

El Colegio de la Frontera Sur

Validación del uso de incrementos de crecimiento en
estructuras duras para determinar la edad de *Octopus maya*
(Voss y Solís, 1966)

TESIS

presentada como requisito parcial para optar al grado de
Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural

por

Almendra Rodríguez Domínguez

2013

DEDICATORIAS

A mis padres, a mi abuela y a mis hermanos por su apoyo incondicional

A mis compañeros de maestría por su amistad y por todos los momentos que pasamos

*A mis amigos y a todos los que siempre han estado ahí y me han brindado su apoyo y
cariño*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado a través de la beca de maestría.

A mi director de tesis Dr. Unai Marcaida Aburto por haberme dado la oportunidad de incursionar en el mundo de los cefalópodos, por su asesoría, su apoyo y dirección en la realización de este proyecto.

Al M. en C. Iván Méndez Loeza y al Dr. Carlos Rosas Vázquez por su asesoría, consejos y gran apoyo.

A los miembros de mi comité sinodal Dr. Juan Carlos Pérez Jiménez, Dr. Daniel Pech Pool y Dr. Francisco Gurri García por sus recomendaciones.

A la Biól. Claudia Caamal Monsreal Técnico académico de la UMDI UNAM Sisal por su apoyo técnico en el cultivo de pulpo.

A la Biól. Estefany López Ripoll por su colaboración y consejos en la preparación de muestras histológicas.

A la Biól. Guadalupe Villegas Barcéñas por sus recomendaciones para la medición de picos.

A la Dra. Patricia Guadarrama y a la M. en C. Maribel Paniagua por la prestación de sus servicios y su apoyo en el Laboratorio de Ecología de la UMDI-Sisal y en el Laboratorio de Microscopía.

Esta tesis fue parcialmente financiada por el programa PAPIIT-UNAM a través del proyecto IN212012 otorgado al Dr. Carlos Rosas Vázquez.

ÍNDICE

Resumen

CAPITULO I

I. INTRODUCCIÓN

A. Importancia económica de cefalópodos	1
B. Características generales de cefalópodos	1
C. <i>Octopus maya</i>	
a. Importancia económica	2
b. Características de <i>Octopus maya</i>	3
D. Crecimiento	
a. Importancia en pesquerías	3
b. Cefalópodos	
i. Estructuras duras	4
ii. Fases de crecimiento	6
iii. Métodos de estudio	7

II. ANTECEDENTES

A. Estiletes	8
B. Picos	10
C. Lentes	11

III. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS	11
---	----

CAPITULO II

Validation of growth increments in stylets, beaks and lenses as ageing tools in

Octopus maya 13

ABSTRACT 14

INTRODUCTION 15

MATERIALS AND METHODS

Specimen collection 16

Structure preparation 17

Data analysis 19

RESULTS 19

DISCUSSION

Stylets 21

Beaks 23

Eye lenses 25

Aknowledgements 26

References 27

TABLES 31

FIGURE LEGENDS 37

CAPITULO III

I. CONCLUSIONES 40

LITERATURA CITADA 41

Validación del uso de incrementos de crecimiento en estructuras duras para determinar la edad de *Octopus maya* (Voss y Solís, 1966)

Resumen: Se emplearon organismos de edad conocida de *Octopus maya* para validar los incrementos en estiletes, picos y lentes. Se analizaron las estructuras de treinta y dos organismos criados en cautiverio con edades comprendidas entre 124 y 233 días. Se montaron secciones transversales de los estiletes en gelatina de glicerol, los picos se cortaron sagitalmente para analizar sus paredes laterales y las lentes se procesaron mediante técnicas histológicas y posteriormente montadas en resina. En los picos sólo los dos grupos de pulpos más jóvenes presentaron una relación cercana a la edad, en el resto de los grupos no se logró validar la deposición diaria de incrementos debido al desgaste de los picos. Las lentes no presentaron un patrón claro en la deposición de incrementos por lo que su periodicidad no pudo validarse. Los estiletes fueron la estructura más eficiente para evaluar la edad de los organismos, al presentar una alta precisión en los conteos de los incrementos entre lectores y una relación cercana entre la edad y el número de incrementos en todos los individuos. Por lo tanto, se recomienda el uso de estiletes para realizar evaluaciones de edad de *Octopus maya*.

Palabras clave: Pulpo, estiletes, picos, lentes.

CAPITULO I

I. INTRODUCCIÓN

A. Importancia económica de cefalópodos

Los cefalópodos constituyen un grupo importante dentro de las pesquerías mexicanas, al constituir el tercer lugar en cuanto a su valor económico, después del camarón y el atún (CONAPESCA, 2011), a pesar de que sólo representan el 3% del total de capturas en las pesquerías globales (Clarke, 1996). Además, forman parte de la dieta de otros organismos importantes para la pesca (e.g. atún y salmón), aves marinas y en general de depredadores oceánicos mayores (Clarke, 1996; Hunsicker, 2010).

La importancia económica de los cefalópodos se ha incrementado en las últimas décadas a consecuencia del incremento en la demanda de recursos marinos (Hunsicker, 2010). Esto puede estar asociado a la reducción de las capturas de muchas pesquerías tradicionales (caso de la sardina), lo que ha conllevado hacia un mayor interés en recursos marinos no-tradicionales (como son los cefalópodos) con el fin de satisfacer la demanda cada vez mayor de proteínas de alta calidad (Boyle y Rodhouse, 2005).

B. Características generales de cefalópodos

Dado el valor que presentan los cefalópodos como recurso pesquero, es necesario conocer su biología, ecología y dinámica poblacional, con el propósito de obtener información que ayude al manejo de las pesquerías (Rodhouse y Hatfield, 1990).

La clase Cephalopoda, pertenece al phylum Mollusca, que por lo general presentan una concha externa calcárea. Sin embargo, en los cefalópodos ésta se ha reducido o perdido por completo (Boyle y Rodhouse, 2005), a excepción de la subclase

Nautiloidea. Otra característica que los diferencia del resto de los moluscos, es la modificación del pie en brazos y tentáculos (Guerra, 2006).

Los cefalópodos presentan altas tasas de crecimiento, por lo cual requieren gran disponibilidad de alimento. Estas características son útiles para entender aspectos como el impacto de la depredación sobre las poblaciones de sus presas, la alta tasa de producción de biomasa de sus poblaciones y la disponibilidad de estos organismos como presas hacia otros depredadores marinos y para la pesca (Boyle y Rodhouse, 2005). Por lo tanto, los estudios sobre estructura de edades y tasas de crecimiento son fundamentales para el monitoreo de la pesca (Rodhouse y Hatfield, 1990).

Dentro de la clase Cephalopoda se presentan tres subclases: Ammonoidea, Nautiloidea y Coleoidea (Boyle y Rodhouse, 2005). En relación a la pesca, principalmente se incluyen miembros de cuatro familias, pertenecientes a la subclase Coleoidea: Loliginidae, Sepiidae, Octopodidae y Ommastrephidae (Clarke, 1996). Dentro de la familia Octopodidae, se encuentra el género *Octopus*, el cual presenta un centenar de especies que son trascendentales para las pesquerías (Boyle y Rodhouse, 2005).

C. *Octopus maya*

a. Importancia económica

El pulpo *Octopus maya* es una especie endémica de la península de Yucatán. Dentro de las pesquerías junto con *Octopus vulgaris*, ocupa el primer lugar en términos económicos y el segundo en volúmenes de captura en la región del Golfo de México y el Caribe (Botello, et al., 2010). A nivel nacional, ocupa el tercer lugar por su valor comercial, después del camarón y el atún (Pérez, et al., 2007), dado este valor comercial, se encuentran flotas pesqueras a través de toda su zona de distribución

(INAPESCA/SAGARPA, 2010). Las capturas de este organismo a nivel nacional, entre los años 1998-2009, han sido de 16,000.0 a 24,000.0 t, lo cual genera 15,000.0 empleos y alrededor de 360 millones de pesos anuales en derrama económica (INAPESCA/SAGARPA, 2010). *Octopus maya*, es considerada como un recurso primordial para el sector pesquero de la Península de Yucatán, siendo así una de las especies más importantes en términos económicos para México (Solís-Ramírez, 1994) y el principal recurso pesquero en la península.

b. Características de *Octopus maya*

Octopus maya se distribuye desde Ciudad del Carmen, hasta Isla Mujeres. Es endémico de la Península de Yucatán (Solís, 1967).

Su reproducción depende generalmente de factores como luz, temperatura y alimentación, dado que éstos determinan el tamaño y edad a la que se alcanza la madurez sexual (Van Heukelem, 1983). La puesta de sus huevos la realizan en el interior de las grietas que habitan, donde las hembras los cuidan y limpian. Al mostrar desarrollo embrionario directo, no presentan para-larva, por lo que el recién eclosionado presenta las características de un adulto (Voss y Solís, 1966).

D. Crecimiento

a. Importancia en pesquerías

Conocer la edad y crecimiento de especies importantes para la pesca es esencial para evaluar parámetros como la tasa de crecimiento, tasa de mortalidad, tasa de sobrevivencia de distintas clases de edades, longevidad, edad a la madurez, productividad y procesos de reclutamiento, de esta forma es posible contribuir a la explotación racional de las poblaciones (Campana, 2001; Doubleday, et al., 2006). Así,

a través de los estudios de edad y crecimiento es posible desarrollar modelos aplicables a pesquerías, que constituyan herramientas importantes para el manejo efectivo de las poblaciones (Doubleday, et al., 2006).

b. Cefalópodos

i. Estructuras duras

Los cefalópodos son el grupo más complejo de los moluscos. Pese a no tener concha, los cefalópodos modernos poseen estructuras duras hechas por deposición incrementos de crecimiento. Un incremento de crecimiento es una estructura bipartita que consiste en una banda clara amplia seguida de una banda oscura y estrecha (Campana y Neilson, 1985; Morris y Aldrich, 1985; Doubleday, et al., 2006) y su formación puede estar dada por la deposición de materia orgánica y minerales (Bettencourt y Guerra, 2000). Estas estructuras han sido utilizados para estimaciones de edad y análisis de crecimiento (Richardson, 2001).

Los estatolitos constituyen un par de estructuras calcáreas compuestas de aragonito y se encuentran dentro de dos cavidades adyacentes, los estatocistos. Estos órganos sensoriales ayudan al organismo a la recepción de la gravedad y detección de la aceleración. Se ha observado que en pulpos los estatolitos son de consistencia similar a la tiza y a diferencia de sepias y calamares no presentan incrementos de crecimiento (Richardson, 2001). Los estatolitos han sido ampliamente empleados para determinar la edad de cefalópodos, principalmente en calamares, gracias a que en estas estructuras es posible visualizar incrementos de crecimiento (Boyle y Rodhouse, 2005; Krstulovic Sifner, 2008).

El gladio o pluma es una placa transparente y quitinosa que conforma la concha vestigial en los calamares. Se encuentra profundamente incrustada en los músculos a lo largo de la línea media dorsal del manto y se han observado marcas de crecimiento (Bizikov, 1996; Richardson, 2001). Ha sido discretamente utilizado para determinar la edad o crecimiento en calamares, dado que algunos estudios han indicado la deposición diaria de incrementos; sin embargo aún es necesario validar la formación de incrementos diarios para algunas especies (Boyle y Rodhouse, 2005; Krstulovic Sifner, 2008).

El sepión (concha interna de las sepias) es una estructura compuesta por una matriz porosa de carbonato de calcio y presenta un papel importante en el control de la flotación (Almonacido-Rioseco, et al., 1994). Se ha reportado la presencia de incrementos de crecimiento diarios en esta estructura (Ré y Narciso, 1994). Era utilizado para estimar la edad de las sepias, no obstante se encontró que la tasa de formación de incrementos depende de la temperatura, por lo que sólo puede ser utilizado en condiciones controladas, con temperatura constante (Krstulovic Sifner, 2008).

El pico de los cefalópodos consta de un par de estructuras quitinosas que presentan un patrón de incrementos de crecimiento. Son utilizados para morder y arrancar pedazos grandes de tejido de su presa (Richardson, 2001).

Los estiletes son estructuras que representan la concha vestigial interna en los pulpos, consisten en un par de barras pequeñas y quitinosas, ampliamente separadas e incrustadas dentro del músculo del manto. Estas estructuras presentan incrementos de crecimiento regulares (Bizikov, 2004; Doubleday, et al., 2006).

Los picos y estiletes son estructuras que recientemente se han probado para determinar la edad en Octópodos, dado que los métodos directos utilizados para sepias y calamares no han tenido éxito para este organismo. El supuesto de que la deposición de los incrementos de crecimiento en estas estructuras es diaria aún debe ser validado en varias especies (Krstulovic Sifner, 2008).

Los lentes de los cefalópodos son estructuras que forman parte del ojo y se componen de lentes distales y proximales. Los lentes exhiben deposiciones de incrementos concéntricos que se presentan como bandas claras y oscuras (Baqueiro-Cárdenas, et al., 2011). Los incrementos más viejos se presentan en el centro de los lentes, mientras que los más nuevos se presentan en el borde exterior (West, et al., 1995; Hunsicker, 2009).

ii. Fases de crecimiento

Estudios de crecimiento han demostrado que en los cefalópodos el crecimiento consiste en un proceso de dos etapas, una fase exponencial larga, donde las tasas de crecimiento se mantienen constantes; seguida de una fase logarítmica lenta, donde la tasa de crecimiento se reduce gradualmente con la edad (Semmens, et al., 2004; Boyle y Rodhouse, 2005).

Una característica de los cefalópodos y sobre todo los pulpos, es la gran variabilidad individual en el crecimiento que provoca una falta de relación entre el tamaño del organismo y su edad (Van Heukelem, 1983; Leporati, et al., 2008).

iii. Métodos de estudio

Para realizar estimaciones en la tasa de crecimiento de cualquier organismo es necesario contar con datos de tamaño (tallas o pesos) y estimaciones de edad. En cefalópodos se han presentado dificultades para la obtención de estos parámetros (Boyle y Rodhouse, 2005).

Los métodos para estimar la edad y crecimiento de cefalópodos se dividen en indirectos y directos. Los primeros se basan en el análisis de datos de frecuencias de longitud de los organismos y consiste en la construcción de curvas de crecimiento, relacionando valores de moda o promedio de la longitud para intervalos de tiempo sucesivos (Krstulovic Sifner, 2008). Esta aplicación del análisis modal para el estudio de edad y crecimiento en cefalópodos ha sido ampliamente criticada. Entre los inconvenientes más importantes están: etapa reproductiva extendida a la mayor parte del año, poblaciones constituidas por individuos de distintas generaciones en la misma área reproductiva o reemplazamiento gradual de generaciones en las áreas de alimentación, especies altamente migratorias y crecimiento individual muy variable (Arkhipkin, 1991; Caddy, 1991; Jackson, 1994; Boyle y Rodhouse, 2005).

Los métodos directos consisten en el monitoreo de los organismo a través del tiempo o bien en la estimación de la edad a partir del conteo de incrementos en estructuras duras (Semmens, et al., 2004). El primero se basa en observaciones directas de organismos en cautiverio, donde se mide la variación en el tamaño de los organismos en intervalos regulares de tiempo y permite evaluar la influencia de factores bióticos y abióticos en el crecimiento. Algunos de los problemas de este método es que se presenta una alta tasa

de mortalidad de los organismos más jóvenes y además se cuestiona si las curvas de crecimiento serán similares a las de organismos silvestres (Krstulovic Sifner, 2008).

Otro método directo es el de marcado y recaptura, que a pesar de no poseer la desventaja del método anterior, su éxito es limitado porque la recaptura de los organismos es inusual, dado que muchos cefalópodos son migrantes activos (Krstulovic Sifner, 2008).

Las evaluaciones de edad basadas en el conteo de incrementos de crecimiento en estructuras duras también es un método directo. La mayor parte de las estructuras duras de cefalópodos presentan incrementos de crecimiento, tales como los estatolitos, gladio, sepión, estilete, picos y lentes. Algunas de estas estructuras han sido empleadas para la determinación de la edad (Boyle y Rodhouse, 2005; Krstulovic Sifner, 2008).

Por lo tanto, validar el uso de incrementos de crecimiento en estructuras duras de pulpos permitirá contar con un método directo para estimar su edad y realizar evaluaciones en poblaciones silvestres.

II. ANTECEDENTES

A. Estiletes

Se ha sugerido que los estiletes son estructuras potencialmente útiles para la determinación de la edad. Sousa y Fernandes (2002) analizaron los incrementos en los estiletes de *Octopus vulgaris*, de la costa de Portugal. No encuentran relación con el número de incrementos y el largo del manto y el peso total del organismo. Sin embargo, sugieren que es posible que los incrementos estén relacionados con la edad de los

pulpos al encontrar secciones marcadas de incrementos que relacionan con las diferentes etapas de crecimiento.

Posteriormente Doubleday, et al. (2006) analizaron los estiletes de individuos de *Octopus pallidus*, criados en laboratorio y de edad conocida, en Tasmania, Australia, y validan la periodicidad diaria de la formación de los incrementos en los estiletes. No obstante, recomiendan más estudios con otras especies de pulpos, al ser un estudio preliminar, y así como mejorar los métodos para la preparación de estiletes.

Barratt y Allcock (2010) proponen una nueva metodología para la preparación permanente de estiletes en las especies de pulpos *Octopus vulgaris*, *Eledone cirrhosa*, *Bathypolypus sponsalis* y *Megaleledone setebos* a base de resina de baja viscosidad.

Hermosilla, et al. (2010) trabajaron con dos grupos de pulpos de *Octopus vulgaris* capturados en Vigo, España, y Nápoles, Italia. Los grupos fueron tratados con oxitetraciclina y tetraciclina respectivamente, para validar la periodicidad diaria de los incrementos en los estiletes de los organismos. De esta forma corroboran la eficacia del método basado en el uso estiletes para la evaluación del crecimiento en adultos, por lo que sugieren realizar más experimentos con organismos juveniles.

A partir de la validación en estiletes realizada por Doubleday, et al. (2006) estudios posteriores utilizan la técnica para determinar la edad y crecimiento de *Octopus pallidus* en vida silvestre, en Tasmania, Australia (Leporati, et al., 2008). Encuentran una edad máxima aproximada de 1.6 años. No encuentran diferencias en los incrementos de pulpos en cautiverio y silvestres.

Doubleday, et al. (2011) evalúan el potencial del uso de incrementos en el estilete para determinar la edad en el pulpo *Macroctopus maorum*, colectados en Australia y Nueva

Zelanda. Encontraron que los estiletes de esta especie son difíciles de preparar, por su estructura suave y quebradiza, lo que dificulta sus lecturas. Por lo tanto, sugieren el estudio de métodos alternativos para esta especie. Asimismo, resaltan la importancia de validar la edad en la formación del primer incremento de crecimiento en el estilete.

B. Picos

Hernández-López, et al. (2001) proponen un nuevo método para determinar la edad de paralarvas de *Octopus vulgaris*, basándose en el conteo de anillos del pico superior, en las Islas Canarias. A pesar de que sus datos indican una deposición diaria de anillos en las paredes laterales del pico superior, mencionan la dificultad de los conteos debida al desgaste de los picos por el uso en la vida del organismo, lo cual puede sesgar la determinación de la edad.

Perales-Raya, et al. (2010) utilizaron dos métodos para evaluar la deposición de incrementos en los picos de *Octopus vulgaris*, uno para la sección sagital rostral y otro para las superficies de la pared lateral para los picos inferiores y superiores, esto con organismos provenientes de Mauritania, Atlántico oriental. Recomiendan el uso de las superficies de la pared lateral, a pesar de obtener lecturas de edad menos precisas que con la sección sagital rostral, dado que es una técnica más simple y rápida de preparar, y además provoca una menor subestimación de la edad debido a que es una región menos susceptible a la erosión.

Canali, et al. (2011) indujeron una marca de shock térmico en pulpos silvestres de *Octopus vulgaris* capturados en verano e invierno en la Bahía de Nápoles, Italia. Encontraron una relación positiva entre el número de días transcurridos y el número de incrementos depositados en el pico a partir de la marca inducida. No hallaron relación

entre el peso de los organismos y su edad. Sus datos presentan nueva evidencia de de deposición diaria de incrementos en los picos superiores de *Octopus vulgaris*.

C. Lentes

Boyle (1983) menciona la presencia de anillos concéntricos bien definidos en los lentes de *Eledone cirrhosa*. Posteriormente Clarke (1993) menciona que en las lentes de *Sepia officinalis* se distinguen incrementos de crecimiento presentando alrededor de 5 incrementos por día.

Baqueiro-Cárdenas, et al., (2011) presentan una técnica para la observación de la estructura de los lentes en el pulpo *Enteroctopus megalocyathus* y evalúan su aplicación como herramienta para determinar la edad. Correlacionan el peso y el diámetro de las lentes con la longitud del manto, longitud total y peso. Encuentran incrementos en las lentes de los pulpos, sugieren que su formación es diaria y proponen su uso para estimaciones de edad.

III. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El pulpo *Octopus maya* es una especie endémica de la Península de Yucatán, considerado como un recurso primordial para el sector pesquero y es la especies de mayor importancia económica en la región. La obtención de información biológica de esta especie, como son datos de edad y crecimiento, es fundamental para contribuir a la explotación racional de sus poblaciones. Asimismo, es importante tener certeza de la validez de un método que permita la evaluación poblacional de la especie, tal como el uso de estructuras duras para la determinación de la edad. No obstante, aún no se cuenta con un estudio que confirme la periodicidad de los incrementos de crecimiento

en estructuras duras de los organismos de esta especie. Por lo tanto, para este estudio se plantea el siguiente objetivo general:

Validar la periodicidad en la deposición de los incrementos de crecimiento en tres estructuras duras del pulpo *Octopus maya*.

De manera particular se pretenden cubrir los siguientes objetivos:

- Determinar si la tasa de deposición de los incrementos del estilete de *Octopus maya* se presenta diariamente.
- Evaluar la tasa de deposición de los incrementos en picos y lentes de *Octopus maya* para la estimación de su edad.

Las hipótesis planteadas son las siguientes:

- La periodicidad de la formación de los incrementos en los estiletes del pulpo *Octopus maya* es de un incremento por día.
- Los incrementos en los picos y lentes del pulpo *Octopus maya* tienen la misma periodicidad en su deposición y presentan igual legibilidad que los estiletes.

CAPITULO II

Validation of growth increments in stylets, beaks and lenses as ageing tools in *Octopus maya*

Running page head: *Octopus maya* growth increments validation

Almendra Rodríguez-Domínguez¹, Carlos Rosas², Iván Méndez-Loeza¹, Unai Markaida^{1*}

¹Laboratorio de Pesquerías Artesanales, El Colegio de la Frontera Sur (CONACyT), Av. Rancho Polígono 2A, Ciudad Industrial Lerma, 24500 Campeche, México.

²Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Puerto de abrigo S/N, Sisal, Yucatán, México

* Corresponding author E-mail: umarkaida@ecosur.mx Tel. +52 (981) 1273720

ABSTRACT

Octopus hard structures have recently been used as ageing tools. Thirty-two *Octopus maya* were raised in captivity in four age groups, ranging 124 to 233 days old. Their stylets, beaks and eye lenses were analyzed in order to validate the periodicity of growth increments. Transverse sections of stylets were mounted in glycerin jelly, beaks were sagittally cut to analyze their lateral walls and eye lenses were processed by histological techniques and mounted in resin. Growth increments in each structure were observed and counted under microscope. Stylet increments were successfully validated as their counts were closely related to age in days. Beak increments from the two younger age groups showed a close relationship with age, suggesting a daily deposition. However, persistence of lower increment counts strongly suggests that not all growth increments could be counted, probably due to erosion during feeding. Eye lens increment counts did not show a relation with age, although periodicity, if any, might be subdaily. The use of stylets is recommended for *Octopus maya* growth and ageing studies as they also showed a high precision in increments counts between readers.

Key words: *Octopus maya*, Age, Stylet, Beak, Eye lens, Growth increment validation

INTRODUCTION

Age and growth estimations are important tools for the development of fisheries management. Knowing age and growth of commercially exploited species is essential for evaluating parameters as age structure, growth rate, longevity, hatching date, recruitment, survival rate of different age classes and hence contribute to the rational exploitation of populations (Campana 2001, Doubleday et al. 2006).

Octopus maya is an endemic species of the Yucatan Peninsula, Mexico. It is the third marine fishery resource by value and the seventh by volume in Mexico (CONAPESCA 2011), and is the largest octopus fishery in the Americas (FAO 2013). Age and growth of wild populations have been estimated through indirect methods such as mantle length (ML) modal analysis (Arreguín-Sánchez 1992, Nepita-Villanueva and Defeo 2001). They suggest larger longevities (1-2.5 years) than those observed under culture (1 year, Van Heukelem 1983). High individual variability in octopus growth produces a lack of relationship between their size and age (Van Heukelem 1983, Semmens et al. 2004, Leporati et al. 2008), stressing the need of direct ageing tools.

Direct methods for age estimation have been recently implemented in octopus through the analysis of hard structures. Stylets represent the vestigial shell in octopods (Bizikov 2004) and their growth increments have been analyzed in several studies (Sousa Reis & Fernandes 2002, Leporati et al. 2008, Doubleday et al. 2006). Daily deposition of these increments have been validated in known-age *Octopus pallidus* (Doubleday et al. 2006) and using tetracycline stains in *Octopus vulgaris* (Hermosilla et al. 2010). Growth increments in octopus upper beaks have been studied mainly in *O. vulgaris* (Raya &

Hernández-González 1998, Hernández-López et al. 2001, Perales-Raya et al. 2010, Canali et al. 2011). Daily deposition has been confirmed in their paralarvae (Hernández-López et al. 2001), and adults (Canali et al. 2011). A recent study validated the increments in young (≤ 122 days old) *O. maya* (Villegas-Bárcenas et al. in press). Clarke (1993) and Baqueiro-Cárdenas et al. (2011) described and counted concentric lines in the eye lenses of *Sepia officinalis* and *Enteroctopus megalocyathus*, respectively, suggesting its possible use for age estimation.

A validated direct method to determine *Octopus maya* age would improve population evaluations, from its biology and ecology to fisheries management (Campana 2001, Doubleday et al. 2006, Hermosilla et al. 2010). In this sense the aim of this study is to validate the periodicity of deposition of the increments in stylets, beaks and eye lenses of *Octopus maya* for age estimations.

MATERIALS AND METHODS

Specimen collection. *O. maya* produces large, benthic hatchlings which has favored its use for cultivation studies (Domingues et al. 2012, Rosas et al. 2012). Thirty-two *Octopus maya* individuals were raised in captivity from four females at different periods, conforming four age groups: Group 1, n = 5, 124 days; Group 2, n = 6, 162 days; Group 3, n = 14, 208 days; and Group 4, n = 7, 233 days. Each age group was kept in a circular tank (5 m in diameter) with an open sea water flow and a recirculation system (each age group was kept in a different tank) at ambient water temperature and natural photoperiod. Three PVC tubes per animal were placed in each tank as a refuge. Groups 1 and 2 were fed twice a day with a soft paste made of shrimp and squid (Rosas et al.

2012), while group 3 and 4 were initially fed with soft paste and then diet was switched to frozen blue crabs (*Callinectes* sp.). Octopuses of each group were sacrificed simultaneously using 5 % ethanol in seawater as terminal anesthesia (Moltschaniwskyj et al. 2007) and their body weight (BW) was measured to the nearest g.

Structure preparation. Stylets were extracted using watchmaker forceps and surgical scissors. They were placed in labeled histocassettes and preserved in 4% formalin. To avoid dehydration, stylets were washed with fresh water prior to cutting. They were weighed and their anterior, posterior and total lengths and central width were measured (Doubleday et al. 2006). Stylets were prepared following Bizikov's (1996) technique, placing them between two polystyrene blocks (1.0 cm x 1.5 cm x 5.0 cm) corresponding to the size of the stylet. They were cut by hand with a razor blade in the bending region or near it (Doubleday et al. 2006). Several cuts were made in each stylet and they were mounted in glycerol jelly on a microscope slide. A small amount of jelly was placed in a slide and heated until it melted (avoiding boiling). Stylet sections were embedded in the jelly and a coverslide was placed on (Bizikov 1996, Doubleday et al. 2006). Samples were observed at 400x magnification with a compound microscope. Increments were counted from the first visible increment surrounding the nucleus (considered the first post-hatch increment, Doubleday et al. 2006) to the stylet periphery with a hand counter. Beaks were removed and placed in labeled histocassettes and kept in water at 4 °C in a refrigerator. Upper beaks were weighed and the following measures were taken: hood length, rostral length, crest length and height (Raya & Hernández-González 1998, Perales-Raya et al. 2010). The outer section (crest and hood) of the upper beaks was sagittally cut with scissors; each section was clean by hand with water to remove the

mucus inside the beak (Hernández-López et al. 2001). Increments were counted under a stereoscopic microscope at 50x magnification and a hand counter from the rostral tip to the opposite end of the lateral wall (Hernández-López et al. 2001). Beak was left to dry prior counting to allow the visibility of increments.

Eye lenses were extracted and processed following Luna's (1968) technique with some modifications, significantly shortening preparation time in developed by Baqueiro-Cárdenas et al. (2011) (Table 1). Fixation and decalcification solutions were prepared as in Luna (1968). Eye lenses embedded in paraffin cubes were placed in distilled water from one to two days for softening. Sections of 7 μm were cut using a LEICA rotary microtome. Sections were placed in a water bath at 40–45 °C for stretching and then mounted on a slide. Samples were stained with Harry's hematoxylin eosin protocol (modified from Luna 1968 and López-Ripoll 2010) (Table 2), mounted with J.T. Baker polymer resin and covered with a coverslide. Samples were left to dry for one day. Increment counting was not possible to be done under microscope as contiguous increments were hard to appreciate. Furthermore, in several samples increments could not be visualized until photos were taken and edited. Digital photos were taken using a Nikon Eclipse E600 compound microscope with a DS-5M-L1 camera at 400x magnification. To improve the visibility of the increments, photos were edited using Picasa 3 program. Increments counting were performed manually on the screen.

Increments counting in the three structures were performed by two independent readers. Each reader counted the increments at least two times, with the exception of eye lenses, which were read only once. Growth increment widths in some samples of all structures

were measured in characteristic regions: anterior or inner, mid-region and posterior or outer.

Data analysis. Counts were compared to determine the reproducibility of the procedure (Campana 2001). Coefficient of variation (CV) (Chang 1982) was calculated as a measure of precision and reproducibility of any pair of readings. Count pairs with CV < 10% were taken as valid and their averages were considered as the number of increments for a given octopus sample. CVs for each age group were averaged (Campana et al. 1995) to detect any bias by age.

Increments counts in the three structures were related to octopus age in days through a linear regression. Regression slopes were tested if they were not significantly different from one (an increment per day hypothesis) with a Student's two tailed *t*-test following Zar (1984). The one sample Kolmogorov-Smirnov test was used to assess normal distribution and Levene's test for homogeneity of variances. When normality and/or homogeneity of variances were not satisfied a Spearman's correlation test was performed.

Regression analysis was used to determine if there was any relationship between octopus age and BW and selected stylet (Doubleday et al. 2006) and upper beak (Perales-Raya et al. 2010) morphometric measurements.

RESULTS

All stylets and upper beaks were readable, except for one broken beak. Seven samples of eye lenses had to be discarded because defective preparation, while other four samples were discarded due to poor readability.

Stylets presented regular, well defined increments, with four distinctive regions as defined by Doubleday et al. (2006): an elliptic, embryonic nucleus, 20–50 μm in largest diameter and 20–35 μm in shortest diameter; an inner region with narrow increments (mean \pm S.D.: 3 ± 0.4 μm); a mid-region with broad increments (4 ± 0.1 μm); and an outer region with narrower increments (3 ± 0.4 μm) (Fig. 1A).

Upper beaks show distinct first order growth increments. Increment width was smaller in the anterior region (30 ± 4 μm) and greater at the mid-region (50 ± 6 μm) than in the posterior region (40 ± 3 μm). Smaller order increments were visible in the lateral walls of the structure (Fig. 1B).

Eye lenses increments were readily visible as very regular, defined marks, with no second order increments. The nucleus is a well define structure 30–40 μm in diameter. Increments width was maximum in the inner region (9 ± 0.9 μm) and it decreased to 3 ± 1 μm at the mid-region and to 1 ± 0.3 μm at the outer region (Fig. 1C).

Mean values of CV between pairs of counts did not differ greater than 10% for any age group in stylets and lenses (Table 3). Counts in beaks yielded CVs larger than 10% in the two older age groups, suggesting a bias between readers.

Mean increment counts from stylets show a significant positive relationship with octopus age ($r^2 = 0.9754$, $p < 0.001$) and the slope of the regression did not differ from 1 (one increment per day) (two-tailed t -test, $t = -0.931$, $df = 60$, $p > 0.05$) (Fig. 2A).

Upper beak increment counts were consistently smaller than octopus age in days (Fig. 2B). Readers disagreed in counts in the older two groups, showing a bias. Reader 2 counts showed a closer agreement with octopus age, ($r^2 = 0.9012$, $p < 0.001$), but the slope was significantly different from 1, ($t = -4.175$, $df = 58$, $p < 0.001$). Considering two

younger age groups alone, average increment counts from both readers showed a close relationship with octopus age ($r^2 = 0.8092$, $p < 0.001$) and the slope did not differ from 1 ($t = -2.083$, $df = 18$, $p > 0.05$). This strongly suggests that growth increments are deposited daily in upper beaks, although not all increments were visible, especially in older specimens.

Growth increment number in eye lenses greatly varied from 400 to >800 between octopus of the same age group. Accordingly, there was no significant relationship with octopus age ($r^2 = 0.0067$, $p > 0.05$). Increments number was consistently much larger than octopus age in days. Lenses from age groups 3 and 4 showed less variation in increment numbers, yielding a mean of 2.7 ± 0.3 increments per day, which suggest that their formation is subdaily (Fig. 2C).

Stylets dimensions showed a positive significant relationship with octopus age and BW. The relationship between stylet weight and age had the highest coefficient of determination. The relationship between BW and stylet posterior length, center width and weight presented high determination coefficients (Table 4). All upper beak measurements presented a positive significant relationship with age and BW, except for rostral length (Table 5). This beak dimension showed no significant relationship with age and it was significant but weak with BW. These relationships indicate that stylets and beaks grow in harmony with somatic growth.

DISCUSSION

Stylets. This study successfully validated the daily periodicity of increments formation in stylets of cultivated adult *Octopus maya* from 124 to 233 days old, which represents

from a third to two thirds of the life span of these yearly invertebrates (Van Heukelem 1983). Similar validation was obtained by Doubleday et al. (2006) for *Octopus pallidus* in a comparable age range. Precision levels between counts in each reader replica and between both readers were high, with CV values lower than 10%, usually acceptable for cephalopods ageing studies (Doubleday et al. 2006, Hermosilla et al. 2010, Perales-Raya et al. 2010). Hermosilla et al. (2010) successfully validated increments laid in the last 6-21 days in adult *O. vulgaris* stylets. However, low increment counts in stylets of several merobenthic octopus species are thought to produce age underestimation (Baqueiro-Cárdenas et al. 2011, Doubleday et al. 2011). Age validation during the last few days does not guarantee that all increments are discernible in stylets of merobenthic octopus.

Since natural conditions were replicated it is unlikely that laboratory conditions had affected the daily increment deposition. Doubleday et al. (2006) and Hermosilla et al. (2010) have proven that temperature does not affect stylets deposition. Bettencourt & Guerra (2001) found that the effect of temperature or light is insignificant for increments periodicity in the statoliths of *Sepia officinalis* and Canali et al. (2011) found that temperature does not affect increments deposition in the beaks of *Octopus vulgaris*. This suggests that increments periodicity deposition is controlled by an endogenous circadian rhythm as suggested by Doubleday et al. (2006) for stylets, Bettencourt & Guerra (2000) for statoliths and Campana & Neilson (1985) for fish otoliths.

Formalin at 4% showed to be a good preserving method for stylets. However we found that samples stored for more than two months are difficult to cut properly. Octopuses from age group 3 were frozen prior to stylet extraction, and although some cracks were

visible (as found by Barrack & Allcock 2010) it did not affect increment visibility and counting. However freezing effect on stylets merits further research (Hermosilla et al. 2010).

Bizikov's technique used in this study for preparing and mounting stylets is easy to use. It allows direct observation on mounted samples which allows continuous focusing, so increments are easy to count. It avoids time consuming preparations and the use of expensive image analysis systems (Doubleday et al. 2006, Barratt & Allock 2010). Samples mounted on glycerin jelly can be stored for future references and increments are visible for several months. In tropical weather, however, high temperatures might evaporate phenol and humidity promotes fungal growth on the jelly, thus preparations should be kept in a dry, cold environment.

The limit of this technique is given by a minimum stylet size. Sharp cuts in hatchlings of *Octopus maya* have not been able to perform, and our smallest stylet successfully prepared was 13 mm total length (124 days old).

Beaks. Daily formation of increments in upper beaks of *Octopus maya* could not be properly validated in all age groups. Close agreement between growth increments and age in the younger age classes strongly suggest that they are laid daily, as found in *O. vulgaris* (Hernandez-López et al. 2001, Canali et al. 2011) and in *O. maya* of up to 122 days old (Villegas-Bárcenas et al. in press).

Persistence of underestimation of age through counts of increments strongly suggests that not all increments are visible. This bias is enhanced with octopus age. A feasible explanation is that erosion of beak rostral area used for feeding during animal life may prevent to view all increments, leading to age underestimation (Hernandez-López et al.

2001, Perales-Raya et al. 2010, Canali et al. 2011). Lack of relationship between age and upper rostral length supports this fact. Beak increments can be fully counted in octopus paralarvae, where erosion is minimum (Hernandez-López et al. 2001) or on young octopus feed with a soft paste (Villegas-Bárcenas et al. in press).

Our younger animals, comparable in age to the older octopus raised by Villegas-Bárcenas et al. (in press), were also fed exclusively with paste, while diet of our older groups switched towards crabs at some point. This difference could further account for the bias observed in counts among age groups. We have observed even more acute erosion in rostrums from *Octopus maya* caught in the wild, as mollusk shells middens are commonly observed in their dens. Whether beaks can be used as ageing tools in wild octopus populations is dubious. Validation as ageing tools of these structures during short, recent periods (Hernandez-López et al. 2001, Canali et al. 2011) or performed on young individuals feed with soft diets (Villegas-Bárcenas et al. in press) does not guarantee that they could be used to determine age in octopus from wild populations, as not all increments could be observed in their eroded beaks. Future validation experiments should consider counting increments along the whole beak before promoting its use as ageing tools.

In addition, significant bias was found between both readers in the counting of beak increments from older age groups. Increments were difficult to observe in the thickenings areas found in the lateral wall of several beaks. They were better defined close to the inner free border of the lateral wall. The occurrence of 'false increments' have been also reported as cause of bias (Canali et al. 2011). Counts made by the more

experienced reader showed a closer agreement with age, and thus working with this structure demands some training.

Cephalopod beaks are attractive as ageing tools as they contain wide increments easily visualized under a stereoscope and no laborious preparation is needed. They can be easily stored in cold water. However beak should be left to dry before increment observation and lateral wall borders may shrink and deform, complicating increment counting. Beaks extracted from frozen octopus did not exhibit any difference from those taken fresh so facilitating the sampling from wild populations.

Eye lenses. Growth increment deposition could not be validated for eye lenses, as there was no such relationship between age and increment numbers, which greatly fluctuated among octopus of the same age group. Bettencourt and Guerra (2000) found out that lens increments are not related with age and growth in the cuttlefish, *Sepia officinalis*, so increment laying periodicity in lenses could vary individually. Another reason for this variation could be that eye lenses cuttings were not uniformly achieved in each sample in a way to ensure that all increments could be counted, leading to a high variation in increment counting.

Lens increments in all cases at least doubled the number of days of octopus age, and averaged 2.7 in older age groups. This strongly suggests that the regular, definite increments found in octopus eye lenses are laid subdaily. An average of five increments per day are laid in the cuttlefish *Sepia officinalis* (Clarke 1993). Baqueiro-Cárdenas et al. (2011) suggest deposition is daily in *Enteroctopus megalocyathus*. These authors found that embryonic octopus lenses show increments. Even extracting the 60 days at

hatching in *O. maya* (Van Heukelem 1983) to our counts, they could not account for a daily formation of increments.

The modification from Luna's (1968) technique showed good results since the increments could be observed and the times were reduced. Distilled water for softening lenses before cutting showed to be a good method. The eye lenses that came from frozen organisms were harder to remove, but visibility of the increments was not affected. However lens preparation is elaborate, time consuming and not all samples could be properly prepared for observation. Nowadays, lens increments are regular and clear to visualize and thus attractive to be potentially used as ageing tools. Further studies are needed if growth increments show any subdaily periodicity, including the number formed during the embryonic life of *Octopus maya* in regard to validate the use of eye lenses as ageing tools.

We tested three different hard structures to be used as ageing tools in *O. maya*. We counted growth increments along all the structure of adult octopus, covering their entire postembryonic life, as a premise to replicate same conditions in wild specimens. Stylets were proven to be most efficient structure for ageing evaluations since they show high precision in increment counts which represent daily depositions. In addition their preparation is simple, easy to visualize and allows sample storage for large periods. Therefore the use of this structure is recommended in *O. maya* ageing evaluations.

Acknowledgements

We greatly appreciate Slava Bizikov's encouragement on working with octopus stylets and his advice for stylet preparation. We also are indebted with Francisco Rocha and

Catalina Perales-Raya for their suggestions on sample observations. We would also like to thank Claudia Caamal-Monsreal for her technical support with octopus rearing; Guadalupe Villegas for her advice on beaks measurements and Estefany López-Ripoll for her support and suggestions in the preparation of eye lens histological samples. The present study constituted first author's M. Sc. thesis during its completion she enjoyed a CONACYT grant. This study was partially financed by UNAM-PAPIIT Program through project IN212012 to CR.

References

Arreguín F (1992) Growth and seasonal recruitment of the octopus (*Octopus maya*)

fishery from the Campeche Bank, caught by the artisanal fleet. NAGA 15: 31-34

Barratt IM, Allcock AL (2010) Ageing octopods from stylets: development of a technique

for permanent preparations. ICES J Mar Sci 67:1452–1457

Bettencourt V, Guerra A (2000) Growth increments and biomineralization process in

cephalopod statoliths. J Exp Mar Biol Ecol 248:191–205

Bettencourt V, Guerra A (2001) Age studies based on daily growth increments in

statoliths and growth lamellae in cuttlebone of cultured *Sepia officinalis*. Mar Biol

139:327–334

Bizikov VA (1991) A new method of squid age determination using the gladius. In:

Jereb P, Ragonese S, Boletzky Sv (eds) Squid age determination using statoliths.

Proceedings of the International Workshop, Istituto di Tecnologia della Pesca e del

Pescato (ITPP-CNR), Mazara del Vallo, Italy, 9–14 October 1989. NTR-ITPP Special

Publication 1, p 39-51

- Bizikov VA (1996) Atlas of morphology and anatomy of the gladius of squids. VNIRO Publishing, Moscow
- Bizikov VA (2004) The shell in Vampyropoda (Cephalopoda): morphology, functional role and evolution. *Ruthenica* 3:1–88
- Campana SE (2001) Accuracy, precision and quality control in age determination, including a review of the use and abuse of age validation methods. *J Fish Biol* 59:197-242
- Campana SE, Annand MC, Mcmillan JI (1995) Graphical and statistical methods for determining the consistency of age determinations. *Trans Am Fish Soc* 124:131–138
- Campana SE, Neilson JD (1985) Microstructure of fish otholiths. *Can J Fish Aquat Sci* 42:1014–1032
- Chang WY (1982) A statistical method for evaluating the reproducibility of age determination. *Can J Fish Aquat Sci* 39:1208-1210
- Clarke MR (1993) Age determination and common sense. In: Okutani T, O'Dor RK, Kuborera T (eds) *Recent Advances in Cephalopod Fisheries Biology*. Tokai University Press, Tokyo, p 670-678
- CONAPESCA (2011) Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2010. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca.
www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario2010 (accessed May 30 2013)
- Domingues P, López N, Rosas C (2012) Preliminary trials on the use of large outdoor tanks for the ongrowing of *Octopus maya* juveniles. *Aquac Res* 43: 26-31
- Doubleday Z, Semmens JM, Pecl G, Jackson G (2006) Assessing the validity of stylets as ageing tools in *Octopus pallidus*. *J Exp Mar Biol Ecol* 338: 35–42

FAO (Food and Agriculture Organization) (2013) FISHSTAT Plus (v. 2.30), Capture Production Database 1950–2011. www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat/en (accessed May 30 2013)

Hermosilla CA, Rocha F, Fiorito G, Gonzalez AF, Guerra A (2010) Age validation in common octopus *Octopus vulgaris* using stylet increments analysis. ICES J Mar Sci 67: 1458-1463

Hernández-López JL, Castro-Hernández JJ, Hernández-Gracia V (2001) Age determined from the daily deposition of concentric rings on common octopus (*Octopus vulgaris*) beaks. Fish Bull 99:679-684

Leporati SC, Semmens JM, Pecl GT (2008) Determining age and growth of wild octopus using stylet increment analysis. Mar Ecol Prog Ser 367:213-222

López-Ripoll ER (2010) Descripción del desarrollo y el efecto de la alimentación en la estructura de la glándula digestiva de juveniles temprano de *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) Voss y Solís-Ramírez, 1966. Bachelor dissertation, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Santa Marta, Colombia

www.academia.edu/3234164/Descripcion_del_desarrollo_y_el_efecto_de_la_alimentacion_en_la_estructura_de_la_glandula_digestiva_de_juveniles_tempranos_de_Octopus_maya_Mollusca_Cephalopoda_Voss_y_Solis-Ramirez_1966 (accessed June 04 2013)

Luna GL (1968) Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. McGraw-Hill, New York

Nepita-Villanueva MR, Defeo O (2001) Crecimiento del pulpo *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) de la costa de Yucatán, México: un análisis de largo plazo. Rev Biol Trop 49: 93-101

Raya CP, Hernández-González CL (1998) Growth lines within the beak microstructure of the octopus *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797. *S Afr J Mar Sci* 20:135–142

Rosas C, Valero A, Caamal-Monsreal C, Uriarte I, Farías A, Gallardo P, Sánchez A, Domingues P (2012) Effects of dietary protein sources on growth, survival and digestive capacity of *Octopus maya* juveniles (Mollusca: Cephalopoda). *Aquac Res* 44:1029–1044

Semmens JM, Pecl G, Villanueva R, Jouffre D, Sobrino I, Wood JW, Rigby P (2004) Understanding octopus growth: patterns, variability and physiology. *Mar Fresh Res* 55:367–377

Sousa Reis C, Fernandes R (2002) Growth observations on *Octopus vulgaris* Cuvier, from Portuguese waters: growth lines in the vestigial shell as possible tools for age determination. *Bull Mar Sci* 71:1099–1101

Van Heukelem WF (1983) *Octopus maya* In: Boyle PR (ed) *Cephalopod Life Cycles* Vol I. Academic Press, London, p 311-323

Villegas-Bárcenas G, Perales-Raya C, Bartolomé A, Almansa E, Rosas C (in press) Age validation in *Octopus maya* (Voss and Solís, 1966) by counting increments in the beak sections of known age individuals. *Fish Res*

Zar JH (1984) *Biostatistical analysis*. Pearson Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey

TABLES

Table 1. *Octopus maya*. Eye lens preparation for paraffin inclusion histological technique (modified from Luna 1968).

Table 2. *Octopus maya*. Eye lens section staining with modified Harry's hematoxylin eosin protocol (modified from Luna 1968 and López-Ripoll 2010). * indicates 2 or 3 seconds

Table 3. *Octopus maya*. Precision of readers (mean coefficient of variation, CV, in each age group) for increment counts of each reader and among both readers. Lens increments were counted only once by each reader

Table 4. *Octopus maya*. Regression equations for the relationships between octopus age (days) and weight (BW, g) and stylet lengths (mm) and weight (g). AL: Anterior stylet length; PL: Posterior stylet length; TL: Total stylet length; CW: Center stylet width; SW: Stylet weight

Table 5. *Octopus maya*. Regression equations for the relationships between octopus age (days) and weight (BW, g) and beak lengths (mm) and weight (g). UCL: Upper crest length; UHL: Upper hood length; URL: Upper rostral length; UBH: Upper beak height; UBW: Upper beak weight. *Indicates Spearman's r correlation coefficient

Table 1. *Octopus maya*. Eye lens preparation for paraffin inclusion histological technique (modified from Luna 1968)

Process	Step	Reagent	Time
Fixation	1	Neutral formalin	72 h
	Optional	Ethanol, 70% for conservation	
	2	Tap water	72 h
Decalcification	3	Decalcifying solution (sodium citrate solution and formic acid solution)	24 h
	4	Decalcifying solution	24 h
	5	Tap water	24 h
Dehydration	6	Alcohol, 95%	1.5 h
	7	Alcohol, 95%	30 min
	8	Alcohol, 95%	30 min
	9	Alcohol, 100%	30 min
	10	Alcohol, 100%	30 min
	11	Alcohol, 100%	30 min
Clearing	12	Ultraclear	30 min
	13	Ultraclear	1 h
Impregnating	14	Paraffin	1 h
	15	Paraffin	1 h
	16	Paraffin	2 h

Table 2. *Octopus maya*. Eye lens section staining with modified Harry's hematoxylin eosin protocol (modified from Luna 1968 and López-Ripoll 2010) * indicates 2 or 3 seconds

Process	Step	Reagent	Time
Deparaffinization	1	Ultraclear	10 min
	2	Ultraclear	10 min
Hydration	3	Alcohol, 100%	5 min
	4	Alcohol, 95%	5 min
	5	Distilled water	10 min
Staining	6	Harris hematoxylin	4 min
	7	Tap water	5 min
	8	Acidic water, 1% of phosphomolybdic acid	3 soakings*
	9	Distilled water	Soaking*
	10	Eosin	1 min
	11	Distilled water	3 soakings*
	12	Acidic water, 1% of glacial acetic acid	3 soakings*
Dehydration	13	Distilled water	3 soakings*
	14	Alcohol, 95%	2 min
	15	Alcohol, 100%	2 min
Clearing	16	Alcohol, 100%	2 min
	17	Ultraclear	5 min
	18	Ultraclear	5 min

Table 3. *Octopus maya*. Precision of readers (mean coefficient of variation, CV, in each age group) for increment counts of each reader and among both readers. Lens increments were counted only once by each reader

Structure	Group	Mean CV		
		Reader1	Reader2	Average
Stylets	1	3.74	4.41	4.76
	2	3.37	3.46	6.84
	3	4.26	3.99	3.68
	4	3.09	4.08	3.91
Beaks	1	4.44	3.08	4.55
	2	2.96	5.10	6.31
	3	3.91	1.91	26.13
	4	2.72	5.40	17.20
Lenses	1	-	-	4.64
	2	-	-	1.12
	3	-	-	4.48
	4	-	-	3.59

Table 4. *Octopus maya*. Regression equations for the relationships between octopus age (days) and weight (BW, g) and stylet lengths (mm) and weight (g). AL: Anterior stylet length; PL: Posterior stylet length; TL: Total stylet length; CW: Center stylet width; SW: Stylet weight

Relationship	<i>n</i>	Equation	S.E.	<i>r</i>²	<i>p</i>
Age vs. AL	28	$y = -1.4423 + 0.0538 * x$	2.111	0.4815	<0.0001
Age vs. PL	30	$y = 0.5685 + 0.0917 * x$	3.257	0.5207	<0.0001
Age vs. TL	28	$y = -0.8668 + 0.1424 * x$	17.442	0.6657	<0.0001
Age vs. CW	29	$y = -0.1872 + 0.01 * x$	0.308	0.5966	<0.0001
Age vs. SW	32	$y = -2.917 + 0.0078 * x$	0.136	0.8999	<0.0001
BW vs. AL	14	$y = (17.8779) * x^{(1.34521)}$	1.030	0.1466	<0.01
BW vs. PL	16	$y = (0.090554) * x^{(2.8693)}$	0.613	0.6687	<0.0001
BW vs. TL	14	$y = (0.030018) * x^{(2.87518)}$	0.860	0.5167	<0.0001
BW vs. CW	16	$y = (105.743) * x^{(1.99512)}$	0.438	0.6944	<0.0001
BW vs. SW	18	$y = 0.0039 + 0.0001 * x$	0.010	0.6604	<0.0001

Table 5. *Octopus maya*. Regression equations for the relationships between octopus age (days) and weight (BW, g) and beak lengths (mm) and weight (g). UCL: Upper crest length; UHL: Upper hood length; URL: Upper rostral length; UBH: Upper beak height; UBW: Upper beak weight. *Indicates Spearman's *r* correlation coefficient

Relationship	<i>n</i>	Equation	S.E.	<i>r</i> ²	<i>p</i>
Age vs. UCL	32			0.8285*	<0.0001
Age vs. UHL	32	$y = 0.5007 + 0.0014 * x$	0.049	0.5165	<0.0001
Age vs. URL	32	$y = 2.0387 + 0.0027 * x$	0.394	0.0553	>0.05
Age vs. UBH	32	$y = 2.1263 + 0.036 * x$	1.038	0.6051	<0.0001
Age vs. UBW	30			0.8130*	<0.0001
BW vs. UCL	18	$y = (0.209207) * x^{(2.78607)}$	0.272	0.9086	<0.0001
BW vs. UHL	18	$y = (2.30056) * x^{(2.76705)}$	0.302	0.8403	<0.0001
BW vs. URL	18	$y = (242.262) * x^{(0.269918)}$	1.571	0.0011	<0.001
BW vs. UBH	18	$y = (0.325458) * x^{(3.0709)}$	0.276	0.9194	<0.0001
BW vs. UBW	18			0.8902*	<0.0001

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *Octopus maya*. Growth increments in three hard structures. (A) transverse section of the stylet, showing nucleus, inner and mid-region (200x), B) inner surface of the lateral wall from the upper beak (50x) and C) eye lens section showing nucleus and inner region (400x)

Figure 2. *Octopus maya*. Relationship between the age of the octopus and A) stylets growth increment mean numbers for reader 1 (•) and 2 (◇) for each age group (with standard deviation, SD bars), the linear regression was fitted to the means between both readers counts for each octopus; B) upper beak increment mean numbers for reader 1 (•) and 2 (◇), with SD bars for each age group. Continuous line is the fitting to the means between both readers for each octopus in the two younger age groups. Dashed line represents the hypothetic 1:1 relationship; C) eye lens increments mean numbers between both readers for each individual octopus; SD not shown

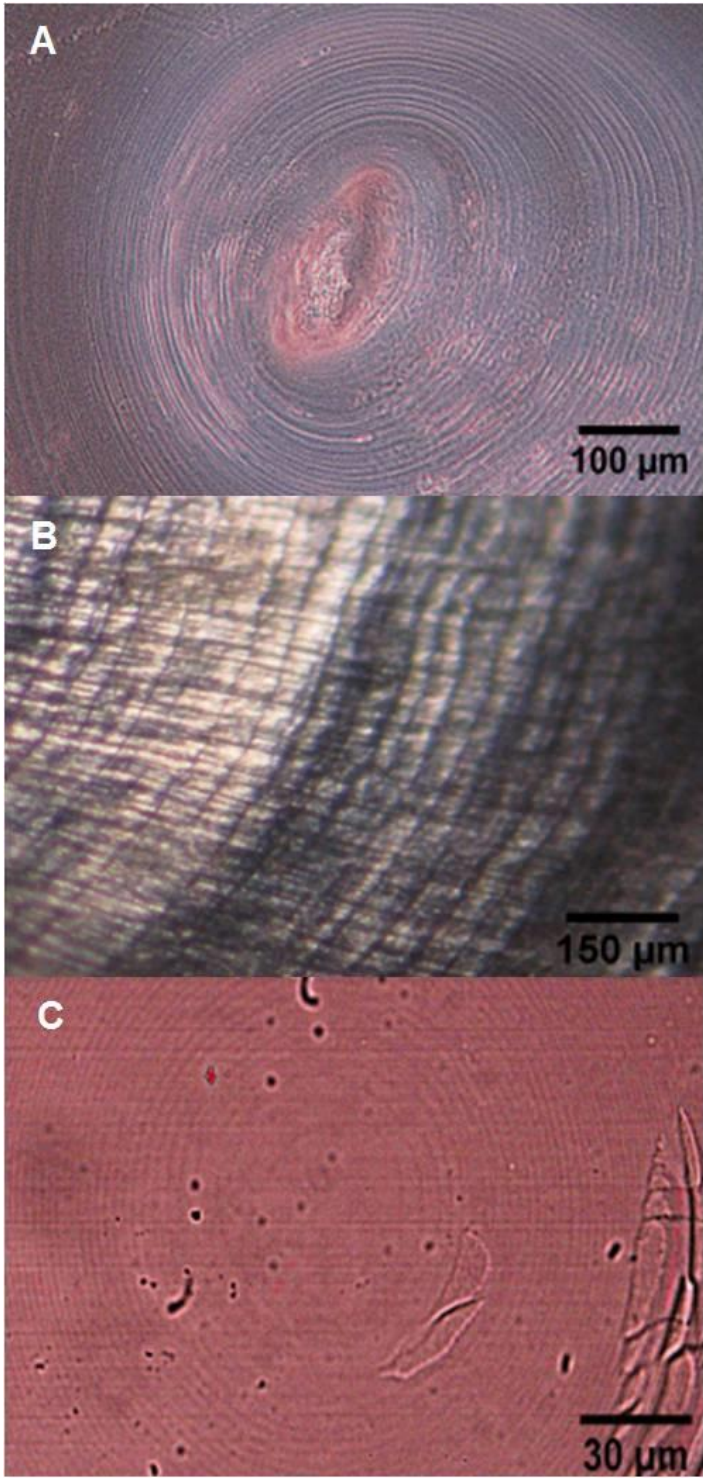


FIGURE 1

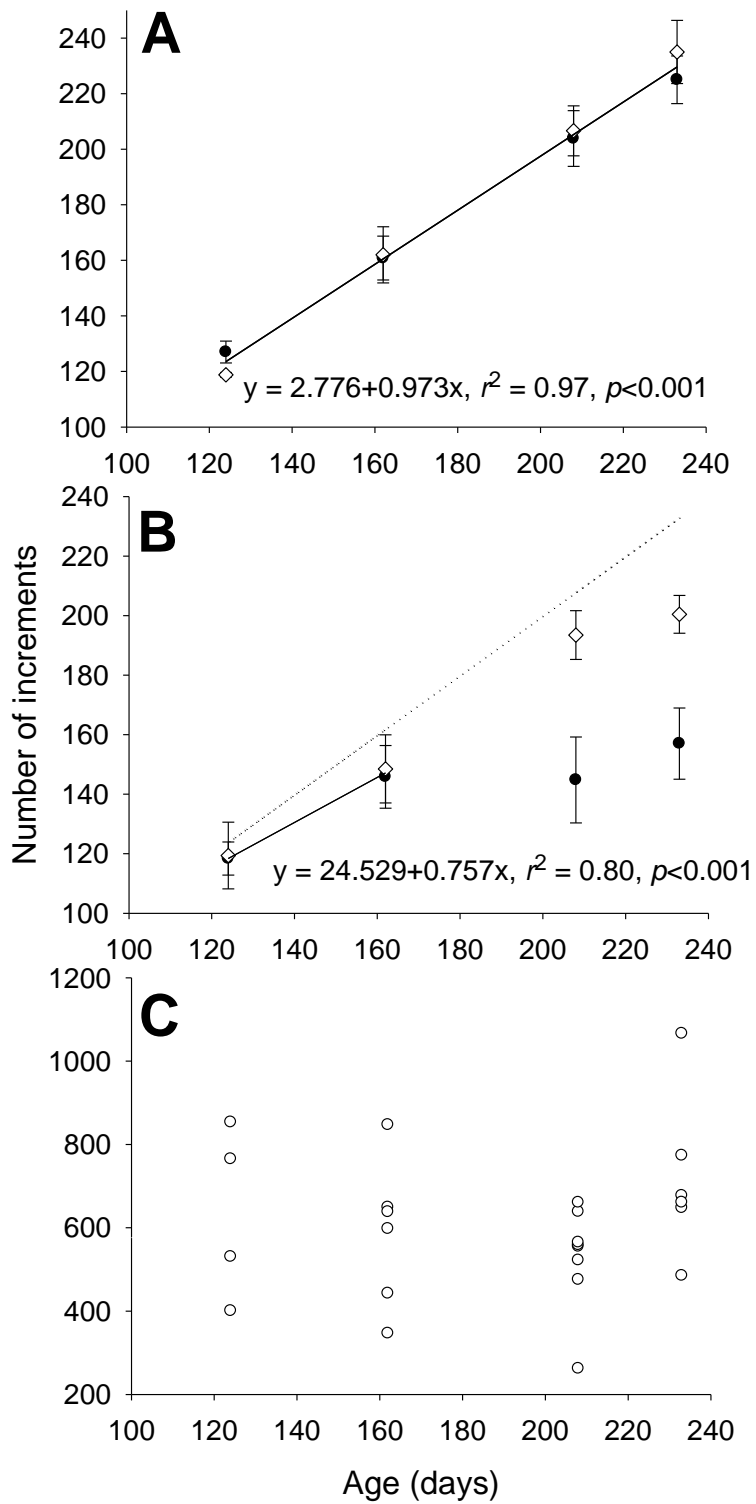


FIGURE 2

CAPITULO III

CONCLUSIONES

Se analizó el uso de tres estructuras duras en *Octopus maya* como herramientas para determinar la edad. A partir del conteo de incrementos de crecimiento se logró validar la periodicidad diaria en la formación de los incrementos en estiletes. Estas estructuras presentaron una relación más cercana con la edad del organismo y una mayor precisión en los conteos entre ambos lectores, en comparación con los picos y las lentes.

Los picos no son una estructura adecuada para la determinación de la edad de *Octopus maya*, dado que el desgaste en su rostro imposibilita la lectura de todos los incrementos a través de la estructura. Por lo tanto, no se logró validar la formación diaria de incrementos en todos los grupos de edad.

Las lentes no presentaron un patrón claro en la periodicidad de formación de los incrementos. En todo caso, el gran número de incrementos sugiere que su deposición es subdiaria. Se requieren más estudios para validar el uso de esta estructura en estudios de edad en pulpos.

Se recomienda el uso de estiletes para evaluaciones de edad de *Octopus maya* al ser la estructura validada donde además se obtuvo una mayor precisión en los conteos y que presenta una técnica sencilla que permite el almacenamiento y la visualización directa de las muestras.

LITERATURA CITADA:

- Almonacido-Rioseco, E., et al., 2009. Sex identification and biomass reconstruction from the cuttlebone of *Sepia officinalis*. *Marine Biodiversity Records*, 2, pp. 1-5.
- Arkhipkin, A.I. 1991. Methods for cephalopod age and growth studies with emphasis on statolith ageing techniques. In P. Jereb, S. Ragonese y S. v. Boletzky, eds. Squid age determination using statoliths, pp. 11-17. Proceedings of the international workshop, 9-14 October 1989, Istituto di Tecnologia della Pesca e del Pescato, N.T.R.-I.T.P.P. Publ. Especial No.1, Mazara del Vallo, Sicilia, Italia. 127 p.
- Baqueiro-Cárdenas, E.R., et al., 2011. Eye lens structure of the octopus *Enteroctopus megalocyathus*: evidence of growth. *Journal of Shellfish Research*, 30 (2), pp. 199-204.
- Barratt, I.M. y Allcock, A.L. 2010. Ageing octopods from stylets: development of a technique for permanent preparations. *ICES Journal of Marine Science*, 67, pp. 1452–1457.
- Bettencourt, V. y Guerra, A., 2000. Growth increments and biomineralization process in cephalopod statoliths. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 248, pp. 191–205.
- Bizikov, V.A., 1996. *Atlas of morphology and anatomy of the gladius of squids*. Moscu: VNIRO Publishing.
- Botello, R.M, Villaseñor, T.R. y Rodríguez, M.F., 2010. Ordenamiento de pesquerías por recursos estratégicos de México, Tomo I. comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), México, 300 p.

- Boyle, P.R., 1983. *Eledone cirrhosa* Cephalopod Life Cycles, Vol. 1. Species Accounts. Pp on: 365-386. Academic Press, London.
- Boyle, P. y Rodhouse, P., 2005. *Cephalopods: ecology and fisheries*. Oxford: Wiley-Blackwell.
- Caddy, J.F., 1991. Daily rings on squid statoliths: an opportunity to test standard population models? In P. Jereb, S. Ragonese y S. v. Boletzky, eds. Squid age determination using statoliths, pp. 53-66. Proceedings of the international workshop, 9-14 October 1989, Istituto di Tecnologia della Pesca e del Pescato, N.T.R.-I.T.P.P. Publ. Especial No. 1, Mazara del Vallo, Sicilia, Italia. 127 p.
- Campana, S.E., 2001. Accuracy, precision and quality control in age determination, including a review of the use and abuse of age validation methods. *Journal of Fish Biology*, 59, pp. 197-242.
- Campana, S.E. y Neilson, J.D., 1985. Microstructure of fish otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 42, pp. 1014-1032.
- Canali, E., et al., 2011. Evaluating age in *Octopus vulgaris*: estimation, validation and seasonal differences. *Marine Ecology Progress Series*, 441, pp. 141-149.
- Clarke, M.R., 1993. Age determination and common sense. In: Recent Advances in *Cephalopod Fisheries Biology* (eds. Okutani, T., O'Dor, R.K. and Kuborera, T.) pp. 670-678. Tokay Univ. Press, Tokyo.
- Clarke, M.R., 1996. The Role of Cephalopods in the World's Oceans: An Introduction. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 351, pp. 979-983.
- CONAPESCA, 2011. Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2010. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca.

www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario2010 (Consultado 30 de mayo 2013)

Doubleday, Z.A., Semmens, J. M., Pecl, G. T., y Jackson, G., 2006. Assessing the validity of stylets as ageing tools in *Octopus pallidus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 338, pp. 35-42.

Doubleday, Z.A., White, J., Pecl, G.T. y Semmens, J.M., 2011. Age determination in merobenthic octopuses using stylet increment analysis: assessing future challenges using *Macroctopus maorum* as a model. *ICES Journal of Marine Science*, 68, pp. 2059-2063.

Guerra, A., 2006. Estrategias evolutivas de los cefalópodos. *Investigación y ciencia*, 355, pp. 50-59.

Hernández-López, J.L., Castro-Hernández, J.J. y Hernández-Gracia, V., 2001. Age determined from the daily deposition of concentric rings on common octopus (*Octopus vulgaris*) beaks. *Fishery Bulletin*, 99 (4), pp. 679-684.

Hermosilla, C.A., et al., 2010. Age validation in common octopus *Octopus vulgaris* using stylet increment analysis. *ICES Journal of Marine Science*, 67, pp. 1458-1463.

Hunsicker, M.E., 2009. *Evaluating the role of cephalopods within marine food webs and fisheries*. Tesis doctoral. Universidad de Washington.

Hunsicker, M.E., Essington, T.E., Watson, R. y Sumaila, U.R., 2010. The contribution of cephalopods to global marine fisheries: can we have our squid and eat them too? *Fish and Fisheries*, 11, pp. 421-438.

INAPESCA/SAGARPA, 2010. *Evaluación de la población de pulpo (*Octopus maya*) en la península de Yucatán 2010*. (Dictamen técnico). México: Instituto Nacional de

Pesca, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. CRIP-Yucalpetén, CRIP-Lerma.

Jackson, G.D., 1994. Applications and future potential on statolith increments analysis in squids and sepioids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 51, pp. 2612-2625.

Krstulovic Sifner, S., 2008. Methods for age and growth determination in cephalopods. *Ribarstvo*, 66, pp. 25-34.

Leporati, S.C., Semmens., J.M. y Pecl, G.T., 2008. Determining the age and growth of wild octopus using stylet increment analysis. *Marine ecology progress series*, 367, pp. 213-222.

Morris, C.C. y Aldrich, F.A., 1985. Statolith length and increment number for age determination of *Illex illecebrosus* (Lesueur, 1821) (Cephalopoda, Ommastrephidae). *NAFO Scientific Council Studies*. 19, pp. 101-106.

Perales-Raya, C., et al., 2010. Age estimation obtained from analysis of octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) beaks: Improvements and comparisons. *Fisheries Research*, 106, pp. 171-176.

Pérez, M., et al., 2007. *Evaluación de la población de pulpo Octopus maya en la Península de Yucatán 2007*. (Informe de Investigación). México: Instituto Nacional de la Pesca. Crip Yucalpetén.

Ré, P. y Narciso, L., 1994. Growth and cuttlebone microstructure of juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis* L., under controlled conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 177, pp. 73-78.

- Richardson, C.A., 2001. Molluscs as archives of environmental change. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review*, 39, pp.103-164.
- Rodhouse, P.G. y Hatfield, E.M.C., 1990. Age determination in squid using statolith growth increments. *Fisheries Research*, 8, pp. 323-334.
- Semmens, J.M., et al., 2004. Understanding octopus growth: patterns, variability and physiology. *Marine and Freshwater Research*. 55, pp. 367-377.
- Solís, M.J. 1967. Aspectos biológicos del pulpo *Octopus maya* Voss y Solís. Instituto nacional de investigaciones biológicas pesqueras (México), Publicación Num. 18, 90 p.
- Solís-Ramírez, M., 1994. Mollusca de la Península de Yucatán, México. En: A. Yáñez-Arancibia, ed. 1994. Recursos Faunísticos del litoral de la Península de Yucatán. Campeche: Universidad Autónoma de Campeche, Estación Pacífico del Occidente de México (EPOMEX), Serie Científica 2.
- Sousa, R.C. y Fernandes, R., 2002. Growth observations on *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 from the Portuguese waters: growth lines in the vestigial shell as possible tools for age determination. *Bulletin of Marine Science*, 71, pp. 1099-1103.
- Van Heukelem, W.F. 1983. *Octopus maya* In: Boyle, P.R. (Ed.), Cephalopod Life Cycles. Vol. I. Academic Press, London, 311-323 p.
- Voss, G.L. y Solís, M.J. 1966. *Octopus maya* a new species from the Bay of Campeche. *Bulletin of Marine Science*, 16, pp. 615-625.
- West, J.A., Sivak, J.G. y Doughty, M.J. 1995. Microscopical evaluation of the crystalline lens of the squid (*Loligo opalescens*) during embryonic development. *Experimental Eye Research*, 60, pp. 19-35.