

Nota de Investigación/Research Note

Lack of genetic differentiation among size groups of jumbo squid (*Dosidicus gigas*)

Ausencia de diferenciación entre grupos de talla del calamar gigante (*Dosidicus gigas*)

E Sandoval-Castellanos*, M Uribe-Alcocer, P Díaz-Jaimes

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior de Ciudad Universitaria, Insurgentes Sur 3000, Coyoacán, México DF 04510. * E-mail: esandoval@miranda.ecologia.unam.mx

Abstract

The population structure of the jumbo squid (*Dosidicus gigas*) is complex, containing several cohorts and three groups defined by their size (small, medium, and large) and by differences in maturation, growth, and life span. Several authors have indicated the possibility of such groups representing discrete genetic units even at level subspecies or species *in statu nascendi*. Genetic divergence was tested in samples from the Gulf of California (Mexico) and Peruvian Sea by estimation of population divergence statistics, an exact test of homogeneity of allele frequencies, analysis of molecular variance, and genealogical trees applied to data obtained with two molecular markers: RAPDs and mtDNA sequences identified by SSCPs. Neither significant values of θ (F_{ST}) nor significant heterogeneity in allele frequencies were detected. Lack of evidence does not imply complete lack of differentiation among the groups but supports the fact that a geographically spread population can have different size groups without relevant genetic differentiation, implying that the hypothetical genetically differentiated groups can occur in different ecological niches.

Key words: *Dosidicus gigas*, RAPDs, mtDNA, genetic differentiation.

Resumen

La estructura poblacional del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es aparentemente compleja al contener varias cohortes y a tres grupos identificados que fueron definidos por su talla (pequeño, mediano y grande) y por diferencias en su maduración, crecimiento y longevidad. Varios autores han señalado la posibilidad de que tales grupos representen unidades genéticamente discretas incluso a nivel de subespecies o especies en *status nascendii*. Se probó la hipótesis de divergencia genética en muestras del Golfo de California (México) y del Mar de Perú mediante la estimación de estadísticos de divergencia poblacional, una prueba exacta de homogeneidad de frecuencias alélicas, un análisis de varianza molecular y árboles genealógicos; aplicados a datos obtenidos con dos marcadores moleculares: RAPDs y secuencias de mtDNA identificadas mediante SSCPs. No se detectaron valores significativos de θ (F_{ST}) ni heterogeneidad en las frecuencias alélicas. La falta de evidencia no necesariamente implica la ausencia de diferenciación entre los grupos pero sustenta el hecho de que la población, en su amplia extensión geográfica, puede tener diferentes grupos de talla sin diferenciación genética relevante, implicando que los hipotéticos grupos genéticamente diferenciados pueden ocurrir en diferentes nichos ecológicos.

Palabras clave: *Dosidicus gigas*, RAPDs, mtDNA, diferenciación genética.

Introduction

The jumbo squid currently sustains the world's largest cephalopod fishery (Young and Olson 2007). Despite its importance, there are numerous pending questions about primary topics for the proper understanding and rational management of the fishery (Nigmatullin *et al.* 2001).

Dosidicus gigas (D'Orbigny, 1835) is an oceanic and partially neritic squid (Nesis 1983) whose distribution is restricted to tropical and subtropical waters in the Eastern Pacific (from 37–40° N to 45–47° S, and from 125–140° W along the equator). High demographic density is reached off the Peruvian coast in the Southern Hemisphere and around and within the Gulf of California in the Northern Hemisphere (Sato 1976, Mariátegui *et al.* 1997). Both hemisphere populations are

Introducción

Actualmente el calamar gigante sustenta la pesquería de cefalópodos más grande del mundo (Young y Olson 2007). A pesar de su importancia, hay numerosas preguntas pendientes acerca de tópicos primarios para la adecuada comprensión y el manejo racional de la pesquería (Nigmatullin *et al.* 2001).

Dosidicus gigas (D'Orbigny, 1835) es un calamar oceánico y parcialmente nerítico (Nesis 1983) cuya distribución se restringe a aguas tropicales y subtropicales del Pacífico Oriental desde 37–40° N a 45–47° S y hasta 125–140° W sobre la línea del ecuador. Alcanza densidades poblacionales elevadas frente a las costas peruanas en el Hemisferio Sur y en los alrededores e interior del Golfo de California en el Hemisferio Norte (Sato

genetically well differentiated (Sandoval-Castellanos *et al.* 2007) and share a complex structure containing several cohorts and three groups defined by their size (small (S), medium (M), and large (L)), and by differences in maturation, growth, life span, and even distribution (Nesis 1970, 1983; Argüelles *et al.* 2001; Markaida *et al.* 2004). In group S, organisms measure 130–140 to 260–340 mm mantle length (ML), inhabit more equatorial areas, mature faster and at smaller sizes, and have a shorter life span (Argüelles *et al.* 2001, Tafur *et al.* 2001, Markaida *et al.* 2004). In group M, organisms measure 240–280 to 420–600 mm ML, inhabit all the distribution range excepting peripheral (northern and southern) areas, grow and mature at intermediate rates, and have a life span of around one year (Argüelles *et al.* 2001, Markaida and Sosa-Nishizaki 2001, Tafur *et al.* 2001, Markaida *et al.* 2004). In group L, organisms measure >500–650 to 1000–1200 mm ML, inhabit the northern and southern margins of the distribution range, mature and grow slower, and have a longer life span of 1.5–2 years (Argüelles *et al.* 2001, Markaida and Sosa-Nishizaki 2001, Tafur *et al.* 2001, Markaida *et al.* 2004).

Several authors have reported that such groups could present reproductive isolation and thus display genetic differences, not only at the level of stocks but also at level subspecies or species *in statu nascendi* (Anderson and Rodhouse 2001, Nigmatullin *et al.* 2001).

In this study we tested the hypothesis of genetic divergence among size groups by using samples from the Peruvian Sea and Gulf of California (Mexico) and two molecular techniques: random amplified polymorphic DNA (RAPD), which is a polymerase chain reaction PCR-based amplification of random fragments treated as Mendelian characters identified and separated by their electrophoretic migration; and mitochondrial DNA (mtDNA) sequences identified by single-strand conformation polymorphisms (SSCPs), which is a separation of single-strand DNA fragments whose differences in sequence produce different conformational variants with different electrophoretic mobility.

Material and methods

This study employed a total of 30 samples of *D. gigas* collected from the Peruvian Pacific waters (77–84° W, 4–16° S) and 46 from the Gulf of California (106°48' W, 23°25' N) between August and October 2002. They were classified based on the size of the organisms in order to integrate them into the three size groups (S, M, and L) according to Hernández-Herrera *et al.* (1996), Argüelles *et al.* (2001), Markaida and Sosa-Nishizaki (2001), Tafur *et al.* (2001), and Markaida *et al.* (2004). Small-sized individuals were not found in the Gulf of California.

Genomic DNA templates were obtained using the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega Biosciences Inc., San Luis Obispo, CA) and quantified by fluorometry. Classified samples were analyzed using the two molecular techniques. RAPD-PCR reactions were carried out in 15 µL containing

1976, Mariátegui *et al.* 1997). Las poblaciones en ambos hemisferios han sido genéticamente diferenciadas (Sandoval-Castellanos *et al.* 2007) y comparten una estructura compleja que contiene a varias cohortes y a tres grupos identificados que se definen por su talla (pequeña (S), mediana (M) y grande (L)) y por diferencias en su maduración, crecimiento, longevidad e incluso distribución (Nesis 1970, 1983; Argüelles *et al.* 2001, Markaida *et al.* 2004). Los organismos del grupo S miden de 130–140 a 260–340 mm de longitud de manto (LM), habitan áreas más ecuatoriales, maduran rápidamente y a menores tallas, y tienen una longevidad menor (Argüelles *et al.* 2001, Tafur *et al.* 2001, Markaida *et al.* 2004). Los calamares del grupo M miden de 240–280 a 420–600 mm LM, habitan en todo el rango de distribución exceptuando las periferias (norte y sur), crecen y maduran a tasas intermedias, y tienen una longevidad de aproximadamente un año (Argüelles *et al.* 2001, Markaida y Sosa-Nishizaki 2001, Tafur *et al.* 2001, Markaida *et al.* 2004). El grupo L presenta tallas de >500–650 y puede llegar hasta los 1000–1200 mm LM. Estos calamares tienden a presentarse en los márgenes sur y norte del área de distribución, a madurar y crecer más lentamente y a tener una longevidad de hasta 1.5–2 años (Argüelles *et al.* 2001, Markaida y Sosa-Nishizaki 2001, Tafur *et al.* 2001, Markaida *et al.* 2004).

Varios autores han señalado que tales grupos podrían presentar aislamiento reproductivo y por lo tanto mostrar diferencias genéticas no sólo a nivel poblacional sino incluso a nivel de subespecies o especies en *status nascendii* (Anderson y Rodhouse 2001, Nigmatullin *et al.* 2001).

En este trabajo se evaluó la hipótesis de divergencia genética entre grupos de talla empleando muestras del Mar de Perú y del Golfo de California, y dos técnicas moleculares: la técnica de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD, por sus siglas en inglés), que consiste en la amplificación aleatoria por PCR de fragmentos tratados como caracteres mendelianos, que son identificados y separados por su movilidad electroforética; y la de secuencias de DNA mitocondrial (mtDNA) identificadas mediante SSCP (polimorfismos de conformación de cadena sencilla), la cual consiste en la separación de fragmentos de DNA cuyas diferencias en la secuencia producen diferentes conformaciones con diferentes movilidades electroforéticas.

Materiales y métodos

Este estudio empleó un total de 30 muestras de *D. gigas* recolectadas en el Mar del Perú recolectadas entre 77–84° W y 4–16° S, y 46 muestras del Golfo de California recolectadas alrededor de 106°48' W y 23°25' N entre agosto y octubre de 2002. Las muestras se clasificaron de acuerdo a la talla de los organismos a fin de integrarlos en cada uno de los tres grupos (S, M y L) de acuerdo a la información de Hernández-Herrera *et al.* (1996), Argüelles *et al.* (2001), Markaida y Sosa-Nishizaki (2001), Tafur *et al.* (2001) y Markaida *et al.* (2004). Sin embargo, no se encontraron individuos del grupo pequeño en el Golfo de California.

10× PCR buffer “B” (Cat. M1901, Promega Biosciences), 0.2 mM of each dNTP, 0.75 U Taq polymerase (Cat. M1661, Promega Biosciences), 5.6 pmol primer, 3.0 mM MgCl₂, and 1.5 ng template DNA (2.5 ng µL⁻¹). Twenty primers from the OPF series (Operon, QIAGEN Inc., Valencia, CA) were assayed and the five that showed better intensity, clarity, and repeatability were chosen for the whole study. The PCR program consisted of an initial step (3 min at 94°C), 44 three-step cycles (1 min at 94°C, 1 min at 37°C, and 2 min at 72°C, increasing the second and third steps one second each cycle), and a final step (10 min at 72°C). The RAPD products were separated by horizontal electrophoresis in 2.0% agarose gels (Cat. 15510-019, Gibco, Invitrogen Corp., Grand Island, NY), and stained with ethidium bromide.

Amplification of the cytochrome *b* fragment was made using the primers UCYTB151F and UCYTB272R (Merritt *et al.* 1998), which were later replaced by the non-degenerated UCYTB272RND (5'-GCGAATAGGAAGTACCATTG-3') and UCYTB151FND (5'-TGTGGGGCCACTGTTATGACTAA-3') in order to avoid artefacts in the sequencing reactions caused by their degenerated character. PCR was carried out in 10 µL containing 10× PCR buffer “B” (Cat. M1901, Promega Biosciences), 0.2mM of each dNTP (Cat. U1240, Promega Biosciences), 0.5 U Taq polymerase (Cat. M1661, Promega Biosciences), 10 pmol of each primer, 3.25 mM MgCl₂, and 1 µL of template. The PCR program consisted of an initial step (3 min at 94°C), 40 three-step cycles (1 min at 94°C, 1 min at 37°C, and 2 min at 72°C), and a final step (7 min at 72°C). Protocols of the SSCP techniques followed Sunnucks *et al.* (2000).

Allele frequencies were obtained for both markers and their homogeneity was tested using the exact test proposed by Raymond and Rousset (1995), which is an unbiased χ^2 contingency test. The exact test assumes random mating and is useful for detecting multilocus probabilities as well as individual aberrant loci. Differentiation was measured by the unbiased estimate of Wright's population differentiation statistic F_{ST} (θ) (Weir and Cockerham 1984). Its confidence interval was obtained by bootstrapping (Weir and Cockerham 1984, Miller 1998). Statistical power was assessed by simulations using the POWSIM program (Ryman and Palm 2006) for the true sample sizes, the observed frequencies, and different degrees of differentiation (F_{ST}). Analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992) was performed to estimate the proportion of the overall variation due to differentiation within the size groups, differentiation among the size groups, and differentiation between populations (Peruvian Sea and Gulf of California). Also, a phylogenetic neighbor-joining tree (see Nei and Kumar 2000), which is an algorithm that efficiently finds the tree that minimizes the length of the branches connecting the individual taxa, was built with all the individual sequences using the MEGA 3.1 software (Kumar *et al.* 2004), after choosing a molecular substitution model as implemented by Posada and Crandall (1998) in the MODELTEST 3.7 program.

Se obtuvieron plantillas de DNA genómico mediante el equipo de purificación Wizard Genomic DNA (Promega Biosciences Inc., San Luis Obispo, California), que fueron cuantificadas por fluorometría. Las muestras clasificadas se analizaron mediante dos técnicas moleculares. Las reacciones de PCR para RAPDs se realizaron en 15 µL que contenían amortiguador de PCR 10× “B” (Cat. M1901, Promega Biosciences), 0.2 mM de cada dNTP, 0.75 U de Taq polimerasa (Cat. M1661, Promega Biosciences), 5.6 pmol de iniciadores (primers), 3.0 mM de MgCl₂ y 1.5 ng de plantilla de DNA (2.5 ng µL⁻¹). Se ensayaron 20 iniciadores de la serie OPF (Operon, QIAGEN Inc. Valencia, California), de los cuales se escogieron los cinco que presentaron mayor intensidad, claridad y repetibilidad para el estudio completo. El programa de PCR consistió en un paso inicial (3 min a 94°C), 44 ciclos de tres pasos (1 min a 94°C, 1 min a 37°C, 2 min a 72°C, incrementando el segundo y tercer pasos un segundo cada ciclo) y un paso final (10 min a 72°C). Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% (Cat. 15510-019, Gibco, Invitrogen Corp., Grand Island, Nueva York) teñidos con bromuro de etidio.

Para la amplificación del fragmento de citocromo *b* del DNA mitocondrial, se utilizaron los iniciadores diseñados por Merritt *et al.* (1998), UCYTB151F y UCYTB272R, mismos que después fueron reemplazados por las versiones no degeneradas UCYTB272RND (5'-GCGAATAGGAAGTACCATTG-3') y UCYTB151FND (5'-TGTGGGGCCACTGTTATGACTAA-3'), a fin de evitar artificios en las reacciones de secuenciación debidos a su carácter degenerado. El PCR se llevó a cabo en 10 µL que contenían amortiguador de PCR 10× “B” (Cat. M1901, Promega Biosciences), 0.2 mM de cada dNTP (Cat. U1240, Promega Biosciences), 0.5 U de Taq polimerasa (Cat. M1661, Promega Biosciences), 10 pmol de cada iniciador, 3.25 mM de MgCl₂, y 1 µL de plantilla. El programa de PCR consistió en un paso inicial (3 min a 94°C), 40 ciclos de tres pasos (1 min a 94°C, 1 min a 37°C, 2 min a 72°C) y un paso final (7 min a 72°C). El protocolo de la técnica de SSCPS fue el presentado por Sunnucks *et al.* (2000).

Se obtuvieron las frecuencias alélicas para ambos marcadores y se probó su homogeneidad mediante la prueba exacta de Raymond y Rousset (1995), la cual es una prueba insesgada de contingencias de χ^2 . La prueba exacta supone reproducción aleatoria y es útil para detectar probabilidades multilocus pero además loci individuales aberrantes. Adicionalmente, la diferenciación se midió mediante una estimación insesgada del estadístico de diferenciación poblacional de Wright F_{ST} llamado θ (Weir y Cockerham 1984). Su intervalo de confianza se obtuvo mediante remuestreo por *bootstrapping* (Weir y Cockerham 1984, Miller 1998). La potencia estadística fue analizada mediante simulaciones con el programa POWSIM (Ryman y Palm 2006) usando los tamaños de muestra reales, las frecuencias observadas y diferentes niveles de diferenciación (F_{ST}). Además se llevó a cabo un análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992) con el fin de

Results

A total of 74 RAPD bands/loci was analyzed, showing 71 (98.6%) polymorphic loci in the Gulf of California and 73 (95.9%) in the Peruvian Sea, with an overall genetic diversity of 0.36 (allele frequencies shown in table 1).

The mitochondrial fragment analyzed corresponds to a 367-bp fragment from the central coding region (positions 453 to 819) of cytochrome *b* that codifies 121 aminoacids (positions 152 to 273). Analysis of mtDNA detected seven haplotypes (Genbank accession numbers: EU882065, EU882066, EU882072, EU882077, EU882081, EU882082, and EU882083; appendix) with 11 polymorphic sites (9 transitions, 2 transversions) that produced only 4 amino acid substitutions after translation. Overall gene diversity was 0.361 and the mean number of pairwise differences was 1.81.

Mitochondrial data agreed with the RAPDs in confirming the lack of differentiation, and neither significant values of θ (F_{ST}) nor significant heterogeneity in allele frequencies were detected either with the overall values (table 2) or in the pairwise analysis. In fact, allele frequencies were highly homogeneous, reaching exact *P* values of up to 1.0. However, the AMOVA analysis attributed some non-significant variation (3.8% with RAPDs and 2.8% with mtDNA) to differentiation between size groups. Effective migration estimations showed mostly high values between group sizes of the same hemisphere (Peruvian Sea or Gulf of California) with RAPDs (mean > 10) and mtDNA sequences (mean > 10). The genealogical trees of all individuals (not shown) did not support the presence of any pattern or association between clades and size groups, and did not show deep topologies (maximum difference between sequences was five substitutions). Nevertheless, four of the seven mitochondrial haplotypes were exclusive to one size group (table 3).

The statistical power assessed by the POWSIM program for 50 RAPD loci (the program cannot manage more) showed values of 0.99 and 0.90 in the χ^2 test and Fisher's exact test, respectively (both tests are analogues of the exact test used here), for the Gulf of California population, and of 0.95 and 0.90 for the Peruvian Sea population, in all cases for a differentiation equivalent to $F_{ST} = 0.029$.

Discussion

The hypothesized differentiation among size groups was not confirmed in this study. This result can be attributed to: (1) the lack of statistical power of the study due to small sample sizes, (2) the samples were not representative of the differentiated size groups; or (3) the lack of genetic differentiation among the size groups.

Despite the limited number of organisms sampled, the number of polymorphic loci (71–73) and sites (11) gave a statistical power equivalent to that obtainable with more than 60 individuals in each size category when analyzed using 10 hypothetical diallelic loci. This would detect genetic

estimar la proporción de la variación total que se debe a la diferenciación al interior de los grupos de talla, diferenciación entre los grupos de talla y diferenciación entre poblaciones (Mar del Perú y Golfo de California). También se construyó un árbol filogenético de *neighbor joining* (ver Nei y Kumar 2000), el cual es un algoritmo que encuentra eficientemente el árbol que minimiza la longitud total de las ramas que conectan a los taxones, empleando todas las secuencias individuales. Para ello se empleó el programa MEGA 3.1 (Kumar *et al.* 2004), después de elegir un modelo de sustitución molecular mediante el programa MODELTEST 3.7 (Posada y Crandall 1998).

Resultados

Se analizó un total de 74 bandas/loci de RAPDs, de las cuales 71 (98.6%) fueron polimórficas en el Golfo de California y 73 (95.9%) en el Mar del Perú, con una diversidad genética total de 0.36 (frecuencias alélicas mostradas en la tabla 1).

El fragmento mitocondrial analizado corresponde a una porción de 367 pb de la región central (posiciones 453 a 819) del citocromo *b* que codifica para 121 aminoácidos (posiciones 152 a 273). El análisis de DNA mitocondrial detectó siete haplotipos (números de acceso del Genbank: EU882065, EU882066, EU882072, EU882077, EU882081, EU882082 y EU882083; apéndice) con 11 sitios polimórficos (9 transiciones, 2 transversiones) que produjeron sólo 4 sustituciones de aminoácidos después de la traducción. La diversidad genética total fue de 0.361 y el promedio de diferencias pareadas de 1.81.

Los datos mitocondriales coincidieron con los de RAPDs en confirmar la carencia de diferenciación ya sea con la falta de valores significativos de θ (F_{ST}) o de heterogeneidad significativa en las frecuencias alélicas en los valores totales o pareados (tabla 2). De hecho, las frecuencias alélicas se mostraron altamente homogéneas alcanzando valores de *P* de hasta 1.0. No obstante, el análisis de AMOVA atribuyó una cantidad no significativa de variación (3.8% con RAPDs y 2.8% con mtDNA) debida a diferenciación entre grupos. Las estimaciones de migración efectiva mostraron valores primordialmente elevados entre grupos de talla del mismo hemisferio (Mar del Perú o Golfo de California) con RAPD (media > 10) y con secuencias de mtDNA (media > 10). Los árboles genealógicos de todos los individuos (no mostrados) no sustentaron la presencia de algún patrón o asociación entre clados y grupos de talla, mostrando topologías poco profundas (la diferencia máxima entre secuencias fue de cinco sustituciones). Sin embargo, cuatro de los siete haplotipos mitocondriales fueron exclusivos de un grupo de talla (tabla 3).

La potencia estadística analizada mediante el programa POWSIM con 50 loci de RAPD (el programa no puede manejar más) mostró valores de 0.99 y 0.90 para una prueba de χ^2 y una prueba exacta de Fisher, respectivamente (ambas pruebas son análogas a la prueba exacta usada aquí), en la población del Golfo de California y 0.95 y 0.90 en la población peruana. En todos los casos para una diferenciación equivalente a una $F_{ST} = 0.029$.

Table 1. Allele frequencies of the 74 RAPD loci.**Tabla 1.** Frecuencias alélicas de los 74 loci de RAPDs.

Locus	Frequency of the null allele				
	Gulf of California		Peruvian Sea		
	Medium (n = 27)	Large (n = 15)	Small (n = 13)	Medium (n = 7)	Large (n = 10)
1	0.2188	0.0000	0.3135	0.0000	0.0000
2	0.0000	0.2923	0.0000	0.0000	0.0000
3	0.0000	0.0000	0.4141	0.4233	0.0000
4	0.4539	0.5285	0.4963	0.0000	0.3563
5	0.2889	0.2923	0.4963	0.4233	0.0000
6	0.3462	0.2923	0.4963	0.4233	0.3563
7	0.6705	0.8590	0.6871	0.5595	0.6445
8	0.7481	0.8590	0.4141	0.5595	0.7811
9	0.5160	0.3861	0.5670	0.4233	0.6445
10	0.5504	0.5871	0.4963	0.4233	0.7161
11	0.5504	0.4626	0.5670	0.5595	0.5642
12	0.5160	0.5871	0.6299	0.4233	0.6445
13	0.5504	0.5871	0.6871	0.5595	0.5642
14	0.4792	0.4626	0.6299	0.6706	0.4708
15	0.3954	0.5285	0.6299	0.4233	0.4708
16	0.5504	0.5285	0.6299	0.6706	0.6445
17	0.4792	0.4626	0.4963	0.6706	0.4708
18	0.5504	0.2923	0.4963	0.4233	0.4708
19	0.3954	0.2923	0.8356	0.4233	0.7811
20	0.4792	0.5871	0.6871	0.7662	0.7161
21	0.5160	0.6897	0.6871	0.5595	0.6445
22	0.2889	0.5285	0.4141	0.4233	0.7811
23	0.3462	0.0000	0.7892	0.7662	0.8412
24	0.2188	0.2923	0.5670	0.0000	0.7161
25	0.5160	0.5285	0.3135	0.4233	0.7161
26	0.3462	0.0000	0.4141	0.4233	0.5642
27	0.6099	0.5120	0.4963	0.6706	0.5642
28	0.5822	0.2832	0.3135	0.0000	0.3563
29	0.3400	0.0000	0.9615	1.0000	1.0000
30	0.5224	0.4482	0.4141	0.4233	0.3563
31	0.4548	0.3740	0.5670	0.6706	0.7811
32	0.4169	0.5688	0.6871	0.5595	0.6445
33	0.2149	0.0000	0.6299	0.4233	0.7161
34	0.2273	0.3861	0.0000	0.4233	0.3563
35	0.4563	0.3861	0.0000	0.5595	0.3563
36	0.6676	0.5871	0.4141	0.5595	0.3563
37	0.4563	0.3861	0.3135	0.4233	0.0000
38	0.8023	0.7789	0.9615	1.0000	1.0000

Table 1 (Cont.)

Locus	Frequency of the null allele				
	Gulf of California		Peruvian Sea		
	Medium (n = 27)	Large (n = 15)	Small (n = 13)	Medium (n = 7)	Large (n = 10)
39	0.4563	0.6405	0.0000	0.5595	0.4708
40	0.6054	0.5871	0.6299	0.4233	0.7161
41	0.4978	0.3861	0.4963	0.0000	0.5642
42	0.4108	0.5285	0.0000	0.5595	0.3563
43	0.6372	0.5871	0.3135	0.4233	0.4708
44	0.6054	0.5285	0.9615	0.8512	0.8412
45	0.6054	1.0000	0.9615	0.9286	0.8412
46	0.3001	0.2923	0.4141	0.7662	0.4708
47	0.3001	0.7789	0.6871	0.4233	0.6445
48	0.3596	0.2923	0.5670	0.6706	0.5642
49	0.4108	0.6897	0.7892	0.5595	0.7811
50	0.4563	0.2923	0.5670	0.4233	0.0000
51	0.3596	0.2832	0.3135	0.4233	0.0000
52	0.5360	0.3740	0.3135	0.0000	0.0000
53	0.4108	0.4482	0.4141	0.0000	0.3563
54	0.5718	0.5120	0.4141	0.5595	0.5642
55	0.6372	0.7546	0.4963	0.0000	0.4708
56	0.4563	0.5688	0.6871	0.7662	0.7811
57	0.3596	0.4482	0.6871	0.7662	0.4708
58	0.4563	0.3740	0.6871	0.0000	0.5642
59	0.4563	0.2832	0.6299	0.6706	0.7161
60	0.3596	0.3740	0.5670	0.5595	0.4708
61	0.3001	0.0000	0.7399	0.6706	0.8412
62	0.3596	0.6681	0.6299	0.5595	0.4708
63	0.3884	0.3740	0.3135	0.0000	0.3750
64	0.4657	0.5120	0.3135	0.0000	0.0000
65	0.7103	0.6681	0.8356	0.8512	0.8222
66	0.7245	0.9030	0.7399	0.4233	0.7537
67	0.3884	0.4482	0.6299	0.0000	0.3750
68	0.6849	0.5688	0.5670	0.0000	0.7537
69	0.5723	0.6205	0.7892	0.6706	0.8222
70	0.6025	0.9365	0.5670	0.7662	0.5938
71	0.6025	0.5688	0.4963	0.0000	0.6784
72	0.3884	0.6205	0.4141	0.5595	0.5938
73	0.6311	0.9030	0.9215	0.8512	1.0000
74	0.2837	0.3740	0.5670	0.4233	0.5938
Total population	98.64		95.94		
Polymorphism (95%)	97.29	91.67	87.83	77.02	83.78

Table 2. Overall estimates of θ between size groups and probability (P) obtained with the exact test.**Tabla 2.** Estimaciones totales de θ entre grupos de talla y probabilidad (P) obtenida con la prueba exacta.

Comparison (size group and sample size in parentheses)	Location	RAPDs		mtDNA	
		θ (SD)	P value	θ (SD)	P value
Medium, 300–370 mm (30) vs Large, >500 mm (16)	Gulf of California	–0.005 (0.004)	1.000	–0.001 (0.003)	0.856
Small, 211–284 mm (13) vs Medium, 341–368 mm (7) vs Large, >500 mm (10)	Peruvian Sea	0.015 (0.010)	0.958	0.055 (0.020)	1.000

Table 3. Haplotype frequencies of the mitochondrial cytochrome *b* fragment analyzed.**Tabla 3.** Frecuencias haplotípicas del fragmento de citocromo *b* analizado.

Haplotype	Haplotype frequency				
	Gulf of California		Peruvian Sea		
	Medium ($n = 20$)	Large ($n = 10$)	Small ($n = 13$)	Medium ($n = 6$)	Large ($n = 10$)
A01	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
A02	0.8500	0.7000	0.6920	0.6670	1.0000
A10	0.1000	0.3000	0.0000	0.0000	0.0000
A16	0.0000	0.0000	0.0000	0.1670	0.0000
A22	0.0000	0.0000	0.0769	0.0000	0.0000
A23	0.0000	0.0000	0.1540	0.1670	0.0000
A24	0.0000	0.0000	0.0769	0.0000	0.0000

differentiation probably as low as $F_{ST} = 0.02$, which is a small differentiation, usually detected between populations with no geographical barriers between them and recent differentiation processes (i.e., a few thousand years of pure genetic drift differentiation). The use of longer mitochondrial sequences and microsatellites would probably confirm or reject the lack of differentiation between jumbo squid size groups.

If the sampled organisms did not show differentiation because they did not truly come from the differentiated size groups, this could only have been possible if they belonged to the large-sized group and if the small- and medium-sized organisms were in fact growing juvenile specimens. This seems improbable, at least in the case of the Peruvian samples, for two reasons: first, the organisms were obtained randomly at six sampling points over a range of 1500 km; and second, the small-sized group included organisms in maturity stage III (Lipinski and Underhill 1995), a stage prior to reproductive maturity, indicating that those organisms would most likely not have attained large sizes when mature. Thus, it is reasonable to assume that our samples contained organisms from different size groups that mature and grow at different rates.

Like any other study of this type, this study cannot definitively reject the presence of genetically differentiated groups;

Discusión

En este estudio no se confirmó la hipotética diferenciación entre grupos de talla. Este resultado puede ser atribuido a: (1) la falta de potencia estadística del estudio debido al tamaño pequeño de las muestras; (2) que las muestras no son representativas de los grupos de talla diferenciados; o (3) la falta de diferenciación genética entre grupos.

A pesar del limitado número de organismos usados, el número de loci polimórficos (71–73) y sitios (11) dieron una potencia estadística equivalente a la que se obtendría con más de 60 individuos en cada categoría al analizarlos con 10 hipotéticos loci dialélicos. Ello permitiría detectar diferenciación probablemente tan baja como una $F_{ST} = 0.02$, la cual es una diferenciación pequeña usualmente detectada entre poblaciones sin barreras geográficas entre sí y procesos de diferenciación recientes (digamos unos pocos miles de años de diferenciación debida a deriva génica). Posiblemente el uso de secuencias mitocondriales mayores y de microsatélites confirmaría o rechazaría la carencia de diferenciación entre grupos de talla del calamar gigante.

Si los organismos muestreados no hubieran mostrado diferenciación debido al hecho de no provenir realmente de grupos

however, it does support the asseveration that Peruvian and Gulf of California populations can have organisms occurring simultaneously in a broad geographical range with different sizes and maturity stages but with little or no genetic differentiation ($F_{ST} < 0.02$). In addition, our result agrees with the lack of cryptic differentiation detected in other oegopsid squids. Only two of more than twenty studies have reported cryptic species or subspecies: *Martialia hyadesi* (Brierley *et al.* 1993) and *Berryteuthis magister* (Katugin 2000). On the other hand, most of the myopsid squids analyzed by genetic data (all are demersal squids contrasting with the highly oceanic oegopsids) have presented cryptic speciation (Triantafillos *et al.* 2004). It has been suggested that the greater possibility of drifting in the pelagic environment prevents localized oegopsid population isolation that could result in cryptic speciation (Triantafillos *et al.* 2004). Under this scenario, *D. gigas* could be the omastrephid squid with greater probabilities of differentiation since it is the only member of the family that presents neritic-oceanic or pseudo-oceanic characteristics, such as its distribution range and reproduction, in contrast to the completely oceanic habits of the rest of the family (Nigmatullin *et al.* 2001).

If there are genetically divergent size groups of *D. gigas* they must tend to inhabit ecological niches that do not overlap with the main population that has organisms of different sizes and growth and maturity rates. Future research should contemplate extensive surveys of non-equatorial as well as small equatorial organisms, recording maturity stages, seasons, and possibly age.

Acknowledgements

This project was partially funded by the National Autonomous University of Mexico (UNAM) through the Technological Research and Innovation Support Program (PAPIIT project IN 215901). We thank C Yamashiro, R Tafur, V Anislado, E Mojica, and E Castillo for providing the samples.

References

- Anderson CIH, Rodhouse PG. 2001. Life cycles, oceanography and variability: Omastrephid squid in variable environments. *Fish. Res.* 54: 133–143.
- Argüelles J, Rodhouse PG, Villegas P, Castillo G. 2001. Age, growth and population structure of the jumbo flying squid *Dosidicus gigas* in Peruvian waters. *Fish. Res.* 54: 51–61.
- Brierley AS, Rodhouse PG, Thorpe JP, Clarke MR. 1993. Genetic evidence of population heterogeneity and cryptic speciation in the omastrephid squid *Martialia hyadesi* from the Patagonian shelf and Antarctic polar frontal zone. *Mar. Biol.* 116: 593–602.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- Hernández-Herrera A, Morales-Bojórquez E, Nevares-Martínez MO, Balmori-Ramírez A, Rivera-Parra GI. 1996. Distribución de tallas y aspectos de la reproducción del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el Golfo de California, México, en 1996. *Cienc. Pesq.* 12: 85–89.

de talla diferenciados, eso sería posible si en realidad perteneciesen al grupo grande, y los organismos de tallas pequeña y mediana en realidad hayan sido especímenes juveniles en crecimiento del mismo grupo. Lo anterior parece improbable, al menos para las muestras peruanas, por dos razones: primero, los organismos se obtuvieron aleatoriamente en seis localidades de muestreo que abarcan más de 1500 km; y segundo, el grupo pequeño incluyó organismos en estadio de madurez III (Lipinski y Underhill 1995), que es un estadio previo a la madurez reproductiva, lo que indica que dichos organismos difícilmente habrían alcanzado tallas mayores en la madurez. Así, resulta razonable considerar que nuestras muestras contienen organismos de diferentes grupos de talla madurando y creciendo a diferentes tasas.

Este estudio, como cualquier otro de su tipo, no permite rechazar definitivamente la presencia de grupos genéticamente diferenciados pero de hecho si apoya el que las poblaciones peruana y californiana tengan simultáneamente organismos presentes en una amplia extensión geográfica con diferentes tallas y estadios de madurez pero con poca o ninguna diferenciación genética ($F_{ST} < 0.02$). Adicionalmente, este resultado va de acuerdo con la ausencia de diferenciación críptica detectada en otros calamares oegópsidos: en más de 20 especies reportadas, sólo para dos se han detectado especies o subespecies crípticas: *Martialia hyadesi* (Brierley *et al.* 1993) y *Berryteuthis magister* (Katugin 2000). Por otro lado, la mayoría de los calamares miópsidos analizados mediante datos genéticos (todos ellos demersales en contraste con los altamente oceánicos oegópsidos) presentaron especiación críptica (Triantafillos *et al.* 2004). Por ello, se ha sugerido que las mayores oportunidades de derivar en el ambiente pelágico evita que los oegópsidos tengan aislamiento poblacional localizado que más tarde pudiera resultar en especiación críptica (Triantafillos *et al.* 2004). Bajo este escenario, *D. gigas* podría ser el calamar omastrephido con mayores probabilidades de diferenciación ya que es el único miembro de la familia que presenta características consideradas como nerítico-oceánicas o pseudo-oceánicas, tales como su distribución y su reproducción, características opuestas a los hábitos completamente oceánicos del resto de la familia (Nigmatullin *et al.* 2001).

Si existen grupos genéticamente divergentes de *D. gigas*, éstos deberían mostrar una tendencia a habitar nichos ecológicos no traslapados con la población principal que mantiene organismos de diversas tallas y tasas de crecimiento y madurez. Se sugiere, para estudios posteriores, realizar muestreos extensos de organismos no ecuatoriales, así como de organismos ecuatoriales pequeños, registrando cuidadosamente la temporadas, estadio de madurez y posiblemente la edad.

Agradecimientos

Este proyecto empleó fondos del Programa de Apoyo para la Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (proyecto IN 215901). Agradecemos a C Yamashiro, R Tafur, V Anislado, E Mojica y E Castillo por la provisión de muestras.

- Katugin ON. 2000. A new subspecies of the schoolmaster gonate squid, *Berryteuthis magister* (Cephalopoda: Gonatidae), from the Japan Sea. *Veliger* 43: 82–97.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetic analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 5: 150–163.
- Lipinski MR, Underhill LG. 1995. Sexual maturation in squid: Quantum or continuum? *S. Afr. J. Mar. Sci.* 15: 207–223.
- Mariátegui L, Tafur R, Morón O, Ayón P. 1997. Distribución y captura del calamar gigante *Dosidicus gigas* a bordo de buques calamareros en aguas del Pacífico centro oriental y en aguas nacionales y adyacentes. *Inf. Prog. Inst. Mar. Perú* 63: 35–36.
- Markaida U, Sosa-Nishizaki O. 2001. Reproductive biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, 1995–1997. *Fish. Res.* 54: 63–82.
- Markaida U, Quiñónez-Velázquez C, Sosa-Nishizaki O. 2004. Age, growth and maturation of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Gulf of California, Mexico. *Fish. Res.* 66: 31–47.
- Merritt TJS, Shi L, Chase MC, Rex MA, Etter RJ, Quattro JM. 1998. Universal cytochrome *b* primers facilitate intraspecific studies in molluscan taxa. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 7: 7–11.
- Miller MP. 1998. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA), version 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Northern Arizona University, Flagstaff, Arizona.
- Nei M, Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford Univ. Press, New York, 333 pp.
- Nesis KN. 1970. The biology of the giant squid of Peru and Chile, *Dosidicus gigas*. *Oceanology* 10: 140–152.
- Nesis KN. 1983. *Dosidicus gigas*. In: Boyle PR (ed.), *Cephalopod Life Cycles*. Vol. I. Species Accounts. Academic Press, London, pp. 216–231.
- Nigmatullin CM, Nesis KN, Arkhipkin AI. 2001. A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fish. Res.* 54: 9–19.
- Posada D, Crandall KA. 1998. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- Raymond M, Rousset F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280–1283.
- Ryman N, Palm S. 2006. POWSIM: A computer program for assessing statistical power when testing for genetic differentiation. *Mol. Ecol.* 6: 600–602.
- Sandoval-Castellanos E, Uribe-Alcocer M, Díaz-Jaimes P. 2007. Population genetic structure of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) evaluated by RAPD analysis. *Fish. Res.* 83: 113–118.
- Sato K. 1976. Results of exploratory fishing for *Dosidicus gigas* (D'Orbigny) off California and Mexico. *FAO Fish. Rep.* 170: 61–67.
- Sunnucks P, Wilson ACC, Beheregaray LB, Zenger K, French J, Taylor AC. 2000. SSCP is not so difficult: The application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol. Ecol.* 9: 1699–1710.
- Tafur R, Villegas P, Rabí M, Yamashiro C. 2001. Dynamics of maturation, seasonality of reproduction and spawning grounds of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in Peruvian waters. *Fish. Res.* 54: 33–50.
- Triantafillos L, Jackson GD, Adams M, McGrath Steer BL. 2004. An allozyme investigation of the stock structure of arrow squid *Nototodarus gouldi* (Cephalopoda: Ommastrephidae) from Australia. *ICES J. Mar. Sci.* 61: 829–835.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370.
- Young J, Olson R. 2007. Workshop report: The ecological role of squid in pelagic ecosystems. *GLOBEC International Newsletter* 13: 43–44.

*Recibido en febrero de 2008;
aceptado en octubre de 2009.*

Appendix. Mitochondrial DNA haplotypes.**Apéndice.** Haplotipos de mtDNA.

	10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
A01	AGGTTTAATATGTAAAGGGTTACTAAAGGATTAGCAGGAATAAAATTTTCGGAATCCCCTAAAGCATTAGGAAACAATATACTAATTTCAATTAATAAT
A02	T.....
A10	G.....A.....G.....
A16	
A22	
A23	
A24	
	110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
A01	AGTAATATAACAAAGAAACCAAATAAATCTTTATATCTATAATACTGATGAAAGGAATCTTATCCACATCACTATTAATACCTAAAGGATTGTTTCTAC
A02	C.....G.....A.....
A10	G.....A.....
A16	G.....G.....A.....
A22	G.....
A23	G.....G.....A.....
A24	G.....G.....A.....
	210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
A01	CCCTCTGATGTAGGAACAATAAGTGTATACCCACTATAGCCATCAATACAAAAGGCAATAAAAAATGAAAACAAAAAAACGTCTAAGAGTCGCATTATC
A02	
A10	
A16	A.....
A22	
A23	T.....
A24	
	310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
A01	TACAGAAAACCCACCTCAAATTCAATAACAATTATTTACCCACATAAGGAATAGCTGAAACCAAA
A02	T.....
A10	T.....
A16	C.....T.....
A22	T.....
A23	T.....
A24	T.....