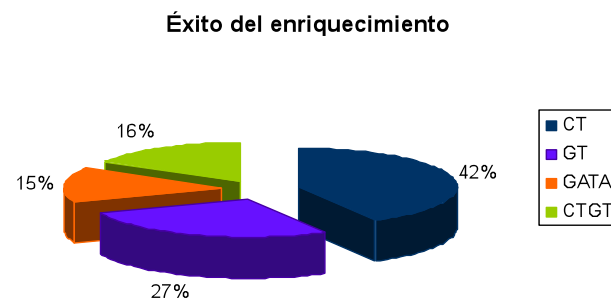
Tabla III. Relación del número de clonas secuenciadas.

Sonda	Secuencias ilegibles	Secuencias legibles	TOTAL
CT ₁₅	23	30	53
GT ₁₅	8	13	21
GATA ₁₀	3	22	25
CTGT ₁₀	0	14	14
TOTAL	34	79	113

El número de secuencias con microsatélites fue diferencial con respecto a la sonda utilizada durante el enriquecimiento. Se obtuvo mayor cantidad de secuencias con microsatélites con la sonda CT₁₅ (42%), sin embargo pudo verse influenciado por el número de clonas que se secuenciaron (Tabla IV y Fig. 4). El éxito total del enriquecimiento fue del 48.6%.

Tabla IV. Figura 4. Secuencias con microsatélites y el éxito del enriquecimiento por sonda.

Sonda	Clonas secuenciadas	Secuencias con microsatélites
CT ₁₅	53	23
GT ₁₅	21	15
GATA ₁₀	25	8
CTGT ₁₀	14	9
TOTAL	113	55





El tipo de repetición más abundante fueron los dinucleótidos seguido por los tetranucleótidos, aunque mostraron una amplia variedad con relación al tipo de microsatélites (perfecto o imperfecto), la mayor proporción encontrada fue la de los perfectos (Tabla V).

Tabla V. Motivos de repetición y tipo de microsatélites encontrados en las secuencias.

Repetición	CT₁₅	GT₁₅	CTGT₁₀	GATA₁₀	TOTAL (%)
Dinucleótidos					
Perfectos	11	11		1	41.82
Interrumpidos	6	4	1	2	23.64
Compuestos			1		1.82
Compuesto Interrumpido	3		2		9.09
Trinucleótidos					
Perfectos	1			1	3.64
Compuestos			1		1.82
Tetranucleótidos					
Perfectos	2		2	1	9.09
Interrumpidos			1	2	5.45
Compuestos			1		1.82
Compuesto Interrumpido			1	1	3.64

1.2 Iniciadores y pruebas de amplificación

De las 55 secuencias con microsatélites se seleccionaron 25 para el diseño de iniciadores ya que muchas de ellas no tenían una región flanqueante adecuada. El inconveniente más común fue no encontrar un espacio suficiente entre el microsatélite y la secuencia del vector y adaptador SuperSNX24.

Se diseñaron un total de 18 iniciadores que parecían ser aptos para la amplificación de los microsatélites, de los ocho individuos de calamar en las que fueron probados, la amplificación solo fue exitosa en cuatro de ellos, todos pertenecientes al Golfo de California, México. Los iniciadores DGI_78, DGI_79 y DGI_80 se descartaron debido a que

bajo los diferentes ciclos y condiciones de los programas de PCR no amplificaron en ninguno de los individuos. En los otros cinco loci la señal no fue suficiente para ser leída por el programa Genemapper, presentando picos difíciles de interpretar.

El polimorfismo de los 10 loci se determinó en 30 individuos de una sola población colectados en Santa Rosalía dentro del Golfo de California. Los genotipos fueron visualizados con geles de poliacrilamida, y aunque fue difícil la interpretación y asignación de alelos, los loci-microsatélites evidenciaron tener un polimorfismo de moderado a alto (9 a 23 alelos), sin embargo la amplificación no fue exitosa para todos los individuos en los loci DGI_66, DGI_75 y DGI_61. La heterocigosidad observada (H_o) fue menor a la esperada (H_e) en la mayoría de los microsatélites, presentando una desviación al equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) en varios de ellos (Tabla VI).

Tabla VI. Iniciadores y condiciones de PCR para diez loci analizados en individuos de *Dosidicus gigas*. T_a , temperatura de alineamiento; n , número de individuos; N_a , número de alelos; H_o , heterocigosidad observada; H_e , observada y esperada. (*) Valores significativos.

Locus	Motivo de Repetición	Secuencia iniciador (5'-3')	T_a (°C)	n	Rango de Tamaño (pb)	N_a	H_e	H_o
DGI11	(TC) ₂₈ (AC) ₇	F: ttcatggcttacatcttgctg R: gtcgtagaggcgaagaaacg	57	27	153-260	22	0.944	0.63*
DGI75	(TA) ₇ (TCA) ₄ TT(ATC) ₅	F: ctctctcattgaccgattacg R: aaaggccttcgctcagcagt	56	23	93-142	23	0.929	0.61*
DGI61	(TATC) ₂₀	F: aatcgattctattctgttcagc R: agaggaaattgatctcgattg	58	27	155-256	18	0.917	0.33*
DGI71	(TG) ₇	F: cagaatgggcacgtatgc R: ttcccttcaactcacttgctc	56	24	130-170	10	0.842	0.33*
DGI66	(AC) ₈	F: catggaccgatcccttaattc R: gatcattgagcatgcaggtg	56	25	133-165	9	0.763	0.6*
DGI90	(AC) ₁₇	F: ttcatgctcattccctttcac R: tctgtgccaatgatcattctg	56	26	111-160	16	0.873	0.46*
DGI10	(GTCT) ₆ ...(TCGT) ₁₀	F: catccttctatctgtgtcta R: agttaagaatgaaagtgagtc	58	26	248-299	12	0.857	0.81

Locus	Motivo de Repetición	Secuencia iniciador (5'-3')	Ta (°C)	n	Rango de Tamaño (pb)	N _a	He	Ho
DGI85	(GAT) ₂₀	F: atggaaggagttgggaaagg R: gataagcggttcatcattcaaa	56	26	193-262	17	0.923	0.77*
DGI8	(GA) ₁₂ ...(GA) ₇	F: gccatatgtgaaagacatggtg R: ctagcaactgttcgccaactc	57	26	183-258	16	0.786	0.65
DGI68	(CT) ₇	F: gacacatttgatccattgtaa R: gcagcgtaggtaagtgcaa	58	27	192-285	17	0.855	0.33*

Sin modificar las condiciones de PCR, la amplificación cruzada fue exitosa en cuatro de los 10 loci aislados (Tabla VII) en dos especies pertenecientes a la misma subfamilia de *D. gigas*.

Tabla VII. Amplificación cruzada en dos especies de omastérfidos. N indica el número de muestras, número de alelos y entre paréntesis el rango de tamaño en pares de bases, - producto de PCR no detectado o ilegible.

Locus	<i>Sthenoteuthis oulaniensis</i> N=7	<i>Eucleoteuthis luminosa</i> N=2
DGI66	-	1 (143)
DGI68	3 (175-191)	2 (203-235)
DGI85	3 (189-210)	-
DGI11	2 (140-208)	-

1.3 Amplificación de microsatélites y genotipificación

De los 10 loci aislados para la especie, cinco amplificaron en la mayoría de los individuos, con los cinco restantes no se obtuvo datos (alelos) suficientes para incluirlos en el análisis de la estructura genética poblacional de *D. gigas*. Probablemente el método de marcaje indirecto utilizado (ver Schuelke, 2000) interfirió en la amplificación de algunos de los microsatélites aislados. Aunque esta técnica a sido utilizada con éxito en diferentes organismos (Carvalho-Costa et al., 2008; Abbot y Double, 2003; Freitas et al., 2006) probablemente la adición del iniciador universal M13 al final del iniciador *forward* de *D. gigas* pudo interferir en la fase de extensión durante la PCR. En la amplificación sin



marcaje con fluorescencia, para visualizar los genotipos con geles de poliacrilamida, los 10 loci amplificaron en la mayoría de los individuos.

2. Análisis genético poblacional en *Dosidicus gigas*

2.1 Variación genética intrapoblacional en *D. gigas*

Con los cinco loci analizados en todas las localidades, se encontró un número promedio de alelos entre 17 y 25 (Tabla 8). En la Fig. 5 se aprecia la similitud en los valores promedio de número de alelos (N_a) y riqueza alélica (AR) entre localidades.

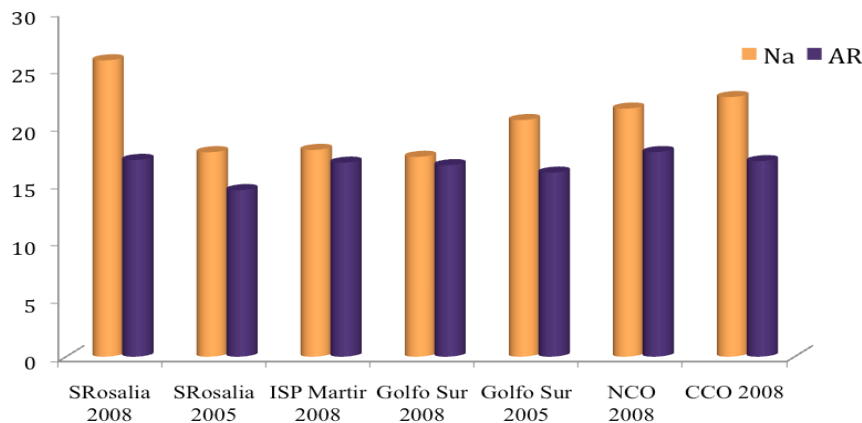


Figura 5. Valores promedio en la estimación de número de alelos (N_a) y riqueza alélica (AR) por localidad y año en *D. gigas*.

Santa Rosalía 2008 presentó un número superior de alelos debido a que se analizó una mayor cantidad de individuos (Tabla VIII), sin embargo al estimar la riqueza alélica, la cual hace un ajuste considerando un tamaño de muestra reducido, los valores resultaron similares entre las localidades oscilando entre 14.50 (Santa Rosalía 2005) y 17.81 (NCO 2008). En promedio la heterocigosidad esperada (H_e) presentó valores altos, sin embargo la



heterocigosidad observada (Ho) fue inferior a la esperada pero semejante entre todas las localidades (Fig. 6, Tabla VIII).

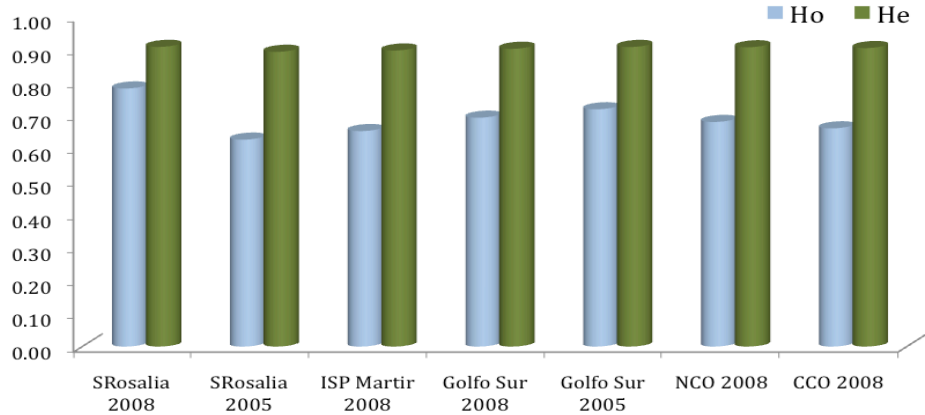


Figura 6. Valores promedio de homocigosidad observada (Ho) y esperada (He) por localidad y año en *D. gigas*.

La prueba no paramétrica de Wilcoxon permitió comprobar que no existen diferencias estadísticamente significativas (valor de $P=1.0$), entre todos los pares de localidades para los estimadores de variabilidad genética (Na, AR, Ho, He) incluso después del ajuste secuencial de Bonferroni (Rice, 1989). El análisis de la frecuencia alélica entre poblaciones, realizado con el programa GENEPOP v4.0, dió como resultado diferencias significativas entre cada comparación pareada, es decir, a pesar de que no hay variación entre el número de alelos (prueba de Wilcoxon), la frecuencia de éstos es diferencial entre localidades (Anexo I).

Tabla VIII. Variabilidad genética en cinco loci de *D. gigas*. Indicando el número de individuos por locus (*n*), número de alelos (*Na*), riqueza alélica (*AR*), número de alelos efectivos (*Ne*), heterocigosidad observada (*Ho*) y esperada (*He*) y valores promedio.

Localidad		Locus					Promedio
		DGI 10	DGI 68	DGI 85	DGI 90	DGI 11	
Santa Rosalía 2008 (N=115)	<i>n</i>	110	75	103	114	77	95.8
	<i>Na</i>	14	37	21	22	35	25.8
	<i>AR</i>	9.87	23.13	15.08	12.97	21.36	17.13
	<i>Ne</i>	6.78	24.35	13.19	7.17	18.85	14.07
	<i>Ho</i>	0.83	0.81	0.83	0.69	0.75	0.78
	<i>He</i>	0.85	0.96	0.92	0.86	0.95	0.91
Santa Rosalía 2005 (N=52)	<i>n</i>	51	21	43	52	49	43.20
	<i>Na</i>	13	17	17	15	27	17.80
	<i>AR</i>	10.41	16.71	13.66	11.66	20.06	14.50
	<i>Ne</i>	6.92	9.91	10.75	7.10	19.13	10.76
	<i>Ho</i>	0.75	0.48	0.74	0.54	0.63	0.63
	<i>He</i>	0.86	0.90	0.91	0.86	0.95	0.89
Isla San Pedro Mártir (N=29)	<i>n</i>	28	21	28	29	25	26.2
	<i>Na</i>	9	22	16	15	28	18
	<i>AR</i>	8.48	21.52	13.24	12.86	25.15	16.89
	<i>Ne</i>	5.37	16.96	9.68	8.37	22.73	12.62
	<i>Ho</i>	0.75	0.52	0.71	0.76	0.52	0.65
	<i>He</i>	0.81	0.94	0.90	0.88	0.96	0.90
Golfo Sur 2008 (N=36)	<i>n</i>	35	20	32	36	35	31.6
	<i>Na</i>	10	21	16	15	25	17.4
	<i>AR</i>	9.47	21.00	14.01	11.77	20.34	16.67
	<i>Ne</i>	7.29	16.33	11.31	6.99	17.88	11.96
	<i>Ho</i>	0.80	0.50	0.88	0.69	0.60	0.69
	<i>He</i>	0.86	0.94	0.91	0.86	0.94	0.90
Golfo Sur 2005 (N=42)	<i>n</i>	42	33	42	41	41	39.80
	<i>Na</i>	12	27	15	18	31	20.60
	<i>AR</i>	9.99	21.78	12.40	13.43	22.53	16.02
	<i>Ne</i>	7.35	18.94	10.05	8.14	21.28	13.15
	<i>Ho</i>	0.86	0.64	0.76	0.80	0.54	0.72
	<i>He</i>	0.86	0.95	0.90	0.88	0.95	0.91
Norte Costa Occidental (N=57)	<i>n</i>	57	34	45	57	36	45.8
	<i>Na</i>	11	27	22	18	30	21.6
	<i>AR</i>	9.19	21.58	15.73	12.26	24.29	17.81
	<i>Ne</i>	6.73	18.35	12.13	7.38	24.00	13.72
	<i>Ho</i>	0.88	0.41	0.91	0.65	0.56	0.68
	<i>He</i>	0.85	0.95	0.92	0.86	0.96	0.91
Centro Costa Occidental (N=63)	<i>n</i>	62	39	55	63	37	51.2
	<i>Na</i>	11	25	24	22	31	22.6
	<i>AR</i>	9.62	19.34	14.54	13.82	21.16	17.02
	<i>Ne</i>	7.09	15.76	12.58	7.73	16.30	11.89
	<i>Ho</i>	0.77	0.56	0.65	0.67	0.65	0.66
	<i>He</i>	0.86	0.94	0.92	0.87	0.94	0.91



2.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW)

El análisis de EHW indicó desviaciones significativas (*), el número de loci en desequilibrio dentro de cada población resultó variable (Tabla IX). La única población que no presentó un déficit de heterocigotos con ninguno de los loci analizados fue CCO. Se obtuvieron valores elevados de endogamia (F_{IS}), sin embargo fueron variables entre loci dentro de cada localidad (Tabla IX).

Tabla IX. Estimación de EHW y coeficiente de endogamia (F_{IS}). Heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) y el valor de P . * Desviación significativa del EHW después del ajuste secuencial de Bonferroni.

Localidad		Locus					Promedio
		DGI 10	DGI 68	DGI 85	DGI 90	DGI 11	
Santa Rosalía 2008 (N=115)	Ho	0.83	0.81	0.83	0.69	0.75	0.78
	He	0.85	0.96	0.92	0.86	0.95	0.91
	P	0.507	0.000*	0.008*	0.104	0.000*	-
	Fis	0.090	0.286	0.182	0.092	0.338	0.198
Santa Rosalía 2005 (N=52)	Ho	0.75	0.48	0.74	0.54	0.63	0.63
	He	0.86	0.90	0.91	0.86	0.95	0.89
	P	0.144	0.001*	0.767	0.022	0.000*	-
	Fis	0.223	0.493	0.067	0.377	0.355	0.303
Isla San Pedro Mártir (N=29)	Ho	0.75	0.52	0.71	0.76	0.52	0.65
	He	0.81	0.94	0.90	0.88	0.96	0.90
	P	0.136	0.000*	0.403	0.038	0.000*	-
	Fis	0.180	0.371	0.095	0.079	0.495	0.244
Golfo Sur 2008 (N=36)	Ho	0.80	0.50	0.88	0.69	0.60	0.69
	He	0.86	0.94	0.91	0.86	0.94	0.90
	P	0.020	0.000*	0.290	0.012*	0.001*	-
	Fis	0.060	0.545	0.042	0.215	0.296	0.231
Golfo Sur 2005 (N=42)	Ho	0.86	0.64	0.76	0.80	0.54	0.72
	He	0.86	0.95	0.90	0.88	0.95	0.91
	P	0.221	0.000*	0.054	0.126	0.000*	-
	Fis	0.059	0.321	0.208	0.130	0.448	0.233
Norte Costa Occidental (N=57)	Ho	0.88	0.41	0.91	0.65	0.56	0.68
	He	0.85	0.95	0.92	0.86	0.96	0.91
	P	0.600	0.000*	0.970	0.0672	0.000*	-
	Fis	0.087	0.509	-0.003	0.235	0.307	0.227
Centro Costa Occidental (N=63)	Ho	0.77	0.56	0.65	0.67	0.65	0.66
	He	0.86	0.94	0.92	0.87	0.94	0.91
	P	0.623	0.023	0.053	0.185	0.118	-
	Fis	-0.232	0.271	0.407	0.231	0.172	0.170



2.3 Prueba de desequilibrio de ligamiento (LD).

No se encontró desequilibrio de ligamiento en ningún par de loci a través de las localidades tras realizar un ajuste en los valores de significancia (prueba secuencial de Bonferroni $P < 0.005$). Este análisis mostró que la variación de cada locus es independiente del resto, ya que no existe una asociación entre los genotipos de los loci.

2.4 Incidencia de alelos nulos y errores durante la genotipificación.

Al comparar la frecuencia de genotipos observados con la distribución aleatoria de genotipos, usando el programa MicroChecker, la prueba mostró un exceso significativo (P -valor) de homocigotos, sugiriendo la incidencia de alelos nulos en diferentes loci dentro de las localidades. No se detectaron alelos nulos en el locus DGI_10, lo cual coincide con el análisis de EHW, pues fue el único que no presentó una desviación significativa del mismo. Los loci con una mayor incidencia y frecuencia de alelos nulos en todas las localidades muestreadas fueron el DGI_68 y el DGI_11 (Tabla X).

Tabla X. Frecuencia de alelos nulos por población y locus. Se muestra el estimador de Brookfield 1 (r) y el valor de significancia (P).

Localidad		Locus			
		DGI_68	DGI_85	DGI_90	DGI_11
Santa Rosalía 2008	r	0.134	0.082		0.160
	P	<0.001	>0.05		<0.001
Santa Rosalía 2005	r	0.213		0.154	0.152
	P	<0.001		<0.01	<0.025
Isla San Pedro Mártir	r	0.162			0.114
	P	<0.001			<0.001
Golfo Sur 2008	r	0.176		0.074	0.160
	P	<0.001		>0.05	<0.001
Golfo Sur 2005	r	0.149	0.091		0.211
	P	<0.001	>0.05		<0.001
Norte Costa Occidental	r	0.240		0.093	0.141
	P	<0.001		>0.05	<0.001
Centro Costa Occidental	r	0.075		0.089	
	P	>0.05		>0.025	



Errores en la asignación de genotipos debido a otros artefactos tales como amplificación del alelo pequeño (*short allele dominante*) o bandas fantasma (*stutter*) fueron descartados debido a la distribución de homocigotos por clase de tamaño que presentaron los loci en el análisis. El programa MicroChecker indica la presencia de alelos nulos cuando existe un exceso significativo de homocigotos y éstos están distribuidos a través de todas las clase de tamaño (e.g locus DGI_90, Fig. 7)

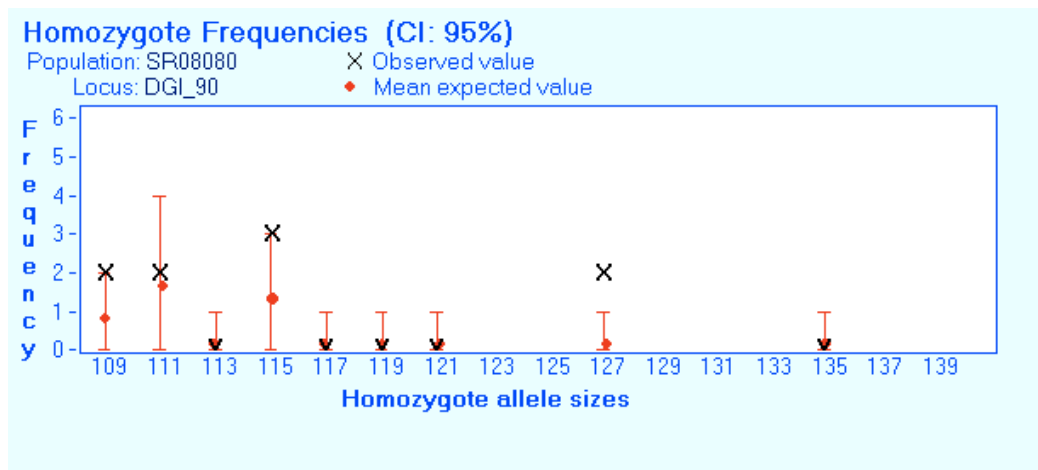


Figura 7. Distribución de homocigotos del locus DGI_90 en cada clase de tamaño. Localidad Santa Rosalía 2008. Programa MicroChecker.

2.5 Variación genética interpoblacional en *D. gigas* en el Pacífico Noreste de México.

El valor global de F_{ST} , incluyendo las muestras de diferentes años, fue muy bajo (0.009); sin embargo fue significativamente diferente de cero ($P=0.008$), indicando que existe diferenciación genética entre alguna de las localidades analizadas.

Los valores de las comparaciones pareadas de F_{ST} entre localidades en general fueron muy bajos, el menor valor fue 0.003 entre Santa Rosalía e Isla San Pedro Mártir, y el mayor entre el CCO 2008 y Santa Rosalía 2005 (0.0369) (Tabla XI). Ningún valor de p fue



significativamente diferente de cero después del ajuste secuencial de Bonferroni; es decir que no existe diferenciación genética entre las localidades analizadas.

Tabla XI. Valores de F_{ST} pareados entre localidades debajo de la diagonal. Encima de la diagonal se muestra el valor de significancia, ($*p < 0.05$). SR: Santa Rosalía, ISPM: Isla San Pedro Mártir, GS: Golfo Sur.

	SR 2008	ISPM 2008	GS 2008	NCO 2008	CCO 2008	SR 2005	GS 2005
SR 2008	-	0.5039	0.3412	0.2096	0.2000	0.1059	0.1073
ISPM 2008	0.0033	-	0.0732	0.6512	0.0900	0.1875	0.3232
GS 2008	0.0035	0.0158	-	0.2171	0.2084	0.0379*	0.0459*
NCO 2008	0.0060	0.0049	0.0063	-	0.4172	0.0476*	0.0208*
CCO 2008	0.0112	0.0140	0.0114	0.0087	-	0.0095*	0.0614
SR 2005	0.0126	0.0155	0.0168	0.0195	0.0369	-	0.4763
GS 2005	0.0066	0.0069	0.0091	0.0133	0.0190	0.0068	-

La prueba de Mantel (aislamiento por distancia) nos indica que no hay una correlación entre la distancia genética (F_{ST}) y la geográfica (km) en las localidades muestreadas (valor $p=0.47$) (Fig. 8).

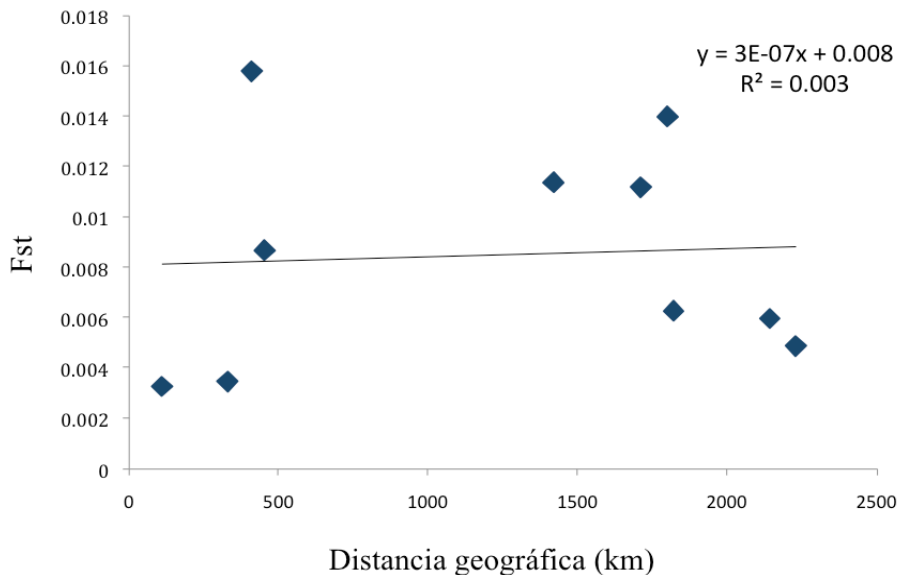


Figura 8. Regresión lineal entre distancias genéticas y geográficas en *D. gigas*



Aunque los valores pareados de F_{ST} , después de la corrección de Bonferroni, no evidenciaron una diferenciación genética entre localidades, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) con el fin de determinar la variabilidad dentro y entre agrupaciones de manera temporal. En este caso, y debido a los resultados de los valores de F_{ST} pareados (Tabla XII), se realizaron dos agrupaciones siguiendo los siguientes criterios:

- 2005 vs 2008: se conformaron dos grupos integrados por las localidades de diferentes años.

Tabla XII. Análisis de varianza molecular entre los años 2005 y 2008 en *D. gigas*. (*) Valor de P significativo.

Agrupación temporal	Fuente de variación	Varianza	% variación total	Estadístico F	Valor P
2005 vs 2008	Entre grupos	0.0118	0.5123	0.0051	0.0161*
	Entre localidades dentro de grupos	0.0014	0.0617	0.0006	0.4046
	Entre individuos dentro de las localidades	0.5056	21.843	0.2197	0.000*
	Entre de individuos	1.7958	77.582	0.2241	0.000*

El análisis temporal mediante la prueba AMOVA arrojó valores significativamente diferentes de cero entre grupos (2005 vs 2008) ($P=0.0161$), mientras que el valor de P entre las localidades que los conforman no fue significativo ($P=0.404$) (Tabla XII), indicando que existe una variación genética entre los años 2005 y 2008.



DISCUSIÓN

1. Aislamiento y caracterización de microsatélites

El aislamiento de microsatélites a través de la construcción de una librería genómica enriquecida ha sido poco usada para moluscos, menos del 2% de los trabajos publicados, sin embargo su uso se ha incrementado por la rapidez y eficiencia para detectarlos en diferentes taxa (Zane et al., 2002). El éxito obtenido en el presente trabajo fue moderado (48.6%) encontrándose en el rango reportado para trabajos similares, que oscila entre el 20 al 90% (Zane et al., 2002). Aunque específicamente para moluscos aún no se ha estimado el motivo de repetición más abundante, Toth (2000) basándose en una aproximación computacional encontró que los trinucleótidos y tetranucleótidos son los menos frecuentes en una gran variedad de taxa analizados, coincidiendo con lo obtenido para *D. gigas* (Tabla IV y V), ya que tanto en clonas positivas hibridizadas con sondas tetranucleotídicas como en secuencias con microsatélites, este motivo de repetición fue escaso.

La estandarización de los iniciadores para la amplificación de los 18 loci se realizó en ocho individuos de *D. gigas*, sin embargo cuatro de ellos, específicamente de la costa norte de California, U.S.A, no amplificaron bajo ningún programa de PCR. La especiación críptica ha sido reconocida en el omastrefido *Martialia hyadesi* (Brierly et al., 1993) y es un patrón que ha sido común en cefalópodos debido a la alta plasticidad morfológica. Aunque podría ser una explicación para *D. gigas*, faltaría confirmarla con posteriores estudios incluyendo una mayor cantidad de individuos de esta región para descartar otras posibles razones como la cantidad y calidad de ADN.



El polimorfismo detectado para los 10 loci fue de moderado a alto, evidenciando un nivel de variación ideal para estudios en genética poblacional de la especie, esto sugiere que los microsatélites son los marcadores genéticos adecuados para el estudio poblacional de cefalópodos y sus sistemas de apareamiento, como ya ha sido propuesto por diferentes autores (Shaw, 1997; Shaw et al., 1999; Adcock et al., 2002). Sin embargo, el déficit de heterocigotos sigue siendo un aspecto importante a considerar, ya que varios de los loci aislados no se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), fundamento básico en el análisis de la estructura genética poblacional.

Un inconveniente frecuente durante la caracterización de microsatélites, son los errores durante la amplificación de los loci en los individuos, ocasionando falsos homocigotos (alelos nulos). En el desarrollo de microsatélites del calamar *Loligo reynaudii* (Naud y Shaw, 2008) se encontraron mayor frecuencia de alelos nulos en loci aislados a partir de una librería enriquecida, al parecer y sin explicación clara, los protocolos enriquecidos que se basan en realizar la hibridación antes del proceso de clonación, tienen una selección preferencial por repeticiones dentro de regiones de ADN sujetos a un alto polimorfismo, y por lo tanto a variaciones en sitios de iniciador (Naud y Shaw, 2008). Se ha reportado que la frecuencia de estos artefactos en microsatélites varía entre el 40 y 20% (Dakin y Avise, 2004), y aunque se han encontrado en una amplia variedad de taxa, se ha observado que los moluscos e insectos revelan una alta frecuencia (Chapuis y Estoup, 2007).

Son pocos los microsatélites aislados para miembros de la familia Ommastrephidae, y en la mayoría de ellos se han encontrado inconvenientes en la amplificación. Para la especie



Todadores pacificus se aislaron 11 loci, de los cuales seis se encontraban fuera del EHW debido a alelos nulos (Iwata et al., 2008). En el género *Illex* (Adcock et al., 1999) deleciones o inserciones en la secuencia flanqueante al microsatélite explicarían una discontinua distribución en los tamaños alélicos.

Varios trabajos realizados en diferentes moluscos han reportado la deficiencia de heterocigotos (Shaw et al., 1999; Pérez-Losada, 2002; Carlsson & Reece 2007), relacionados a diferentes causas como alelos nulos, efecto Walhund, selección e incluso endogamia, sin embargo existe la incertidumbre si esta condición es una característica en este grupo de organismos o simplemente un artefacto de la técnica. La presencia de alelos nulos, debido errores durante la amplificación es probablemente la causa de la deficiencia de heterocigotos en este estudio y será discutida con mayor detalle en la siguiente sección.

Las relaciones filogenéticas entre la subfamilia Ommastrephinae aun no han sido esclarecidas debido a la falta de caracteres morfológicos informativos, sin embargo se ha propuesto que *Sthenoteuthis oulaniensis* es una de las especies más cercana a *D. gigas* (Roeleveld, 1988). Se conoce que los microsatélites no tienen una resolución significativa en estudios filogenéticos, debido a su elevado polimorfismo, sin embargo la amplificación cruzada (Tabla VII) permite confirmar el uso de estos marcadores en especies que se encuentran filogenéticamente emparentadas.

2. Variabilidad genética en *D. gigas*

Los cinco microsatélites analizados en este estudio revelaron una alta y similar variación



genética entre localidades, con un promedio de heterocigosidad observada del 68% por locus (Tabla VIII). Sin embargo existe una tendencia, basada en estudios con alozimas (Augustyn y Grant, 1988), donde los cefalópodos exhiben una menor variabilidad en éste estimador con respecto a otros invertebrados, exceptuando los insectos. El promedio de alelos por locus y de heterocigosidad observada en *D. gigas* (Tabla VIII) fueron similares a los resultados obtenidos para el omastrefido japonés común *Todaroes pacificus*, en el cual se encontró de 4 a 26 alelos por locus y una heterocigosidad observada entre 0.2 a 0.95; valores menores a los encontrados en *Loligo opalescens* y *L. forbesi* (Shaw et al., 1999; Reichow y Smith, 2001).

Al parecer en la familia Ommastrephidae ésta tendencia se conserva ya que se encuentra por debajo (promedio de heterocigosidad 2.7%) de Loliginidae y Gonatidae (8.7% heterocigosidad promedio) (Reichow y Smith, 2001). A nivel de microsátelites, una comparación mas completa de la variabilidad genética en cefalópodos requiere de una investigación con mayor número de especies pertenecientes a diferentes familias.

Estas medidas de variabilidad en una población son usualmente utilizadas para discriminar el potencial de las especies, teóricamente niveles altos de diversidad genética conllevan a una mayor capacidad de respuesta de las poblaciones ante cambios ambientales y al éxito de los individuos (Amos y Balmford, 2001). Se conoce que *D. gigas* es una especie con una alta capacidad de adaptación a las condiciones ambientales (Zeidberg y Robinson, 2007; Bazzino et al., 2007), no solo por su condición altamente migratoria tanto horizontal como vertical, sino también por las adaptaciones fisiológicas (Rosa y Seibel, 2008). Sin embargo es importante discernir entre la variabilidad genética neutral (medida) y la que realmente



afecta el potencial adaptativo y evolutivo de las poblaciones o especies (Holderegger et al., 2006)

3. Déficit de heterocigotos: artefactos o característica biológica

El déficit de heterocigotos en poblaciones naturales se asocia a las características biológicas como la incidencia de endogamia, y/o la mezcla de subpoblaciones (efecto Wahlund) mientras que en los artefactos de la técnica se incluye los inconvenientes durante la amplificación (alelos nulos) (Oosterhout et al., 2004). Los resultados en estudios poblacionales pueden ser mal interpretados o sesgados si no se conoce la razón al desequilibrio de Hardy Weinberg, ya que todas tienen significados biológicos totalmente diferentes.

En este trabajo, la mayoría de las localidades analizadas están en desequilibrio y se vió asociado a dos loci específicamente DGI_68 y DGI_11 (Tabla IX). Cuando existen mutaciones en la secuencia flanqueante al microsatélite, ciertos alelos no pueden ser amplificados resultando en falsos homocigotos y provocando un déficit de heterocigotos (Dakin y Avise, 2004). La asociación entre la presencia de alelos nulos y la alta variabilidad en las regiones flanqueantes ha sido reportada repetidamente sugiriendo que éstas secuencias son menos estables que otras localizadas en diferentes regiones genómicas (Chapuis y Estoup, 2007).

En la mayoría de los microsatélites al encontrarse en regiones no codificantes, su tasa de mutación es mayor, y por lo tanto es posible observar deleciones, inserciones o cambios en



uno o varios sitios en el iniciador, ocasionando éstos artefactos. Los alelos nulos han sido mencionados en varios estudios en diferentes organismos. En bivalvos marinos el déficit de heterocigotos ha sido bien documentado, tanto para microsatélites como alozimas (Gaffney, 1990; Fairbrother & Beaumont, 1993; Hedgecock et al., 2004; Carlsson & Reece, 2007) y en algunas ocasiones se ha relacionado con la incidencia de éstos artefactos. En cefalópodos también ha sido común encontrar una heterocigosidad observada baja y se ha atribuido a una alta frecuencia de alelos no amplificados (Adcock et al., 1999; Iwata et al., 2008), como se presentó en este estudio (Tabla X).

Otra de las razones a la reducción de heterocigotos en una población se ha relacionado con el efecto Wahlund, el cual describe que al unir subpoblaciones con frecuencias alélicas diferentes, aún estando en EHW, la heterocigosidad disminuye. Hixon (1983) reporta que durante la pesca de calamares de la familia Loliginidae, múltiples grupos se congregan en lugares de desove, si las frecuencias alélicas difieren entre dichos grupos, la mezcla de muestras produciría un efecto Wahlund y ocultaría las diferencias genéticas entre las agregaciones.

Desviaciones significativas del EHW con alozimas han sido reportadas en estudios poblacionales de los omastréfidos *Illex argentinus* (Carvalho et al., 1992) y *Martalia hyadesi* (Brierley et al., 1995), igualmente en *Sepia officinalis* con loci microsatélites (Garoia et al., 2004) y éstas fueron atribuidas a la mezcla de subpoblaciones durante la migración estacional hacia la costa para la reproducción. Markaida et al. (2004) encontró la ocurrencia de dos grupos de individuos de *D. gigas* diferenciados por la talla de madurez



(tamaño pequeño: maduración temprana y, tamaño grande: madurez tardía) en áreas de pesca del Golfo de California. Varios autores (Tafur y Rabí, 1997; Argüelles, 2001) basándose en un estudio de crecimiento y reclusión apoyan esta segregación en las costas del Perú. Puesto que la estrategia reproductiva de *D. gigas* consiste en múltiples desoves durante su corta vida (Rocha et al., 2001), la existencia de cohortes estacionales en una colección puede resultar en la deficiencia global de heterocigotos surgido por unidades genéticamente diferentes.

Aunque la endogamia es otra de las causas para encontrar una heterocigosidad observada baja, depende del tamaño de las poblaciones, la migración entre ellas y el potencial de reproducción (Knowlton y Jackson, 1993). En *D. gigas* no solo se detectaron niveles altos de endogamia (F_{IS}) sino también valores variables entre loci dentro de cada población (e.g. -0.232 y 0.407 en CCO, Tabla IX). Valores de F_{IS} variables entre loci no deberían ser considerados como una señal clara de endogamia, ya que en teoría se espera que este proceso afecte el nivel de heterocigosidad observada en todos los loci (Gaffney et al., 1990), y así observar niveles de F_{IS} igualmente distribuidos entre ellos. Además, las características biológicas de los cefalópodos, especialmente las de los calamares, como su amplio tamaño poblacional y la alta dispersión en adultos y paralarvas, contradicen que la endogamia sea el proceso que este afectando la heterocigosidad en este estudio.

Con estas evidencias se apoyó la hipótesis sobre un déficit de heterocigotos exacerbado quizá por la incidencia de alelos nulos. El diseño de nuevos pares de iniciadores mediante la secuenciación y/o una prueba involucrando el apareamiento de individuos para



determinar el ajuste a la herencia mendeliana en la progenie resultante confirmarían la ocurrencia de amplificaciones nulas.

4. Variación interpoblacional y flujo genético en *D. gigas*

El valor de F_{ST} global para *D. gigas* resultó ser bajo (0.009), sin embargo parece ser algo recurrente para marcadores altamente variables, como los microsatélites. Se ha discutido que la diferenciación genética medida con este estimador puede llegar a ser subestimada debido a la influencia de la heterocigosidad en estos loci (Hedrick, 1999). Comparando los índices F_{ST} de microsatélites y alozimas en el calamar *L. forbesi*, Shaw et al. (1999) encontró aproximadamente valores dos veces más altos con las proteínas, sin embargo la significancia estadística fue igual en ambos métodos.

Los análisis pareados entre localidades demuestran que no existe una estructura genética para la especie y que la variación es resultado de la temporalidad (Tabla XI), apoyado por el análisis de varianza molecular (Tabla XII). Es necesario considerar que los valores de F_{ST} pueden ser afectados por la incidencia de alelos nulos debido a la reducción de la diversidad genética intrapoblacional ocasionando que se sobreestime la distancia genética al reducirse la variabilidad (Paetkau y Strobeck, 1995; Slatkin, 1995). Sin embargo, a pesar de encontrar una alta frecuencia de amplificaciones nulas (Tabla X) el valor de F_{ST} no fue sobreestimado ni significativo.

La utilidad del parámetro F_{ST} para estimar la diferenciación genética, migración y demografía histórica ha sido discutida repetidamente. Varias de las asunciones, en las



cuales está basado este método (Modelo de Isla, Wright 1931) están muy lejos de la realidad, ya que pocas pueden cumplirse en la naturaleza (Whitlock y McCauley, 1999, Neigel, 2002, Pearson y Crandall, 2004). Otros métodos implementados últimamente para determinar la estructura genética, utilizando la inferencia bayesiana (e.g. STRUCTURE), permiten que los datos definan las poblaciones en lugar de realizar suposiciones *a priori*, empleando los sitios de muestreo como sustitutos de poblaciones genéticas. Sin embargo, éstos métodos requieren que se cumplan las condiciones de EHW y equilibrio de ligamiento en los loci. Es por ello que el uso de F_{ST} es una aproximación y un punto de partida para el análisis genético poblacional de *D. gigas* en este estudio.

No encontrar una estructura genética geográfica poblacional en el calamar no es un resultado desconcertante, los movimientos en las poblaciones de cefalópodos toman lugar durante todas las fases de su ciclo de vida, desde la pasiva deriva de las masas de huevos (O'Dor y Balch, 1985), a las migraciones diarias verticales de paralarvas en especies oceánicas (Roper y Young, 1975) y los desplazamientos a gran escala (miles de kilómetros) de los juveniles y adultos para alimentarse y hacia zonas de desove (O'Dor, 1992). Además, el medio oceánico no posee barreras tangibles como en los ambientes dulceacuícolas o terrestres, y por lo tanto la estructura genética de las poblaciones marinas esta condicionada por factores oceanográficos y características propias de las especies para la dispersión (Avise, 1994).

Comparando con estudios anteriores utilizando diferentes marcadores genéticos, Sandoval y Castellanos (2007) encontraron que la segregación de las poblaciones de *D. gigas* se



encontraba asociada a los hemisferios sur y norte sin evidenciar ninguna estructura dentro de cada grupo, un resultado similar encontraron Staff et al. (en prensa) con el marcador NADH y Sandoval et al. (2010) con la región mitocondrial citocromo *b*. Ambos atribuyeron esta segregación a las condiciones oceanográficas y de corrientes que se presentan en el Ecuador, limitando la migración. La variación en microsatélites es usualmente mucho mayor debido a la alta tasa de mutación que poseen, por ello han sido utilizados para estudios poblacionales en cefalópodos de fina escala, en donde otros marcadores no han demostrado gran variabilidad (Shaw, 1999); sin embargo, los resultados encontrados en este estudio revelan que no hay una diferenciación geográfica con los loci empleados, contrario como ha sucedido con otras especies como *L. forbesi*, (Shaw et al., 1999). Las especies de omastéridos tienen un mayor desplazamiento y una tendencia a hábitos oceánicos, mientras que los loliginidos son costeros y realizan migraciones más limitadas, favoreciendo la estructura genética como lo demuestran Shaw et al. (1999) en su trabajo.

Teóricamente, la tasa de flujo genético de pocos individuos por generación (tasa de migración menor al 1%), es suficiente para mantener la población genéticamente homogénea (Semmens et al., 2007). La detección de diferencias genéticas significativas entre áreas o poblaciones indica que existe una baja tasa de migración efectiva, es por ello que una homogeneidad genética en una escala de tiempo de por lo menos 10 generaciones en *D. gigas* sugiere que existe una dispersión y apareamiento efectivo a lo largo de las áreas geográficas incluidas en este estudio, y que la variación genética es evidente a lo largo del tiempo. Esta aseveración se vio reflejada con la prueba de Mantel en donde no se encontró



ninguna relación entre la distancia geográfica y la genética (Fig. 8), y con el análisis de varianza molecular en donde se presentó una mayor variabilidad entre grupos de diferentes años (Tabla XII).

5. Implicaciones para el manejo de la pesquería en el noreste del Pacífico mexicano

La abundancia y posición geográfica de las poblaciones de cefalópodos y la pesca asociada, está fuertemente influenciada por la prevalencia y magnitud de sus movimientos (Boyle y Boletzky, 1996). Por ello en ommastreídeos las fluctuaciones anuales de captura varían entre dos y cinco ordenes de magnitud por especie (Semmens et al., 2007).

Como se mencionó anteriormente, la estimación de diferencias genéticas a partir del estimador F_{ST} posee varias limitantes, sobre todo en marcadores altamente variables como los microsatélites. Sin embargo, bajo el concepto de *stock* genético el cual está descrito como una unidad reproductiva aislada que es diferente genéticamente de otra (Carvalho y Nigmatullin, 1998), los análisis realizados en el presente estudio indican que existe un elevado flujo genético entre todas las localidades muestreadas, infiriendo que el calamar *D. gigas* esta conformado por un solo *stock* en el noroeste del Pacífico mexicano.

Los calamares y principalmente los miembros de la familia Ommastrephidae, son especies con elevada capacidad de desplazamiento, *D. gigas* ha recorrido 700km en una semana (John Field 2009, comentario personal), además su dieta oportunista, la cual le permite alimentarse de gran variedad de presas, incluyendo el canibalismo, indican que la disponibilidad de alimento no constituye una limitante en sus movimientos, y al parecer



están mayormente influenciados como respuesta a cambios ambientales o eventos climatológicos como El Niño (Markaida et al., 2008).

Es importante recalcar que en calamares la estructura poblacional es más compleja, puesto que diferentes *stocks* genéticos migran mezclándose a través de largas distancias (Carvalho y Hauser, 1994), por lo tanto la pesquería en un lugar determinado afecta otro diferente. Aunque aparentemente *D. gigas* no se encuentra sobreexplotado, es necesario considerar las diferencias en crecimiento y talla de madurez (cohortes) reportadas previamente, que pudieran verse reflejadas en este estudio como un efecto Walhlund, para establecer un plan de manejo adecuado en la pesquería de calamar. Un mal manejo y una sobreexplotación pueden provocar la reducción de variabilidad genética, especialmente en la pérdida de alelos ocasionando una disminución en el tamaño efectivo poblacional (Ward, 2002) lo cual puede reducir la adaptabilidad y persistencia de la población e incluso de la especie (Hoarau et al., 2002).

Los resultados de éste estudio sirven de base para futuras aplicaciones de los microsatélites en *D. gigas*. Incluir más localidades a lo largo del rango de distribución de la especie (Pacífico Oriental) y monitorear la diversidad genética con un mayor número de loci, permitirá tener una perspectiva completa y detallada de la migración, así como de los cambios en las frecuencias alélicas y el tamaño efectivo poblacional de la especie.



CONCLUSIONES

- El éxito en el enriquecimiento durante la construcción de la librería genómica resultó ser moderado, y a pesar de ser un protocolo poco usado para el aislamiento de microsatélites en calamares, se obtuvieron 10 pares de iniciadores caracterizados para *Dosidicus gigas*.
- La mayoría de los microsatélites aislados presentaron desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg (ocho de diez), la principal razón en el déficit de heterocigotos se atribuye a la incidencia de alelos nulos.
- La mezcla de subpoblaciones en los lugares de pesca, efecto Wahlund, es otro de los eventos que pudieron afectar la baja heterocigosidad observada en éste estudio.
- Los niveles de variabilidad genética expresados en número de alelos y heterocigosidad, encontrados en el calamar gigante tanto en el 2005 como en el 2008, fueron elevados y similares a los reportados para otras especies de omastérfidos y loliginidos.
- No se detectó una diferenciación genética entre las localidades muestreadas, indicando que en el noroeste del Pacífico mexicano *Dosidicus gigas* está conformado por una sola población.



-
- Las características biológicas de la especie, como su gran capacidad de desplazamiento, permite que exista un flujo genético efectivo entre las localidades muestreadas para que la población se mantenga genéticamente homogénea.



BIBLIOGRAFÍA

- Abbott C. y M. Double. 2003. Genetic structure, conservation genetics and evidence of speciation by range expansion in shy and white-capped albatrosses. *Molecular Ecology* **12**: 2953–2962
- Adcock, G., G. Carvalho, P. Rodhouse y P.W. Shaw. 1999. Highly polymorphic microsatellite loci of the heavily fished squid genus *Illex* (Ommastrephidae). *Molecular Ecology Notes* **8**:157-168.
- Adcock, G., P. Shaw, P. Rodhouse, y G. Carvalho. 1999b. Microsatellite analysis of genetic diversity in the squid *Illex argentinus* during a period of intensive fishing. *Marine Ecology Progress Series*. **187**:171-178.
- Amos W. y A. Balmford. 2001. When does conservation genetics matter? *Heredity* **87**: 257-265
- Argüelles, J. 2001. Age, growth and population structure of the jumbo flying squid *Dosidicus gigas* in Peruvian waters. *Fisheries Research* **54**(1):51-61.
- Augustyn, C. L., y W.S Grant. 1988. Biochemical and morphological systematics of *Loligo vulgaris vulgaris* Lamarck and *Loligo vulgaris reynaudii* D'Orbigny nov. comb. (Cephalopoda: Myopsida). *Malacologia* **29**:215--233.
- Awise, J. C. 2004. Molecular markers, natural history and evolution. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc Publishers, Sunderland, U.S.A. 683p
- Bazzino, G., C. Salinas-Zavala, y U. Markaida. 2007. Variabilidad en la estructura poblacional del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en Santa Rosalía, región central del Golfo de California. *Ciencias Marinas* **33**(2):173–186.
- Bohonak, A. 1999. Dispersal, gene flow and population structure. *The Quarterly review of biology* **74**:21-45.
- Boyle P.R. y S. v. Boletzky. 1996. Cephalopod Populations: Definition and Dynamics. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*. **351**(1343). 985-1002.
- Brierley, A., J. Thorpe, G. Pierce, M. Clarke, y P. Boyle. 1993. Genetic variation in the neritic squid *Loligo forbesi* (Myopsida: Loliginidae) in the northeast Atlantic Ocean. *Marine Biology* **122**:79-86.
- Brierley, A., P. Rodhouse, J. Thorpe, y M. Clarke. 1995. Genetic evidence of population heterogeneity and cryptic speciation in the ommastrephid squid *Martialia hyadesi*



- from the Patagonian Shelf and Antarctic Polar Frontal Zone. *Marine Biology* **116**:593-602.
- Carlsson, J., C. Morrison y K. Reece. 2006. Wild and aquaculture populations of the eastern oyster compared using microsatellites. *Journal of Heredity*, **97**(6):595-598.
- Carvalho, G.R., A. Thompson, y A.L. Stoner. 1992. Genetic diversity and population differentiation of the shortfin squid *Illex argentinus* in the south-west Atlantic. *J. exp. mar. Biol Ecol.* **158**:105-21.
- Carvalho, G.R. y L. Hauser. 1994. Molecular genetics and the stock concept in fisheries *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4, 326-350
- Carvalho, G., y Nigmatullin, C. 1998. Stock structure analysis and species identification. *FAO Fisheries Technical Paper* **376**:199-232
- Carvalho-Costa, L.F., T. Hatanaka y Galetti Jr. P.M. 2008. Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. *Genetics and Molecular Biology.* **31**(1) 377-380.
- Cosgrove J.A. 2005. The first specimens of Humboldt squid in British Columbia. *PICES Press* **13**(2), 30–31.
- Chapuis, M., y A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* **24**(3):621-631.
- Dakin, E. y J. Avise. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, **93**(5):504–509.
- Dillane, E., P. Galvin, J. Coughlan, M. Lipinski y T.F. Cross. 2005. Genetic variation in the lesser flying squid *Todaropsis eblanae* (Cephalopoda , Ommastrephidae) in east Atlantic and Mediterranean waters. *Marine Ecology Progress Series* **292**:225-232.
- Ehrhardt N.M., P.S. Jacquemin, B.F. García, D.G. González, B.J. López, C.J. Ortiz y N.A. Solís. 1983. On the fishery and biology of the giant squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, Mexico. En: Caddy J.F. (ed.), *Advances in Assessment of World Cephalopod Resources. FAO Fish. Tech. Pap.* **231**: 306–340.
- Ehrhardt N.M., Solís N.A., Jacquemin P.S., Ortiz C.J., Ulloa R.P., González D.G. y García B.F. 1986. Análisis de la biología y condiciones del stock del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el Golfo de California, México, durante 1980. *Cienc. Pesq.* **5**: 63–76.
- Ehrhardt, N.M. 1991. Potential impact of a seasonal migratory jumbo squid (*Dosidicus gigas*) stock on a Gulf of California sardine (*Sardinops sagax caerulea*) population. *Bulletin of Marine Science* **49**:325-332.



- Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider. 1995. ARLEQUIN. Ver. 3.0. An integrated software package for population genetic data analysis. *Evol. Biof. Online* **1**:47-50.
- Fairbrother, J.F. y A.R. Beaumont. 1993. Heterozygote deficiencies in a cohort of newly settled *Mytilus edulis* spat. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **73**:647-653.
- Field J.C., K. Baltz, A.J. Phillips, y W.A. Walker. 2007. Range expansion and trophic interactions of the jumbo squid, *Dosidicus gigas*, in the California Current. *CalCOFI Reports* **48**: 131-146.
- Frankham R., J.D Ballou y D. Briscoe. 2005. Introduction to Conservations Genetics. Cambridge University Press. 617p.
- Freitas, P.D., C.M Jesus y P.M. Galetti. 2006. Isolation and characterization of new microsatellite loci in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and cross-species amplification in other penaeid species. *Molecular Ecology Notes* **7**(2):324-326.
- Gaffney P.M., T.M Scott, R.K. Koehn y W.J Diehl. 1990. Interrelationships of heterozygosity, growth rate and heterozygote deficiencies in the coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics* **124**:687-699.
- Garoia F., I. Guarniero, A. Ramsak, N. Ungaro, M. Landi, C. Piccinetti, P. Mannini y F. Tinti. 2004. Microsatellite DNA variation reveals high gene flow and panmictic populations in the Adriatic shared stocks of the European squid and cuttlefish (Cephalopoda). *Heredity*. **93**, 166-174.
- Gilly, W.F., U. Markaida, C. H. Baxter, B. A. Block, A. Boustany, L. Zeirberg, K. Reisenbichler, B. Robinson, G. Bazzino y C. Salinas. 2006. Vertical and horizontal migrations by the jumbo squid, *Dosidicus gigas* revealed by electronic tagging. *Marine Ecology Progress Series*. **324**:1-17.
- Glenn, T.C. and N.A. Schable. 2005. Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology* **395**:202-222.
- Greatorex, E., C. Jones, J. Murphy, L. Key, A. Emery, P. Boyle. 2000. Microsatellite markers for investigating population structure in *Octopus vulgaris* (Mollusca: Cephalopoda). *Molecular Ecology Notes* **9**:629-644.
- Hancock, J.M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. En: Goldstein, D.B., Schlötterer, C. (eds). Oxford University Press. 1-19.
- Hedrick PW. 1999. Perspective: Highly variable loci and their interpretation in Evolution and Conservation. *Evolution* **53**:313-318.



- Hartl, D.L. y A. Clark. 1989. Principles of population genetics. Sinauer Associates, Sunderland, USA. 682pp.
- Hedgecock, D., G. Li, S. Hubert, K. Bucklin y V. Ribes. 2004. Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* **23**:379–385.
- Hixon R.F. 1983. *Loligo opalescens*. In: Cephalopod Life Cycles: Species Accounts. Boyle P.R. (ed) Academic Press, London. **1**:95–114.
- Holderegger, R., U. Kamm y F. Gugerli. 2006. Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. *Landscape Ecology* **21**:797-807.
- Hoarau, G., D. Rijnsdorp, H.W. Van Der Veer, W.T. Stam y L. Olsen. 2002. Population structure of plaice (*Pleuronectes platessa*) in northern Europe: microsatellite revealed large-scale spatial and temporal homogeneity. *Molecular Ecology* **11**:1165-1176.
- Iwata, Y., C. Lian y Y. Sakurai. 2008. Development of microsatellite markers in the Japanese common squid *Todarodes pacificus* (Ommastrephidae). *Molecular Ecology*, **8**:466-468.
- Jarne, P. y P.J. Lagoda. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* **11**(10): 424:429.
- Kalinowski ST. 2005. HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes* **5**:187-189.
- Knowlton, N. y J. Jackson. 2003. Inbreeding and outbreeding in marine invertebrates. En: Nancy Wilmsen (ed.). The Natural history of inbreeding and outbreeding: theoretical and empirical perspectives. The University Chicago Press, USA. 200-230p.
- Korzum, Y.V., K.N. Nesis, Ch.N. Nigmatullin, A.A. Ostapenko y M.A. Pinchukov. 1979. New data on the distribution of squids, family Ommastrephidae, in the World ocean. *Okeanologiya* **19**(4):729-733.
- Markaida, U., y O. Sosa-Nishizaki. 2001. Reproductive biology of jumbo squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, 1995–1997. *Fisheries Research*, **54**(1), 63-82.
- Markaida, U., y O. Sosa-Nishizaki. 2003. Food and feeding habits of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Gulf of California, Mexico. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* **83**(3), 507-522.
- Markaida, U., C. Quiñónez 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**(1):31-47.



- Markaida, U., W. Gilly, C. Salinas-Zavala, R. Rosas-Luis y Booth, A. 2008. Food and feeding of jumbo squid *Dosidicus gigas* in the central Gulf of California during 2005-2007. *Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep* **49**:90-103.
- Mooney H.A. y E.E. Cleland. 2001. The evolutionary impact of invasive species. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(10):5446-5451p.
- Morales-Bojórquez, E., M. Cisneros-Mata, M. Nevárez-Martínez, y A. Hernández-Herrera 2001. Review of stock assessment and fishery biology of *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, Mexico. *Fisheries Research*, **54**(1):83-94.
- Naud, M.J. y P.W. Shaw. 2008. Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellites in the chokka squid, *Loligo reynaudii*. *Molecular Ecology Resources* **8**(4):943-945.
- Neigel, J. 2002. Is Fst obsolete? *Conservation Genetics* **3**:167-173.
- Nesis, K.N. 1970. The biology of the giant squid of Perú and Chile, *Dosidicus gigas*. *Okeanologiya* **10**(1):140-152.
- Nesis, K.N. 1979. Squid larvae of the family Ommastrephidae (Cephalopoda). *Zoologicheskyy Zhurnal* **58**(10): 17-30.
- Nesis K.N. 1983. *Dosidicus gigas*. En: P. Boyle (ed.). *Cephalopod Life Cycles*. Academic Press 1, London. 215-231
- Nesis K.N. 1985. *Oceanic Cephalopods: Distribution, life forms, evolution*. Nauka, Moscou, 287pp.
- Nigmatullin Ch.M., K.N. Nesis y A.I. Arkhipkin. 2001. A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fisheries Research* **54**:9-19
- Norman, J., J.M. Murphy, G. Pierce y P.R. Boyle. 1994. Preliminary molecular genetic analysis of stock structure in the squid *Loligo forbesi* (Steenstrup). *ICES Shellfish Committee C. M.* 238pp.
- O'Dor R.K., y N. Balch. 1985. Properties of *Illex illecebrosus* egg masses potentially influencing larval oceanographic distribution. *NAFO Sci Coun Stud* **9**:69-76
- O'Dor R.K. 1992. Big squid in big currents. *S Afr J Mar Sci* **12**:225-235



- Oosterhout C.V., W.F. Hutchinson, D.P. Wills y P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**:535-538.
- Paetkau, D. y C. Strobeck. 1995. The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. *Molecular Ecology* **4**:519-520.
- Peakall, R. y P.E. Smouse. 2006. Genalex 6: Genetic analysis in Excel. Population software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. **6**(1):288-295.
- Pearse, D. y K.A. Crandall. 2004. Beyond Fst: Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics*. **5**:585-602.
- Pearse D. E., Field, J. C, y Stierhoff, K. 2008. Application of molecular genetic methods to rockfish predation and habitat association research efforts in Central California. *Report to the Monterey Bay National Marine Sanctuary Sanctuary Integrated Monitoring Network (SIMoN) and Monterey Bay Sanctuary Foundation*.
- Pérez-Losada M., A. Guerra, G.R. Carvalho, A. Sanjuan y P.W. Shaw. 2002. Extensive population subdivision of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda) around the Iberian Peninsula indicated by microsatellite DNA variation. *Heredity* **89**:417-424.
- Pierce G.J. y A. Guerra. 1994. Stock assessment methods used for cephalopod fisheries. *Fisheries Research* **21**:255-285
- Ramirez, M., y Klett, A. (1985). Composición de tallas de la captura de calamar gigante en el Golfo de California durante 1981. *CIBCASIO Transactions* **10**:14pp
- Raymond, M. y F. Rousset. 1995. GENEPOP. 4.0. Population genetic software for exact test and ecumenism. *J. Hered.* **86**:248-249.
- Reichow D. y M.J. Smith. 2001. Microsatellites reveal high levels of gene flow among populations of the California squid *Loligo opalescens*. *Molecular Ecology* **10**:1101-1109.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical test. *Evolution*. **43**. 223-225.
- Rocha, F., A. Guerra y A.F. González. 2001. A review of reproductive strategies in cephalopods. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **76**(3), 291-304.
- Roeleveld M.A. 1988. Generic interrelationships within the Ommastrephidae (Cephalopoda). En: Clarke M.R y Trueman E.R (eds). *The Mollusca, Paleontology and Neontology of Cephalopods*. Academic Press, San Diego. **12**:277-291.



- Roper C. y R.E. Young. 1975. Vertical distribution of pelagic cephalopods. *Smithsonian contributions to zoology* **209**. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. 51pp
- Rosa, R., y B. Seibel. 2008. Synergistic effects of climate-related variables suggest future physiological impairment in a top oceanic predator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(52): 20776-20780.
- Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- Sambrook J, E.F Fritch y T. Maniatus. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sandoval-Castellanos E., M. Uribe-Alcocer y P. Díaz-Jaimes. 2007. Population genetic structure of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) evaluated by RAPD analysis. *Fisheries Research* **83**:113-118.
- Sandoval-Castellanos, E., M. Uribe-Alcocer, M. y P. Díaz-Jaimes. 2010. Population genetic structure of the Humboldt squid (*Dosidicus gigas* d'Orbigny, 1835) inferred by mitochondrial DNA analysis, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*
- Semmens J., G. Pecl, B. Gillanders, C. Waluda, E. Shea D. Jouffre, T. Ichii, K. Zumholz, O. Katugin, S. Leporati y P. Shaw. 2007. Approaches to resolving cephalopod movement and migration patterns. *Rev Fish Biol Fisheries* **17**:401-423.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* **18**:233-234.
- Shaw P.W. 1997. Polymorphic microsatellite markers in a cephalopod: the veined squid *Loligo forbesi*. *Molecular Ecology* **6**:297-298.
- Shaw P.W., G.J. Pierce y P.R. Boyle. 1999. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* **8**:407-417.
- Shaw P.W. y M. Pérez-Losada. 2000. Polymorphic microsatellites in the common cuttlefish *Sepia officinalis* (Cephalopoda). *Molecular Ecology* **9**:237-244.
- Shaw P.W. y G. J. Adcock. 2002. Polymorphic microsatellite DNA markers for the Patagonian squid *Loligo gahi* (Cephalopoda). *Molecular Ecology Notes* **2**:331-333.
- Shaw P.W. 2002. Past, present and future applications of DNA based markers in cephalopod biology: workshop report. *Bulletin of Marine Science* **71**(1): 67 -78.



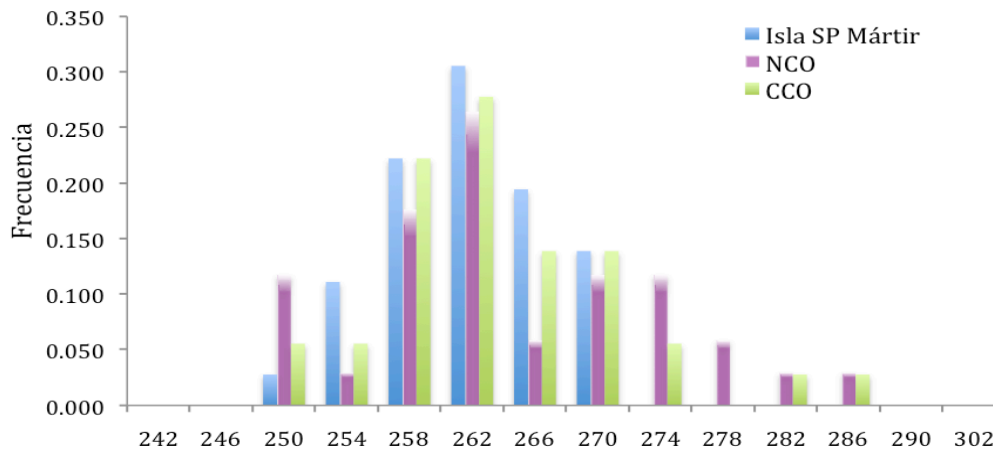
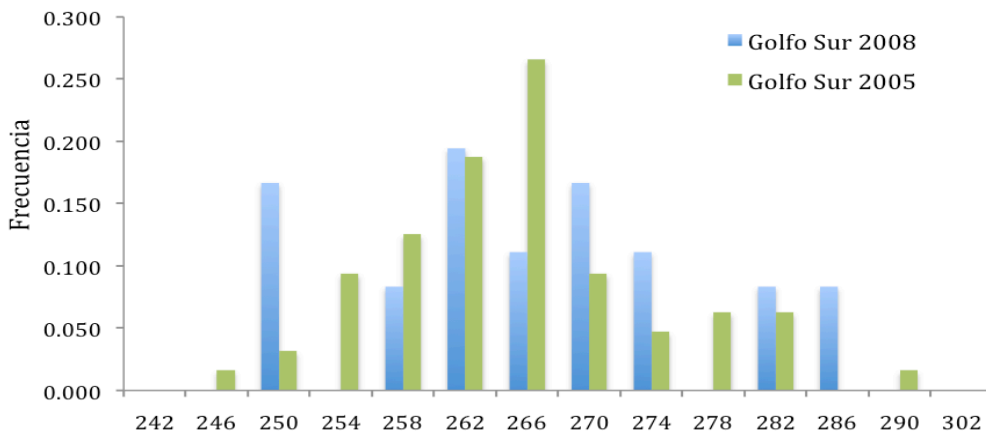
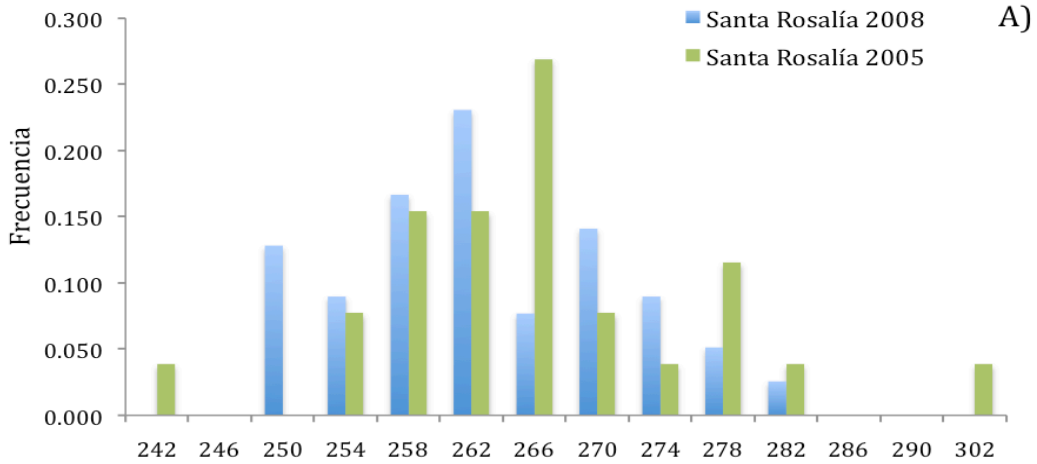
- Schlötterer C. y D. Tautz. 1991. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic acids Research* **20**(2):211-215p.
- Staaf, D.J., R.I. Ruiz-Cooley, C. Elliger, Z. Lebaric¹, B. Campos, U. Markaida y W. F. Gilly. (en prensa). Ommastrephid squids in the Central and Eastern Pacific show a convergent biogeographic break but contrasting population structures. *Marine Ecology Progress Series*.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* **139**(1):457-462.
- Stramma L., Johnson, G. C., Sprintall, J., y Mohrholz, V. 2008. Expanding Oxygen-Minimum Zones in the Tropical Oceans. *Science*, **320**: 655-658.
- Tafur, R., y M. Rabí. 1997. Reproduction of the jumbo flying squid, *Dosidicus gigas* (Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae) off Peruvian coasts. *Scientia Marina* **61**(2), 33-37.
- Toth, G., Z. Gáspari y J. Jurka. 2000. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research* **10**:967-981.
- Ward, R. 2000. Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia* **420**(1):191-201.
- Weir B.S., C. Cockerham. 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* **138**:1358-1370.
- Whitlock, M. y D. McCauley. 1999. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \approx 1/(4Nm+1)$. *Heredity* **82**:117-125.
- Zane L., L. Bargelloni y T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation a review. *Molecular Ecology* **11**, 1-16
- Zeidberg L.D., Robinson B.H. 2007. Invasive range expansion by the Humboldt squid, *Dosidicus gigas*, en the eastern North Pacific. *Proc Natl Acad Sci USA*. **104**(31):12948-12950p.
- Zuev, G.V., K.N. Nesis y Ch.M. Nigmatullin. 1975. Systematics and evolution of the squid genera Ommastrephes and Symplectoteuthis (Cephalopoda, Ommastrephidae). *Zoologichesky Zhurnal* **54**(10): 1468-1479.



ANEXO I

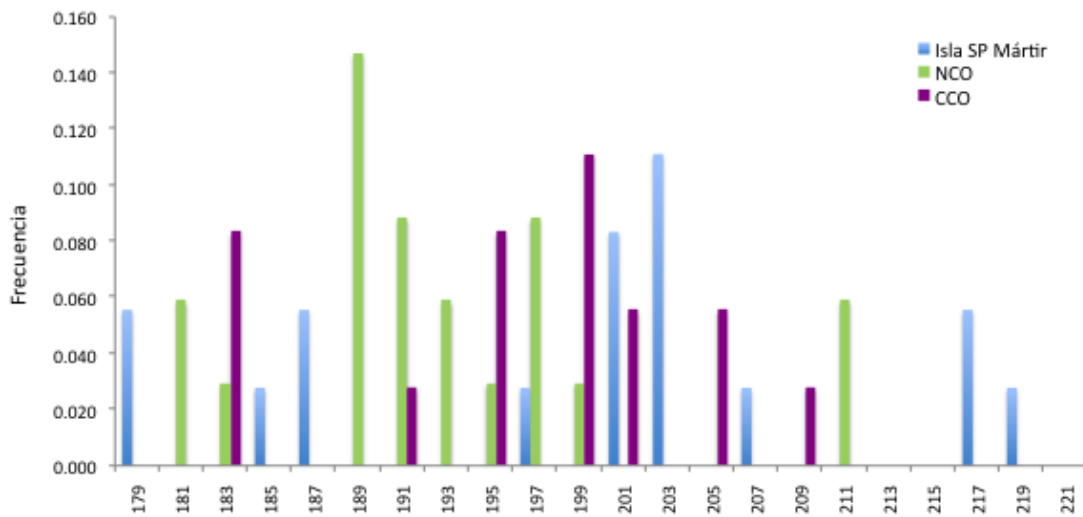
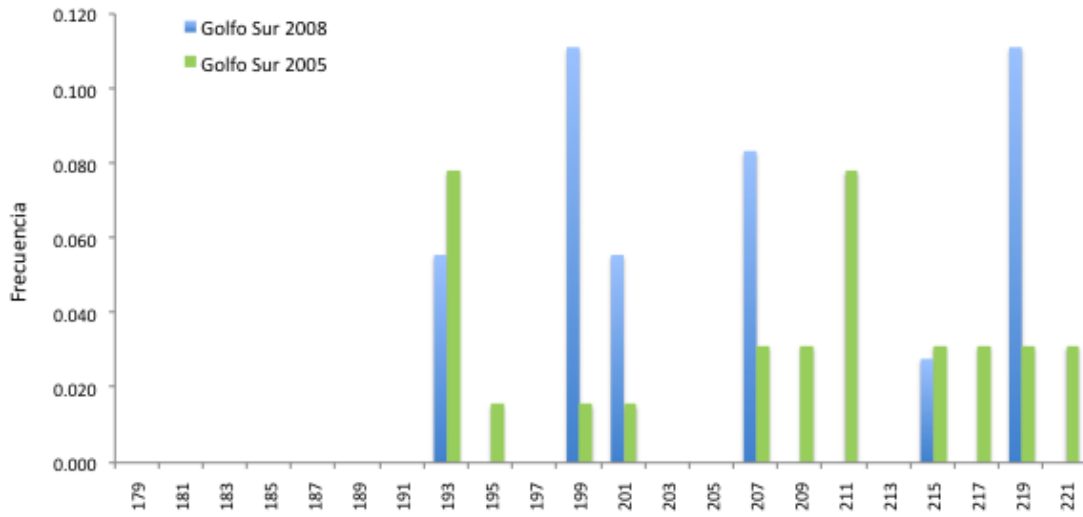
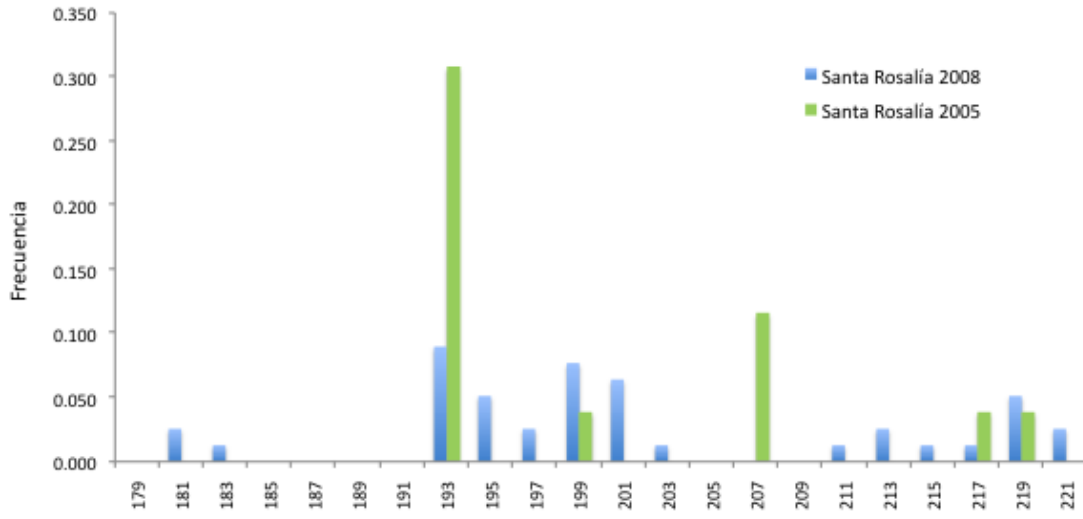
Frecuencia alélica por locus y por población:

A) Locus DGI_10



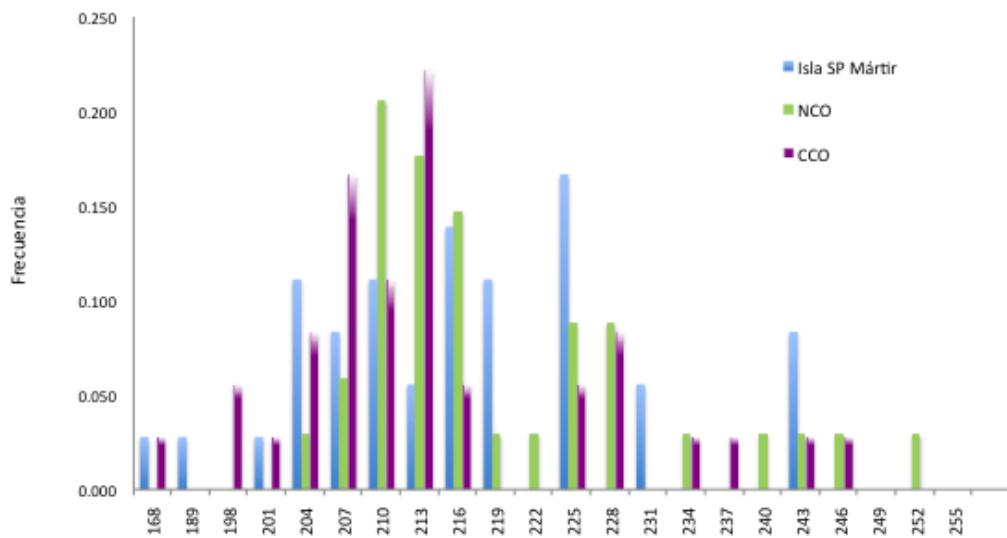
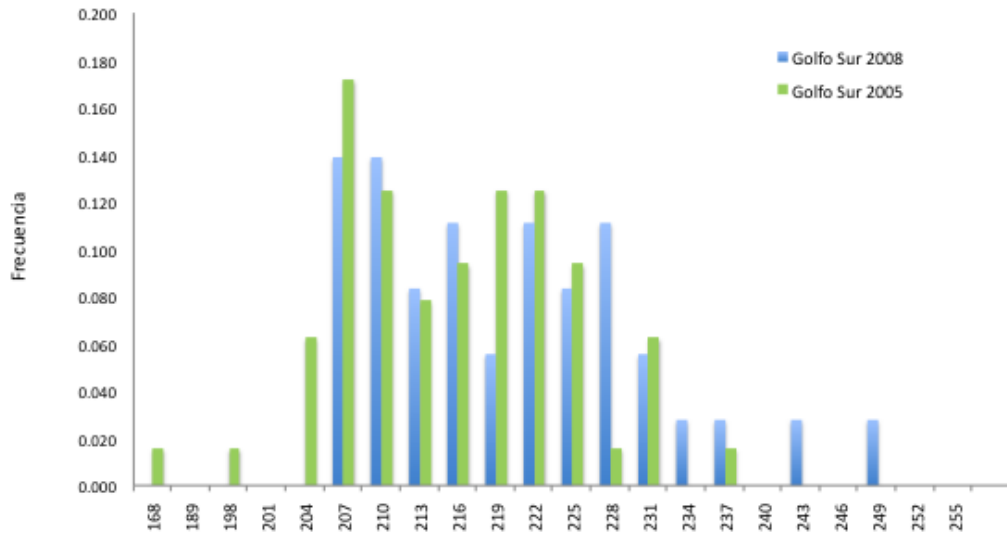
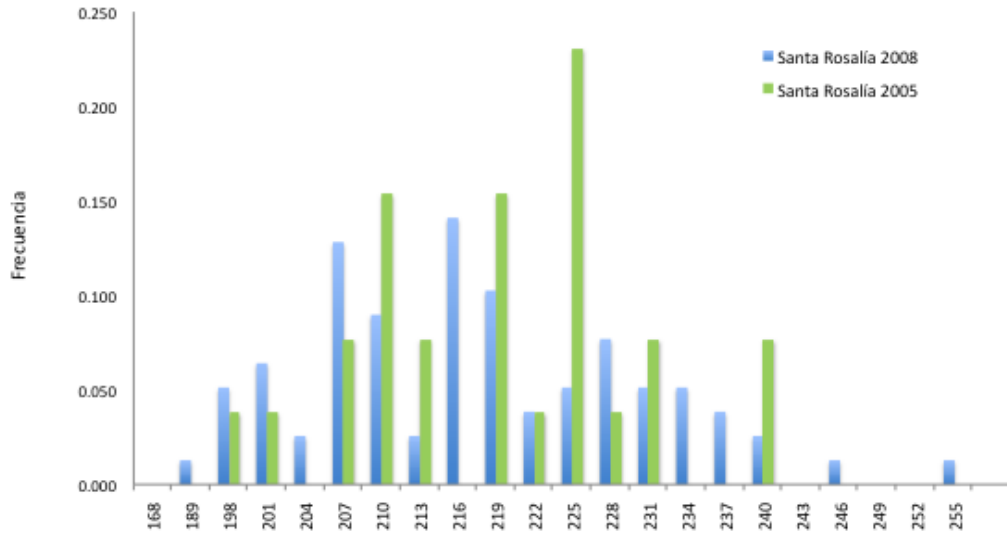


B) Locus DGI_68



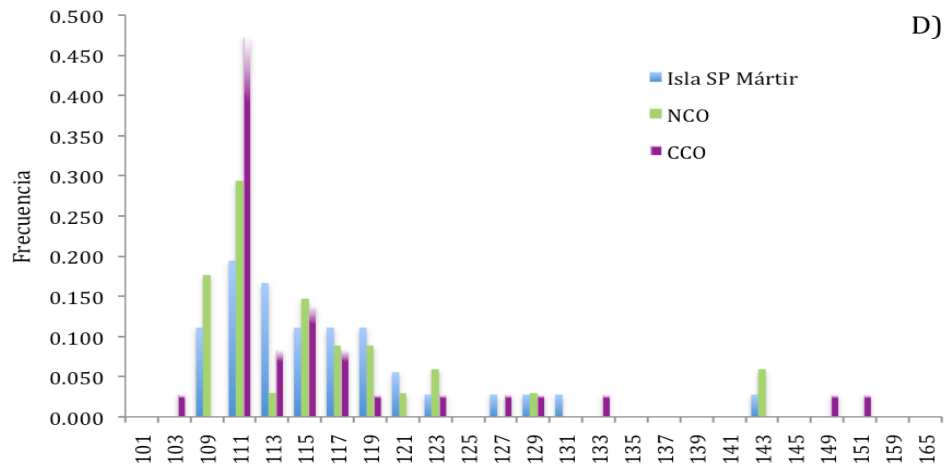
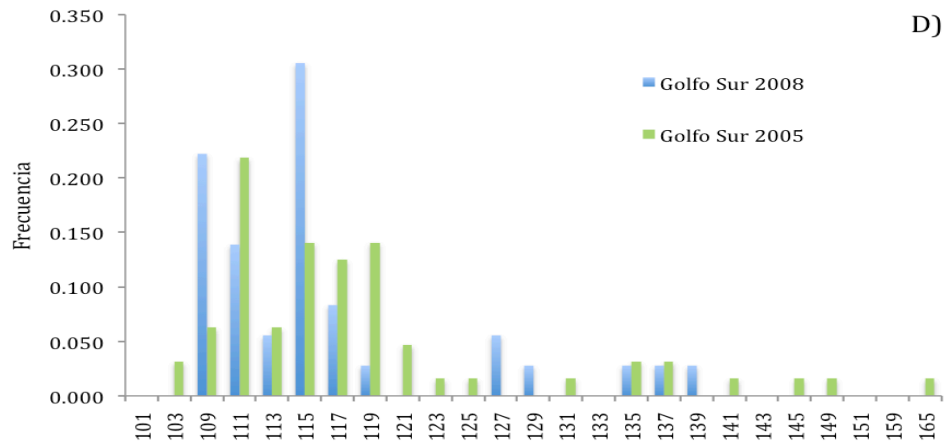
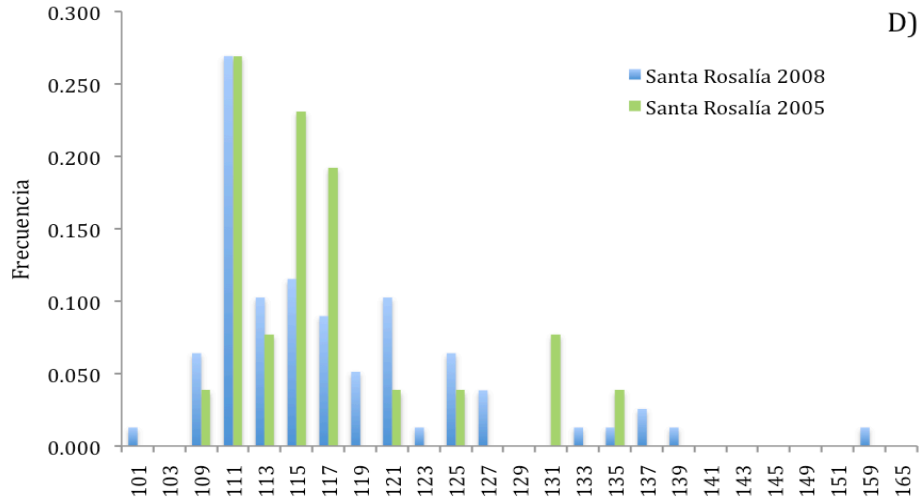


C) Locus DGI_85





D) Locus DGI_90





E) Locus DGI_11

