

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



Distribución actual y conectividad genética de poblaciones de pulpo en el noroeste de México

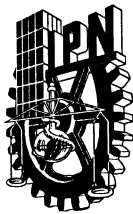
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

PRESENTA

JOSÉ FRANCISCO DOMÍNGUEZ CONTRERAS

LA PAZ, B.C.S., DICIEMBRE DE 2015.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 4 del mes de Diciembre del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

**"DISTRIBUCIÓN ACTUAL Y CONECTIVIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES
DE PULPO EN EL NOROESTE DE MÉXICO"**

Presentada por el alumno:

DOMÍNGUEZ

Apellido paterno

CONTRERAS

materno

JOSÉ FRANCISCO

nombre(s)

Con registro:

A	1	2	0	3	8	8
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

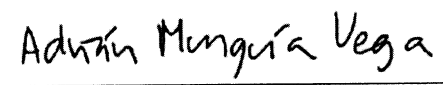
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

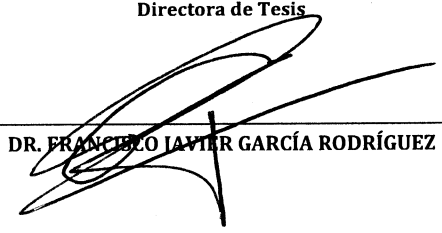
Directores de Tesis

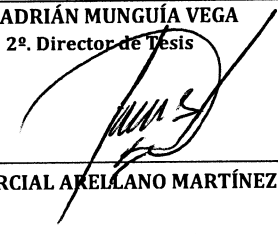

DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS VÁZQUEZ

Directora de Tesis


DR. ADRIÁN MUNGUÍA VEGA

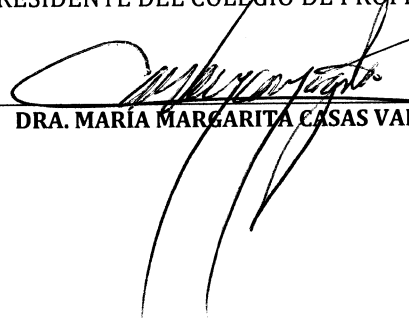
2º. Director de Tesis


DR. FRANCISCO JAVIER GARCÍA RODRÍGUEZ


DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ


DRA. MELANIE CULVER

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



I.P.N.
CICIMAR
DIRECCIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 10 del mes de Diciembre del año 2015

El (la) que suscribe MC. JOSÉ FRANCISCO DOMÍNGUEZ CONTRERAS Alumno (a) del Programa

DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

con número de registro A120388 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS VÁZQUEZ y DR. ADRIÁN MUNGUÍA VEGA

y cede los derechos del trabajo titulado:

"DISTRIBUCIÓN ACTUAL Y CONECTIVIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES

DE PULPO EN EL NOROESTE DE MÉXICO"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: fradoco@gmail.com - bceballo@ipn.mx - airdrian@email.arizona.edu

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

MC. JOSÉ FRANCISCO DOMÍNGUEZ CONTRERAS

Nombre y firma del alumno

Dedicatoria

A Jacsani y Samantha

A mis padres

A mis hermanas

Agradecimientos

El presente trabajo es el resultado del apoyo de diversas instituciones, personas y proyectos.

Agradezco extensamente al CONACyT y a BEIFI-IPN por soportar mis estudios por medio de una beca de manutención completa y al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional, por las facilidades que me brindó durante la realización de la presente tesis. También agradezco particularmente al Lic. Humberto Heleodoro Ceseña Amador del departamento de servicios educativos y a la Lic. María Magdalena Mendoza Tlapa de la subdirección académica y de Investigación por su total apoyo en trámites administrativos.

Agradezco profundamente a mis directores de tesis Dra. Patricia Ceballos y Dr. Adrian Munguía-Vega por alentarme, guiarme y apoyar siempre en esta y otras investigaciones, por su amistad.

También quiero agradecer a mi comité compuesto por Dr. Francisco Javier García Rodríguez, Dr. Marcial Arellano Martinez, Dra. Melanie Culver y Dr. José de la Cruz Agüero por su confianza, por su tiempo, sus alentadoras palabras y por hacer recomendaciones considerables durante la presente investigación.

Agradezco especialmente al Laboratorio de Genética a cargo del Dr. Francisco J. García-Rodríguez. Por permitirme desarrollar parte fundamental de esta investigación.

También agradezco muy sinceramente a al Laboratorio de Invertebrados Marinos y sus integrantes en su momento y previos, Alma Rivera, Josué, Marian y Nefertiti.

También agradezco a la gente de Arizona por todo su apoyo durante mis estancias en el Laboratorio de Genética para la Conservación. Dr. Melanie Culver, Alex Ochoa, Bob, Sophie, Erin, Ellie, John Clemons, y muy especialmente a Ashwin Naidu, Karla Vargas y Tavito por todo su apoyo y amistad.

Por la colecta de muestras agradezco a COBI, PRONATURA, CEDO, los pescadores de las Soc. Coop. Prod. Pesq. La Purísima (Bahía Tortugas), de Bahía Magdalena y de Puerto Chale. A los pescadores de San Quintín, Ejido Erendira, y especialmente a Ivoone Posada por su incondicional ayuda durante el muestre en Baja California.

Esta investigación fue parcialmente financiada por The David and Lucile Packard Foundation via the PANGAS project, Proyectos SIP: 20120971, 20121594, 20130059, 20130089, 20140465, 20140473, 20150117, 20150103, and 20150998. CONACyT 108230 y la Western Society of Malacologists.

A mis padres, Alma y Mauricio, por su amor.

Índice

Lista de Figuras	III
Lista de Tablas	V
Lista de Apéndices	VIII
Productos derivados de la tesis.....	IX
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XIII
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
Origen de los Cefalópodos.....	1
El problema y su contexto global	1
El uso de datos moleculares en cefalópodos.....	5
La situación actual de recurso pulpo en México	8
JUSTIFICACIÓN.....	11
OBJETIVO GENERAL.....	13
OBJETIVOS ESPECIFICOS	13
ÁREA DE ESTUDIO	14
Organización del manuscrito	17
Capítulo I: Diseño de marcadores microsatélites y ensamble del genoma mitocondrial de <i>Octopus bimaculatus</i> Verrill 1883.....	19
Caracterización de loci microsatélites del pulpo de dos puntos <i>Octopus bimaculatus</i> Verrill 1883 a partir de lecturas de pirosecuenciación	19
Introducción.....	20
Material y Métodos	21
Resultados y Discusión	23
Genoma mitocondrial completo de <i>Octopus bimaculatus</i> Verrill 1883 del Golfo de California.....	27
Introducción.....	28
Material y métodos	29
Resultados y Discusión	32
Capítulo II: Identificación y distribución de especies	36
Identificación y distribución poblacional actual de tres especies de pulpo en la costa noroeste del Pacífico Mexicano	36
Introducción.....	37
Material y Métodos	42

Resultados	46
Discusión.....	57
Capítulo III: Conectividad y genética poblacional de especies de pulpo.....	64
Conectividad genética de poblaciones de tres especies de pulpo en el noroeste de México.....	64
Introducción.....	65
Material y métodos	68
Resultados	74
Discusión.....	98
DISCUSIÓN INTEGRAL.....	109
CONCLUSIONES	114
BIBLIOGRAFÍA.....	120
Apéndices	136

Lista de Figuras

Figura 1. Toponimia de la zona de colecta de especies de pulpo en el noroeste de México. Todas (incluyendo estrella azul) las localidades con símbolo fueron muestreadas para análisis con loci microsatélites. La estrella azul muestra las localidades que fueron sometidas a análisis filogenético con fragmentos de los genes 16s ribosomal (16s) y Citocromo Oxidasa subunidad I (COI o Cox1) de ADN mitocondrial.	16
Figura 2. Fotografías de las gónadas maduras de <i>Octopus bimaculatus</i> (izquierda) y <i>Octopus bimaculoides</i> (derecha).	29
Figura 3. Distribución y arreglo de genes del mitogenoma de <i>Octopus bimaculatus</i> . Flechas Azules = genes que codifican proteínas, Flechas Rojas = Genes de transferencias (rrnL es 16s y rrnS es 12s. ARN ribosomales), La flecha rosada = VNTR.	33
Figura 4. Análisis filogenético bayesiano de 13 mitogenomas de cefalópodos (nautilus, calamares, sepias y pulpo). La escala debajo del árbol muestra la sustitución de nucleótidos.	35
Figura 5. Fotografías de las especies de pulpo más frecuentes en la captura de pulpo en el noroeste de México.	37
Figura 6. Distribución geográfica de las tres especies más frecuentes en las capturas del noroeste de México.	39
Figura 7. Árboles filogenéticos de las tres especies de pulpo en el Noroeste de México, utilizando secuencias de 16s (izquierda) y COI (derecha). Azul = <i>Octopus bimaculatus</i> , Morado = <i>Octopus bimaculoides</i> y Naranja = <i>Octopus hubbsorum</i>	47
Figura 8. Asignación de grupos (clústers) obtenidos de STRUCTURE y STRUCTURE HARVESTER. A, C y E, muestran la función promedio del Logaritmo de probabilidad poblacional, con valores promedio y desviación estándar. B, D y F muestran la función modal de Delta K, para obtener el K verdadero o el mejor K. A y B consideran los 7 loci. C, D, E y F consideran 6 loci y no consideran el locus Ocbi39. C y D es el modelo con condiciones por defecto de STRUCTURE (excepto iteraciones y MCMC) mientras que E y F consideran un modelo similar a A y B.	53
Figura 9. Gráfica de barras indicando la probabilidad de asignación de individuos de 10 réplicas independientes para K = 20 o 20 localidades. A) modelo conservativo K = 2, B) modelo libre K = 2 y C) modelo semi-conservativo K =3. Morado = <i>Octopus bimaculoides</i> , Azul = <i>Octopus bimaculatus</i> , y Naranja = <i>Octopus hubbsorum</i>	55
Figura 10. Distribución geográfica de las poblaciones de <i>O. bimaculatus</i> , <i>O. bimaculoides</i> y <i>O. hubbsorum</i> en el noroeste de México de acuerdo al análisis bayesiano de clúster obtenido de STRUCTURE.	56
Figura 11. Arreglo POOLPLEX diseñado en Multiplex para 15 loci microsatélites cargados con el primer universal M-13 y etiquetas fluorescentes.	69

Figura 12. Asignación de grupos (clúster) obtenidos de STRUCTURE e identificados por medio de CLUMPAK para determinar el delta K, Best K o mejor población. A) utilizando el modelo libre y B) utilizando el un modelo semi-conservativo (LocPrior).	79
Figura 13. Análisis de estructura poblacional para <i>Octopus bimaculatus</i> en el noroeste de México. A) Indica dos poblaciones (K=2) obtenida del modelo libre, y B) indica 5 poblaciones (K = 5) obtenida del modelo semi-conservativo.	80
Figura 14. Mapa de conectividad genética de <i>O. bimaculatus</i> calculado a partir de los datos de tasas de migración reciente BAYESASS.	82
Figura 15. Valores promedio de parentesco (r) pareado dentro de cada población. Las barras de error son los intervalos de confianza al 95%, determinados por re-muestreo de 1000 bootstraps. Los Limites de confianza azul y rojo son intervalos de confianza de 95% sobre la hipótesis nula de no diferencia o bien no parentesco en las poblaciones, este intervalo se determino con 9999 permutaciones.	83
Figura 16. Análisis de estructura poblacional para <i>Octopus bimaculoides</i> en la costa oeste de la península. A) Indica dos poblaciones (K=2) obtenida del modelo libre, y B) indica 2 poblaciones (K = 2) obtenida del modelo semi-conservativo.	87
Figura 17. Mapa de conectividad genética de <i>O. bimaculoides</i> calculado a partir de los datos de tasas de migración reciente BAYESASS.	88
Figura 18. Valores promedio de parentesco (r) pareado dentro de cada población de <i>Octopus bimaculoides</i> en la costa oeste de la península. Las barras son los intervalos de confianza al 95%, determinados por re-muestreo de 1000 bootstraps. Los Limites de confianza azul y rojo son intervalos de confianza de 95% sobre la hipótesis nula de no diferencia o bien no parentesco en las poblaciones, este intervalo se determinó con 9999 permutaciones.	89
Figura 19. Asignación de grupos (clúster) obtenidos de STRUCTURE en identificados por medio de CLUMPAK para determinar el delta K. A) es el mejor ajuste de K = 4 cuando se utilizó el modelo libre y B) es el mejor ajuste para identificar K = 3 cuando se utilizó un modelo semi-conservativo (LocPrior).	94
Figura 20. Análisis de estructura poblacional para <i>Octopus hubbsorum</i> . K = 4 indica cuatro poblaciones obtenida del modelo libre, y K = 3 indica tres poblaciones obtenida del modelo semi-conservativo. El número arriba de las gráficas indican el arreglo de matrices entre clústers.	95
Figura 21. Mapa de conectividad genética de <i>O. hubbsorum</i> calculado a partir de los datos de tasas de migración reciente BAYESASS.	96
Figura 22. Valores promedio de parentesco (r) pareado dentro de cada población de <i>Octopus hubbsorum</i> . Las barras de error son los intervalos de confianza al 95%, determinados por re-muestreo de 1000 bootstraps. Los Limites de confianza azul y rojo son intervalos de confianza de 95% sobre la hipótesis nula de no diferencia o bien no parentesco en las poblaciones, este intervalo se determino con 9999 permutaciones.	97

Lista de Tablas

Tabla I. Caracterización de 22 loci microsatélites en <i>Octopus bimaculatus</i> (n=32). Nombre del locus, número de acceso de Genbank motivo de repetición, tamaño esperado, rango observado, secuencias de cebadores F y R (5'- 3'), número de alelos (N_A), heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e).	24
Tabla II. Loci microsatélites de <i>Octopus bimaculatus</i> que amplificaron en <i>Octopus bimaculoides</i> (n=16) y <i>Octopus hubbsorum</i> (n=16). Nombre del locus, rango observado, número de alelos (N_A), heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e).	26
Tabla III. Primers específicos para terminar el ensamble del genoma mitocondrial completo de <i>O. bimaculatus</i>	30
Tabla IV. Anotaciones del genoma mitocondrial completo del pulpo de dos puntos (Gamban No. Acceso KT581981).	34
Tabla V. Divergencia genética entre especies de pulpo en el noroeste de México, identificadas por medio de fragmentos de secuencias 16s (debajo de la diagonal) y COI (arriba de la diagonal). El error estándar se muestra entre paréntesis	48
Tabla VI. Variación genética entre localidades para las tres especies. Tamaño de muestra (N), valores promedio y error estándar del número de alelos (N_A) número de alelos efectivos (N_E) heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e), riqueza alélica (R_A) y riqueza de alelos privado (R_{AP}).	49
Tabla VII. Análisis molecular de variancia para las tres especies de pulpo.	51
Tabla VIII. Diversidad genética de <i>Octopus bimaculatus</i> en la costa oeste de la península y Golfo de California, utilizando 15 loci microsatélites e Incluyendo el tamaño de muestra (N), número de alelos (N_A), número de alelos efectivos (N_e), alelos privados (AP), heterocigosidad Observada (H_o) y esperada (H_e). (Media $\pm$ Error Estandar).....	75
Tabla IX. Riqueza alélica (R_A) y riqueza de alelos privados (R_{AP}) después de la corrección de rarefacción por tamaño de muestra en poblaciones de <i>Octopus bimaculatus</i> , considerando un mínimo de 8 genes para todas las poblaciones. (Media $\pm$ Error Estándar).....	76
Tabla X. Diferenciación genética de poblaciones de <i>Octopus bimaculatus</i> en la costa oeste de la península (área gris) y el Golfo de California (área azul). Los valores de F_{st} por debajo de la diagonal no consideran los alelos nulos (logaritmo de ENA), los valores arriba de la diagonal consideran los alelos nulos.	76
Tabla XI. Diferenciación genética entre poblaciones de <i>Octopus bimaculatus</i> en la costa oeste de la península (área gris) y Golfo de California (área azul). Valores de F_{st} arriba de la diagonal y valores de Jost' D debajo de la diagonal. Los valores en negritas representan no diferencia significativa después de la corrección de Bonferroni ($P = 0.0014$).....	78

Tabla XII. Análisis molecular de varianza para poblaciones de <i>Octopus bimaculatus</i> en la costa oeste de la península y el Golfo de California.	79
Tabla XIII. Tasas de migración direccional ($\pm$ error estándar) entre poblaciones de <i>Octopus bimaculatus</i> en el noroeste de México obtenidas de BAYESASS.	81
Tabla XIV. Análisis de cuello de botella reciente para poblaciones de <i>Octopus bimaculatus</i> obtenido de BOTTLENECK. La tabla muestra la población, el tamaño de muestra (N), el número de alelos (Na), la heterocigosidad (He) y las pruebas de Significancia, desviación estandarizada de heterocigosidad y de Rangos de Wilcoxon.* desviación ($P < 0.08$).	84
Tabla XV. Diversidad genética de <i>Octopus bimaculoides</i> en la costa oeste de península, utilizando 15 loci microsatélites e incluyendo el tamaño de muestra (N), número de alelos (Na), número de alelos efectivos (Ne), alelos privados (AP), heterocigosidad Observada (Ho) y esperada (He). Corrección por Rarefacción de muestras con 12 genes, riqueza alélica (RA) y riqueza de alelos privados (RAP) (Media $\pm$ Erro Estándar).	85
Tabla XVI. Diferenciación genética de poblaciones de <i>Octopus bimaculoides</i> en la costa oeste de península. Los valores de Fst se muestran arriba de la diagonal. Los valores en negritas no consideran alelos nulos (FREENA). Corrección de Bonferroni ($P = 0.014$). Los valores por debajo de la diagonal pertenecen al estimador Jost' D.	86
Tabla XVII. Análisis molecular de varianza para poblaciones de <i>Octopus bimaculoides</i> en la costa oeste de la península.	86
Tabla XVIII. Estimación de delta K (best k) utilizando el método de Evanno et al. (2005), para los modelos libre y semi-conservativo.	87
Tabla XIX. Tasas de migración direccional entre poblaciones de <i>Octopus bimaculoides</i> (error estándar) obtenidas de BAYESASS. En negritas se muestra la tasa migración intrínseca por población. En gris se muestra valores más elevados entre poblaciones.	88
Tabla XX. Análisis de cuello de botella reciente para poblaciones de <i>Octopus bimaculoides</i> obtenido de BOTTLENECK. Heterocigosidad (He), prueba de Significancia (PS), desviación estandarizada de heterocigosidad (DEH) y Rangos de Wilcoxon (DEW). * desviación ($P < 0.08$).	90
Tabla XXI. Diversidad genética de <i>Octopus bimaculoides</i> en la costa oeste de la península y el Golfo de California, utilizando 7 loci microsatélites. Tamaño de muestra (N), número de alelos (Na), número de alelos efectivos (Ne), alelos privados (AP), heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He).	91
Tabla XXII. Corrección de rarefacción por tamaño de muestra de poblaciones de <i>Octopus bimaculoides</i> , considerando un mínimo de 10 genes para todas las poblaciones. Incluye la riqueza alélica y la riqueza de alelos privados.	92
Tabla XXIII. Diferenciación genética de poblaciones de <i>Octopus hubbsorum</i> en la costa oeste de la península y el Golfo de California. Los valores de Fst por debajo de	

la diagonal son corregidos utilizando el logaritmo de ENA y no consideran los alelos nulos, los valores arriba de la diagonal consideran los alelos nulos.	92
Tabla XXIV. Diferenciación genética entre poblaciones de <i>Octopus hubbsorum</i> en la costa oeste de la península y el Golfo de California. Los valores de F_{st} son mostrados por arriba de la diagonal, y el estimador Jost' D debajo de la diagonal. Corrección de Bonferroni ($P = 0.0033$).	93
Tabla XXV. Análisis molecular de varianza para poblaciones de <i>Octopus hubbsorum</i> . Grados de libertad (g.l) y (P) valor de significancia.	93
Tabla XXVI. Tasas de migración direccional entre poblaciones de <i>Octopus hubbsorum</i> (error estándar) obtenidas de BAYESASS.	95
Tabla XXVII. Análisis de cuello de botella reciente para poblaciones de <i>Octopus hubbsorum</i> . La tabla muestra la población, la heterocigosidad (H_e) y las pruebas de Significancia, desviación estandarizada de heterocigosidad y de Rangos de Wilcoxon . *desviación	98

Lista de Apéndices

Apéndice A. Desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (probabilidad y significancia) y prueba de alelos nulos por medio de expectativa de maximización de 20 localidades con 7 loci microsatélites. claves: ns=no significativo, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$	136
Apéndice B. Diferenciación genética pareada con y sin corrección por alelos nulos. Arriba de la diagonal muestra los valores de F_{ST} con la corrección de alelos nulos. Debajo de la diagonal muestra los valores de F_{ST} sin corrección de alelos nulos. Valores generados por el programa FREENA.....	140
Apéndice C. Diferenciación genética de especies de pulpo de 20 localidades en el Pacífico Mexicano. Arriba de la diagonal valores de F_{ST} , debajo de la diagonal estimaciones de Jost' D.	141
Apéndice D. Evaluación de 15 microsatélites por locus por población de <i>Octopus bimaculatus</i> . Locus, heterocigosidad Observada (H_o) y esperada (H_e), valores de P (Prob) para equilibrio de Hardy-Weinberg, Significancia (Signif) de EHW después de valor de corrección de Bonferroni ($P < 0.00037$) y valores de máxima expectativa (EM) para alelos nulos.	143
Apéndice E. Evaluación de 15 microsatélites por locus por población de <i>Octopus bimaculoides</i> . Locus, heterocigosidad Observada (H_o) y esperada (H_e), valores de P (Prob) para equilibrio de Hardy-Weinberg, Significancia (Signif) de EHW después de valor de corrección de Bonferroni ($P < 0.00037$) y valores de máxima expectativa (EM) para alelos nulos.	147
Apéndice F. Evaluación de 7 microsatélites por locus por población de <i>Octopus hubbsorum</i> . Locus, heterocigosidad Observada (H_o) y esperada (H_e), valores de P (Prob) para equilibrio de Hardy-Weinberg, Significancia (Signif) de EHW después de valor de corrección de Bonferroni ($P < 0.00037$) y valores de máxima expectativa (EM) para alelos nulos.	149

Productos derivados de la tesis

Publicaciones científicas

Domínguez-Contreras, J. F., A. Munguía-Vega, B. P. Ceballos-Vázquez, M. Arellano-Martínez, & M. Culver. **2014.** Characterization of microsatellite loci from two-spotted octopus *Octopus bimaculatus* Verrill 1883 from pyrosequencing reads. *Conservation Genetics Resources*. 6 (2):465-468. DOI: 10.1007/s12686-013-0128-x

Domínguez-Contreras, J. F., A. Munguia-Vega, B. P. Ceballos-Vázquez, F. J. García-Rodríguez, & M. Arellano-Martínez. **2015.** The complete mitochondrial genome of *Octopus bimaculatus* Verrill, 1883 from the Gulf of California. *Mitochondrial DNA*. Early On-line 1-2. DOI: 10.3109/19401736.2015.1101575

Domínguez-Contreras, J. F., A. Munguia-Vega, B. P. Ceballos-Vázquez, F. J. García-Rodríguez, M. Arellano-Martínez & M. Culver. Current population distribution of three species of octopus in the northwest Pacific Coast of Mexico. (En proceso).

Domínguez-Contreras, J. F., A. Munguia-Vega, B. P. Ceballos-Vázquez, M. Arellano-Martínez & M. Culver. Genetic and oceanographic connectivity of *Octopus bimaculatus* on the northwest coast of Mexico. (En proceso).

Domínguez-Contreras, J. F., A. Munguia-Vega, B. P. Ceballos-Vázquez, M. Arellano-Martínez & M. Culver. Structure and connectivity genetic of *Octopus bimaculoides* Pickford and McConnaughey 1949 on the Pacific coast of Baja California peninsula. (En proceso).

Domínguez-Contreras, J. F., A. Munguia-Vega, B. P. Ceballos-Vázquez, M. Arellano-Martínez & M. Culver. Structure genetic of *Octopus hubbsorum* Berry 1953 in the central Gulf of California. (En proceso).

Congresos

Domínguez-Contreras, J. F., A. Munguía-Vega, B. P. Ceballos-Vázquez, M. Arellano-Martínez, & M. Culver. **Characterization of microsatellite loci from two-spotted octopus *Octopus bimaculatus* Verrill 1883 from pyrosequencing reads.** Mollusca 2014. El encuentro de las Americas. Mexico D. F.

Estancias internacionales de Investigación

Optimize at least 20 markers from 40 individuals from one site during his first visit and publish a scientific note. In the Conservation Genetics Laboratory, School of Natural Resources and the Environment, at the University of Arizona, for the period from May 2013 to September 2013. Tucson, Arizona, Estados Unidos de America.

Estimate patterns of genetic structure and diversity, to analyze this genotypic data and help understand patterns of marine connectivity and adult and larval dispersal for the species. In the Conservation Genetics Laboratory, School of Natural Resources and the Environment, at the University of Arizona, for the period from May 2014 to September 2014. Tucson, Arizona, Estados Unidos de America.

Premios

Mejor proyecto de investigación financiado por la Western Society of Malacologists, Junio 2013. **Marine connectivity of octopus *Octopus bimaculatus* in the NW Mexican Pacific.**

RESUMEN

México es uno de los principales exportadores de pulpo a nivel mundial. Actualmente únicamente existen normas legales específicas que regulan su aprovechamiento en el Golfo de México y Mar Caribe. Sin embargo, estas normas no aplican para el Pacífico Mexicano. El problema principal es que se desconocen las especies y por lo tanto no se pueden evaluar sus poblaciones. La dificultad de identificación se debe principalmente a la inconsistencia de rasgos morfológicos entre las especies. Al respecto, las herramientas moleculares han sido utilizadas eficazmente en la identificación y distribución de las especies, así como en la evaluación de sus poblaciones. Ante el problema y la opción molecular, la presente investigación utilizó secuencias mitocondriales de 16s rARN y COI, para identificar especies de pulpo y en conjunto con microsatélites determinar su distribución, evaluar sus poblaciones y la conectividad genética por especie. Con ayuda de secuenciación masiva (454-ROCHE) se obtuvieron 22 loci microsatélites y se ensambló el genoma mitocondrial completo, este último se utilizó como referencia para las secuencias de 16s rARN y COI, que se desconocían para una de las especies. El análisis filogenético de 96 muestras en 12 localidades usando 16s rARN y COI mostró una diferencia filogenética para tres especies *Octopus bimaculatus*, *Octopus bimaculoides* y *Octopus hubbsorum* con una tasa de divergencia de 3.3% a 7.1% para 16s ARN y de 6.3 % a 10.4% para COI, siendo más cercanas *O. bimaculatus* y *O. bimaculoides* (16s ARN = 3.3% y COI 6.3%). Un análisis de clúster bayesiano con 316 muestras (incluyendo las 96 previas) en 20 poblaciones y 7 loci microsatélites compartidos entre las tres especies identificó 3 clúster propios de las 3 especies y determinó la distribución de las poblaciones por especie. Las tres especies se traslaparon alrededor de la región biogeográfica de Bahía Magdalena, mientras en el Golfo de California únicamente *O. bimaculatus* y *O. hubbsorum* se traslaparon alrededor de las grandes islas, la primera se asoció a un ambiente templado en el norte del golfo, mientras *O. hubbsorum* fue más tropical al sur de las islas. No hubo evidencia genética de la presencia de *O. bimaculoides* en el Golfo de California. Posteriormente con ayuda de los microsatélites por especie, se calcularon la diversidad, la estructura y la conectividad genética de las poblaciones. Para *O. bimaculatus* se utilizaron 15 loci microsatélites en nueve poblaciones, 3 de la costa oeste de la península y 6 en el Golfo de California. El análisis de estructura poblacional mostró 5 poblaciones bien definidas y se observó una significativa diferencia genética entre las poblaciones de ambas costas de la península, particularmente cuando se comparó a Malarrimo con las poblaciones del Golfo de California. Sin embargo, la estructura genética fue mayor en el Golfo de California encontrando un flujo de genes predominantemente unidireccional promovido principalmente por la circulación oceanográfica anticiclónica del norte del Golfo de California, durante las estaciones otoño-invierno cuando posiblemente eclosionen las

paralarvas de *O. bimaculatus*. Particularmente, Puerto Peñasco mostró evidencia de retención local de larvas y ser fuente de larvas para las demás poblaciones en el Golfo de California que mostraron a tendencia a reducir la diversidad genética. Dentro de las poblaciones sumidero se observaron algunas que presentan cuellos de botella recientes muy probablemente producto de una sobrepesca. Para *O. hubbsorum* con 7 microsatélites se observaron 3 poblaciones, de las cuales, Bahía Kino fue la fuente de larvas para el resto de las poblaciones incluyendo la costa oeste de península; mientras que Santa Rosalía fue la población sumidero con una diversidad genética alta. La mayor diversidad genética la presentó Puerto Libertad pero fue la de menor flujo genético con las demás poblaciones. La conectividad genética coincide con la circulación oceanográfica estacional del Golfo de California durante la temporada de eclosión de larvas. La población de El Conejo fue la única que presentó indicios de un cuello de botella reciente probablemente debido a una reciente expansión poblacional a partir de poblaciones genéticamente diferentes o explosiones intermitentes de heterocigosidad característico en especies que presentan paternidad múltiple. De acuerdo con la conectividad asimétrica de las poblaciones de ambas especies (*O. bimaculatus* y *O. hubbsorum*), el Golfo de California pudiera estar funcionando con un centro distribución de paralarvas para la costa oeste de la península. Para *O. bimaculoides* con 15 microsatélites, en 3 localidades, se observaron dos poblaciones bien definidas, de las cuales las dos más cercanas (Ejido Erendira y San Quintín) fueron más diferentes con respecto a la más lejana (Bahía Magdalena). Las tasas de flujo de genes con dirección sur a norte sobre la contracorriente de California respaldan la estructura observada. Sin embargo, esta especie no presenta paralarva, por lo que su conectividad pudiera estar llevándose a cabo por medio de vectores flotantes. Las poblaciones de San Quintín y Bahía Magdalena presentaron niveles bajos pero significativos de parentesco muy probablemente producto de su bajo potencial de dispersión y por ende el autoreclutamiento. Bahía Magdalena tiene indicios de cuellos de botella reciente y los niveles más bajos de diversidad genética probablemente debido al elevado autoreclutamiento y la sobrepesca. La presente investigación tiene implicaciones esenciales en el manejo de la pesquería de pulpo en el noroeste de México.

ABSTRACT

Mexico is one of the leading exporters of octopus worldwide. Currently there are only specific national laws to regulate its use in the Gulf of Mexico and Caribbean Sea. However, these rules do not apply to the Mexican Pacific. The main problem is that species are unknown and therefore can not be assessed populations. Identification difficulty is mainly due to the inconsistency of morphological traits between species. In this regard, the molecular tools have been used effectively in the identification and distribution of species, as well as in the evaluation of their populations. Faced with the problem and molecular option, the present study used mitochondrial sequences of 16S rRNA and COI, to identify species of octopus and in conjunction with microsatellite determine their distribution, to evaluate their populations and genetic connectivity species. Using high throughput sequence (454-ROCHE), 22 microsatellite loci were obtained and the complete mitochondrial genome was assembled, the latter was used as a reference for 16S rRNA sequences and COI, which were unknown to one of the species. Phylogenetic analysis of 96 samples in 12 locations using 16S rRNA and COI showed a phylogenetic difference for three species *Octopus bimaculatus*, *Octopus bimaculoides* and *Octopus hubbsorum* a divergence rate of 3.3% to 7.1% for 16s RNA and 6.3% to 10.4% for IOC, being closest *O. bimaculatus* and *O. bimaculoides* (16S RNA = 3.3% and 6.3% COI). Bayesian cluster analysis with 316 samples (including the previous 96) in 20 towns and 7 microsatellite loci shared among the three species identified three own cluster of 3 species and determined the distribution of populations by species. The three species overlapped around the biogeographic region of Bahía Magdalena, while in the Gulf of California only *O. bimaculatus* and *O. hubbsorum* overlapped around large islands, the first was associated to temperate environment in the northern Gulf, whereas *O. hubbsorum* was more tropical south of the islands. There was no genetic evidence for the presence of *O. bimaculoides* in the Gulf. Later with the help of microsatellites by species diversity, genetic structure and connectivity of populations were calculated. To *O. bimaculatus* 15 microsatellite loci were used in nine populations, 3 of the west coast of the peninsula and 6 in the Gulf of California. The population structure analysis showed five distinct populations and a significant genetic difference between populations on both coasts of the peninsula, particularly when compared to Malarrimo with Gulf of California populations. However, the genetic structure was higher in the Gulf of California found predominantly unidirectional flow of genes promoted mainly by the anticyclonic circulation oceanographic in the northern Gulf of California, during the fall and winter seasons when possibly hatch paralarvae *O. bimaculatus*. Particularly, Puerto Peñasco showed evidence of local retention of larvae and a source of larvae for other populations in the Gulf of California that showed a tendency to reduce genetic diversity. Among the sink populations that have some bottle necks recent product likely overfishing were

observed. To *O. hubbsorum* with 7 microsatellite, three populations were observed which Bahía Kino was the source of larvae for other populations including the west coast of peninsula; while Santa Rosalia was the sink population with a high genetic diversity. The greater genetic diversity was observed in Puerto Libertad but it presented the lowest genetic flow with other populations. Genetic connectivity coincides with the seasonal oceanographic circulation of the Gulf of California during the hatching season larvae. The population of El Conejo was the only with indications of a recent bottleneck probably due to a recent population expansion from genetically different populations or intermittent explosions heterozygosity, characteristic in species with multiple paternity. According to the asymmetric connectivity of populations of both species (*O. bimaculatus* and *O. hubbsorum*), the Gulf of California might be running a paralarvae distribution center for the west coast of the peninsula. To *O. bimaculoides* with 15 microsatellites in 3 locations, two distinct populations were observed, of which the two closest (Ejido Erendira and San Quintin) were more different with respect to the farthest (Magdalena Bay). Rates of gene flow south toward northern California on the counter support the observed structure. However, this species is not paralarva, so connectivity could be taking place through floating vectors. The populations of Bahía Magdalena and San Quintin had low but significant levels of relationship most likely product of its low potential for dispersion and therefore the self recruitment. Bahía Magdalena is recent evidence of bottle necks and lower levels of genetic diversity, probably due to the high self recruitment and overfishing. This research has essential implications for the management of the fishery for octopus in northwestern Mexico.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Origen de los Cefalópodos

El Phylum Mollusca contiene algunos de los invertebrados más conocidos. Existen alrededor de 50,000 especies descritas y su diversidad se distribuye aproximadamente en 8 clases (Caudofoveata, Aplacophora, Monoplacophora, Polyplacophora, Gastropoda, Bivalvia, Scaphopoda y Cephalopoda) (Brusca & Brusca 1990). De éstas, la clase Cephalopoda se originó hace unos 530 Millones de años durante el Cámbrico, a partir de un molusco con apariencia de monoplacóforo. A mediados del Paleozoico (~416 Ma), los cefalópodos divergieron en dos subclases: Nautiloidea (género “Nautilus”) y los actualmente dominantes Coloidea (pulpos, calamares y sepias) (Strugnell et al. 2005, Kroger et al. 2011). Los coleoideos se bifurcaron en Decapodiformes y Octopodiformes, diferenciados por el número de brazos (10 y 8, respectivamente) (Kroger et al. 2011). Dentro de los Decapodiformes se encuentran los calamares y sepias principalmente, mientras que los vampiromorfos (Orden Vampyromorpha) y los octópodos (Orden Octopoda) componen a los Octopodiformes. Este último se divide en subordenes Cirrata (pulpos con aletas y de profundidad) e Incirrata (pulpos bentónicos y pelágicos) (Young & Vecchione 1996).

El problema y su contexto global

Los pulpos se distribuyen ampliamente en los océanos del mundo desde los polos hasta los trópicos, y los más comunes son aquellos de hábitos bentónicos que ocurren desde la zona inter-mareal hasta zonas profundas. Sin embargo, también los hay de ambientes pelágicos (Boyle & vonBoletzky 1996). En general, todos se caracterizan por presentar ocho brazos cubiertos de ventosas sobre la parte ventral, las cuales carecen de pedúnculos y de estructuras duras o quitinosas sobre ellas (como en el caso de la mayoría de los calamares). Presentan estructuras cartilaginosas como vestigios de una concha interna. Algo particular que distingue al Suborden Incirrina, es que los organismos carecen de cirros y al menos cuatro familias son representativas por un hectocótilo en uno de los brazos de los machos (Boyle & Rodhouse 2005).

La presencia de hectocótilo y el estar asociados completamente al bentos son características específicas de los pulpos de la familia Octopodidae, la cual es la más diversa de las familias (Boyle & Rodhouse 2005), con 374 nombres de especies, de los cuales solo 186 (49.7%) son considerados válidos y 102 (27%) son considerados como sinónimos de otras especies. El resto de los nombres (23.3%) son catalogados como no resueltos. No obstante aún se cree que el número de especies para esta familia ha sido subestimado, con base en registros de datos y observaciones de más de 150 especímenes no identificados en museos, lo que sugiere que la tasa a la cual las especies son descubiertas, es mayor a la tasa a la cual están siendo descritas (Norman & Hochberg 2005).

Entre los factores más relevantes que influyen la mala o nula identificación de cefalópodos en general, destacan aquellos de carácter taxonómico, tales como: falta de estudios morfométricos, material inadecuado para el estudio (especímenes en mal estado), la carente evaluación de especímenes tipo, que en conjunto con una prevalencia de literatura sin crítica, hacen que los errores históricos continúen perpetuándose (Norman & Hochberg 2005). También destacan los de carácter académico, tales como: la poca retención de material, pocas réplicas por sitios y/o sitios insuficientes, una mala curación (fijación), la falta de caracteres definidos, la falta de escuela o descendencia de expertos en cefalópodos hacia discípulos que trabajen o actualicen las colecciones de cefalópodos del mundo (Norman & Hochberg 2005).

Aun con el latente problema taxonómico, la demanda de información es mayor que nunca, a medida que las capturas de peces están colapsando alrededor del mundo, la atención de la pesca comercial se ha desplazado hacia la explotación de recursos de niveles tróficos inferiores, pero con valores en el mercado similares o superiores al de los peces, como los cefalópodos (Watson & Pauly 2001, Arkhipkin et al. 2015), los cuales, por las características biológicas tales como un rápido crecimiento y una elevada fecundidad, los hace favorables y por ende objetivos de pesca (Arkhipkin et al. 2015). Sin embargo, la capacidad de las autoridades para el efectivo manejo del recurso pulpo está severamente obstaculizada no solo por el

problema de la identificación, sino también por estadísticas pesqueras inadecuadas (esto incluye la falta de CPUE) (Watson & Pauly 2001), escasas de información biológica para especies objetivo, falta de censos detallados a nivel regional (o incluso la falta integral de estudios de mercado) (Pauly et al. 2002, Norman & Hochberg 2005). Aún así, se ha sugerido que los cefalópodos son uno de los últimos recursos marinos capaces de soportar la sustancial expansión de la descarga pesquera, por lo que se espera que las capturas se incrementen a niveles tróficos más bajos y sobre especies de menor valor comercial como una respuesta a la creciente demanda de recursos marinos (Hunsicker et al. 2010).

La pesquería de cefalópodos a nivel mundial ha incrementado dramáticamente en recientes décadas (FAO 2015). Actualmente, la captura de cefalópodos contribuye a las pesquerías marinas globales entre el 15% y el 20% de la descarga pesquera y una derrama económica muy similar al mismo nivel. Hasta el 2012 se registraron hasta 4 millones de toneladas; captura que está compuesta principalmente por unas 290 especies de calamares, de las cuales, unas 30 o 40 especies son las más representativas; sin embargo aún siendo las especies clave de sus capturas se sabe que cerca del 20% o 30%, son de cefalópodos que no son identificados (Arkhipkin et al. 2015).

La captura de pulpo no es tan significativa como la del calamar, probablemente por su pesca no tan industrializada y más dirigida hacia el consumo local, considerándose como una pesquería artesanal o local (Berkes et al. 2001, Finkbeiner & Basurto 2015). No obstante, la producción global de la especie *Octopus vulgaris*, según la FAO (2015), ha incrementado considerablemente de 3,500 ton en 1950-1970, hasta un promedio de 60,000 ton anuales (1972-2013). Desde el 2003 a 2013 los países con mayor producción promedio anual de pulpo (sin considerar especies) han sido México (14,906 ton, 36%), España (7,127 ton, 17%), Portugal (6,277 ton, 15%) e Italia (5,033 ton, 12%) (FAO 2015).

Octopus vulgaris ha sido la especie de pulpo más estudiada a nivel mundial posiblemente por su aparente amplia distribución, la cual abarca ambas costas del atlántico incluyendo el Mar Mediterráneo, costas del océano Índico y del Pacífico

occidental (Belcari et al. 2002, Katsanevakis & Verriopoulos 2006, Teske et al. 2007, Guerra et al. 2010b, Sales et al. 2013, De Luca et al. 2014c). Sin embargo su supuesta distribución ha permanecido en conflicto, incluso hoy en día las discusiones específicas sobre su identificación taxonómica y molecular ha llevado a los investigadores de los distintos países a denominar un “Complejo de especies de *Octopus vulgaris*” (Warnke et al. 2004, De Luca et al. 2014c).

Pero, ¿qué tipo de implicaciones tendría considerar un complejo como el de *Octopus vulgaris*? Según Garcia-Vazquez et al. (2012) estar capturando una especie diferente a la especie objetivo, puede llevar a decisiones de manejo incorrectas y poner en peligro a las poblaciones explotadas a largo plazo; principalmente por los errores en las estimaciones de tasa de explotación cuando éstas se basan en los datos de captura reportados. Principalmente, por la inflación en las estimaciones de captura para la mayoría de las especies deseables, y simultáneamente un sub-registro o no registro de captura para las especies menos deseables y que potencialmente no están siendo administradas (Marko et al. 2004). Todo esto conlleva una reducción en la efectividad de la conservación marina y los programas de manejo que ayudan a proteger los hábitats marinos y las especie en peligro (Rasmussen & Morrissey 2008).

Debido a que el precursor necesario del manejo es definir la identidad y la distribución de la población sobre la cual la pesquería toma lugar, es necesario conocer los métodos de evaluación poblacional de cefalópodos, los cuales incluyen: relación población reclutamiento, índices de reclutamiento, estimaciones de biomasa por barrido de áreas (arrastres planctónicos), modelos de producción, análisis de cohortes, modelos de rendimiento por reclutamiento, análisis de cohortes basados en la talla (longitud) y estimaciones del descenso del tamaño del stock (Pierce & Guerra 1994). A pesar de las múltiples técnicas de evaluación, pocas pesquerías de cefalópodos cuentan con una estrategia de manejo, ya que la evaluación analítica actualmente es considerada impráctica debido a la poca información que se obtiene de las pesquerías y la fuerte demanda datos que se asocian directamente con ciclo

de vida el cual limita el acceso a estos principalmente por la semelparidad, característica de los cefalópodos (Guerra et al. 2010a).

Un ciclo de vida corto (aproximadamente 1-2 años) y un único evento de desove (semelparidad) son adaptaciones evolutivas para el oportunismo ecológico, permitiendo a las poblaciones expandirse rápidamente cuando las condiciones ambientales son favorables, pero también llevan a un decline rápido cuando las condiciones no lo son (Rocha et al. 2001, Boyle & Rodhouse 2005, Rodhouse 2010). El tamaño de las poblaciones de cefalópodos es por lo tanto frecuentemente variable en escalas de tiempo anual resultando en la variabilidad del reclutamiento impulsada por el medio ambiente. Eventos excepcionales de reclutamiento dan lugar a plagas y extensiones en el rango de distribución, pero tal variabilidad provee retos para evaluar stocks y el manejo de las pesquerías de cefalópodos (Rodhouse 2010, Rodhouse et al. 2014). Al respecto, los análisis genéticos tienen mucho que ofrecer en el manejo de las pesquerías, especialmente en la provisión de herramientas de etiquetado inequívoco (o sumamente preciso) en la identificación de especímenes y la evaluación de la estructura de un stock (Ward 2000).

El uso de datos moleculares en cefalópodos

Los cefalópodos contemplan dos problemas esenciales y actuales; la identificación de especies y la evaluación de sus poblaciones (Boyle & vonBoletzky 1996, Boyle & Rodhouse 2005, Rodhouse et al. 2014), los cuales no hace más de 20 años han sido abordados por medio del uso de marcadores moleculares basados en ADN, como una herramienta alternativa para los datos obtenidos de pesquerías, con resultados relevantes mediante análisis filogenéticos y poblacionales (Shaw 2002).

Entre los marcadores moleculares están los basados en ADN mitocondrial preferencialmente para análisis filogenéticos y los de origen nuclear para análisis de poblaciones. De los marcadores mitocondriales, un fragmento del 16s rRNA, ha mostrado ser prometedor para determinar relaciones taxonómicas desde su primer uso en cefalópodos (Bonnaud et al. 1994, 1997) y específicamente en octópodos

(Allcock & Piertney 2002, Piertney et al. 2003). Las subunidades Citocromo Oxidasa I y III (COI, COIII), también han sido clave en el desarrollo del conocimiento filogenético de cefalópodos, tanto en calamares como en pulpos (Sosa et al. 1995, Bonnaud et al. 1997). La filogenética, además de ayudar a definir un estatus taxonómico, también ha sido práctica en la definición histórica de las poblaciones, la definición de límites geográficos entre especies o poblaciones y muy recientemente en la comparación de genomas (Yang & Rannala 2012).

Octopus vulgaris continua siendo la especie de pulpo más estudiada, debido a su gran aprovechamiento como fuente alimenticia y su potencial distribución cosmopolita. Sin embargo, su distribución ha sido cuestionada desde su descripción, presumiblemente en el mar mediterráneo por Cuvier en 1797, ya que actualmente no se cuenta con el organismo original o tipo (Norman et al. 2014). Al respecto, varios estudios han utilizado herramientas moleculares con la finalidad de definir las relaciones entre pulpos que estuvieron o están bajo el nombre de *O. vulgaris*. Por ejemplo, los estudios de Soller et al. (2000) utilizando secuencias de 16s rRNA, lograron diferenciar a *Octopus mimus*, la cual se distribuye en las costas del Pacífico sureste. Warnke et al. (2004) usando secuencias mitocondriales 16s rRNA y COIII, concluyeron que dos taxa de la costa noreste de Brasil, coincidían molecularmente con especímenes del Océano Atlántico, de Sudáfrica y del Pacífico noroeste (Japón y Taiwán, provincia de China) para la especie *O. vulgaris*, enfatizando su distribución alrededor del mundo. Posteriormente, Leite et al. (2008) utilizando caracteres morfológicos y datos moleculares describió uno de los taxa brasileños como una nueva especie *Octopus insularis*, también corroborado por Sales et al. (2013) (16s rRNA y COI). Recientemente, Guerra et al. (2010b) usando COI y COIII identificó a *O. vulgaris* en Ámsterdam e Islas Saint Paul, ampliando su rango de distribución. En la actualidad, como parte de un acuerdo entre investigadores, el grupo o complejo de especies catalogadas como *Octopus vulgaris*, es tratado conforme a su distribución geográfica como sigue: *Octopus vulgaris sensu stricto*, tipos I, II, III y IV Mar Mediterráneo (océano Atlántico Centro y noreste), océano Atlántico centro tropical oeste, océano Atlántico subtropical sur-oeste: Brasil, Sudáfrica templado y océano

Indico sur, y por último este de Asia subtropical-templado, respectivamente (De Luca et al. 2014c, Norman et al. 2014).

Boyle & Rodhouse (2005), mencionan que los conceptos de stock en pesquerías, aún se encuentran basados convencionalmente en el criterio de identificación de especie y la ubicación espacio-temporal de cantidades pescables. Los métodos moleculares principalmente los microsatélites, los cuales, aplicados en combinación con un claro reconocimiento de localidades de apareamiento y rutas migratorias, suministren una aproximación robusta para estudios poblacionales. El progreso en el desarrollo de marcadores moleculares para estudios poblacionales debería ser un gran acierto para aproximaciones fundamentales en la dinámica de poblaciones y para su aplicación práctica para los stocks de captura.

El diseño de marcadores moleculares, particularmente los microsatélites para cefalópodos se ha llevado a cabo en años recientes: *Loligo opalescens* (Reichow & Smith 1999), *Octopus vulgaris* (Greatorex et al. 2000, Zuo et al. 2011, De Luca et al. 2014a), *Adelieledone polymorpha* (Strugnell et al. 2009a), *Graneledone boreopacifica* (Voight & Feldheim 2009) *Octopus mimus* (Galleguillos et al. 2011), *Enteroctopus dofleini* (Toussaint et al. 2012), *Octopus minor* (Kang et al. 2012), entre otros.

El uso reciente de microsatélites ha sido más evidente en calamares (Shaw 2002, Garoia et al. 2004, Shaw et al. 2004, Shaw et al. 2010), sepias (Perez-Losada et al. 2002a, Moghadam et al. 2015) y muy recientemente en *Nautilus pompilius* (Williams et al. 2015).

Octopus vulgaris cuenta con la mayor parte de estudios como resultado de los microsatélites diseñados por Greatorex et al. (2000), los cuales fueron utilizados para evaluar poblaciones entre diferentes puntos geográficos, tales como: la costas del Atlántico y el Mar Mediterráneo (Casu et al. 2002), sobre la costa noroeste de África para evaluar stocks pesqueros (Murphy et al. 2002), así como entre Islas Canarias y la península Ibérica (Cabranes et al. 2008), y en la costa sureste de Brasil (Moreira et al. 2011). Todos estos estudios, encontraron diferencias entre poblaciones independientemente del número de loci (1 - 6) y tamaño muestra utilizado, sugiriendo

que el manejo de su pesquería debería de ser específico por área o stock; principalmente en aquellas poblaciones que muestren diferencia genética significativa. Recientemente Zuo et al. (2011) y De Luca et al. (2014a) caracterizaron 17 y 10 nuevos microsatélites respectivamente, sin embargo estos no han sido probados a nivel poblacional.

Los marcadores diseñados por Greatorex et al. (2000) también han sido probados en la especie *Octopus maya* para la península de Yucatán por Juárez et al. (2010), sin embargo ellos no permitieron concluir con certeza la diferencia poblacional debido al bajo número de microsatélites utilizados, por lo que se abstuvieron de plantear un manejo pesquero distinto al actual. Al respecto, Juárez et al. (2013) desarrollaron 10 nuevos microsatélites específicos para *O. Maya*, pero tampoco se han probado a nivel poblacional.

Entre los estudios de genética poblacional de pulpo más recientes están los realizados en *Octopus minor* con los que se sugiere que las poblaciones de China y Corea son poblaciones distintas y proponen que deben ser tratadas como unidades de manejo independientes (Kang et al. 2012). Esta misma conclusión fue sugerida por Larson et al. (2015) para *Enteroctopus dofleini* entre las costas de Oregón, Washington y la costa sureste de la Isla Vancouver.

La situación actual de recurso pulpo en México

Según la FAO (2015) México ha alcanzado una producción acumulada de ~160,000 ton (2003-2013), con un promedio anual de ~ 16,000 ton, colocando a México en primer lugar de producción de pulpo (no menciona especies). Arreguín-Sánchez et al. (2000) consideraron que el 80% de la pesquería de pulpo está compuesta principalmente por *O. maya* y que el 20% por *O. vulgaris*. Las áreas de pesca de estas especies en México están en los estados de la península de Yucatán: Yucatán, Campeche y Quintana Roo, y que la flota de pesca es industrial y artesanal. Actualmente existen dos normas oficiales mexicanas dedicadas al manejo de la pesquería de pulpo: NOM-008-PESC-1993 y NOM-009-PESC-1993. La primera

establece la talla mínima de manto de 110 mm y prohíbe el uso de ganchos y fisgas (Jurado-Molina 2010, CONAPESCA 2014). La segunda norma es general, y establece la necesidad de crear vedas en las aguas mexicanas para cualquier organismo (flora y fauna) en aguas de jurisdicción mexicana. Al respecto, la veda realmente conocida es la de *O. maya* (16 diciembre - 31 Julio), y en sí la NOM-008-PESC-1993 únicamente aplica para las especies de pulpo que se distribuyen en aguas del Golfo de México y Mar Caribe (CONAPESCA 2014), dejando expuestas a las especies y poblaciones de pulpo que se distribuyen en el Pacífico mexicano.

Las diez especies de pulpo registradas en el Pacífico mexicano fueron descritas hace mas de 50 años, entre estas se encuentran: *Octopus bimaculatus* Verrill 1883, *Octopus chierchiae* Jatta 1889, *Octopus digueti* Perrier y Rocheburne 1894, *Octopus bimaculoides* Pickford y McConnaughey 1949, y los pulpos de Berry 1953, *Octopus alecto*, *Octopus fitchi*, *Octopus hubbsorum*, *Octopus veligero*, *Octopus rubescens* y *Octopus penicillifer* (Berry 1953, Brusca 1980, Norman et al. 2014). Todos los nombres de las especies han sido catalogados como validos (Norman & Hochberg 2005, Norman et al. 2014). Sin embargo, para algunas de estas especies, los datos más actuales fueron aquellos de su descripción original (*O. penicillifer*, *O. alecto*, *O. fitchi*) y aún así, con la escasa información, se les ha atribuido un posible intervalo de distribución (Brusca 1980, Roper et al. 1995, Gotshall 1998, Kerstitch & Bertsch 2007, Norman et al. 2014).

La pesquería de pulpo se lleva a cabo en todos los estados del Pacífico mexicano. Es considerada como artesanal, con un arte de pesca no definido, sin talla mínima de captura y sin cuota definida, tampoco están definidas las especies que componen esta pesquería (CONAPESCA 2014). Investigaciones recientes han concluido que ésta se compone por tres especies principalmente, *O. hubbsorum* (López-Uriarte et al. 2005, Alejo-Plata et al. 2009, Domínguez-Contreras et al. 2013), *O. bimaculatus* (López-Rocha et al. 2012, Villegas et al. 2014) y recientemente *O. bimaculoides* (González-Meléndez 2012). De las demás especies solo se tienen estudios esporádicos y aparentemente no figuran como objetivos de pesquería, al

menos no comercial ni artesanal, pero quizás si como organismos de acuario principalmente por su tamaño pequeño.

Entre los estudios que mas resaltan sobre poblaciones de pulpo en el noroeste de México, están los reproductivos sobre las especies *O. bimaculatus* y *O. hubbsorum*. Al respecto, el ciclo de reproductivo de *O. bimaculatus* ocurre de enero a junio en la Bahía Sebastián Vizcaíno en la costa oeste de la península de Baja California (García-Rodríguez 2010), mientras que al interior del Golfo de California es de junio a septiembre (Castellanos-Martínez 2008). En el caso de *O. hubbsorum*, su temporada reproductiva es de mayo a octubre en la costa oeste de la península (Domínguez-Contreras 2011), mientras que en Golfo de California ocurre de septiembre a diciembre (Pliego-Cárdenas et al. 2011).

Estas dos especies, como la mayoría de pulpos con elevada fecundidad (> 20,000 huevos) (Rocha et al. 2001), presentan dos fases en su ciclo de vida. La primera es planctónica por medio de una fase de paralarva la cual puede durar meses en la columna de agua antes de adoptar la fase bentónica (Villanueva & Norman 2008). Esta estrategia, incrementa su capacidad de dispersión y por lo tanto, tendrá un efecto sobre su distribución y por ende en sus poblaciones.

Dada la clara problemática y los pocos estudios de pulpo en el en el noroeste de México, el presente trabajo aborda tres preguntas especificas, ¿Cuáles son las especies de pulpo?, ¿Dónde se distribuyen éstas? y ¿Cómo es la dinámica poblacional de cada especie?.

JUSTIFICACIÓN

Comúnmente el manejo y evaluación de una población, está enfocado principalmente sobre las fronteras del stock de pesca (algunas veces territoriales) y sobre la evaluación del recurso pulpo como un todo, más que en el rango de distribución real de la especie (Boyle & Rodhouse 2005). Al respecto, las especies de pulpo que componen la pesquería en el Pacífico Mexicano, carecen de evaluaciones y su distribución aun no se encuentra bien definida desde ninguno de los dos puntos de vista, pesquero y ecológico.

Desde el punto de vista pesquero, solo existen datos de captura mensual, anual y por estado, así como del número de permisos pesca. Esta información puede ser útil pero definitivamente es limitada al momento de evaluar una población.

Si bien el problema del recurso pulpo en el Pacífico Mexicano es claro, éste se acentúa aún más en la región noroeste, principalmente en el norte del Golfo de California, donde las zonas de pesca de las cooperativas se traslapan. Por lo tanto, antes de poder trabajar sobre un plan de manejo del recurso pulpo, es necesario identificar las especies que componen su pesquería y conocer los límites de distribución que presentan cada una de las especies que están siendo aprovechadas, así como evaluar aspectos poblacionales. Desafortunadamente, la información pesquera, biológica y ecológica es limitada; más aún los aspectos biológicos inherentes de los pulpos como la elevada plasticidad fenotípica, la falta de estructuras duras (con excepción del pico y los estiletes) (Hanlon 1988) y su elevado aprendizaje del entorno para modificar su comportamiento, forma y coloración, incrementan la dificultad de identificación de las especies (Hanlon 1988, Hanlon & Messenger 1999, Brown & Piscopo 2013).

Al respecto, el uso de herramientas moleculares tales como marcadores mitocondriales que por su naturaleza conservativa han corroborado la identificación taxonómica y por ende contribuido en la precisión de los límites de distribución de muchas especies mediante análisis filogenéticos. Por otra parte, dado que la capacidad de dispersión influencia directamente el arreglo poblacional, los

marcadores nucleares tipo microsatélites se han utilizado ampliamente a nivel poblacional, evaluando su estructura y la conectividad de las poblaciones; debido a sus características como una elevada tasa de mutación, polimorfismo, herencia mendeliana y co-dominancia.

Con base en lo anterior, el presente trabajo pretende identificar las especies de pulpo con mayor frecuencia de captura en el noreste de México utilizando marcadores mitocondriales y se utilizarán marcadores tipo microsatélites para evaluar las poblaciones de cada especie identificada.

OBJETIVO GENERAL

Determinar qué especies de pulpo se distribuyen en el noroeste de México y como es la dinámica y conectividad de sus poblaciones a partir de marcadores y análisis genéticos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- I. Desarrollar y caracterizar marcadores moleculares tipo microsatélites para evaluar el estatus genético-poblacional las especies de pulpo en el noroeste de México.
- II. Desarrollar las secuencias específicas de los genes 16s rRNA y COI a partir del ensamble del genoma mitocondrial completo de *Octopus bimaculatus*.
- III. Identificar las principales especies pulpo y su distribución geográfica en la costa noroeste de México, por medio de marcadores mitocondriales y nucleares.
- IV. Determinar la estructura y la conectividad genética de las poblaciones de pulpo que son blanco pesquero en la costa noroeste de México.

ÁREA DE ESTUDIO

El noroeste de México está representado por los estados de Sinaloa, Sonora y principalmente por la península de Baja California, que incluyen a Baja California y Baja California Sur (Fig. 1). La formación de la península dio origen al Golfo de California hace aproximadamente unos 7 millones de años, como un cuerpo de agua separado del Océano Pacífico. Ambos, El Golfo de California y la península de Baja California, poseen una gran diversidad marina y terrestre, que se derivó de procesos geológicos que facilitaron eventos de dispersión, aislamientos, especiación y extinción. La fauna marina actual muestra una amplia variedad de patrones de distribución, muchos de los cuales se asocian con la separación de la península del macizo continental (Brusca 2010).

El Golfo de California tiene extensión aproximada de 1200 km, la cual varía de 200 km de ancho en la boca hasta 85 km en su punto más estrecho (Brusca 2010). La región norte del golfo, donde la profundidad alcanza los 200 m, grandes cantidades de sedimento se mantienen en suspensión debido a las fuertes corrientes, resultado del extremo rango de mareas (hasta 7 metros) (Alvarez-Borrego 2010). Al sur de la costa norte, se encuentra un archipiélago compuesto por cuantas, canales y dos grandes islas: Ángel de la Guarda y Tiburón.

Al sur de estas islas, la batimetría alcanza hasta los 2500 m de profundidad en Cuencas como las de Guaymas y la del Farallón; y hasta 3500 hacia la boca del golfo (Lavin & Marinone 2003). La costa de la península es principalmente rocosa, pero con pequeñas intermitencias arenosas y una plataforma estrecha. La costa continental, por el contrario, se caracteriza por largas playas arenosas, grandes lagunas costeras y una amplia plataforma (Lluch-Cota et al. 2007, Alvarez-Borrego 2010).

Las temperaturas más altas se encuentran en boca del golfo durante verano; mientras temperaturas más bajas son encontradas en la mitad norte del Golfo de California y alrededor de las grandes islas a lo largo del año (Lluch-Cota et al. 2007). La circulación del golfo está influenciada por cambios estacionales y por el ciclo de mareas diurno y semi-diurno. Probablemente la circulación estacional mas

documentada es el giro reversible en el norte del Golfo de California (ciclónico de junio a septiembre y anticiclónico de noviembre a abril) (Lavin & Marinone 2003, Marinone 2003, Lluch-Cota et al. 2007). Observaciones de barco a la deriva, temperatura superficial y salinidad, en la parte centro-sur del golfo, indican un flujo hacia fuera del golfo durante invierno y un flujo hacia dentro durante el verano (Lavin & Marinone 2003).

La costa oeste de la península de Baja California, está representada principalmente por el sistema de la Corriente de California, la cual tiene su origen en Canadá y culmina en costas de Baja California, y es considerada una de las zonas más productivas del mundo (Gaxiola-Catro et al. 2010). La plataforma continental oeste es parte de las características geológicas activas de la península, por lo que actualmente, está formada por intensos gradientes batimétricos. Como consecuencia, el ancho de la plataforma varía de estrechas y abruptas pendientes a laderas suaves de anchura considerable. Las laderas con pendientes más abruptas están en la parte norte de la península. Presenta muchas lagunas costeras a lo largo de la costa, entre ellas San Quintín, Guerrero Negro, San Ignacio, Ojo de Liebre y, la más grande, el sistema lagunar Bahía Magdalena-Almejas (Zaytsev et al. 2003).

Las temperaturas suelen ser más frías que en el Golfo de California influenciadas principalmente por el sistema de la Corriente de California. Dos periodos (frio y cálido) bien identificados determinan la temperatura superficial del agua; el periodo frio coincide con la Corriente de California portando agua sub-ártica, mientras que durante el periodo cálido la influencia de la Contra Corriente de California transporta agua cálida subtropical y tropical con dirección hacia el polo y pegada a la costa (Durazo 2015).

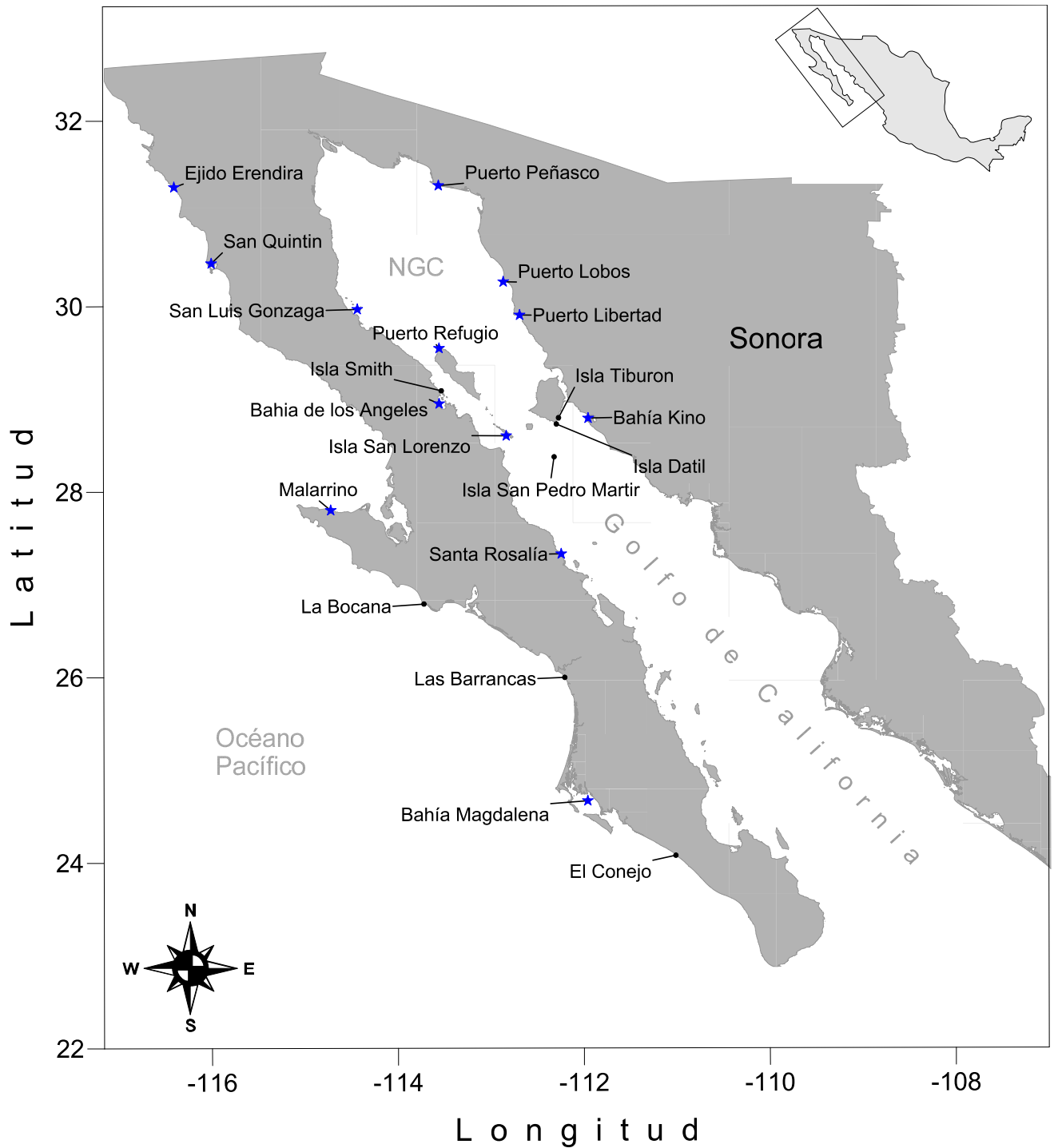


Figura 1. Toponimia de la zona de colecta de especies de pulpo en el noroeste de México. Todas (incluyendo estrella azul) las localidades con símbolo fueron muestreadas para análisis con loci microsatélites. La estrella azul muestra las localidades que fueron sometidas a análisis filogenético con fragmentos de los genes 16s ribosomal (16s) y Citocromo Oxidasa subunidad I (COI o Cox1) de ADN mitocondrial.

Organización del manuscrito

El presente estudio está representado en tres capítulos separados, considerados como resultados. Cada capítulo, presenta su propia introducción, objetivos particulares, material y métodos, resultados y discusión. No obstante, al final se presenta una discusión integrativa. La bibliografía está de manera conjunta al final del presente documento.

Capítulo I: Diseño de marcadores microsatélites y ensamble del genoma mitocondrial de *Octopus bimaculatus*. Este capítulo está compuesto por secciones.

La primera se enfocó al diseño marcadores moleculares tipo microsatélites por métodos de nueva generación, para evaluar las poblaciones de *Octopus bimaculatus* en el noroeste de México. Los marcadores caracterizados fueron probados en otras dos especies *Octopus bimaculoides* y *Octopus hubbsorum* que traslapan distribución con *O. bimaculatus*. En la segunda sección se muestra el ensamble completo de genoma mitocondrial de *Octopus bimaculatus*, utilizando secuenciación de nueva generación (454 Roche) y secuenciación Sanger. Este genoma cuenta con 16,085 pares de bases, tiene 13 genes que codifican proteínas, 2 genes mitocondriales, 22 genes de transferencia y una región control. La secuencia completa fue cargada en la base de datos internacional de GenBank con el número de acceso KT581981. Este es el 7° genoma mitocondrial de pulpo a nivel mundial.

Capítulo II. Identificación y distribución poblacional actual de tres especies de pulpo en la costa noroeste del Pacífico Mexicano

En este capítulo se muestra la identificación y distribución actual de las especies de pulpo que componen la pesquería en la costa occidental de la península de Baja California (COP) y en Golfo de California (GC). *Octopus bimaculatus*, *Octopus bimaculoides* y *Octopus hubbsorum* están presentes en la costa oeste de la

península y convergen alrededor de la región biogeográfica de Bahía Magdalena. Mientras que en el Golfo de California solo se encuentra a *O. bimaculatus* y *O. hubbsorum*, poblaciones bien delimitadas por la región de las grandes islas, la cual también es considerada una región biogeográfica que define la distribución de especies con características templadas y tropicales.

Capítulo III. Conectividad genética de poblaciones de tres especies de pulpo en el noroeste de México

Este capítulo analiza la diversidad genética, estructura poblacional y patrones de conectividad genética de las poblaciones de pulpo en el noroeste de México, para cada una de las tres especies de las cuales se tiene mayor información científica y que componen la pesquería. Las poblaciones de las tres especies mostraron niveles relativamente altos de heterocigosidad y una fuerte estructura genética, una conectividad significativa. *Octopus bimaculatus* y *O. hubbsorum* parecen tener una conectividad asimétrica del Golfo de California hacia la costa oeste de la península de Baja California. *Octopus bimaculoides* también presentó una migración asimétrica siguiendo la contracorriente de California. Casi todas las poblaciones de las tres especies mostraron un parentesco significativo, como resultado de un muy probable autoreclutamiento o bien de un cuello de botella reciente de acuerdo al análisis de exceso de heterocigosidad, sin embargo, se considera que este último análisis está sobreestimado debido a la paternidad múltiple, la cual es común en pulpos.

**Capítulo I: Diseño de marcadores microsatélites y
ensamble del genoma mitocondrial de *Octopus
bimaculatus* Verrill 1883**

**Caracterización de loci microsatélites del pulpo de dos
puntos *Octopus bimaculatus* Verrill 1883 a partir de
lecturas de pirosecuenciación**

Introducción

Dentro de los marcadores de ADN se encuentran las aloenzimas, el ADN_m, ADN polimórfico amplificado al azar RAPD, minisatélites y microsatélites. Éstos últimos son secuencias de repetición simple (SSRs) y se conforman desde una hasta seis pares de bases (pb) repetidas en tándem, es decir la misma secuencia una tras otra. Si estas repeticiones son lo suficientemente largas e ininterrumpidas, se consideran excelentes marcadores genéticos debido a su alto nivel de polimorfismo y a su elevada tasa de mutación (Ellegren 2004). Los microsatélites presentan herencia mendeliana y son marcadores co-dominantes, lo que les permite definir loci y diferenciar individuos homocigotos y heterocigotos, estimar su porcentaje y las frecuencias alélicas de las diferentes variantes de una población (Hartl & Clark 1997). Este tipo de características, los ha convertido en los marcadores moleculares favoritos en estudios poblacionales (Ellegren 2004, Selkoe & Toonen 2006).

El uso de microsatélites ha permitido la separación de algunas especies previamente identificadas dentro del complejo “especies-*O. vulgaris*” (Oosthuizen et al. 2004) utilizando los primeros microsatélites para *O. vulgaris* (Greatest et al. 2000). Por otra parte, estos marcadores de *O. vulgaris*, han permitido detectar variabilidad genética suficiente para distinguir más de dos poblaciones en las costas del Mar Mediterráneo (Casu et al. 2002) , costa norte de África (Murphy et al. 2002), la Península Ibérica e Islas Canarias (Cabranes et al. 2008) o bien determinar que existe una población única en Sudáfrica (Oosthuizen et al. 2004).

Al menos nueve especies de pulpo habitan las costas del Pacífico mexicano (Roper et al. 1995). Le pulpo de dos manchas *Octopus bimaculatus* Verrill 1883, habita desde la zona intermareal hasta los 50 m de profundidad. Este llega a crecer hasta aproximadamente 100 cm (longitud total), y ha sido ubicado desde las costas de California, USA, hasta Bahía Tortugas, México, incluyendo la zona norte del Golfo de California (López-Rocha et al. 2012) y recientemente se ha reportado en las costas de Oaxaca al sur de México (Alejo-Plata et al. 2012). *Octopus bimaculatus* presenta sexos separados y las hembras producen miles de huevos que son

adheridos al sustrato, después de la eclosión; la deriva larval es principalmente pasiva (por corrientes oceánicas) por un periodo aproximado de 3 meses antes de asentarse en arrecifes rocosos (Ambrose 1990). Aunque su pesquería no está bien establecida en California, USA, una importante pesquería de pequeña escala se realiza en otras zonas de su rango conocido de distribución, como es el caso del norte del Golfo de California (Ambrose 1990, López-Rocha et al. 2012). Hasta el momento no existen estudios de cómo las poblaciones están conectadas y no existe una regulación que asegure su aprovechamiento sustentable. El primer paso es tener la certeza en la identificación de la especie, por lo que en este sentido se aislaron y caracterizaron marcadores microsatélites para *O. bimaculatus*, esto permitirá estudiar su estructura poblacional y su potencial conectividad genética y marina, así como su parentesco y endogamia.

Material y Métodos

Se obtuvo una librería genómica (Shotgun Genomic Library) utilizando ~ 5 µg de ADN genómico obtenido de un individuo (hembra) capturado en el norte de la Isla Ángel de la Guarda en Golfo de California, México. El ADN que se extrajo utilizando un kit comercial (DNeasy blood and tissue kit by QIAGEN, Valencia, CA, USA) fue secuenciado utilizando tecnología de pirosecuenciación 454 (454 Titanium chemistry by Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) en el University of Arizona Generic Core (UAGC).

Después de realizar un filtrado de calidad utilizando el métrico Phred quality score de $Q > 20$ o bien un 99% de calidad (es decir que la probabilidad de que una base haya sido asignada incorrectamente durante la secuenciación fue de 1 por cada 100). Se obtuvieron un total de 206,575 lecturas únicas con una longitud promedio de 325 bp.

Las lecturas constituyeron 67,136, 875 bp, de las cuales se identificaron los loci microsatélites dinucleótidos que contenían al menos 10 repeticiones perfectas y

microsatélites tetranucleótidos con al menos 8 repeticiones perfectas. Se utilizó el programa QDD (Megléc et al. 2010) para seleccionar marcadores microsatélites y diseñar marcadores bajo los siguientes criterios: se utilizaron lecturas o secuencias únicas mayores a 120 bp y secuencias consensos a partir de contigs (el traslape de secuencias similares, pero no precisamente del mismo tamaño) que fueran $\geq 95\%$ en regiones >30 bp de flanco para el diseño de cebadores. Este paso se utilizó para eliminar loci duplicados que hubiesen divergido en la región flanco y así reducir alelos nulos por la unión de secuencias de aquellas regiones con cobertura >1X debido al anclaje de cebadores. También se eliminaron secuencias cortas (nanosatélites, > 6 repeticiones de homopolímero y > 3 di- hexabase repeticiones en regiones flanco). Esto es considerado un método conservativo para eliminar redundancia y loci microsatélites que tienen problemas con la amplificación (Megléc et al. 2010).

Se obtuvieron 3,956 dinucleótidos y 1,491 tetranucleótidos loci microsatélites que reunieron los criterios previos. Se probaron 50 loci tetranucleótidos con el mayor número de repeticiones (>14) en 32 muestras de una población bien establecida de *Octopus bimaculatus* en Puerto Peñasco en el norte del Golfo de California (Moreno-Báez et al. 2012).

Para lograr etiquetar con un tinte fluorescente, se agregó la secuencia universal M13 en final 5' de todos los cebadores forward (Schuelke 2000). La reacción en Cadena de Polimerasa o PCR (por sus siglas en ingles), se realizó en un volumen de 15 μ L con 20-40 ng de ADN genómico, 1 $\times$ PCR buffer, 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.2% BSA (bovine serum albumi), 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 0.02 μ M del cebador forward sin etiquetar M13, 0.2 μ M del cebador M13 etiquetado con 6-FAM, y 0.2 μ M del primer Reverse. Se utilizó un protocolo de PCR touchdown, el cual consistió de 94 °C por 5 min, 15 ciclos de 94 °C por 30 s, 65-50 °C por 30 s (disminuye 1 °C cada ciclo), 72 °C por 30 s, seguido por 40 ciclos a 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 30 s, y una extensión final de 72 °C por 5 min.

Para los genotipos de los productos de PCR se usó un secuenciador Applied Biosystem 3730XL y los alelos fueron identificados con el programa GENOTYPER 3.7 (Applied Biosystem). El tamaño de los alelos fue asignado utilizando el programa FLEXIBIN (Amos et al. 2007). La heterocigosidad observada y esperada, así como el número de alelos se calcularon usando el programa GENALEX 6.5 (Peakall & Smouse 2012).

Se utilizó el programa MICROCHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004) para probar la presencia de errores ocurridos durante la asignación de genotipos y para identificar la presencia de alelos nulos.

Las desviaciones de Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) y el desequilibrio por ligamiento (DL) (fueron estimados usando el programa on line GENEPOP 4.2 (Raymond & Rousset 1995) y el programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1995), respectivamente. Los valores de p fueron ajustados ($\alpha = 0.05$) utilizando una prueba secuencial de Bonferroni para comparación múltiple.

Resultados y Discusión

Se amplificó y genotipificaron un total de 22 loci microsatélites (Tabla I). Todos los loci fueron polimórficos con un número promedio de alelos por locus fue de 13.09 en un rango de 7 a 19 alelos. La heterocigosidad observada tuvo un rango de 0.50 a 1.00 con un promedio de 0.84, mientras que la heterocigosidad esperada se mantuvo entre 0.42 y 0.93 con un promedio de 0.86, muy similar a la heterocigosidad observada. Se encontraron cuatro pares de loci que presentaron un desequilibrio por ligamiento significativo ($P < 0.000022$), los cuales fueron: *Ocbi10/Ocbi48*, *Ocbi14/Ocbi16*, *Ocbi19/Ocbi46* y *Ocbi43/Ocbi47*. Los loci *Ocbi1*, *Ocbi11* y *Ocbi45* presentaron una desviación significativa del EHW, incluso después de la prueba secuencial de Bonferroni ($P < 0.00227$).

Tabla I. Caracterización de 22 loci microsatélites en *Octopus bimaculatus* (n=32). Nombre del locus, número de acceso de Genbank motivo de repetición, tamaño esperado, rango observado, secuencias de cebadores F y R (5' - 3'), número de alelos (N_A), heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e).

^a loci que se desviaron significativamente de EHW después de la corrección de Bonferroni ($P < 0.00227$).

Locus GenBank	Motivo Rep.	Tamaño Esp. (bp)	Rango Obs. (bp)	Secuencia de cebadores F y R	N _A	H _o -H _e
<i>Ocbi1</i> KF746722	cata ₍₁₉₎	507	453- 502	F:TCCTGGGGCACTAGGATATG R:CGCTTGACGTCTGATATTG	14	0.500-0.912 ^a
<i>Ocbi9</i> KF746723	agat ₍₁₇₎	218	190- 282	F:CATGCCCAGTCCTCCTTTTA R:ACACTTGCTCGTTCAGGACC	17	0.935-0.903
<i>Ocbi10</i> KF746724	tatg ₍₁₆₎	188	145- 203	F:GCAGTGTGACTGAACCCTGA R:CAGAGACAGAGAGATGAATTGATAGA	13	0.969-0.896
<i>Ocbi11</i> KF746725	taca ₍₁₆₎	212	189- 251	F:TTCACAATGCTATTTACTGTAAGGTTG R:CGGCTGGCATATTTTCCTAA	17	0.563-0.899 ^a
<i>Ocbi12</i> KF746726	tgta ₍₁₆₎	220	188- 228	F:AACGATTGCTTTCAGGTGCT R:CGCATATCTATAAGGACACAGACA	11	0.813-0.843
<i>Ocbi14</i> KF746727	tggc ₍₁₆₎	145	198- 247	F:AGAAAAGTGGCTTGGTCGG R:CAACAGCCACCAACTCTCAA	12	0.875-0.890
<i>Ocbi15</i> KF746728	agat ₍₁₆₎	174	145- 248	F:CTGAGCCCGGTACATGAGTT R:CACCCCCACACATATTGGTT	19	0.875-0.933
<i>Ocbi16</i> KF746729	tcta ₍₁₆₎	225	198- 247	F:CATATGCGTGTGAGTGTGTTGTG R:TGAGTCAGCAACGCCTAAAA	12	0.719-0.879
<i>Ocbi17</i> KF746730	tcta ₍₁₆₎	170	124- 199	F:CCTGCAGTAGCAGCAAAGGT R:CCTGAACCCACTGTGTGAGA	15	0.813-0.900
<i>Ocbi19</i> KF746731	atag ₍₁₆₎	122	218- 295	F:GACGCGTCGACAAATAGTCA R:TCATTAGTCTGCCAGCACA	14	0.933-0.891
<i>Ocbi25</i> KF746732	cata ₍₁₅₎	193	160- 208	F:CGAGCACACAAACGTACACA R:TGCAGATTGACCCAACTCAG	13	0.938-0.899
<i>Ocbi32</i> KF746733	taga ₍₁₅₎	226	207- 255	F:CGTCATCAGATACAAAGAAACGA R:GCATTGCCAACTCGTAAAGTC	12	1.000-0.854
<i>Ocbi35</i> KF746734	taga ₍₁₅₎	156	129- 195	F:ATGTCCCTCAGCGTCGTTAG R:GATGTTGCGCACAAAGTGTCT	14	0.906-0.891
<i>Ocbi39</i> KF746735	tctt ₍₁₄₎	186	160- 201	F:TCTTTCCGACTGCCTTATTTG R:AAAGCAACGTCAACAACACG	11	0.906-0.864
<i>Ocbi40</i> KF746736	cttt ₍₁₄₎	391	359- 407	F:TCGGTCGGCCATAGTAAAC R:GGGAAATGAGGGAGATAGGG	13	0.969-0.904
<i>Ocbi41</i> KF746737	cttt ₍₁₄₎	190	156- 211	F:GGCAACAGGGACAACCTTTA R:GCCAGGCGATCAACATATTA	11	0.813-0.784
<i>Ocbi43</i>	atgt ₍₁₄₎	158	184- 227	F:GCTTGTCCACAGCCAAATAA	11	0.938-0.881

KF766122				R:GATGGGGGACAAACGAGTAA		
<i>Ocbi45</i>	<i>cata</i> ₍₁₄₎	211	177- 226	F:CATCTTGTGGCTTTCTTAGCA	14	0.563-0.896 ^a
KF746738				R:TACACGAGTTTGCAGCCATC		
<i>Ocbi46</i>	<i>tgta</i> ₍₁₄₎	241	219- 296	F:GGCTTTAGCTGCCAATTCTG	14	0.903-0.888
KF746739				R:TGCTAGGTGTTTACATTTATTTGTCC		
<i>Ocbi47</i>	<i>acat</i> ₍₁₄₎	210	184- 227	F:CCTGTCATAAACAGTAATACCAATAAA	11	1.000-0.881
KF746740				R:GTGCCTGAAATACGGGGTAA		
<i>Ocbi48</i>	<i>tatg</i> ₍₁₄₎	159	145- 203	F:TGTATGAGTGGGTTTGTGGG	13	1.000-0.897
KF746741				R:ACACGGATATAAGCGGGACA		
<i>Ocbi50</i>	<i>tatg</i> ₍₁₄₎	186	137- 176	F:GGTGCTGCTGCACAGTAAGA	7	0.531-0.424
KF746742				R:TTCTCTATTGGCAAGAAATACTTGAA		

Adicionalmente, los 22 loci microsatélites específicos para *Octopus bimaculatus*, fueron probados en otras dos especies de pulpo que traslapan su rango de distribución con *O. bimaculatus*. *Octopus bimaculoides* Pickford y McConnaughey, 1949 (n=16) de Bahía San Quintín en la costa Pacífico de la península de Baja California y *Octopus hubbsorum* Berry, 1953 de dos localidades que incluyen a Santa Rosalía (n=8) en el Golfo de California y a El Conejo (n=8) en la costa Pacífico al suroeste de la península de Baja California.

Para *Octopus bimaculoides* amplificaron 19 loci microsatélites y solo uno fue monomórfico (*Ocbi46*). El número de alelos promedio por locus fue de 4.89 en un rango de 1 a 11 alelos. Su heterocigosidad observada vario de 0.00 hasta 1.00 con un promedio de 0.69, mientras que la heterocigosidad esperada fue de 0.00 a 0.85 con un promedio de 0.55 (Tabla II).

Para *Octopus hubbsorum* amplificaron 12 loci microsatélites, todos fueron polimórficos con un número de alelos promedio de 9.00 y un rango de 2 a 16 alelos. La heterocigosidad observada fue entre 0.06 y 1.00 con un promedio de 0.80, mientras que la heterocigosidad esperada tuvo en promedio 0.71 y un rango de 0.06 hasta 0.91 (Tabla II).

Tabla II. Loci microsatélites de *Octopus bimaculatus* que amplificaron en *Octopus bimaculoides* (n=16) y *Octopus hubbsorum* (n=16). Nombre del locus, rango observado, número de alelos (N_A), heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e).

Locus	<i>Octopus bimaculoides</i>			<i>Octopus hubbsorum</i>		
	Rango Observado (bp)	N_A	H_o-H_e	Rango Observado (bp)	N_A	H_o-H_e
<i>Ocbi9</i>	202-242	9	1.000-0.854	-	-	-
<i>Ocbi10</i>	93-145	5	1.000-0.621	136-187	12	0.938-0.877
<i>Ocbi11</i>	192-212	5	0.938-0.795	101-324	9	0.938-0.775
<i>Ocbi12</i>	199-209	3	0.750-0.557	-	-	-
<i>Ocbi14</i>	142-172	3	0.214-0.196	-	-	-
<i>Ocbi15</i>	153-300	11	0.867-0.793	-	-	-
<i>Ocbi16</i>	178-239	10	0.938-0.840	-	-	-
<i>Ocbi17</i>	113-120	2	0.063-0.061	-	-	-
<i>Ocbi19</i>	114-130	5	1.000-0.744	106-165	12	1.000-0.850
<i>Ocbi25</i>	195-200	2	0.938-0.498	195-307	16	0.875-0.914
<i>Ocbi32</i>	214-247	9	0.938-0.816	156-246	12	0.875-0.833
<i>Ocbi35</i>	133-171	9	1.000-0.818	132-214	13	0.938-0.895
<i>Ocbi39</i>	-	-	-	160-204	9	0.615-0.790
<i>Ocbi41</i>	139-157	2	1.000-0.500	139-144	2	0.750-0.469
<i>Ocbi43</i>	113-147	2	0.071-0.069	-	-	-
<i>Ocbi45</i>	169-189	3	0.286-0.656	-	-	-
<i>Ocbi46</i>	213	1	0.000-0.000	169-214	5	0.875-0.641
<i>Ocbi47</i>	179-207	7	1.000-0.820	203-262	11	1.000-0.854
<i>Ocbi48</i>	158-174	3	0.933-0.571	139-168	5	0.688-0.594
<i>Ocbi50</i>	137-160	2	0.222-0.346	95-139	2	0.063-0.061

**Genoma mitocondrial completo de *Octopus bimaculatus*
Verrill 1883 del Golfo de California**

Introducción

El pulpo de dos puntos *Octopus bimaculatus* Verrill, 1883 ha sido registrado a lo largo de la costa del Pacífico en California, EUA y en la península de Baja California en México (Ambrose 1988). Sin embargo, su distribución alrededor de la parte sur de la Península es aún incierta pero existe una población discreta que está siendo aprovechada en el norte del Golfo de California (López-Rocha et al. 2012, Moreno-Báez et al. 2012). Recientemente, se desarrollaron 22 loci microsatélites (Domínguez-Contreras et al. 2014) para evaluar la conectividad genética que pudiera provocar la fase larval o paralarvas de ésta especie las cuales se sabe puede tener una duración de entre 1 y 3 meses (Ambrose 1988).

Se han documentado paralarvas de *Octopus bimaculatus* fuera de las costas de Oaxaca, México (Alejo-Plata et al. 2012). Sin embargo, otros pulpos ocelados se han registrado en centro y Sudamérica, pero su identidad taxonómica aún no ha sido resuelta (F. G. Hochberg, SBMNH Comm. Pers.). *Octopus bimaculatus* y *Octopus bimaculoides* han sido consideradas especies hermanas principalmente por su similitud morfológica, al grado que solo las hembras maduras pueden ser diferenciadas principalmente por el tamaño y número de huevos (Fig. 2), pero en el caso de los machos y juveniles la discriminación no es contundente (Pickford & MacConnaughey 1949). Sin embargo, ambas especies pueden ser distinguidas únicamente utilizando secuencias del fragmento de gen Citocromo Oxidasa subunidad III (COIII o Cox3) (Sosa et al. 1995). Recientemente, se generó el genoma nuclear completo de *O. bimaculoides* (Albertin et al. 2015). Infortunadamente las secuencias de los genes COI y 16s rRNA para *Octopus bimaculatus* aun no se conocen, restringiendo los análisis filogenéticos para diferenciar especies. En este sentido, la secuenciación masiva 454-ROCHE previamente obtenida para *Octopus bimaculatus* recopila información genética suficiente para ensamblar un genoma mitocondrial completo, el cual servirá como referencia para diferenciar esta especie en el noroeste de México.

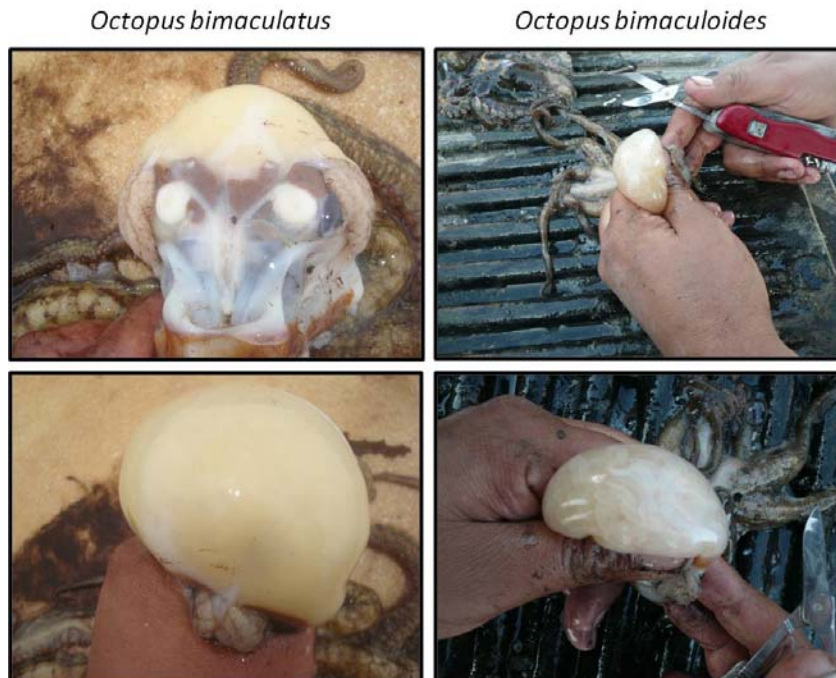


Figura 2. Fotografías de las gónadas maduras de *Octopus bimaculatus* (izquierda) y *Octopus bimaculoides* (derecha).

Material y métodos

El genoma mitocondrial completo se obtuvo de organismos capturados en el norte del Golfo de California. El ADN genómico se extrajo con un kit de extracción (blood and tissue DNeasy kit por QIAGEN). Aproximadamente 5 µg de ADN genómico fueron tratados con RNasa y enviados al University of Arizona Genetic Core (UAGC) donde la muestra fue secuenciada en ¼ de placa con un secuenciador de alto desempeño GS FLX Titanium Chemistry (Roche Applied Science). Se obtuvieron un total de 206,575 lecturas con una longitud promedio de 325 bp. Las lecturas fueron filtradas con un criterio Q20 (registro de calidad de Phred o Q score), el cual indica la probabilidad de que una determinada base sea llamada o asignada incorrectamente por el secuenciador (Q20 = 1 de cada 100 bases está mal asignada, es decir que el 99% de de la asignación fue precisa).

Todas las lecturas fueron mapeadas utilizando como base o referencia el genoma mitocondrial completo de *Octopus vulgaris* (número de acceso de GenBank

AB158363.1, con un tamaño 15,744 bp). El ensamble se realizó en contigs (secuencia obtenida a través del traslape de segmentos contiguos de ADN) utilizando el programa CLC Genomics Workbench (Qiagen versión 7.5.1). Se realizó un ensamble preliminar con los siguientes parámetros 99.3% (0.993) de la longitud de las lecturas y una fracción de similitud de las mismas de 84% (0.84), con respecto a la referencia (*O. vulgaris*). El ensamble mapeó 155 lecturas (0.08%) con una longitud promedio de 330.29 bp en 8 contigs mostrando en promedio una cobertura del genoma mitocondrial de 3.22X y representando un 84% (13,296 bp) con respecto a la referencia.

Fueron identificadas 8 regiones con cero coberturas de entre 15 y 810 bp (con respecto a la referencia). Al respecto, se diseñaron cebadores o primers específicos (Tabla III) utilizando CLC para cubrir estas regiones y se amplificaron por medio de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) en un volumen de 38µL con 20-40 ng de ADN genómico, 1× PCR buffer, 0.2 mM de cada dNTP, 2 mM MgCl₂, 0.20% BSA (bovine serum albumi), 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 0.5 µM del cebador forward, y 0.5 µM del cebador reverse. Se utilizó un protocolo de PCR consistió de 94 °C por 3 min, 34 ciclos de 94 °C por 1 min, 64 ó 65 °C por 1min, 72 °C por 2 min, y una extensión final de 72 °C por 5 min.

Tabla III. Primers específicos para terminar el ensamble del genoma mitocondrial completo de *O. bimaculatus*

Nombre	Forward	Reverse	Longitud Fragmento (bp)
OBus1	CAGGTATTCCCCCAACAT	CCCCCTCTCGGATCAAAA	921
OBus2	CCACGACGATATTCAGATT	GGGAATGAAAGGGAAAAAG	1488
OBus3	CTTGCATCATTACTACCTTC	TCAGGGGTTTGTGCTATT	1300
OBus4	ACTAAACCTAACCCATCTC	TTAGTGTTGATCATGGGC	586
OBus41	CTGAGGAACACAATCCAT	GGGTTTTGAAGTGTGAC	1132
OBus5	TAATAAATGGAGGGGCTC	GGGTTTTGAAGTGTGAC	1279
OBus6	ACCTAACAAAGCCTCTACACC	ACATATCGCCCGTCACTC	1367
OBus7	GTAAAACCGCCAAACCTT	CTGTATGAGGTGGTCGAA	781
OBus8	CAGATGCTGGCACAATTAA	GATGTGCTCAGGTAACGG	>1500
ObimWL	TCGAGGTATGAACCCAATAGC	TTTATGTCTGTGGTTGTTGATTTTT	>1500

Los productos de PCR fueron secuenciados por medio de secuenciación Sanger en ambas direcciones (Macrogen Inc. Seúl, Corea). Las secuencias de ambas direcciones fueron ensambladas y limpiadas con el programa Chromas Pro versión 1.7.6. En conjunto con estas nuevas secuencias se volvieron a mapear las 206,757 lecturas y fueron re-ensambladas de nuevo, con respecto a la referencia, utilizando los parámetros de longitud de lecturas de 93% y de similitud de lecturas de 94% (10% más que la anterior).

El nuevo ensamble mapeó 309 lecturas con una longitud promedio de lectura de 245.45 pb. El porcentaje promedio de cobertura para el genoma completo fue de 4.43X (1.21X más que el anterior). Las anotaciones del genoma ensamblado se hicieron con ayuda del programa en línea MITOS (Bernt et al. 2013). Todas las anotaciones fueron inspeccionadas a ojo y verificadas por ORF (Open Reading Frame o Marco de lectura abierto) y codones de parada (stop codons) con el programa CLC. Las traducciones a proteínas también fueron realizadas con CLC. Posteriormente, la secuencia fue cargada al banco de genes internacional GenBank (siguiendo las instrucciones de los administradores), para obtener un número de acceso.

Se realizó un análisis filogenético utilizando 13 genomas mitocondriales obtenidos del banco de datos GenBank para corroborar que el genoma ensamblado esta dentro del grupo adecuado. Los genomas fueron alineados empleando el algoritmo MUSCLE. El modelo de sustitución de nucleótidos GTR+G mas elevado fue seleccionado con el programa JmodelTest (Darriba et al. 2012) empleando el criterio de información de Akaike y el Bayesiano. Se obtuvo un árbol consenso a partir de métodos bayesianos utilizando el programa MrBayes 3.2 (Ronquist et al. 2012). El cálculo del árbol fue después de 1×10^6 iteraciones en 4 pasos. los primeros 25% resultados fueron descartados como Burn-in, para que el modelo se estabilizara.

Resultados y Discusión

El mitogenoma (genoma mitocondrial completo) de *O. bimaculatus* (Gamban Accesion No. KT581981) contiene 16,085 bp, 13 genes que codifican proteínas, 22 genes ARN de transferencia y 2 genes RNA ribosomales (16s rRNA y 12s rRNA) (Fig. 2, Tabla III). La composición de bases del genoma es de 75.6% para A+T y 24.4% para C+G, con 6,581 Adeninas, 2,719 Citocinas, 1,209 Guaninas y 5,576 Timinas. La Región Control de *O. bimaculatus* contiene un locus VNTR (número variable de repeticiones en tándem) (Motivo de repetición 5'-ACTCTACAACACTATGTATAT_[17]) (Fig. 3, Tabla IV), el cual está ausente en los seis genomas mitocondriales de especies de pulpo depositados en Gamban (KF017606.1, KF017605.1, AB240156.1, HQ638215.1, NC_007896.1, AB158363.1) cuando se alinearon por medio del algoritmo de MUSCLE implementado en Mega 6.0 (Tamura et al. 2013).

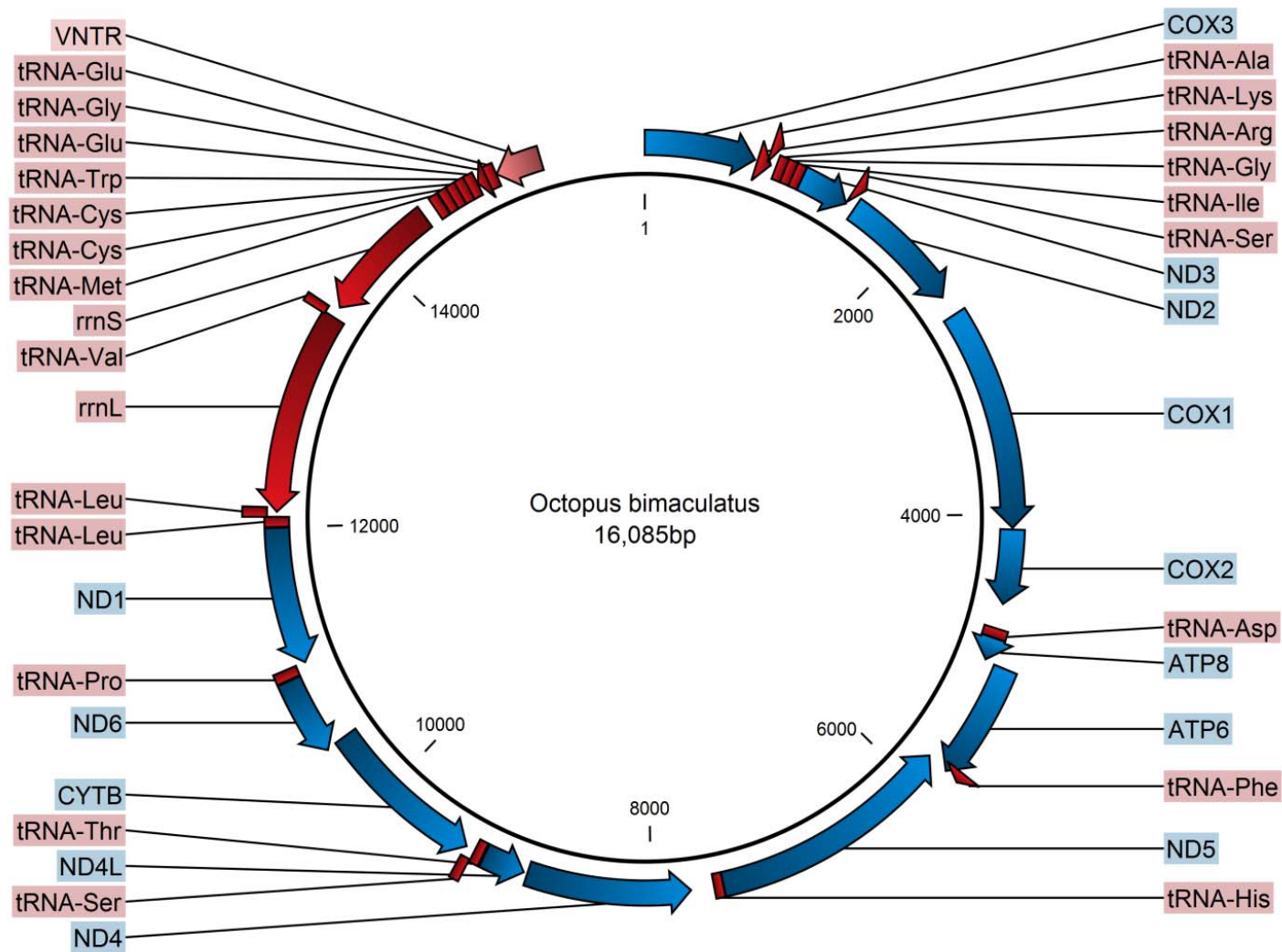


Figura 3. Distribución y arreglo de genes del mitogenoma de *Octopus bimaculatus*. Flechas Azules = genes que codifican proteínas, Flechas Rojas = Genes de transferencias (rrnL es 16s y rrnS es 12s. ARN ribosomales), La flecha rosada = VNTR.

Tabla IV. Anotaciones del genoma mitocondrial completo del pulpo de dos puntos (Gamban No. Acceso KT581981).

Inicio	Fin	Genes(strand)	Longtud (bp)
1	780	COX3 (+)	779
799	865	tRNA-Lys (+)	66
866	934	tRNA-Ala (+)	68
934	997	tRNA-Arg (+)	63
998	1063	tRNA-Gly (+)	65
1064	1130	tRNA-Ile (+)	66
1131	1481	ND3 (+)	350
1480	1548	tRNA-Ser (+)	68
1549	2415	ND2 (+)	866
2559	4091	COX1 (+)	1532
4103	4615	COX2 (+)	512
4789	4854	tRNA-Asp (+)	65
4856	5011	ATP8 (+)	155
5023	5787	ATP6 (+)	764
5732	5798	tRNA-Phe (-)	66
5779	7491	ND5 (-)	1712
7492	7554	tRNA-His(-)	62
7721	8875	ND4(-)	1154
8902	9198	ND4L(-)	296
9205	9269	tRNA-Thr (+)	64
9275	9339	tRNA-Ser(-)	64
9338	10477	CYTB(-)	1139
10470	10982	ND6(-)	512
10984	11050	tRNA-Pro(-)	66
11055	11996	ND1(-)	941
11997	12065	tRNA-Leu(-)	68
12066	12130	tRNA-Leu(-)	64
12107	13508	16S ribosomal RNA(-)	1401
13506	13573	tRNA-Val(-)	67
13588	14447	12S ribosomal RNA(-)	859
14556	14623	tRNA-Met(-)	67
14629	14693	tRNA-Cys(-)	64
14694	14759	tRNA-Cys(-)	65
14760	14827	tRNA-Trp(-)	67
14828	14895	tRNA-Glu(-)	67
14900	14971	tRNA-Gly(-)	71
14972	15041	tRNA-Glu(-)	69
15043	15365	VNTR (ACTCTACAACTATGTATAT)	322
15044	16085	Control Region	1041

Los genes de *O. bimaculatus* siguieron el mismo orden con respecto a las otras seis especies. Adicionalmente, se realizó un análisis filogenético bayesiano que incluyó 13 mitogenomas de cefalópodos, el cual muestra un clado monofilético que incluye a todos los octópodos y donde *O. bimaculatus* mantuvo una relación más estrecha con *O. vulgaris* del Océano Atlántico (Fig. 4).

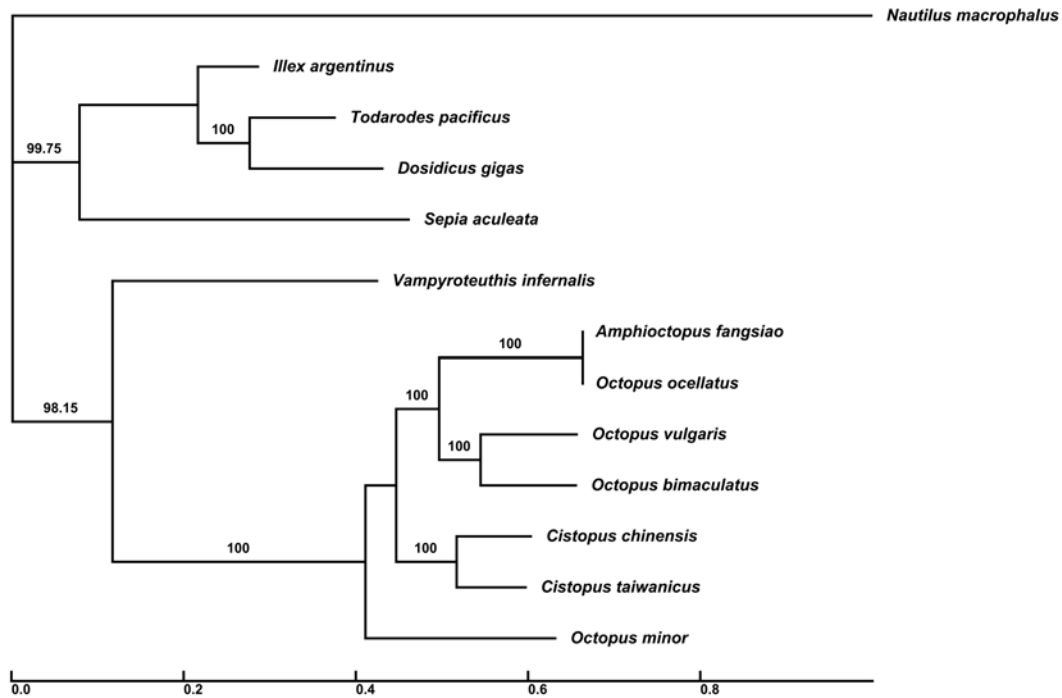


Figura 4. Análisis filogenético bayesiano de 13 mitogenomas de cefalópodos (nautilus, calamares, sepias y pulpo). La escala debajo del árbol muestra la sustitución de nucleótidos.

Capítulo II: Identificación y distribución de especies

Identificación y distribución poblacional actual de tres especies de pulpo en la costa noroeste del Pacífico Mexicano

Introducción

De acuerdo con Norman & Hochberg (2005) alrededor de unas 186 especies de pulpo han sido consideradas como validas, es decir que no presentan un problema de identificación, ni de sinonimia, ni tampoco son catalogadas como especies crípticas. Entre estas especies validadas se encuentran las nueve especies que se han identificado en el Pacífico Mexicano (López-Uriarte et al. 2005), donde *Octopus hubbsorum*, *Octopus bimaculatus* y *Octopus bimaculoides* componen, aunque no oficialmente, la pesquería de pulpo en las costas del noroeste de México (López-Uriarte et al. 2005, González-Meléndez 2012, López-Rocha et al. 2012). Sin embargo, la falta de identificación de especies en los reportes de pesca posiblemente se deba a que los cefalópodos tienen un comportamiento dinámico y su capacidad de cambiar el color, el patrón, su textura y forma debido a su avanzado control neural (Mathger et al. 2009) (Fig. 5). Incluso una vez preservados, los cefalópodos son difíciles de identificar, porque han perdido la coloración y su anatomía cuenta con muy pocas estructuras duras, por lo tanto, los caracteres sistemáticos se reducen y frecuentemente son inadecuados para distinguir especies, especialmente en pulpos (Hanlon 1988).

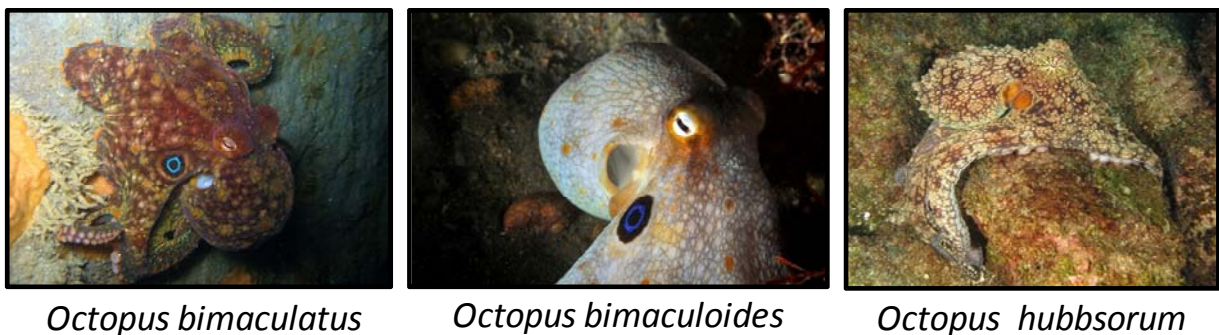


Figura 5. Fotografías de las especies de pulpo más frecuentes en la captura de pulpo en el noroeste de México.

La pesquería en el Pacífico mexicano es considerada únicamente como recurso “pulpo” por las agencias gubernamentales encargadas de evaluar éste y otros

recursos pesqueros en el litoral del Pacífico (López-Uriarte et al. 2005). Por otra parte, *Octopus maya* es la especie de pulpo más capturada en el Golfo de México, la cual cuenta con medidas oficiales de regulación específica (NOM-008-PESC-1993), tales como: talla mínima de captura, una cuota de pesca estacional, artes de pesca específicos, veda y un continuo monitoreo durante su temporada de pesca. Sin embargo, las regulaciones propuestas en la NOM-008-PESC-1993, no aplican a la pesquería de ninguna de las especies de pulpo en las Costas del Pacífico mexicano.

Octopus hubbsorum y *O. bimaculatus* pueden ser diferenciados morfológicamente debido a que el primero carece de ocelos, sin embargo tienen ciclos de vida similares y como la mayoría de las especies, ambas prefieren la estación cálida para llevar a cabo su evento reproductivo. Ambas especies tienen una elevada fecundidad >20,000 huevos que una vez que eclosionan presentan una dispersión por medio de una paralarva (Ambrose 1988, Domínguez-Contreras 2011). En el caso de *O. bimaculatus*, esta etapa puede durar hasta 3 meses en la columna de agua antes de asentarse (Ambrose 1988). Por otra parte, *O. bimaculatus* y *O. bimaculoides*, son especies morfológicamente muy similares, sin embargo éstas pueden ser diferenciadas con certeza solo por el tamaños de huevos de las hembras (Pickford & MacConnaughey 1949). *Octopus bimaculoides* tiene un ciclo de vida completamente distinto a *O. bimaculatus* y a *O. hubbsorum*. Su fecundidad está constituida por centenas de huevos de gran tamaño, los cuales presentan un desarrollo directo, lo que significa que no tiene una etapa de paralarva y después de la eclosión los juveniles se mueven al bentos directamente (Forsythe & Hanlon 1988a).

Octopus hubbsorum es considerada la especie de mayor distribución a lo largo del Pacífico mexicano y también las más capturada desde Bahía Magdalena Baja California hasta las costas de Oaxaca, incluyendo el Golfo de California (López-Uriarte et al. 2005, Alejo-Plata et al. 2009, Domínguez-Contreras 2011, Domínguez-Contreras et al. 2013). Recientemente, se ha sugerido que *O. hubbsorum* y *O. mimus* son la misma especie (Pliego-Cárdenas et al. 2014), lo cual extendería su distribución hasta las costas de Chile, colocándola como la segunda especie de

pulpo con mayor cobertura geográfica, después de *O. vulgaris* (De Luca et al. 2014c) (Fig. 6).

Octopus bimaculatus se ha registrado desde las costas de California USA, hasta Bahía Tortugas, México, incluyendo el Norte de Golfo de California (López-Rocha et al. 2012) y la costa este de la península (Ambrose 1990). Recientemente fue registrada en las costas de Oaxaca (Alejo-Plata et al. 2012). Aunque su pesquería no está bien establecida en las costas de California, USA, ésta si es importante a pequeña escala en otras partes de su rango de distribución, principalmente el norte del Golfo de California (López-Rocha et al. 2012, Moreno-Báez et al. 2012) (Fig. 6).

Octopus bimaculoides es conocido como el pulpo de lodos de California (California mud flat octopus), debido a su preferencia por fondos suaves. Sin embargo, también puede ser encontrado en madrigueras rocosas y en cantos rodados. Su distribución ha sido registrada desde Santa Barbara, USA, hasta Bahía de San Quintín en Baja California, México (Forsythe & Hanlon 1988h, Stoskopf & Oppenheim 1996) (Fig. 6).

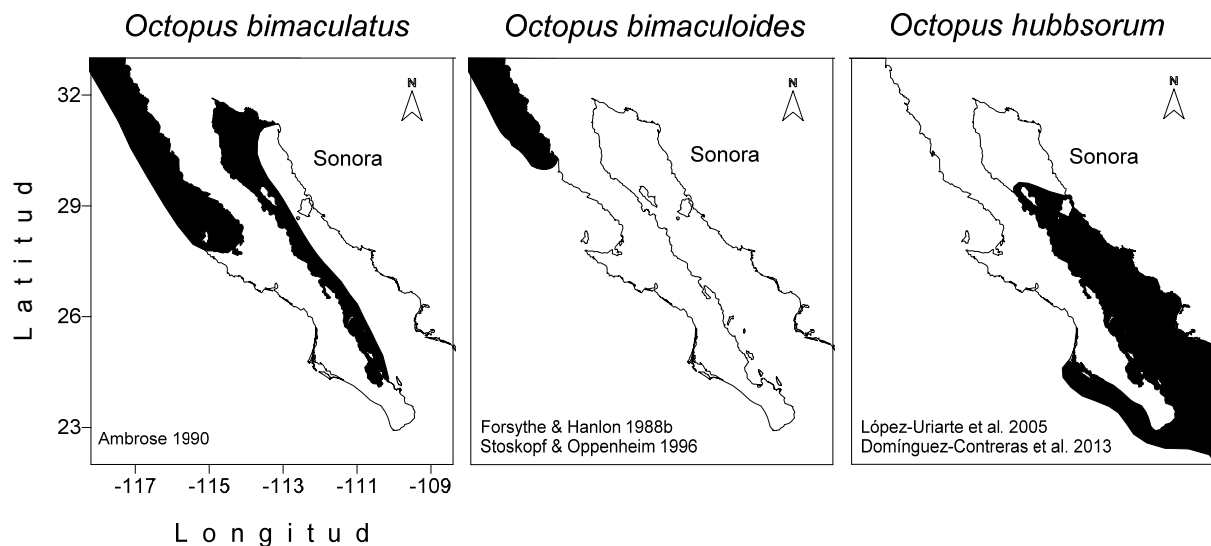


Figura 6. Distribución geográfica de las tres especies más frecuentes en las capturas del noroeste de México.

Sin embargo, en estas especies la distribución continua a lo largo de las costas en el noroeste del Pacífico mexicano ha sido considerada (Roper et al. 1995), posiblemente porque sus registros de distribución fueron realizados varios años atrás o bien, han sido basados en registros de bases de datos de diferentes museos, los cuales realmente no están actualizados. En este sentido, análisis moleculares ofrecen una buena opción para identificar especies que potencialmente tienen un amplio rango de distribución y que no son sencillos de identificar morfológicamente, como los pulpos (Cabranes et al. 2008, Domínguez-Contreras et al. 2013). El uso de herramientas genéticas han contribuido sustancialmente en la identificación de especies por medio de marcadores mitocondriales y en la genética de poblaciones por el uso de marcadores tipo microsatélites (De Luca et al. 2014c).

Entre los marcadores mitocondriales ampliamente utilizados en cefalópodos están las subunidades I y III del gen Citocromo Oxidasa (COI, COIII) y el 16s rRNA, estos se han empleado principalmente en el complejo de especies (species-complex) *Octopus vulgaris* alrededor del mundo, por considerarla una especie cosmopolita (Teske et al. 2007, Sales et al. 2013, De Luca et al. 2014c). Por otra parte, los microsatélites han sido utilizados en diferentes especies de pulpo, tales como *O. vulgaris* (Casu et al. 2002, Murphy et al. 2002, Cabranes et al. 2008), *Pareledone turqueti* y *Pareledone charcoti* (Strugnell et al. 2009b), *O. maorum* (Doubleday et al. 2009), *O. maya* (Juárez et al. 2010), *O. mimus* (Galleguillos et al. 2011), *O. minor* (Kang et al. 2012) y *Enteroctopus dofleini* (Larson et al. 2015). Todos los estudios han mostrado cierto grado de estructura poblacional, la cual provee una base para el manejo y por lo tanto, una pesquería sustentable.

Solo se han hecho un par de estudios filogenéticos sobre especies de pulpo que presentan distribución en el Pacífico mexicano. Sosa et al. (1995) mediante el uso de COIII concluyen que *O. bimaculatus* y *O. bimaculoides* son especies que cuentan con la divergencia suficiente (5.5%) para ser consideradas especies independientes, y ambas especies divergieron de otras especies de pulpo del Pacífico norte (*O. rubescens*, *O. californicus* y *O. dofleini* ahora *Enteroctopus dofleini*).

Las secuencias de *O. bimaculatus* (COIII) y las de *O. bimaculoides* (COI y 16s), han sido contempladas dentro de otros estudios alrededor del mundo, como el de Soller et al. (2000) quienes agruparon a las especies oceladas junto a *O. vulgaris* de Sudáfrica, pero separadas del grupo *O. vulgaris* del Mar Mediterráneo, lo cual fue corroborado posteriormente por Oosthuizen et al. (2004) y Guerra et al. (2010b) en sus análisis en las costas de Sudáfrica y al sur del Océano Índico, respectivamente. *Octopus bimaculoides* ha sido más frecuentemente utilizado por varios autores para análisis filogenéticos debido a sus secuencias COI y 16s, las cuales no están disponibles para *O. bimaculatus* (Carlini et al. 2001, Warnke et al. 2004, Juárez 2012, Sales et al. 2013, Allcock et al. 2014, Pliego-Cárdenas et al. 2014).

Sin embargo, no existen estudios recientes sobre estas especies cerca de su zona de distribución o con especies que comparten la misma distribución. El estudio más reciente fue el de Pliego-Cárdenas et al. (2014), pero su investigación se enfocó principalmente sobre la distribución de *O. hubbsorum* y su cercana relación filogenética con *O. mimus* del centro y Sudamérica, sugiriendo que son la misma especie. *Octopus bimaculatus* no fue incluido en el análisis y la posición de *O. bimaculoides* no pudo ser resuelta usando COI y COIII por separado, y con 16s se agrupó con el conjunto *O. hubbsorum-mimus*, *O. maya* y *O. insularis*.

Hasta ahora, ningún estudio ha utilizado microsatélites en ninguna de las nueve especies catalogadas para el Pacífico mexicano. Recientemente, Domínguez-Contreras et al. (2014) aislaron loci microsatélites específicos para *O. bimaculatus* para evaluar la estructura y la conectividad entre poblaciones en el GC, probándolos adicionalmente en otras dos especies, *O. bimaculoides* y *O. hubbsorum*.

Debido a la carente evidencia de estudios acerca de las especies de pulpo que están siendo explotadas sin regulación alguna a lo largo de la costa del Pacífico en México, es necesario identificar los límites de distribución entre las tres especies de pulpo que componen esta pesquería. Al respecto, se utilizaron marcadores mitocondriales (COI y 16s) como una herramienta para identificar las especies por localidad y como una referencia para el uso de marcadores nucleares tipo microsatélites para diferenciar qué poblaciones están compuestas por qué especie.

Material y Métodos

Se obtuvieron 316 muestras de tejido muscular (brazo o manto ~1 cm) de 20 localidades en ambas costas de la Península de Baja California (PBC) (Fig. 1; Tabla V), entre 2008 y 2013. El muestreo se desarrolló principalmente en comunidades pesqueras (prácticamente de pesquería artesanal) debido al fácil acceso de muestras una vez que los pescadores estuvieron de acuerdo. Las localidades incluyeron a lo largo del lado Pacífico (Ejido Erendira cercano a Ensenada B. C. hasta El Conejo en Baja California Sur) y en el Golfo de California (desde puerto Peñasco y la parte central del Golfo de California hasta Santa Rosalía, incluyendo la región de las grandes islas). La región de las grandes islas está compuesta por varias islas e islotes, en algunas de éstas el acceso es remoto, lo cual se reflejó en un menor número de muestras, mientras que otras localidades el bajo número de muestras se debió a la dificultad de capturar pulpo fuera de la estación reproductiva cuando es más frecuente. Las muestras del Golfo de California fueron almacenadas en The Conservation Genetics Laboratory, School of Natural Resource and the Environment, en The University of Arizona (USA) y las muestras colectadas en el Pacífico fueron almacenadas en el Laboratorio de Invertebrados Marinos, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional (México). Todas las muestras fueron fijadas en alcohol al 95% y almacenadas a -20 °C, hasta su procesamiento.

Secuencias de ADN mitocondrial

El ADN de todas las muestras fue extraído con ayuda de un kit de extracción DNeasy blood and tissue (QIAGEN, Valencia, CA, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se realizó secuenciación Sanger en 96 muestras de 12 localidades, ocho por localidad, utilizando dos marcadores mitocondriales conocidos 16s ADN-ribosomal (16s) L1987 5'-GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC-3' y H2609 5'-CGGTCTGAACTCAGATCACGT-3' (Palumbi et al. 1991) y Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) LCO 1490 5'-GGTCAAACAAATCATAAAGATATTGG-3' y HCO2198 5'-TAAAATTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (Folmer et al. 1994).

El volumen de reacción para PCR de ambos marcadores fue de 25 µL con 15-40 ng ADN genómico, 1× PCR buffer, 0.2 mM de cada dNTP, 2 mM MgCl₂, 0.2% BSA (bovine Serum Albumin), 1 U Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 0.5 µM de cada cebador. Las condiciones del termociclador para COI y 16s fueron: desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 45.5 °C por 1 min (51 °C para 16s), y una elongación de 72 °C por 2 min. Después de los 30 ciclos se realizó una elongación final de 72 °C por 7 min. Los productos de PCR fueron purificados de cebadores sobrantes, dNTPs libres y estructuras terciarias, utilizando ExoSAP (Affymetrix, INC) con la siguiente proporción, 2 µL de ExoSAP por cada 12 µL de producto de PCR.

Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en un secuenciador Applied Biosystem 3730XL DNA Analyzer de la University of Arizona Genetics Core (UAGC). Las secuencias COI y 16s fueron corregidas a ojo utilizando el programa Chromas Pro Version 1.7.6. y fueron alineadas por medio de MUSCLE implementado en el programa Mega6 (Tamura et al. 2013). Se utilizó el programa JmodelTest 2 (Guindon & Gascuel 2003, Darriba et al. 2012) para seleccionar, de acuerdo a los criterios de información de Akaike y Bayesiana, el modelo de mejor ajuste para la sustitución de nucleótidos para el análisis filogenético de secuencias alineadas. Los modelos con mejor ajuste fueron sometidos a un análisis de inferencia filogenética bayesiana en el programa MrBayes 3.2 (Ronquist et al. 2012) bajo las siguientes condiciones: 1,000,000 de iteraciones en 4 pasos, descartando los primeros 25% de los datos de cada paso, para que el modelo lograra estabilizarse.

La distancia genética fue calculada utilizando el modelo de Tamura-Nei con un Bootstrap de 1000 iteraciones, todos los análisis fueron realizados con MEGA6 (Tamura et al. 2013).

Genotipificación de microsatélites

Se utilizaron 7 loci microsatélites (Ocbi25, Ocbi35, Ocbi39, Ocbi41, Ocbi47, Ocbi48 y Ocbi50) que amplificaron para las tres especies (Domínguez-Contreras et

al. 2014). Se genotipificaron 316 muestras de 20 localidades siguiendo las mismas especificaciones descritas por los autores. Los electroferogramas de los microsatélites fueron evaluados en el programa GeneMarker Version 2.6.0 (SoftGenetics LLC). El tamaño de los alelos fue asignado por medio de bins (enlaces mediante distribución de la desviación estándar de los picos registrados por GeneMarker) de acuerdo al programa FLEXIBIN (Amos et al. 2007), para obtener el genotipo final por cada muestra.

Análisis de datos genotípicos

Se calculó, por localidad, el número de alelos (N_A), el número de alelos efectivos (N_E), heterocigosidad esperada (H_E), heterocigosidad observada (H_O) con ayuda del programa GENALEX 6.501 (Peakall & Smouse 2012). La riqueza alélica (R_A) y la riqueza de alelos privados (R_{AP}) fue estimada usando el programa HP-Rare para corregir el efecto del tamaño de muestra (Kalinowski 2005). Se estimaron las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg con ayuda del programa en línea GENEPOP 4.2 (Raymond & Rousset 1995). Para probar los errores en los genotipos y determinar la presencia de alelos nulos se utilizó el programa MICROCHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004). Adicionalmente, se utilizó el programa FREENA para estimar la frecuencia de alelos nulos y probar su efecto sobre la estimación de estructura poblacional utilizando los valores de F_{ST} obtenidos con FREENA, tomando en cuenta la frecuencia de alelos nulos estimados con el método de máxima expectativa (Chapuis & Estoup 2007).

Se calculó la diferencia genética observada dentro y entre poblaciones con ayuda de un Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) bajo el modelo de alelos infinitos y 999 permutaciones, implementados en GENALEX 6.501 (Peakall & Smouse 2012). Se calcularon los valores pareados de F_{ST} y el métrico D (Jost-D) (Jost 2008); en donde D mide el grado relativo actual de diferenciación de la frecuencia de alelos entre los demes de una población, es decir que no utiliza la

heterocigosidad (Jost 2009). Los cálculos fueron realizados en el programa GENODIVE (Meirmans & Van Tienderen 2004).

Se realizó un análisis de asignación por clúster bayesiano en el programa STRUCTURE versión 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) utilizando los modelos Admixture y Non-Admixture con y sin la opción Loc Prior para ambos modelos (cuatro combinaciones) y con la misma frecuencia alélica correlacionada entre poblaciones. La longitud de datos descartados fue de 1,000,000 con un número de repeticiones de Cadenas de Markov-Monte Carlo (MCMC), después de los datos descartados, de 2,000,000 y 10 iteraciones por K (K= poblaciones) y una K asumida de 20 (20 localidades).

La intención fue que alguno de los modelos tuviera su mejor ajuste a un $K=3$ que determina las tres especies y por lo tanto su distribución a lo largo de ambas costas de la península de Baja California, siguiendo la guía obtenida por los análisis mitocondriales. Para determinar el número aproximado de K o sea poblaciones, se seleccionaron los clúster o grupos con los valores más elevados (10 iteraciones por K) ($\ln P(K)$), así como los valores modales más altos de la mejor K (Best K ó ΔK). Ambos valores fueron utilizados ya que se ha sugerido que el método de verosimilitud no siempre es el más aproximado y de acuerdo con Evanno et al. (2005), los valores de ΔK están basados sobre la tasa de cambio en el logaritmo de probabilidad de los datos entre los valores sucesivos de K (en este caso, nuestro ΔK está basado en el clúster modal de 10 iteraciones por K, es decir unos 200 valores de K), lo que provee una mejor estimación del número de clúster genéticos. La agrupación de los datos se realizó con los programas en línea Structure harvester (Earl & vonHoldt 2011) y CLUMPAK (Kopelman et al. 2015).

Resultados

Análisis filogenético

Un total de 1054 bp fueron secuenciadas, incluyendo las 473 para el gen 16s y 581 para el gen COI. Los modelos óptimos de sustitución según los criterios de información de Akaike y Bayesiano según jModelTest2 (Darriba et al. 2012), fueron TrN+I para 16s y TN93+G para COI. En ambos genes se observó una clara posición monofilética para las tres especies (Fig. 7)

Octopus bimaculoides fue claramente monofilético, agrupando a los organismos colectados en las localidades de la costa oeste de la Península de Baja California, (Ejido Erendira, San Quintín y Bahía Magdalena), las cuales no compartieron con ninguna de las otras dos especies. El estatus monofilético y las localidades específicas fueron confirmadas con las secuencias de gen COI, formando un subgrupo para las secuencias de Bahía Magdalena. Su presencia no fue evidente entre las muestras o grupos que conformaron al Golfo de California.

Un único grupo fue formado para *O. bimaculatus*, utilizando ambos genes 16s y COI, los cuales están integrados por organismos de localidades de Malarrimo de la costa oeste de la península y del norte del Golfo de California compuesto por Puerto Peñasco, Puerto Refugio, Puerto Lobos, San Luis Gonzaga, Bahía de los Ángeles y una muestra de Puerto Libertad para 16s (desafortunadamente esta muestra no amplificó para COI). Esto sugiere que *O. bimaculatus* está presente con una frecuencia baja en Puerto Libertad, donde *O. hubbsorum* fue evidente en un clado monofilético en ambos conjuntos de secuencias 16s y COI, formando un grupo en el centro del Golfo de California el cual incluye a Puerto Libertad, Isla San Lorenzo, Bahía Kino y Santa Rosalía (Fig. 7).

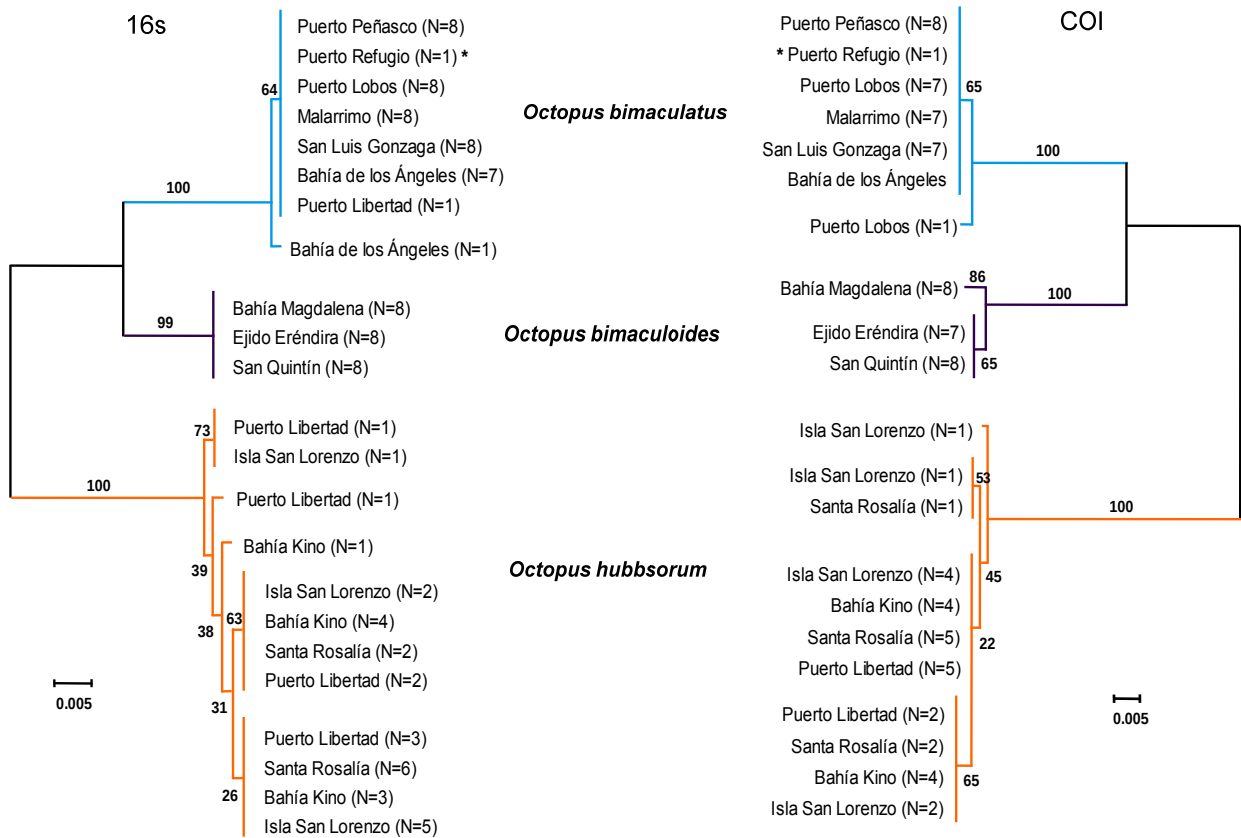


Figura 7. Árboles filogenéticos de las tres especies de pulpo en el Noroeste de México, utilizando secuencias de 16s (izquierda) y COI (derecha). Azul = *Octopus bimaculatus*, Morado = *Octopus bimaculoides* y Naranja = *Octopus hubbsorum*.

La tasa de divergencia de nucleótidos entre las tres especies varió de 3.3 a 7.1% para 16s y de 6.3 a 10.4% para COI (Tabla V). Sucesivamente, *O. bimaculoides* diverge de *O. bimaculatus* por 3.3% y de *O. hubbsorum* por 6.3%. Mientras que *O. bimaculatus* diverge de *O. hubbsorum* por 7.1%, un patrón similar se muestra con las secuencias de COI, pero con mayor divergencia. *Octopus bimaculoides* diverge de *O. bimaculatus* por 6.3% y por un 10.0% de *O. hubbsorum*. Mientras que *O. bimaculatus* diverge de *O. hubbsorum* por 10.4%. La mayor divergencia fue siempre con *O. hubbsorum* en ambos genes.

Tabla V. Divergencia genética entre especies de pulpo en el noroeste de México, identificadas por medio de fragmentos de secuencias 16s (debajo de la diagonal) y COI (arriba de la diagonal). El error estándar se muestra entre paréntesis

	<i>O. bimaculoides</i>	<i>O. bimaculatus</i>	<i>O. hubbsorum</i>
<i>O. bimaculoides</i>	-	0.0632 (± 0.0104)	0.1005 (± 0.0142)
<i>O. bimaculatus</i>	0.0328 (± 0.0079)	-	0.1042 (± 0.0139)
<i>O. hubbsorum</i>	0.0629 (± 0.0113)	0.0708 (± 0.123)	-

Análisis de microsatélites

De la amplificación y genotipificación de siete loci en 316 muestras distribuidas entre 20 localidades, se observó una proporción de datos faltantes de 3.75% en promedio (rango 1.26% - 7.27%) por locus y 3.84% en promedio (rango 0% - 28.5%) por muestra. Es decir que como máximo, menos de un locus no funcionó (7.27%) en todas las muestras y como máximo dos loci (28.5%) no funcionaron en una misma muestra, pero si en todas las demás.

La prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg, mostró desviaciones significativas en 28 de 140 combinaciones únicas entre población y loci ($P < 0.05$). Todos los loci presentaron, al menos una vez, desviación significativa de Hardy-Weinberg, siendo los loci Ocbi39 y Ocbi41 los más frecuentes en 6 poblaciones cada uno. De igual manera, exceptuando Ocbi35 y Ocbi41, todos los loci presentaron alelos nulos al menos una vez, siendo Ocbi39 el más frecuente en 8 localidades. Dos loci fueron definidos como monomórficos Ocbi41 en una población y Ocbi50 en 4 poblaciones (Apéndice A).

Análisis de Datos

Los siete loci probados en las tres especies y 20 localidades fueron altamente polimórficos para todas la poblaciones (15 – 30 alelos) el número de alelos (N_A) promedio fue moderado 7.59 ± 0.36 (rango 2.9 - 11.7). La diversidad alélica (N_E) promedio entre poblaciones fue 5.12 ± 0.24 (rango 2.6 - 7.3). Mientras que un análisis de rarefacción por tamaño de muestra indicó una riqueza alélica (R_A) más

homogénea entre todas las poblaciones 3.67 (rango 2.86 - 4.30), el análisis fue ajustado a 6 genes como mínimo, incluso para isla El Dátil e isla San Pedro Mártir con solo 3 muestras, sin embargo los valores de N_A y N_E fueron similares a R_A 4 y 2.6, respectivamente (Tabla VI). La Bocana y Puerto Lobos tuvieron los valores promedio más altos de riqueza alélica, mientras que Isla San Pedro Mártir registro los valores más bajos (2.86). La riqueza de alelos privados promedio (P_{AR}) fue de 0.19 (rango 0 - 0.76). La población de San Quintín tuvo el valor promedio más elevado 0.76, seguido por Puerto Libertad (0.67) y Puerto Lobos (0.24). Los valores más bajos fueron para Isla San Pedro Mártir (0.00) (Tabla VI).

Tabla VI. Variación genética entre localidades para las tres especies. Tamaño de muestra (N), valores promedio y error estándar del número de alelos (N_A) número de alelos efectivos (N_E) heterocigosidad observada (H_O) y esperada (H_E), riqueza alélica (R_A) y riqueza de alelos privado (R_{AP}).

Población	N	N_A	N_E	H_O	H_E	R_A	R_{AP}
Ejido Erendira	14	5.00 ± 0.93	3.22±0.58	0.77±0.09	0.62±0.07	3.00	0.04
San Quintín	9	6.14 ± 1.49	4.44±1.18	0.52±0.12	0.62±0.11	3.42	0.76
Bahía Magdalena	9	4.29 ± 0.71	3.34±0.62	0.91±0.05	0.65±0.05	3.10	0.17
La Bocana	5	5.86 ± 0.51	4.73±0.49	0.94±0.06	0.77±0.03	4.30	0.05
Las Barrancas	5	5.43 ± 0.53	4.49±0.61	0.72±0.11	0.73±0.07	4.22	0.17
El Conejo	8	5.00 ± 1.31	4.09±1.07	0.65±0.12	0.60±0.12	3.27	0.16
Malarrimo	32	11.7 ± 0.71	6.01±0.79	0.79±0.08	0.79±0.06	4.09	0.11
Puerto Peñasco	32	11.4 ± 0.87	7.29±1.15	0.87±0.06	0.81±0.07	4.25	0.10
San Luis Gonzaga	8	6.71 ± 1.02	5.21±0.76	0.79±0.14	0.71±0.12	4.02	0.03
Puerto Refugio*	17	9.14 ± 1.20	6.11±0.96	0.68±0.11	0.77±0.08	4.07	0.10
Isla Smith	25	11.1 ± 1.24	6.76±0.89	0.84±0.06	0.81±0.06	4.25	0.23
Bahía de Los Ángeles	14	9.57 ± 0.75	6.20±0.89	0.68±0.10	0.78±0.07	4.23	0.07
Puerto Lobos	25	10.4 ± 0.75	6.66±0.83	0.77±0.08	0.82±0.04	4.30	0.24
Puerto Libertad	14	8.86 ± 1.18	5.85±1.39	0.70±0.10	0.72±0.08	3.91	0.67
Isla San Lorenzo	22	7.71 ± 2.11	5.17±1.55	0.57±0.15	0.61±0.13	3.34	0.09
Isla Tiburón	31	10.0 ± 2.35	5.89±1.47	0.53±0.12	0.69±0.10	3.64	0.16
Isla el Dátil	3	4.00 ± 0.31	3.23±0.39	0.76±0.06	0.66±0.04	4.00	0.10
Bahía Kino	32	10.0 ± 2.86	6.32±1.77	0.70±0.14	0.66±0.13	3.54	0.15
Isla San Pedro Mártir	3	2.86 ± 0.63	2.58±0.56	0.41±0.17	0.46±0.13	2.86	0.00
Santa Rosalía	8	6.57 ± 1.51	4.82±1.14	0.75±0.12	0.66±0.11	3.65	0.32
Total	316	7.59 ± 0.36	5.12±0.24	0.72±0.02	0.70±0.02	3.77	0.19

La heterocigosidad promedio observada fue de 0.72 ± 0.02 (rango 0.40 - 0.94) mientras que la esperada fue de 0.70 ± 0.02 (0.46 - 0.82). En casi todas las poblaciones la heterocigosidad observada fue ligeramente mayor a la esperada, como resultado del exceso de heterocigosidad. Bahía Magdalena y La Bocana tuvieron la mayor heterocigosidad (0.91 y 0.94, respectivamente), mientras que la heterocigosidad más baja se registró para Isla San Pedro Mártir e Isla Tiburón (0.41 y 0.53, respectivamente) (Tabla VI).

La frecuencia de alelos nulos afecta la estimación de diferenciación poblacional, por ejemplo, reduciendo la diversidad genética dentro de las poblaciones. Es decir, los valores de distancia genética y F_{ST} generalmente incrementan conforme se reduce la diversidad genética dentro de la población (Chapuis & Estoup 2007); sin embargo, en el presente estudio los valores de F_{ST} globales con y sin corrección de alelos nulos fueron muy similares ($F_{ST} = 0.154 \pm 0.005$ y $F_{ST} = 0.159 \pm 0.004$, respectivamente) (valores pareados en el apéndice B). Los valores pareados sin corrección ($F_{ST} = 0.159$) por alelos nulos estuvieron en un rango de 0.007 - 0.316. Mientras que las estimaciones de Jost' D mostraron varios órdenes de magnitud de diferencia (Jost' D = 0.550) y los valores variaron en un rango de 0.015 y 0.882 (ver los valores pareados en el Apéndice B).

El primer método mostró que no existía un efecto significativo con respecto a la presencia de alelos nulos manteniendo los valores de diferenciación genética muy similares. Los valores de F_{ST} y las estimaciones de Jost D, mostraron altos niveles de diferenciación genética entre las 20 poblaciones (ver los valores pareados en el Apéndice C) inclusive entre localidades que se agruparon para la misma especie siguiendo los análisis mitocondriales. Por ejemplo, las tres localidades donde COI y 16s ubicaron a *O. bimaculoides*; se observó que los organismos de Bahía Magdalena tienen una mayor estructura genética con respecto a San Quintín y Ejido Erendira ($F_{ST} = 0.219$ y 0.232 , Jost D= 0.571 y 0.572, respectivamente), mientras que entre éstas últimas dos localidades hay una menor estructura genética ($F_{ST} = 0.174$, Jost D= 0.381, respectivamente).

Para *O. hubbsorum* identificado previamente por COI y 16s en las localidades de Santa Rosalía, Bahía Kino, Puerto Libertad e Isla San Lorenzo se observó una fuerte estructura genética promedio $F_{ST} = 0.189$, Jost' $D = 0.524$ y la menor estructura se observó entre Isla San Lorenzo y Bahía Kino ($F_{ST} = 0.126$, Jost' $D = 0.268$) (Apéndice C).

Para *O. bimaculatus*, se observó que la población de Malarrimo en el lado Pacífico mostró la mayor diferenciación genética promedio ($F_{ST} = 0.121$, Jost' $D = 0.565$) con respecto a las localidades que se encuentran en el norte del Golfo de California. Mientras que al interior del Golfo de California, San Luis Gonzaga y Puerto Refugio presentaron la mayor diferenciación genética ($F_{ST} = 0.144$, Jost' $D = 0.593$). La localidad con menos estructura genética fue Puerto Lobos con respecto a Puerto Peñasco y San Luis Gonzaga ($F_{ST} = 0.026$ y 0.036 , Jost' $D = 0.126$ y 0.161 , respectivamente) (Apéndice C).

El análisis molecular de varianza indicó que la mayor variación de frecuencia alélica fue dentro de las poblaciones (78%) seguido por una significativa variación entre poblaciones (15%) ($P = 0.001$) (Tabla VII).

Tabla VII. Análisis molecular de variancia para las tres especies de pulpo.

Fuente de Variación	Varianza (%)	g. l.	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Varianza estimada	P
Entre Poblaciones (F_{ST})	15	19	331.474	17.446	0.471	0.001
Entre Individuos (F_{IS})	7	296	859.306	2.903	0.215	0.001
Dentro Individuos (F_{IT})	78	316	781.500	2.473	2.473	0.001
Total	100	631	1972.280		3.159	

Análisis de clúster (STRUCTURE)

De los cuatro modelos que fueron sometidos a STRUCTURE, el más adecuado fue el modelo no aditivo (Non-Admixture) en conjunto con la opción LOCPRIOR, el cual es mejor para evaluar poblaciones discretas y la opción utiliza las localidades de muestreo como información previa para asistir al agrupamiento (Clúster); este modelo fue considerado como “conservativo” (Fig. 8 A y B). Dada la

sensibilidad de STRUCTURE, se realizaron análisis sin considerar el locus Ocbi39 debido que fue el más frecuente en las poblaciones para alelos nulos y desvío de EHW (apéndices A y B). Estos modelos fueron catalogados, uno como “libre” en el cual las condiciones fueron por defecto de STRUCTURE (aditivo o admixture y sin la opción LOCPRIOR, es decir que los organismos pueden tener ancestría ó el organismo ha heredado una fracción del genoma de un ancestro de una determinada población) y el otro como “semi-conservativo” (aditivo o admixture con la opción LOCPRIOR, es decir considerando información previa para asistir el agrupamiento o clúster).

El modelo “conservativo” encontró un máximo posible de 11 poblaciones (media $\ln P(K) = -8763.62$), mientras que el mejor ajuste de ΔK fue 2, es decir la frecuencia modal fue de dos clúster genéticos o especies (Fig. 8 B y Fig. 8 A). Sin embargo, cuando se observan los valores de media $\ln P(K)$ de $K = 2$ y $K = 3$, (Fig. 8 A), éstos son muy similares en 10/10 repeticiones involucradas en la matriz, la cual tuvo una mejor similitud en $K = 3$ (0.998) que en $K = 2$ (0.993) (Fig. 9 A). Dado lo anterior $K = 3$ podría ser considerado para explicar mejor la distribución de las tres especies (Fig. 9 A, $K = 3$).

Los resultados del modelo “libre” fueron muy similares a los del modelo “conservativo”, identificando un máximo de 11 poblaciones media ($\ln P(K) = -7608.52$) y una frecuencia modal de 2 poblaciones ($\Delta K = 2$) (Fig. 8 C y D). Los valores entre $K = 2$ y $K = 3$ en la figura 9 B, muestran una matriz de similitud idéntica (0.999) en 10/10 repeticiones.

El modelo “semi-conservativo” identificó un máximo de 8 poblaciones ($\ln P(K) = -7664.11$) y un mejor ajuste modal de 3 poblaciones ($\Delta K = 3$) (Fig. 8 E y F). Los valores entre $K = 2$ y $K = 3$ en la figura 9 C, muestran una mejor similitud entre matrices para $K = 3$ (0.969).

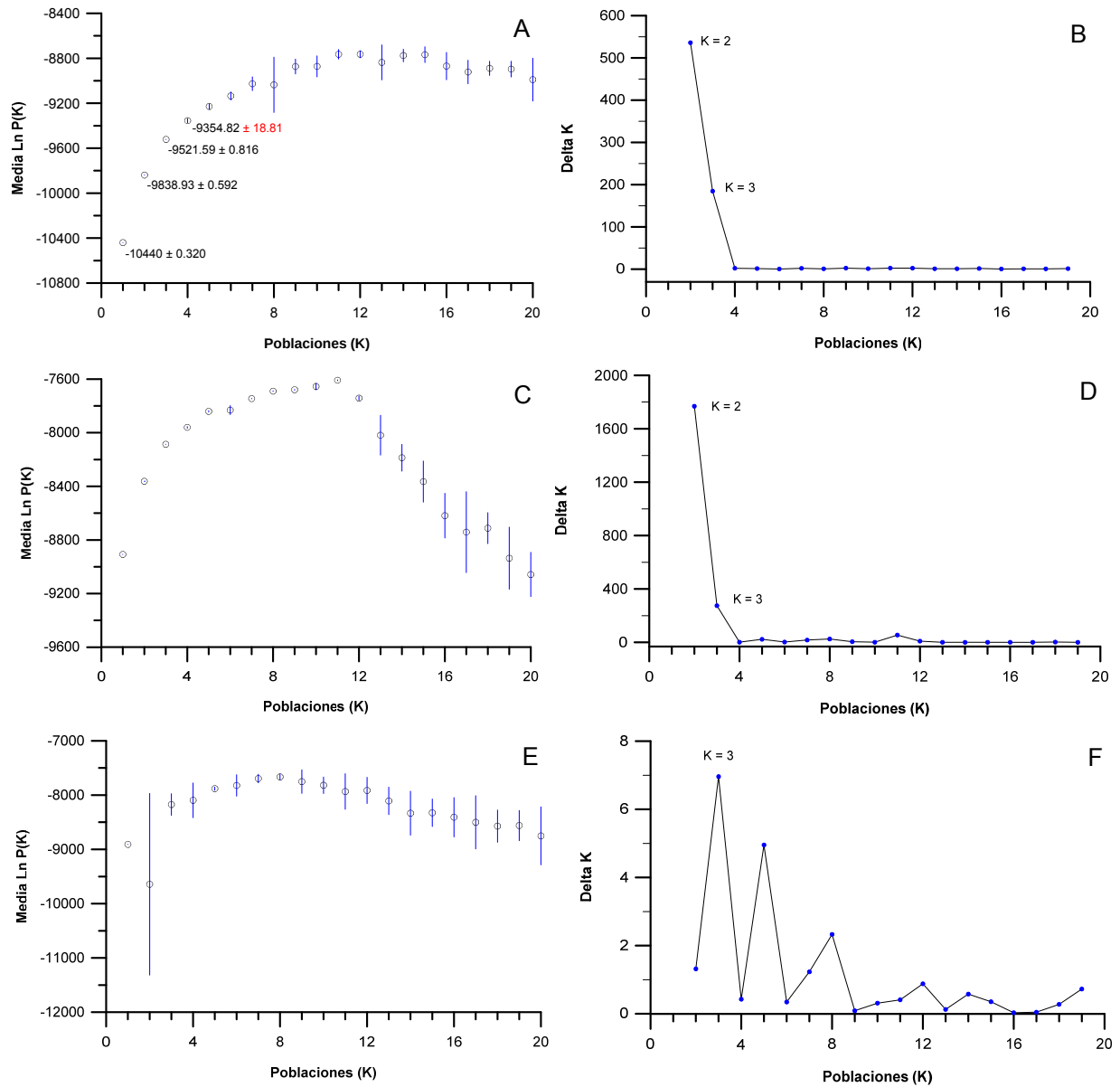


Figura 8. Asignación de grupos (clústers) obtenidos de STRUCTURE y STRUCTURE HARVESTER. A, C y E, muestran la función promedio del Logaritmo de probabilidad poblacional, con valores promedio y desviación estándar. B, D y F muestran la función modal de Delta K, para obtener el K verdadero o el mejor K. A y B consideran los 7 loci. C, D, E y F consideran 6 loci y no consideran el locus Ocbi39. C y D es el modelo con condiciones por defecto de STRUCTURE (excepto iteraciones y MCMC) mientras que E y F consideran un modelo similar a A y B.

En la figura 9 y 10 se presentan las graficas de agrupamiento y la distribución geográfica, respectivamente. *Octopus bimaculatus* se encuentra en las localidades de La Bocana, Las Barrancas y Malarrimo en la costa occidental de la Península; mientras que en el GC fueron las localidades de Puerto Peñasco, San Luis Gonzaga, Puerto Refugio, Isla Smith, Bahía de los Ángeles, Puerto Lobos y muy probablemente Isla El Dátil (n=3) (Fig. 10). Por su parte, *O. hubbsorum*, fue encontrado en la localidad de El Conejo en la costa occidental de la Península, mientras en el GC estuvo presente en Isla San Lorenzo, Isla Tiburón, Bahía Kino Santa Rosalía y probablemente en Isla San Pedro Mártir (n=3) (Fig. 9 y 10). Finalmente, *O. bimaculoides* estuvo presente en Ejido Erendira, San Quintín y Bahía Magdalena en la costa occidental de la península (Fig. 9 y 10)

Algunas localidades presentaron, individuos con dos especies, por ejemplo, la más evidente fue Las Barrancas, que independientemente del modelo, siempre mostró la presencia de *O. bimaculatus* y *O. hubbsorum*, al igual que Puerto Libertad (7/8 muestras y solo una muestra para *O. bimaculatus* (1/8) (Fig. 7). Sin embargo, en los análisis bayesianos Puerto Libertad se identificó mas para *O. bimaculoides* para uno de los modelos (Fig. 9 A), pero fue corregida conforme la sensibilidad del modelo incrementó (Fig. 9 B y C), logrando el agruparse conforme a lo observado en el análisis filogenético (Fig. 7).

Bahía Magdalena también presentó cambios con respecto al modelo utilizado, identificando el grupo como si perteneciera a *O. bimaculatus* en el modelo semi-conservativo (Fig. 9 C), cuando en los otro dos modelos (Fig. 9 A y B) lo identificó como *O. hubbsorum*, como se observó en el análisis filogenético (Fig. 7).

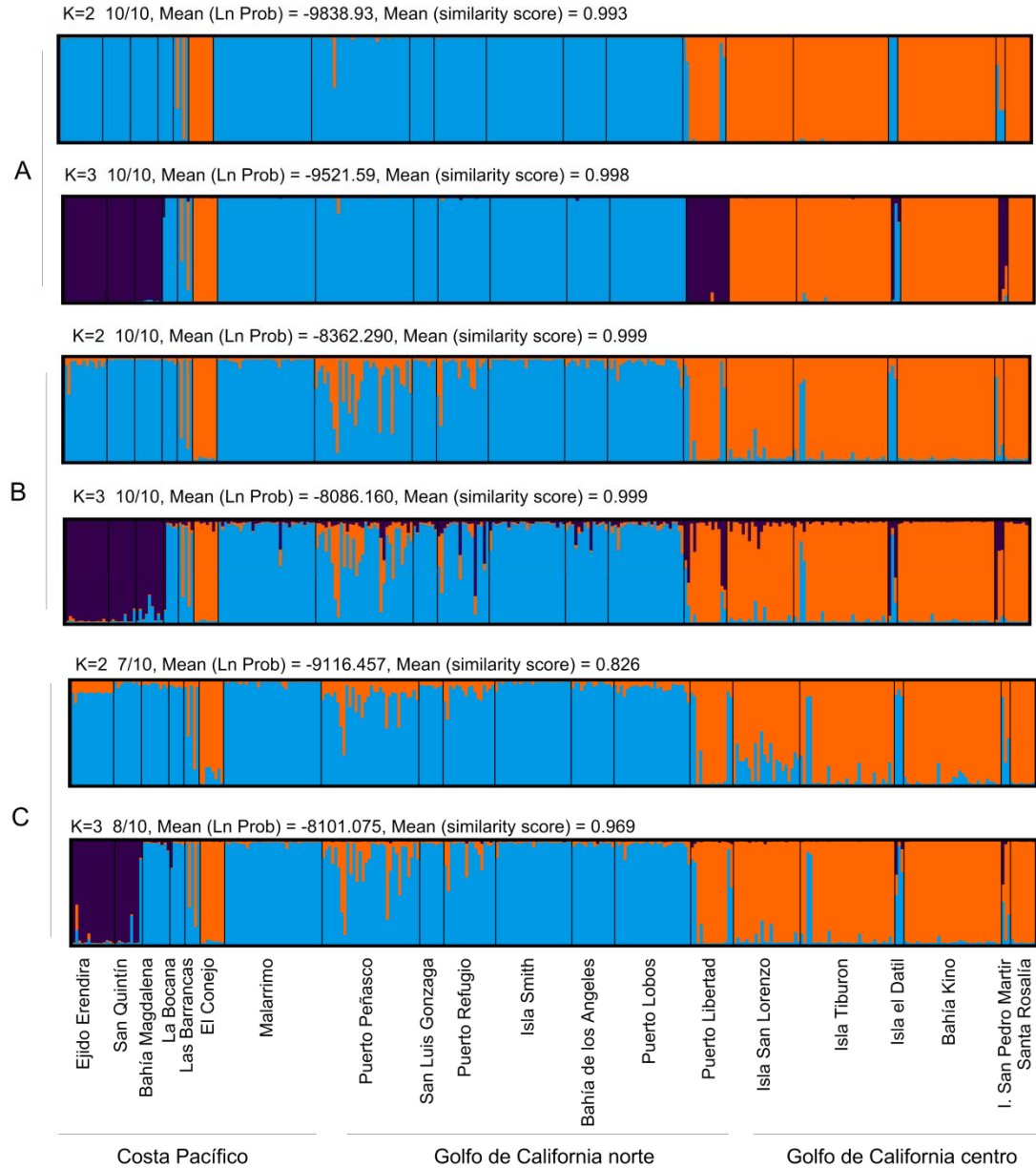


Figura 9. Gráfica de barras indicando la probabilidad de asignación de individuos de 10 réplicas independientes para K = 20 o 20 localidades. A) modelo conservativo K = 2, B) modelo libre K = 2 y C) modelo semi-conservativo K = 3. Morado = *Octopus bimaculoides*, Azul = *Octopus bimaculatus*, y Naranja = *Octopus hubbsorum*.

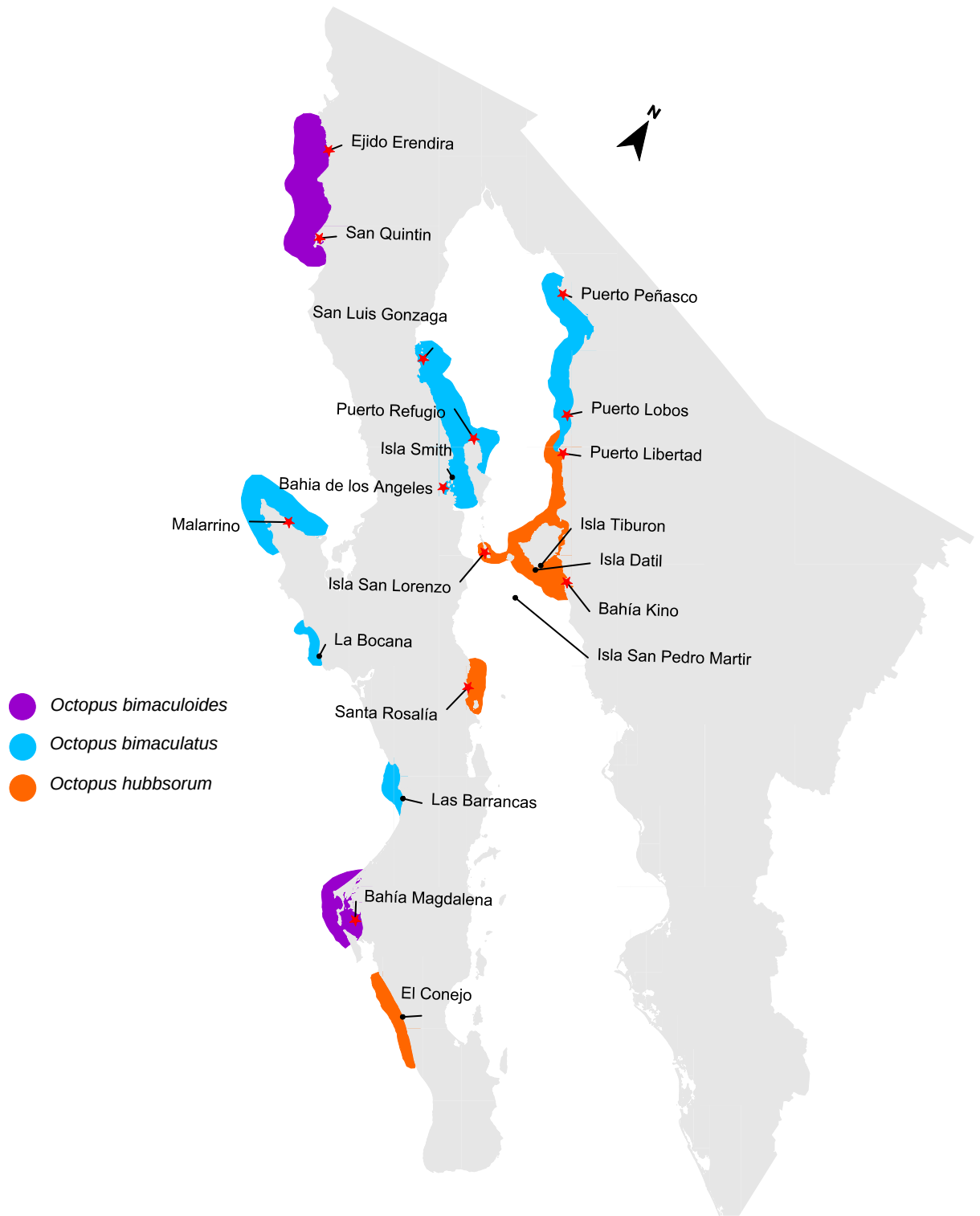


Figura 10. Distribución geográfica de las poblaciones de *O. bimaculatus*, *O. bimaculoides* y *O. hubbsorum* en el noroeste de México de acuerdo al análisis bayesiano de clúster obtenido de STRUCTURE.

Discusión

Análisis de Datos

En el presente trabajo se utilizaron marcadores mitocondriales para fragmentos de COI y 16s con la intención de diferenciar especies de pulpo, una de las cuales no contaba con secuencias previas (*Octopus bimaculatus*). De manera complementaria, se utilizaron marcadores nucleares tipo microsatélites para observar un nivel de estructura suficiente y discriminar las especies que fueron identificadas por métodos mitocondriales. Con la finalidad de poder ampliar el análisis y determinar que especie está presente en una determinada localidad, se incrementó el tamaño de muestra de 96 en 13 localidades utilizando COI y 16s a 316 ejemplares distribuidos en 20 localidades usando 7 microsatélites.

El análisis molecular de varianza mostró que el 15% de variación genética se observó entre poblaciones (Tabla VII). Sin embargo, la estimación estandarizada de Jost muestra una mayor diferenciación genética (Jost D = 0.550) incluso para localidades que agrupó el análisis mitocondrial para especie (apéndice C). La presencia de alelos nulos no mostró una variación que sea considerada significativa ($F_{ST} = 0.159$), que en la ausencia de estos ($F_{ST} = 0.154$) (Apéndice B).

Los modelos empleados no siempre presentaron el mejor ajuste de estructura esperado (es decir $\Delta K = 3$), al respecto Evanno et al. (2005), mencionan que cuando la moda de Delta K está ausente en la K verdadera, se puede deber a un bajo tamaño de muestra y a un bajo número de marcadores que fueron utilizados para el análisis, lo que lleva a una ausencia de señal o a una inspección visual de L (K) el cual, probablemente, habría identificado valores extremos en el corridas de MCMC, como se observó en la figura 8 E, donde se observa la desviación estándar más extrema en K = 2, cuando se eliminó el locus Ocbi39. Al respecto, Carlsson (2008) menciona que los alelos nulos reducirán ligeramente la proporción de asignación correcta de individuos en pruebas de asignación como STRUCTURE y GENECLASS, pero se incrementará el sesgo en la asignación si el número de loci es bajo; él utilizó 12 loci.

Aun cuando los modelos tuvieron diferencia, la correspondencia de especies por localidad entre marcadores mitocondriales y microsatélites fue alta (92%). De las 13 localidades identificadas por especie en el análisis mitocondrial, 12 presentaron la estructura suficiente para diferenciar 3 grupos específicos (especies) con microsatélites. Los cuales, podrían ser considerados como marcadores diagnósticos, al menos para diferenciar a estas tres especies. Este tipo de análisis con diferentes tipos de marcadores han sido empleados con éxito en otros organismos como peces (Vanhaecke et al. 2012, Barmintseva & Mugue 2013) y especies de *Drosophila* (Routtu et al. 2007).

Divergencia genética entre especies

Tres grupos monofiléticos fueron conformados. *O. bimaculatus* y *O. bimaculoides* fueron relativamente más cercanas entre sí que con *O. hubbsorum* usando ambos marcadores (Fig. 7, Tabla V). La estrecha relación entre *O. bimaculatus* y *O. bimaculoides* ya había sido previamente reportada por Sosa et al. (1995), quienes definieron que son dos especies distintas con 5.5% de divergencia genética utilizando COIII. El presente estudio mostró una diferencia mínima de 3.3% y de 6.3% utilizando 16s y COI, respectivamente, los cuales están cercanos a los reportados por Pliego-Cárdenas (2015) 2.6% y 7.0%, respectivamente. Las diferencias de ambas especies con *O. hubbsorum* fueron de 6.3% y 7.0% con 16s, las cuales fueron mayores a las reportadas por Pliego-Cárdenas (2015), 4.2 para *O. bimaculatus* y 3.5 para *O. bimaculoides*. Para COI, la diferencia fue más grande en 1.1% y 1.8% respecto a los valores obtenidos en el presente estudio (~10%). Pliego-Cárdenas et al. (2014) mencionan que no lograron ubicar a *O. bimaculoides* cuando utilizaron COI y COIII por separado, sin embargo cuando utilizaron 16s, esta especie estuvo relacionada al clado *O. hubbsorum-mimus*, *O. maya* y *O. insularis*.

Distribución de especies

Octopus bimaculoides se encontró en las costas de Ejido Erendira, y al interior de Bahía de San Quintín y Bahía Magdalena, localidades a lo largo de la costa oeste

de la península de Baja California. Forsythe & Hanlon (1988a) reportaron su distribución desde California hasta Bahía San Quintín, y su presencia en Bahía Magdalena no había sido considerada hasta recientemente (Ibarra-García 2012, Zamacona-Mora 2015) al igual que en la Laguna Guerrero Negro (González-Meléndez 2012). *Octopus bimaculoides* se encuentra principalmente en hábitat con lodos, limos y arenas finas, sin embargo los organismos más grandes o viejos pueden ser encontrados hasta los 20 m de profundidad sobre rocas o camas de Kelp (Hochberg & Fields 1980, Stoskopf & Oppenheim 1996). Los bosques de kelp *Macrosystis pyrifera* y *Eisenia arborea* que son dos laminariales que presentan una fijación al sustrato rocoso por medio de disco, y se distribuyen desde California hasta Bahía Magdalena (Lüning & Dieck 1990, Graham et al. 2007). Por lo tanto, su distribución podría ser continua hasta Bahía Magdalena, ya que se han registrado 16 lagunas costeras desde ensenada hasta Bahía Magdalena (Lankford 1977).

La capacidad de dispersión de *O. bimaculoides* sobre grandes distancias pudiera estar influenciada negativamente por las características de su ciclo de vida el cual es relativamente corto (14 - 17 meses), presenta una baja fecundidad (centenas de huevos) y tiene un desarrollo directo o bentónico al eclosionar los juveniles (no tienen fase paralarva o planctónica) (Forsythe & Hanlon 1988h). No obstante, al eclosionar los juveniles se dispersan por rastreo o natación, en lugar de depender únicamente de la corrientes oceánicas (Sinn 2008). Adicionalmente, Thiel & Gutow (2005) observaron 11 especies de cefalópodos a la deriva sobre madera o macroalgas, incluyendo adultos de *O. bimaculatus*, *O. micropyrsus*, *O. variabilis*, *O. vulgaris* y *O. bimaculoides*, lo que tiene ventajas como un medio de transporte pasivo y almacenamiento de energía, incrementando su capacidad de dispersión.

Octopus bimaculatus fue evidente en ambas costas de la Península, principalmente desde Malarrimo (cerca de Punta Eugenia) hasta Las Barrancas sobre la costa oeste, lo que extiende su rango de distribución en esta región, el cual era conocido desde California hasta Punta Eugenia (Ambrose 1988, 1990). Sin embargo, su distribución probablemente se extienda hasta Bahía Magdalena (Domínguez-Contreras et al. 2013). Por otra parte, en el Golfo de California su

distribución fue restringida de Bahía de Los Ángeles a Puerto Libertad subiendo hasta Puerto Peñasco en el norte del Golfo de California, lo que sugiere que la distribución de *O. bimaculatus* quizás no sea continua a lo largo de la península en el Golfo de California, como se había supuesto (San Felipe B.C. a La Paz B.C.S) (Hochberg & Fields 1980, Ambrose 1990). Recientemente, un extenso muestro realizado en el GC que incluía a La Paz, Loreto, Mulege y Santa Rosalía, no mostró ningún pulpo con ocelos (Domínguez-Contreras, datos sin publicar), y por el contrario, en estas localidades es más frecuente observar a la especie *O. hubbsorum* (López-Uriarte et al. 2005).

Octopus bimaculatus, puede estar de diversos hábitats (Kelp, Rocas, Arenas) y tiende a permanecer siempre cerca de su madriguera o en la misma área (Ambrose 1982), tiene un ciclo de vida corto (15-24 meses) y una elevada fecundidad (>20,000 huevos), sin embargo presenta una fase planctónica después de la eclosión que puede durar de 2 a 3 meses (Ambrose 1981) y la cual permitiría dispersarse grandes distancias, incluso comunicarse con el norte del Golfo de California, como se ha visto en otras especies como *Panopea globosa*, con una duración larvaria de ~40 días, en donde el flujo genéticos es del norte del Golfo de California hacia Bahía Magdalena (Munguía-Vega et al. 2015a).

Octopus hubbsorum también fue asignado a ambas costas de península, en El Conejo en la costa oeste, mientras que en el GC está en Santa Rosalía, Isla San Lorenzo, Bahía de Kino, Isla Tiburón y Puerto Libertad. Al respecto, *O. hubbsorum* fue descrito por primera vez por Berry (1953) de un organismo colectado en Bahía San Carlos en Sonora, México. Posteriormente se consideró que esta especie era endémica del GC (Hendrickx et al. 2005). Sin embargo, López-Uriarte et al. (2005) ampliaron su rango de distribución desde Bahía de los Ángeles en el GC hasta Salina Cruz en Oaxaca, y recientemente una población bien establecida ha sido reportada en Bahía Magdalena (Domínguez-Contreras et al. 2013) con una distribución potencial hasta las costas de Chile (Pliego-Cárdenas et al. 2014).

Octopus hubbsorum al igual que *O. bimaculatus*, tiene preferencia sobre hábitat rocoso (con excepción de los bosques de Kelp) (López-Uriarte & Rios-Jara

2010). Presenta un ciclo de vida relativamente corto de 12 a 18 meses, tiene una elevada fecundidad que rebasa los 100,000 huevecillos, (Pliego-Cárdenas et al. 2011), y su dispersión también se realiza por medio de paralarvas (Alejo-Plata & Alejo 2014).

Aspectos Biogeográficos

Octopus bimaculatus y *O. bimaculoides* tienen una distribución geográfica muy similar, pero el hábitat y la forma de dispersión parecen ser muy distintas. Por otra parte, *O. bimaculatus* y *O. hubbsorum* tienen ciclos de vida, dispersión y aparentemente hábitats muy similares, no obstante su distribución geográfica está bien delimitada en ambas costas de la península, de manera similar con *O. bimaculoides*. Estas características podrían suponer que las especies *O. bimaculatus* y *O. bimaculoides* podrían ser consideradas especies de regiones templadas, mientras que *O. hubbsorum* sería una especie más tropical. Las regiones biogeográficas se describen frecuentemente basadas sobre el rango en el cual se traslapan muchas especies y las fronteras entre estas regiones pueden derivan de una discontinuidad histórica o de diferencias ambientales, tales como las diferencias en la temperatura y salinidad (Riginos & Nachman 2001, Riginos et al. 2011).

Los principales límites de distribución o bien donde se traslapan las especies de pulpo fueron la región alrededor de Bahía Magdalena en la costa oeste de la península y Puerto Libertad en el Golfo de California. Al respecto, Bahía Magdalena es el lugar donde la tasa de cambio de especies es más elevada, ya que muchas de las especies tropicales se extienden hacia el norte por una considerable distancia, encontrando condiciones adecuadas en zonas someras, bahías protegidas e islotes, mientras que muchas especies norteadas de aguas frías son encontradas dentro de la influencia de zonas de surgencias alejadas de la costa (Briggs 1974, Briggs & Bowen 2012, Briggs et al. 2013). Por otra parte, Briggs (1974) mencionó que la frontera biogeográfica dentro del Golfo de California puede ser hasta la costa de Guaymas en Sonora para especies con una distribución tropical, así mismo se han determinado tres regiones faunísticas: Norte (Bahía de Kino), Centro (Guaymas) y Sur del Golfo de California (La Paz-Bahía de Banderas) (Hendrickx et al. 2005). Específicamente el

Golfo de California tienen una zona de transición con aguas cálidas-tropicales en el sur y aguas templadas-frías en la parte norte (Brusca 2010), aunque el Golfo de California también ha sido considerado como una región templada-cálida (Spalding et al. 2007, Briggs & Bowen 2012).

Si bien existe el registro de la presencia de *O. bimaculatus* en las costas de Oaxaca (Alejo-Plata et al. 2012), esta debería de tomarse con precaución, debido al número (3 juveniles, 15 paralarvas) y la calidad de muestras (muestras fijadas), así como la identificación. En este sentido, es conocido que unos de los principales problemas para diferenciar especies es la fijación debido a la pérdida de forma, texturas y coloración en octópodos (Norman & Hochberg 2005). También es sabido que los juveniles y machos de *O. bimaculatus* y *O. bimaculoides* son difíciles de diferenciar morfológicamente (Pickford & MacConnaughey 1949). De igual manera, Alejo-Plata et al. (2012) concluyeron que *O. bimaculatus* tiene un “acentuado origen tropical” basados en el trabajo filogenético de Perez-Losada et al. (2002b) el cual no incluye a *O. bimaculatus* en el análisis, pero discuten el trabajo de Voight (1988) que encontró semejanza fenotípica entre *O. bimaculatus* y *O. maya*, así como con otras especies. Aún así se recomiendan análisis filogenéticos, ya que se han observado otras especies oceladas alrededor del Istmo panámico en las costas de San Salvador, Panamá y Ecuador, que no han sido identificadas adecuadamente (Verrill 1883, Voight 1988, Ambrose 1990).

Conservación

La pesquería de pulpo en la costa oeste de la península está compuesta por las tres especies y pudiera estar indirectamente regulada, ya que ésta se lleva a cabo principalmente en zonas de concesión de cooperativas pesqueras bien organizadas, las cuales tienen objetivos de pesca específicos y con mucho mayor valor comercial que el pulpo, como el abulón y la langosta, esta última traslapa su temporada de pesca con el evento reproductivo del pulpo. Sin embargo, también existen zonas como la Laguna de Guerrero Negro, donde aparentemente *O. bimaculoides* se pesca todo el año sin ningún tipo de restricción, ni arte de pesca específico (incluyendo cloro) (González-Meléndez 2012). Las zonas de transición

como la región alrededor de Bahía Magdalena también debe tener un mayor enfoque, ya que en esta zona converge la distribución de las tres especies, si bien se sabe por comentarios de pescadores que la especie más capturada es el pulpo verde (*O. hubbsorum* ~80%), no existe un estudio que haya evaluado la composición pesquera real de cada una de las especies (Domínguez-Contreras et al. 2013).

Un análisis de la distribución espacial de las pesquerías en el norte del Golfo de California, mostró que en la región de la grandes islas pueden traslaparse hasta 5 comunidades pesqueras en busca del recurso pulpo al mismo tiempo, desconociendo si su composición específica era *O. bimaculatus* u *O. hubbsorum* (Moreno-Báez et al. 2012). En este sentido, el presente estudio muestra que ambas especies están delimitadas, encontrando a *O. bimaculatus* justo al norte de Isla Tiburón, mientras que *O. hubbsorum* está más asociado a la región de las grandes islas. La importancia de conocer la distribución y las especies que están siendo explotadas tiene un efecto significativo sobre su manejo y conservación. De lo contrario, habría sobreestimaciones de captura para la mayoría de las especies deseables, y simultáneamente un sub-registro o no registro de captura para las especies menos deseables y que potencialmente no están siendo administradas (Marko et al. 2004).

Capítulo III: Conectividad y genética poblacional de especies de pulpo

Conectividad genética de poblaciones de tres especies de pulpo en el noroeste de México

Introducción

En la naturaleza, es común observar conjuntos de organismos de la misma especie en localidades diferentes, sin que la distribución sea continua entre ellos. Este arreglo discreto, también es conocido como una distribución en “parches” y se refiere a las poblaciones locales (Saenz-Agudelo et al. 2012). En el ambiente marino este arreglo es muy frecuente y la comunicación entre estos parches ó “conectividad” puede ser direccional o bidireccional; término que ha sido abordado por varios autores que concuerdan principalmente en una palabra “intercambio” (Lopez-Duarte et al. 2012, Trembl et al. 2012).

La conectividad poblacional es el resultado de la dispersión de individuos (Burgess et al. 2012), dicha dispersión en el ambiente marino se presenta en la mayoría de peces e invertebrados durante los primeros estadios de su historia de vida, y es comúnmente llamada dispersión larval, la cual se asocia con el ambiente pelágico (Cowen et al. 2000). Este parece ser el caso de los pulpos pues en general, su ciclo de vida es corto 1 - 2 años, por lo que largas migraciones como adultos no forman parte de su estrategia (Rodhouse et al. 2014, Hofmeister et al. 2015).

Octopus bimaculatus y *Octopus hubbsorum* son especies merobentónicas es decir, que durante su ciclo de vida presentan una fase de paralarva pelágica, la cual en *O. bimaculatus* puede durar hasta 3 meses en la columna de agua antes de asentarse (Ambrose 1990), pero en otras especies se ha registrado un periodo de hasta 6 meses, lo que depende de diversos factores físicos y ecológicos (Vidal et al. 2014). En contraste, existen las especies holobentónicas que suelen tener un desarrollo directo es decir que no presentan paralarva y se van directamente al bentos después del nacimiento como juveniles, como es el caso de *O. bimaculoides* (Boyle & Rodhouse 2005, Sinn 2008, Vidal et al. 2014). Por lo tanto, se ha mencionado que las especies merobentónicas tienen un mejor potencial de dispersión que las holobentónicas (Higgins et al. 2013).

La conectividad genética se refiere al grado en el cual el flujo de genes afecta los procesos evolutivos en las poblaciones, este flujo puede ser contemporáneo o histórico y dependiendo de la estrategia de dispersión, en el ambiente marino

comúnmente es sobre una amplia escala espacial (Thomas & Bell 2013). Sobre este punto se ha observado que *Octopus vulgaris* (merobentónica) muestra estructura genética a una escala regional (Cabranes et al. 2008), mientras que *Octopus maya* (holobentónica) tiene una estructura muchísimo más débil a una escala local como consecuencia de un menor alcance de dispersión (Juárez et al. 2010).

En el noroeste de México, *O. bimaculoides*, *O. bimaculatus* y *O. hubbsorum* son simpátricas alrededor de las regiones biogeográficas que delimitan su distribución. De acuerdo con reportes anteriores y a lo derivado de esta investigación, se encontró que *O. bimaculatus* y *O. bimaculoides* están presentes desde California EUA hasta Bahía Magdalena México, donde comparten hábitat con *O. hubbsorum*. Mientras que en el Golfo de California están, *O. bimaculatus* por encima de las Grandes Islas y *O. hubbsorum* por debajo.

El patrón de distribución discontinuo de *O. bimaculatus* en la costa oeste de la península y en el norte del Golfo de California, pero no en el sur de la península, coincide con poblaciones de peces que han sido consideradas disyuntas, debido a eventos de glaciación y/o el cierre de canales marinos (“seaways”) (Terry et al. 2000, Bernardi & Lape 2005). No obstante, especies con distribución similar también han mostrado tener flujo de genes o conectividad genética reciente por medio de dispersión larval (Bernardi et al. 2003, Munguía-Vega et al. 2015a).

Ambas costas de la península de Baja California, tienen características físicas propias, por la parte occidental se encuentra el Sistema de la Corriente de California, el cual tiene dos componentes: 1) la Corriente de California que es un sistema de surgencias, con una dirección superficial (0 a 200 m de profundidad) hacia ecuador, de origen sub-ártico y relativamente fría, de baja salinidad y bien oxigenada, y 2) la Contracorriente de California con dirección hacia el polo norte, que debido a su origen en el sur es rica en nutrientes, con elevada salinidad y pobre en oxígeno (Durazo 2015). Mientras que en el Golfo de California, la circulación oceánica está bien documentada por la presencia de giros con cambios en la dirección de la corriente entre estaciones; siguiendo una dirección ciclónica (contrario al reloj) durante el verano, la cual introduce agua al Golfo de California sobre su costa

oriental del Golfo de California, mientras que en invierno esta el giro es anticiclónico (en el sentido del reloj) el cual saca agua, sobre la costa de la península de Baja California (Lavin & Marinone 2003, Marinone 2003, Marinone et al. 2008, Marinone et al. 2011, Marinone 2012)

Sobre este escenario oceanográfico y la historia de vida de cada una de las especies en el noroeste de México, se espera que las poblaciones puedan mantener una conectividad entre ellas. En este sentido, el conocimiento de la historia de vida en conjunto con las capacidades de dispersión son esenciales para el manejo de las especies, tales como el diseño efectivo de reservas marinas y pesquerías sustentables (Pineda 2000, Cowen 2002, Becker et al. 2007). Estudios multidisciplinarios recientes en el Golfo de California correlacionan herramientas genéticas y modelación oceanográfica (como una aproximación para la dispersión y la conectividad), que han ubicado estructura poblacional significativa, dirección de las migraciones, así como poblaciones fuentes y sumidero. Esta información está ayudando a reestructurar planes de manejo y conservación adecuados, para especies de importancia comercial, o bajo una protección especial (Marinone et al. 2008, Cudney-Bueno et al. 2009, Munguía-Vega et al. 2010, Moreno-Báez et al. 2012, Soria et al. 2012, Munguía-Vega et al. 2014, Jackson et al. 2015, Munguía-Vega et al. 2015a)

El recurso pulpo, *Octopus* sp., como es identificado por las agencias encargadas de evaluar su aprovechamiento, tiene capturas básicamente en todos los estados del Pacífico mexicano. Los que tienen más desembarcos son los estados alrededor del Golfo de California (CONAPESCA 2014); específicamente en la zona de las Grandes Islas y al norte de estas donde la pesca ocurre todo el año, con traslape de zonas de captura y donde interactúan en promedio de 3 a 5 comunidades de pescadores (Moreno-Báez et al. 2012).

El presente estudio tiene como objetivo conocer la diversidad y conectividad genética entre las poblaciones de cada una de las especies de pulpo que componen la pesquería en el noroeste de México, calculando variabilidad genética, estructura

genética o diferenciación genética, tasas de migración recientes, parentesco, y cuellos de botella recientes, utilizando marcadores polimórficos microsatélites.

Material y métodos

Obtención de muestras y de ADN Genómico

Se extrajo el ADN genómico de 299 muestras de tejido muscular proveniente de 18 localidades y tres especies de pulpo: *Octopus bimaculatus* (n = 152, 9 localidades) *Octopus bimaculoides* (n = 32, 3 localidades) y *Octopus hubbsorum* (n = 115, 6 localidades). El ADN fue extraído con ayuda de un kit DNeasy blood and tissue (QIAGEN, Valencia, CA, USA), de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Todas las muestras (incluye las 3 especies), fueron probadas con 15 loci microsatélites diseñados para la especie *O. bimaculatus* como resultado del trabajo correspondiente al capítulo I de este trabajo (Domínguez-Contreras et al. 2014), siguiendo las mismas especificaciones. Adicionalmente, se diseñó un método POOLPLEX con ayuda del programa MULTIPLEX Manager 1.0 (Holleley & Geerts 2009). El método poolplex a diferencia de multiplex convencional, no mezcla cebadores antes de correr el PCR, sino utiliza los productos de PCR y los mezcla de acuerdo al tamaño de fragmentos y el marcador etiquetado con fluorescencia (NED, PET, VIC y 6 FAM) mas la secuencia universal M13 (Schuelke 2000) (Fig. 11). Este método POOLPLEX ahorra tiempo de laboratorio y reduce costos significativamente.

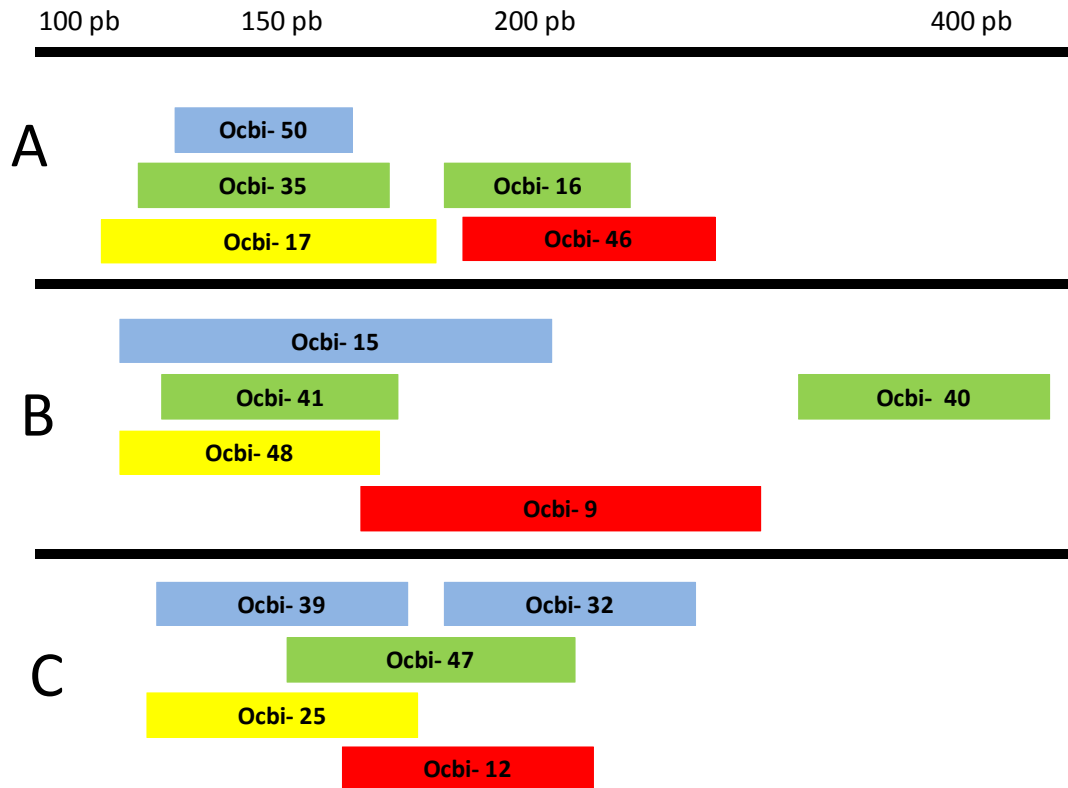


Figura 11. Arreglo POOLPLEX diseñado en Multiplex para 15 loci microsatélites cargados con el primer universal M-13 y etiquetas fluorescentes.

Posteriormente las muestras se llevaron para un análisis de fragmentos en el secuenciador Applied Biosystem 3730XL DNA Analyzer de la University of Arizona Genetics Core (UAGC). Una vez que todas las muestras fueron secuenciadas se procedió a realizar el siguiente conjunto de análisis para las tres especies de pulpo por separado.

Agrupamiento de alelos por locus-población

Se obtuvo el genotipo de todas las muestras con ayuda del programa GeneMarker V.2.6.0. (SoftGenetics). Después de evaluar los genotipos, *O. hubbsorum* fue la única especie que mostró más errores, por lo que se usaron únicamente 7 loci microsatélites para los análisis posteriores.

Debido a que el método genotípico asume colinealidad entre la longitud de los alelos identificados, es necesario que estos sean agrupados adecuadamente para evitar errores en los siguientes análisis. Por lo tanto, el agrupamiento se realizó utilizando la frecuencia de los alelos por cada individuo de cada población y cada locus, utilizando intervalos de confianza basados en el error estándar de una distribución de frecuencias para todas las muestra por locus; el análisis se realizó en un programa macro para Excel, FLEXIBIN (Amos et al. 2007).

Análisis microsatélites

La diversidad alélica (número de alelos, número de alelos efectivos, número de alelos privados), la heterocigosidad observada y esperada, así como las desviaciones de Equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) se calcularon con el programa para Excel GenAlex (Peakall & Smouse 2012). HWE fue corroborado utilizando Cadenas de Markov con 10,000 dememorizaciones (proceso independiente de un proceso anterior), un muestreo de 100 conjuntos (Batch) y 10,000 iteraciones (repeticiones) por batch con ayuda del programa en línea GENEPOP (Raymond & Rousset 1995).

Adicionalmente, se realizó un análisis de rarefacción por tamaños de muestra utilizando el programa HP-RARE (Kalinowski 2005), con la finalidad de estandarizar la diversidad alélica (riqueza alélica-número de alelos efectivos y riqueza de alelos privados-número de alelos privados) ya que GenAlex no considera el tamaño de muestra cuando estima la diversidad (excepto para los alelos efectivos).

Se estimó la frecuencia de alelos nulos por locus utilizando todas las poblaciones de cada especie con ayuda del programa MICRO-CHECKER (Van Oosterhout et al. 2004) para identificar loci que presentaran alelos nulos. Para evaluar si la frecuencia de los alelos nulos por locus por población era considerable se calculó la frecuencia de alelos nulos por locus/población utilizando el método de Máxima Expectativa implementado en programa FREENA (Chapuis & Estoup 2007).

Diferenciación genética de poblaciones

Se evaluó la diferenciación genética poblacional pareada por medio de valores de F_{st} y el estimador D (D_{est} o Jost' D) (Jost 2008) con ayuda del programa GENODIVE 2.0b24 (Meirmans & Van Tienderen 2004). Jost (2008) menciona que cuando se utilizan marcadores que presentan un elevado polimorfismo, como los microsatélites, el número de alelos tiende a incrementarse, reflejando un incremento también en la heterocigosidad esperada y por lo tanto, los valores de F_{st} tienden a acercarse a cero (es decir a la no diferenciación o bien subestimar la estructura de las poblaciones). Por otra parte Jost' D utiliza la frecuencia alélica, específicamente el número de alelos efectivos de la población, y es una representación de la estructura actual de las poblaciones por que lleva más tiempo alcanzar un equilibrio (Jost 2009). Los valores de significancia (0.05) para F_{st} fueron corregidos utilizando la corrección de Bonferroni para pruebas múltiples (Rice 1989).

Efecto de los alelos nulos sobre la diferenciación poblacional

Adicionalmente se evaluó el efecto de la frecuencia de alelos nulos sobre los valores de diferenciación poblacional F_{st} a nivel global y pareado. En este sentido, se ha considerado que la presencia de alelos nulos en análisis de diferenciación pueden sobrestimar los valores de F_{st} (Chapuis & Estoup 2007). La evaluación se realizó calculando los valores de F_{st} globales y pareados, con y sin presencia de alelos nulos, con ayuda del programa FREENA utilizando el método de Máxima Expectativa implementado en el mismo programa (Chapuis & Estoup 2007).

La diferencia genética observada dentro y entre las poblaciones, se calculó con un análisis molecular de varianza (AMOVA) implementado en GenAlex (Peakall & Smouse 2012)

Análisis de agrupación bayesiana (STRUCTURE)

Se realizó un análisis bayesiano en STRUCTURE versión 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) para agrupar o formar clúster de las muestras con base en el genotipo de los microsatélites (de cada muestra). En el programa se corrieron dos modelos

("libre" y "semi-conservativo"). Ambos modelos usaron el parámetro no-aditivo o non-admixture (es decir que los individuos son discretamente de una población o de otra), este parámetro de ancestría es apropiado para analizar poblaciones discretas y es más poderoso que el Aditivo o Admixture para detectar subestructura (la probabilidad posterior de que un individuo i provenga de una población j). Los modelos fueron efectuados con una frecuencia de alélica correlacionada entre poblaciones (es decir que la frecuencia entre las poblaciones probablemente sea similar) (Falush et al. 2003). El modelo "libre" corrió con las condiciones por defecto del programa (No-aditivo y frecuencia alélica correlacionada), mientras que al modelo "semi-conservativo" únicamente se le agregó el parámetro LOCPRIOR (asiste al modelo con información previa de las localidades que serán agrupadas y es utilizado cuando la señal de estructura es relativamente débil) (Pritchard et al. 2000, Falush et al. 2003). Los parámetros de muestreo bayesiano para los dos modelos fueron los siguientes: la longitud de datos descartados fue de 1.000,000, con un número de repeticiones de Cadenas de Markov-Monte Carlo (MCMC) después de los datos descartados fue de 2,000,000 y 10 iteraciones por K (K = poblaciones) y una K asumida de acuerdo con las especies, *O. bimaculatus* 9 poblaciones, *O. bimaculoides* 3 poblaciones y *O. hubbsorum* 6 poblaciones.

Tasas recientes de migración dirigida (BAYESASS)

Se estimaron tasas de migración reciente entre las poblaciones utilizando MCMC en un estimador bayesiano implementado en el programa BAYESASS 3.0.3. (Wilson & Rannala 2003). Los parámetros fueron un burn-in (son los primeros datos desechados con la finalidad de que las cadenas comiencen a estabilizarse o bien a convergir) de 10,000,000 pasos, de un total de 100,000,000 iteraciones y una frecuencia de muestreo cada 10,000 iteraciones. El modelo de mezcla para las MCMC utilizó parámetros continuos como frecuencia alélica, coeficiente de endogamia y tasas de migración ($-a$, $-f$ y $-m$), el valor de cada parámetro fue particular para cada especie, hasta que las cadenas mezclaran bien la cual ocurre

cuando la tasa de aceptación para cada uno de los parámetros este entre 20% y 60% (Wilson & Rannala 2003).

Análisis de parentesco promedio por población (RELATEDNESS)

Se estimó el parentesco promedio (RELATEDNESS) para cada una de las poblaciones a partir de matrices pareadas de cada muestra, utilizando la frecuencia alélica de acuerdo al estimador promedio (r) descrito por Queller & Goodnight (1989) e implementado en GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse 2012). El cálculo se realizó con 9999 permutaciones para evaluar la significancia y con 10,000 bootstraps para establecer intervalos de confianza al 95% alrededor de los valores del estimador (r).

Cuellos de botella recientes (BOTTLENECK)

Se estimaron cuellos de botella recientes (entre 2 y 4 generaciones atrás) para cada población por cada locus, calculando la heterocigosidad esperada obtenida del número de alelos observados, para un tamaño de muestra determinado. La distribución de heterocigosidad es obtenida a través de un proceso de simulación de coalescencia de n genes bajo cada posible modelo de mutación alelos infinitos (IAM) y gradual (SMM) para evaluar si existe un exceso o déficit de heterocigosidad en cada locus. La distribución fue evaluada (para IAM y SMM) utilizando tres pruebas estadísticas, Prueba de Significancia, Desviación Estandarizada de Heterocigosidad y Prueba de Rangos de Wilcoxon. También se realizó un análisis con el modelo de mutación de dos pasos (TPM) el cual utiliza ambos modelos de mutación (SMM en mayor proporción que IAM), ya que los microsatélites pueden seguir ambos modelos. Sin embargo, la mayoría siguen el modelo SMM, por lo que se agregó una probabilidad de 95% para este modelo y un 5% para IAM (Di Rienzo et al. 1994). Se utilizaron las mismas pruebas de significancia bajo 10,000 réplicas y el cálculo completo se realizó en el programa BOTTLENECK (Piry et al. 1999).

Resultados

Octopus bimaculatus

Análisis de Microsatélites

Se genotipificaron 152 muestras de *Octopus bimaculatus* utilizando 15 loci microsatélites de los cuales, se obtuvo una proporción de datos faltantes del 3% para muestras y para loci; es decir, dos muestras no mostraron genotipos y menos de un locus no funcionó adecuadamente.

La prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg, después de la corrección de Bonferroni, sugiere una desviación significativa ($P < 0.00037$) en 1 de 135 combinaciones únicas Loci/población; la combinación significativamente diferente fue el locus 15 de la población de Puerto Refugio ($P = 0.00008$). Los loci Ocbi-50 y Ocbi-46 resultaron ser monomórficos para dos poblaciones San Luis Gonzaga y Puerto Lobos, respectivamente. El número promedio de alelos nulos fue relativamente bajo 0.022 (Rango 0 - 0.255), siendo el locus Ocbi39 el que presentó el valor más elevado de la población de Bahía de los Ángeles (Apéndice D).

Diversidad genética

En general, todos los loci fueron polimórficos (6 - 12 alelos). El número de alelos promedio fue de 9.63 ± 0.306 , siendo Malarrimo, Puerto Peñasco, Isla Smith y Puerto Refugio las localidades con mayor número de alelos (> 10). Mientras que los valores más bajos los presentaron La Bocana y Las Barrancas con 6 y 6.4 alelos, respectivamente (Tabla I).

El número de alelos esperado o efectivo fue en promedio de 6.75 ± 0.209 . El número de alelos efectivos tuvo el mismo comportamiento que el número de alelos, siendo Malarrimo, Puerto Peñasco, Isla Smith y Puerto Refugio las localidades con mayor número de alelos (> 7). Mientras que los valores más bajos los presentaron La Bocana y Las Barrancas con 4.93 y 5.42 alelos (Tabla VIII).

El número promedio de alelos privados (los que no se comparten con otras poblaciones) fue de 0.25 ± 0.085 . La localidad con mayor número de alelos privados

fue Isla Smith (0.73), seguida de Malarrimo (0.53), Las Barrancas y Puerto Peñasco (0.33). Puerto Lobos y La Bocana no presentaron alelos privados (Tabla I). Sin embargo, tanto el número de alelos efectivos como el número de alelos privados son sensibles al tamaño de muestra, por lo que es necesario realizar un análisis de rarefacción por tamaño de muestra.

Tabla VIII. Diversidad genética de *Octopus bimaculatus* en la costa oeste de la península y Golfo de California, utilizando 15 loci microsatélites e Incluyendo el tamaño de muestra (N), número de alelos (Na), número de alelos efectivos (Ne), alelos privados (AP), heterocigosidad Observada (Ho) y esperada (He). (Media $\pm$ Error Estandar)

Población	N	Na	Ne	AP	Ho	He
Malarrimo	32	12.67 $\pm$ 1.094	7.76 $\pm$ 0.762	0.53 $\pm$ 0.192	0.82 $\pm$ 0.041	0.83 $\pm$ 0.038
La Bocana	5	6.00 $\pm$ 0.338	4.93 $\pm$ 0.346	0.00 $\pm$ 0.000	0.93 $\pm$ 0.037	0.78 $\pm$ 0.017
Las Barrancas	5	6.40 $\pm$ 0.388	5.42 $\pm$ 0.415	0.33 $\pm$ 0.187	0.76 $\pm$ 0.060	0.78 $\pm$ 0.034
Puerto Peñasco	32	12.87 $\pm$ 0.729	8.47 $\pm$ 0.766	0.33 $\pm$ 0.159	0.87 $\pm$ 0.032	0.85 $\pm$ 0.032
San Luis Gonzaga	8	7.47 $\pm$ 0.608	5.80 $\pm$ 0.531	0.07 $\pm$ 0.067	0.83 $\pm$ 0.073	0.77 $\pm$ 0.056
Isla Smith	25	12.80 $\pm$ 0.922	8.39 $\pm$ 0.721	0.73 $\pm$ 0.206	0.88 $\pm$ 0.029	0.85 $\pm$ 0.030
Bahía de los Ángeles	14	9.80 $\pm$ 0.545	7.02 $\pm$ 0.564	0.07 $\pm$ 0.067	0.77 $\pm$ 0.054	0.83 $\pm$ 0.033
Puerto Refugio	17	10.60 $\pm$ 0.755	7.13 $\pm$ 0.566	0.20 $\pm$ 0.107	0.75 $\pm$ 0.058	0.82 $\pm$ 0.040
Puerto Lobos	14	8.07 $\pm$ 0.796	5.83 $\pm$ 0.601	0.00 $\pm$ 0.000	0.76 $\pm$ 0.070	0.77 $\pm$ 0.058
Total	152	9.63 $\pm$ 0.306	6.75 $\pm$ 0.209	0.25 $\pm$ 0.085	0.82 $\pm$ 0.018	0.81 $\pm$ 0.013

El análisis de rarefacción por tamaño de muestra en HP-RARE, mostró que para corregir la diversidad genética el tamaño mínimo de genes fue de 8. La riqueza alélica promedio de *O. bimaculatus* en 9 poblaciones fue de 5.39 ± 0.049 (Tabla IX), el cual fue menor al observado en la Tabla I ($N_e = 6.75$). La mayor diversidad de alelos se observó en Las Barrancas (5.69) e Isla Smith (5.6), lo cual difirió del orden observado en la Tabla VIII. Por otra parte, la riqueza de alelos privados (RAP) tiene en promedio 0.32 ± 0.037 ; siendo Isla Smith la que mostró el mayor número (0.53), seguido de Las Barrancas (0.45) y de Malarrimo (0.37) (Tabla II) y a diferencia de la Tabla VIII se observaron valores en las poblaciones de La Bocana (0.37) y Puerto Lobos (0.31). Bahía de Los Ángeles y Puerto Refugio tuvieron el menor número de alelos privados (0.23) (Tabla IX).

Tabla IX. Riqueza alélica (RA) y riqueza de alelos privados (RAP) después de la corrección de rarefacción por tamaño de muestra en poblaciones de *Octopus bimaculatus*, considerando un mínimo de 8 genes para todas las poblaciones. (Media $\pm$ Error Estándar)

Población	Riqueza Alélica	Riqueza Alelos Privados
Malarrimo	5.33 $\pm$ 0.265	0.37 $\pm$ 0.109
La Bocana	5.35 $\pm$ 0.253	0.25 $\pm$ 0.101
Las Barrancas	5.69 $\pm$ 0.297	0.45 $\pm$ 0.159
Puerto Peñasco	5.52 $\pm$ 0.250	0.32 $\pm$ 0.060
San Luis Gonzaga	5.21 $\pm$ 0.345	0.24 $\pm$ 0.130
Isla Smith	5.60 $\pm$ 0.229	0.53 $\pm$ 0.128
Bahía de los Ángeles	5.43 $\pm$ 0.233	0.23 $\pm$ 0.058
Puerto Refugio	5.35 $\pm$ 0.273	0.23 $\pm$ 0.063
Puerto Lobos	5.06 $\pm$ 0.393	0.31 $\pm$ 0.078
Total	5.39 $\pm$ 0.049	0.32 $\pm$ 0.037

La heterocigosidad promedio observada fue 0.82 ± 0.018 (rango 0.75 - 0.93), mientras que la esperada fue muy similar 0.81 ± 0.013 (rango 0.77 - 0.85). Solamente en 3 poblaciones la heterocigosidad observada fue ligeramente mayor a la esperada (Puerto Peñasco, San Luis Gonzaga e Isla Smith), La Bocana mostró una mayor heterocigosidad observada a la esperada ($H_o = 0.93$ vs $H_e = 0.78$). Las demás poblaciones tuvieron heterocigosidades observadas ligeramente debajo de las esperadas (Tabla VIII).

Diferencia genética entre poblaciones

Efecto de los alelos nulos en la diferenciación genética

Los valores globales de F_{st} utilizando y no utilizando el logaritmo de ENA fueron muy similares ($F_{st} = 0.046$ vs $F_{st} = 0.046$, respectivamente) lo que significa que los alelos nulos no tuvieron efecto significativo; por lo tanto, no sobreestima los valores de diferenciación poblacional (se pueden utilizar todos los loci), de igual manera se observó en valores pareados de F_{st} por población (Tabla X).

Tabla X. Diferenciación genética de poblaciones de *Octopus bimaculatus* en la costa oeste de la península (área gris) y el Golfo de California (área azul). Los valores de F_{st} por debajo de la diagonal no

consideran los alelos nulos (logaritmo de ENA), los valores arriba de la diagonal consideran los alelos nulos.

	Malarrimo	La Bocana	Las Barrancas	Puerto Peñasco	San Luis Gonzaga	Isla Smith	Bahía de Los Ángeles	Puerto Refugio	Puerto Lobos
Malarrimo		0.042	0.021	0.027	0.038	0.057	0.063	0.063	0.021
La Bocana	0.040		0.017	0.045	0.037	0.056	0.058	0.029	0.021
Las Barrancas	0.023	0.015		0.025	0.021	0.057	0.054	0.062	0.017
Puerto Peñasco	0.026	0.044	0.027		0.032	0.056	0.049	0.056	0.025
San Luis Gonzaga	0.038	0.036	0.021	0.034		0.072	0.076	0.076	0.034
Isla Smith	0.056	0.056	0.059	0.055	0.073		0.020	0.062	0.043
Bahía de Los Ángeles	0.063	0.053	0.052	0.049	0.072	0.020		0.058	0.052
Puerto Refugio	0.067	0.024	0.062	0.060	0.076	0.067	0.061		0.053
Puerto Lobos	0.018	0.019	0.014	0.022	0.029	0.045	0.051	0.057	

Diferenciación de poblaciones de Octopus bimaculatus

Los valores pareados de F_{st} se mantuvieron entre 0.014 y 0.076, mientras que las estimaciones de Jost' D variaron de 0.096 a 0.457 (Tabla XI). Todas las poblaciones fueron diferentes incluso después de la corrección de Bonferroni ($P = 0.0014$), excepto por Las Barrancas y La Bocana entre ellas y con algunas poblaciones del Golfo de California.

Las Barrancas no fue diferente de Malarrimo ($F_{st} = 0.023$, $P = 0.008$; Jost' D = 0.127), La Bocana ($F_{st} = 0.015$, $P = 0.153$; Jost' D = 0.111), San Luis Gonzaga ($F_{st} = 0.020$, $P = 0.052$; Jost' D = 0.108) y Puerto Lobos ($F_{st} = 0.014$, $P = 0.153$; Jost' D = 0.096); y la población de La Bocana no fue diferente de San Luis Gonzaga ($F_{st} = 0.036$, $P = 0.004$; Jost' D = 0.205), Puerto Refugio ($F_{st} = 0.025$, $P = 0.005$; Jost' D = 0.181) y Puerto Lobos ($F_{st} = 0.018$, $P = 0.097$; Jost' D = 0.137) (Tabla XI).

La población de Malarrimo fue diferente de la población de La Bocana en la costa occidental de la península, ($F_{st} = 0.041$, Jost' D = 0.265) y tuvo una elevada estructura con todas las poblaciones en el Golfo de California, siendo mayor con Isla Smith ($F_{st} = 0.059$, Jost' D = 0.382), Bahía de Los Ángeles ($F_{st} = 0.064$, Jost' D = 0.395) y Puerto Refugio ($F_{st} = 0.070$, Jost' D = 0.416) (Tabla XI).

En el Golfo de California se observó una elevada diferenciación genética con un promedio $F_{st} = 0.046$ (rango 0.013 - 0.076) y Jost' D = 0.331 (rango 0.130 -

0.457). Esto sugiere una estructura poblacional en el norte del Golfo de California (Tabla XI).

La población de San Luis Gonzaga mostró mayor diferencia genética con Isla Smith ($F_{st} = 0.073$, Jost' $D = 0.448$), Bahía de Los Ángeles ($F_{st} = 0.071$, Jost' $D = 0.422$) y Puerto Refugio ($F_{st} = 0.077$, Jost' $D = 0.438$) y una menor diferencia con Puerto Peñasco ($F_{st} = 0.034$, Jost' $D = 0.192$). Las combinaciones de Puerto Peñasco, Puerto Refugio, Isla Smith y Bahía de Los Ángeles también presentaron altos niveles de diferenciación poblacional (Tabla XI).

La población de Puerto Lobos presentó un nivel de diferenciación poblacional más bajo dentro del Golfo de California pero significativo; sin embargo, su nivel de estructuración fue aún más bajo con las poblaciones de costa oeste de la península (Tabla XI).

Tabla XI. Diferenciación genética entre poblaciones de *Octopus bimaculatus* en la costa oeste de la península (área gris) y Golfo de California (área azul). Valores de F_{st} arriba de la diagonal y valores de Jost' D debajo de la diagonal. Los valores en negritas representan no diferencia significativa después de la corrección de Bonferroni ($P = 0.0014$)

	Malarrimo	La Bocana	Las Barrancas	Puerto Peñasco	San Luis Gonzaga	Isla Smith	Bahía de los Ángeles	Puerto Refugio	Puerto Lobos
Malarrimo		0.041	0.023	0.026	0.038	0.059	0.064	0.070	0.021
La Bocana	0.265		0.015	0.045	0.036	0.057	0.053	0.025	0.018
Las Barrancas	0.127	0.111		0.028	0.020	0.058	0.050	0.062	0.014
Puerto Peñasco	0.160	0.313	0.165		0.034	0.056	0.049	0.062	0.026
San Luis Gonzaga	0.206	0.205	0.108	0.192		0.073	0.071	0.077	0.032
Isla Smith	0.382	0.419	0.416	0.385	0.448		0.020	0.069	0.046
Bahía de los Ángeles	0.395	0.384	0.358	0.320	0.422	0.130		0.062	0.050
Puerto Refugio	0.416	0.181	0.422	0.389	0.438	0.458	0.391		0.055
Puerto Lobos	0.125	0.137	0.096	0.173	0.181	0.326	0.347	0.368	

El Análisis Varianza de Molecular (AMOVA) indicó un 6% de variación en la frecuencia de alelos entre poblaciones ($P= 0.001$). El 94% correspondió la variación entre individuos ($P=0.001$) (Tabla XII).

Tabla XII. Análisis molecular de varianza para poblaciones de *Octopus bimaculatus* en la costa oeste de la península y el Golfo de California.

Fuente Variación	Varianza (%)	Estadístico F	Valor F	g.l	Suma cuadrados	Cuadrado Medio	Varianza Estimada	P
Entre poblaciones	6	Fst	0.062	8	162.153	20.269	0.419	0.001
Entre individuos	5	Fis	0.052	143	962.330	6.730	0.335	0.001
Dentro individuos	89	Fit	0.111	152	921.000	6.059	6.059	0.001
Total	100			303	2045.484		6.814	

Análisis bayesiano de estructura poblacional (STRUCTURE).

El análisis del modelo libre (parámetros por defecto del programa) indicó que el mejor agrupamiento o Best K identificó dos poblaciones principalmente; sin embargo, también mostró un segundo agrupamiento de menor intensidad en $K = 5$ (Fig. 12 A). Este último resultó ser el mejor ajuste de K (Best K) cuando se utilizó el modelo semi-conservativo que integraba las localidades de muestreo (LocPrior) (Fig. 12 B).

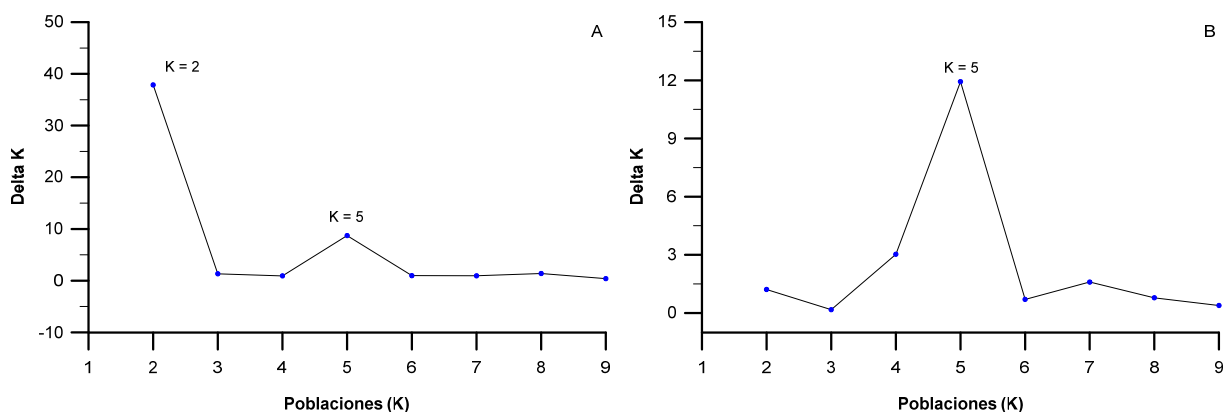


Figura 12. Asignación de grupos (clúster) obtenidos de STRUCTURE e identificados por medio de CLUMPAK para determinar el delta K, Best K o mejor población. A) utilizando el modelo libre y B) utilizando el un modelo semi-conservativo (LocPrior).

Cuando $K = 2$ en el modelo libre, se indica que existen dos poblaciones y que de acuerdo a la Figura 2 A, estas se encuentran mezcladas tanto en la costa occidental de la península como en el Golfo de California. Sin embargo, es mayor en el Golfo de California, principalmente en Isla Smith donde los organismos presentaron más de un 90% de afinidad a una población, mientras que en Puerto Refugio tuvo mayor ($> 80\%$) afinidad a una población distinta.

Cuando se utilizó el modelo semi-conservativo, el cual integra a las localidades de muestreo en el análisis de clúster, el método de Evanno et al. (2005) identificó un delta K de 5 poblaciones como el mejor agrupamiento (Figs. 12 y 13 B). El análisis mostró una fuerte estructura logrando separar las poblaciones de Malarrimo, Puerto Peñasco, San Luis Gonzaga e Isla Smith, así como la población de Puerto Refugio en un 70%. Las poblaciones de La Bocana y Las Barrancas están constituidas en su mayoría por genotipos con mayor frecuencia del Golfo de California. Bahía de Los Ángeles tiene una estructura compuesta por genotipos presentes en Puerto Peñasco e Isla Smith. Por otra parte Puerto Lobos tuvo una estructura compuesta en su mayoría por genotipos presentes en el Golfo de California y en menor grado de la costa occidental de la península, principalmente Malarrimo (Fig. 13 B).

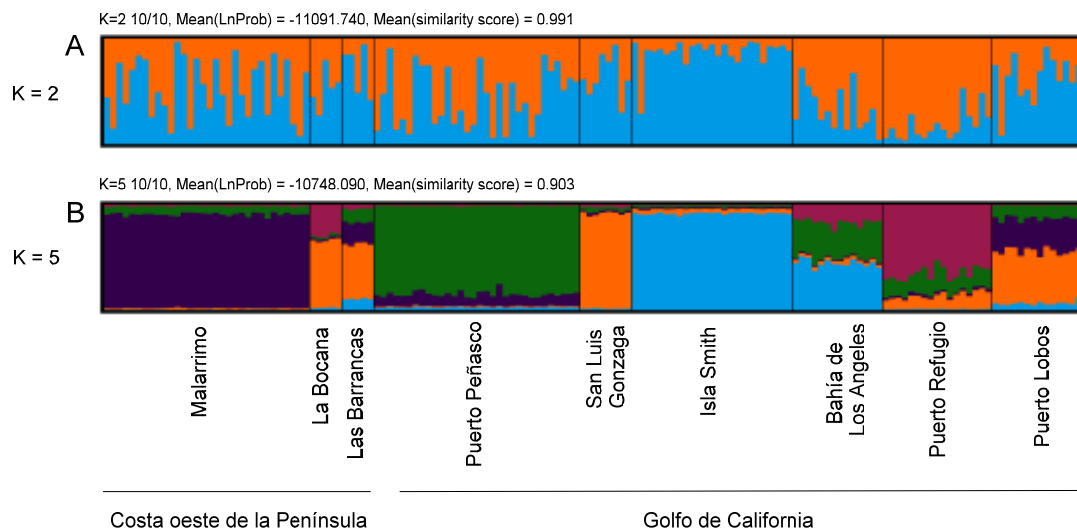


Figura 13. Análisis de estructura poblacional para *Octopus bimaculatus* en el noroeste de México. A) Indica dos poblaciones ($K=2$) obtenida del modelo libre, y B) indica 5 poblaciones ($K = 5$) obtenida del modelo semi-conservativo.

Tasas de migración direccional por generación (BAYESASS)

La tasa de migración siempre fue mayor dentro de cada población (68% - 87%). De manera general, se puede observar una red de conectividad entre todas las poblaciones, las cuales que comparten una tasa de migración de entre 1% y 4% por generación (Tabla XIII).

De entre las poblaciones que se distribuyen en la costa occidental de la península, Malarrimo tiene una tasa de migración del 7% para Las Barrancas, y un 6% y 10% hacia las poblaciones de Puerto Peñasco y Puerto Lobos en el Golfo de California. De manera inversa, la tasa máxima de migración de Puerto Refugio fue del 10% hacia San Luis Gonzaga y hacia La Bocana en la costa occidental de la península (Tabla XIII, Fig. 14).

De las nueve poblaciones, Puerto Peñasco fue la que menor inmigración recibió, pero fue la que mas exportó hacia todas las poblaciones. Dentro del Golfo de California suministró larvas en un 23% y 21% hacia Isla Smith y Bahía de los Ángeles respectivamente, y un 12% para Puerto Lobos. Así mismo, tuvo emigrantes hacia la costa occidental de la península en un 11% para Malarrimo, 7% para La Bocana y 8% para Las Barrancas (Tabla XIII, Fig. 14).

Tabla XIII. Tasas de migración direccional ($\pm$ error estándar) entre poblaciones de *Octopus bimaculatus* en el noroeste de México obtenidas de BAYESASS.

De:	Costa oeste de la península			Hacia:					
	Malarrimo	La Bocana	Las Barrancas	Puerto Peñasco	San Luis Gonzaga	Isla Smith	Bahía de Los Ángeles	Puerto Refugio	Puerto Lobos
Malarrimo	0.83 (0.086)	0.02 (0.022)	0.07 (0.046)	0.06 (0.061)	0.03 (0.026)	0.02 (0.024)	0.02 (0.015)	0.01 (0.014)	0.10 (0.065)
La Bocana	0.01 (0.008)	0.69 (0.023)	0.02 (0.022)	0.01 (0.008)	0.02 (0.018)	0.01 (0.010)	0.01 (0.014)	0.01 (0.012)	0.01 (0.014)
Las Barrancas	0.01 (0.008)	0.02 (0.022)	0.69 (0.023)	0.01 (0.008)	0.02 (0.019)	0.01 (0.010)	0.01 (0.014)	0.01 (0.012)	0.01 (0.014)
Puerto Peñasco	0.11 (0.090)	0.07 (0.063)	0.08 (0.055)	0.87 (0.065)	0.09 (0.074)	0.23 (0.036)	0.21 (0.036)	0.09 (0.102)	0.12 (0.072)
San Luis Gonzaga	0.01 (0.008)	0.02 (0.022)	0.02 (0.022)	0.01 (0.008)	0.69 (0.020)	0.01 (0.010)	0.01 (0.014)	0.01 (0.013)	0.01 (0.014)
Isla Smith	0.01 (0.009)	0.02 (0.023)	0.02 (0.022)	0.01 (0.010)	0.02 (0.019)	0.69 (0.021)	0.02 (0.015)	0.01 (0.012)	0.01 (0.014)
Bahía de los Ángeles	0.01 (0.008)	0.02 (0.022)	0.02 (0.022)	0.01 (0.008)	0.02 (0.018)	0.01 (0.010)	0.68 (0.015)	0.01 (0.012)	0.01 (0.014)
Puerto Refugio	0.01 (0.013)	0.10 (0.065)	0.04 (0.033)	0.02 (0.023)	0.10 (0.069)	0.01 (0.013)	0.02 (0.019)	0.82 (0.102)	0.03 (0.025)
Puerto Lobos	0.01 (0.008)	0.02 (0.022)	0.02 (0.022)	0.01 (0.008)	0.02 (0.019)	0.01 (0.010)	0.01 (0.014)	0.01 (0.012)	0.68 (0.014)

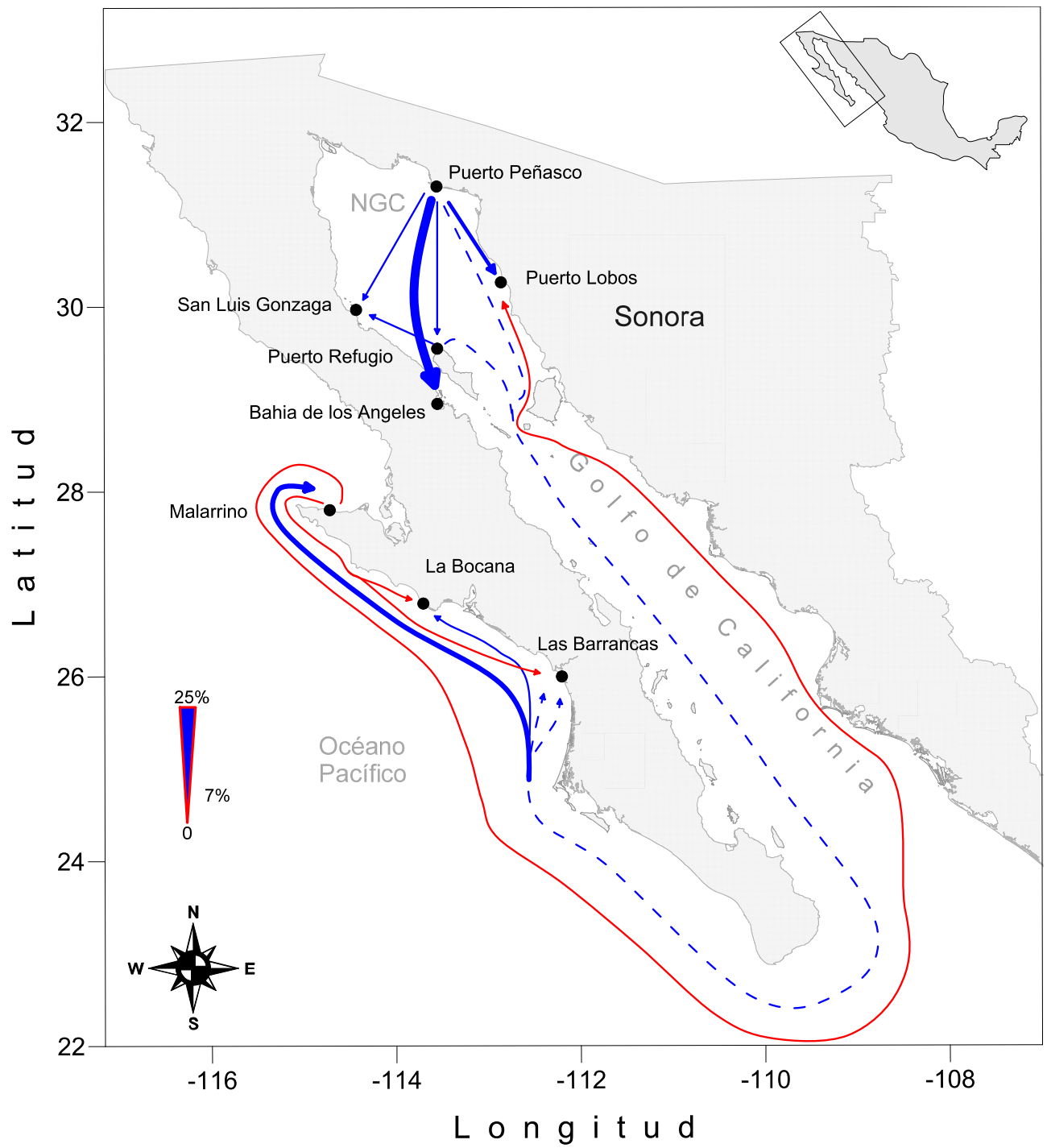


Figura 14. Mapa de conectividad genética de *O. bimaculatus* calculado a partir de los datos de tasas de migración reciente BAYESASS.

Parentesco (RELATEDNESS)

El análisis indica claramente que 8 de 9 poblaciones presentan niveles de parentesco significativamente más grande de lo esperado. Únicamente la población de Las Barrancas se mantuvo dentro de los límites de confianza y presentó el menor parentesco (Fig. 15).

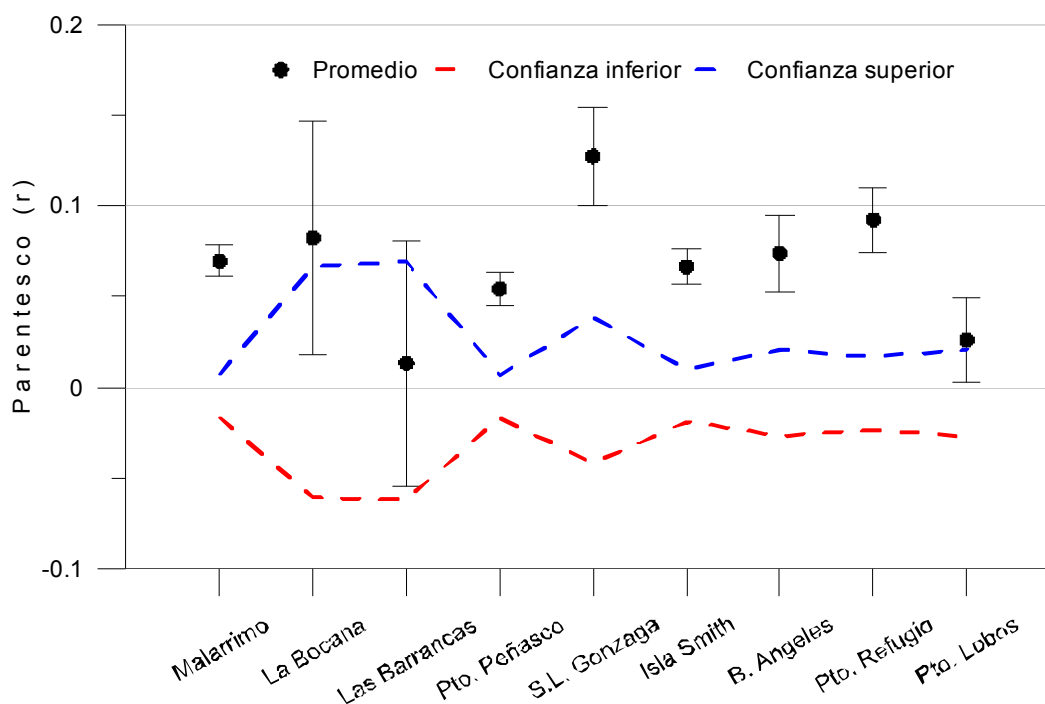


Figura 15. Valores promedio de parentesco (r) pareado dentro de cada población. Las barras de error son los intervalos de confianza al 95%, determinados por re-muestreo de 1000 bootstraps. Los Límites de confianza azul y rojo son intervalos de confianza de 95% sobre la hipótesis nula de no diferencia o bien no parentesco en las poblaciones, este intervalo se determinó con 9999 permutaciones.

Cuellos de botella recientes (BOTTLENECK)

El análisis de exceso de heterocigosidad para determinar cuellos de botella recientes (2 a 4 generaciones) indicó que La Bocana/Las Barrancas (se unieron porque el programa no corría un número de muestra bajo), San Luis Gonzaga y Bahía de Los Ángeles presentaron exceso de heterocigosidad (Tabla XIV).

Tabla XIV. Análisis de cuello de botella reciente para poblaciones de *Octopus bimaculatus* obtenido de BOTTLENECK. La tabla muestra la población, el tamaño de muestra (N), el número de alelos (Na), la heterocigosidad (He) y las pruebas de Significancia, desviación estandarizada de heterocigosidad y de Rangos de Wilcoxon.* desviación ($P < 0.08$)

Población	N	No. alelos	He	Significancia P < 0.08 TPM	Desv. Est. P < 0.08 TPM	Wilcoxon P < 0.08 TPM
Malarrimo	32	12.67	0.846	0.111	0.164	0.738
LBO/LBR*	10	6.07	0.873	0.237	0.134	0.036*
Puerto Peñasco	32	12.87	0.863	0.363	0.455	0.094
San Luis Gonzaga	8	7.47	0.823	0.277	0.183	0.077*
Isla Smith	25	12.87	0.872	0.575	0.370	0.300
Bahía de Los Ángeles	14	9.8	0.858	0.198	0.457	0.060*
Puerto Refugio	17	10.6	0.847	0.433	0.476	0.402
Puerto Lobos	14	8.07	0.811	0.583	0.437	0.232

Octopus bimaculoides

Análisis de Microsatélites

Se genotipificaron 32 muestras de *O. bimaculoides*, utilizando 15 loci microsatélites, de los cuales se tuvo una proporción de datos faltantes del 2% para muestras y para loci; es decir que 1 muestra no mostró genotipo y que menos de un locus no funcionó adecuadamente.

La prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg, después de la corrección de Bonferroni, sugiere una desviación significativa ($P < 0.00111$) en 2 de 45 combinaciones únicas Loci/población; las combinaciones significativamente diferentes fueron Ocbi15 ($P = 0.000003$) y Ocbi39 ($P = 0.0002$) ambas para la población de Ejido Erendira. Los loci Ocbi17 y Ocbi46 resultaron ser monomórficos para dos poblaciones Ejido Erendira y Bahía Magdalena (Apéndice E). El número promedio de alelos nulos fue relativamente bajo 0.025 ± 0.016 (Rango 0 - 0.282), siendo el locus Ocbi47 el que presentara la mayor proporción de alelos nulos para la población de San Quintín (Apéndice E).

Diversidad Genética

Los loci fueron polimórficos en las tres poblaciones (4 - 6 alelos). El número de alelos promedio fue de 5.31 ± 0.461 . San Quintín fue la población con mayor

diversidad genética con un promedio de 6.47 ± 0.878 número de alelos, 4.48 ± 0.708 alelos efectivos y 2.40 ± 0.779 alelos privados. Mientras que Bahía Magdalena fue la de valores más bajos (Tabla VIII). Este patrón de diversidad alélica se conservó incluso cuando se aplicó el análisis de rarefacción (HP-RARE) de alelos por número de muestras (con 12 genes), donde San Quintín tuvo la mayor riqueza alélica (5.189) y la mayor riqueza alélica privada (2.02) (Tabla XV).

La heterocigosidad promedio observada fue 0.69 ± 0.051 (rango 0.69 - 0.81), mientras que la esperada fue muy similar 0.61 ± 0.040 (rango 0.59 - 0.64). Ejido Erendira y Bahía Magdalena mostraron una mayor heterocigosidad que la esperada ($H_o = 0.69$ vs $H_e = 0.59$, y $H_o = 0.81$ vs $H_e = 0.59$, respectivamente) y San Quintín se mantuvo por debajo (Tabla XV).

Tabla XV. Diversidad genética de *Octopus bimaculoides* en la costa oeste de península, utilizando 15 loci microsatélites e incluyendo el tamaño de muestra (N), número de alelos (Na), número de alelos efectivos (Ne), alelos privados (AP), heterocigosidad Observada (Ho) y esperada (He). Corrección por Rarefacción de muestras con 12 genes, riqueza alélica (RA) y riqueza de alelos privados (RAP) (Media $\pm$ Erro Estándar).

Población	N	Na	Ne	AP	Ho	He	RA	RAP
Ejido Erendira	14	5.60 ± 0.872	3.70 ± 0.558	1.73 ± 0.547	0.69 ± 0.092	0.59 ± 0.075	4.22 ± 0.562	1.45 ± 0.399
San Quintín	10	6.47 ± 0.878	4.48 ± 0.708	2.40 ± 0.779	0.58 ± 0.077	0.64 ± 0.068	5.18 ± 0.616	2.02 ± 0.533
B. Magdalena	8	3.87 ± 0.477	3.15 ± 0.369	0.53 ± 0.291	0.81 ± 0.089	0.59 ± 0.067	3.68 ± 0.425	0.72 ± 0.318
Total	34	5.31 ± 0.461	3.78 ± 0.328	1.56 ± 0.539	0.69 ± 0.051	0.61 ± 0.040	4.36 ± 0.439	1.40 ± 0.376

Diferencia genética entre poblaciones

Diferenciación de poblaciones (*Fst* con y sin alelos nulos, *Jost' D*).

Los valores de *Fst*, estimados con Genodive y FREENA fueron los mismos al considerar alelos nulos. Cuando se aplicó el algoritmo de ENA para la corrección por alelos nulos (evitar alelos nulos), los valores globales no mostraron una diferencia significativa (con alelos nulos *Fst* = 0.181, sin alelos nulos *Fst* = 0.185), de igual manera no existe evidencia del efecto de alelos nulos sobre la los valores de *Fst* pareados (Tabla XVI).

El rango de valores pareados para *Fst* fue de 0.128 a 0.224, mientras que para *Jost' D* fue de 0.238 a 0.524. Todos los valores de *Fst* fueron significativos

(Bonferroni $P = 0.014$). Ambos métodos mostraron una fuerte diferenciación genética entre San Quintín y Ejido Erendira ($F_{st} = 0.224$, Jost $D = 0.524$), así como con Bahía Magdalena ($F_{st} = 0.176$, Jost $D = 0.406$). Bahía Magdalena y Ejido Erendira mostraron la menor diferencia ($F_{st} = 0.128$, Jost $D = 0.238$) (Tabla XVI).

Tabla XVI. Diferenciación genética de poblaciones de *Octopus bimaculoides* en la costa oeste de península. Los valores de F_{st} se muestran arriba de la diagonal. Los valores en negritas no consideran alelos nulos (FREENA). Corrección de Bonferroni ($P = 0.014$). Los valores por debajo de la diagonal pertenecen al estimador Jost' D.

	Ejido Erendira	San Quintín	Bahía Magdalena
Ejido Erendira		0.224 0.228	0.128 0.127
San Quintín	0.524		0.176 0.180
Bahía Magdalena	0.238	0.406	

El análisis de varianza molecular indica que el 83% de la varianza genética es entre los individuos, mientras que el 17% de la varianza la representa el análisis específico entre poblaciones, lo que sugiere una fuerte estructura genética entre poblaciones ($P = 0.000$) (Tabla XVII).

Tabla XVII. Análisis molecular de varianza para poblaciones de *Octopus bimaculoides* en la costa oeste de la península.

Fuente de Variación	Varianza %	Estadístico F	Valor F	g.l	Suma cuadrados	Cuadrado Medio	Varianza Estimada	P
Entre poblaciones	17	F_{st}	0.174	2	51.923	25.962	1.026	0.000
Entre individuos	0	F_{is}	-0.041	29	135.264	4.664	0.000	0.915
Dentro individuos	83	Fit	0.140	32	162.000	5.063	5.063	0.000
Total	100			63	349.188		6.089	

Análisis bayesiano de estructura poblacional (STRUCTURE).

Ambos modelos, el libre y el semi-conservativo, indicaron que el mejor agrupamiento de clúster (delta K) fue $K = 2$ (Tabla XVIII). Ambos modelos, muestran que existen dos poblaciones (San Quintín y Bahía Magdalena) que son más similares entre sí, que con respecto a Ejido Erendira (Fig. 16)

Tabla XVIII. Estimación de delta K (best k) utilizando el método de Evanno et al. (2005), para los modelos libre y semi-conservativo.

Libre	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
K = 1	10	-1670.03	0.3653	NA	NA	NA
K = 2	10	-1748.32	541.6685	-78.29	331.37	0.611758
K = 3	10	-1495.24	19.1498	253.08	NA	NA

Semi-conservativo						
K = 1	10	-1669.62	0.7941	NA	NA	NA
K = 2	10	-1564.98	2.6811	104.64	24.15	9.007405
K = 3	10	-1484.49	3.4751	80.49	NA	NA

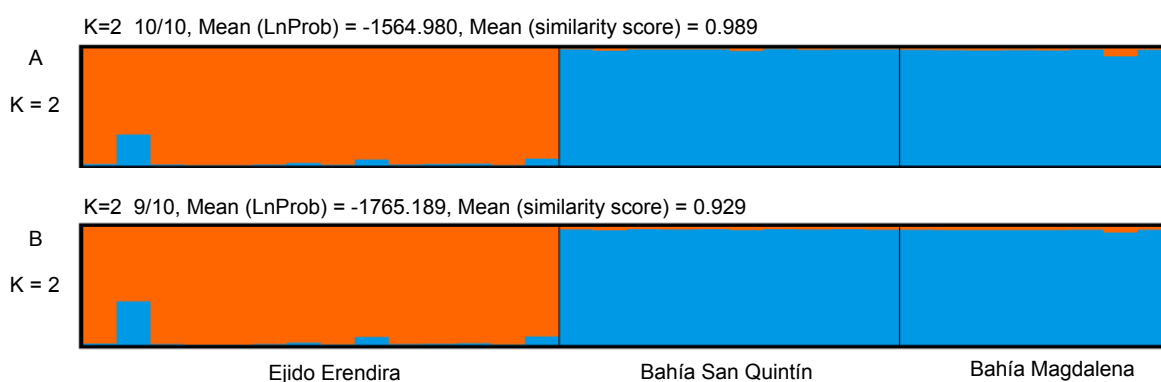


Figura 16. Análisis de estructura poblacional para *Octopus bimaculoides* en la costa oeste de la península. A) Indica dos poblaciones (K=2) obtenida del modelo libre, y B) indica 2 poblaciones (K = 2) obtenida del modelo semi-conservativo.

Tasas de migración direccional por generación (BAYESASS)

Las tasas de migración siempre fueron mayores dentro de cada población (90% - 96%). La tasa de migración general, es decir entre tres localidades se mantuvo entre un 2% y 3%. Sin embargo, se observó una direccionalidad mayor de Bahía Magdalena hacia San Quintín (7%) (Tabla XIX, Fig. 17).

Tabla XIX. Tasas de migración direccional entre poblaciones de *Octopus bimaculoides* (error estándar) obtenidas de BAYESASS. En negritas se muestra la tasa migración intrínseca por población. En gris se muestra valores más elevados entre poblaciones.

De:	Hacia:		
	Ejido Erendira	San Quintín	Bahía Magdalena
Ejido Erendira	0.96 (0.026)	0.03 (0.024)	0.03 (0.029)
San Quintín	0.02 (0.018)	0.90 (0.041)	0.03 (0.028)
Bahía Magdalena	0.02 (0.020)	0.07 (0.038)	0.94 (0.038)

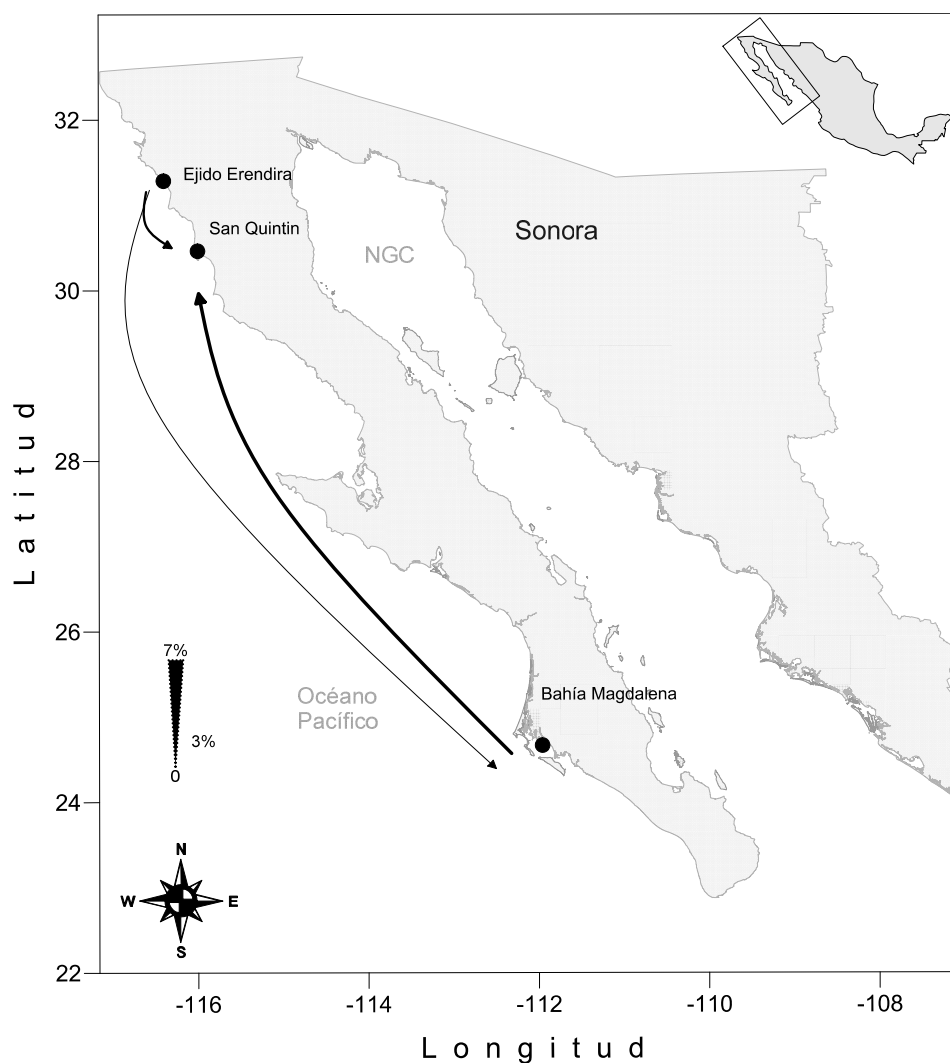


Figura 17. Mapa de conectividad genética de *O. bimaculoides* calculado a partir de los datos de tasas de migración reciente BAYESASS.

Parentesco (RELATEDNESS)

El análisis indica que Ejido Erendira no presenta valores de parentesco en su población además de que están en los límites de confianza estimados; por otra parte las poblaciones de San Quintín y Bahía Magdalena muestran altos indicios de parentesco, principalmente la de Bahía Magdalena (Fig. 18).

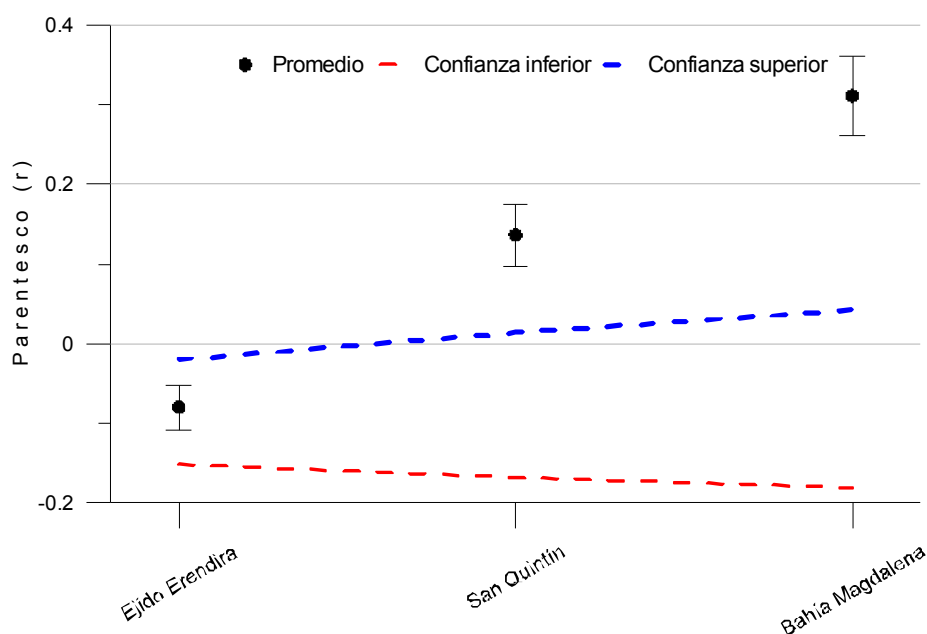


Figura 18. Valores promedio de parentesco (r) pareado dentro de cada población de *Octopus bimaculoides* en la costa oeste de la península. Las barras son los intervalos de confianza al 95%, determinados por re-muestreo de 1000 bootstraps. Los Límites de confianza azul y rojo son intervalos de confianza de 95% sobre la hipótesis nula de no diferencia o bien no parentesco en las poblaciones, este intervalo se determinó con 9999 permutaciones.

Cuello de botella reciente (BOTTLENECK)

El análisis de cuellos de botella recientes indicó que la población de Bahía Magdalena presenta un exceso de heterocigosidad significativo ($P < 0.08$). Mientras que Ejido Erendira y San Quintín, no presentaron una diferencia significativa (Tabla XX).

Tabla XX. Análisis de cuello de botella reciente para poblaciones de *Octopus bimaculoides* obtenido de BOTTLENECK. Heterocigosidad (He), prueba de Significancia (PS), desviación estandarizada de heterocigosidad (DEH) y Rangos de Wilcoxon (DEW). * desviación ($P < 0.08$)

Población	Muestra	Número		PS	DEH	DEW
		de alelos	He	$P < 0.08$ TPM	$P < 0.08$ TPM	$P < 0.08$ TPM
Ejido Erendira	14	5.6	0.62	0.320	0.474	0.527
San Quintín	10	6.47	0.68	0.244	0.033	0.805
Bahía Magdalena	8	3.87	0.63	0.001	0.005	0.000*

Octopus hubbsorum

Análisis de Microsatélites

Se genotipificaron 115 muestras de *O. hubbsorum* utilizando 7 loci microsatélites, de los cuales la proporción de datos faltantes fue del 6% para muestras y loci; es decir que 7 muestras no amplificaron bien entre todos los loci, y que menos de un locus no funcionó adecuadamente.

La prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg, después de la corrección de Bonferroni, sugiere una desviación significativa ($P < 0.00119$) en 5 de 42 combinaciones únicas Loci/población; las combinaciones significativamente diferentes fueron Ocbi41 para las poblaciones de Bahía Kino ($P = 0.00004$), Isla Tiburón ($P = 0.00000$) y Puerto Libertad ($P = 0.00004$), Ocbi-47 para Isla San Lorenzo ($P = 0.00003$) y Ocbi50 para Isla Tiburón ($P = 0.00000$). El locus Ocbi50 fue monomórfico para las poblaciones de El Conejo e Isla San Lorenzo (Apéndice C).

El número promedio de alelos nulos fue relativamente bajo 0.042 ± 0.025 (Rango 0 - 0.263), siendo el locus Ocbi50 valor más elevado en la población de Isla Tiburón (Apéndice F).

Diversidad genética

En general, se observó un polimorfismo alélico a través de las poblaciones (5 - 10 alelos). El número de alelos efectivos promedio fue 5.36 ± 0.555 , y muy similar

entre todas las poblaciones, pero fue ligeramente mayor en Isla Tiburón (5.89) seguida de Puerto Libertad (5.85) e Isla San Lorenzo (5.17). El número de alelos privados en promedio fue 0.69 ± 0.328 (rango 0.29 - 2.29) y sobresalió significativamente la población de Puerto Libertad (2.29) (Tabla XXI).

Las poblaciones de Santa Rosalía, El Conejo y Bahía Kino mostraron una heterocigosidad observada ligeramente mayor a la esperada, no así las demás poblaciones. La heterocigosidad observada y esperada promedio fueron muy similares $H_o = 0.65$ y $H_e = 0.66$ (Tabla XXI).

Tabla XXI. Diversidad genética de *Octopus bimaculoides* en la costa oeste de la península y el Golfo de California, utilizando 7 loci microsatélites. Tamaño de muestra (N), número de alelos (Na), número de alelos efectivos (Ne), alelos privados (AP), heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He).

Población	N	Na	Ne	AP	Ho	He
Santa Rosalía	8	6.57 ± 1.510	4.82 ± 1.142	0.29 ± 0.184	0.75 ± 0.122	0.66 ± 0.107
EL Conejo	8	5.00 ± 1.309	4.09 ± 1.070	0.29 ± 0.286	0.65 ± 0.121	0.59 ± 0.119
Bahía Kino	32	10.00 ± 2.862	6.32 ± 1.774	0.29 ± 0.286	0.70 ± 0.139	0.66 ± 0.126
Isla San Lorenzo	22	7.71 ± 2.112	5.17 ± 1.546	0.43 ± 0.297	0.57 ± 0.148	0.61 ± 0.134
Isla Tiburón	31	10.00 ± 2.350	5.89 ± 1.473	0.57 ± 0.202	0.53 ± 0.122	0.69 ± 0.098
Puerto Libertad	14	8.86 ± 1.184	5.85 ± 1.388	2.29 ± 0.714	0.70 ± 0.103	0.72 ± 0.082
Total	115	8.02 ± 0.810	5.36 ± 0.555	0.69 ± 0.328	0.65 ± 0.050	0.66 ± 0.043

El análisis de rarefacción mostró una riqueza alélica promedio de 4.81 y al igual que el Ne de la Tabla XXII no hubo mucha variación entre las poblaciones; el mismo comportamiento se observó en la riqueza de alelos privados sin embargo, la proporción tuvo un ligero incremento (promedio 0.74 ± 0.376) para todas las poblaciones (rango 0.32 -1.97), habiendo mas alelos privados para Puerto Libertad (1.97) (Tabla XXII).

Tabla XXII. Corrección de rarefacción por tamaño de muestra de poblaciones de *Octopus bimaculoides*, considerando un mínimo de 10 genes para todas las poblaciones. Incluye la riqueza alélica y la riqueza de alelos privados.

Población	Riqueza alélica	Riqueza de alelos privados
Santa Rosalía	5.00 ± 0.993	0.66 ± 0.211
El Conejo	4.28 ± 0.975	0.52 ± 0.308
Bahía Kino	4.79 ± 0.999	0.32 ± 0.210
Isla San Lorenzo	4.44 ± 0.956	0.46 ± 0.215
Isla Tiburón	4.94 ± 0.846	0.54 ± 0.167
Puerto Libertad	5.42 ± 0.733	1.97 ± 0.382
Total	4.81 ± 0.168	0.74 ± 0.249

Efecto de los alelos nulos en la diferenciación genética

Los valores globales de F_{st} utilizando y no utilizando el logaritmo de ENA fueron similares (sin alelos nulos $F_{st} = 0.161$, con alelos nulos $F_{st} = 0.169$). El análisis pareado tampoco mostró diferencias significativas (Tabla XXIII). Esto indica que el efecto de los alelos nulos no está alterando los valores de F_{st} , por lo que se pueden utilizar todos los loci.

Tabla XXIII. Diferenciación genética de poblaciones de *Octopus hubbsorum* en la costa oeste de la península y el Golfo de California. Los valores de F_{st} por debajo de la diagonal son corregidos utilizando el logaritmo de ENA y no consideran los alelos nulos, los valores arriba de la diagonal consideran los alelos nulos.

	Santa Rosalía	El Conejo	Bahía Kino	Isla San Lorenzo	Isla Tiburón	Puerto Libertad
Santa Rosalía		0.220	0.212	0.229	0.165	0.140
El Conejo	0.222		0.085	0.198	0.163	0.217
Bahía Kino	0.217	0.083		0.120	0.119	0.214
Isla San Lorenzo	0.229	0.188	0.110		0.242	0.208
Isla Tiburón	0.150	0.157	0.111	0.220		0.171
Puerto Libertad	0.141	0.216	0.212	0.206	0.147	

Diferenciación de poblaciones

Se observó una elevada diferenciación genética entre todas las poblaciones de *O. hubbsorum*. El rango de F_{st} fue entre 0.086 y 0.258; para el estimador Jost' D

fue entre 0.186 y 0.695. Todos los valores fueron significativos incluso después de la corrección de Bonferroni ($P = 0.0033$) (Tabla XXIV).

Bahía Kino fue la que presentó menor diferencia con respecto a las demás poblaciones, incluso con El Conejo de la costa occidental de la península ($F_{st} = 0.086$, Jost' $D = 0.186$), pero presentó la mayor diferencia con Puerto Libertad ($F_{st} = 0.223$, Jost' $D = 0.696$) y con Santa Rosalía ($F_{st} = 0.216$, Jost' $D = 0.595$) (Tabla XXIV).

Se observó una elevada y significativa diferencia en el Golfo de California. Santa Rosalía y Puerto Libertad mostraron las diferencias más notables con las demás poblaciones, pero entre ellas fue relativamente baja ($F_{st} = 0.141$, Jost' $D = 0.455$) (Tabla XXIV).

Tabla XXIV. Diferenciación genética entre poblaciones de *Octopus hubbsorum* en la costa oeste de la península y el Golfo de California. Los valores de F_{st} son mostrados por arriba de la diagonal, y el estimador Jost' D debajo de la diagonal. Corrección de Bonferroni ($P = 0.0033$).

	Santa Rosalía	El Conejo	Bahía Kino	Isla San Lorenzo	Isla Tiburón	Puerto Libertad
Santa Rosalía		0.218	0.216	0.225	0.178	0.141
El Conejo	0.575		0.086	0.196	0.172	0.218
Bahía Kino	0.595	0.186		0.126	0.148	0.223
Isla San Lorenzo	0.559	0.423	0.268		0.258	0.206
Isla Tiburón	0.521	0.449	0.379	0.690		0.189
Puerto Libertad	0.455	0.678	0.696	0.566	0.623	

El análisis de varianza molecular (AMOVA) indicó que el 85% de la variación genética estuvo representada entre individuos. Mientras que el 15 % de variación en la frecuencia alélica fue entre las poblaciones ($P = 0.001$) (Tabla XXV).

Tabla XXV. Análisis molecular de varianza para poblaciones de *Octopus hubbsorum*. Grados de libertad (g.l) y (P) valor de significancia.

Fuente de Variación	Varianza %	Estadístico F	Valor F	g.l	Suma cuadrados	Cuadrado Medio	Varianza Estimada	P
Entre poblaciones	15	Fst	0.152	5	96.798	19.360	0.453	0.001
Entre individuos	13	Fis	0.154	109	317.671	2.914	0.390	0.001
Dentro individuos	72	Fit	0.283	115	245.500	2.135	2.135	0.001
Total	100			229	659.970		2.978	

Análisis bayesiano de estructura poblacional (STRUCTURE).

El modelo libre indicó que el mejor ajuste de agrupamiento de clúster fue $K = 4$ (Fig. 19 A). Mientras que el modelo semi-conservativo se ajustó mejor para definir 3 poblaciones (Fig. 19 B).

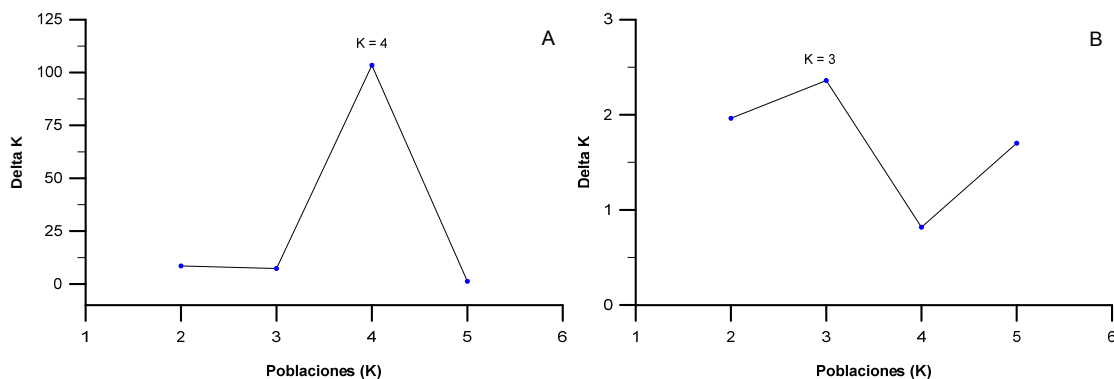


Figura 19. Asignación de grupos (clúster) obtenidos de STRUCTURE en identificados por medio de CLUMPAK para determinar el delta K. A) es el mejor ajuste de $K = 4$ cuando se utilizó el modelo libre y B) es el mejor ajuste para identificar $K = 3$ cuando se utilizó un modelo semi-conservativo (LocPrior).

El modelo libre ($K=4$), muestra claramente dos poblaciones bien definidas, Isla San Lorenzo y Puerto Libertad, y dos poblaciones mezcladas compuestas principalmente por Isla Tiburón y Bahía Kino. El Conejo está más relacionado con Bahía Kino y Santa Rosalía con Isla Tiburón (Fig. 20 $K = 4$). Sin embargo, solo 6 de 10 repeticiones en las matrices lograron agruparse.

El modelo semi-conservativo mostró un mejor arreglo entre matrices (9 de 10) e identificó 3 poblaciones bien estructuradas Puerto Libertad, Isla Tiburón e Isla San Lorenzo. Bahía Kino está más relacionada con Isla Tiburón al Igual que El Conejo. Mientras que Santa Rosalía está más relacionada con la población de Puerto Libertad (Fig. 20 $K = 3$).

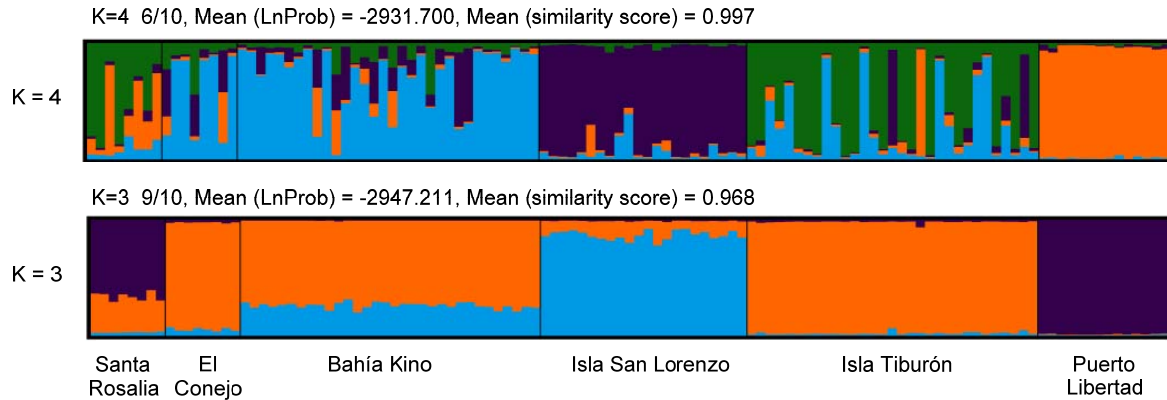


Figura 20. Análisis de estructura poblacional para *Octopus hubbsorum*. K = 4 indica cuatro poblaciones obtenida del modelo libre, y K = 3 indica tres poblaciones obtenida del modelo semi-conservativo. El número arriba de las gráficas indican el arreglo de matrices entre clústers.

Tasas de migración direccional por generación (BAYESASS)

La tasa de migración siempre fue mayor entre la misma población (69% - 93%). De acuerdo con el análisis, todas las poblaciones pueden intercambiar migrantes en 1%, 2% y 3%. Bahía Kino es la población que mayor emigración presenta hacia El conejo (21%), y Santa Rosalia (4%) e Isla Tiburón (6%). Isla San Lorenzo es la que menos inmigración tiene. Mientras que Puerto libertad recibió al menos un 2% de las demás poblaciones. Santa Rosalia también recibe migrantes de las demás poblaciones y un 9% de Isla Tiburón (Tabla XXVI) (Fig. 21).

Tabla XXVI. Tasas de migración direccional entre poblaciones de *Octopus hubbsorum* (error estándar) obtenidas de BAYESASS.

De:	Hacia:					
	Santa Rosalía	El Conejo	Bahía Kino	Isla San Lorenzo	Isla Tiburón	Puerto Libertad
Santa Rosalía	0.80 (0.081)	0.02 (0.022)	0.01 (0.009)	0.01 (0.012)	0.01 (0.010)	0.03 (0.025)
El Conejo	0.02 (0.023)	0.69 (0.025)	0.01 (0.009)	0.01 (0.012)	0.01 (0.009)	0.03 (0.024)
Bahía Kino	0.04 (0.030)	0.21 (0.046)	0.93 (0.025)	0.02 (0.017)	0.06 (0.028)	0.02 (0.017)
Isla San Lorenzo	0.03 (0.024)	0.02 (0.023)	0.02 (0.017)	0.93 (0.027)	0.01 (0.012)	0.02 (0.018)
Isla Tiburón	0.09 (0.084)	0.02 (0.022)	0.02 (0.015)	0.01 (0.012)	0.89 (0.031)	0.02 (0.019)
Puerto Libertad	0.02 (0.023)	0.02 (0.022)	0.01 (0.009)	0.01 (0.012)	0.02 (0.012)	0.89 (0.038)

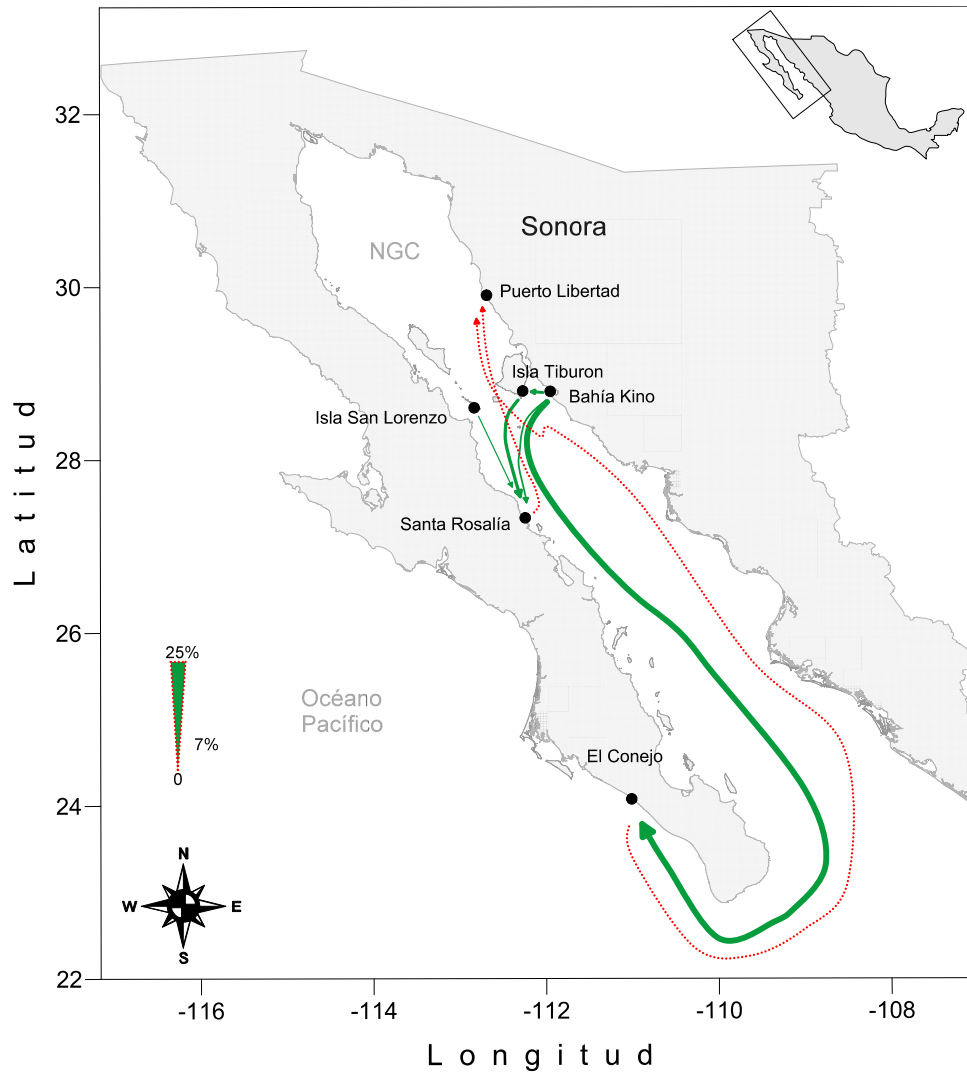


Figura 21. Mapa de conectividad genética de *O. hubbsorum* calculado a partir de los datos de tasas de migración reciente BAYESASS.

Parentesco (RELATEDNESS)

El análisis muestra que 5 de 6 poblaciones presentan parentesco, es decir que están muy relacionadas hacia dentro de cada población. Probablemente Puerto Libertad este dentro del intervalos de confianza, sin embargo una fracción si indicó parentesco. Santa Rosalía fue la que menor parentesco mostró es decir que los organismos están menos relacionados entre sí que las demás poblaciones (Fig. 22).

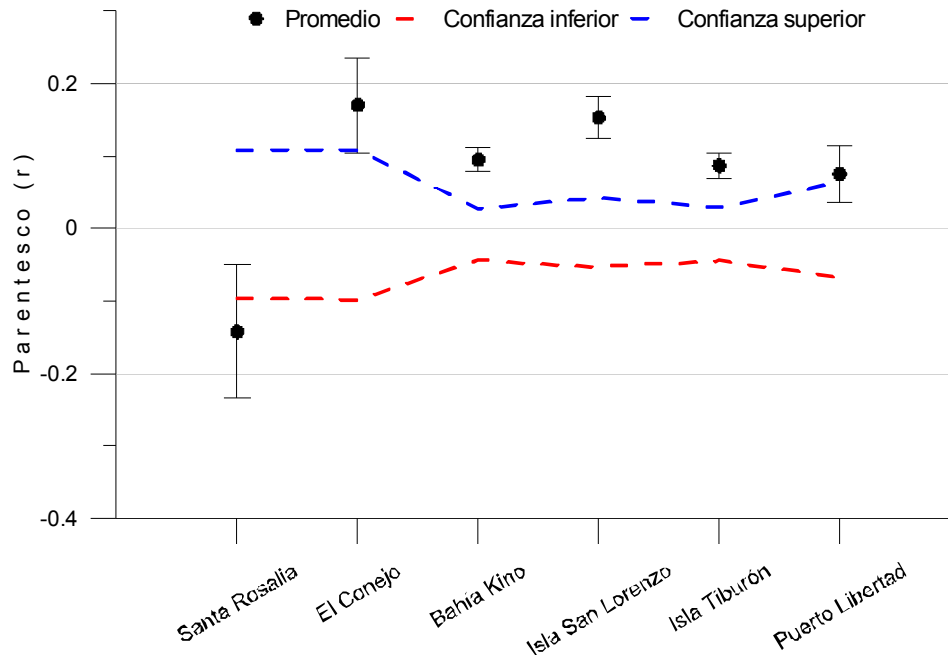


Figura 22. Valores promedio de parentesco (r) pareado dentro de cada población de *Octopus hubbsorum*. Las barras de error son los intervalos de confianza al 95%, determinados por re-muestreo de 1000 bootstraps. Los Límites de confianza azul y rojo son intervalos de confianza de 95% sobre la hipótesis nula de no diferencia o bien no parentesco en las poblaciones, este intervalo se determinó con 9999 permutaciones.

Cuello de botella reciente (BOTTLENECK)

El análisis de cuello de botella no mostró evidencia significativa de que las poblaciones de *O. hubbsorum* que se encuentran en el Golfo de California hayan presentado un exceso de heterocigosidad, mientras que en El Conejo de la costa oeste de la península parece estar en los niveles significativos de exceso de heterocigosidad ($P < 0.08$) (Tabla XXVII).

Tabla XXVII. Análisis de cuello de botella reciente para poblaciones de *Octopus hubbsorum*. La tabla muestra la población, la heterocigosidad (He) y las pruebas de Significancia, desviación estandarizada de heterocigosidad y de Rangos de Wilcoxon . *desviación

Población	Muestra	No. alelos	He	Significancia	Desv. Est.	Wilcoxon
				P < 0.05 TPM	P < 0.05 TPM	P < 0.05 TPM
Santa Rosalía	8	6.57	0.7	0.208	0.210	0.852
El Conejo	8	5	0.64	0.197	0.097	0.078*
Bahía Kino	32	10	0.67	0.338	0.381	0.656
Isla San Lorenzo	22	7.71	0.62	0.194	0.353	0.719
Isla Tiburón	31	10	0.7	0.109	0.044	0.973
Puerto Libertad	14	8.86	0.75	0.596	0.000	0.656

Discusión

Octopus bimaculatus

El análisis genético de *O. bimaculatus* en 9 localidades en el Noroeste de México reveló una fuerte estructura poblacional. Los valores globales y pareados de Fst y Jost D fueron elevados y significativos (en su mayoría), indicando un arreglo poblacional discreto. Debido a la distancia y las particularidades físicas del Golfo de California, se esperaba que la mayor diferencia genética se encontrara entre el norte del Golfo de California y la costa occidental de la península, sin embargo la mayoría de los valores pareados de Fst como los de Jost D entre las localidades de estas dos regiones fueron los más bajos e incluso no significativos (La Bocana y Las Barrancas vs norte del Golfo de California), que entre poblaciones de las mismas regiones. Esto sugiere la existencia de un flujo genético suficiente para mantener conectadas a las poblaciones de *O. bimaculatus* entre la costa occidental de la península y el norte del Golfo de California, el cual muy probablemente tendría que ser por el transporte de paralarvas, ya que *O. bimaculatus* suele tener gran movilidad pero siempre permanece en la misma zona (Ambrose 1982), su movilidad no va más allá de un área de 6000 m² (Hofmeister et al. 2015).

Recientemente, Munguía-Vega et al. (2015a) reportaron resultados similares, al encontrar una estructura genética significativa entre poblaciones de *Panopea globosa* de Bahía Magdalena y las poblaciones del norte del Golfo de California, pero con un ligero o intermitente intercambio de larvas entre ambas zonas, asociado a la

temporada reproductiva y a la dispersión de larvas por medio de la circulación oceanográfica del Golfo de California.

Octopus bimaculatus en el Golfo de California, específicamente en Bahía de los Ángeles tiene una temporada reproductiva durante el verano (López-Rocha et al. 2012, Villegas et al. 2014) con un periodo principal de desove de junio a septiembre, y pocos desoves en febrero (Castellanos-Martínez 2008). López-Peraza et al. (2014), en condiciones de laboratorio, observaron que la puesta de huevos (*O. bimaculatus* de Bahía de los Ángeles) puede durar hasta dos meses (abril – junio, 61 días) cuando las paralarvas eclosionan. Tomando en consideración esto, las puestas de junio-septiembre podrían estar eclosionando en octubre-noviembre, la eclosión coincide con el giro anticiclónico (en el sentido del reloj) el cual ocurre de noviembre a abril y se caracteriza por un flujo de agua superficial de salida a través de las grandes Islas (Lavin & Marinone 2003, Marinone 2003, Marinone et al. 2011). Esto posiblemente explique que las poblaciones del norte del Golfo de California esten exportando paralarvas de pulpo hacia el sur y que probablemente salgan del Golfo de California, pues se ha mencionado que las paralarvas de *O. bimaculatus* pueden durar hasta 3 meses en la columna de agua antes de asentarse (Ambrose 1981, 1988, 1990). Otros estudios con peces, en el norte del Golfo de California han mostrado que los conjuntos de larvas suelen estar lejos del sitio de desove como una respuesta al giro anticiclónico; el cual mueve >54% de las partículas en dirección sur durante el invierno, de acuerdo a un modelo de circulación oceanográfica específico para el Golfo de California (Peguero-Icaza et al. 2010).

El análisis de clúster por STRUCTURE identificó 5 poblaciones bien definidas, Malarrimo en la costa occidental de la península y Puerto Peñasco, San Luis Gonzaga, Isla Smith y Puerto Refugio en el Golfo de California. Poblaciones intermedias, La Bocana, Las Barrancas y Puerto Lobos coinciden con los límites de distribución de *O. bimaculatus* y *O. hubbsorum* y con las regiones biogeográficas identificadas por Briggs (1974) y discutidas en el capítulo II. Estas poblaciones también coinciden con la mayor diversidad alélica, pero con menor número de alelos privados (Tabla I, II). En este sentido se sabe que el número de alelos privados son

aquellos que son únicos de cada población (Kalinowski 2004). Por lo tanto, estas poblaciones posiblemente tengan una mayor diversidad alélica debido a un flujo genético asimétrico que las favorece, pero carecen de alelos únicos. Las poblaciones de Isla Smith y Puerto Peñasco tuvieron la riqueza alélica y el número de alelos privados ligeramente más alta en el Golfo de California, lo cual es característico de poblaciones bien establecidas que funcionan como poblaciones fuente o bien centros de origen para otras poblaciones alrededor (Szpiech & Rosenberg 2011).

Las tasas de migración recientes determinadas en este estudio respaldan aspectos importantes, 1) el nivel de estructuración en las poblaciones de *O. bimaculatus*, 2) el patrón de dispersión dentro del norte del Golfo de California y entre este y la costa occidental de la península, 3) la coincidencia entre la temporada de desove-eclosión con el cambio estacional de la circulación (en el sentido del reloj) oceanográfica principalmente en el norte del Golfo de California, 4), la determinación de poblaciones fuente y sumidero, particularmente en el caso de Puerto Peñasco la cual tuvo la mayor tasa de emigración hacia todas poblaciones, tanto del Golfo de California como en la costa occidental de la península. Sin embargo, Puerto peñasco fue la que menor tasa inmigración tuvo, contrario a Puerto Lobos la cual tuvo mayor diversidad genética, menor número de alelos privados, la menor tasa de emigración y la mayor tasa de inmigración, lo que la ubica como una población sumidero, lo cual, de acuerdo con Cowen & Sponaugle (2009) una población fuente es aquella que exporta mas organismos de los que importa, y una población sumidero es lo contrario.

La tasa de migración también reveló que el mayor porcentaje de migración ocurre dentro de cada población, esto fue corroborado en un análisis de parentesco, donde se observó que la mayoría las poblaciones estaban fuera del intervalo de confianza y que sugiere que los organismos están emparentados. Esta tasa de migración intrínseca con un parentesco dentro de la población, puede ser explicada con base en la temporada de desove y el patrón de dispersión.

Como se mencionó previamente *O. bimaculatus* puede iniciar el desove en febrero (Castellanos-Martínez 2008), lo que implica que la eclosión pudiera estar

llevándose a cabo de abril a junio, lo cual coincide con el giro ciclónico (sentido contrario del reloj) y alcanza la transición hacia el anticiclónico (en sentido del reloj) (Marinone 2012), por lo que aquellas paralarvas que eclosionan durante la transición de los giros estacionales en el norte del Golfo de California tienen una gran probabilidad de regresar al sitio de origen lo que implicaría un autoreclutamiento o bien una retención local. Munguía-Vega et al. (2015a) también encontraron parentesco en poblaciones de *P. globosa* en el Golfo de California producto de una retención local. Este patrón de dispersión y de retención local ha sido previamente observado en *Mycteroperca rosacea* ubicando sitios y temporada de desove, en conjunto con modelos correlacionados de conectividad oceanográfica y genética (Munguía-Vega et al. 2014).

Un autoreclutamiento y un parentesco significativo suelen ser propiedades de una población que ha estado o está presentando un cuello de botella reciente. El análisis de exceso de heterocigosidad indicó que en La Bocana-Las Barrancas, San Luis Gonzaga y Bahía de Los Ángeles han presentado cuellos de botella recientes. Particularmente estas poblaciones son las que mayor registró de captura presentan (Torreblanca-Ramirez 2011) y de las que se capturan prácticamente todo el año en las costas de península (Moreno-Báez et al. 2012). Al respecto, Pinsky & Palumbi (2014) mencionan que la sobrepesca tiene un efecto negativo sobre la diversidad genética de las poblaciones en pequeñas pero significativas cantidades y es más sensible cuando se consideran la pérdida de alelos raros. En este sentido, las poblaciones de La Bocana-Las Barrancas, San Luis Gonzaga y Bahía de Los Ángeles mostraron los valores ligeramente más bajos de riqueza alélica y los más bajos en alelos privados.

Otro aspecto que se debe de considerar es que el análisis de BOTTLENECK pudiera estar sobrestimando el exceso de heterocigosidad, debido a la historia de vida del organismo, en el siguiente sentido: Las poblaciones que han experimentado una reducción en el tamaño efectivo muestran una correlación con el número de alelos y la heterocigosidad (Piry et al. 1999). Sin embargo, el número de alelos, se reduce mucho más rápido que la heterocigosidad, de esta forma la heterocigosidad

es mucho mayor que la heterocigosidad esperada en una población estable o bajo el equilibrio deriva-mutación, ya que la heterocigosidad esperada se calcula a partir del número de alelos (incluye los raros) (Cornuet & Luikart 1996, Barson et al. 2009).

Sobre el supuesto previo, en una población estable el efecto es esperado dado que la heterocigosidad en un estado estable depende del tamaño efectivo y de la tasa de entrada de nuevo material genético. Sin embargo en especies que presentan paternidad múltiple el número efectivo de la población incrementa, ya que el efecto de la paternidad múltiple satura (en el mismo grado) el número efectivo de la población como si la población se mezclara libremente (Rafajlovic et al. 2013). Un ejemplo extremo, es que algunas hembras que lleguen a una isla vacía, alcanzarían la capacidad de carga de la isla en una sola generación. También se ha observado que la heterocigosidad, de especies con paternidad múltiple, incrementa conforme incrementa la distancia entre dos localidades, lo cual se debe a explosiones (bursts) intermitentes (fundadores intermitentes) de diversidad genética, la cual incrementa conforme el grado de paternidad múltiple lo hace (Rafajlovic et al. 2013). Al respecto, todas las especies de pulpo, presentan glándulas oviductales que tienen la capacidad de almacenar esperma de diferentes machos (Froesch & Marthy 1975) y se ha corroborado la paternidad múltiple en diferentes especies de pulpo, llegando a encontrar hasta 4 machos por cada hembra de huevos (Voight & Feldheim 2009, Quinteiro et al. 2011, Larson et al. 2015). En el presente trabajo se observó que el número de alelos sobre un control por rarefacción presenta valores muy similares de riqueza alelos y de alelos privados o raros, para las poblaciones en cuestión, por lo que no es clara una reducción de alelos que incrementen la heterocigosidad de manera excesiva.

Octopus bimaculoides

El análisis genético de *O. bimaculoides* en la costa occidental de la península mostró una significativa estructura genética de 12% y 22% usando F_{st} y el doble cuando se calculó Jost D (23% a 52%). La mayor diferencia genética fue entre las localidades relativamente más cercanas (Ejido Erendira y San Quintín), y la menor

entre las localidades más lejanas (Ejido Erendira y Bahía Magdalena). Esta fuerte estructura puede deberse a que *O. bimaculoides* tiene una estrategia de dispersión limitada ya que no presenta una fase de larva o paralarva que pase un tiempo en la columna de agua, por el contrario tiene un desarrollo directo que al eclosionar inmediatamente se dirige al bentos, por lo que su dispersión puede ser limitada (Forsythe & Hanlon 1988a). Sin embargo, ambos análisis de STRUCTURE sugirieron dos clúster ($K = 2$) que separan a Ejido Erendira de San Quintín y Bahía Magdalena, lo que sugiere un mayor flujo genético entre las últimas dos poblaciones. Por su parte BAYESASS calculó una tasa de migración principalmente asimétrica hacia San Quintín en donde el mayor aportador fue Bahía Magdalena (7%). En este sentido la dispersión también puede darse por medio de objetos flotantes (Grantham et al. 2003, Thiel & Gutow 2005, Villanueva & Norman 2008).

La capacidad de los organismos para dispersarse por la deriva oceánica o rafting en restos flotantes del océano es dictada por una compleja interacción entre la dinámica oceánica, la geomorfología, la proximidad al mar y la supervivencia en el camino (Gillespie et al. 2012). En este sentido, *O. bimaculoides* es considerada una especie fuerte que tolera varios rangos de temperatura y puede asentarse en distintos tipos de hábitats (arenas, rocas, lodos, latas, botellas, etc.) (Forsythe & Hanlon 1988a, h). Hobday (2000) evaluó la importancia del kelp como un factor de dispersión, determinando que un kelp puede mantenerse a flote hasta por 110 días, y encontró, entre la fauna asociada, dos especies de pulpo, *O. bimaculoides* y *O. micropyrsus* (un pulpo enano con características reproductivas similares o más restringidas que las de *O. bimaculoides*). Dos adultos de *Octopus bimaculatus* también se han observado a la deriva sobre hojas de kelp, las cuales fueron consideradas como vectores de dispersión (Bushing 1994).

Recientemente, Durazo (2015) evaluó el sistema de la Corriente de California sobre la península y encontró que la Contracorriente de California (con una dirección hacia el norte y va pegada a la costa occidental de la península) es continua a lo largo del año y se une al flujo superficial polar, el cual también es costero. Dicha Contracorriente es más intensa durante verano y otoño, y coincide con la temporada

de eclosión de *O. bimaculoides* en Bahía Magdalena, la cual abarca de mayo a octubre, siendo más frecuente durante agosto y septiembre (otoño) (Ibarra-García 2012).

Probablemente *O. bimaculoides* está manteniendo un flujo genético asimétrico que soporta la conectividad poblacional, por medio de vectores asociados a su comportamiento biológico en conjunto con la estacionalidad de corrientes oceánicas.

El análisis de parentesco indicó que Ejido Erendira no presenta relación genética cercana entre los organismos de esta población, contrario a San Quintín y Bahía Magdalena, este último fue más evidente. Específicamente la población de Ejido Erendira se encuentra sobre la costa rocosa de la península, la cual está expuesta al fuerte oleaje y a constantes corrientes marinas, esto probablemente influya en un cambio constante de organismos durante el reclutamiento. Por el contrario, Las Bahías de San Quintín y Magdalena son consideradas lagunas costeras las cuales presentan su propia dinámica hidrográfica (Lankford 1977). Ambas lagunas tienen un intercambio de agua con el océano Pacífico por medio de mareas (flujo y reflujo), sin embargo este libre intercambio de aguas se ve interrumpido por frentes de masas de agua distintos, debido a las surgencias en la boca de ambas lagunas, principalmente durante el verano y otoño (Aguirre-Muñoz et al. 2001, Funes-Rodríguez et al. 2007). En San Quintín el desove de *O. bimaculoides* ocurre de octubre a enero y la eclosión de enero a mayo (Forsythe & Hanlon 1988a) mientras que en Bahía Magdalena la eclosión es de agosto a septiembre (Ibarra-García 2012). Al respecto, se pudiera suponer que el parentesco se deba más a una retención local en conjunto con la estrategia de vida de *O. bimaculoides* (eclosión bentónica). Rodhouse et al. (2014) encontraron que la intensidad del reclutamiento de especies que desovan una cohorte en distintas estaciones, estará influenciada por el transporte o retención de huevos o paralarvas.

Un aspecto relevante es que *O. bimaculoides* tiene dos modelos de ciclos de vida, uno llamado “alternancia de años” el cual todos los pulpos tardan dos años en desovar y se relaciona con temperaturas frías y el otro es el de “alternancia de generaciones” el cual desova cada año y se relaciona con temperaturas cálidas

(Forsythe & Hanlon 1988h, a). En Bahía Magdalena Ibarra-García (2012) determinó que *O. bimaculoides* presentaba una alternancia de generaciones mientras que en San Quintín donde la temperatura es más baja se presenta una alternancia de años (Forsythe & Hanlon 1988h, a). En este sentido existe una mayor probabilidad de encontrar un mayor parentesco en Bahía Magdalena que en San Quintín debido al ciclo de vida de la especie por localidad. Rodhouse et al. (2014) mencionan que en regiones frías, el desarrollo embrionario de los pulpos puede ser relativamente tardado, reduciendo la probabilidad de traslape de generaciones.

Si bien *O. bimaculoides* en Bahía Magdalena puede tener paternidad múltiple, quizás en esta ocasión el supuesto cuello de botella no sea producto propiamente de la paternidad múltiple, sino de otro conjunto de características. Por ejemplo, 1) en el análisis de rarefacción fue la localidad con menor riqueza alélica y menor número de alelos privados, 2) su estructura genética más baja probablemente sea resultado de la migración asimétrica hacia el norte de la península, 3) tiene un modelo de vida de alternancia de generaciones y 4) hasta el momento no se ha ubicado otra población más al sur o que este cercana de Bahía Magdalena, con la cual pueda estar intercambiando material genético. Además de ser una población con una fuerte pesquería, lo cual puede estar deteriorando su diversidad genética (Pinsky & Palumbi 2014).

Octopus hubbsorum

El análisis genético para *O. hubbsorum* indicó una fuerte estructura entre las poblaciones dentro y fuera del Golfo de California. Se observaron tres poblaciones bien definidas: Isla San Lorenzo, Isla Tiburón y Puerto Libertad. Particularmente, El Conejo, Bahía Kino e Isla Tiburón forman parte de la misma población. Pero Bahía Kino tiene un porcentaje genético que comparte con Isla San Lorenzo. Mientras que Santa Rosalia está más relacionada con Puerto Libertad, sin embargo también comparte genotipos con de Isla Tiburón.

El patrón de estructura dentro del Golfo de California, puede ser explicado por la capacidad de dispersión larvaria. *Octopus hubbsorum*, al igual que *O. bimaculatus*, presenta dentro de su ciclo de vida una fase de paralarva y su capacidad de dispersión es por medio de corrientes (Alejo-Plata & Alejo 2014), aunque se desconoce el tiempo que esta puede pasar en la columna de agua.

El ciclo reproductivo de *O. hubbsorum* aun no ha sido descrito para ninguna de las poblaciones aquí mencionadas, sin embargo como en la mayoría de los pulpos se cree que el pico de máximo desarrollo gonádico ocurre durante temperaturas cálidas (Boyle & Rodhouse 2005). Loreto, en B. C. S, ha sido la zona más cercana que tiene caracterizado su ciclo reproductivo, el cual tiene una frecuencia de desove débil en febrero y una máxima entre junio y agosto (Bravo-Olivas 2008). Recientemente, Alejo-Plata & Alejo (2014) determinaron que el desarrollo embrionario de *O. hubbsorum* dura aproximadamente de 20 a 30 días, por lo que probablemente el transcurso desde su puesta hasta su eclosión pudo haber sido de un mes o dos, como se ha observado en otras especies de pulpo (Vidal et al. 2014). Es decir que la temporada de eclosión de *O. hubbsorum* muy probablemente coincida con la transición de un giro ciclónico a un anticiclónico en el Golfo de California, lo que promueve la dispersión hacia el sur sureste (Lavin & Marinone 2003, Marinone 2003, Cudney-Bueno et al. 2009).

Las tasas de migración calculadas para *O. hubbsorum* son asimétricas en dirección norte-sur, donde Bahía Kino tuvo emigrantes hacia Isla Tiburón ambas poblaciones tuvieron emigrantes hacia Santa Rosalía. Esta migración asimétrica coincide con el modelo de dispersión de partículas con origen en la región alrededor de Bahía Kino-Isla Tiburón durante los meses de agosto a septiembre, y con la elevada tasa de retención de partículas alrededor de Santa Rosalía durante todo el año (Marinone 2012). Esta consistente retención de partículas probablemente explique, por una parte, su gran diversidad alélica (5.00) y por otra parte los valores relativamente altos de alelos privados (0.66), así como los bajos niveles de parentesco.

Por otra parte, la mayor tasa de migración asimétrica fue entre el Golfo de California y la costa occidental de la península, particularmente de Bahía Kino hacia El Conejo (0.21). Esto muy probablemente se deba a que gran parte de las paralarvas liberadas (partículas) en Bahía Kino entran al giro de la región centro sur del Golfo de California, el cual tiende a retener partículas gran parte del año y a dirigirlas hacia la boca del golfo, particularmente hacia las costas de Baja California Sur durante gran parte del año (Marinone 2003, 2012, Soria et al. 2014). Adicionalmente, De Silva-Dávila et al. (2015) observaron que la mayor concentración de paralarvas de cefalópodos, incluido el género *Octopus*, se encontraron en la región sur centro del Golfo de California y se sabe que las poblaciones de *O. hubbsorum* están bien establecidas desde Santa Rosalía hasta Cabo San Lucas (López-Uriarte et al. 2005, Bravo-Olivas 2008, Pliego-Cárdenas et al. 2011, Domínguez-Contreras et al. 2013). Por otra parte, Munguía-Vega et al. (2015a) encontraron una migración direccional principalmente de Guaymas hacia Bahía Magdalena (0.16) durante la temporada de desove de *P. globosa* en el Golfo de California, la cual se traslapa con la temporada de eclosión de *O. hubbsorum*.

El parentesco dentro de cada población fue relativamente bajo pero significativo en todas las poblaciones con excepción de Santa Rosalía. Este parentesco también puede ser explicado desde el punto de vista de las tasas de migración la cual fue mayor al interior de cada población y podría implicar un auto reclutamiento por retención de paralarvas. Al respecto, Marinone (2012) encontró, en regiones que incluyen a estas poblaciones, que la tasa de recepción (inmigración) de partículas de otras localidades fue incluso menor a la tasa de retención local (autoreclutamiento), y ambas tasas fueron mucho menores a las tasas de liberación (emigración), excepto para la región que incluía a Santa Rosalía. Por lo tanto, Bahía Kino pudiera considerarse con una población fuente y Santa Rosalía pudiera ser una población sumidero.

El análisis de cuello de botella no mostró evidencia de un exceso de heterocigosidad para las poblaciones en el interior del Golfo de California, lo que confirma un autoreclutamiento o retención local; sin embargo El Conejo parece estar

experimentado un cuello de botella reciente. Este exceso de heterocigosidad en El Conejo es difícil de explicar desde el punto de vista de autoreclutamiento, ya que se desconoce con precisión la dinámica oceanográfica que existe. Sin embargo, los valores de parentesco fueron los más elevados, mientras que los niveles de diferencia genética con Bahía Kino fueron los más bajos ($F_{st} = 0.086$, Jost' $D = 0.186$) y la tasa de emigración más grande 21% de Bahía Kino. Por lo que se cree que el exceso de heterocigosidad puede ser indicativo de una expansión poblacional resultado de la inmigración a partir de poblaciones genéticamente diferentes lo que crea una aparente exceso de alelos novedosos y una distribución incompleta de la distribución alélica (Barson et al. 2009). *Octopus hubbsorum* de El Conejo obtuvo una riqueza alélica similar a las demás poblaciones pero una mayor riqueza de alelos privados. Al respecto, Cornuet & Luikart (1996) mencionan que la inmigración reciente debe ser tomada con precaución, especialmente si los inmigrantes provienen de poblaciones genéticamente diferentes, debido a que estos inmigrantes pueden incrementar rápidamente en la población sin afectar la heterocigosidad. O bien, puede darse el caso de explosiones intermitentes de heterocigosidad debido a su paternidad múltiple (Rafajlovic et al. 2013).

DISCUSIÓN INTEGRAL

Los cefalópodos, específicamente los pulpos, contribuyen una derrama económica considerable propiciada por dos aspectos 1) la gran demanda de productos marinos y 2) la creciente escasez de blancos predilectos de pesca. Sin embargo, presentan grandes retos que exponen su adecuado manejo y su conservación; los más significativos son la identificación de especies y la evaluación de poblaciones.

El problema de identificación se debe esencialmente a la fuerte similitud entre especies y a la falta de constancia de caracteres morfológicos que distingan a una especie de otra. Mientras que el reto poblacional está alimentado por el primer problema y por los aspectos biológicos inherentes de cada especie, como: el ciclo de vida corto, el rápido crecimiento, y la plasticidad fenotípica entre especies y con el entorno. Estos aspectos, entre otros, los hace atractivos para la pesca, pero también limita las metodologías que han sido utilizadas para evaluar poblaciones que han sido o no objetivos de aprovechamiento.

Ante estos retos, la implementación de herramientas moleculares ofrece alternativas que ayudan en la diferenciación de especies, como lo es el uso genes mitocondriales debido su relativa baja recombinación, al tener un origen materno (Dai et al. 2012) ó en el caso de la evaluación de poblaciones, los marcadores moleculares como los microsatélites, son más populares debido a su herencia mendeliana y elevado polimorfismo; permitiendo analizar poblaciones que tienen una amplia distribución geográfica, en un tiempo relativamente corto y a un costo cada vez más bajo, debido al avance constante en el desarrollo de tecnologías de secuenciación masiva que permite obtener gran numero de marcadores específicos para la especie (Albertin et al. 2012) o genomas cortos, como los mitogenomas, que permiten abordar análisis más profundos que ayuden a identificar eventos de especiación (Rannala & Yang 2008, Yang & Rannala 2012).

Estos mismos problemas no excluyen a México, el cual es uno de los mayores exportadores de pulpo, pero también el que mayor problema en la identificación de especies, al menos para las costas del Océano Pacífico, ya que se desconocía hasta hace apenas <10 años, cuáles y cuantas especies están distribuidas en sus costas, entre muchos de los aspectos biológicos, que son esenciales antes de empezar a aprovechar un recurso.

En la presente investigación si bien no cubrió a todas las especies registradas, si abordamos las tres que mayor frecuencia que componen las capturas. Una intensa compilación bibliográfica, permitió conocer aspectos de la historia de vida de las tres especies, tales como las capacidades biológicas de dispersarse, las temporadas reproductivas, así como los registros de distribución geográfica asociado a la composición de captura de cada especie. Esto permitió tener un panorama aproximado de cuando y donde es más probable de encontrarlas. Esta información fue fundamental para asignar la especie que requería mayor atención de acuerdo a monitoreos y evaluaciones elaboradas por el proyecto PANGAS en el norte del Golfo de California (Munguía-Vega et al. 2015h). En este sentido se interesó por *Octopus bimaculatus* para secuenciar parte del genoma nuclear por medio de pirosecuenciación 454 ROCHE, y de ahí obtener los microsatélites y el mitogenoma (capítulo I).

El desarrollo de microsatélites para cefalópodos y específicamente para pulpos ha incrementado en los últimos años, infortunadamente no al nivel que se esperaba, aun cuando los costos de secuenciación de alto rendimiento han disminuido considerablemente (Loman et al. 2012). Otro aspecto que no ayuda, es que los pocos loci microsatélites específicos que se han caracterizado, aun no han sido empleados en poblaciones, esto se ve reflejado en la falta de estudios de genética poblacional. Esta carencia, probablemente esté relacionada con la poca certeza de que las muestras obtenidas en campo pertenezcan a la misma especie, y por el contrario, es evidente encontrar una gran cantidad de estudios filogenéticos (Sosa et al. 1995, Bonnaud et al. 1997, Piertney et al. 2003, Guerra et al. 2010b, Juárez 2012).

Sin embargo, la mayoría de los estudios filogenéticos en pulpo han utilizado fragmentos de genes mitocondriales los cuales a su vez han llevado discusiones divididas y un claro ejemplo se ha observado en el complejo *O. vulgaris* el cual no se ha definido si debe considerarse cosmopolita. En este sentido, utilizar la secuencia completa de ADN mitocondrial, en lugar de fragmentos, puede descubrir más información sobre el reordenamiento de los genes y la variación a nivel genoma entre especies, así como la descripción específica de cada especie (Cheng et al. 2011, Cheng et al. 2013). En la presente investigación se desarrolló el genoma mitocondrial completo para *O. bimaculatus* (7mo a nivel mundial), que es considerada una especie hermana de *O. bimaculoides* para la cual el genoma completo se caracterizó recientemente (Albertin et al. 2015) por lo que existe la probabilidad de analizar a mayor detalle cuales fueron los eventos de especiación que las llevo encontrarlas morfológicamente y genéticamente muy parecidas de acuerdo con el fragmento COIII (Sosa et al. 1995), o bien conocer si el origen de esta (s) especie (s) fue en la región tropical donde otras especies de pulpo oceladas son frecuentes hoy en día (Domínguez-Contreras et al. 2013).

El uso de herramientas moleculares mitocondriales como alternativa para la identificación de especies que presentan un reto de diferenciación, como los pulpos, deberían de ser indispensables antes de empezar a analizar una o varias poblaciones de una o varias localidades específicas en las cuales la composición de especies se desconoce. En el presente estudio, esta herramienta fue fundamental para diferenciar a las tres especies de las cuales la información es escasa, muy específica y la mayoría es relativamente anticuada. De igual manera fue esencial para corroborar la distribución de las poblaciones de las tres especies cuando se utilizaron marcadores microsatélites.

La distribución actual de pulpos en el noroeste de México, aun debe ser considerada incierta debido que no consideramos a todas las especies que se han registrado, o en un sentido más estricto, realmente desconocemos si las demás especies que se registraron en promedio hace 50 años se encuentran realmente en las costas de México, pues ha habido poca investigación que respalde su presencia.

Específicamente, *O. bimaculatus*, *O. hubbsorum* y *O. bimaculoides*, parecen tener distribuciones específicas, principalmente por las características del hábitat y por la historia de vida de cada una. No obstante, la presencia convergente de éstas en regiones biográficas pueda modificar la distribución alrededor de estas regiones principalmente durante eventos climáticos que modifiquen las características físicas de la región, encontrando algunos organismos de una especie en localidades donde otra especie es más común (Briggs et al. 2013). Por ejemplo algunos organismos de *O. hubbsorum*, en localidades comunes para *O. bimaculatus* por lo que sería interesante evaluar si ha habido procesos de hibridación, ya que ambas especies tienen una historia de vida y una fisiología reproductiva muy semejante.

Los estudios de poblaciones de pulpos en el noroeste México eran desconocidos hasta ahora, muy probablemente porque se desconocían las especies y su distribución poblacional. Una vez que se obtuvo esta información en el presente estudio, se pudieron conocer aspectos poblacionales para cada una de las tres especies estudiadas, las cuales mostraron una fuerte estructura poblacional entre sus poblaciones, y una conectividad asimétrica, quizás la más relevante es que el Golfo de California este exportando paralarvas de *O. bimaculatus* y *O. hubbsorum* hacia la costa oeste de la península. En este sentido podría considerarse que la región del norte del Golfo de California y la zona alrededor de las grandes islas puedan ser consideradas como centro de distribución para el Pacífico mexicano, al menos para especies que desoven y presenten un estadio larval durante el invierno, como *P. globosa* (Munguía-Vega et al. 2015a). El caso particular de *O. bimaculoides* la conectividad probablemente sea por medio de vectores (objetos flotantes) que estén viajando pegado a la costa, transportados por la contracorriente de California, sin embargo se debería de considerar un mayor número de poblaciones a lo largo de la costa, principalmente en las lagunas costeras.

Aspectos claves como conocer si una población está siendo subsidiada por otra o se repone a sí misma por medio de autoreclutamiento, son necesarios para estructurar y/o re-estructurar el manejo de recursos, ya sea desde punto de vista de aprovechamiento o el diseño de áreas de no tocar, lo cual es fundamental para áreas

naturales protegidas (Cowen et al. 2007, Pineda et al. 2007). O bien, desde un punto de vista de la investigación científica en el diseño de muestreos con objetivos específicos que ayuden a entender mejor la dinámica de una población (Cowen & Sponaugle 2009). Particularmente, en el Golfo de California se identificaron poblaciones fuente como Puerto Peñasco para *O. bimaculatus* y Bahía Kino para *O. hubbsorum*, así como poblaciones sumidero como Puerto Lobos para *O. bimaculatus* y Santa Rosalía para *O. hubbsorum*, ambos tipos de poblaciones con diversidades genéticas distintas. Aparentemente, intensificar una captura en Puerto Peñasco o Bahía Kino no sería lo más adecuado dado que es una población fuente con mayor número de alelos privados pero con una relativa baja diversidad genética, y quizás lo más adecuado sería capturar en una población sumidero como Puerto Lobos o Santa Rosalía, sin embargo su bajo número de alelos privados y su elevada diversidad genética la hace una población única al contar con un pool génico que representa a otras poblaciones. En este caso, tendría más sentido proteger una población que puede ser considerada un banco genético, pero también deben considerarse aspectos biológicos y ecológicos que ayuden a definir mejor su aprovechamiento.

Finalmente, *O. bimaculatus*, *O. bimaculoides* y *O. hubbsorum* son las especies con mayor frecuencia de captura presentan en el noroeste de México. Sin embargo este dato no es oficial, pero en el presente estudio, utilizando herramientas genéticas, se logró responder tres preguntas fundamentales, que son: ¿Quiénes están?, ¿Dónde están? y parcialmente ¿Cómo es su dinámica poblacional?.

CONCLUSIONES

Herramientas moleculares: Microsatélites y Mitogenoma

Algunos de los marcadores microsatélites diseñados específicamente para *O. bimaculatus*, amplifican también para *O. bimaculoides* y *O. hubbsorum*. Sin embargo se recomienda que se diseñen loci microsatélites para *O. hubbsorum*, pues se ha reportado que es la especie con mayor distribución geográfica para el Pacífico mexicano, y probablemente hasta las costas de Chile.

El ensamble del genoma completo mitocondrial para *O. bimaculatus*, permitió tener una referencia genética específica, la cual se desconocía para los genes más utilizados a nivel mundial en análisis filogenéticos y para diferenciar especies, 16s ARN y COI.

El mitogenoma de *O. bimaculatus* presentó el mismo arreglo de genes que presentan las otras 6 especies de pulpo para las cuales se han descritos los genomas.

El mitogenoma de *O. bimaculatus*, a diferencia de los otros, tiene longitud mayor 16,085 bp y presenta un VNTR único en la región control, lo cual podría ser característico de la especie y pudiera utilizarse en un futuro como un marcador único para diferenciar a la especie.

El análisis filogenético de mitogenomas indicó que *O. bimaculatus* presenta una relación más estrecha con su congénere *O. vulgaris*.

Identificación de especies

Octopus bimaculatus, *O. bimaculoides* y *O. hubbsorum* se pueden diferenciar utilizando los genes 16s ARN y COI. Sin embargo, las dos primeras son más cercanas genéticamente.

Distribución de especies

El uso de loci microsatélites en conjunto con marcadores mitocondriales permitió diferenciar las poblaciones que corresponden a cada especie en el noroeste de México.

Los límites de distribución de *O. bimaculatus*, *O. bimaculoides* y *O. hubbsorum* se traslapan en la costa oeste de la península, específicamente en la región biogeográfica alrededor de Bahía Magdalena. Mientras que en el Golfo de California, *O. bimaculatus* y *O. hubbsorum* se traslapan alrededor de las grandes islas. No se encontró evidencia de que *O. bimaculoides* este norte del Golfo de California.

Octopus bimaculatus y *O. bimaculoides* ampliaron su rango de distribución de Bahía Sebastián Vizcaíno hacia el sur, hasta Bahía Magdalena. Sobre la misma costa probablemente estén algunos organismos de *O. hubbsorum* en la región de Las Barrancas justo al norte de Bahía Magdalena donde se había considerado su límite geográfico.

En el Golfo de California *O. bimaculatus* y *O. hubbsorum* están bien delimitados en la región de las grandes islas con localidades donde convergen. *Octopus bimaculatus*, de acuerdo a su distribución pudiera ser considerada una especie con hábitos templados principalmente. Mientras que *O. hubbsorum* estuvo más asociado a regiones tropicales, sin embargo se podría considerar que tolera ambientes templados.

Genética Poblacional y conectividad

Las poblaciones de las tres especies mostraron una fuerte estructura poblacional en el noroeste de México.

La conectividad genética de las tres especies puede ser explicada por medio de la dispersión larvaria o juveniles asociada a corrientes marinas y vectores flotantes.

Octopus bimaculatus

Octopus bimaculatus tiene una estructura de al menos 5 poblaciones en el noroeste de México. Una en sobre la costa oeste de la península, Malarrimo, y cuatro en el norte del Golfo de California, Puerto Peñasco, San Luis Gonzaga, Isla Smith y Puerto Refugio.

La población de Isla Smith probablemente sea un centro de origen de las demás poblaciones, por su mayor riqueza de alelos privados.

Puerto Peñasco puede ser considerada una población fuente, con una tasa de migración asimétrica para las demás poblaciones de este estudio, debido que exporta mas organismos de lo que importa.

Todas las poblaciones de *O. bimaculatus*, presentan un grado de parentesco producto de una retención local y/o autoreclutamiento durante la temporada de desove.

Se considera que las poblaciones de *O. bimaculatus* no presentaron cuellos de botellas recientes. Los cuellos detectados para Bahía de Los Ángeles, San Luis Gonzaga y La Bocana-Las Barrancas muy probablemente estén sobrestimados por un efecto de paternidad múltiple.

Octopus bimaculoides

Octopus bimaculoides presenta estructura poblacional. Se identificaron dos poblaciones; una compuesta por San Quintín y Bahía Magdalena, las cuales que difieren de Ejido Erendira.

La fuerte estructura genética de Ejido Erendira con las otras poblaciones, probablemente se deba a las características de hábitat*.

La conectividad fue asimétrica de Bahía Magdalena hacia San Quintín, probablemente ocasionada por vectores (Rafting) sobre la contracorriente de California *.

No se observó un parentesco genético significativo en la población de Ejido Erendira, por lo que el autoreclutamiento no esté sucediendo debido a exposición a aguas abiertas.

Las poblaciones San Quintín y Bahía Magdalena tuvieron un parentesco genético significativo, producto del autoreclutamiento y el modelo de ciclo de vida asociado temperaturas de cada localidad.

La población de Bahía Magdalena presentó un cuello de botella significativo, probablemente producto de dos factores: 1) el autoreclutamiento, el cual es más frecuente debido a la alternancia de generaciones y 2) la migración asimétrica hacia el norte lo que refleja poco intercambio genético.

*algunas conclusiones para *O. bimaculoides* deben ser consideradas con precaución debido al bajo número de muestras y el bajo número de poblaciones.

Octopus hubbsorum

La estructura genética de *O. hubbsorum* en el noroeste de México, estuvo representada por 3 poblaciones, Isla San Lorenzo, Isla Tiburón y Puerto Libertad.

La conectividad genética de *O. hubbsorum* es asimétrica con dirección de norte a sur.

La población de Bahía Kino puede considerarse como una población fuente para las demás poblaciones. Mientras que Santa Rosalía puede considerarse una población sumidero, ya que recibe más organismos de otras poblaciones de los que exporta.

Las poblaciones de *O. hubbsorum* en el Golfo de California, muy probablemente, están exportando organismos hacia la costa oeste de la península (El Conejo).

Las poblaciones de *O. hubbsorum* en el Golfo de California, presentaron un parentesco genético relativamente bajo, posiblemente del producto de autoreclutamiento.

La población de El Conejo parece haber experimentado un cuello de botella reciente como resultado de un exceso de heterocigosidad, el cual probablemente se deba a una expansión poblacional a partir de migrantes de poblaciones genéticamente diferentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Muñoz, A., R. W. Buddemeier, V. Camacho-Ibar, J. D. Carriquiry, S. E. Ibarra-Obando, B. W. Massey, S. V. Smith, & F. Wulff. 2001. Sustainability of Coastal Resource Use in San Quintin, Mexico. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* **30**:142-149.
- Albertin, C. B., L. Bonnaud, C. T. Brown, W. J. Crookes-Goodson, R. R. da Fonseca, C. Di Cristo, B. P. Dilkes, E. Edsinger-Gonzales, R. M. Freeman, Jr., R. T. Hanlon, K. M. Koenig, A. R. Lindgren, M. Q. Martindale, P. Minx, L. L. Moroz, M. T. Nodl, S. V. Nyholm, A. Ogura, J. R. Pungor, J. J. Rosenthal, E. M. Schwarz, S. Shigeno, J. M. Strugnell, T. Wollesen, G. Zhang, & C. W. Ragsdale. 2012. Cephalopod genomics: A plan of strategies and organization. *Stand Genomic Sci* **7**:175-188.
- Albertin, C. B., O. Simakov, T. Mitros, Z. Y. Wang, J. R. Pungor, E. Edsinger-Gonzales, S. Brenner, C. W. Ragsdale, & D. S. Rokhsar. 2015. The octopus genome and the evolution of cephalopod neural and morphological novelties. *Nature* **524**:220-224.
- Alejo-Plata, C., R. García-Guillén, & J. Herrera-Galindo. 2012. *Octopus bimaculatus* paralarvae and juvenile (Cephalopoda: Octopodidae) in the Pacific south of Mexico. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* **42**:6.
- Alejo-Plata, M., J. L. Gómez-Márquez, S. Ramos-Carrillo, & J. E. Herrera-Galindo. 2009. Reproducción, dieta y pesquería del pulpo *Octopus hubbsorum* (Mollusca: Cephalopoda) en la costa de Oaxaca, México. *Revista de Biología Tropical* **57**:16.
- Alejo-Plata, M. d. C. & S.-n. H. Alejo. 2014. First description of eggs and paralarvae of green octopus *Octopus hubbsorum* (cephalopoda: Octopodidae) under laboratory conditions. *American Malacological Bulletin* **32**:132-139.
- Alvarez-Borrego, S. 2010. Physical, chemical and biological oceanography of the Gulf of California. Page 354 in R. C. Brusca, editor. *The Gulf of California: Biodiversity and Conservation*. The University of Arizona Press and The Arizona-Sonora Desert Museum, Tucson, USA.
- Allcock, A. L., A. Lindgren, & J. M. Strugnell. 2014. The contribution of molecular data to our understanding of cephalopod evolution and systematics: a review. *Journal of Natural History* **49**:1373-1421.
- Allcock, A. L. & S. B. Piertney. 2002. Evolutionary relationships of southern Ocean Octopodidae (Cephalopoda: Octopoda) and a new diagnosis of *Pareledone*. *Marine Biology* **140**:129-135.
- Ambrose, R. F. 1981. Observations on the embryonic development and early post embryonic behavior of *Octopus bimaculatus* (MOLLUSCA: CEPHALOPODA). *Veliger* **24**:8.
- Ambrose, R. F. 1982. Shelter Utilization by the Molluscan Cephalopod *Octopus bimaculatus*. *Marine Ecology Progress Series* **7**:67-73.
- Ambrose, R. F. 1988. Population dynamics of *Octopus bimaculatus*: influence of life history patterns, synchronous reproduction and recruitment. *Malacologia* **29**:16.

- Ambrose, R. F. 1990. *Octopus bimaculatus*. Pages 11-22 in M. A. Land and F. G. Hochberg, editors. Proceedings of the workshop on the fishery and market potential of octopus in California. Smithsonian Institution, Washinton, DC.
- Amos, W., J. I. Hoffman, A. Frodsham, L. Zhang, S. Best, & A. V. S. Hill. 2007. Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Molecular Ecology Notes* **7**:10-14.
- Arkhipkin, A. I., P. G. K. Rodhouse, G. J. Pierce, W. Sauer, M. Sakai, L. Allcock, J. Arguelles, J. R. Bower, G. Castillo, L. Ceriola, C.-S. Chen, X. Chen, M. Diaz-Santana, N. Downey, A. F. González, J. Granados Amores, C. P. Green, A. Guerra, L. C. Hendrickson, C. Ibáñez, K. Ito, P. Jereb, Y. Kato, O. N. Katugin, M. Kawano, H. Kidokoro, V. V. Kulik, V. V. Laptikhovsky, M. R. Lipinski, B. Liu, L. Mariátegui, W. Marin, A. Medina, K. Miki, K. Miyahara, N. Moltschaniwskyj, H. Moustahfid, J. Nabhitabhata, N. Nanjo, C. M. Nigmatullin, T. Ohtani, G. Pecl, J. A. A. Perez, U. Piatkowski, P. Saikliang, C. A. Salinas-Zavala, M. Steer, Y. Tian, Y. Ueta, D. Vijai, T. Wakabayashi, T. Yamaguchi, C. Yamashiro, N. Yamashita, & L. D. Zeidberg. 2015. World Squid Fisheries. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* **23**:92-252.
- Arreguín-Sánchez, F., M. J. Solis-Ramirez, & M. E. Gonzalez de la Rosa. 2000. Population dynamics and stock assessment for *Octopus maya* (Cephalopoda: Octopodidae) fishery in the Campeche Bank, Gulf of Mexico. *Revista de Biología Tropical*. **48**:323-331.
- Barmintseva, A. E. & N. S. Mugue. 2013. The Use of Microsatellite Loci for Identification of Sturgeon Species (Acipenseridae) and Hybrid Forms. *Animal Genetics* **49**:1093-1105.
- Barson, N. J., J. Cable, & C. Van Oosterhout. 2009. Population genetic analysis of microsatellite variation of guppies (*Poecilia reticulata*) in Trinidad and Tobago: evidence for a dynamic source-sink metapopulation structure, founder events and population bottlenecks. *J Evol Biol* **22**:485-497.
- Becker, B. J., L. A. Levin, F. J. Fodrie, & P. A. McMillan. 2007. Complex larval connectivity patterns among marine invertebrate populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:3267-3272.
- Belcari, P., D. Cuccu, M. Gonzalez, A. Srairi, & P. Vidoris. 2002. Distribution and abundance of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Cephalopoda : Octopoda) in the Mediterranean sea. *Scientia Marina* **66**:157-166.
- Berkes, F., R. Mahon, P. McConney, R. Pollnac, & R. Pomeroy. 2001. Managing small-scale fisheries, alternative directions and methods. International Development Research Centre, Ottawa.
- Bernardi, G., L. Findley, & A. Rocha-Olivares. 2003. Vicariance and dispersal across Baja California in disjunct marine fish populations. *Evolution* **57**:1599-1609.
- Bernardi, G. & J. Lape. 2005. Tempo and mode of speciation in the Baja California disjunct fish species *Anisotremus davidsonii*. *Mol Ecol* **14**:4085-4096.
- Bernt, M., A. Donath, F. Jühling, F. Externbrink, C. Florentz, G. Fritzsche, J. Pütz, M. Middendorf, & P. F. Stadler. 2013. MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **69**:313-319.
- Berry, S. S. 1953. Preliminary diagnoses of six west american species of octopus. *Leaflets in Malacology* **1**:51-58.

- Bonnaud, L., R. Boucher-Rodoni, & M. Monnerot. 1994. Phylogeny of decapod cephalopods based on partial 16S rDNA nucleotide sequences. *C R Acad Sci III* **317**:581-588.
- Bonnaud, L., R. Boucher-Rodoni, & M. Monnerot. 1997. Phylogeny of cephalopods inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* **7**:44-54.
- Boyle, P. R. & P. G. Rodhouse. 2005. *Cephalopods: ecology and fisheries*. Blackwell science, United Kingdom
- Boyle, P. R. & S. vonBoletzky. 1996. Cephalopod populations: Definition and dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **351**:985-1002.
- Bravo-Olivas, M. 2008. Aspectos reproductivos del pulpo *Octopus hubbsorum* Berry, 1953 en el parque nacional "Bahía de Loreto", Golfo de California. Instituto Politécnico Nacional, Mexico.
- Briggs, J. C. 1974. *Marine zoogeography*. McGraw-Hill, Inc., USA.
- Briggs, J. C. & B. W. Bowen. 2012. A realignment of marine biogeographic provinces with particular reference to fish distributions. *Journal of Biogeography* **39**:12-30.
- Briggs, J. C., B. W. Bowen, & C. McClain. 2013. Marine shelf habitat: biogeography and evolution. *Journal of Biogeography* **40**:1023-1035.
- Brown, E. R. & S. Piscopo. 2013. Synaptic plasticity in cephalopods; more than just learning and memory? *Invert Neurosci* **13**:35-44.
- Brusca, R. C. 1980. *Common intertidal invertebrates of the Gulf of California*. Second edition. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA.
- Brusca, R. C. 2010. *The Gulf of California: biodiversity and conservation*. The University of Arizona Press, USA.
- Brusca, R. C. & G. J. Brusca. 1990. *Invertebrates*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
- Burgess, S. C., E. A. Treml, & D. J. Marshall. 2012. How do dispersal costs and habitat selection influence realized population connectivity? *Ecology* **93**:1378-1387.
- Bushing, W. W. 1994. Biogeographic and ecological implications of kelp rafting as a dispersal vector for marine invertebrates. Pages 103-110 *in* *Proceedings of the Fourth California Islands Symposium: Update on the Status of Resources*. Santa Barbara Museum of Natural History, Santa Barbara, California
- Cabranes, C., P. Fernandez-Rueda, & J. L. Martinez. 2008. Genetic structure of *Octopus vulgaris* around the Iberian Peninsula and Canary Islands as indicated by microsatellite DNA variation. *ICES Journal of Marine Science* **65**:12-16.
- Carlini, D. B., R. E. Young, & M. Vecchione. 2001. A molecular phylogeny of the Octopoda (Mollusca: Cephalopoda) evaluated in light of morphological evidence. *Mol Phylogenet Evol* **21**:388-397.
- Carlsson, J. 2008. Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *J Hered* **99**:616-623.
- Castellanos-Martínez, S. 2008. Reproducción del pulpo *Octopus bimaculatus* Verrill, 1883 en bahía de los ángeles, baja california, méxico. Master. Instituto politécnico Nacional, La Paz B.C.S, Mexico.

- Casu, M., F. Maltagliati, M. Meloni, D. Casu, P. Cossu, G. Binelli, M. Curini-Galletti, & A. Castelli. 2002. Genetic structure of *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) from the Mediterranean Sea as revealed by a microsatellite locus. *Italian Journal of Zoology* **69**:295-300.
- CONAPESCA. 2014. Anuario estadístico de acuacultura y pesca 2013. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, México.
- Cornuet, J. M. & G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**:2001-2014.
- Cowen, R. K. 2002. Oceanographic influences on larval dispersal and retention and their consequences for population connectivity. Pages 149-170 *Coral Reef Fishes*. Academic Press, London, New York.
- Cowen, R. K., G. Gawarkiewicz, J. Pineda, S. R. Thorrold, & F. E. Werner. 2007. Population Connectivity in Marine Systems An Overview. *Oceanography* **20**:14-21.
- Cowen, R. K., K. M. M. Lwiza, S. Sponaugle, C. B. Paris, & D. B. Olson. 2000. Connectivity of marine populations: Open or closed? *Science* **287**:857-859.
- Cowen, R. K. & S. Sponaugle. 2009. Larval Dispersal and Marine Population Connectivity. *Annual Review of Marine Science* **1**:443-466.
- Cudney-Bueno, R., M. F. Lavin, S. G. Marinone, P. T. Raimondi, & W. W. Shaw. 2009. Rapid effects of marine reserves via larval dispersal. *PLoS One* **4**:e4140.
- Chapuis, M. P. & A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Biol Evol* **24**:621-631.
- Cheng, R., X. Zheng, X. Lin, J. Yang, & Q. Li. 2011. Determination of the complete mitochondrial DNA sequence of *Octopus minor*. *Molecular Biology Reports* **39**:3461-3470.
- Cheng, R., X. Zheng, Y. Ma, & Q. Li. 2013. The complete mitochondrial genomes of two octopods *Cistopus chinensis* and *Cistopus taiwanicus*: revealing the phylogenetic position of the genus *Cistopus* within the order Octopoda. *PLoS One* **8**:e84216.
- Dai, L., X. Zheng, L. Kong, & Q. Li. 2012. DNA barcoding analysis of Coleoidea (Mollusca: Cephalopoda) from Chinese waters. *Mol Ecol Resour* **12**:437-447.
- Darriba, D., G. L. Taboada, R. Doallo, & D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Meth* **9**:772-772.
- De Luca, D., G. Catanese, G. Fiorito, & G. Procaccini. 2014a. A new set of pure microsatellite loci in the common octopus *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 for multiplex PCR assay and their cross-amplification in *O. maya* Voss & Solís Ramírez, 1966. *Conservation Genetics Resources* **7**:299-301.
- De Luca, D., G. Catanese, G. Procaccini, & G. Fiorito. 2014c. An integration of historical records and genetic data to the assessment of global distribution and population structure in *Octopus vulgaris*. *Frontiers in Ecology and Evolution* **2**.
- De Silva-Dávila, R., C. Franco-Gordo, F. G. Hochberg, E. Godínez-Domínguez, R. Avendaño-Ibarra, J. Gómez-Gutiérrez, & C. J. Robinson. 2015. Cephalopod paralarval assemblages in the Gulf of California during 2004-2007. *Marine Ecology Progress Series* **520**:123-141.

- Di Rienzo, A., A. C. Peterson, J. C. Garza, A. M. Valdes, M. Slatkin, & N. B. Freimer. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:3166-3170.
- Domínguez-Contreras, J. F. 2011. Reproducción del pulpo *Octopus hubbsorum* Berry, 1953 en Bahía Magdalena, B.C.S, México. UNAM, Mexico, D.F.
- Domínguez-Contreras, J. F., B. P. Ceballos-Vázquez, F. G. Hochberg, & M. Arellano-Martínez. 2013. A new record in a well-established population of *Octopus hubbsorum* (Cephalopoda: Octopodidae) expands its known geographic distribution range and maximum size. *American Malacological Bulletin* **31**:95-99.
- Domínguez-Contreras, J. F., A. Munguía-Vega, B. P. Ceballos-Vázquez, M. Arellano-Martínez, & M. Culver. 2014. Characterization of microsatellite loci from two-spotted octopus *Octopus bimaculatus* Verrill 1883 from pyrosequencing reads. *Conservation Genetics Resources* **6**:465-468.
- Doubleday, Z. A., J. M. Semmens, A. J. Smolenski, & P. W. Shaw. 2009. Microsatellite DNA markers and morphometrics reveal a complex population structure in a merobenthic octopus species (*Octopus maorum*) in south-east Australia and New Zealand. *Marine Biology* **156**:1183-1192.
- Durazo, R. 2015. Seasonality of the transitional region of the California Current System off Baja California. *Journal of Geophysical Research: Oceans* **120**:1173-1196.
- Earl, D. A. & B. M. vonHoldt. 2011. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**:359-361.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* **5**:435-445.
- Evanno, G., S. Regnaut, & J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* **14**:2611-2620.
- Falush, D., M. Stephens, & J. K. Pritchard. 2003. Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**:1567-1587.
- FAO. 2015. The state of world fisheries and aquaculture, Food and Agriculture. Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Finkbeiner, E. M. & X. Basurto. 2015. Re-defining co-management to facilitate small-scale fisheries reform: An illustration from northwest Mexico. *Marine Policy* **51**:433-441.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, & R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* **3**:294-299.
- Forsythe, J. W. & R. T. Hanlon. 1988a. Behavior, body patterning and reproductive biology of *Octopus bimaculoides* from california. *Malacologia* **29**:41-55.
- Forsythe, J. W. & R. T. Hanlon. 1988h. Effect of Temperature on Laboratory Growth, Reproduction and Life-Span of *Octopus bimaculoides*. *Marine Biology* **98**:369-379.

- Froesch, D. & H. J. Marthy. 1975. The Structure and Function of the Oviducal Gland in Octopods (Cephalopoda). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **188**:95-101.
- Funes-Rodríguez, R., J. Gomez-Gutierrez, & R. Palomares-Garcia. 2007. Estudios ecologicos Bahia Magdalena. Instituto Politécnico Nacional, Mexico.
- Galleguillos, R., C. B. Canales-Aguirre, S. Ferrada, & A. Barrera. 2011. SSRs in *Octopus mimus*: development and characterization of nine microsatellite loci. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* **46**:491-494.
- García-Rodríguez, O. U. 2010. Biología reproductiva del pulpo *Octopus bimaculatus* (Verrill, 1883) en Bahía Sebastián Vizcaíno, Baja California Sur, México. . Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste, S. C., Mexico.
- Garcia-Vazquez, E., G. Machado-Schiaffino, D. Campo, & F. Juanes. 2012. Species misidentification in mixed hake fisheries may lead to overexploitation and population bottlenecks. *Fisheries Research* **114**:52-55.
- Garoia, F., I. Guarniero, A. Ramsak, N. Ungaro, M. Landi, C. Piccinetti, P. Mannini, & 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 (Edinb)* **93**:166-174.
- Gaxiola-Catro, G., B. E. Lavaniegos, A. Martínez, R. Castro, & T. L. Espinosa-Carreón. 2010. Pelagic ecosystem response to climate variability in the Pacific Ocean off Baja California. Page 486 in S. W. Simard and M. E. Austin, editors. *Climate Change and Variability*. Sciyo Books.
- Gillespie, R. G., B. G. Baldwin, J. M. Waters, C. I. Fraser, R. Nikula, & G. K. Roderick. 2012. Long-distance dispersal: a framework for hypothesis testing. *Trends Ecol Evol* **27**:47-56.
- González-Meléndez, M. 2012. Análisis cualitativo sobre el método de pesca para el pulpo de laguna Guerrero Negro, B. C. S., y sus implicaciones sociales. UABCS, La Paz B.C.S., México.
- Gotshall, D. W. 1998. Marine Animals of Baja California: A guide to the common fishes and invertebrates Baja California to Panama, Monterey, California.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity* **86**:485-486.
- Graham, M. H., J. A. Vasquez, & A. H. Buschmann. 2007. Global ecology of the giant kelp macrocystis: From ecotypes to ecosystems. *Oceanography and Marine Biology : an Annual Review* **45**:39-88.
- Grantham, B. A., G. L. Eckert, & A. L. Shanks. 2003. Dispersal potential of marine invertebrates in diverse habitats. *Ecological Applications* **13**:S108-S116.
- Greatorex, E. C., C. S. Jones, J. Murphy, L. N. Key, A. M. Emery, & P. R. Boyle. 2000. Microsatellite markers for investigating population structure in *Octopus vulgaris* (Mollusca: cephalopoda). *Mol Ecol* **9**:641-642.
- Guerra, Á., L. Allcock, & J. Pereira. 2010a. Cephalopod life history, ecology and fisheries: An introduction. *Fisheries Research* **106**:117-124.
- Guerra, Á., Á. Roura, Á. F. González, S. Pascual, Y. Cherel, & M. Pérez-Losada. 2010b. Morphological and genetic evidence that *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 inhabits Amsterdam and Saint Paul Islands (southern Indian Ocean). *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* **67**:1401-1407.

- Guindon, S. & O. Gascuel. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**:696-704.
- Hanlon, R. T. 1988. Behavioral and body patterning characters useful in taxonomy and field identification of cephalopods. *Malacologia* **29**:19.
- Hanlon, R. T. & J. B. Messenger. 1999. Cephalopods Behavior. *ICES Journal of Marine Science*, **56**:247-250.
- Hartl, D. L. & A. G. Clark. 1997. Principles of population genetics. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hendrickx, E. M., R. C. Brusca, & L. T. Findley. 2005. A distributional checklist of the macrofauna of the Gulf of California, Mexico. Part I. Invertebrates. Desert Museum and Conservation International, Arizona-Sonora.
- Higgins, K. L., J. M. Semmens, Z. A. Doubleday, & C. P. BurrIDGE. 2013. Life history matters: comparisons of population structuring in sympatric octopus species that differ in the presence of a pelagic larval stage. *Marine Ecology Progress Series* **486**:203-212.
- Hobday, A. J. 2000. Persistence and transport of fauna on drifting kelp (*Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh) rafts in the Southern California Bight. *J Exp Mar Bio Ecol* **253**:75-96.
- Hochberg, F. G. & W. G. Fields. 1980. Cephalopoda: the squids and octopuses. Pages 429-444 in M. H. Morris, D. P. Abbott, and E. C. Haderlie, editors. *Intertidal invertebrates of California*. Stanford University. Press, Stanford, California.
- Hofmeister, J., K. Voss, & C. White. 2015. Movement patterns of the California two spot octopus, *Octopus bimaculatus*, using acoustic telemetry. Page 270 in Y. Sakurai, editor. *Recent Advances in Cephalopod Science*. Cephalopod International Advisory Council Conference 2015, Hakodate, Japan.
- Holleley, C. E. & P. G. Geerts. 2009. Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *BioTechniques* **46**:511-517.
- Hunsicker, M. E., T. E. Essington, R. Watson, & U. R. Sumaila. 2010. The contribution of cephalopods to global marine fisheries: can we have our squid and eat them too? *Fish and Fisheries* **11**:421-438.
- Ibarra-García, L. E. 2012. Análisis de edad y crecimiento de *Octopus hubbsorum* (Berry, 1953) y *Octopus bimaculoides* (Pickford y McConnaughey, 1949) con lecturas de anillos de crecimiento en los estiletes. Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste, S. C., Mexico.
- Jackson, A. M., A. Munguía-Vega, R. Beldade, B. E. Erisman, & G. Bernardi. 2015. Incorporating historical and ecological genetic data for leopard grouper (*Mycteroperca rosacea*) into marine reserve design in the Gulf of California. *Conservation Genetics*.
- Jost, L. O. U. 2008. GST and its relatives do not measure differentiation. *Mol Ecol* **17**:4015-4026.
- Jost, L. O. U. 2009. D vs. GST: response to Heller and Siegismund (2009) and Ryman and Leimar (2009). *Mol Ecol* **18**:2088-2091.
- Juárez, O. E. 2012. Phylogenetic relationships of *Octopus maya* revealed by mtDNA sequences. *Ciencias Marinas* **38**:563-575.

- Juárez, O. E., C. Rosas, & L. Arena. 2010. Heterologous microsatellites reveal moderate genetic structure in the *Octopus maya* population. *Fisheries Research* **106**:209-213.
- Juárez, O. E., C. Rosas, L. Arena, L. Enríquez, F. Camarena, N. McKeown, & P. W. Shaw. 2013. Characterization of microsatellite loci developed for the Mexican four-eyed octopus *Octopus maya*. *Conservation Genetics Resources* **5**:803-805.
- Jurado-Molina, J. 2010. A Bayesian framework with implementation error to improve the management of the red octopus (*Octopus maya*) fishery off the Yucatán Peninsula. *Ciencias Marinas* **36**:1-14.
- Kalinowski, S. T. 2004. Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation Genetics* **5**:539-543.
- Kalinowski, S. T. 2005. HP-rare: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity. *Molecular Ecology Notes* **5**.
- Kang, J. H., Y. K. Kim, J. Y. Park, C. M. An, & J. C. Jun. 2012. Development of microsatellite markers to genetically differentiate populations of *Octopus minor* from Korea and China. *Mol Biol Rep* **39**:8277-8286.
- Katsanevakis, S. & G. Verriopoulos. 2006. Seasonal population dynamics of *Octopus vulgaris* in the eastern Mediterranean. *ICES Journal of Marine Science* **63**:151-160.
- Kerstitch, A. & H. Bertsch. 2007. Sea of Cortez Marine Invertebrates. Second (revised) edition. Sea Challengers, Monterey, California.
- Kopelman, N. M., J. Mayzel, M. Jakobsson, N. A. Rosenberg, & I. Mayrose. 2015. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol Ecol Resour*.
- Kroger, B., J. Vinther, & D. Fuchs. 2011. Cephalopod origin and evolution: A congruent picture emerging from fossils, development and molecules: Extant cephalopods are younger than previously realised and were under major selection to become agile, shell-less predators. *Bioessays* **33**:602-613.
- Lankford, R. R. 1977. COASTAL LAGOONS OF MEXICO THEIR ORIGIN AND CLASSIFICATION. Pages 182-215 in M. Wiley, editor. *Estuarine Processes*. Academic Press.
- Larson, S., C. Ramsay, & J. Cosgrove. 2015. Multiple paternity and preliminary population genetics of giant pacific octopuses, *Enteroctopus dofleini*, in oregon, washington and the southeast coast of vancouver island, bc. *Diversity* **7**:195-205.
- Lavin, M. F. & S. G. Marinone. 2003. An overview of the physical oceanography of the gulf of California. Pages 173-204 *Nonlinear Processes in Geophysical Fluid Dynamics*.
- Leite, T. S., M. Haimovici, W. Molina, & K. Warnke. 2008. Morphological and genetic description of *Octopus insularis*, a new cryptic species in the *Octopus vulgaris* complex (Cephalopoda : Octopodidae) from the tropical southwestern Atlantic. *Journal of Molluscan Studies* **74**:63-74.
- Loman, N. J., R. V. Misra, T. J. Dallman, C. Constantinidou, S. E. Gharbia, J. Wain, & M. J. Pallen. 2012. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol* **30**:434-439.

- Lopez-Duarte, P. C., H. S. Carson, G. S. Cook, F. J. Fodrie, B. J. Becker, C. Dibacco, & L. A. Levin. 2012. What controls connectivity? An empirical, multi-species approach. *Integr Comp Biol* **52**:511-524.
- López-Peraza, D. J., M. Hernández-Rodríguez, & B. Barón-Sevilla. 2014. Ontogeny of the digestive system of the *Octopus bimaculatus* paralarvae (Verrill, 1883). *SpringerPlus* **3**:1-10.
- López-Rocha, J. A., M. Arellano-Martínez, B. P. Ceballos-Vázquez, I. Velázquez-Abunader, S. Castellanos-Martínez, & E. Torreblanca-Ramírez. 2012. Use of length-frequency analysis for growth estimation of the California two-spotted octopus *Octopus bimaculatus* Verrill 1883 of the Gulf of California. *Journal of Shellfish Research* **31**:1173-1181.
- López-Uriarte, E. & E. Ríos-Jara. 2010. Diet and feeding habitats of *Octopus hubbsorum* Berry, 1953 in the central Mexican Pacific. *The Veliger* **51**:26-42.
- López-Uriarte, E., E. Ríos-Jara, & M. Pérez-Peña. 2005. Range extension for *Octopus hubbsorum* (Cephalopoda: Octopodidae) in the Mexican Pacific. *Bulletin of Marine Science* **77**:9.
- Lüning, K. & I. Dieck. 1990. The Distribution and Evolution of the Laminariales: North Pacific — Atlantic Relationships. Pages 187-204 in D. Garbary and G. R. South, editors. *Evolutionary Biogeography of the Marine Algae of the North Atlantic*. Springer Berlin Heidelberg.
- Lluch-Cota, S. E., E. A. Aragón-Noriega, F. Arreguín-Sánchez, D. Auriolles-Gamboa, J. Jesús Bautista-Romero, R. C. Brusca, R. Cervantes-Duarte, R. Cortés-Altamirano, P. Del-Monte-Luna, A. Esquivel-Herrera, G. Fernández, M. E. Hendrickx, S. Hernández-Vázquez, H. Herrera-Cervantes, M. Kahru, M. Lavín, D. Lluch-Belda, D. B. Lluch-Cota, J. López-Martínez, S. G. Marinone, M. O. Nevárez-Martínez, S. Ortega-García, E. Palacios-Castro, A. Parés-Sierra, G. Ponce-Díaz, M. Ramírez-Rodríguez, C. A. Salinas-Zavala, R. A. Schwartzlose, & A. P. Sierra-Beltrán. 2007. The Gulf of California: Review of ecosystem status and sustainability challenges. *Progress in Oceanography* **73**:1-26.
- Marinone, S. G. 2003. A three-dimensional model of the mean and seasonal circulation of the Gulf of California. *Journal of Geophysical Research* **108**.
- Marinone, S. G. 2012. Seasonal surface connectivity in the Gulf of California. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **100**:133-141.
- Marinone, S. G., M. F. Lavin, & A. Pares-Sierra. 2011. A quantitative characterization of the seasonal Lagrangian circulation of the Gulf of California from a three-dimensional numerical model. *Continental Shelf Research* **31**:1420-1426.
- Marinone, S. G., M. J. Ulloa, A. Pares-Sierra, M. F. Lavin, & R. Cudney-Bueno. 2008. Connectivity in the northern Gulf of California from particle tracking in a three-dimensional numerical model. *Journal of Marine Systems* **71**:149-158.
- Marko, P. B., S. C. Lee, A. M. Rice, J. M. Gramling, T. M. Fitzhenry, J. S. McAlister, G. R. Harper, & A. L. Moran. 2004. Fisheries: mislabelling of a depleted reef fish. *Nature* **430**:309-310.
- Mathger, L. M., E. J. Denton, N. J. Marshall, & R. T. Hanlon. 2009. Mechanisms and behavioural functions of structural coloration in cephalopods. *J R Soc Interface* **6 Suppl 2**:S149-163.

- Meglécz, E., C. Costedoat, V. Dubut, A. Gilles, T. Malausa, N. Pech, & J.-F. Martin. 2010. QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics* **26**:403-404.
- Meirmans, P. G. & P. H. Van Tienderen. 2004. genotype and genodive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes* **4**:792-794.
- Moghadam, H. Y., H. Zolgharnein, M. A. Aliabadi, S. Keyvanshokoo, & M. Modarresi. 2015. Genetic analysis of cuttlefish *Sepia pharaonis* (Ehrenberg, 1831) population in Persian Gulf with microsatellites. *Journal of Shellfish Research* **34**:1-5.
- Moreira, A. A., A. R. G. Tomás, & A. W. S. Hilsdorf. 2011. Evidence for genetic differentiation of *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) fishery populations from the southern coast of Brazil as revealed by microsatellites. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **407**:34-40.
- Moreno-Báez, M., R. Cudney-Bueno, B. J. Orr, W. W. Shaw, T. Pfister, J. Torre-Cosio, R. Loaiza, & M. Rojo. 2012. Integrating the spatial and temporal dimensions of fishing activities for management in the northern Gulf of California, Mexico. *Ocean & Coastal Management* **55**:111-127.
- Munguía-Vega, A., M. Culver, F. J. García de Leon, R. Rodríguez-Estrella, & T. Pfister. 2010. Next generation Microsatellite discovery by shotgun genomic pyrosequencing. PANGAS. Reporte Interno, Tucson, AZ.
- Munguía-Vega, A., A. Jackson, S. G. Marinone, B. Erisman, M. Moreno-Baez, A. Giron-Nava, T. Pfister, O. Aburto-Oropeza, & J. Torre. 2014. Asymmetric connectivity of spawning aggregations of a commercially important marine fish using a multidisciplinary approach. *PeerJ* **2**:e511.
- Munguía-Vega, A., I. Leyva-Valencia, D. B. Lluch-Cota, & P. Cruz-Hernandez. 2015a. Genetic Structure of the Cortes Geoduck *Panopea globosa* Dall, 1898, from the Mexican Northwest. *Journal of Shellfish Research* **34**:153-161.
- Munguía-Vega, A., J. Torre, P. Turk-Boyer, S. G. Marinone, M. F. Lavín, T. Pfister, W. Shaw, G. Danemann, P. Raimondi, A. Castillo-López, A. Cinti, J. N. Duberstein, M. Moreno-Báez, M. Rojo, G. Soria, L. Sánchez-Velasco, H. N. Morzaria-Luna, L. Bourillón, K. Rowell, & R. Cudney-Bueno. 2015h. PANGAS: An Interdisciplinary Ecosystem-Based Research Framework for Small-Scale Fisheries in the Northern Gulf of California. *Journal of the Southwest* **57**:337-390.
- Murphy, J. M., E. Baguerias, L. N. Key, & P. R. Boyle. 2002. Microsatellite DNA markers discriminate between two *Octopus vulgaris* (Cephalopoda : Octopoda) fisheries along the northwest African coast. *Bulletin of Marine Science* **71**:545-553.
- Norman, M. D., J. K. Finn, & F. G. Hochberg. 2014. Family Octopodidae. Pages 36-215 in P. Jereb, C. F. E. Roper, M. D. Norman, and J. K. Finn, editors. *Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date*. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes, Rome, FAO.
- Norman, M. D. & F. G. Hochberg. 2005. The current state of octopus taxonomy. *Phuket mar. biol. Cent. Res. Bull.* **66**:28.

- Oosthuizen, A., M. Jiwaji, & P. Shaw. 2004. Genetic analysis of the *Octopus vulgaris* population on the coast of South Africa. *South African Journal of Science* **100**:603-607.
- Palumbi, S. R., A. P. Martin, S. L. Romano, W. O. McMillan, L. Stacey, & G. Grabowski. 1991. *The Simple Fool's Guide to PCR*. Department of Zoology Special Publication, University of Hawaii, Honolulu.
- Pauly, D., V. Christensen, S. Guenette, T. J. Pitcher, U. R. Sumaila, C. J. Walters, R. Watson, & D. Zeller. 2002. Towards sustainability in world fisheries. *Nature* **418**:689-695.
- Peakall, R. & P. Smouse. 2012. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*.
- Peguero-Icaza, M., L. Sanchez-Velasco, M. F. Lavin, S. G. Marinone, & E. Beier. 2010. Seasonal changes in connectivity routes among larval fish assemblages in a semi-enclosed sea (Gulf of California). *Journal of Plankton Research* **33**:517-533.
- Perez-Losada, M., A. Guerra, G. R. Carvalho, A. Sanjuan, & P. W. Shaw. 2002a. Extensive population subdivision of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda) around the Iberian Peninsula indicated by microsatellite DNA variation. *Heredity (Edinb)* **89**:417-424.
- Perez-Losada, M. P., A. Guerra, & A. Sanjuan. 2002b. Allozyme divergence supporting the taxonomic separation of *Octopus mimus* and *Octopus maya* from *Octopus vulgaris* (Cephalopoda : Octopoda). *Bulletin of Marine Science* **71**:653-664.
- Pickford, G. E. & B. H. MacConnaughey. 1949. *The Octopus bimaculatus* problem: a study in sibling species. Peabody Museum of Natural History, Yale University.
- Pierce, G. J. & A. Guerra. 1994. Stock Assessment Methods Used for Cephalopod Fisheries. *Fisheries Research* **21**:255-285.
- Piertney, S. B., C. Hudelot, F. G. Hochberg, & M. A. Collins. 2003. Phylogenetic relationships among cirrate octopods (Mollusca: Cephalopoda) resolved using mitochondrial 16S ribosomal DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **27**:348-353.
- Pineda, J. 2000. Linking larval settlement to larval transport: Assumptions, potentials, and pitfalls.
- Pineda, J., J. A. Hare, & S. Sponaugle. 2007. Larval transport and dispersal in the coastal ocean and consequences for population connectivity. *Oceanography* **20**:22-39.
- Pinsky, M. L. & S. R. Palumbi. 2014. Meta-analysis reveals lower genetic diversity in overfished populations. *Mol Ecol* **23**:29-39.
- Piry, S., G. Luikart, & J. M. Cornuet. 1999. Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *Journal of Heredity* **90**:502-503.
- Pliego-Cárdenas, R. 2015. Caracterización genética, morfológica y relaciones filogenéticas de la familia Octopodidae del Pacífico mexicano. Ph. D. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, Mexico.
- Pliego-Cárdenas, R., F. A. García-Domínguez, B. P. Ceballos-Vázquez, M. Villalejo-Fuerte, & M. Arellano-Martínez. 2011. Reproductive aspects of *Octopus*

- hubbsorum* (Cephalopoda: Octopodidae) from Espíritu Santo Island, southern Gulf of California, Mexico. *Ciencias Marinas* **37**:23-32.
- Pliego-Cárdenas, R., F. G. Hochberg, F. J. G. D. León, & I. D. L. A. Barriga-Sosa. 2014. Close Genetic Relationships between Two American Octopuses: *Octopus hubbsorum* Berry, 1953, and *Octopus mimus* Gould, 1852. *Journal of Shellfish Research* **33**:293-303.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, & P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**:945-959.
- Queller, D. C. & K. F. Goodnight. 1989. Estimating Relatedness Using Genetic-Markers. *Evolution* **43**:258-275.
- Quinteiro, J., T. Baibai, L. Oukhattar, A. Soukri, P. Seixas, & M. Rey-Mendez. 2011. Multiple paternity in the common octopus *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797), as revealed by microsatellite DNA analysis. *Molluscan Research* **31**:15-20.
- Rafajlovic, M., A. Eriksson, A. Rimark, S. Hintz-Saltin, G. Charrier, M. Panova, C. Andre, K. Johannesson, & B. Mehlig. 2013. The effect of multiple paternity on genetic diversity of small populations during and after colonisation. *PLoS One* **8**:e75587.
- Rannala, B. & Z. Yang. 2008. Phylogenetic inference using whole genomes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **9**:217-231.
- Rasmussen, R. S. & M. T. Morrissey. 2008. DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **7**:280-295.
- Raymond, M. & F. Rousset. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**:248-249.
- Reichow, D. & M. J. Smith. 1999. Highly Variable Microsatellites in the California Market Squid *Loligo opalescens*. *Mar Biotechnol* (NY) **1**:403-406.
- Rice, R. W. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**:223-225.
- Riginos, C., K. E. Douglas, Y. Jin, D. F. Shanahan, & E. A. Treml. 2011. Effects of geography and life history traits on genetic differentiation in benthic marine fishes. *Ecography* **34**:566-575.
- Riginos, C. & M. W. Nachman. 2001. Population subdivision in marine environments: the contributions of biogeography, geographical distance and discontinuous habitat to genetic differentiation in a blennioid fish, *Axoclinus nigricaudus*. *Mol Ecol* **10**:1439-1453.
- Rocha, F., A. Guerra, & A. F. Gonzalez. 2001. A review of reproductive strategies in cephalopods. *Biol Rev Camb Philos Soc* **76**:291-304.
- Rodhouse, P. G. 2010. Effects of environmental variability and change on cephalopod populations: an Introduction to the CIAC '09 Symposium special issue. *ICES Journal of Marine Science* **67**:1311-1313.
- Rodhouse, P. G. K., G. J. Pierce, O. C. Nichols, W. H. H. Sauer, A. I. Arkhipkin, V. V. Laptikhovsky, M. R. Lipiński, J. E. Ramos, M. Gras, H. Kidokoro, K. Sadayasu, J. Pereira, E. Lefkaditou, C. Pita, M. Gasalla, M. Haimovici, M. Sakai, & N. Downey. 2014. Chapter Two - Environmental Effects on Cephalopod Population Dynamics: Implications for Management of Fisheries. Pages 99-233 in A. G. V. Erica, editor. *Advances in Marine Biology*. Academic Press.
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Hohna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, & J. P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2:

- efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* **61**:539-542.
- Roper, C. F. E., M. J. Sweeney, & F. G. Hochberg. 1995. Cefalópodos. Pages 305-353. *in* W. Fischer, F. Krup, W. Schneider, C. Sommer, C. K. E, and V. H. Niem, editors. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro-Oriental. FAO, Roma.
- Routtu, J., A. Hoikkala, & M. Kankare. 2007. Microsatellite-based species identification method for *Drosophila virilis* group species. *Hereditas* **144**:213-221.
- Saenz-Agudelo, P., G. P. Jones, S. R. Thorrold, & S. Planes. 2012. Patterns and persistence of larval retention and connectivity in a marine fish metapopulation. *Mol Ecol* **21**:4695-4705.
- Sales, J. B. D. L., P. S. D. Rego, A. W. S. Hilsdorf, A. A. Moreira, M. Haimovici, A. R. Tomás, B. B. Batista, R. A. Marinho, U. Markaida, H. Schneider, & I. Sampaio. 2013. Phylogeographical Features of *Octopus vulgaris* and *Octopus insularis* in the Southeastern Atlantic Based on the Analysis of Mitochondrial Markers. *Journal of Shellfish Research* **32**:325-339.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* **18**:233-234.
- Selkoe, K. A. & R. J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett* **9**:615-629.
- Shaw, P. W. 2002. Past, present and future applications of DNA-based markers in cephalopod biology: workshop report. *Bulletin of Marine Science* **71**:67-78.
- Shaw, P. W., A. I. Arkhipkin, G. Adcock, W. Burnett, G. R. Carvalho, J. Scherbich, & P. Villegas. 2004. DNA markers indicate that distinct spawning cohorts and aggregations of Patagonian squid, *Loligo gahi*, do not represent genetically discrete subpopulations. *Mar Biol* **144**:961-970.
- Shaw, P. W., L. Hendrickson, N. J. McKeown, T. Stonier, M. J. Naud, & W. H. H. Sauer. 2010. Discrete spawning aggregations of loliginid squid do not represent genetically distinct populations. *Marine Ecology Progress Series* **408**:117-127.
- Sinn, D. L. 2008. Patterns of activity cycles in juvenile California two-spot octopuses (*Octopus bimaculoides*). *American Malacological Bulletin* **24**:65-69.
- Soller, R., K. Warnke, U. Saint-Paul, & D. Blohm. 2000. Sequence divergence of mitochondrial DNA indicates cryptic biodiversity in *Octopus vulgaris* and supports the taxonomic distinctiveness of *Octopus mimus* (Cephalopoda : Octopodidae). *Marine Biology* **136**:29-35.
- Soria, G., A. Munguía-Vega, S. G. Marinone, M. Moreno-Báez, I. Martínez-Tovar, & R. Cudney-Bueno. 2012. Linking bio-oceanography and population genetics to assess larval connectivity. *Marine Ecology Progress Series* **463**:159-175.
- Soria, G., J. Torre-Cosio, A. Munguía-Vega, S. G. Marinone, M. F. Lavín, A. Cinti, & M. Moreno-Báez. 2014. Dynamic connectivity patterns from an insular marine protected area in the Gulf of California. *Journal of Marine Systems* **129**:248-258.
- Sosa, I. D. B., K. Beckenbach, B. Hartwick, & M. J. Smith. 1995. The molecular phylogeny of five eastern north Pacific octopus species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **4**:163-174.

- Spalding, M. D., H. E. Fox, B. S. Halpern, M. A. McManus, J. Molnar, G. R. Allen, N. Davidson, Z. A. Jorge, A. L. Lombana, S. A. Lourie, K. D. Martin, E. McManus, J. Molnar, C. A. Recchia, & J. Robertson. 2007. Marine ecoregions of the world: A bioregionalization of coastal and shelf areas. *BioScience* **57**:573-583.
- Stoskopf, M. K. & B. S. Oppenheim. 1996. Anatomic Features of *Octopus bimaculoides* and *Octopus digueti*. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **27**:1-18.
- Strugnell, J., M. Norman, J. Jackson, A. J. Drummond, & A. Cooper. 2005. Molecular phylogeny of coleoid cephalopods (Mollusca: Cephalopoda) using a multigene approach; the effect of data partitioning on resolving phylogenies in a Bayesian framework. *Mol Phylogenet Evol* **37**:426-441.
- Strugnell, J. M., A. L. Allcock, & P. C. Watts. 2009a. Microsatellite loci from the endemic Southern Ocean octopus *Adelieledone polymorpha* (Robson, 1930). *Mol Ecol Resour* **9**:1068-1070.
- Strugnell, J. M., A. L. Allcock, & P. C. Watts. 2009b. A panel of microsatellite loci from two species of octopus, *Pareledone turqueti* (Joubin, 1905) and *Pareledone charcoti* (Joubin, 1905). *Mol Ecol Resour* **9**:1239-1242.
- Szpiech, Z. A. & N. A. Rosenberg. 2011. On the size distribution of private microsatellite alleles. *Theor Popul Biol* **80**:100-113.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, & S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**:2725-2729.
- Terry, A., G. Bucciarelli, & G. Bernardi. 2000. Restricted gene flow and incipient speciation in disjunct Pacific Ocean and Sea of Cortez populations of a reef fish species, *Girella nigricans*. *Evolution* **54**:652-659.
- Teske, P. R., A. Oosthuizen, I. Papadopoulos, & N. P. Barker. 2007. Phylogeographic structure of *Octopus vulgaris* in South Africa revisited: identification of a second lineage near Durban harbour. Pages 2119-2122 *Marine Biology*.
- Thiel, M. & L. Gutow. 2005. The ecology of rafting in the marine environment. II. The rafting organisms and community. *Oceanography and Marine Biology - an Annual Review*, Vol. 43 **43**:279-418.
- Thomas, L. & J. J. Bell. 2013. Testing the consistency of connectivity patterns for a widely dispersing marine species. *Heredity (Edinb)* **111**:345-354.
- Torreblanca-Ramirez, E. 2011. Propuesta de Plan de Manejo Pesquero del Pulpo en el Norte del Golfo de California., CEDO-COBI, Guaymas, Sonora, México.
- Toussaint, R. K., G. K. Sage, S. L. Talbot, & D. Scheel. 2012. Microsatellite marker isolation and development for the giant Pacific octopus (*Enteroctopus dofleini*). *Conservation Genetics Resources* **4**:545-548.
- Trembl, E. A., J. J. Roberts, Y. Chao, P. N. Halpin, H. P. Possingham, & C. Riginos. 2012. Reproductive output and duration of the pelagic larval stage determine seascape-wide connectivity of marine populations. *Integr Comp Biol* **52**:525-537.
- Van Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills, & P. Shipley. 2004. micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**:535-538.
- Vanhaecke, D., C. Garcia de Leaniz, G. Gajardo, K. Young, J. Sanzana, G. Orellana, D. Fowler, P. Howes, C. Monzon-Aguello, & S. Consuegra. 2012. DNA

- barcoding and microsatellites help species delimitation and hybrid identification in endangered galaxiid fishes. *PLoS One* **7**:e32939.
- Verrill, A. E. 1883. Descriptions of two species of *Octopus* from California. Pages 117-124. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College*, Cambridge.
- Vidal, E. A. G., R. Villanueva, J. P. Andrade, I. G. Gleadall, J. Iglesias, N. Koueta, C. Rosas, S. Segawa, B. Grasse, R. M. Franco-Santos, C. B. Albertin, C. Caamal-Monsreal, M. E. Chimal, E. Edsinger-Gonzales, P. Gallardo, C. Le Pabic, C. Pascual, K. Roumbedakis, & J. Wood. 2014. Chapter One - Cephalopod Culture: Current Status of Main Biological Models and Research Priorities. Pages 1-98 in A. G. V. Erica, editor. *Advances in Marine Biology*. Academic Press.
- Villanueva, R. & M. D. Norman. 2008. Biology of the planktonic stages of benthic octopuses. Pages 105-202 in R. N. Gibson, R. J. A. Atkinson, and J. D. M. Gordon, editors. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*. CRC Press.
- Villegas, E. J. A., B. P. Ceballos-Vázquez, U. Markaida, A. Abitia-Cárdenas, M. A. Medina-López, & M. Arellano-Martínez. 2014. Diet of *Octopus bimaculatus* Verrill, 1883 (Cephalopoda: Octopodidae) in Bahía De Los Ángeles, Gulf of California. *Journal of Shellfish Research* **33**:305-314.
- Voight, J. R. 1988. Trans-panamanian genimate octopods (MOLLUSCA: OCTOPODA). *Malacologia* **29**:289-294.
- Voight, J. R. & K. A. Feldheim. 2009. Microsatellite inheritance and multiple paternity in the deep-sea octopus *Graneledone boreopacifica* (Mollusca: Cephalopoda). *Invertebrate Biology* **128**:26-30.
- Ward, R. D. 2000. Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia* **420**:191-201.
- Warnke, K., R. Söller, D. Blohm, & U. Saint-Paul. 2004. A new look at geographic and phylogenetic relationships within the species group surrounding *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda): indications of very wide distribution from mitochondrial DNA sequences. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **42**:306-312.
- Watson, R. & D. Pauly. 2001. Systematic distortion in world fisheries catch trends. *Nature* **414**:534-536.
- Wilson, G. A. & B. Rannala. 2003. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* **163**:1177-1191.
- Williams, R. C., B. C. Jackson, L. Duvaux, D. A. Dawson, T. Burke, & W. Sinclair. 2015. The genetic structure of *Nautilus pompilius* populations surrounding Australia and the Philippines. *Mol Ecol* **24**:3316-3328.
- Yang, Z. & B. Rannala. 2012. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nat Rev Genet* **13**:303-314.
- Young, R. E. & M. Vecchione. 1996. Analysis of morphology to determine primary sister-taxon relationships within coleoid cephalopods. *American Malacological Bulletin* **12**:91-112.
- Zamacona-Mora, P. 2015. Estimación de edad y crecimiento de *Octopus bimaculoides* (PICKFORD Y MCONNAUGHEY, 1949) con base en la lectura de marcas de crecimiento en picos. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR, Mexico.

- Zaytsev, O., R. Cervantes-Duarte, O. Montante, & A. Gallegos-Garcia. 2003. Coastal upwelling activity on the pacific shelf of the Baja California Peninsula. *Journal of Oceanography* **59**:489-502.
- Zuo, Z., X. Zheng, C. Liu, & Q. Li. 2011. Development and characterization of 17 polymorphic microsatellite loci in *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797. *Conservation Genetics Resources* **4**:367-369.

Apéndices

Apéndice A. Desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (probabilidad y significancia) y prueba de alelos nulos por medio de expectativa de maximización de 20 localidades con 7 loci microsatélites. claves: ns=no significativo, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

Población	Locus	EM	probabilidad	Significancia
Ejido Erendira	ocbi25	0.000	0.109	ns
	ocbi35	0.000	0.749	ns
	ocbi39	0.000	0.000	***
	ocbi41	0.000	0.003	**
	ocbi47	0.000	0.633	ns
	ocbi48	0.000	0.882	ns
	ocbi50	0.000	0.826	ns
Media		0.000	0.457	
Error Estándar		0.000		
San Quintín	ocbi25	0.000	0.549	ns
	ocbi35	0.000	0.655	ns
	ocbi39	0.172	0.067	ns
	ocbi41	0.070	0.724	ns
	ocbi47	0.265	0.039	*
	ocbi48	0.000	0.708	ns
	ocbi50	0.000	0.660	ns
Media		0.072	0.486	
Error Estándar		0.040		
Bahía Magdalena	ocbi25	0.038	0.014	*
	ocbi35	0.000	0.497	ns
	ocbi39	0.000	0.141	ns
	ocbi41	0.000	0.003	**
	ocbi47	0.000	0.218	ns
	ocbi48	0.000	0.725	ns
	ocbi50	0.000	0.451	ns
Media		0.005	0.293	
Error Estándar		0.005		
La Bocana	ocbi25	0.000	0.890	ns
	ocbi35	0.000	0.704	ns
	ocbi39	0.001	0.172	ns
	ocbi41	0.000	0.641	ns
	ocbi47	0.000	0.680	ns
	ocbi48	0.000	0.247	ns
	ocbi50	0.000	0.172	ns
Media		0.000	0.501	
Error Estándar		0.000		
Las Barrancas	ocbi25	0.000	0.371	ns
	ocbi35	0.000	0.679	ns
	ocbi39	0.000	0.357	ns
	ocbi41	0.000	0.641	ns
	ocbi47	0.001	0.382	ns
	ocbi48	0.083	0.558	ns
	ocbi50	0.001	0.019	*
Media		0.012	0.430	
Error Estándar		0.012		
El Conejo	ocbi25	0.054	0.439	ns
	ocbi35	0.000	0.352	ns
	ocbi39	0.072	0.744	ns
	ocbi41	0.000	0.199	ns
	ocbi47	0.000	0.066	ns
	ocbi48	0.000	0.257	ns
	ocbi50	0.001	Monomórfico	
Media		0.018	0.343	
Error Estándar		0.012		

Malarrimo	ocbi25	0.033	0.494	ns
	ocbi35	0.000	0.759	ns
	ocbi39	0.102	0.003	**
	ocbi41	0.000	0.924	ns
	ocbi47	0.000	0.831	ns
	ocbi48	0.032	0.676	ns
	ocbi50	0.045	0.000	***
Media		0.030	0.527	
Error Estándar		0.014		
Puerto Peñasco	ocbi25	0.000	0.393	ns
	ocbi35	0.000	0.906	ns
	ocbi39	0.000	0.467	ns
	ocbi41	0.000	0.904	ns
	ocbi47	0.000	0.892	ns
	ocbi48	0.000	0.211	ns
	ocbi50	0.000	1.000	ns
Media		0.000	0.682	
Error Estándar		0.000		
San Luis Gonzaga	ocbi25	0.000	0.937	ns
	ocbi35	0.000	0.670	ns
	ocbi39	0.000	0.263	ns
	ocbi41	0.000	0.312	ns
	ocbi47	0.000	0.809	ns
	ocbi48	0.010	0.661	ns
	ocbi50	0.001	Monomórfico	
Media		0.002	0.609	
Error Estándar		0.001		
Puerto Refugio	ocbi25	0.005	0.319	ns
	ocbi35	0.000	0.973	ns
	ocbi39	0.127	0.689	ns
	ocbi41	0.000	0.409	ns
	ocbi47	0.000	0.781	ns
	ocbi48	0.220	0.003	**
	ocbi50	0.103	0.089	ns
Media		0.065	0.466	
Error Estándar		0.033		
Isla Smith	ocbi25	0.000	0.846	ns
	ocbi35	0.000	0.969	ns
	ocbi39	0.027	0.007	**
	ocbi41	0.000	0.933	ns
	ocbi47	0.000	0.637	ns
	ocbi48	0.000	0.871	ns
	ocbi50	0.000	0.968	ns
Media		0.004	0.747	
Error Estándar		0.004		
Bahía de los Ángeles	ocbi25	0.000	0.410	ns
	ocbi35	0.000	0.086	ns
	ocbi39	0.255	0.021	*
	ocbi41	0.000	0.788	ns
	ocbi47	0.000	0.853	ns
	ocbi48	0.158	0.239	ns
	ocbi50	0.000	0.000	***
Media		0.059	0.343	
Error Estándar		0.039		
Puerto Lobos	ocbi25	0.000	0.792	ns
	ocbi35	0.089	0.036	*
	ocbi39	0.073	0.387	ns
	ocbi41	0.015	0.477	ns
	ocbi47	0.000	0.010	*
	ocbi48	0.000	0.566	ns
	ocbi50	0.165	0.000	***
Media		0.049	0.324	

Error Estándar		0.024		
Puerto Libertad	ocbi25	0.006	0.408	ns
	ocbi35	0.000	0.282	ns
	ocbi39	0.157	0.037	*
	ocbi41	0.000	0.000	***
	ocbi47	0.083	0.042	*
	ocbi48	0.064	0.002	**
	ocbi50	0.000	1.000	ns
Media		0.044	0.253	
Error Estándar		0.023		
Isla san Lorenzo	ocbi25	0.000	0.532	ns
	ocbi35	0.000	0.996	ns
	ocbi39	0.000	0.494	ns
	ocbi41	0.000	0.798	ns
	ocbi47	0.165	0.000	***
	ocbi48	0.167	0.010	*
	ocbi50	0.001	Monomórfico	
Media		0.048	0.472	
Error Estándar		0.031		
Isla Tiburon	ocbi25	0.078	0.899	ns
	ocbi35	0.000	0.885	ns
	ocbi39	0.095	0.002	**
	ocbi41	0.062	0.000	***
	ocbi47	0.111	0.488	ns
	ocbi48	0.148	0.009	**
	ocbi50	0.263	0.000	***
Media		0.108	0.326	
Error Estándar		0.031		
Isla el Datil	ocbi25	0.000	0.387	ns
	ocbi35	0.000	0.532	ns
	ocbi39	0.000	0.532	ns
	ocbi41	0.000	0.861	ns
	ocbi47	0.000	0.387	ns
	ocbi48	0.000	0.861	ns
	ocbi50	0.001	0.423	ns
Media		0.000	0.569	
Error Estándar		0.000		
Bahía Kino	ocbi25	0.000	0.162	ns
	ocbi35	0.000	0.925	ns
	ocbi39	0.136	0.588	ns
	ocbi41	0.000	0.003	**
	ocbi47	0.000	0.000	***
	ocbi48	0.007	0.393	ns
	ocbi50	0.000	0.762	ns
Media		0.021	0.405	
Error Estándar		0.019		
Isla San Pedro Martir	ocbi25	0.315	0.083	ns
	ocbi35	0.000	0.532	ns
	ocbi39	0.000	0.532	ns
	ocbi41	0.001	Monomórfico	
	ocbi47	0.001	0.261	ns
	ocbi48	0.176	0.343	ns
	ocbi50	0.001	Monomórfico	
Media		0.070	0.350	
Error Estándar		0.048		
Santa Rosalia	ocbi25	0.000	0.239	ns
	ocbi35	0.000	0.966	ns
	ocbi39	0.111	0.346	ns
	ocbi41	0.000	0.028	*
	ocbi47	0.000	0.628	ns
	ocbi48	0.000	0.846	ns
	ocbi50	0.000	0.850	ns

Media	0.016	0.558
Error Estándar	0.016	

Apéndice B. Diferenciación genética pareada con y sin corrección por alelos nulos. Arriba de la diagonal muestra los valores de F_{ST} con la corrección de alelos nulos. Debajo de la diagonal muestra los valores de F_{ST} sin corrección de alelos nulos. Valores generados por el programa FREENA.

	EE	SQ	BM	LBA	LBR	CON	MAL	PPE	SLG	PRE	ISM	BLA	PLO	PLI	ISL	ITI	IDA	BKI	ISPM	STR
EE		0.174	0.232	0.176	0.248	0.288	0.214	0.182	0.245	0.206	0.199	0.202	0.207	0.151	0.259	0.252	0.195	0.305	0.250	0.226
SQ	0.175		0.224	0.151	0.190	0.301	0.182	0.186	0.213	0.214	0.169	0.162	0.179	0.233	0.303	0.249	0.133	0.299	0.240	0.256
BM	0.232	0.217		0.126	0.185	0.226	0.155	0.138	0.165	0.180	0.173	0.162	0.144	0.226	0.295	0.241	0.153	0.274	0.165	0.263
LBA	0.176	0.148	0.126		0.033	0.113	0.094	0.043	0.037	0.043	0.087	0.085	0.034	0.163	0.167	0.151	0.052	0.161	0.105	0.177
LBR	0.251	0.182	0.187	0.034		0.103	0.130	0.026	0.008	0.121	0.113	0.109	0.029	0.166	0.122	0.162	0.047	0.107	0.091	0.187
CON	0.286	0.295	0.223	0.111	0.106		0.212	0.060	0.125	0.207	0.207	0.187	0.127	0.216	0.188	0.157	0.162	0.083	0.053	0.222
MAL	0.215	0.188	0.155	0.093	0.131	0.213		0.116	0.146	0.118	0.086	0.115	0.085	0.176	0.219	0.148	0.141	0.205	0.167	0.193
PPE	0.182	0.193	0.138	0.043	0.029	0.062	0.118		0.046	0.108	0.106	0.088	0.028	0.117	0.112	0.121	0.075	0.092	0.060	0.143
SLG	0.245	0.213	0.166	0.037	0.008	0.124	0.147	0.046		0.144	0.130	0.136	0.047	0.213	0.150	0.205	0.114	0.138	0.105	0.236
PRE	0.206	0.221	0.181	0.037	0.123	0.204	0.129	0.115	0.144		0.114	0.115	0.069	0.176	0.199	0.159	0.129	0.185	0.150	0.196
ISM	0.198	0.176	0.172	0.086	0.114	0.208	0.088	0.106	0.129	0.122		0.018	0.074	0.167	0.220	0.140	0.132	0.203	0.162	0.183
BLA	0.198	0.161	0.157	0.074	0.101	0.180	0.118	0.088	0.129	0.118	0.018		0.078	0.154	0.215	0.140	0.085	0.196	0.099	0.161
PLO	0.209	0.189	0.144	0.028	0.021	0.116	0.093	0.024	0.036	0.078	0.081	0.082		0.150	0.133	0.140	0.086	0.118	0.117	0.166
PLI	0.150	0.238	0.227	0.164	0.168	0.217	0.183	0.123	0.213	0.186	0.172	0.160	0.160		0.206	0.147	0.155	0.212	0.157	0.141
ISL	0.257	0.315	0.303	0.178	0.134	0.198	0.230	0.126	0.165	0.213	0.230	0.223	0.140	0.208		0.220	0.184	0.110	0.205	0.229
ITI	0.266	0.269	0.254	0.160	0.175	0.163	0.169	0.139	0.217	0.182	0.159	0.162	0.165	0.171	0.242		0.174	0.111	0.164	0.150
IDA	0.195	0.121	0.152	0.052	0.045	0.156	0.138	0.075	0.114	0.121	0.130	0.067	0.079	0.150	0.189	0.176		0.204	0.008	0.152
BKI	0.302	0.303	0.271	0.157	0.108	0.085	0.204	0.092	0.136	0.189	0.201	0.195	0.111	0.214	0.120	0.119	0.198		0.155	0.217
ISPM	0.270	0.242	0.168	0.126	0.115	0.066	0.184	0.087	0.130	0.157	0.184	0.110	0.129	0.175	0.235	0.169	0.022	0.165		0.169
STR	0.226	0.255	0.262	0.175	0.186	0.220	0.192	0.144	0.234	0.196	0.182	0.154	0.167	0.140	0.229	0.165	0.149	0.212	0.185	

Apéndice C. Diferenciación genética de especies de pulpo de 20 localidades en el Pacífico Mexicano. Arriba de la diagonal valores de F_{ST} , debajo de la diagonal estimaciones de Jost' D.

	EE	SQ	BM	LBA	LBR	CON	MAL	PPE	SLG	PRE	ISM	BLA	PLO	PLI	ISL	ITI	IDA	BKI	ISPM	STR
EE		0.174	0.232	0.175	0.248	0.275	0.214	0.182	0.242	0.207	0.198	0.197	0.208	0.15	0.253	0.271	0.195	0.303	0.251	0.225
SQ	0.381		0.219	0.148	0.178	0.289	0.187	0.193	0.212	0.222	0.176	0.161	0.189	0.233	0.316	0.274	0.121	0.306	0.234	0.255
BM	0.572	0.571		0.127	0.185	0.217	0.156	0.138	0.165	0.18	0.173	0.156	0.146	0.225	0.298	0.255	0.152	0.269	0.168	0.261
LBA	0.533	0.518	0.429		0.032	0.108	0.093	0.043	0.036	0.038	0.087	0.074	0.028	0.163	0.177	0.164	0.052	0.159	0.118	0.175
LBR	0.773	0.599	0.628	0.168		0.108	0.123	0.029	0.007	0.117	0.108	0.093	0.021	0.164	0.138	0.178	0.044	0.114	0.122	0.181
CON	0.666	0.780	0.542	0.338	0.313		0.21	0.066	0.122	0.2	0.204	0.177	0.119	0.217	0.196	0.172	0.154	0.086	0.065	0.218
MAL	0.741	0.672	0.583	0.484	0.592	0.761		0.118	0.144	0.131	0.089	0.117	0.094	0.184	0.226	0.183	0.137	0.208	0.156	0.191
PPE	0.627	0.723	0.526	0.221	0.114	0.214	0.573		0.045	0.118	0.107	0.088	0.026	0.125	0.124	0.157	0.075	0.095	0.092	0.144
SLG	0.700	0.656	0.498	0.146	0.015	0.325	0.618	0.181		0.144	0.128	0.128	0.036	0.211	0.163	0.224	0.114	0.135	0.125	0.232
PRE	0.659	0.791	0.653	0.191	0.554	0.676	0.594	0.550	0.593		0.126	0.12	0.08	0.189	0.213	0.198	0.121	0.196	0.12	0.198
ISM	0.702	0.658	0.694	0.489	0.552	0.772	0.429	0.551	0.574	0.610		0.018	0.083	0.174	0.227	0.172	0.131	0.207	0.153	0.182
BLA	0.650	0.565	0.583	0.419	0.482	0.622	0.561	0.428	0.559	0.562	0.079		0.083	0.161	0.221	0.175	0.067	0.199	0.074	0.154
PLO	0.772	0.752	0.596	0.178	0.104	0.431	0.478	0.126	0.161	0.390	0.450	0.439		0.162	0.139	0.178	0.079	0.115	0.139	0.167
PLI	0.406	0.766	0.774	0.776	0.725	0.676	0.818	0.540	0.840	0.808	0.815	0.715	0.783		0.207	0.187	0.146	0.222	0.13	0.141
ISL	0.575	0.814	0.797	0.531	0.361	0.423	0.752	0.378	0.413	0.649	0.786	0.708	0.445	0.572		0.258	0.189	0.126	0.226	0.225
ITI	0.783	0.843	0.818	0.649	0.659	0.449	0.691	0.593	0.769	0.720	0.674	0.656	0.729	0.621	0.690		0.177	0.148	0.136	0.178
IDA	0.501	0.353	0.424	0.240	0.208	0.421	0.640	0.326	0.420	0.552	0.652	0.329	0.419	0.588	0.491	0.631		0.199	0.03	0.149
BKI	0.837	0.882	0.786	0.531	0.322	0.186	0.745	0.308	0.372	0.648	0.770	0.690	0.394	0.695	0.268	0.379	0.599		0.162	0.216
ISPM	0.617	0.600	0.349	0.418	0.308	0.103	0.785	0.239	0.308	0.685	0.833	0.552	0.397	0.644	0.456	0.574	0.026	0.328		0.13

STR	0.569	0.737	0.787	0.693	0.677	0.575	0.764	0.562	0.810	0.756	0.764	0.602	0.724	0.455	0.559	0.521	0.474	0.595	0.615
------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Apéndice D. Evaluación de 15 microsatélites por locus por población de *Octopus bimaculatus*. Locus, heterocigosidad Observada (Ho) y esperada (He), valores de P (Prob) para equilibrio de Hardy-Weinberg, Significancia (Signif) de EHW después de valor de corrección de Bonferroni ($P < 0.00037$) y valores de máxima expectativa (EM) para alelos nulos.

Población	Locus	Ho	He	Prob	Signif	EM
Malarrimo	OCBI-9	0.906	0.910	0.880	ns	0.000
	OCBI-12	0.767	0.874	0.590	ns	0.051
	OCBI-15	0.906	0.930	0.657	ns	0.005
	OCBI-16	0.839	0.855	0.835	ns	0.015
	OCBI-17	0.871	0.912	0.065	ns	0.005
	OCBI-25	0.875	0.849	0.494	ns	0.033
	OCBI-32	0.813	0.892	0.029	ns	0.057
	OCBI-35	0.871	0.876	0.759	ns	0.000
	OCBI-39	0.656	0.865	0.003	ns	0.102
	OCBI-40	0.839	0.850	0.013	ns	0.030
	OCBI-41	0.906	0.801	0.924	ns	0.000
	OCBI-46	0.933	0.862	0.742	ns	0.000
	OCBI-47	1.000	0.847	0.831	ns	0.000
	OCBI-48	0.839	0.849	0.676	ns	0.032
	OCBI-50	0.321	0.309	0.648	ns	0.000
	Promedio	0.823	0.832			0.022
	EE	0.041	0.038			0.008
La Bocana	OCBI-9	1.000	0.820	0.247	ns	0.000
	OCBI-12	0.800	0.760	0.132	ns	0.000
	OCBI-15	1.000	0.880	0.516	ns	0.000
	OCBI-16	1.000	0.760	0.451	ns	0.000
	OCBI-17	1.000	0.750	0.285	ns	0.000
	OCBI-25	1.000	0.760	0.890	ns	0.000
	OCBI-32	0.600	0.760	0.491	ns	0.067
	OCBI-35	1.000	0.800	0.704	ns	0.000
	OCBI-39	0.600	0.760	0.172	ns	0.001
	OCBI-40	1.000	0.820	0.290	ns	0.000
	OCBI-41	1.000	0.820	0.641	ns	0.000
	OCBI-46	1.000	0.800	0.764	ns	0.000
	OCBI-47	1.000	0.840	0.680	ns	0.000
	OCBI-48	1.000	0.820	0.247	ns	0.000
	OCBI-50	1.000	0.580	0.172	ns	0.000
	Promedio	0.933	0.782			0.004
	EE	0.037	0.017			0.004
Las Barrancas	OCBI-9	0.800	0.840	0.337	ns	0.000
	OCBI-12	0.800	0.820	0.451	ns	0.000
	OCBI-15	0.600	0.780	0.375	ns	0.067
	OCBI-16	1.000	0.820	0.823	ns	0.000
	OCBI-17	1.000	0.880	0.516	ns	0.000

	OCBI-25	0.800	0.840	0.371	ns	0.000
	OCBI-32	0.600	0.840	0.247	ns	0.133
	OCBI-35	1.000	0.781	0.679	ns	0.000
	OCBI-39	0.800	0.800	0.357	ns	0.000
	OCBI-40	1.000	0.840	0.247	ns	0.000
	OCBI-41	1.000	0.820	0.641	ns	0.000
	OCBI-46	0.600	0.860	0.170	ns	0.133
	OCBI-47	0.750	0.813	0.382	ns	0.001
	OCBI-48	0.500	0.688	0.558	ns	0.083
	OCBI-50	0.200	0.340	0.019	ns	0.001
	Promedio	0.763	0.784			0.028
	EE	0.060	0.034			0.013
Puerto Peñasco	OCBI-9	0.935	0.903	0.997	ns	0.000
	OCBI-12	0.813	0.843	0.358	ns	0.000
	OCBI-15	0.875	0.933	0.016	ns	0.028
	OCBI-16	0.719	0.879	0.078	ns	0.089
	OCBI-17	0.813	0.900	0.087	ns	0.051
	OCBI-25	0.938	0.899	0.393	ns	0.000
	OCBI-32	1.000	0.854	0.912	ns	0.000
	OCBI-35	0.906	0.891	0.906	ns	0.000
	OCBI-39	0.906	0.864	0.467	ns	0.000
	OCBI-40	0.969	0.904	0.588	ns	0.000
	OCBI-41	0.813	0.784	0.904	ns	0.000
	OCBI-46	0.903	0.888	0.976	ns	0.000
	OCBI-47	1.000	0.881	0.892	ns	0.000
	OCBI-48	1.000	0.897	0.211	ns	0.000
	OCBI-50	0.531	0.424	1.000	ns	0.000
	Promedio	0.875	0.850			0.011
	EE	0.032	0.032			0.007
San Luis Gonzaga	OCBI-9	1.000	0.867	0.827	ns	0.000
	OCBI-12	1.000	0.836	0.682	ns	0.000
	OCBI-15	0.875	0.898	0.516	ns	0.000
	OCBI-16	0.375	0.828	0.011	ns	0.244
	OCBI-17	0.750	0.875	0.369	ns	0.066
	OCBI-25	1.000	0.852	0.937	ns	0.000
	OCBI-32	0.875	0.742	0.835	ns	0.000
	OCBI-35	0.875	0.820	0.670	ns	0.000
	OCBI-39	0.875	0.789	0.263	ns	0.000
	OCBI-40	1.000	0.820	0.594	ns	0.000
	OCBI-41	1.000	0.852	0.312	ns	0.000
	OCBI-46	1.000	0.734	0.837	ns	0.000
	OCBI-47	1.000	0.847	0.809	ns	0.000
	OCBI-48	0.750	0.805	0.661	ns	0.010
	OCBI-50	0.000	0.000	monomórfico		0.001

	Promedio	0.825	0.771			0.021
	EE	0.073	0.056			0.017
	OCBI-9	0.960	0.885	0.264	ns	0.000
	OCBI-12	0.800	0.868	0.289	ns	0.027
	OCBI-15	0.960	0.935	0.199	ns	0.000
	OCBI-16	0.920	0.890	0.626	ns	0.000
	OCBI-17	0.920	0.906	0.673	ns	0.000
	OCBI-25	0.920	0.891	0.846	ns	0.000
	OCBI-32	0.840	0.886	0.072	ns	0.038
	OCBI-35	0.920	0.846	0.969	ns	0.000
	OCBI-39	0.840	0.865	0.007	ns	0.027
	OCBI-40	0.920	0.892	0.025	ns	0.000
	OCBI-41	0.920	0.864	0.933	ns	0.000
	OCBI-46	0.920	0.889	0.684	ns	0.000
	OCBI-47	0.920	0.874	0.637	ns	0.000
	OCBI-48	0.880	0.861	0.871	ns	0.000
	OCBI-50	0.500	0.437	0.968	ns	0.000
	Promedio	0.876	0.853			0.006
	EE	0.029	0.030			0.003
Bahía de Los Ángeles	OCBI-9	1.000	0.883	0.416	ns	0.000
	OCBI-12	0.786	0.852	0.036	ns	0.000
	OCBI-15	0.857	0.906	0.786	ns	0.024
	OCBI-16	0.857	0.821	0.480	ns	0.000
	OCBI-17	0.857	0.903	0.431	ns	0.024
	OCBI-25	0.857	0.878	0.410	ns	0.000
	OCBI-32	0.786	0.852	0.160	ns	0.032
	OCBI-35	0.929	0.860	0.086	ns	0.000
	OCBI-39	0.357	0.816	0.021	ns	0.255
	OCBI-40	0.769	0.858	0.549	ns	0.020
	OCBI-41	0.857	0.816	0.788	ns	0.000
	OCBI-46	0.929	0.839	0.577	ns	0.000
	OCBI-47	0.929	0.883	0.853	ns	0.000
	OCBI-48	0.571	0.860	0.239	ns	0.158
	OCBI-50	0.286	0.372	0.000	ns	0.000
	Promedio	0.775	0.827			0.034
	EE	0.054	0.033			0.019
Puerto Refugio	OCBI-9	0.765	0.843	0.177	ns	0.029
	OCBI-12	0.882	0.874	0.928	ns	0.000
	OCBI-15	0.529	0.905	0.000	*	0.200
	OCBI-16	0.824	0.889	0.631	ns	0.034
	OCBI-17	0.824	0.884	0.176	ns	0.007
	OCBI-25	0.882	0.879	0.319	ns	0.005
	OCBI-32	0.706	0.830	0.587	ns	0.058

	OCBI-35	0.941	0.874	0.973	ns	0.000
	OCBI-39	0.529	0.768	0.689	ns	0.127
	OCBI-40	0.941	0.875	0.063	ns	0.000
	OCBI-41	0.824	0.822	0.409	ns	0.000
	OCBI-46	1.000	0.872	0.850	ns	0.000
	OCBI-47	0.941	0.862	0.781	ns	0.000
	OCBI-48	0.471	0.875	0.003	ns	0.220
	OCBI-50	0.188	0.275	0.089	ns	0.103
	Promedio	0.750	0.822			0.052
	EE	0.058	0.040			0.019
Puerto Lobos	OCBI-9	0.923	0.855	0.836	ns	0.000
	OCBI-12	0.750	0.750	0.349	ns	0.000
	OCBI-15	0.500	0.688	0.100	ns	0.001
	OCBI-16	0.750	0.840	0.153	ns	0.080
	OCBI-17	0.857	0.880	0.825	ns	0.014
	OCBI-25	1.000	0.860	0.923	ns	0.000
	OCBI-32	0.700	0.870	0.172	ns	0.095
	OCBI-35	0.929	0.862	0.479	ns	0.000
	OCBI-39	0.750	0.809	0.569	ns	0.044
	OCBI-40	1.000	0.861	0.682	ns	0.000
	OCBI-41	1.000	0.872	0.869	ns	0.000
	OCBI-46	0.000	0.000	monomórfico	-	
	OCBI-47	0.929	0.862	0.529	ns	0.000
	OCBI-48	0.929	0.842	0.825	ns	0.000
	OCBI-50	0.462	0.657	0.017	ns	0.101
	Promedio	0.765	0.767			0.024
	EE	0.070	0.058			0.010
Total	Promedio	0.82	0.81			0.023
	EE	0.0168	0.0123			0.004

Apéndice E. Evaluación de 15 microsatélites por locus por población de *Octopus bimaculoides*. Locus, heterocigosidad Observada (Ho) y esperada (He), valores de P (Prob) para equilibrio de Hardy-Weinberg, Significancia (Signif) de EHW después de valor de corrección de Bonferroni ($P < 0.00037$) y valores de máxima expectativa (EM) para alelos nulos.

Población	Locus	Ho	He	Prob	Signif	EM
Ejido Erendira	OCBI-9	1.000	0.847	0.828	ns	0.000
	OCBI-12	0.692	0.541	0.453	ns	0.000
	OCBI-15	0.357	0.786	0.000	***	0.245
	OCBI-16	1.000	0.719	0.727	ns	0.000
	OCBI-17	0.000	0.000	monomórfico		0.001
	OCBI-25	0.615	0.426	0.109	ns	0.000
	OCBI-32	0.929	0.867	0.366	ns	0.000
	OCBI-35	1.000	0.732	0.585	ns	0.000
	OCBI-39	0.857	0.821	0.000	***	0.000
	OCBI-40	1.000	0.852	0.004	ns	0.000
	OCBI-41	1.000	0.533	0.003	ns	0.000
	OCBI-46	0.000	0.000	monomórfico		0.001
	OCBI-47	0.769	0.766	0.633	ns	0.000
	OCBI-48	0.357	0.309	0.882	ns	0.000
	OCBI-50	0.786	0.694	0.826	ns	0.000
	Promedio	0.691	0.593			0.017
	EE	0.092	0.075			0.016
San Quintín	OCBI-9	0.700	0.830	0.499	ns	0.051
	OCBI-12	0.800	0.710	0.019	ns	0.000
	OCBI-15	0.600	0.780	0.260	ns	0.109
	OCBI-16	0.500	0.750	0.076	ns	0.138
	OCBI-17	0.200	0.270	0.003	ns	0.000
	OCBI-25	0.400	0.335	0.891	ns	0.000
	OCBI-32	0.900	0.845	0.573	ns	0.000
	OCBI-35	0.889	0.852	0.655	ns	0.000
	OCBI-39	0.600	0.885	0.135	ns	0.155
	OCBI-40	1.000	0.864	0.278	ns	0.000
	OCBI-41	0.444	0.593	0.724	ns	0.070
	OCBI-46	0.200	0.180	0.725	ns	0.000
	OCBI-47	0.200	0.680	0.020	ns	0.282
	OCBI-48	0.222	0.198	0.708	ns	0.000
	OCBI-50	1.000	0.890	0.366	ns	0.000
	Promedio	0.577	0.644			0.054
	EE	0.077	0.068			0.022
Bahía Magdalena	OCBI-9	1.000	0.602	0.110	ns	0.000
	OCBI-12	1.000	0.734	0.515	ns	0.000

OCBI-15	0.875	0.789	0.005	ns	0.000
OCBI-16	1.000	0.688	0.134	ns	0.000
OCBI-17	0.000	0.000	monomórfico		0.001
OCBI-25	0.667	0.611	0.034	ns	0.051
OCBI-32	1.000	0.781	0.526	ns	0.000
OCBI-35	1.000	0.727	0.629	ns	0.000
OCBI-39	1.000	0.648	0.187	ns	0.000
OCBI-40	1.000	0.711	0.416	ns	0.000
OCBI-41	1.000	0.500	0.005	ns	0.000
OCBI-46	0.000	0.000	monomórfico		0.001
OCBI-47	1.000	0.719	0.353	ns	0.000
OCBI-48	0.750	0.508	0.410	ns	0.000
OCBI-50	0.875	0.844	0.363	ns	0.000
Promedio	0.811	0.591			0.004
EE	0.089	0.067			0.003
Total	0.693	0.609			0.025
EE	0.088	0.069			0.016

Apéndice F. Evaluación de 7 microsatélites por locus por población de *Octopus hubbsorum*. Locus, heterocigosidad Observada (Ho) y esperada (He), valores de P (Prob) para equilibrio de Hardy-Weinberg, Significancia (Signif) de EHW después de valor de corrección de Bonferroni ($P < 0.00037$) y valores de máxima expectativa (EM) para alelos nulos.

Población	Locus	Ho	He	Prob	Signif	EM
Santa Rosalía	OCBI- 25	1.000	0.891	0.239	ns	0.000
	OCBI- 35	1.000	0.859	0.966	ns	0.000
	OCBI- 39	0.625	0.805	0.346	ns	0.111
	OCBI- 41	0.875	0.492	0.028	ns	0.000
	OCBI- 47	1.000	0.852	0.628	ns	0.000
	OCBI- 48	0.625	0.602	0.846	ns	0.000
	OCBI- 50	0.125	0.117	0.850	ns	0.000
	Promedio	0.750	0.660			0.016
	EE	0.122	0.107			0.016
El Conejo	OCBI- 25	0.750	0.836	0.439	ns	0.054
	OCBI- 35	0.875	0.883	0.352	ns	0.000
	OCBI- 39	0.600	0.680	0.744	ns	0.072
	OCBI- 41	0.625	0.430	0.199	ns	0.000
	OCBI- 47	1.000	0.836	0.066	ns	0.000
	OCBI- 48	0.714	0.500	0.257	ns	0.000
	OCBI- 50	0.000	0.000	Monomórfico		0.001
	Promedio	0.750	0.660			0.018
	EE	0.122	0.107			0.012
Bahía Kino	OCBI- 25	1.000	0.927	0.162	ns	0.000
	OCBI- 35	0.969	0.883	0.588	ns	0.000
	OCBI- 39	0.613	0.873	0.003	ns	0.136
	OCBI- 41	0.906	0.581	0.000	***	0.000
	OCBI- 47	0.969	0.889	0.393	ns	0.000
	OCBI- 48	0.407	0.437	0.762	ns	0.007
	OCBI- 50	0.034	0.034	0.925	ns	0.000
	Promedio	0.700	0.660			0.021
	EE	0.139	0.126			0.019
Isla San Lorenzo	OCBI- 25	0.944	0.920	0.532	ns	0.000
	OCBI- 35	1.000	0.864	0.996	ns	0.000
	OCBI- 39	0.810	0.841	0.494	ns	0.000
	OCBI- 41	0.591	0.531	0.798	ns	0.000
	OCBI- 47	0.529	0.822	0.000	***	0.165
	OCBI- 48	0.105	0.273	0.010	ns	0.167
	OCBI- 50	0.000	0.000	Monomórfico		0.001
	Promedio	0.569	0.607			0.048

	EE	0.148	0.134			0.031
Isla Tiburón	OCBI- 25	0.750	0.901	0.899	ns	0.078
	OCBI- 35	0.935	0.888	0.885	ns	0.000
	OCBI- 39	0.710	0.878	0.002	ns	0.095
	OCBI- 41	0.355	0.466	0.000	***	0.062
	OCBI- 47	0.667	0.885	0.488	ns	0.111
	OCBI- 48	0.308	0.505	0.009	ns	0.148
	OCBI- 50	0.000	0.290	0.000	***	0.263
	Promedio	0.532	0.688			0.108
	EE	0.122	0.098			0.031
Puerto Libertad	OCBI- 25	0.857	0.898	0.408	ns	0.006
	OCBI- 35	1.000	0.883	0.282	ns	0.000
	OCBI- 39	0.538	0.828	0.037	ns	0.157
	OCBI- 41	1.000	0.699	0.000	***	0.000
	OCBI- 47	0.714	0.901	0.042	ns	0.083
	OCBI- 48	0.308	0.438	0.002	ns	0.064
	OCBI- 50	0.462	0.399	1.000	ns	0.000
	Promedio	0.697	0.721			0.044
	EE	0.103	0.082			0.023
	Total	0.650	0.655			0.042
	EE	0.122	0.107			0.025