



Universidad Austral de Chile

Centro Trapananda

INFORME FINAL CORREGIDO PROYECTO FIP 2006-15

**UNIDADES POBLACIONALES DE MERLUZA DE TRES ALETAS
(*Micromesistius australis*)**

Informe CT 09-006

CONTRAPARTE TÉCNICA

Subsecretaría de Pesca

PREPARADO POR:

Edwin Niklitschek¹, Cristian Canales², Sandra Ferrada², Ricardo Galleguillos², Mario George-Nascimento³, Eduardo Hernández¹, Claudio Herranz¹, Alejandra Lafon¹, Rubén Roa², Pamela Toledo¹.

¹Centro Trapananda, Universidad Austral de Chile

²Universidad de Concepción

³Universidad Católica de la Santísima Concepción

Coyhaique, 12 de mayo de 2009

Presentación de autores por función o rol en el proyecto

Nombre	Función
Edwin Niklitschek	Jefe de Proyecto, análisis estadístico, coordinación.
Cristian Canales-Aguirre	Análisis genético
Sandra Ferrada	Análisis genético
Ricardo Galleguillos	Análisis genético.
Mario George Nascimento	Análisis parasitológico
Eduardo Hernández	Coordinación, manejo de base de datos, lectura de edades
Pamela Toledo	Preparación y edición de informe, lectura de edades
Claudio Herranz	Encargado base de datos
Alejandra Lafon	Coordinación, preparación informe de avance
Rubén Roa	Análisis estadístico

Colaboradores:

Sofía Astete	Análisis genético
Francesca Barattini	Preparación de otolitos, lectura de edades
Ariel Gallardo	Análisis imágenes otolitos
Karen González	Análisis parasitológico

1.1. Resumen Ejecutivo.

Micromesistius australis (merluza de tres aletas) es una especie mesopelágica, de gran movilidad que muestra estrecha relación con las aguas subantárticas. Se encuentra asociada a la plataforma y talud continental de la región sur austral de Chile y Argentina, Mar de Scotia (alrededor de las islas Georgias, Shetland del Sur, Orcadas) y sur de Nueva Zelanda (Cousseau & Perrota. 2000, Lillo et al. 2005).

Tanto en el sector Atlántico como en el Pacífico la actividad pesquera está fuertemente relacionada con migraciones reproductivas hacia las zonas de desove, situadas al sur de las Islas Malvinas (Falkland) en el Atlántico sur-occidental y en el entorno del Golfo de Penas en el Pacífico sur-oriental (Céspedes et al. 1998, Pájaro & Macchi 2001). Este desplazamiento ha llevado a postular diversas hipótesis sobre la dinámica espacial e identidad poblacional del recurso, para explicar las variaciones estacionales en su distribución y biomasa (Payá et al. 2002)

En este proyecto, la identificación de unidades poblacionales de merluza de tres aletas es abordada mediante la aplicación e integración de diversos enfoques metodológicos: genético, biológico-pesquero, morfología de otolitos, prevalencia parasitaria y microquímica de otolitos.

Las técnicas utilizadas hoy en día en la determinación de stock pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: técnicas de análisis fenotípico y técnicas de análisis genotípico.

Dentro de las técnicas de análisis fenotípico se encuentra la merística, morfometría, morfometría de otolitos, parámetros clave de la historia de vida, prevalencia parasitaria, composición de isótopos en otolitos.

Dentro de las técnicas de análisis genotípico se encuentran las aloenzimas, RFLP (amplificación aleatoria de segmentos polimórficos de ADN), RAPD (amplificación aleatoria de fragmentos polimórficos de DNA), AFLP (largos fragmentos polimórficos amplificados), VNTRs (número variable de repeticiones en tándem) donde se encuentran los minisatélites y los microsátélites y ADNmt-RFLP.

El diseño muestral aplicado se orientó a evaluar la hipótesis nula de un sólo gran stock de merluza de tres aletas en el cono sur de América, el cual incluye individuos originados en al menos dos áreas distintas de desove; una ubicada en el Océano Pacífico, al sur de la Península de Taitao y otra en el Océano Atlántico, en la proximidad de las Islas Malvinas (Falkland). A partir de los resultados obtenidos, se aplicó un procedimiento (O'Brien & Muller 1993) de estimación prospectiva del número de muestras necesarias para alcanzar una potencia estadística predeterminada.

El análisis prospectivo de potencia y tamaño muestral indicó, para las aproximaciones más convencionales, tamaños mínimos de muestras entre 11 y 421 ejemplares, dependiendo de la hipótesis evaluada y de la técnica empleada.

Las técnicas que alcanzaron una mayor potencia estadística correspondieron al análisis de isótopos estables en otolitos y de composición parasitaria en estómagos y musculatura.

El análisis genético en cinco loci microsátélites presentaron alta variabilidad y en general los valores de heterocigosidad fueron más altos en la zona 4 (Is. Malvinas/Falkland) que en individuos de la zona 1 (Pacífico sur).

Para el Dloop se utilizó las primeras 410 pares de base, de ellas 337 fueron sitios invariantes y 73 fueron variables, su valor de diversidad genética fue bajo, el número de haplotipos varió entre 1 y 6.

Para el ND1 los valores fueron mayores que para Dloop, el número de haplotipos varió entre 1 y 19.

No se observa estructuración poblacional con ninguno de estos marcadores mitocondriales. Para D-loop el haplotipo más frecuente es H1, que esta presente en gran magnitud en todas las poblaciones analizadas y presenta una topología estrellada, frecuentemente asociada a poblaciones en expansión. Por otro lado para ND1 el haplotipo mas frecuente fue H2, presente en todas las zonas analizadas. La topología es del tipo estrellada, al igual que D-loop.

El análisis de morfometría de otolitos utilizando descriptores de Fourier, indica que el modelo que considera la zona como factor predictor de la estructura multivariada de los coeficientes es significativamente mejor que el modelo que considera los datos de ambas zonas agrupados. Coincidentemente, el análisis discriminatorio lineal logra clasificar exitosamente el 93,8% de los datos.

Se encontró evidencia de diferencias significativas entre zonas en algunos de sus parámetros vitales y demográficos, incluyendo estructura de talla, tasa de crecimiento y madurez sexual.

Los resultados indican fuertes diferencias en todos los procesos de la historia de vida de las cohortes, este tipo de análisis indica que los stocks del Atlántico sur y del Pacífico sur pueden ser considerados funcionando de manera separada una vez que se realiza el reclutamiento.

El análisis de prevalencia parasitaria indica que para los endoparásitos que alcanzan su estado adulto en *M. australis*, se destacan las diferencias encontradas en la prevalencia y/o abundancia de *Ascarophis* sp entre las muestras de las zona 2 y zona 3 con la de la zona 4 y la zona 1, que indica diferencias relacionadas necesariamente a variaciones de la dieta de la merluza de tres aletas entre las zonas de pesca examinadas.

Entre los ectoparásitos, no se encontraron diferencias notables en prevalencia o abundancia (*Diclidophora micromesisti* y *Chondrachantus* sp.) lo que sugiere que estos taxa se transmiten en forma homogénea entre sus hospedadores en el rango geográfico muestreado.

Las diferencias en el parasitismo que se observan entre las cuatro zonas de pesca pueden interpretarse como resultantes de las condiciones ecológicas en que viven las merluzas de tres aletas en las distintas zonas de pesca y señalan que no constituyen una unidad ecológicamente homogénea, la que se distinguiría por la permanencia diferencial de las merluzas de tres aletas en cada zona de pesca.

El análisis exploratorio de elementos sugirió diferencias en las concentraciones de estroncio y bario y de los isótopos de carbono y oxígeno entre la zona Atlántico y Pacífico.

Las concentraciones medias de Ba y Sr fueron más altas en las muestras procedentes del Océano Atlántico alcanzando valores de $18 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm 1,1$ (EE) y $1950 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm 60$ (EE), respectivamente. En el grupo de muestras obtenido en el Océano Pacífico la concentración media de Ba fue de $9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm 1,1$ (EE), mientras que la de Sr llegó a $720 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm 60$ (EE).

El análisis de isótopos estables indicó un efecto significativo ($p < 0,001$) del área de muestreo sobre las concentraciones relativas de los isótopos $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$. La concentración relativa de $\delta^{13}\text{C}$ fue mayor en las muestras del Pacífico ($0,3 \text{‰} \pm 0,11$ EE) que en aquellas procedentes del Atlántico ($-1,2\text{‰} \pm 0,11$ EE).

AGRADECIMIENTOS

Nuestros agradecimientos a la Subsecretaría de Pesca y al Consejo y Secretaría Ejecutiva del Fondo de Investigación Pesquera, por su apoyo institucional y financiero al presente proyecto.

A la Federación Gremial de Industrias de la Macrozona X, XI y XII Regiones (FIPES F.G.) que nos permitió disponer observadores a bordo para la obtención de muestras.

Al Dr. Alexander Arkhipkin, científico jefe del Departamento de Pesquerías del Gobierno de las Islas Malvinas (Falkland) (*Falkland Islands Government-Fisheries Department*, (FIG-FD) y a la sra Pia Schuchert quienes coordinaron la obtención de muestras en el Océano Atlántico.

Al Dr. David Secor quién colaboró y participó en el análisis de microelementos en otolitos de merluza de tres aletas.

ÍNDICE GENERAL

Presentación de autores por función o rol en el proyecto.....	2
1.1. Resumen Ejecutivo.....	3
1.2. Antecedentes.....	12
1.3. Objetivos.....	14
1.3.1. Objetivo general.....	14
1.3.2. Objetivos específicos.....	14
2. Realizar una revisión bibliográfica de las metodologías más robustas para la identificación de unidades poblacionales (e.g. ADN, electroforesis de isoenzimas en gel de almidón, índices merísticos y/o estudios de parásitos, entre otros). (Objetivo 1).....	15
2.1. Introducción.....	15
2.2. Determinación de unidades de stock.....	15
2.2.1. Marcadores fenotípicos.....	15
i. Merística.....	16
ii. Morfometría.....	16
iii. Morfometría de otolitos.....	16
iv. Microestructura de otolitos.....	17
v. Parámetros claves de la historia de vida.....	17
vi. Prevalencia parasitaria.....	17
vii. Composición de isótopos en otolitos.....	18
2.2.1. Marcadores genéticos moleculares.....	18
i. Aloenzimas y Isoenzimas	19
ii. Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)	19
iii. RAPD (amplificación aleatoria de fragmentos polimórficos de DNA).	19
iv. Polimorfismo de longitu de fragmentos amplificados (AFLP)	20
v. VNTRs (número variable de repeticiones en tándem).	20
vi. ADNmt-RFLP.....	21
2.1. Técnicas de análisis de stocks propuestas para esta investigación.....	22
3. Establecer un diseño experimental (temporal y geográficamente adecuado) que permita identificar la(s) unidad(es) poblacional(es) de la especie. (Objetivo 2).....	24
3.1. Introducción.....	24
3.2. Materiales y métodos.....	25
3.2.1. Muestreo biológico implementado.....	25
3.2.2. Bases de datos recopiladas.....	26

3.2.3. Diseño muestral prospectivo.....	27
3.3. Resultados.....	29
3.3.1. Diseño aplicado.....	29
3.3.2. Diseño prospectivo para eventuales programas de continuidad.....	30
3.4. Discusión.....	32
4. Identificar unidad(es) poblacional(es) en merluza de tres aletas (<i>Micromesistius australis</i>) y su respectiva área de distribución geográfica (objetivo 3).	34
4.1. Análisis de genética de poblaciones.....	34
4.1.1. Introducción.....	34
4.1.2. Materiales y métodos.....	37
i. Area de muestreo.....	37
ii. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación de genes Dloop y ND1.....	37
iii. Análisis de microsatélites.....	38
iv. Análisis de secuencias.....	38
v. Análisis de verosimilitud.....	39
4.1.3. Resultados.....	39
i. Variabilidad y estructura genética en microsatélites.....	39
ii. Variación de secuencias Dloop y ND1	39
iii. Estructura poblacional	43
iv. Análisis de verosimilitud	45
4.1.4. Discusión.....	48
i. Variabilidad genética y H&W en loci microsatélites.....	48
ii. Diversidad genética en ADN mitocondrial.....	48
iii. Estructuración poblacional.....	49
4.2. Morfometría de otolitos.....	50
4.2.1. Introducción.....	50
4.2.2. Materiales y métodos.....	50
4.2.3. Resultados.....	52
4.2.4. Discusión.....	54
4.3. Parámetros clave de la historia de vida.....	55
4.3.1. Introducción.....	55
4.3.2. Materiales y métodos.....	55
i. Comparación de la estructura de tallas de los stocks Atlántico y Pacífico, considerando la variabilidad interanual de las diferencias.....	55
ii. Ajuste y comparación de modelos de crecimiento de los stocks Atlántico y Pacífico.....	57

iii. Estimación y comparación de los modelos de madurez sexual.....	58
4.3.3. Resultados.....	60
i. Comparación de la estructura de tallas de los stocks Atlántico y Pacífico, considerando la variabilidad interanual de las diferencias.....	60
ii. Ajuste y comparación de modelos de crecimiento de los stocks Atlántico y Pacífico.....	65
iii. Estimación y comparación de los modelos de madurez sexual.....	66
4.3.4. Discusión.....	69
4.4. Evaluación de posibles diferencias intra-específicas en la composición de la fauna parasitaria de <i>M. australis</i>	70
4.4.1. Introducción.....	70
4.4.2. Materiales y métodos.....	70
4.4.3. Resultados.....	71
4.4.4. Discusión.....	76
4.5. Comparación de la composición microquímica de otolitos de merluza de tres aletas <i>Micromesistius australis</i> entre áreas de reproducción de los océanos Atlántico y Pacífico.....	78
4.5.1. Introducción.....	78
4.5.2. Materiales y métodos.....	79
4.5.3. Análisis estadístico	80
4.5.4. Resultados	81
Micro-constituyentes.....	82
Isótopos estables.....	84
4.5.5. Discusión.....	86
4.6. Utilidad de un marcador molecular para la trazabilidad de productos derivados de <i>Micromesistius australis</i> (SOBREOFERTA).....	87
4.6.1. Introducción.....	87
4.6.2. Materiales y métodos.....	87
4.6.3. Resultados y discusión.....	88
4.7. Conclusiones generales.....	91
4.8. Referencias.....	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Trabajos realizados y técnicas utilizadas en Chile para análisis de stock de especies marinas.....	23
Tabla 2: Embarcaciones utilizadas para la obtención de ejemplares de merluza de tres aletas (2006-2007)..	25
Tabla 3: Escala macroscópica de estadios de madurez gonadal en merluza de tres aletas: machos.....	26
Tabla 4: Escala macroscópica de estadios de madurez gonadal en merluza de tres aletas: hembras.....	26
Tabla 5: Tamaños de muestra utilizados para análisis de stock de merluza de <i>Micromesistius australis</i>	27
Tabla 6: Tamaño muestral estimado para asegurar un error de tipo II (aceptación de hipótesis nula	

errónea) inferior al 5%. Estimación asume ausencia de correlación entre muestras debido a co-variables tales como caladero, lance, fecha de muestreo u otras.....	28
Tabla 7: Zonas de muestreo de <i>Micromesistius australis</i> en el presente estudio.....	29
Tabla 8: Muestras de ejemplares de merluza de tres aletas (C: muestras comprometidas; O: muestras obtenidas; entre paréntesis: número de lances a partir de los cuales se obtuvieron las muestras).....	30
Tabla 9: Parámetros de variabilidad genética en cinco loci microsátélites en las áreas estudiadas. (N: número de muestras utilizadas; Na: n° de alelos; Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada; H & W: valor de probabilidad para el test de equilibrio de Hardy & Weinberg).....	40
Tabla 10: Fst por pares de poblaciones para cada fuente de información. Valor de probabilidad estimado mediante 10.100 permutaciones. (Valores en negrita: no significativos luego de la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples).....	40
Tabla 11: Resultado AMOVA para cada hipótesis propuesta. Valor de probabilidad estimado mediante 10.100 permutaciones.....	42
Tabla 12: Hipótesis de estructura genética poblacional de merluza de tres aletas sin información a priori..	43
Tabla 13: Índices de diversidad genética para cada fragmento utilizado en este estudio, Dloop y ND1 por población (N= n° de muestras; H= n° de haplotipos; h= diversidad haplotípica; π = diversidad nucleotídica; S.D.= desviación estándar).....	43
Tabla 14: Prueba de la razón de verosimilitud de dos hipótesis acerca de las diferencias en la frecuencia de siete marcadores genéticos de merluza de tres aletas entre zona 1 (Pacífico) versus zona 4 (Atlántico).....	47
Tabla 15: Prueba de la razón de verosimilitud de dos hipótesis acerca de las diferencias en la frecuencia de siete marcadores genéticos de merluza de tres aletas entre tres áreas zona1, zona 2 y zona 3.....	47
Tabla 16: Análisis de varianza de la comparación de un modelo multivariado nulo sin efecto de zona, versus uno en que la zona es un factor significativo, para la morfometría de los otolitos de merluza de tres aletas. GL: grados de libertad.....	52
Tabla 17: Resultado del análisis discriminante realizado a las coordenadas de los otolitos analizados pertenecientes a la zona 1 (Pacífico) o zona 2 (Atlántico).....	53
Tabla 18: Número de individuos maduros e inmaduros en tres bases de datos correspondientes a merluza de tres aletas (Fuente: FIFD: Falkland Islands Fisheries Department).....	59
Tabla 19: Talla media, desviación estándar, talla máxima, mínima y mediana para merluza de tres aletas provenientes de las zonas 1 (Pacífico sur) y 4 (Atlántico sur).....	61
Tabla 20: Resultados de la prueba de razón de verosimilitud para varias hipótesis concernientes con las diferencias en la estructura de tallas entre el Pacífico Sur y el Atlántico Sur, el quinto modelo incluye interacción y efectos principales.....	62
Tabla 21: Comparación de modelos de crecimiento de Schnute y von Bertalanffy en merluza de tres aletas de ambos lados de Sudamérica.	65
Tabla 22: Parámetros y sus errores estándar (entre paréntesis) de los modelo de crecimiento seleccionados para merluza de tres aletas de ambos lados de Sudamérica.....	65
Tabla 23: Comparación del modelo de madurez sexual como función de la longitud de merluza de tres aletas para dos zonas, Atlántico Sur versus Pacífico Sur.....	66
Tabla 24: Parámetros ajustados de la ojiva de madurez de merluza de tres aletas en el Atlántico Sur y en Pacífico Sur. Errores estándar entre paréntesis.....	67
Tabla 25: Edad de 50% de maduración sexual de merluza de tres aletas en el Atlántico Sur y en Pacífico Sur. Errores estándar entre paréntesis.....	68
Tabla 26: Número de ejemplares examinados (n), promedio y desviación estándar de la longitud horquilla	

de 165 ejemplares de merluza de tres aletas (<i>M. australis</i>) provenientes de cuatro zonas de pesca.....	71
Tabla 27: Prevalencia (P, en %) y abundancia (A) de parásitos encontrados en 165 ejemplares de merluza de tres aletas (<i>M. australis</i>) provenientes de cuatro zonas de pesca. n = número de hospedadores examinados (Q.E.D.= quistes de etiología desconocida).....	72
Tabla 28: Coeficientes de correlación de Pearson de la abundancia de cada taxon parasitario con la longitud horquilla de <i>M. australis</i> (n= 165, valores en negrita indican $p < 0,05$), resultados de la prueba de comparación de pendientes entre zonas de pesca, de la comparación de medias y de pruebas a posteriori (en negritas se indica las diferencias en pendientes). Los números de la última columna corresponden a las zonas de pesca según lo indicado en Tabla 26	73
Tabla 29: Promedio y desviación estándar (entre paréntesis) de la abundancia total, riqueza taxonómica, diversidad, dominancia y composición de las infracomunidades de parásitos en 165 ejemplares de merluza de tres aletas (<i>M. australis</i>) provenientes de cuatro zonas de pesca. Las letras indican las diferencias entre parejas de medias ajustadas por la covariable (least square means).	74
Tabla 30: Clasificación de los ejemplares de merluza de tres aletas de cuatro zonas de pesca según análisis discriminante simple de la composición de los ensambles de 19 taxa parasitarios encontrados en 165 individuos hospedadores y de 6 descriptores cuantitativos de las infracomunidades.....	75
Tabla 31: Funciones de clasificación de 19 taxa parasitarios y de seis descriptores cuantitativos de las infracomunidades en <i>M. australis</i> para cada una de las cuatro zonas de pesca consideradas.....	75
Tabla 32: Coeficientes de correlación de la abundancia de cada uno de los 19 taxa parasitarios y de seis descriptores cuantitativos de las infracomunidades en <i>M. australis</i> con las dos primeras funciones discriminantes.....	76
Tabla 33: Análisis de varianza de la comparación de un modelo multivariado nulo sin efecto de zona, versus uno en que la zona es un factor significativo, versus otro en que tanto la zona, como el sexo, y la longitud del pez afectan la composición química de los otolitos de merluza de tres aletas.....	82
Tabla 34: Coeficientes canónicos de las funciones discriminantes construidas para la asignación de muestras de otolitos a sus respectivas zonas de procedencia. Se incluye también resultados del test de Wilk para cada modelo discriminante.....	83
Tabla 35: Matriz de asignación y errores del modelo discriminante lineal construido en base a todos los micro-constituyentes analizados en secciones del primer año de vida de otolitos de merluza de tres aletas (Ba, Ca, Mg, Mn, Sr/Ca).....	84
Tabla 36: Matriz de asignación y errores del modelo discriminante lineal construido en base a micro-constituyentes seleccionados: Ba y Mg, analizados en secciones del primer año de vida de otolitos de merluza de tres aletas.	84
Tabla 37. Lista de asistentes al taller metodológico.....	102
Tabla 38. Lista de asistentes al taller de difusión de resultados del proyecto “Unidades poblacionales de merluza de tres aletas realizado en Valparaíso, el 17 de diciembre de 2008.....	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución geográfica de muestras de merluza de tres aletas (<i>Micromesistius australis</i>) utilizada para cada aproximación metodológica de identificación de stock empleadas en el proyecto.	31
Figura 2: Estratificación del area de estudio de <i>Micromesistius australis</i> utilizada para el análisis de unidades de stock en el presente proyecto.	32
Figura 3: Frecuencias alélicas para cada loci analizado por población.....	41
Figura 4: Análisis de coordenadas principales de los genotipos multilocus de <i>M. australis</i> para cuatro zonas	

de estudio.....	42
Figura 5: Network para Gen D-loop de merluza de tres aletas en cada zona analizada. (Números rojos : posición donde hay una mutación). Tamaño de la esfera proporcional al número de haplotipos.....	44
Figura 6: Network para ND1 de merluza de tres aletas en cada zona analizada. (Números rojos: posición donde hay una mutación). Tamaño de la esfera proporcional al número de haplotipos.....	45
Figura 7: Frecuencia de siete marcadores genéticos de merluza de tres aletas en las zonas.....	46
Figura 8: Negativo del logaritmo de los 46 coeficientes de Fourier utilizados como descriptores de la morfometría de los otolitos de merluza de tres aletas del Atlántico Sur y del Pacífico Sur.....	52
Figura 9: Diagramas de Tukey para las medias de tallas de merluza de tres aletas en zona 1 (Pacífico sur).	61
Figura 10: Diagramas de Tukey para las medias de tallas de merluza de tres aletas zona 4 (Atlántico sur)..	62
Figura 11: Estructuras de tallas de merluza de tres aletas en el lado Pacífico y Atlántico de América del Sur. No se dispuso de los datos del año 2006 en el Pacífico Sur.....	63
Figura 12: Re-agrupamiento de los datos de estructura de tallas en categorías de cinco cm para los análisis de modelación estadística.....	64
Figura 13: Modelo de crecimiento de von Bertalanffy en merluza de tres aletas de ambos lados de Sudamérica.....	66
Figura 14: Ojivas de madurez sexual de merluza de tres aletas en el Pacífico Sur y en el Atlántico Sur. Los números indican el número de observaciones en cada categoría de longitud.....	68
Figura 15: Relación entre el primer gradiente composicional de las infracomunidades de parásitos expresado en unidades de desviación estándar x 100, y longitud horquilla de <i>M. australis</i> según zona de pesca (□: zona 1, o: zona 2, ▲: zona 3, -: zona 4).....	74
Figura 16: Distribución de los datos crudos de concentración de minerales e isótopos en los otolitos de merluza de tres aletas, por zona y sexo, y efecto de la talla.....	81
Figura 17: Distribución de muestras de otolitos procedentes de los océanos Atlántico y Pacífico a lo largo de los ejes de concentración de Ba y Mg medidas en secciones correspondientes al primer año de vida de merluza de tres aletas.	85
Figura 18: Distribución de muestras de otolitos procedentes de los océanos Atlántico y Pacífico a lo largo de los ejes de concentración relativa de $\delta^{13}C$ y $\delta^{18}O$ en secciones correspondientes al primer año de vida de merluza de tres aletas.	85
Figura 19: Análisis de distancias genéticas para secuencias de la COI para 18 especies de importancia comercial en la costa chilena. En el recuadro se encuentra <i>Micromesistius australis</i>	90
Figura 20: Programa del taller metodológico del proyecto FIP 2006-15 realizado en la ciudad de Concepción.....	103
Figura 21: Programa del taller de difusión de resultados del proyecto FIP 2006-15.....	106

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I: Talleres realizados con motivo del proyecto FIP 2006-15	101
Anexo II: Personal participante por objetivo específico del proyecto.....	107

1.2. Antecedentes.

El género *Micromesistius* está representado a nivel mundial por dos especies: *M. poutassou* (Risso, 1826) en el Noratlántico y Mediterráneo, y *M. australis* (Norman, 1937), en el Atlántico sudoccidental, Pacífico sur-oriental y Nueva Zelanda. *Micromesistius australis* (merluza de tres aletas) se describe como una especie mesopelágica, euribática, de gran movilidad. Muestra estrecha relación con las aguas subantárticas, y se le encuentra asociada a la plataforma y talud continental de la región sur austral de Chile y Argentina, Mar de Scotia (alrededor de las islas Georgias, Shetland del Sur, Orcadas) y sur de Nueva Zelanda. Dentro de la plataforma argentina se distribuye desde los 37°S hasta los 55°S y se encuentra relacionada con temperaturas de fondo que fluctúan entre los 3-10°C. En el Océano Pacífico sur-oriental se extiende entre las latitudes 42° S y 57° S, en un rango de profundidades de 130 a 800 m (Lillo et al. 2007).

En el sector Atlántico cercano a las Islas Malvinas (Falkland), donde se encuentra la mayor concentración del recurso, el stock ha sido fuertemente explotado durante los últimos 20 años causando una fuerte reducción en sus niveles de biomasa (Macchi et al. 2005). En Chile, la explotación comercial de merluza de tres aletas se inició de manera indirecta en la década del 70 con el desarrollo de la pesquería demersal-austral (PDA), donde la merluza de tres aletas formaba parte de la fauna acompañante de los recursos objetivo: merluza de cola y congrio dorado. Entre los años 1981 y 1992 los desembarques fluctuaron entre las 2.000 y 5.000 t, pero en los años siguientes se incrementaron progresivamente a niveles superiores a las 20.000 t anuales. Actualmente, el recurso se encuentra declarado en régimen de plena explotación al sur del paralelo 41° 28,6' S, y es regulado mediante Límites Máximos de Captura por Armador (D. Ex. N° 1587 21.12.2005; D. Ex. N° 1362 30.12.2005). Se debe considerar que, además de su valor económico, la especie desempeña un importante rol en la trama trófica del ecosistema sur- austral siendo consumidor de zooplancton e integrante de la dieta de otras especies demersales, como por ejemplo merluza del sur y congrio dorado (Lillo et al. 2007).

Merluza de tres aletas es una especie relativamente longeva, la edad máxima estimada para la población virgen en el Océano Atlántico es de 30 años (Wöhler et al. 2001). Actualmente, se han recolectado individuos desde las costas del Pacífico de no más de 20 años con un rango de talla de 32-64 cm (Lillo et al. 2005) y desde el Atlántico suroccidental individuos de hasta 23 años con un rango de talla de 17-60 cm (Cassia 2000). Los valores estimados de mortalidad natural para hembras son de 0,20 a 0,33 año⁻¹ y para machos de 0,23-0,29⁻¹ (Ojeda et al. 1998).

En lo que respecta a su proceso reproductivo, merluza de tres aletas presenta un desarrollo ovárico de tipo sincrónico, con un solo grupo modal de ovocitos (450 - 1.125 micras) que madura para ser desovados en tandas sucesivas en corto tiempo, sin que se registre un proceso continuo de reclutamiento desde el stock de ovocitos maduros en reserva, características que la identifican como un desovador parcial con fecundidad anual determinada (Lillo et al. 2002). El valor de fecundidad visto para una hembra de 51,1 cm LT es cercano a los 478 mil ovocitos (Macchi & Pájaro 1999). Además, se ha descrito que esta especie tiene un crecimiento relativamente rápido, ya que el 60 % de la longitud teórica máxima se alcanza en la primera madurez sexual. En las costas del Pacífico comienza a desovar a una talla de 31 cm (2 años) y sobre 45 cm de longitud la totalidad de las hembras se encuentran maduras (Lillo et al. 2002, Córdova et al. 2003). Al igual que en otras especies, las hembras alcanzan tallas mayores a la de los machos. Para individuos del Atlántico sudoccidental se ha reportado que el mayor incremento de longitud anual ocurre entre los 4-5 primeros años, edad a la que alcanzan una talla de 38-45 cm, rango que coincide con la de su madurez sexual. Estudios realizados en el stock del Atlántico señalan una talla media de madurez de 35,4 cm para machos y 38,01 cm para hembras (Sánchez et al. 1986), mientras que Macchi & Pájaro (1999) señalan un valor menor cercano a los 31 cm para hembras.

El proceso de desove en el Pacífico se lleva a cabo entre mediados de julio y septiembre (Córdova & Céspedes 1997, Lillo & Céspedes 1998, Lillo et al. 2002, Córdova et al. 2003). A este respecto, los datos recolectados señalan que en promedio la mayor actividad reproductiva se localiza en el bimestre agosto-septiembre, con más del 50% de las hembras en proceso de desove activo. En septiembre se ha observado un 73% de gónadas en regresión y hacia octubre y noviembre, junto a los ejemplares con gónadas en regresión se ha observado hembras inmaduras, pero ninguna en proceso de desove (Saavedra et al. 2007). En el Atlántico suroccidental, el desove anual se produce entre agosto y septiembre, prolongándose ocasionalmente hasta noviembre (Sánchez et al. 1986).

Tanto en el sector Atlántico como en el Pacífico la actividad pesquera se relaciona con una migración reproductiva hacia las zonas de desove. Se ha observado que a mediados de año el recurso ingresa a las costas chilenas por el extremo sur desde aguas atlánticas (mayo o junio), desplazándose al norte para desovar alrededor de agosto, permaneciendo en aguas chilenas asociado a la plataforma y talud continental, hasta noviembre de cada año. Luego del desove el recurso retornaría al Atlántico. Esta secuencia de eventos restringe la actividad extractiva en el Pacífico entre los meses de mayo a noviembre. Por otro lado, en el Atlántico el patrón migratorio sugerido es un desplazamiento de grandes cardúmenes que atraviesan la zona oeste del Banco de Burdwood por el sur a inicios de invierno, con altas concentraciones al oeste de la Isla de los Estados. Luego continúa el desplazamiento con dirección a la costa sur de las Islas Malvinas (Falkland), en invierno y en primavera, presentándose en dicha área una mayor actividad reproductiva donde los cardúmenes se mueven hacia afuera y el interior del área para desovar. Posteriormente para cerrar el patrón migratorio se sugiere una probable dispersión en dirección sur en el verano (Céspedes et al. 1998). Las conductas migratorias descritas, presentan la posibilidad de uno o más stock compartidos entre el Pacífico y el Atlántico. Sin embargo, existe información que indica que la flota Argentina explota una fracción del recurso al sur de la Isla de los Estados, previo al ingreso del recurso e inicios de la temporada de pesca en Chile, e inmediatamente después de terminada la temporada en aguas nacionales (noviembre-diciembre), lo que sugiere que parte del stock que ingresa anualmente a aguas nacionales es sometido a una presión de pesca en el lado Atlántico y por ende, el stock explotado en aguas nacionales no conformaría una unidad cerrada (Payá et al. 2002). Entonces, si la población de merluza de tres aletas perteneciente al cono sur de América corresponde a un sólo gran stock, se hace imprescindible realizar un manejo armónico del recurso para evitar la sobreexplotación. Entonces, considerando todos estos antecedentes, se proponen las siguientes hipótesis:

1. Existe un sólo gran stock de merluza de tres aletas en el cono sur de América, que segrega hacia dos distintas áreas de desove. Lillo (Payá et al. 2002), postula que durante el período de verano-comienzos de otoño la merluza de tres aletas se sitúa en el Mar de Escocia, en una etapa de alimentación. Hacia fines de otoño inicia un desplazamiento migratorio-reproductivo hacia la plataforma y talud continental del Atlántico sudoccidental y Pacífico sudoriental, alcanzando hacia mediados de invierno las áreas de desove, situadas entre las latitudes 49-53° S y 47-51° S, respectivamente. Una vez finalizado el evento reproductivo, la merluza de tres aletas iniciaría un nuevo desplazamiento, esta vez de carácter trófico, en dirección al sur hacia el Mar de Escocia.
2. Existen dos stock de merluza de tres aletas en el cono sur de América, con un área de desove determinada para cada una ellas. El desove ocurre en periodos similares (julio-septiembre). Esta hipótesis sugiere la posibilidad de dos unidades de stock que desarrollan todo su ciclo vital en su respectivo océano.

La mayoría de los métodos de evaluación de stock modelan la dinámica de las poblaciones asumiendo que son poblaciones cerradas y homogéneas en sus características de historia de vida. Considerando el alcance de las hipótesis planteadas, resulta prioritario estudiar y definir la identidad de la(s) unidad(es)

poblacionales de merluza de tres aletas incluyendo las zonas de desove en ambos océanos, para entender la dinámica de su diferenciación espacial-temporal y aplicar esta información en el manejo pesquero y sustentabilidad del recurso.

1.3. Objetivos.

1.3.1. Objetivo general.

Identificar unidad(es) poblacional(es) de merluza de tres aletas (*Micromesistius australis*).

1.3.2. Objetivos específicos.

- Objetivo 1: Realizar una revisión bibliográfica de las metodologías más robustas para la identificación de unidades poblacionales (e.g. ADN, electroforesis de isoenzimas en gel de almidón, índices merísticos y/o estudios de parásitos, entre otros)
- Objetivo 2: Establecer un diseño experimental (temporal y geográficamente adecuado) que permita identificar la(s) unidad(es) poblacional(es) de la especie.
- Objetivo 3: Identificar unidad(es) poblacional(es) en merluza de tres aletas (*Micromesistius australis*) y su respectiva área de distribución geográfica.

PRESENTACION DE RESULTADOS POR OBJETIVO ESPECIFICO

2. Realizar una revisión bibliográfica de las metodologías más robustas para la identificación de unidades poblacionales (e.g. ADN, electroforesis de isoenzimas en gel de almidón, índices merísticos y/o estudios de parásitos, entre otros). (Objetivo 1).

Ximena Valenzuela¹, Edwin Niklitschek¹

¹Universidad Austral de Chile, Centro Trapananda

2.1. Introducción.

El concepto de stock es fundamental para el manejo de los recursos pesqueros, dado que este forma la “unidad básica” sobre la cual los modelos de dinámica poblacional son aplicados. Una adecuada identificación de stock es fundamental para la correcta evaluación del estado de una pesquería y es fundamental para adoptar medidas de manejo apropiadas para asegurar la sustentabilidad de un recurso. A pesar de su importancia, no existe una definición clara del concepto de stock, ya que este depende del objetivo propuesto y del campo del conocimiento en el cual el investigador desarrolla su trabajo (Guerra Sierra & Sánchez Lizaso 1998, Abaunza et al. 2008). En un comienzo *stock* correspondió a un concepto netamente productivo relacionado directamente con la extracción del recurso por parte de la industria pesquera, donde stock era equivalente a una fuente de extracción de peces. En una perspectiva productiva más amplia, stock correspondería a una porción específica de una población que es influenciada por una actividad antropogénica, la que afecta la productividad de la población. Esta definición pasa a ser puramente operacional, en la cual la porción de los peces expuesta a la pesquería se define como stock. Otra acepción lo define como una población de peces que se comporta como una unidad cohesiva cuyos miembros exhiben respuestas comunes a condiciones medioambientales dentro de sus límites geográficos (Waldman 2005). Sin embargo, una de las definiciones más aceptadas es la de Ihssen (1981) *vide* Waldman (2005) quien propuso que stock es un grupo intraespecífico de individuos apareados al azar con una integridad temporal y espacial. Con el tiempo el concepto de stock tendió hacia una definición más teórica, fuertemente influenciada por el desarrollo de nuevas técnicas moleculares procedentes del campo de la genética. Debido a las variaciones en la definición de este importante concepto, decidimos hablar de stock para referirnos a unidades poblacionales relevantes para el manejo pesquero, siguiendo la definición de Ihssen (1981) *vide* Waldman(2005).

2.2. Determinación de unidades de stock.

Las técnicas utilizadas hoy en día en la determinación de stock pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: técnicas de análisis fenotípico y técnicas de análisis genotípico.

2.2.1. Marcadores fenotípicos.

Estas técnicas de análisis se basan en las variaciones fenotípicas de individuos de stock diferentes lo que proporciona una base indirecta para determinar la estructura del stock y aunque no se obtiene evidencia directa de aislación genética entre stock, puede indicar una prolongada separación de individuos de estadios post larvales en diferentes regímenes medioambientales (Begg & Waldman

1999). Los análisis morfométricos comprenden el estudio de rasgos genéticos cuantitativos, controlados normalmente por muchos genes y afectados por el medioambiente donde ellos son expresados (Swain et al. 2005). Los principales métodos de análisis fenotípicos utilizados en peces se detallan a continuación:

i. *Merística.*

Este método se basa en el recuento de caracteres merísticos como los radios de la segunda aleta dorsal, los radios de la aleta pectoral, las branquiespinas, las barbillas mentonianas, las escamas de la línea lateral, las hileras longitudinales de escamas de la línea lateral o el número de vértebras, para comparar especímenes provenientes de diferentes áreas. La obtención de las muestras debe considerar el tipo de arte de pesca y su selectividad, para asegurar que todas las tallas estén representadas, además de la selección de los caracteres merísticos cuantificables importantes, debido a que algunos de estos caracteres presentan distinto grado de variabilidad y por lo tanto, debe evaluarse cuales son pertinentes para su uso. Los caracteres merísticos más estables no permiten ser utilizados para discriminar grupos de peces, como por ejemplo los radios de las aletas pectorales y dorsales, mientras que otros caracteres son sumamente variables y dependen, en algunos casos de los parámetros ambientales (temperatura, salinidad) y, por lo tanto, tampoco son útiles. La principal inconveniencia de esta técnica es que su aplicación demanda mucho tiempo y recursos y precisa de personal técnico especializado para el reconocimiento y recuento de estructuras (Volpedo et al. 2006).

ii. *Morfometría.*

Este método se basa en la medición de diferentes estructuras de los peces, como por ejemplo longitud de la cabeza, altura del cuerpo, diámetro del ojo, longitud de la quijada superior e inferior, longitud de las aletas (pectorales, pélvicas, dorsales y anal), altura del pedúnculo caudal, entre otras. La obtención de la muestra debe considerar el arte de pesca y su selectividad, especificando el rango de tallas considerado para las cuales se plantean las relaciones morfométricas y el sexo, ya que es posible que existan diferencias morfométricas entre sexos y estadios de vida (juveniles y adultos). En Nueva Zelanda, se realizó un análisis morfométrico en *M. australis*, para comparar individuos obtenidos desde diferentes áreas costeras, el resultado sugirió que pertenecen a stock diferentes (Hanchet 1999). La principal desventaja de este método, al igual que en la comparación de los caracteres merísticos, es que demanda mucho tiempo y recursos, además de precisar de personal técnico especializado para el reconocimiento y medición de las estructuras (Volpedo et al. 2006).

iii. *Morfometría de otolitos.*

También denominado método del contorno, cuantifica geoméricamente el borde de la estructura para luego determinar las variaciones de la forma dentro y entre grupos (Cadrin et al. 2005) y de esta manera discriminar acerca de la existencia de uno o mas stock. Este análisis ha avanzado considerablemente, en un comienzo se realizaron mediciones de distancias lineares simples de la estructura, hoy en día se realizan derivación de variables geométricas (Cadrin et al. 2005). En un estudio realizado por Galleguillos et al. (1996) se midieron 11 variables (distancias) distintas de otolito de sardina común (*Strangomera bentincki*) y de anchoveta (*Engraulis ringens*). Los resultados permitieron sugerir, en ambas especies, las muestras correspondían a stock distintos. En un estudio reciente (Niklitschek et al. 2009) se incorporó la tecnología digital para obtener una imagen del contorno de otolitos de orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*) aunque en este caso los resultados muestran que las zonas en comparación no presentan diferencias significativas.

iv. *Microestructura de otolitos*

Esta técnica es utilizada para identificar grupos que fueron espacial o temporalmente discretos en un punto particular de su historia de vida. Cuando las diferencias medibles aumentan en la porción larval temprana del otolito, indica que los grupos fueron espacial o temporalmente distintos poco después de la eclosión, y puede insinuar distintos orígenes de desove (Brophy & King 2007). Lo anterior queda ejemplificado en un estudio que examinó la historia de crecimiento larval registrada en otolitos de individuos adultos de *Micromesistius punctatus*, en el se observó que las muestras examinadas presentaron diferentes patrones de crecimiento según el área de muestreo, esto sugirió la existencia de dos poblaciones con diferentes vías divergentes de dispersión, lo que proporciona una herramienta para la discriminación entre stocks debido a su naturaleza cronológica (Brophy & King 2007). Otro estudio validó el método de análisis de microestructura de otolitos de *Clupea harengus*, específicamente la evaluación visual de las medidas de crecimiento, como una aproximación a la separación de stock desde una mezcla de stock. Para esto, comparó el método morfométrico con un método objetivo cuantitativo basado en la estimación del tiempo de crianza de *Clupea harengus* sobre un modelamiento lineal. A partir de esta investigación, se determinó que la inspección visual concuerda en un 89% con la estimación objetiva, lo que respalda la utilización de morfometría de otolitos en la determinación de stock (Clausen et al. 2007).

v. *Parámetros claves de la historia de vida.*

Los parámetros de historia de vida son la consecuencia de las estrategias de vida a la cual los stock de peces han sido sometidos, reflejando la dinámica del stock, el que incluye los parámetros de la población vital intrínseca como abundancia, crecimiento, sobrevivencia, reproducción, madurez y reclutamiento. Se cree que la estimación de estos parámetros, es representativo de un pez único dentro de un stock y puede ser usado para distinguir entre un stock discreto de peces ya que estos parámetros son la expresión fenotípica de la interacción entre el genotipo y el ambiente. Como resultado, las diferencias de los parámetros de vida entre grupos de peces son asumidas como evidencia de que las poblaciones de peces son geográficamente y/o reproductivamente aisladas y por lo tanto, para propósitos de manejo se considera que son stock discretos (Begg 2005). Por otro lado, se ha observado que al evaluar el stock con diversas aproximaciones, los parámetros claves de la historia de vida proporcionan información que concuerda con el resto de las técnicas utilizadas (Abaunza et al. 2008). En Chile Galleguillos et al. (1996) han utilizado esta técnica, para determinación de stock de sardina común (*Strangomera bentincki*) y anchoveta (*Engraulis ringens*).

vi. *Prevalencia parasitaria.*

El uso de parásitos como marcas biológicas proporciona información sobre diversos aspectos de la biología del huésped. El principio de este análisis se basa en el uso de parásitos como marcas en el estudios de poblaciones de peces, en el cual el pez es infectado por el parásito sólo cuando ellos se encuentran dentro del área endémica del parásito (área geográfica en la cual las condiciones son propicias para la transmisión del parásito). Si se encuentra un pez infectado fuera del área endémica, se puede inferir que este pez ha estado dentro del área alguna vez en su historia pasada (Castro-Papillón et al. 2002, Cuyás et al. 2004, Incorvaia & Hernández 2006, Mackenzie et al. 2008, Mattiucci et al. 2008). Esta técnica se inicia con la recolección, clasificación y registro de los parásitos desde diferentes lugares geográficos, luego se determina aquellos que son más efectivos como marcas biológicas y finalmente se correlaciona la presencia de éstos en peces extraídos de diferentes regiones de estudio (Mackenzie et al. 2008) lograron determinar que las larvas de nemátodos *Anisakis* spp. y *Hysterothylacium aduncum* presentes en *Trachurus trachurus* son las marcas

biológicas más efectivas para esta especie, junto con esto, determinaron a partir de las distintas variaciones de la infección en las muestras obtenidas desde diferentes áreas geográficas del mar Mediterráneo, que esta especie se divide en tres stocks. Otros ejemplos de la efectividad de esta técnica en la determinación de stock han sido reportados en las especies *Xiphias gladius* (Castro-Papillón et al. 2002), *Serranus atricauda* (Cuyás et al. 2004), *Trachurus trachurus* (Mattiucci et al. 2008) y *Macruronus magellanicus* (Incorvaia & Hernández 2006).

vii. *Composición de isótopos en otolitos.*

Los otolitos son estructuras calcáreas, están compuestas principalmente de carbonato de calcio y se encuentran situados en el interior del aparato vestibular de los peces teleósteos. Su función fisiológica es mantener la orientación y/o equilibrio (Campana 1999). Además de su utilización como marcadores cronológicos (Pannella 1971, Campana & Thorrold 2001), se ha demostrado que estas estructuras tienen la habilidad de incorporar a su matriz de carbonato de calcio inclusiones sutiles de elementos químicos de manera diaria, registrando así las variables ambientales como temperatura y salinidad (Campana & Thorrold 2001, Elsdon & Gillanders 2002). La composición química de los otolitos sirve como marcas naturales o señales químicas que reflejan diferencias en la composición química de hábitat particulares, transformándose en un reflejo de las condiciones medioambientales que experimenta cada pez en forma individual (Secor et al. 1995b) (Campana 2005). Todo esto los convierte en una excelente herramienta para reconstruir la historia ambiental de un pez y sus patrones migratorios a partir de los cuales se pueden identificar stock (Secor et al. 1995b, Thorrold et al. 1997, Secor 1999, Begg et al. 2005, Campana 2005). Los microelementos utilizados como registro de las condiciones ambientales que experimenta el pez se encuentran los elementos trazas y los isótopos estables de carbono y oxígeno ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$). Los elementos mayores y menores o elementos trazas han sido descritos como indicadores ambientales, entre estos destaca estroncio y bario. Los estudios muestran que la concentración de estroncio (Sr/Ca) es un indicador de salinidad y temperatura, con una relación directamente proporcional entre ambientes altamente salinos y la presencia de Sr en otolitos (Secor et al. 1995b, Elsdon & Gillanders 2003b, Elsdon & Gillanders 2006b). Lo contrario ocurre con Ba, cuya presencia en otolitos (Ba/Ca) mantiene una relación negativa con la salinidad del ambiente, dando cuenta de ambientes con baja concentración salina (Begg et al. 2005, Elsdon & Gillanders 2005). Las proporciones de isótopos de oxígeno se encuentran relacionadas con la temperatura y las de isótopos de carbono permite hacer una aproximación del metabolismo, reproducción y/o nivel trófico (Kalish 1991, Wurster et al. 1999, Rooker & Secor 2004). La detección límite varía entre elementos, pero para aquellos comúnmente examinados el rango es partes por millón (Thresher 1999). La sensibilidad y resolución del análisis dependen en parte de la naturaleza del láser utilizado (por ejemplo el ICP-MS, espectrómetro de masa inductivamente acoplado a plasma, permite la determinación simultáneamente de todos los elementos traza analizados, a diferencia de la espectrometría de absorción atómica) como también depende de la capacitación del operador y de la correcta interpretación de los resultados. Una de las grandes ventajas es que el esfuerzo y el tiempo para la aplicación de esta técnica en identificación de stock no es alto y lo mismo ocurre con el tamaño de la muestra, que es relativamente bajo, ya que se obtienen resultados representativos utilizando menos de 30 ejemplares por especie (Thresher 1999, Volpedo et al. 2006).

2.2.1. Marcadores genéticos moleculares

El uso de las técnicas genéticas, o marcadores moleculares, en investigación de pesquerías a aumentado en los últimos años debido a una creciente conciencia en el valor de estos datos, su éxito

ha proporcionado una nueva herramienta para el estudio de la estructura de stock (Ward 2000). La ventaja que tiene este método, en general, es que los datos obtenidos no son afectados por el medioambiente como ocurre con las características fenotípicas. Si las diferencias o variaciones genéticas, también llamados polimorfismos, son lo suficientemente grandes entre poblaciones o stocks, las metodologías analíticas permitirán la determinación de las proporciones de stock dentro de una mezcla de stock pesquero (Begg et al. 1999, Koljonen & Wilmont 2005). Se denomina polimorfismo a la variación discontinua y de base genética. El polimorfismo puede ser conspicuo o no y es la consecuencia de alteraciones en el ADN debido a mutaciones o a la recombinación. La variación a nivel individual, poblacionales o de especie hacen posible encontrar atributos heredables (morfológicos o moleculares) que permiten inferir si las variantes bajo estudio pertenecen o no al mismo organismo, población o especie (González 1998). Los métodos moleculares más utilizados en la evaluación de stock se describen a continuación:

i. Aloenzimas y Isoenzimas .

Aloenzimas e Isoenzimas exploran el polimorfismo a nivel de sistemas proteínicos. La utilización de aloenzimas como marcadores genéticos ha sido exitosa en la determinación de variabilidad y diferenciación genética, cualidades que permiten utilizar esta técnica en la identificación de stock de peces (Imsiridou et al. 2003). Este método puede analizar un número grande de muestras con un tiempo de análisis relativamente breve, el análisis de laboratorio es simple y no requiere complicadas técnicas. Sin embargo, debe existir un aislamiento reproductivo suficiente entre stocks para que las diferencias estadísticas sean significantes, por lo que esta técnica pasa a segundo plano cuando existen elementos más resolutivos como los microsátélites. Esta técnica puede ayudar a determinar stock separados, sin embargo, se reconoce su baja definición comparada con otros marcadores moleculares (Galleguillos et al. 1997, Galleguillos et al. 2000, Espinoza et al. 2002, Ayvazian et al. 2004, Larsson et al. 2007).

ii. Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

La primera generación de marcadores de ADN fueron los RFLP. Este método utiliza enzimas de restricción para digerir hebras de ADN, generando numerosos fragmentos de ADN. Estos fragmentos pueden ser separados por electroforesis en gel y las diferencias en los patrones de fragmentos observados son los llamados RFLP. En sus comienzos el RFLP fueron realizados utilizando la técnica de Southern blots para resolver los fragmentos de restricción obtenidos desde el DNA blanco e hibridizados con sondas radiomarcadas, lo que involucraba mucho tiempo, dinero y muestras de ADN. Hoy día, con el desarrollo de la PCR esta tecnología se hace menos engorrosa ya que se amplifica un segmento determinado de ADN y el producto de la amplificación es incubado con las enzimas de restricción apropiadas para finalmente evaluar el patrón de restricción en un gel (PCR-RFLP) (Bernatchez & Danzmann 1993, Strachan & Read 1999).

iii. RAPD (amplificación aleatoria de fragmentos polimórficos de DNA).

Este método amplifica regiones de ADN elegidas al azar mediante PCR, esto se realiza con una pareja de partidores arbitrarios. Cualquier sección del ADN, flanqueado por sitios de unión a partidores y de menos de 5.000 pares de base de separación, será amplificado por RAPD. Los fragmentos generados son separados por electroforesis en gel y detectados con tinción de bromuro de etidio o nitrato de plata. Esta técnica no requiere sondas específicas y no utiliza radioisótopos. Lo atractivo de este método es la simplicidad técnica y su rapidez comparado con otros métodos de análisis de ADN. Sin embargo, esta técnica tiene algunas limitaciones, los patrones de fragmentos

de ADN obtenidos, son sensibles a las condiciones de la PCR por lo que es necesario extremar el cuidado en el desarrollo del método para asegurar así que el polimorfismo sea repetible. La mayoría de los fragmentos polimórficos en el RAPD aparecen como presencia o ausencia de fragmentos dominantes (herencia mendeliana). Debido a estas importantes limitaciones y al desarrollo de otros marcadores moleculares, la aplicación del RAPD se circunscribe a discriminación de especies y a la revisión de poblaciones cuando los microsatélites no están disponibles y las aloenzimas muestran bajo nivel de polimorfismo (Smith 2005). Este método se ha utilizado en estudios poblacionales de *Brycon orbignyanus* (Lopera et al. 2008).

iv. *Polimorfismo de longitu de fragmentos amplificados (AFLP)*

Esta tecnología combina las ventajas de las enzimas de restricción utilizadas en RFLP con las marcas de la PCR utilizadas en RAPD. AFLP se basa en la selectiva amplificación de un subgrupo de fragmentos, previamente digeridos, usando PCR cuyo producto es evaluado por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalante (PAGE). Esta técnica permite una rápida generación de grandes datos genéticos. No necesita un conocimiento previo, o información genética previa de la especie en estudio y permite tanto la identificación de especies como la determinación de relaciones entre muestras diferentes. En la práctica, las bandas comunes y conservadas permiten definir la relación entre las muestras analizadas, mientras que las banda polimórficas definen diferenciación. Esto es observado cuando se realiza análisis genético de población (Zhanjiang 2005).

v. *VNTRs (número variable de repeticiones en tándem).*

Existen dos tipos de VNTRs, los minisatélites y los microsatélites (SSR = secuencias únicas repetidas o STR = repetidos en tándem simples). Estos marcadores difieren en el tamaño del motivo que se repite (entre 15 y 100 pb en los minisatélites o entre 1 y 4 pb en los microsatélites) (Araneda 2004).

Minisatélites.

Estos marcadores fueron los primeros VNTR estudiados. Esta es una metodología multilocus, es decir, se detectan muchos loci que poseen el minisatélite a la vez, pero no se sabe en qué región del genoma se encuentran. La muestra de DNA genómico de cada individuo es digerida con enzimas de restricción, los fragmentos son separados de acuerdo a su tamaño por electroforesis en gel, transferidos a una membrana e hibridados con sondas, que en este caso corresponden al motivo del minisatélite (southern blot). El producto final de marcas es un patrón de bandas que es específico de un individuo (normalmente entre el 15 al 20% de las bandas son compartidas por dos individuos debido al azar). Las bandas reveladas por esta técnica tienen un patrón de herencia mendeliana, pues en promedio la mitad de las bandas son derivadas de cada progenitor. Al igual que el RFLP los minisatélites han perdido popularidad respecto de los microsatélites, debido a las dificultades técnicas en su desarrollo (Araneda 2004).

Microsatélites.

Una de los marcadores más ampliamente utilizados han sido los microsatélites debido a la fácil implementación de la técnica en laboratorio una vez desarrollados los partidores para cada loci (utiliza PCR seguido de electroforesis en condiciones desnaturalantes para la determinación del tamaño del alelo) y por el alto grado de información proporcionada (gran número alelos por locus) (Vignal et al. 2002). Los microsatélites son marcadores más polimórficos que los minisatélites y poseen la ventaja que pueden ser analizados por PCR. Permiten evaluar la estructura genética, debido a los altos niveles de variación genética que son a menudo detectados como locus

individuales de microsatélites, este gran número de locus que puede ser analizado, particularmente con secuenciador automatizado (Wirgin & Waldman 2005). El uso de microsatélites como una aproximación a la determinación de stock ha sido utilizada en estudios en especies como *Trachurus trachurus* (Kasapidis & Magoulas 2008) usando muestras provenientes del Mar del Norte y del este del Mar Mediterráneo; *Cyprinus carpiu* (Kohlmann et al. 2003) provenientes de diversos lugares de Europa. También existen estudios en merluza, aquí los microsatélites han sido utilizados con éxito en la determinación de stock de *Micromesistius poutassou* (Ryan et al. 2005) y *Micromesistius australis* (Ryan et al. 2002). (Ryan et al. 2002) realizó análisis de microsatélites y minisatélites en poblaciones de *Micromesistius australis* ubicadas en Nueva Zelandia e Islas Malvinas (Falkland), llegando a la conclusión de que ambas poblaciones son genéticamente distintas.

Los microsatélites destacan entre los marcadores moleculares ya que entregan gran valor para la discriminación de stock de peces, gracias a su alto grado de polimorfismo comparado con los otros marcadores genéticos (Imsiridou et al. 2003). La amplia variedad de métodos moleculares disponibles hoy en día, permite realizar comparación molecular utilizando genes del ADN nuclear como los del ADN mitocondrial, por direccionamiento de loci que poseen tasas específicas de mutación, a través de secuenciación directa o estimación indirecta de divergencia genética usando métodos de diferentes sensibilidad. La elección del método tendrá un efecto significativo sobre la obtención de las divergencias estimadas, aunque tal impacto puede ser reducido por el aumento del número de loci analizados y las técnicas utilizadas (Carvalho & Hauser 1999).

vi. *ADNmt-RFLP.*

El análisis de las variaciones del ADN mitocondrial han ido direccionando hacia temas de biología de poblaciones. Hasta hace poco, las variaciones del ADNmt fueron casi exclusivamente realizadas con el genoma mitocondrial entero con la ayuda de endonucleasas de restricción y por separación de los fragmentos obtenidos, de acuerdo a su tamaño molecular, por electroforesis en gel (análisis de RFLP). De esta forma, para cada molécula de ADNmt producida se generaba un patrón de restricción particular, con el advenimiento de la PCR se ha logrado generar información de secuencias de secciones específicas del genoma a gran escala. Una de sus desventajas es la limitada cantidad de información que se obtiene ya que esta técnica evalúa sólo dos alelos (sitio presente o ausente). La ventaja de este análisis es que el genoma mitocondrial está presente en un gran número de copias de las cuales se obtiene gran cantidad de DNA genómico por medio de varios métodos de extracción. Además, la alta tasa de mutación y pequeño tamaño de población efectiva, hace que éste sea a menudo un genoma informativo acerca de los patrones evolutivos y de sus procesos (Hubert et al. 2008), cobrando un papel preponderante en estudios de variaciones genéticas intraespecífica de especies con prioridades de manejo y conservación (Rocha-Olivares & Sandoval-Castillo 2003, Di Finizio et al. 2007).

La idea del uso de ADN mitocondrial para el análisis de estructura de stock se basa en que si las muestras tomadas desde individuos de diferentes áreas o de la misma área en diferentes periodos de tiempo, pertenecen al mismo stock, ellos contendrán los mismos tipos de molécula de ADN mitocondrial (mitotipos) en similar frecuencia. De lo contrario, si se encuentran diferencias sustanciales en la distribución del mitotipo es una fuerte evidencia que estas muestras corresponden a diferentes stocks caracterizado por un cierto grado de aislamiento genético.

Este método unido a marcadores moleculares como microsatélites ha aportado información relevante a la determinación de poblaciones de *Cyprinus carpiu* (Kohlmann et al. 2003). Además, se ha desarrollado marcadores moleculares para la trazabilidad de productos pesqueros derivados de la merluza de tres aletas, con el análisis del segmento citocromo b (Akasaki et al. 2006). No existen estudios genéticos poblacionales de *M. australis* basados en ADN mitondrial.

2.1. Técnicas de análisis de stocks propuestas para esta investigación.

Un estudio de identificación de stock requiere ser realizado desde un enfoque holístico, donde el resultado de los diferentes métodos y técnicas son comparados y complementados unos con otros (Kohlmann et al. 2003). Un ejemplo de lo anterior lo representa un estudio en que se realizó determinación de stock de *Trachurus trachurus*, (Abaunza et al. 2008) y muestra que la integración de los hallazgos provenientes de aproximaciones diferentes (marcadores moleculares, morfometría, parásitos como marcas biológicas y parámetros de la historia de vida), es la forma más apropiada para la identificación de stocks en este recurso.

Basados en los antecedentes antes mencionados, se utilizó una aproximación holística en la determinación de stock de merluza de tres aletas, *Micromesistius australis*. Para ello se utilizó dos enfoques: i) el primero basado en una escala evolutiva que comprende técnicas de genética de poblaciones, específicamente microsatélites del ADN nuclear y secuenciación del segmento Dloop del ADN mitocondrial; y ii) el segundo, basado en una escala ecológica, que incluyó morfometría de otolitos, parámetros de la historia de vida, prevalencia de parásitos y composición de isótopos de otolitos.

Existe poca información sobre las técnicas propuestas aplicadas a *M. australis*, sin embargo, los métodos elegidos se encuentran dentro de los grupo de marcadores de alta eficiencia en la determinación de stocks de especies marinas, lo que es respaldado por la gran cantidad de estudios realizados con estas técnicas aplicadas en otras especies. Estudios de microsatélites del ADN nuclear registra sólo un antecedente para *M. australis* (Ryan et al. 2002), se ha realizado secuenciación del segmento ADN mitocondrial con énfasis en el segmento del citocromo b (Akasaki et al. 2006). En cuanto a morfometría de otolitos, parámetros claves de la historia de vida y el marcador de prevalencia de parásitos son técnicas que no han sido utilizadas con anterioridad para estudios poblacionales de *M. australis* lo que da una connotación de análisis innovador para esta especie. Finalmente, se propuso realizar análisis de la composición de isótopos de C y O en otolitos, que fue extendido a la determinación de los microelementos (Sr, Ca, Mn, Mg, Ba), lo que permitió robustecer nuestro estudio.

El desarrollo de cada una de las técnicas estuvo a cargo de destacados científicos nacionales, cada uno experto en su área. Entre ellos se encuentran el Dr. Ricardo Galleguillos de la Universidad de Concepción, que posee una vasta experiencia en el manejo de marcadores genéticos para especies marinas; el Dr. Mario George-Nascimento de la Universidad Católica de la Santísima Concepción, experto en técnicas parasitológicas. A ellos se suma la experiencia del Dr. Rubén Roa y del Dr Edwin Niklitschek, expertos en diseño de muestreo y análisis estadístico utilizando técnicas de máxima verosimilitud y utilización de modelos lineales generales mixtos para datos correlacionados. Finalmente, el equipo contó con la colaboración del Dr. David Secor, autoridad mundial en aspectos teóricos y métodos innovadores para la definición y discriminación de stocks, y del apoyo de investigadores de las instituciones de investigación más importantes en la zona de distribución del recurso en el Océano Atlántico: INIDEP en Argentina y del Falkland Government Fisheries Department en Islas Malvinas (Falkland).

En Chile, la aproximación holística para estudios de determinación de stock ha sido empleada escasamente. En la tabla 1 se muestra un resumen de los trabajos para determinación de stock en especies marinas realizados en Chile y las técnicas empleadas en ellos.

Tabla 1: Trabajos realizados y técnicas utilizadas en Chile para análisis de stock de especies marinas.

Referencia	Especie estudiada	Método de análisis de stock	Áreas comparadas	Conclusiones
(Galleguillos et al. 1996)	<i>Strangomera bentincki</i> <i>Engraulis ringens</i> .	Aloenzimas Parámetros de la historia de vida, morfometría de otolitos, morfometría corporal, prevalencia parasitaria.	Entre la Región de Valparaíso y Región de la Araucanía.	Resultados no concluyentes.
(Ferrada et al. 2002)	<i>Engraulis ringens</i>	PCR-RFLP (ITS y CaM)	Talcahuano y área de Iquique	Stock único
(Oyarzún et al. 2003)	<i>D. eleginoides</i>	Aloenzimas	Lebu, Valdivia, Quellón y Pto. Williams	Stock único
(Galleguillos et al. 2008)	<i>D. eleginoides</i>	Microsatélites del ADN nuclear y secuenciación del ADNm (Dloop y ND2).	Costa sudamericana, desde Perú pasando por Cabo de Hornos hasta Isl. Malvinas y Georgias del sur.	Stock único entre Perú e Is. Malvinas; Islas Georgias son otro stock.
(Galleguillos et al. 1997)	<i>Strangomera bentincki</i>	Aloenzimas	San Antonio, Talcahuano y Puerto Montt	Stock único
(Espinoza et al. 2002)	<i>Brama australis</i>	Aloenzimas	Valparaíso y Lebu	Stock único
(Uchida et al. 2003)	<i>Cancer setosus</i>	Aloenzimas AFLP	Costa de Chile	Resultados no concluyentes.
(Galleguillos et al. 2000)	<i>Merluccius gayi gayi</i>	Aloenzimas	Coquimbo, Puerto Montt, San Antonio.	Stock único
(Galleguillos et al. 1998)	<i>Macruronus magellanicus</i>	Aloenzimas, PCR-RFLP del segmento Dloop ADNm, prevalencia parasitaria	Zona centro sur y sur austral	Stock único
(Pardo-Gandarillas et al. 2007)	<i>Gobiosox marmoratus</i>	Prevalencia parasitaria	Tres localidades de la zona centro sur (separadas al menos por 400mt).	Resultados no concluyentes.
(Niklitschek et al. 2009)	<i>Hoplostethus atlanticus</i>	Microsatélites, segmento mitocondrial Dloop	Montes submarinos aledaños al Archipiélago de Juan Fernández (32 y 33°S)	Resultados no concluyentes
(Valdivia et al. 2007)	<i>Engraulis ringens</i>	Prevalencia parasitaria	Zona norte y centro.	Stock diferentes en cada zona

3. Establecer un diseño experimental (temporal y geográficamente adecuado) que permita identificar la(s) unidad(es) poblacional(es) de la especie. (Objetivo 2).

Edwin Niklitschek¹ & Rubén Roa²

¹Universidad Austral de Chile, Centro Trapananda

²Universidad de Concepción, Departamento de Oceanografía

3.1. Introducción

El presente proyecto apuntó a identificar las principales unidades poblacionales (stocks pesqueros) presentes en aguas de los océanos Atlántico y Pacífico, alrededor del extremo sur de América. La información disponible indica que durante el verano y hasta comienzos de otoño la merluza de tres aletas se sitúa en el Mar de Escocia, en una etapa de alimentación. Hacia fines de otoño inicia un desplazamiento migratorio-reproductivo hacia la plataforma y talud continental del Atlántico sudoccidental y Pacífico sudoriental, alcanzando hacia mediados de invierno las áreas de desove, situadas entre las latitudes 49°-53°S y 47°-51°S, respectivamente (Payá et al. 2002). Una vez finalizado el evento reproductivo, la merluza de tres aletas iniciaría un nuevo desplazamiento, ésta vez de carácter trófico, en dirección al Sur hacia el mar de Escocia. Bajo este escenario, el presente proyecto apuntó a someter a prueba la hipótesis nula que indica la existencia de un stock único donde los peces nacidos en cada uno de los océanos se mezclan en las áreas de alimentación, para luego retornar aleatoriamente a cualquiera de las dos zonas de desove. Esta hipótesis nula fue contrastada contra la hipótesis alternativas no excluyentes de i) dos stocks separados en ambos océanos, cuyos miembros retornarían a desovar a sus respectivos lugares de origen, independientemente de su posible mezcla en zonas comunes de alimentación y ii) dos o más stocks separados dentro del Océano Pacífico.

Un aspecto estadístico de suma relevancia en estudios de identificación de stock es el análisis adecuado de la potencia estadística alcanzada en cada una de las pruebas estadísticas aplicadas. Como es sabido, la falta de evidencia para rechazar la hipótesis nula (stock único) no implica necesariamente que tal hipótesis sea correcta. Aunque tal falta de evidencia podría ser reflejo de una ausencia real de diferencias entre dos stocks aparentemente distintos, podría ser también la simple consecuencia de un tamaño muestral insuficiente para los niveles de variabilidad existentes entre dos stocks efectivamente distintos, para cada marcador elegido. En este contexto, la potencia estadística se define como la probabilidad de rechazar la hipótesis nula siendo ésta falsa, y corresponde al complemento $(1-\beta)$ de la probabilidad β de un error de tipo II, es decir, de aceptar la hipótesis nula siendo falsa. potencia estadística predeterminada (0.95), de manera tal que la probabilidad β de aceptación errónea de la hipótesis nula (stock único) fuera inferior al 5%.

En la presente sección, nosotros apuntamos al logro simultáneo de dos objetivos complementarios y secuenciales: i) evaluar las hipótesis nulas de un sólo gran stock de merluza de tres aleta en el cono sur de América y de un sólo stock en el océano pacífico; y ii) a partir de los estimados de variabilidad obtenidos para cada marcador empleado, diseñar un nuevo set de muestreos donde se optimice la potencia de futuros análisis sobre la estructura de los stocks presentes en el área de estudio.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Muestreo biológico implementado.

El muestreo biológico se orientó primariamente a comparar las principales áreas conocidas de desove en Sudamérica (Golfo de Penas e Islas Malvinas/Flakland). Secundariamente, buscamos comparar zonas discretas dentro del área de distribución del recurso en el SE del Océano Pacífico. Se intentó también obtener muestras de la zona de Islas de los Estados, en aguas Argentinas, donde se espera una mezcla de los stocks o contingentes procedentes de ambas zonas de desove. Lamentablemente, esto no fue posible debido a la complejidad y lentitud de los procedimientos internacionales involucrados para el envío de muestras.

El muestreo biológico en el Océano Pacífico se obtuvo apostando muestreadores biológicos a bordo de dos embarcaciones (Tabla 2) pertenecientes a la Federación Gremial de Industrias de la Macrozona X, XI y XII Regiones (FIPES F.G.). La obtención de muestras de la zona de las Islas Malvinas (Falkland) fue coordinada por el Dr. Alexander Arkhipkin, científico jefe del Departamento de Pesquerías del Gobierno de las Islas Malvinas (Falkland). En este caso, el muestreo se realizó a bordo de dos embarcaciones pertenecientes a la flota surimera japonesa. Los ejemplares muestreados provinieron de las capturas comerciales regulares de las embarcaciones participantes.

Tabla 2: Embarcaciones utilizadas para la obtención de ejemplares de merluza de tres aletas (2006-2007).

Embarcación	Armador	Periodo año 2006	Periodo año 2007
B/F Cabo de Hornos	Pescachile S.A.	Julio, Noviembre	Julio, Noviembre
B/F Diego Ramírez	Pescachile S.A.	Diciembre	Septiembre
ZDHL	Desconocido, Flota surimera de Japón	Octubre	
CBUS	Desconocido, Flota surimera de Japón		Noviembre

En cada lance muestreado, los ejemplares fueron medidos (longitud total y estándar, precisión 1 mm) y pesados (precisión 50 g). Se determinó el sexo, peso gonadal (precisión 1 g) y el estado de madurez sexual macroscópico de cada individuo, de acuerdo a una escala de madurez (Tablas 3 y 4) basada en la empleada anteriormente por Saavedra et al. (2007). Se obtuvo muestras de tejido para análisis genético, de otolitos sagita para lectura de edades y análisis de microelementos, y se guardó ejemplares completos a -18°C para análisis parasitológico. El muestreo biológico fue complementado con el registro de bitácoras de pesca que detalló fecha, hora, ubicación, profundidad del barco, profundidad de la red, temperatura de fondo, captura, tipo de red utilizada, hora efectiva de inicio y término de cada arrastre entre otros.

El muestreo estuvo dirigido a representar el rango de tallas presente en el stock con el fin de establecer relaciones longitud-peso, claves talla-edad y asegurar la correcta obtención de muestras comprometidas para los distintos análisis. Se procuró obtener muestras de cinco lances distintos separados en a lo menos dos días de diferencia, buscando una adecuada cobertura espacial de cada zona de muestreo propuesta. Desafortunadamente, esto no fue siempre posible.

Tabla 3: Escala macroscópica de estadios de madurez gonadal en merluza de tres aletas: machos.

Estado	Denominación	Aspecto macroscópico
I	Virginal	Sexo indeterminado, gónadas pequeñas, filiformes, generalmente juveniles menores de 24 centímetros.
II	Inmaduro	Testículos pequeños rojizos sin zonas blancas (reposo).
III	En maduración	Testículos turgentes, rojizos con zonas blancas y vasos sanguíneos visibles (en preparación). A ligera presión no escurre líquido seminal.
IV	Maduro	Testículos blancos, muy firmes, al apretar escurre semen (líquido viscoso blanco) (en evacuación).
V	Desovado	Testículos grandes, flácidos rojizos, con zonas blancas muy vascularizadas.

Tabla 4: Escala macroscópica de estadios de madurez gonadal en merluza de tres aletas: hembras.

Estado	Denominación	Aspecto macroscópico
I	Virginal	Sexo indeterminado, gónadas pequeñas, filiformes, generalmente juveniles menores de 24 centímetros
II	Inmaduro	Comienzo de maduración de juveniles y reincidentes, ovario bien definido de color rosado claro, sin óvulos visibles al ojo desnudo. En ejemplares grandes es normal que el ovario en esta fase presente lumen claramente apreciable, pero su pared es más gruesa que en la fase V (indica reposo gonádico).
III	En maduración	Gónadas de gran volumen con óvulos visibles de color amarillo pálido, pero no traslúcido, con escasa vascularización. Por lo general, el lumen desaparece cuando los óvulos alcanzan un diámetro mayor de 0.5 mm. Ovario turgente.
	Maduración con desove parcial reciente	Ovario muy vascularizado y con óvulos visibles a simple vista, los que en pequeña proporción presentan una gota oleosa (de color verde amarillento), que corresponde a restos de un desove anterior reciente. En este caso la gónada es más flácida que en la fase III.
IV	Maduro	Ovario turgente con óvulos visibles y transparentes de color anaranjado. Al apretarlo escurren óvulos transparentes.
V	Desovado y En regresión	Ovario vacío, distendido, lumen amplio, muy flácido, de color rojizo de aspecto hemorrágico, sin óvulos visibles. Este ovario pasa al estado II, inmaduro.

3.2.2. Bases de datos recopiladas

Se compiló y organizó una base de datos de talla, sexo y madurez gonadal, procedentes de muestreos aleatorios efectuados en las zona de reproducción conocidas en el Océano Pacífico (zona 1) y Océano Atlántico (zona 4). En el caso de la zona 1, estos datos correspondieron a la información generada por muestreos aleatorios de talla, correspondientes a los cruceros de evaluación hidroacústica financiados por el Fondo de Investigación Pesquera, proyectos FIP 96-39, FIP 2001-20, FIP 2002-20, FIP 2003-10, FIP 2004-08, FIP 2005-06, FIP 2006-15, FIP 2007-15. En el caso de la zona 4, la información correspondió a una compilación de los datos disponibles en el Departamento de

Pesquerías del Gobierno de Islas Malvinas (Falkland Islands), gentilmente proporcionadas por los colegas Alexander Arkhipkin y Pia Schuchert. Esta base totalizó más de 70.000 observaciones de talla y más de 9.000 observaciones de madurez gonadal (Tabla 5).

3.2.3. Diseño muestral prospectivo

Para definir el tamaño muestral necesario para someter a prueba las distintas hipótesis sobre la estructura poblacional de merluza de tres aletas en el cono sur de Sudamérica, utilizamos el conjunto de análisis de resultados basado en funciones de verosimilitud de los datos, desarrollados como parte del objetivo específico 3 del presente proyecto. Esto permitió un análisis unificado de la potencia de las pruebas y, como corolario, del tamaño de muestra necesario para rechazar cada hipótesis nula. Para este fin, aplicamos la metodología de razón de verosimilitud y estimación del parámetro λ de no-centralidad de la distribución chi-cuadrado descrita por Shieh (2000). Este método estima el tamaño de muestra necesario para rechazar la hipótesis nula (modelo reducido) dados la magnitud de la diferencia en verosimilitud respecto de una o más hipótesis alternativas (modelo expandido) y valores arbitrarios de las probabilidades aceptables de error tipo I (α) y tipo II (β). Para tal efecto, se utilizó las verosimilitudes estimadas (objetivo específico 3) para la hipótesis nula de stock único y distintas hipótesis alternativas que incluyeron más de dos stocks; ya sea a nivel de océanos (Pacífico vs Atlántico) o de estratos (zonas), dentro del Océano Pacífico (Tabla 6). Este análisis prospectivo fue efectuado con apoyo de la macro UnifyPow para SAS (O'Brien 1998), estimando el tamaño de muestras necesario para rechazar la hipótesis nula, bajo valores de $\alpha=\beta=0,05$.

Tabla 5: Tamaños de muestra utilizados para análisis de stock de merluza de *Micromesistius australis*.

Zona	Genética			Otolitos			Parásitos	BD		
	Frecuencia alelos	Haplotipos ND1	Dloop	Morfo-metría	Edad	Micro-química		Tallas	Edad-talla	Madurez sexual
Zona 1	94	35	37	95	348	15	68	45.966	348	1.297
Zona 2	30	5	5	21	25		11			
Zona 3	41	18	16				41			
Zona 4	60	27	29	29	38	15	45	24.141	9.885	7.823
Zona 5					99					
Total	225	85	87	145	510	30	165	70.107	10.233	9.120

Tabla 6: Tamaño muestral estimado para asegurar un error de tipo II (aceptación de hipótesis nula errónea) inferior al 5%. Estimación asume ausencia de correlación entre muestras debido a co-variables tales como caladero, lance, fecha de muestreo u otras.

Técnica	VARIABLES predictivas	Zonas contrastadas	GL	Razón de verosimilitud	N muestral utilizado	N muestral propuesto $\alpha=\beta=0.05$
Estructura de tallas	LH	Z1 v/s Z4	40	1488,4	70107	1862
Talla madurez sexual	EMS	Z1 v/s Z4	4	1239	9120	137
Parasitofauna	Todos	(Z1, Z2, Z3) v/s Z4	36	625,7	165	11
	Todos	Z1 v/s Z2 v/s Z3	36	613,3	120	11
Técnicas moleculares	DLOOP	(Z1, Z2, Z3) v/s Z4	12	13,95	87	162
	ND1	(Z1, Z2, Z3) v/s Z4	32	33,85	85	92
	MMER	(Z1, Z2, Z3) v/s Z4	22	18,02	225	285
	MPO13	(Z1, Z2, Z3) v/s Z4	13	19,37	225	313
	MPOUBW_7	(Z1, Z2, Z3) v/s Z4	18	18,72	225	301
	MPOUBW_8	(Z1, Z2, Z3) v/s Z4	12	12,23	225	421
	MPOUBW_9	(Z1, Z2, Z3) v/s Z4	14	31,24	225	213
	DLOOP	Z1 v/s Z2 v/s Z3	24	17,2	58	111
	ND1	Z1 v/s Z2 v/s Z3	64	56,59	58	49
	MMER	Z1 v/s Z2 v/s Z3	44	54,16	165	126
	MPO13	Z1 v/s Z2 v/s Z3	26	24,12	165	231
	MPOUBW_7	Z1 v/s Z2 v/s Z3	36	35,09	165	179
	MPOUBW_8	Z1 v/s Z2 v/s Z3	24	20,33	165	267
	MPOUBW_9	Z1 v/s Z2 v/s Z3	28	34,16	165	168
Morfometría otolitos	H3-25, H102-H125	Z1 v/s Z4	46	112,73	145	54
Química otolitos	Ba, Ca, Mg, Mn, Sr	Z1 v/s Z4	5	20,78	30	29
	Ba, Mg	Z1 v/s Z4	2	17,11	30	28
	d13C	Z1 v/s Z4	1	31,58	30	13
	d18O	Z1 v/s Z4	1	31,53	30	13

3.3. Resultados

3.3.1. Diseño aplicado

La implementación del diseño de muestreo enfrentó importantes dificultades, siendo la más importante la imposibilidad de obtener muestras procedentes de capturas Argentinas en la zona de Islas de Los Estados. Aunque existió alguna operación de flota Chilena en esa zona, tampoco fue posible obtener tales muestras. En el caso de la zona de Malvinas (Falkland) se obtuvo un número razonable de muestras, que alcanzó o superó lo comprometido para las técnicas moleculares, parasitológicas e isótopos estables. En las aguas jurisdiccionales chilenas, el muestreo dependió de la disponibilidad de cupos para muestreadores biológicos en los barcos de la flota industrial, la que fue complementada con muestras proporcionadas directamente por la flota. Lamentablemente, algunas de ellas tuvieron que ser descartadas por no contar con suficiente información, como sobre fecha y lugar de procedencia.

Considerando la disponibilidad y procedencia de las muestras e información disponible sobre la dinámica del recurso y de la flota que opera en el área (Figura 1), se estableció cinco zonas o estratos para el análisis de los datos obtenidos (Figura 2, Tabla 7). La distribución efectiva de las muestras obtenidas fue algo desbalanceada, aunque excedió, en varios casos, lo comprometido y alcanzó tamaños suficientes para la aplicación de técnicas moleculares y parasitológicas en los tres principales estratos de distribución definidos para el Pacífico (zonas 1, 2 y 3) y en el Atlántico (zona 4) (Tabla 8). Las técnicas basadas en morfometría y microquímica de otolitos sólo permitieron contrastar las zonas 1 (Golfo de Penas-Caleta Coralie) y 4 (Malvinas/Falkland).

Lamentablemente, las muestras procedentes del Océano Atlántico correspondientes a distintas técnicas procedieron de distintos peces. Esto impidió poner las técnicas en un mismo modelo analítico y obligó a efectuar análisis separados para cada técnica aplicada.

Tabla 7: Zonas de muestreo de *Micromesistius australis* en el presente estudio.

Zona	Localidades	Características y áreas que incluye
Zona 1	Península de Taitao-Caleta Coralie	Principal área de desove en el Océano Pacífico, incluye zonas de pesca de Golfo de Penas e Isla Patricio Lynch
Zona 2	Islas Diego Ramírez	Grupo insular ubicado aproximadamente 100 mn al sur del continente americano
Zona 3	Isla Navarino	Zona de pesca más oriental de las aguas jurisdiccionales chilenas, ubicada al oeste de Isla de los Estados
Zona 4	Islas Malvinas (Falkland)	Principal área de desove en el Océano Atlántico
Zona 5	Canal de Chacao-Península de Taitao	Zona meridional de distribución en aguas Chilenas. Escasa actividad extractiva. Grupos residentes que parecen no realizar migración anual a aguas subantárticas

Tabla 8: Muestras de ejemplares de merluza de tres aletas (C: muestras comprometidas; O: muestras obtenidas; entre paréntesis: número de lances a partir de los cuales se obtuvieron las muestras).

Zona	Año	Muestras otolitos		Muestras genética		Muestras parásitos	
		C	O	C	O	C	O
Zona 1	2006	100	71(8)	100	101(9)	35	68 (7)
	2007		470(3)		0		0
Zona 2	2006	100	28(10)	100	29(12)	35	11(3)
	2007		26(1)		0		0
Zona 3	2006		41(12)		42(12)		41(12)
	2007						
Zona 4	2006	100	15(1)	100	245(5)	35	0
	2007		45(1)		0		45(1)
Zona 5	2006	0	2(1)	0	2(1)	0	0
	2007		94(2)		0		0

3.3.2. Diseño prospectivo para eventuales programas de continuidad.

Los resultados del análisis prospectivo de potencia y tamaño muestral indicaron, para las aproximaciones más convencionales, tamaños mínimos de muestras entre 11 y 421 ejemplares, dependiendo de la hipótesis evaluada y de la técnica empleada (Tabla 6). En el caso de las aproximaciones basadas en el análisis de la estructura de tallas, el tamaño muestral se eleva a 1.862 muestras. Es muy importante resaltar que las cifras entregadas asumen independencia plena de las muestras, supuesto que es violado al obtener muestras procedentes de un mismo lance, de un mismo barco o de una misma fecha. Este efecto podría ser corregido distribuyendo el muestreo aleatoriamente en tantos lances, fechas y barcos como sea posible, e incrementando en lo posible los tamaños muestrales indicados.

Las técnicas que alcanzaron una mayor potencia estadística correspondieron a los análisis de isótopos estables en otolitos y de composición parasitaria en estómagos y musculatura, todos los cuales sustentaron la hipótesis alternativa de al menos dos stocks. Dentro de las técnicas moleculares, que tendieron a sustentar las hipótesis nulas de stock único, las secuenciaciones de Dloop y ND1 mostraron una mayor potencia, a igual número de muestras. La comparación de estadíos de madurez sexual, por su parte, mostró una potencia relativamente alta, con un tamaño mínimo de sólo 137 hembras requerido para comparar las zonas 1 y 4, casi un orden de magnitud por debajo del tamaño requerido para los mismos fines utilizando la estructura de tallas (Tabla 6).

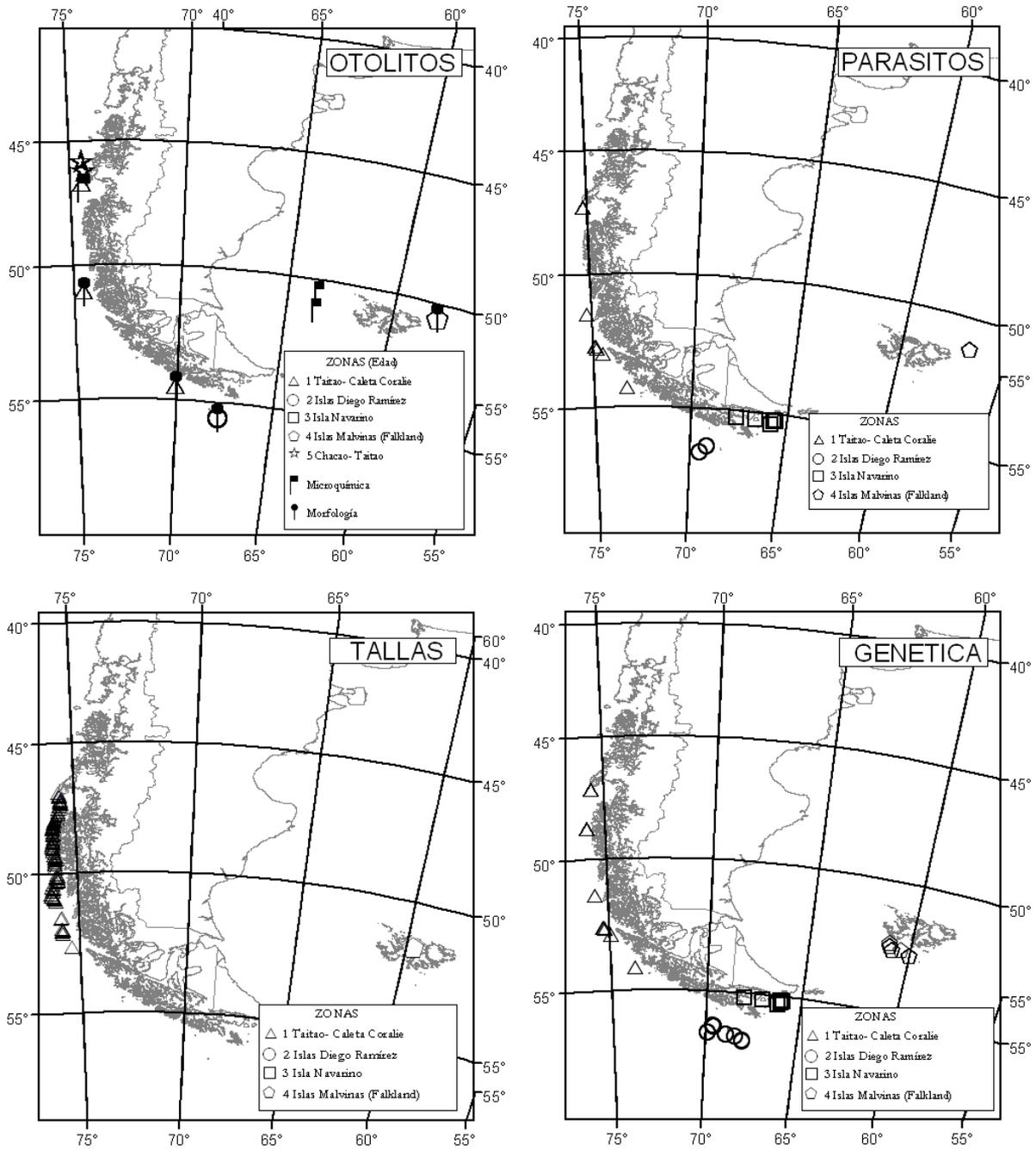


Figura 1: Distribución geográfica de muestras de merluza de tres aletas (*Micromesistius australis*) utilizada para cada aproximación metodológica de identificación de stock empleadas en el proyecto.

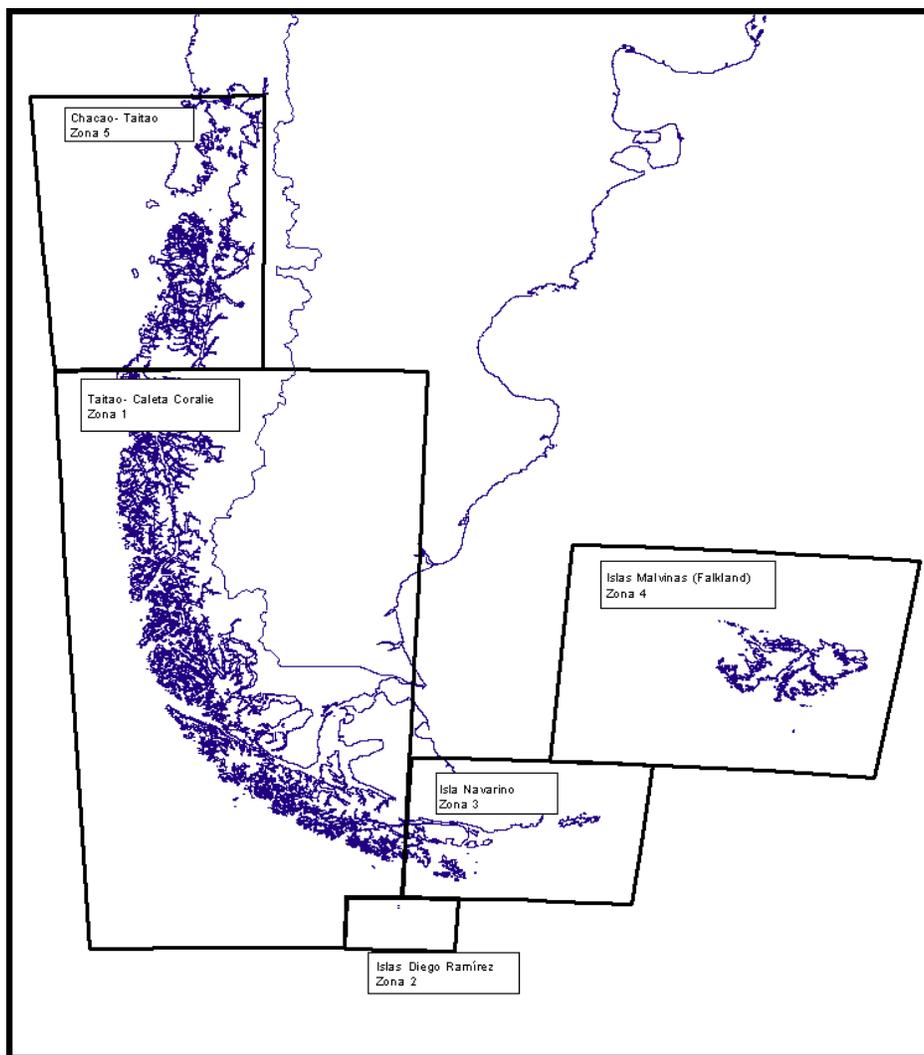


Figura 2: Estratificación del area de estudio de *Micromesistius australis* utilizada para el análisis de unidades de stock en el presente proyecto.

3.4. Discusión

La implementación del diseño muestral presentó dificultades relacionadas, principalmente, con la imposibilidad práctica de obtener muestras en aguas jurisdiccionales Argentinas. A ello se sumaron limitaciones en la disponibilidad de cupos para observadores a bordo de la flota Chilena y en el número de muestras obtenidas desde la flota que opera en la zona de las Malvinas/Falkland. Como resultado de estas restricciones, no fue posible evaluar la procedencia de las capturas obtenidas por la flota Argentina en la zona de las Islas de Los Estados, cuya evaluación consideramos una prioridad a considerar en futuros proyectos destinados a profundizar la caracterización de la estructura de los stocks de merluza de tres aletas, en el cono sur del continente. A pesar de los problemas señalados se obtuvo suficientes muestras como para alcanzar niveles adecuados de potencia estadística (Tabla 7), confirmando la validez de las definiciones *a priori* respecto del tamaño muestral necesario para el logro de los objetivos del proyecto.

En relación al diseño de posibles estudios de continuidad, éste dependería de los objetivos buscados por el estudio. Las líneas generales por objetivo pueden ser resumidas como sigue:

i) Corroboración de la existencia de stocks separados en los océanos Pacífico y Atlántico:

- Técnicas de análisis: composición de isótopos estables en otolitos y contenido parasitario, como técnicas principales.
- Temporalidad de muestreo (4): zonas de desove de Islas Malvinas (Falkland) y Golfo de Penas, zona migratoria de Islas de Los Estados, zona de alimentación en el Mar de Escocia.
- Período de muestreo: se propone muestreos estacionales, durante las respectivas épocas de desove, migración o alimentación, a lo largo de una serie de al menos tres años de muestreo. Esto último con el fin de evaluar la consistencia interanual de las diferencias encontradas en los marcadores.
- Número de muestras: el análisis de potencia indica requerimientos de 11 y 13 muestras independientes para parásitos y otolitos, respectivamente. Sugerimos tamaños muestrales de 15 ejemplares procedentes de al menos 5 lances independientes para cada uno de los estratos de muestreo y cada uno de los años a considerar en la serie.

ii) Identificación de unidades poblacionales dentro del stock Pacífico.

- Técnicas de análisis: composición de isótopos estables en otolitos y contenido parasitario.
- Temporalidad de muestreo (4): zona de desove de Golfo de Penas (zona 1), zona al norte de Península de Taitao (zona 5), zona de Islas Diego Ramirez (zona 2)
- Períodos de muestreo: se propone una serie de al menos tres años de muestreo para evaluar la consistencia interanual de posibles diferencias en los marcadores. Se sugiere además contrastar muestras obtenidas dentro y fuera de la época de desove para investigar la presunta existencia de contingentes no migratorios del recurso.

Número de muestras: considerando el análisis de potencia, sugerimos tamaños muestrales de 15 ejemplares procedentes de al menos cinco lances independientes para cada uno de los cuatro estratos de muestreo, cada una de las épocas de muestreo (desove y no-desove) y cada uno de los años a considerar en la serie.

4. Identificar unidad(es) poblacional(es) en merluza de tres aletas (*Micromesistius australis*) y su respectiva área de distribución geográfica (objetivo 3).

A continuación se informa los distintos análisis realizados para la determinación de unidades poblacionales de merluza de tres aletas (*Micromesistius australis*): genético, morfometría de otolitos, parámetros clave de la historia de vida que incluye comparación de estructura de tallas, modelo de crecimiento y madurez sexual, prevalencia parasitaria y microquímica de otolitos.

4.1. Análisis de genética de poblaciones

Ricardo Galleguillos¹, Sandra Ferrada¹, Cristian Canales-Aguirre¹, Sofía Astete¹, Alejandra Lafon²

¹Universidad de Concepción, Departamento de Oceanografía

²Universidad Austral de Chile, Centro Trapananda

4.1.1. Introducción

Uno de los requerimientos básicos para el adecuado manejo de poblaciones naturales de especies explotadas, ya sea por razones comerciales o de conservación, es el conocimiento de sus aspectos reproductivos. Por ejemplo, el que una población o caladero sea reproductivamente autosustentable o dependa de inmigrantes para el reemplazo de sus individuos adultos se ve reflejado en la tasa de intercambio genético entre poblaciones, la que se transforma en un indicador de sustentabilidad en el largo plazo.

Tomando en cuenta las dificultades en el monitoreo directo del potencial de dispersión de un organismo, se ha desarrollado métodos indirectos (genotípicos y fenotípicos) para evaluar el grado en que las poblaciones divergen o mantienen su integridad (intercambio de individuos). Diferencias fenotípicas sustanciales entre poblaciones pueden ser atribuidas tanto a aislamiento reproductivo, como a la expresión de su plasticidad en respuesta a condiciones ambientales diferentes. Desde el punto de vista genético, una alternativa para evaluar las diferencias poblacionales es examinar la estructura genética de la población. El grado en el cual las diferentes poblaciones son genéticamente divergentes puede reflejar el balance entre los procesos potencialmente diversificadores de la deriva génica y la selección, versus, el efecto homogeneizador del flujo génico.

Desde el punto de vista genético, se define un stock puro o discreto como una población que evolucionó independientemente de otras y por lo tanto acumuló diferencias genéticas con respecto a ellas. Este concepto se basa en la idea de poblaciones de organismos que se desarrollan independientemente, entre las que el flujo génico es muy bajo o nulo, lo que resulta finalmente en una especie formada por numerosas poblaciones panmícticas o demos. Esta situación puede ocurrir tanto en organismos con amplia distribución geográfica, causada por una fuerte dependencia de factores ambientales en su historia de vida o, debido a la existencia de barreras que restrinjan el libre movimiento de los individuos entre las poblaciones evitando la panmixia total entre los ejemplares (Spanakis et al. 1989).

En el desarrollo de este objetivo, para evaluar la estructuración de la o las unidad(es) poblacional(es) se aplicó marcadores moleculares, término que corresponde a cualquier fenotipo molecular producto de la expresión de un gen o de segmentos específicos del ADN, de origen nuclear (ADNn) o

mitocondrial (ADNmt). Estos fenotipos pueden ser regiones expresadas o no del genoma (Ferreira & Grattapaglia 1989, Becerra & Paredes 1999), cuya resolución temporal y potencial aplicación dependerá de las características del marcador molecular utilizado.

i. Marcadores moleculares nucleares

Al clasificar el ADN nuclear podemos encontrar secuencias tanto moderadas (genes ribosomales), como altamente repetitivas (microsatélites), siendo estos últimos, uno de los más utilizados en la evaluación de unidades poblacionales y determinación de variabilidad genética (Litt & Luty 1989). Los marcadores moleculares tipo microsatélites (SSRs, Simple Sequence Repeats; STRs, Short Tandem Repeats) corresponden a regiones no codificantes, de origen y función aún desconocida. Salvo algunas excepciones, están compuestos por motivos básicos de repetición de uno a seis nucleótidos de largo, organizados en bloques entre 5 y 50 repeticiones en serie. Estas regiones se encuentran ampliamente distribuidas en el genoma de organismos eucariontes (Tautz 1989) y procariontes (Zane et al. 2002), encontrándose aproximadamente una región microsatélite cada 10 kilobases. Estos marcadores moleculares responderían a un modelo de herencia mendeliana codominante (De Woody & Avise 2000) y poseen una elevada presencia de polimórficos, lo que explica su frecuente utilización en estudios poblacionales (Litt & Luty 1989, Park et al. 1993).

Los microsatélites han sido tradicionalmente clasificados de acuerdo a la naturaleza de sus unidades de repeticiones, como perfectos (sin interrupciones), imperfectos (con una o más interrupciones) o compuestos (unidades de repeticiones conjuntas con secuencias diferentes) (Weber 1990). Los tipos de repeticiones más comunes son los tetra y dinucleótidos como (CA)_n, (GT)_n y (GATA)_n (Tautz 1989). Los microsatélites trinucleótidos han demostrado ser más polimórficos que los SSRs dinucleótidos y tienen la particularidad de producir menos artefactos de la amplificación por PCR, también llamados “bandas tartamudas” (Song et al. 2002).

Aunque los microsatélites son considerados selectivamente neutros, algunos estudios han mostrado relevancia funcional en un significativo número de SSRs. Las diferencias en la frecuencia de microsatélites en regiones codificantes y no codificantes se relaciona con una selección específica frente a mutaciones en las secuencias flanqueantes en las regiones codificantes. En general, los microsatélites con motivo de repetición tri- y hexanucleótidos se encuentran en exceso en regiones codificantes y no codificantes, mientras que los microsatélites con otros tipos de repeticiones no son tan abundantes. La selección que existe contra las mutaciones en las regiones flanqueantes limita la expansión de los microsatélites no tripletes en regiones codificantes (Metzgar et al. 2000).

El origen del polimorfismo de las secuencias microsatélites está aún en debate, aunque probablemente éste se deba a eventos de deslizamientos de cadena (slipagge) durante la replicación del ADN (Schlotterer & Tautz 1992, Zane et al. 2002), en el cual ambas cadenas pueden alinearse incorrectamente, resultando en una expansión o contracción del número de ellas en la nueva cadena sintetizada (Moxon & Wills 1999). Otras posibles causas para la generación de polimorfismos son mutaciones de tipo sustractivo o aditivo, ya sean en el microsatélite en sí o en las regiones que lo flanquean, alterando el tamaño de la región microsatélite. Este tipo de procesos y mutaciones hacen que los microsatélites se encuentren entre las secuencias de ADN con mayor tasa de mutación, estimada entre 2.5×10^{-5} y 10^{-2} mutaciones por locus y por generación en poblaciones naturales. La duplicación de una secuencia microsatélite en otra región del genoma da lugar a la generación de marcadores microsatélites multilocus (Jarne & Lagoda. 1996). En el campo de pesquería y acuicultura, la utilidad de estos marcadores se ha dado en áreas como la caracterización de stocks genéticos, selección de reproductores, construcción de mapas genéticos, entre otros (Chistiakov et al. 2006). Dentro de los estudios poblacionales los microsatélites se han utilizado en estudios de variabilidad genética, estructuración poblacional o evaluación de stock genético, para diferentes

recursos marinos: peces (Oke et al. 1999, Ward et al. 2001), moluscos (McGoldrick et al. 2000, Pressa et al. 2002) y crustáceos (Cruz et al. 2002).

ii. Marcadores moleculares mitocondriales

El ADN mitocondrial ha sido una de las moléculas hereditarias más estudiadas dentro del genoma animal en los últimos años (Edwards & Skibinski 1987). Es una molécula de doble hebra circular, a excepción de organismos como los hidrozooos *Hydra* spp donde se observan dos moléculas lineales de ADNmt (Hoffmann et al. 1992). Presenta decenas de copias en cada mitocondria, de 200 a 1000 copias por célula, sin proteínas asociadas como histonas y no-histonas y, en su mayor parte formado por ADN codificante (93%), que prácticamente no posee ADN repetitivo, ni intrones. Tiene aproximadamente entre 15.000 a 18.000 pb (pares de bases), es de naturaleza haploide, y aunque comprende menos del 1% del total del genoma en cada célula, presenta características muy importantes por las cuales se elige para estudios moleculares: 1) su alta tasa de evolución con mayor deriva génica, esto debido principalmente a la exposición del ADNmt a especies reactivas de oxígeno resultantes del metabolismo celular, 2) se encuentra desprotegido al carecer de histonas y, 3) a la menor eficiencia de los sistemas de reparación de las mitocondrias.

El ADNmt aparentemente carece de recombinación o ésta es despreciable, es de herencia preferentemente materna, no-mendeliana, siendo los organismos generalmente homoplásmicos (con un sólo tipo de secuencia de ADNmt). Esta molécula contiene en promedio, dependiendo del taxón, 37 genes: 22 ARN de transferencia, 2 ARN ribosómicos (12s y 16r) y 13 ARN mensajeros que codifican para proteínas de complejos enzimáticos respiratorios implicados en la producción de energía mediante la vía de fosforilación oxidativa para obtención de ATP, como el citocromo b, subunidades proteicas del citocromo oxidasa I, II y III (los que presentan baja tasa mutacional en comparación con el resto del genoma mitocondrial). También posee genes de la ATP sintetasa 6 y 8, genes del complejo NADH deshidrogenasa subunidad 1 a la 6 y 4L, que han sido objeto de variadas investigaciones demostrando gran utilidad como marcadores genéticos en poblaciones naturales (Cronin et al. 1993, Park et al. 1993, Bembo et al. 1995). Por último, el ADN mitocondrial presenta también una región control no codificante llamada D-loop o Región Mayor no codificante (Ovenden 1990, Zbawicka et al. 2003), cuyo tamaño puede variar entre 200 a 2.000 pb dependiendo de la especie (Palumbi 1996). Estudios han demostrado que la región es flanqueada por secciones no codificantes altamente polimórficas, donde la tasa de sustitución de estas regiones hipervariables, denominadas dominio 5' y dominio 3', puede ser 40 veces mayor que en la región del citocromo *b* del ADN mitocondrial. Las mutaciones en la región no codificante, se mantendrían en el tiempo, al no poseer efecto fenotípico, por lo cual los polimorfismos más comunes son los que afectan la región control del ADN mitocondrial. Una de las características notables del ADN mitocondrial es que evoluciona 5 a 10 veces más rápido que el ADN nuclear de copia única, lo que le hace presentar alta variabilidad (Luque 2001) y le otorga mayor sensibilidad en el análisis de procesos demográficos en poblaciones naturales.

En cuanto a la información genética que ha surgido del estudio de *M. australis*, la literatura presenta sólo tres. Dos realizados mediante electroforesis de proteínas musculares, con fines taxonómicos (Tomo & Márquez 1980, Márquez 1991) y uno con marcadores de ADN (microsatélites) con fines poblacionales entre individuos de Nueva Zelanda e Islas Malvinas (Falkland) (Ryan et al. 2002).

Dada esta precaria información acerca de la genética de la especie, además de ser un recurso de importancia económica que es compartido entre Chile y Argentina es necesario tener claro si en su distribución geográfica en la Patagonia sudamericana se observa estructuración genética que pueda entregar información que pueda ayudar al manejo sustentable del recurso para ambos países. Para responder esta pregunta utilizamos diferentes fuentes de información, cinco loci microsatélites y dos genes mitocondriales.

4.1.2. Materiales y métodos

i. Área de muestreo

El área de muestreo correspondió a cuatro zonas (Figura 2) en la distribución sudamericana de merluza de tres aletas: Zona 1 (Taitao – Caleta Coralie); Zona 2 (Islas Diego Ramírez); Zona 3 (Isla Navarino) y Zona 4 (Islas Malvinas o Falkland).

ii. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación de genes Dloop y ND1

El aislamiento del ADN genómico se realizó mediante un protocolo estándar con digestión con proteinasa K, extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol absoluto (Sambrook et al. 1989). El ADN fue resuspendido en agua ultrapura (GIBCO Technology™), cuantificado en un Biophotometer Eppendorf® y diluido a 20 ng/μL.

Loci microsátélites

Utilizamos cuatro loci de *M. poutassou*, MpouBW09, MpouBW08, MpouBW07, MpouBW13, (Moran et al. 1999) y uno de *Merlangius merlangius*, MmerUEAW01, (Rico et al. 1997). Los cinco loci fueron amplificados en un volumen de 10 μL, el cual, contiene 20 ng de ADN templado, 1.5 mM (MpouBW09, MpouBW08, MpouBW07), 2.75 mM (MpouBW13), 1 mM (MmerUEAW01) de MgCl₂, 0.1 mM (MpouBW09, MpouBW08, MpouBW07, MpouBW13), 0.2 mM (MmerUEAW01) de dNTP's, 0.75 μM (MpouBW09, MpouBW08, MpouBW07), 1.5 μM (MpouBW13), 2 μM (MmerUEAW01) de cada partidor y 0.25 U/μL (MpouBW09, MpouBW08, MpouBW07), 0.75 U/μL (MmerUEAW01) de Taq ADN polimerasa (Invitrogen®) y 0.5 U/μL (MpouBW13) de Taq ADN polimerasa (Biotools®). El primer forward de cada pareja fue marcado en su extremo 3' con un colorante fluorescente. Las amplificaciones de los loci MpouBW09, MpouBW08, MpouBW07 y MpouBW13 fueron realizadas en un termocilador PCT-200 (MJ-Research®) con las siguientes condiciones: una denaturación inicial a 94°C por 3 min; siete ciclos de 94°C por 30 seg, 52°C por 30 seg, 72°C por 30 seg; seguido de 25 ciclos, denaturación 89°C por 30 seg, annealing a 52°C por 30 seg, extensión a 72°C por 30 seg y una extensión final a 72°C por 5 min. Para el locus MmerUEAW01 las amplificaciones fueron realizadas en un termocilador PCT-100 (MJ-Research®), con las siguientes condiciones: 30 ciclos de denaturación 94°C por 30 seg, annealing a 55°C por 1 min y extensión a 71°C por 1 min. Los fragmentos fueron visualizados en un analizador genético ABI PRISM 3730 utilizando el método de electroforesis capilar. La asignación de los tamaños alélicos obtenidos para cada locus se realizó en el programa GeneScan versión 3.0 y para la obtención de genotipos utilizamos Genotyper versión 2.1.

Genes Dloop y ND1

Diseñamos partidores para el gen Dloop desde miembros de la familia Gadidae, m3alF (5'-GCTAAATTCCTCCCTAGTG-3') y m3alR (5'-TGCTTTCGGGACTTICTA-3'). El fragmento Dloop (~1000pb) fue amplificado en un volumen final de 30 μL, el cual, contiene 20 ng de ADN templado, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP's, 0.3 μM de cada partidor y 0.9 U/μL de Taq ADN polimerasa (Invitrogen®). La amplificación fue realizada en un termocilador PCT-200 (MJ-Research®) con las siguientes condiciones: una denaturación inicial a 94°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de, denaturación 95°C por 30 seg, annealing a 58°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 10 min. El fragmento ND1 fue amplificado en un volumen final de 30 μL, el cual, contiene 20 ng de ADN templado, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTP's, 0.3 μM de cada

partidor (Cronin et al. 1993) y 1.2 U/ μ L de Taq ADN polimerasa (Invitrogen®). La amplificación fue realizada en un termocilador PCT-100 (MJ-Research®) con las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C por 10 min, 60°C por 30 seg, 72°C por 2 min seguido de 41 ciclos, denaturación 95°C por 30 seg, annealing a 54°C por 45 seg, extensión a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 5 min. Las muestras fueron secuenciadas en un secuenciador de ADN automático (Modelo 3730xl; Applied Biosystems) con polímero POP7 y Big Dye terminador v.3.

iii. *Análisis de microsátélites.*

Determinamos la frecuencias alélicas, heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e), número de alelos (N_a) y desviación del equilibrio de Hardy & Weinberg (H&W), como medidas de variabilidad genética en el programa GENALEX v6 (Peakall & Smouse 2006). Para determinar la presencia de estructuración poblacional utilizamos dos aproximaciones:

1) Por un lado, calculamos el índice F_{st} por pares de poblaciones y realizamos un análisis de la varianza de frecuencias alélicas (AMOVA: Analysis of molecular variance) implementado en el programa Arlequin 2,0 (Schneider et al. 2000), con la finalidad de testear diferentes hipótesis: a) Panmixia (homogeneidad genética entre ambos océanos); b) Dos poblaciones, (Zona 1 y Zona 4); c) Tres poblaciones (Zona 1; Zona 2-3 y Zona 4). Para determinar diferencias significativas se utilizó 10.100 permutaciones.

2) Por otro lado, realizamos un análisis de cluster mediante una aproximación bayesiana implementado en el programa Structure v2.2 (Pritchard et al. 2000, Falush et al. 2003). Este programa es utilizado para inferir estructura poblacional usando datos genotípicos sin información *a priori*, el algoritmo utilizado identifica diferentes grupos (desde un punto de vista genético) asignando individuos a las poblaciones en estudio. El programa asume un modelo en el cual hay K poblaciones (K es desconocido) caracterizados por un set de datos de frecuencias alélicas en cada locus. Los individuos son asignados (probabilísticamente) a poblaciones o conjuntamente a dos o más poblaciones si sus genotipos indican que están mezclados. Para este análisis utilizamos un modelo de mezcla con frecuencias alélicas correlacionadas y se testearon de 1–5 cluster con tres réplicas cada uno. Se determinó el número de cluster presentes en las muestras en estudio mediante un valor de likelihood ($\ln P(D)$). Por último usamos un método gráfico para visualizar los resultados obtenidos, para esto realizamos un análisis de coordenadas principales (PCA), implementado en GENALEX v6 (Peakall & Smouse 2006), este programa permite encontrar y trazar patrones dominantes en un set de datos multivariado (múltiples poblaciones y loci). Se aplicó el Test de Bonferroni para comparaciones múltiples cuando fue necesario (Rice 1989).

iv. *Análisis de secuencias.*

El alineamiento de secuencias de los fragmentos Dloop y ND1 se realizó mediante el programa SEQUENCHER™ y visualmente. Usamos el programa DNAsp (Rozas et al. 2003) para obtener parámetros de diversidad genética, como número de haplotipos (H), diversidad haplotípica (h) diversidad nucleotídica (π) en cada grupo y localidad. Para determinar la presencia de estructuración poblacional calculamos: 1) el índice F_{st} por pares de poblaciones y 2) un análisis de la varianza de frecuencias alélicas (AMOVA: Analysis of molecular variance), con la finalidad de testear diferentes hipótesis (las hipótesis testeadas corresponden a las mismas utilizadas con los datos microsátélites). Los estadísticos-F fueron estimados desde las frecuencias haplotípicas. Estos análisis fueron realizados en el programa Arlequin 2,0 (Schneider et al. 2000). Se aplicó el Test de Bonferroni para comparaciones múltiples cuando fue necesario (Rice 1989).

v. *Análisis de verosimilitud*

La modelación de la frecuencia de haplotipos y microsatélites por pez, presenta una distribución multinomial, así que aplicamos la metodología de regresión logística multinomial. El número de haplotipos y microsatélites puede ser dependiente de la zonas o áreas así que la zona/área fueron los únicos factores predictores considerados. El modelo nulo correspondió a

$$\log\left(\frac{S_{i,j,k}}{S_{i,1,1}}\right) = \delta_i.$$

donde $s_{i,j,k}$ es la probabilidad de ocurrencia del haplotipos o microsatélites i en la zona/área j ; δ es el puntaje logit. El enfoque estadístico utilizado, de regresión logística multinomial, ha sido recientemente introducido en la literatura genética, como un método especialmente apropiado en análisis de marcadores genéticos debido a que toma en cuenta la distribución exacta de los datos (Chen & Kao 2006).

4.1.3. Resultados.

i. *Variabilidad y estructura genética en microsatélites.*

Los cinco loci utilizados presentaron alta variabilidad (Tabla 9). La heterocigocidad observada para los loci fue de 0,605 (MpouBW8) a 0,932 (MpouBW7) y el número de alelos fluctuó entre 8–18 (MpouBW8 y Mmer, respectivamente). La frecuencia de cada alelo por población analizada se observa en la figura 3. Al evaluar el equilibrio de H&W encontramos que algunas poblaciones presentaron loci con valores significativos ($p < 0.05$), Zona 1 (Taitao - Caleta Coralie) (MpouBW9, MpouBW8 y MmerUEAW01, Zona 2 (Is. Diego Ramírez) (MmerUEAW01), Zona 3 (I. Navarino) (MpouBW7) y Zona 4 (Is. Malvinas o Falkland) (MmerUEAW01) (Tabla 9). Los valores de F_{st} por pares de poblaciones arrojaron valores cercanos a cero con valores $p > 0.05$ (Tabla 10). Los resultados del AMOVA muestran que las hipótesis puestas a prueba, presentaron valores F_{ST} (panmixia) y F_{CT} (agrupaciones b y c; ver metodología) bajos y con valores de probabilidad no significativos ($p > 0.05$) (Tabla 11). Utilizando una aproximación de cluster genéticos (información *a posteriori*) los valores obtenidos del $\ln P(D)$ fueron disminuyendo a medida que aumentó el número de cluster (K) a analizar. Los valores de $\ln P(D)$ fueron desde -4.066,9 a -4.698,7 desde uno a cinco cluster (Tabla 12). Por último el análisis de coordenadas principales (PCA) mostró congruencia con ambas aproximaciones (Figura 4), información a priori (AMOVA) y con información a posteriori (análisis de cluster).

ii. *Variación de secuencias Dloop y ND1*

Para el Dloop utilizamos sólo las primeras 410 pb, debido que las secuencias presentaban un gran número de ambigüedades desde esta posición, de las 410 posiciones nucleotídicas utilizadas, 337 fueron sitios invariantes y 73 fueron variables, la composición de bases fue: Timina 26,5%; Citosina 17,9%; Adenina 33,8% y Guanina 21,8%. Para el ND1 utilizamos 805 pb., de las 805 posiciones nucleotídicas utilizadas, 709 fueron sitios invariantes y 78 fueron variables, la composición de bases fue: Timina 26,6%; Citosina 18,2%; Adenina 28,1% y Guanina 27,2%. Los valores de diversidad genética para el Dloop fueron bajos (Tabla 13), el número de haplotipos varió entre 1 y 6; la diversidad haplotípica fue desde 0 ± 0 a $0,450 \pm 0,151$ para la Zona 2 (Is. Diego Ramírez) y la Zona

3 (I. Navarino), respectivamente; la diversidad nucleotídica osciló entre 0 ± 0 para la Zona 2 (Is. Diego Ramírez) y $0,00366 \pm 0,00172$ para la Zona 4 (Is. Malvinas o Falkland). Para el ND1 los valores fueron mayores que para Dloop (Tabla 13), el número de haplotipos varió entre 1 y 19, la diversidad haplotípica fue desde $1,000 \pm 0,126$ a $0,902 \pm 0,066$ para la Zona 2 (Is. Diego Ramírez) y Zona 3 (I. Navarino), respectivamente; la diversidad nucleotídica fue desde $0,00118 \pm 0,00034$ y $0,00308 \pm 0,00054$ para la Zona 4 (Is. Malvinas o Falkland) y Zona 3 (I. Navarino), respectivamente.

Tabla 9: Parámetros de variabilidad genética en cinco loci microsatélites en las áreas estudiadas. (N: número de muestras utilizadas; Na: n° de alelos; Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada; H & W: valor de probabilidad para el test de equilibrio de Hardy & Weinberg).

Población	Parámetro	Locus					Promedio
		MpouBW9	MpouBW8	MpouBW7	Mpo13	Mmer	
Zona 1	N	86	86	89	64	94	
	Na	12	11	16	14	18	14,2
	Ho	0,698	0,605	0,730	0,797	0,723	0,711
	He	0,793	0,803	0,752	0,883	0,858	
	H & W	0,000	0,004	1,000	0,190	0,000	
Zona 2	N	30	28	26	14	29	
	Na	9	8	11	9	14	10,2
	Ho	0,800	0,714	0,808	0,786	0,759	0,773
	He	0,846	0,765	0,803	0,798	0,828	
	H & W	0,150	0,203	0,980	0,774	0,013	
Zona 3	N	37	35	39	25	41	
	Na	11	11	10	11	15	11,6
	Ho	0,811	0,657	0,846	0,800	0,780	0,779
	He	0,801	0,782	0,755	0,879	0,847	
	H & W	0,555	0,185	0,018	0,407	0,504	
Zona 4	N	45	47	44	35	60	
	Na	11	13	16	11	18	13,8
	Ho	0,844	0,766	0,932	0,914	0,750	0,841
	He	0,781	0,802	0,803	0,879	0,870	
	H & W	1,000	0,687	0,112	0,863	0,000	

Tabla 10: Fst por pares de poblaciones para cada fuente de información. Valor de probabilidad estimado mediante 10.100 permutaciones. (Valores en negrita: no significativos luego de la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples).

	ADN nuclear				ADN mitocondrial							
	Microsatélites				Dloop				Nd1			
	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4
Zona 1	—	0,846	0,691	0,954	—	0,48	0,424	0,579	—	0,395	0,65	0,088
Zona 2	-0,0046	—	0,845	0,887	-0,07	—	0,532	0,563	0,01	—	0,277	0,022
Zona 3	-0,0019	-0,0073	—	0,851	0,007	-0,021	—	0,602	-0,009	-0,011	—	0,026
Zona 4	-0,0066	-0,0098	-0,0068	—	-0,01	-0,038	-0,015	—	0,024	0,17	0,059	—

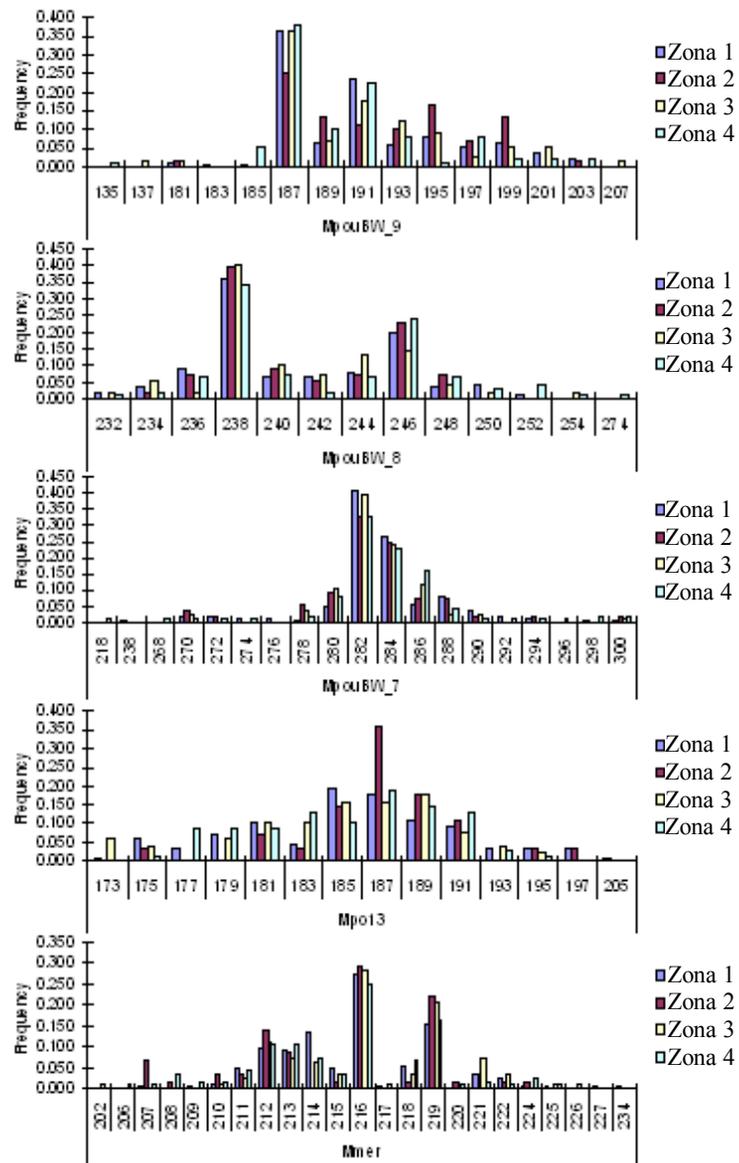


Figura 3: Frecuencias alélicas para cada loci analizado por población.

Tabla 11: Resultado AMOVA para cada hipótesis propuesta. Valor de probabilidad estimado mediante 10.100 permutaciones.

Agrupaciones	Microsatélites		Dloop		ND1	
	Φ -Estadísticos	Valor-P	Φ -Estadísticos	Valor-P	Φ -Estadísticos	Valor-P
Panmixia						
Grupo (Z1, Z2, Z3, Z4)	$\Phi_{st} = -0.0056$	0.963	$\Phi_{st} = -0.012$	0.617	$\Phi_{st} = 0.026$	0.065
O. Pacífico v/s Atlántico						
Grupo 1 (Z1, Z2, Z3)	$\Phi_{st} = -0.0073$	0.965	$\Phi_{st} = -0.011$	0.611	$\Phi_{st} = 0.040$	0.06
Grupo 2 (Z4)	$\Phi_{sc} = -0.0035$	0.858	$\Phi_{sc} = -0.013$	0.367	$\Phi_{sc} = 0.002$	0.486
	$\Phi_{ct} = -0.0038$	0.749	$\Phi_{ct} = 0.002$	0.246	$\Phi_{ct} = 0.037$	0.495
Z1 v/s Z2 - Z3 v/s Z4						
Grupo 1 (Z1)	$\Phi_{st} = -0.0054$	0.959	$\Phi_{st} = -0.012$	0.613	$\Phi_{st} = 0.027$	0.059
Grupo 2 (Z2, Z3)	$\Phi_{sc} = -0.0072$	0.841	$\Phi_{sc} = -0.008$	0.304	$\Phi_{sc} = 0.013$	0.654
Grupo 3 (Z4)	$\Phi_{ct} = 0.0018$	0.173	$\Phi_{ct} = -0.003$	0.008	$\Phi_{ct} = 0.014$	0.334

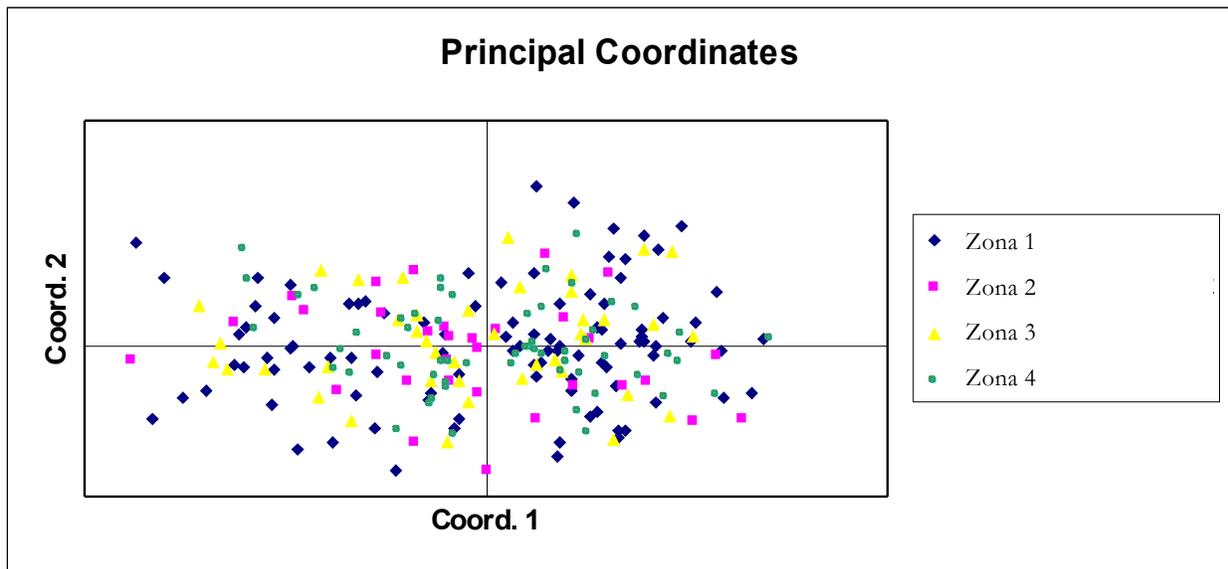


Figura 4: Análisis de coordenadas principales de los genotipos multilocus de *M. australis* para cuatro zonas de estudio

Tabla 12: Hipótesis de estructura genética poblacional de merluza de tres aletas sin información a priori.

Modelo Admixture			
Frecuencias correlacionadas			
K	Réplicas	Ln P(D)	Var[LnP(D)]
1	1	-4067,1	39,6
	2	-4066,3	38,5
	3	-4067,2	39,7
		-4066,9	39,3
2	1	-4101,7	162,7
	2	-4113	188,6
	3	-4103,3	166,9
		-4106,0	172,7
3	1	-4167,2	330,8
	2	-4154,7	303,9
	3	-4143	277,8
		-4155,0	304,2
4	1	-4333,6	701,4
	2	-4318,7	664,3
	3	-4274,5	570,2
		-4308,9	645,3
5	1	-4734,7	1579,8
	2	-4659,6	1427,7
	3	-4737,7	1559,8
		-4698,7	1493,8

Tabla 13: Índices de diversidad genética para cada fragmento utilizado en este estudio, Dloop y ND1 por población (N= n° de muestras; H= n° de haplotipos; h= diversidad haplotípica; π = diversidad nucleotídica; S.D.= desviación estándar).

Área	Dloop						ND1					
	N	H	S	h \pm S.D.	$\pi \pm$ S.D.		N	H	S	h \pm S.D.	$\pi \pm$ S.D.	
Zona 1	37	6	5	0,255 \pm 0,094	0,00111 \pm 0,00044		35	19	30	0,820 \pm 0,067	0,00305 \pm 0,00073	
Zona 2	5	1	0	0 \pm 0	0 \pm 0		5	1	4	1,000 \pm 0,126	0,00241 \pm 0,00046	
Zona 3	16	5	6	0,450 \pm 0,151	0,00309 \pm 0,00126		18	13	15	0,902 \pm 0,066	0,00308 \pm 0,00054	
Zona 4	29	6	11	0,374 \pm 0,113	0,00366 \pm 0,00172		27	7	7	0,556 \pm 0,111	0,00118 \pm 0,00034	
Todas	87	13	19	0,316 \pm 0,066	0,00226 \pm 0,00070		85	34	43	0,776 \pm 0,049	0,00242 \pm 0,00037	

iii. Estructura poblacional

Los resultados entregados en el análisis por pares de poblaciones (Tabla 10) y los resultados para cada hipótesis a prueba del AMOVA, mostraron valores de probabilidad no significativos (Tabla 11). A su vez, la aproximación de redes tampoco muestra un patrón geográfico entre las poblaciones para Dloop y ND1. Por ende, no se observa estructuración poblacional con ninguno de estos marcadores mitocondriales. Para D-loop el haplotipo más frecuente corresponde al H1, el cual está presente en gran magnitud en todas las poblaciones analizadas y además presenta una topología estrellada, frecuentemente asociada a poblaciones en expansión (Figura 5). Por otro lado para ND1 el haplotipo más frecuente fue H2 (Figura 6), presente en todas las zonas analizadas. La topología es del tipo

estrellada, al igual que D-loop. Con los datos de ADNmt, ambos fragmentos dan luces que la población podría estar en expansión.

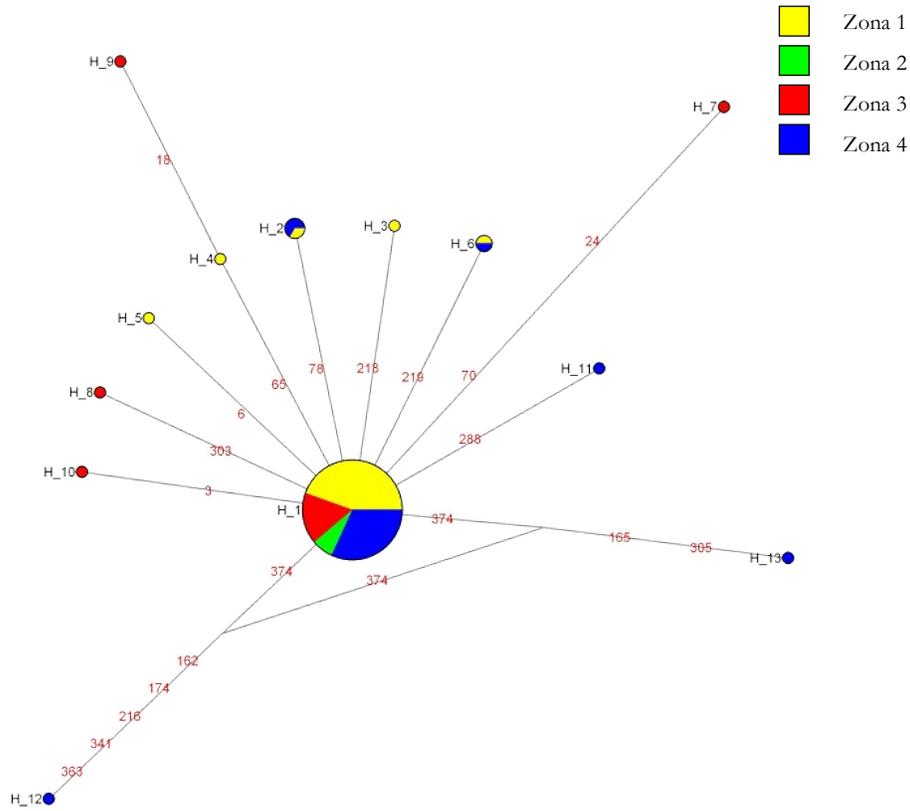


Figura 5: Network para Gen D-loop de merluza de tres aletas en cada zona analizada. (Números rojos : posición donde hay una mutación). Tamaño de la esfera proporcional al número de haplotipos.

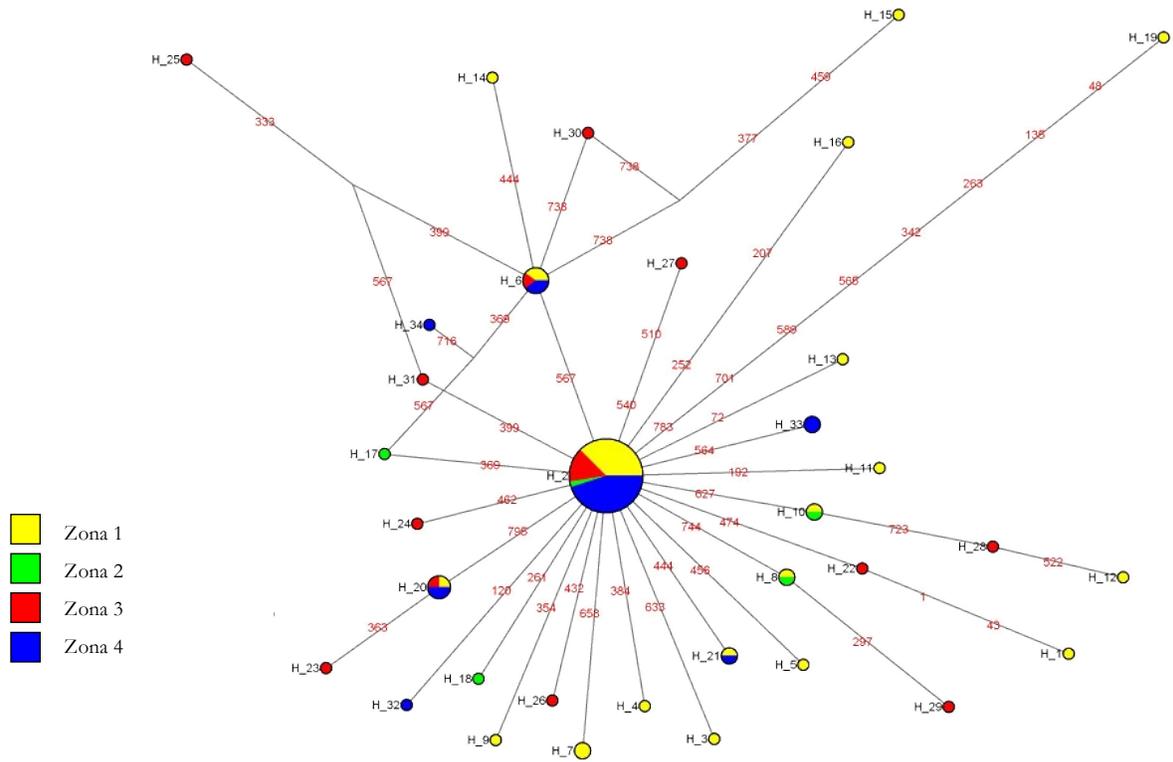


Figura 6: Network para ND1 de merluza de tres aletas en cada zona analizada. (Números rojos: posición donde hay una mutación). Tamaño de la esfera proporcional al número de haplotipos.

iv. Análisis de verosimilitud

No se observan diferencias consistentes importante en las frecuencias de los siete marcadores genéticos entre el Atlántico Sur y el Pacífico Sur (Figura 7). Naturalmente, tampoco se observan diferencias importantes entre las áreas dentro de la zona del Pacífico Sur. Las diferencias que se observan, no presentan un sentido claro sino que parecen aleatorias. En concordancia con lo anterior, las pruebas de significancia indican que la zona no es un factor significativo (Tabla 14), ni tampoco lo es el área dentro de la zona Pacífico Sur (Tabla 15).

Es interesante que se presenta una excepción a lo anterior con el microsatélite MpouBW_9, que sí presenta diferencias significativas entre las zonas (Tabla 14). En cambio, cuando sólo se consideran las tres áreas del Pacífico Sur, este marcador no presenta diferencias (Tabla 15).

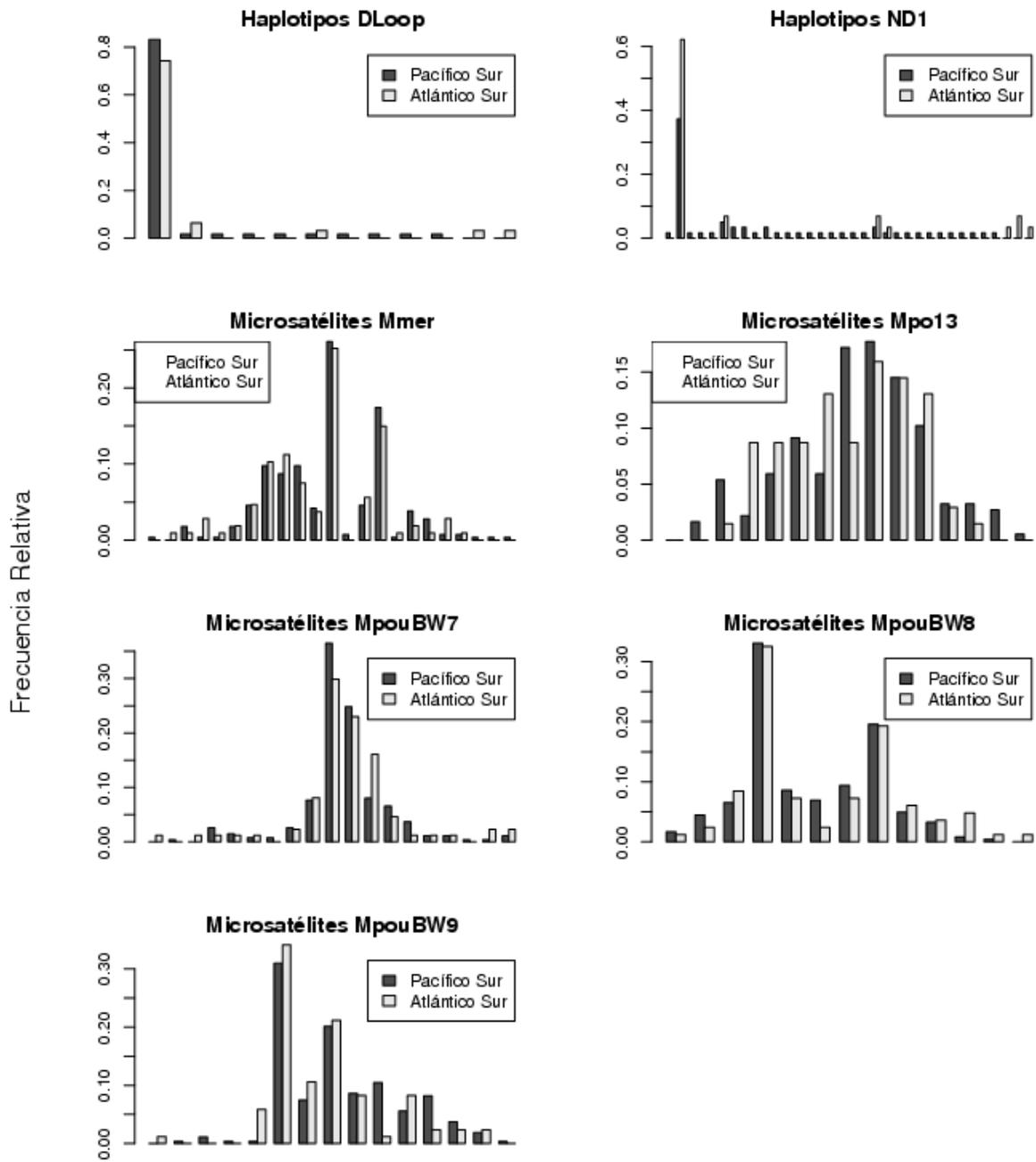


Figura 7: Frecuencia de siete marcadores genéticos de merluza de tres aletas en las zonas.

Tabla 14: Prueba de la razón de verosimilitud de dos hipótesis acerca de las diferencias en la frecuencia de siete marcadores genéticos de merluza de tres aletas entre zona 1 (Pacífico) versus zona 4 (Atlántico).

	Modelo	GL Residuales	Devianza Residual	GL	Razón de verosimilitud	Pr(> χ^2)
Hdloop	Nulo	12	151.8			
	Zona	0	137.9	12	13.95	0.304
HND1	Nulo	32	408.22			
	Zona	0	374.37	32	33.85	0.378
Mmer	Nulo	22	1858.28			
	Zona	0	1840.26	22	18.02	0.705
Mpo13	Nulo	13	1168.11			
	Zona	0	1148.74	13	19.37	0.112
MpouBW_7	Nulo	18	1427.18			
	Zona	0	1408.46	18	18.72	0.409
MpouBW_8	Nulo	12	1330.27			
	Zona	0	1318.04	12	12.23	0.427
MpouBW_9	Nulo	14	1429.57			
	Zona	0	1398.33	14	31.24	0.01

Tabla 15: Prueba de la razón de verosimilitud de dos hipótesis acerca de las diferencias en la frecuencia de siete marcadores genéticos de merluza de tres aletas entre tres áreas zona1, zona 2 y zona 3.

	Modelo	GL Residuales	Devianza Residual	GL	Razón de verosimilitud	Pr(> χ^2)
Hdloop	Nulo	24	89.61			
	Zona	0	72.41	24	17.2	0.840
HND1	Nulo	64	317.32			
	Zona	0	260.73	64	56.59	0.733
Mmer	Nulo	44	1342.71			
	Zona	0	1288.55	44	54.16	0.140
Mpo13	Nulo	26	851.99			
	Zona	0	827.87	26	24.12	0.569
MpouBW_7	Nulo	36	1063.01			
	Zona	0	1027.92	36	35.09	0.512
MpouBW_8	Nulo	24	982.4			
	Zona	0	962.07	24	20.33	0.678
MpouBW_9	Nulo	28	1082.6			
	Zona	0	1048.45	28	34.16	0.196

4.1.4. Discusión

El presente informe tuvo la finalidad de caracterizar la diversidad genética en diferentes localidades de la distribución geográfica sudamericana de merluza de tres aletas (*M. australis*), en el Océano Atlántico y Pacífico, utilizando dos diferentes fuentes de información, mediante ADN nuclear y mitocondrial.

i. Variabilidad genética y H&W en loci microsatélites

Los cinco loci microsatélites analizados para *M. australis* en su distribución sudamericana fueron altamente variables. Los valores de heterocigosidad de *M. potansou* obtenidos por Was(2008) para los loci MpouBW07 (0,67-0,95), MpouBW08 (0,74-0,92), MpouBW13 (0,67-0,95) y MmerUEAW01 (0,65-0,88) y para *M. australis* según Ryan(2002) en los loci MpouBW07 (0,72-0,85), MpouBW08 (0,72-0,80), MpouBW09 (0,73-0,83), MpouBW13 (0,55-0,71) y MmerUEAW01 (0,69-0,75). Hay que destacar que en general los valores de heterocigosidad fueron más altos en la Zona 4 (Is. Malvinas o Falkland) que en individuos de la Zona 1 (Taitao-Caleta Coralie). Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Ryan(2002) en individuos de Nueva Zelanda e Islas Malvinas, siendo esta última la localidad que presenta mayor variabilidad. De Woody(2000) en su revisión sobre variabilidad genética en marcadores microsatélites de peces marinos, de agua dulce y anádromos, proponen un valor promedio de variabilidad de 20,4 alelos por locus y 0,790 de heterocigosidad para peces marinos. Los valores promedios del número de alelos y heterocigosidad observada en este estudio mostraron valores de 12,45 alelos por locus y $0,841 \pm 0,016$ para los cinco loci. Se observaron algunas desviaciones del equilibrio de H&W en algunas localidades causado por exceso de homocigotos (datos no mostrados), principalmente en muestras del Pacífico del sur. Efecto Wahlund, selección, endogamia o presencia de alelos nulos pueden provocar estas desviaciones. La presencia de alelos nulos es un problema frecuente en datos microsatélites. Un alelo nulo corresponde a la no amplificación de un alelo, debido a que la secuencia de la región flanqueante del microsatélite ha sufrido una mutación en su secuencia nucleotídica. Otros factores que provocan artefactos en la PCR, son la amplificación preferencial de alelos de pequeño tamaño (Wattier et al. 1998) o un deslizamiento de la polimerasa durante la amplificación por PCR (Shinde et al. 2003) . Utilizando MICRO-CHECKER se corroboró que las desviaciones del Hardy & Weinberg correspondió a un exceso de homocigotos en algunos loci (datos no mostrados) y se sugiere la presencia de alelos nulos en esos loci analizados.

ii. Diversidad genética en ADN mitocondrial

Para el caso de los marcadores mitocondriales, la diversidad genética fue diferente en ambos fragmentos. La diversidad haplotípica en Dloop ($0,316 \pm 0,066$) y en ND1 ($0,776 \pm 0,049$). Es inusual encontrar baja diversidad en el Dloop, esto porque se ha planteado la presencia de dos regiones hipervariables en ambos extremos del gen. Por otro lado, el fragmento Dloop es el más utilizado en estudios de variabilidad genética, estructuración poblacional y evaluación de stock en peces marinos, por su alta variabilidad. Sólo en *Trachurus murphyi* (Ojeda et al. 2002) se ha encontrado una diversidad haplotípica muy baja en el gen Dloop (0,36). Hay que tener en cuenta que el tamaño del fragmento analizado en este estudio fue de 410 pb, aunque se corroboró a posteriori que la región del fragmento con la que estábamos trabajando era uno de los extremos hipervariables (datos no mostrados).

iii. Estructuración poblacional

Se utilizó información proveniente de diferentes fuentes de información, ADN mitocondrial, ADN nuclear, una de las principales diferencias entre éstas es la diferencia en la tasa de mutación. El ADN mitocondrial da cuenta de procesos de mayor data, en cambio los microsatélites de procesos más recientes, o sea, si en una población hay diferencias en el ADN mitocondrial concluiríamos que las poblaciones divergieron hace una escala de tiempo mayor, por otro lado si se encuentra diferencias en los marcadores microsatélites estaríamos en presencia de divergencia a una escala mas actual, entre 10-100 generaciones. Nuestros resultados no muestran diferencias en el área estudiada para ambas fuentes de información. O sea, el recurso merluza de tres aletas que se encuentra presente tanto en aguas jurisdiccionales chilenas y argentinas correspondería a una gran población con dos áreas de desove separadas. Especies de peces marinos se caracterizan principalmente por tener grandes tamaños poblacionales, huevos y larvas pelágicas, alta fecundidad, y conductas migratorias factores que reducen la probabilidad de divergencia entre poblaciones (Wirgin & Waldman 2005), estas características se presentan en la merluza de tres aletas. Estudios acerca de desplazamientos poblacionales del recurso han establecido que se presentan dos, 1) con fines tróficos, hacia el sur en el mar de Escocia y 2) con fines reproductivos hacia el norte a cada área de desove (Pacífico y Atlántico). La mezcla de ambos efectivos en el área de alimentación, podría ser una de las causales de la homogeneidad genética encontrada en este estudio. Esta homogeneidad genética no es inusual en recursos ícticos que se encuentran en la zona económica exclusiva chilena, jurel (Galleguillos & Torres. 1988) (Ojeda et al. 2002), anchoveta (Ferrada et al. 2002), sardina (Galleguillos et al. 1997), congrio dorado (Canales 2006), bacalao de profundidad (Galleguillos & Astete 2003, Galleguillos et al. 2008) entre otros. Los valores del índice de diferenciación poblacional F_{st} fueron bajos y no significativos concordando con (Ward et al. 1994), el cual plantea que peces marinos presentan baja diferenciación genética con valores de $F_{st} < 0,01$, comparados con peces de agua dulce y anádromos. En el caso particular de homogeneidad genética en ambos lados del cono sur sudamericano nuestros resultados son similares a los encontrados en la especie *Dissostichus eleginoides* el cual no mostró diferencias en su distribución geográfica desde el norte de Perú hasta las Islas Malvinas (Galleguillos et al. 2008).

A partir de la información de los resultados genéticos obtenidos en el presente proyecto, la hipótesis de que en el cono sur de América existe un stock genético único que se alimenta y mezcla en aguas subantárticas, para luego incorporarse aleatoriamente a alguno de los flujos migratorios que les conducen a las zonas de desove resulta la más plausible. Siendo una sola gran población que se distribuiría desde su área de desove en el Océano Pacífico (Golfo de Penas), Chile, hasta el extremo austral y desde allí hasta las costas de Argentina, incluyendo la zona de las Is. Malvinas (Falkland).

4.2. Morfometría de otolitos.

Edwin Niklitschek¹, Rubén Roa² & Pamela Toledo¹

¹Universidad Austral de Chile, Centro Trapananda

²Universidad de Concepción, Departamento de Oceanografía

4.2.1. Introducción.

El uso de caracteres fenotípicos en la caracterización de unidades de stock se basa en la identificación de “grupos de individuos pertenecientes a una especie, que mantienen caracteres comunes, ambientalmente dependientes” (Cadrin & Friedland 1999), dentro de estos caracteres se encuentran parámetros vitales a nivel poblacional como: fecundidad, talla de primera madurez, tasa media de crecimiento individual y tasa de mortalidad natural, así como también características anatómicas morfométricas y merísticas (Begg et al. 2001). La identificación de diferencias merísticas y/o morfométricas fue por años la base de las técnicas tradicionales de identificación de stock (Begg & Waldman 1999). Sin embargo, la excesiva variabilidad en las respuestas fenotípicas evaluadas llevó, a menudo, a sugerir la existencia de estructuras poblacionales que terminaron por ser consideradas artefactos de la respectiva técnica de identificación. En la búsqueda de indicadores fenotípicos más estables, se ha propuesto el análisis morfométrico de otolitos, que corresponden a estructuras internas menos sensibles a la variabilidad aleatoria propia de la expresión génica de otros caracteres y a las presiones ambientales de corto plazo (Begg et al. 2001). En efecto, la variabilidad individual de los otolitos durante el crecimiento del individuo parece más limitada que la variabilidad observada en el crecimiento somático, lo que tiende a filtrar cambios de corto plazo en la condición del pez (*e.g.* stress, reproducción o inanición). Sin perjuicio de la sensibilidad relativa a la variabilidad ambiental, el patrón morfológico básico del otolito es especie-específico y puede reflejar también variabilidad genética entre distintos stock (Stransky 2004, Tracey et al. 2006). Esta combinación de aspectos genéticos y ambientales proporciona un enfoque fenotípico de discriminación útil para el manejo pesquero (Begg & Waldman 1999, Begg et al. 2001, Campana 2005, Clausen et al. 2007). En efecto, el análisis de contorno de otolitos, utilizando series de Fourier ha sido aplicada exitosamente en la identificación de stocks en los últimos años (Begg et al. 2001) (Robertson & Talman. 2002, Smith et al. 2002, Cardinale et al. 2004, Stransky 2004, Stransky 2005, Tracey et al. 2006). Cabe señalar que de los tres pares de otolitos (sagita, lapillus y astericus) de acuerdo a Campana & Casselman (1993) los otolitos sagita serían los que discriminan ligeramente mejor la diferencias morfométrica.

En el desarrollo del presente proyecto, aplicamos distintos tipos de herramientas fenotípicas para someter a prueba la hipótesis nula de stock separados planteados en la propuesta, dentro de ellos analizamos parámetros vitales, incluyendo estructura de tallas, modelo de crecimiento, modelo de madurez sexual y se realizó un análisis de descriptores morfométricos (coeficientes de Fourier) en otolitos sagitales en muestras procedentes de las zonas de estudio.

4.2.2. Materiales y métodos.

Los otolitos sagita se obtuvieron a partir del muestreo biológico (Tabla 5, Figura 2) realizado en el área de estudio. Los otolitos extraídos a bordo fueron guardados en sobres de papel previamente rotulados, una vez ingresados al laboratorio de la Universidad Austral de Chile (BIMAC) en Coyhaique, se siguió la siguiente rutina:

1. se revisó cuidadosamente cada muestra, eliminando aquellas quebradas o incompletas.

2. los otolitos fueron limpiados con agua desmineralizada en baño de ultrasonido (Ultrasonik modelo 28H White Ney) por dos horas.
3. fueron deshidratados en estufa de secado (Cole & Parmer modelo 0515-52) a 60°C por 24 horas.
4. se estabilizó la temperatura en cámara de vacío con absorbente de humedad silicagel.
5. una vez estabilizada la temperatura (20 min. aproximadamente) se determinó el peso de cada otolito usando una balanza analítica (Precisa modelo 300A) de precisión de 0,0001 g.

Para el análisis de morfometría cada otolito fue fotografiado con una cámara (Olympus modelo C-5060) instalada en un microscopio trinocular (Olympus modelo SZ-61) a 0,035X de aumento utilizando luz transmitida. Los otolitos se colocaron sobre la platina del microscopio, con el sulcus hacia arriba y el extremo anterior del otolito hacia la derecha. La imagen fue capturada utilizando el software Micrometrics SE Premium (version 2.2 ©). El contorno fue digitalizado utilizando el software Sigma Scan Pro5, las coordenadas fueron exportadas a una planilla para su posterior análisis. Se analizaron 145 otolitos provenientes de distintas zonas de estudio.

Las funciones elípticas de Fourier permiten capturar matemáticamente la silueta de otolitos irregulares de manera eficiente (Tracey et al. 2006). Se utilizó esta técnica para transformar cada otolito en un conjunto de coeficientes que representasen la forma de manera multivariada, tal como lo recomiendan Robertson & Talman (2002). Se calcularon 126 funciones armónicas, de ellas se eliminaron del análisis la primera y segunda, que corrigen por tamaño del otolito y por ende por tamaño del pez, y posición del otolito, y las intermedias que capturan una fracción menor de la morfología del otolito, esto dejó un total de 46 variables descriptoras de la morfología de los otolitos de merluza de tres aletas.

El conjunto de observaciones reunidas en los coeficientes de las funciones armónicas de Fourier forman un conjunto multivariado que describe la forma de los otolitos de merluza de tres aletas. Se utilizó dos técnicas de análisis multivariado para probar la hipótesis de que los otolitos del lado Atlántico versus los del lado Pacífico de Sudamérica correspondían a morfometrías diferentes. Primero, se realizó un Análisis de Varianza Multivariado (MANOVA), con la función *manova* de R (Venables & Ripley 2002), determinando el efecto de la zona al comparar el modelo nulo,

$$\begin{bmatrix} f_{1,j} \\ f_{2,j} \\ \dots \\ f_{46,j} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \beta_1 \\ \beta_2 \\ \dots \\ \beta_{46} \end{bmatrix}$$

con el modelo con efecto de zona,

$$\begin{bmatrix} f_{1,j} \\ f_{2,j} \\ \dots \\ f_{46,j} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \beta_{1,j} \\ \beta_{2,j} \\ \dots \\ \beta_{46,j} \end{bmatrix}$$

donde:

- f_{ij} : valor medio del coeficiente de la función armónica i en la zona j
- β : valor esperado del coeficiente de la función armónica i .

Para la comparación del modelo nulo versus el modelo con efecto de la zona se utilizó la prueba de la razón de verosimilitud, con función *anova* de R.

También, se utilizó el análisis discriminante lineal, con la función lda del paquete contribuido a R ASS (Venables & Ripley 2002). En este caso el objetivo es inverso al del MANOVA: predecir la pertenencia de cada pez a cada zona sobre la base de los 46 coeficientes de las funciones armónicas. En este análisis las diferencias entre las zonas se verán reflejadas en la proporción de otolitos que son asignados exitosamente a su zona verdadera sobre la base de los 46 coeficientes y la muestra de entrenamiento que se usó para crear la función discriminante lineal.

4.2.3. Resultados.

El análisis exploratorio de la morfometría de los otolitos indica que los valores de los coeficientes centrales son consistentemente mayores en los peces del Pacífico Sur (Figura 8). Consecuentemente, el análisis estadístico revela que el modelo que considera a la zona como factor predictor de la estructura multivariada de los coeficientes es significativamente mejor que el modelo que considera a los datos de ambas zonas agrupados (Tabla 16).

Tabla 16: Análisis de varianza de la comparación de un modelo multivariado nulo sin efecto de zona, versus uno en que la zona es un factor significativo, para la morfometría de los otolitos de merluza de tres aletas. GL: grados de libertad.

Modelo	GL residuales	Var. Generalizada	Pillais	F aprox.	GL numerador	GL denominador	Pr(>F)
Nulo	144	10^{-6}	0.519				
Zona	143	9.9×10^{-7}	0.001	2.227	47	97	0.000461

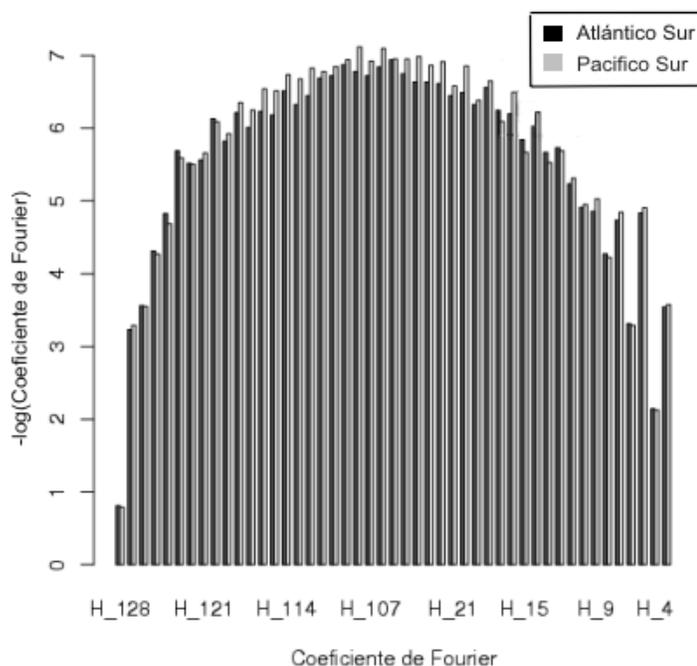


Figura 8: Negativo del logaritmo de los 46 coeficientes de Fourier utilizados como descriptores de la morfometría de los otolitos de merluza de tres aletas del Atlántico Sur y del Pacífico Sur.

El resultado del análisis discriminante lineal realizado sobre la base de los 46 coeficientes se muestra en la Tabla 17. En este caso, coincidentemente con los otros análisis, el análisis discriminatorio lineal logra clasificar exitosamente el 93.8% de los datos.

Tabla 17: Resultado del análisis discriminante realizado a las coordenadas de los otolitos analizados pertenecientes a la zona 1 (Pacífico) o zona 2 (Atlántico).

Origen	Probabilidad de origen		Origen	Probabilidad de origen		Origen	Probabilidad de origen	
	Atlántico	Pacífico		Atlántico	Pacífico		Atlántico	Pacífico
Atlántico	0,960	0,040	Pacífico	0,010	0,990	Pacífico	0,369	0,631
Atlántico	0,744	0,256	Pacífico	0,025	0,975	Pacífico	0,032	0,968
Atlántico	0,816	0,184	Pacífico	0,000	1,000	Pacífico	0,063	0,937
Atlántico	0,833	0,167	Pacífico	0,008	0,992	Pacífico	0,001	0,999
Atlántico	0,995	0,005	Pacífico	0,156	0,844	Pacífico	0,121	0,879
Atlántico	0,953	0,047	Pacífico	0,016	0,984	Pacífico	0,001	0,999
Atlántico	0,999	0,001	Pacífico	0,000	1,000	Pacífico	0,000	1,000
Atlántico	0,564	0,436	Pacífico	0,000	1,000	Pacífico	0,000	1,000
Atlántico	0,855	0,145	Pacífico	0,022	0,978	Pacífico	0,380	0,620
Atlántico	0,555	0,445	Pacífico	0,003	0,997	Pacífico	0,073	0,927
Atlántico	0,543	0,457	Pacífico	0,022	0,978	Pacífico	0,179	0,821
Atlántico	0,501	0,499	Pacífico	0,118	0,882	Pacífico	0,166	0,834
Atlántico	0,635	0,365	Pacífico	0,077	0,923	Pacífico	0,027	0,973
Atlántico	0,998	0,002	Pacífico	0,003	0,997	Pacífico	0,006	0,994
Atlántico	0,978	0,022	Pacífico	0,001	0,999	Pacífico	0,001	0,999
Atlántico	0,973	0,027	Pacífico	0,001	0,999	Pacífico	0,048	0,952
Atlántico	1,000	0,000	Pacífico	0,029	0,971	Pacífico	0,012	0,988
Atlántico	0,863	0,137	Pacífico	0,311	0,689	Pacífico	0,000	1,000
Atlántico	0,731	0,269	Pacífico	0,322	0,678	Pacífico	0,328	0,672
Atlántico	0,548	0,452	Pacífico	0,001	0,999	Pacífico	0,023	0,977
Atlántico	0,997	0,003	Pacífico	0,016	0,984	Pacífico	0,035	0,965
Atlántico	0,794	0,206	Pacífico	0,006	0,994	Pacífico	0,005	0,995
Atlántico	0,997	0,003	Pacífico	0,017	0,983	Pacífico	0,000	1,000
Atlántico	0,939	0,061	Pacífico	0,078	0,922	Pacífico	0,013	0,987
Atlántico	0,975	0,025	Pacífico	0,001	0,999	Pacífico	0,011	0,989
Pacífico	0,013	0,987	Pacífico	0,043	0,957	Pacífico	0,043	0,957
Pacífico	0,024	0,976	Pacífico	0,006	0,994	Pacífico	0,004	0,996
Pacífico	0,015	0,985	Pacífico	0,023	0,977	Pacífico	0,008	0,992
Pacífico	0,090	0,910	Pacífico	0,056	0,944	Pacífico	0,002	0,998

Origen	Probabilidad de origen		Origen	Probabilidad de origen		Origen	Probabilidad de origen	
	Atlántico	Pacífico		Atlántico	Pacífico		Atlántico	Pacífico
Pacífico	0,005	0,995	Pacífico	0,003	0,997	Pacífico	0,037	0,963
Pacífico	0,124	0,876	Pacífico	0,017	0,983	Pacífico	0,015	0,985
Pacífico	0,003	0,997	Pacífico	0,012	0,988	Pacífico	0,051	0,949
Pacífico	0,010	0,990	Pacífico	0,007	0,993	Pacífico	0,000	1,000
Pacífico	0,000	1,000	Pacífico	0,000	1,000	Pacífico	0,026	0,974
Pacífico	0,001	0,999	Pacífico	0,173	0,827	Pacífico	0,390	0,610
Pacífico	0,004	0,996	Pacífico	0,000	1,000	Pacífico	0,049	0,951
Pacífico	0,670	0,330	Pacífico	0,013	0,987	Pacífico	0,025	0,975
Pacífico	0,267	0,733	Pacífico	0,000	1,000	Pacífico	0,013	0,987
Pacífico	0,002	0,998	Pacífico	0,004	0,996	Pacífico	0,003	0,997
Pacífico	0,015	0,985	Pacífico	0,019	0,981	Pacífico	0,000	1,000
Pacífico	0,011	0,989	Pacífico	0,005	0,995	Pacífico	0,000	1,000
Pacífico	0,004	0,996	Pacífico	0,008	0,992	Pacífico	0,023	0,977
Pacífico	0,008	0,992	Pacífico	0,027	0,973	Pacífico	0,003	0,997
Pacífico	0,014	0,986	Pacífico	0,000	1,000	Pacífico	0,025	0,975
Pacífico	0,002	0,998	Pacífico	0,001	0,999	Pacífico	0,000	1,000
Pacífico	0,005	0,995	Pacífico	0,001	0,999	Pacífico	0,229	0,771
Pacífico	0,005	0,995	Pacífico	0,222	0,778	Pacífico	0,008	0,992
Pacífico	0,303	0,697	Pacífico	0,245	0,755	Pacífico	0,017	0,983
						Pacífico	0,002	0,998

4.2.4. Discusión.

La forma del otolito determinada por análisis de descriptores de Fourier puede ser una herramienta de medición rápida y fácil para la discriminación de stock y ha sido utilizada en estudios de diversas especies como caballa (*Scomber scombrus*) (Castonguay et al. 1991), bacalao (*Gadus morhua*) (Campana & Casselman 1993), orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*) (Robertson & Talman. 2002, Smith et al. 2002), redfish (genus *Sebastes*) (Stransky 2004), siendo utilizada como herramienta única o como apoyo a otras técnicas aplicadas en la determinación de stock..

Los resultados de la morfometría de otolitos utilizando el análisis de Fourier indican que existe una diferencia entre los otolitos de ejemplares del Pacífico y los ejemplares del Atlántico, apreciable en la diferencia existente entre los valores de los coeficientes centrales de Fourier y el análisis estadístico que indicó que el modelo que considera a la zona como factor predictor de la estructura multivariada de los coeficientes es significativamente mejor que el que considera a los datos de ambas zonas agrupadas. Además, el análisis discriminatorio lineal logró clasificar exitosamente el 93.8% de los datos.

4.3. Parámetros clave de la historia de vida.

Autor: Rubén Roa ¹

¹ Universidad de Concepción, Departamento de Oceanografía

4.3.1. Introducción.

Este análisis se basó en diversas bases de datos de procesos biológicos de *Micromesistius australis* generadas con información recopilada en las áreas en estudio. Se maximizó las funciones de verosimilitud dentro de un modelo lineal generalizado. La comparación de los modelos nulos versus los modelos con efectos de las variables predictoras se realizó en todos los casos mediante evaluaciones del Índice de Información de Akaike (AIC) o mediante pruebas de razones de verosimilitud, o su equivalente, el análisis de varianza cuando la distribución de los datos fue normal o normal multivariada. El AIC se utilizó cuando la comparación involucró el ajuste de modelos, específicamente, los modelos de crecimiento y de madurez sexual, mientras que la prueba de la razón de verosimilitud se utilizó cuando el análisis involucró una prueba de hipótesis solamente.

En los casos en que la prueba de hipótesis considere la comparación entre Atlántico Sur versus Pacífico Sur, nos referiremos al factor 'zona'. Las bases de datos consideradas, y las hipótesis planteadas para cada base, son:

- Estructura de tallas del desembarque; Atlántico Sur versus Pacífico Sur.
- Longitud y edad de machos y hembras; Atlántico Sur versus Pacífico Sur.
- Longitud y madurez sexual de machos y hembras; Atlántico Sur versus Pacífico Sur.

4.3.2. Materiales y métodos.

- Comparación de la estructura de tallas de los stocks Atlántico y Pacífico, considerando la variabilidad interanual de las diferencias.*

La base de datos consistió de 70.107 registros de longitud estándar agrupados en categorías de 1 cm, de los cuales 24.141 provinieron del Pacífico Sur y 45.966 del Atlántico Sur (Tabla 5). Estos últimos datos fueron proporcionados por colegas del Department of Fisheries del Falkland Islands Government, y cubrieron un período desde 1998 a 2007. Los datos del Pacífico Sur sólo cubrieron el período 2002 a 2007, sin datos para el año 2006. Puesto que la comparación de la estructura de tallas del stock a ambos lados de América del Sur debe considerar el efecto de la variabilidad interanual, se eliminaron del análisis los registros del Atlántico Sur anteriores a 2002. En cambio, fueron considerados los datos del Atlántico Sur de 2006, a pesar de la ausencia de los mismos en el lado Pacífico.

Los datos disponibles no presentaron diferenciación por sexo así que los análisis se realizaron sobre los sexos agrupados. Para disminuir la variabilidad muestral, antes de la aplicación de los modelos estadísticos, los datos de talla fueron agrupados en categorías de 5 cm, definidas como:

L_{20} : $LS \leq 20$ cm.

L_{25} : $20 \text{ cm} < LS \leq 25$ cm

L_{30} : $25 \text{ cm} < LS \leq 30$ cm

$L35: 30 \text{ cm} < LS \leq 35 \text{ cm}$

$L40: 35 \text{ cm} < LS \leq 40 \text{ cm}$

$L45: 40 \text{ cm} < LS \leq 45 \text{ cm}$

$L50: 45 \text{ cm} < LS \leq 50 \text{ cm}$

$L55: 50 \text{ cm} < LS \leq 55 \text{ cm}$

$L60: 55 \text{ cm} < LS \leq 60 \text{ cm}$

$L65: 60 \text{ cm} < LS \leq 65 \text{ cm}$

$L70: LS > 65 \text{ cm}$

Modelación Estadística

Los datos de estructura de tallas en la captura forman una variable de distribución multinomial,

$$\begin{bmatrix} l_1 \\ l_2 \\ \dots \\ l_k \end{bmatrix}$$

donde

l_i : número de peces en la muestra de la captura cuya talla hace que pertenezca a la categoría de talla i ,

k : número de categorías de talla ($k=11$).

La distribución multinomial correspondiente tiene parámetros,

$$\begin{bmatrix} p_1 \\ p_2 \\ \dots \\ p_{k-1} \\ n \end{bmatrix}$$

donde

n : número total de peces en la muestra de la captura, $p_i \leq 1$, y $\sum p_i = 1$.

Para determinar si existen diferencias en la estructura de tallas en la captura entre las muestra del Pacífico Sur y las del Atlántico Sur, tomando en cuenta el efecto anual, se realizó un análisis de regresión logística multinomial, una forma de modelo lineal generalizado con variable respuesta multivariada y discreta (Venables & Ripley 2002). Los modelos lineales generalizados fueron planteados en la siguiente secuencia.

Primero, el modelo nulo fue,

$$\log\left(\frac{p_i}{p_1}\right) = y_i$$

donde

la zona de referencia es Pacífico Sur,

el año de referencia es 2002, y

y es el puntaje logit independiente de la zona y del año.

Segundo, el modelo con efecto exclusivamente del año fue,

$$\log\left(\frac{p_{i,y}}{p_{1,y}}\right) = \gamma(i, \text{Año}_y)$$

donde

Año_y entra como un factor.

Tercero, el modelo con efecto exclusivamente de la zona fue,

$$\log\left(\frac{p_{i,j}}{p_{1,j}}\right) = \gamma(i, \text{Zona}_j)$$

donde

Zona_j es un factor.

Cuarto, el modelo con efecto separado de año y zona fue,

$$\log\left(\frac{p_{i,j}}{p_{1,j}}\right) = \gamma(i, \text{Año}_y) + \gamma(i, \text{Zona}_j) .$$

Este modelo corresponde al caso en que la estructura de tallas de la captura es diferente para cada zona y diferente para cada año, pero el cambio anual es independiente de la zona.

Quinto, el modelo más complejo fue con interacción entre zona y año, donde la diferencia entre las zonas cambia a través de los años.

$$\log\left(\frac{p_{i,j}}{p_{1,j}}\right) = \gamma_i + \gamma(i, \text{Año}_y) + \gamma(i, \text{Zona}_j) + \gamma(i, \text{Año}_y) \cdot \gamma(i, \text{Zona}_j)$$

La comparación de los modelos se realizó a través de la prueba de la razón de verosimilitud, que es equivalente a un anova si la distribución de los datos fuera normal. En los ajustes de los modelos se utilizó el paquete *nnet* de R, y la función *multinom* (Venables & Ripley 2002).

ii. Ajuste y comparación de modelos de crecimiento de los stocks Atlántico y Pacífico.

La base de datos consistió en 9.963 observaciones de longitud estándar y edad del Atlántico sur (zona 4), y 505 observaciones similares del Pacífico sur (zonas 1, 2 y 3). De la base de datos de la zona 4 fueron eliminados cuatro datos, uno con edad de 85 años, otro con edad 0 años y longitud 59 cm, y dos con edad 1 año y longitud 57 cm y 48 cm. Además fueron eliminados todos los registros en que el sexo fue indeterminado. Esto resultó en 4.918 observaciones de hembras y 4.967 de machos para la zona 4, y 246 observaciones en hembras y 102 en machos para el Pacífico sur.

Modelación Estadística

Sea $l(a)$ un modelo de crecimiento, donde la longitud del pez es función de la edad. Se investigó dos modelos de crecimiento:

Schnute:

$$l(a) = \left(l_1^{g_2} + \left(\frac{l_2^{g_2}}{1 - g_2} - l_1^{g_2} \right) (1 - \exp(-g_1(a - a_1))) \right)^{(1/g_2)}$$

von Bertalanffy:

$$l(a) = l_{\infty} \left(1 - \left(\frac{l_0}{l_{\infty}} \right) \exp(-Ka) \right)$$

Ambos modelos han sido reparametrizados por este autor, la reparametrización del modelo de Schnute es explicada en Arkhipkin(2005); la reparametrización del modelo de von Bertalanffy consiste en reemplazar el parámetro t_0 (que tiene poco sentido físico pues es una edad negativa) por la longitud inicial (l_0), que sí es directamente interpretable en términos biológicos. La justificación biológica-matemática del uso del modelo de Schnute se encuentra en Arkhipkin(2005).

El modelo estadístico consistió en

$$\lambda(a_i) = l(a_i) + \epsilon_1, \quad \epsilon \sim P(l(a), \sigma^2, p, \alpha)$$

donde:

- λ : variable aleatoria que representa la longitud de un pez individual (indexado por λ),
- $l(a)$: modelo de crecimiento subyacente (Schnute o von Bertalanffy)
- ϵ : variable aleatoria de distribución P ,
- P : distribución robusta que considera una mezcla entre una distribución normal con media $l(a)$ y varianza σ^2 , y otra distribución de colas mucho más altas con parámetro α y parámetro de mezcla p .

En esencia, este es un modelo de regresión robusta y es el mismo que está implementado en ADMB, en este caso se codificó en el sistema de programación estadística R 2.7.1. El uso de la distribución robusta sirve para dar cuenta de errores de lectura de edad como los que se sospecha han ocurrido en el caso de algunos puntos alejados de la nube de datos en la Figura 13, en lugar de eliminar esos puntos manualmente, la regresión robusta da cuenta de ellos como provenientes de la distribución de colas altas que está mezclada con la distribución normal (Arkhipkin & Roa-Ureta 2005).

El ajuste de los modelos se realizó codificando nuestras propias funciones que llaman a la función de maximización no lineal de R, nlm. Primero se comparó el modelo de Schnute con el modelo de von Bertalanffy, para cada sexo y cada zona. Una vez decidido cuál de ambos modelos representa mejor el crecimiento de merluza de tres aletas, se contrastó el modelo según el cual hay un sólo modelo de crecimiento válido para ambas zonas versus un modelo en que existen modelos diferentes de crecimiento para cada zona, siempre respetando la diferencia entre sexos.

iii. Estimación y comparación de los modelos de madurez sexual.

Se contó con tres bases de datos, dos del sector Pacífico y una del sector Atlántico. Las primeras provinieron de los proyectos FIP 2001-20 y 2005-06, ambos de evaluación hicroacústica del stock de merluza de tres aletas. La base del sector Atlántico fue proporcionada por colegas del Department of Fisheries del gobierno de las Islas Malvinas. Desafortunadamente, la base de datos proveniente del lado Atlántico no contenía información sobre fecundidad. Debido a esto, sólo se realizó un análisis cuantitativo de las tallas de madurez sexual del lado Atlántico versus lado Pacífico.

La escala de madurez utilizada en las tres bases de datos para clasificar a los peces en estados de madurez sexual se basó en la escala de Macchi et al. (2005), que considera hasta ocho estadios, de los cuales generalmente se observan sólo seis. En los informes finales de los proyectos FIP 2001-20 y 2005-06 se indica que se considera sexualmente maduros a los peces del lado Pacífico en estado 3 y superior; lo mismo indican Macchi et al. (2005) y Macchi & Pájaro (1999), que ocurre en el Atlántico. Si bien se utilizó bases de datos de distinta procedencia, se hizo esfuerzos para

compatibilizar los estados de madurez del Atlántico con los del Pacífico (comunicación personal con científicos de diversas instituciones), además la clasificación de peces maduros e inmaduros en cada base de datos se realizó sobre la base de las aclaraciones de Paul Brickle (Falkland Island Fisheries Department). En este análisis se supuso que los peces en estado 1 y 2 fueron juveniles inmaduros, y los peces en estados superiores fueron peces maduros. Los individuos cuyo sexo fue indeterminado o que no presentaron registro de estado de madurez fueron eliminados del análisis. Dado estos criterios, los datos de frecuencia de individuos maduros a la talla son los que se indican en la Tabla 18; las frecuencias y proporciones de individuos maduros a la talla se muestran en la Figura 14.

Tabla 18: Número de individuos maduros e inmaduros en tres bases de datos correspondientes a merluza de tres aletas (Fuente: FIFD: Falkland Islands Fisheries Department).

		Zona	Hembras	Machos
Inmaduros	FIP 2001-20	Pacífico Sur	229	30
	FIP 2005-06	Pacífico Sur	37	1
	FIFD	Atlántico Sur	202	292
Maduros	FIP 2001-20	Pacífico Sur	474	564
	FIP 2005-06	Pacífico Sur	758	666
	FIFD	Atlántico Sur	3273	4056

Modelación Estadística

En general, se siguieron los métodos descritos en Roa-Ureta et al. (1999), basados en maximizar una función de verosimilitud binomial sobre datos agrupados en categorías de longitud de 1 cm. Sin embargo, en el presente trabajo no se utilizó remuestreo Montecarlo para evaluar la incerteza asociada al parámetro de longitud de 50% de madurez. En lugar de eso se re-parametrizó el modelo logístico según

$$\phi(l) = \begin{cases} 0 & l = 0 \\ \phi(l) = \frac{1}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 l}} & l > 0 \end{cases}$$

$$\beta_0 + \beta_1 l(\phi) = \ln \frac{1 - \phi}{\phi}$$

$$\phi = 0.5, \rightarrow \beta_0 = -\beta_1 l_{.5}$$

$$\phi = 0.95, \rightarrow \beta_0 + \beta_1 l_{.95} = \ln(1/19), \quad \beta_1 = \frac{\ln(1/19)}{l_{.95} - l_{.5}}, \quad \beta_0 = -l_{.5} \frac{\ln(1/19)}{l_{.95} - l_{.5}}$$

donde:

ϕ : proporción de madurez

l : longitud estándar

β_0 y β_1 : parámetros, que se reemplazan por $l_{.5}$ y $l_{.95}$ (longitud de 50% y de 95% de madurez respectivamente).

De esta manera la incerteza asociada a la longitud de 50% de madurez, $l_{.5}$ es evaluada directamente de la maximización de la función de soporte, en lugar de recurrir a simulación Monte Carlo.

La comparación de los modelos de madurez sexual entre las dos zonas se realizó utilizando el Índice de Información de Akaike (AIC). Para esta comparación, se calculó el AIC cuando se ajustaron dos

modelos diferentes para cada zona, suponiendo independencia entre los datos; cuando los datos se agregan se realizó un sólo ajuste, ignorando la zona de origen de los datos.

La estimación de la edad de madurez sexual se realizó utilizando la estimación de talla de madurez sexual y la función de crecimiento de von Bertalanffy inversa,

$$a_{.5} = -\frac{1}{K} \log \left(\frac{1 - \frac{l_{.5}}{l_{\infty}}}{1 - \frac{l_0}{l_{\infty}}} \right)$$

Al reemplazar los parámetros de esta ecuación por los estimadores de máxima verosimilitud obtenidos en las secciones de modelación del crecimiento y de la longitud de madurez sexual, se obtiene un estimador de máxima verosimilitud de la edad de 50% de madurez, por la propiedad de invarianza funcional de los estimadores de máxima verosimilitud Casella (1990). Para obtener la medida de incerteza de este estimador (error estándar), se utilizó una aproximación a la curvatura alrededor del máximo de la curva de soporte mediante expansión por series de Taylor,

$$EE(a_{.5}) = \left[\begin{array}{cccc} \frac{\partial a_{.5}}{\partial K} & \frac{\partial a_{.5}}{\partial l_{\infty}} & \frac{\partial a_{.5}}{\partial l_0} & \frac{\partial a_{.5}}{\partial l_{.5}} \end{array} \right] \left[\begin{array}{cccc} \hat{v}(\hat{K}) & \hat{c}(\hat{K}, \hat{l}_{\infty}) & \hat{c}(\hat{K}, \hat{l}_0) & \hat{c}(\hat{K}, \hat{l}_{.5}) \\ \hat{c}(\hat{l}_{\infty}, \hat{K}) & \hat{v}(\hat{l}_{\infty}) & \hat{c}(\hat{l}_{\infty}, \hat{l}_0) & \hat{c}(\hat{l}_{\infty}, \hat{l}_{.5}) \\ \hat{c}(\hat{l}_0, \hat{K}) & \hat{c}(\hat{l}_0, \hat{l}_{\infty}) & \hat{v}(\hat{l}_0) & \hat{c}(\hat{l}_0, \hat{l}_{.5}) \\ \hat{c}(\hat{l}_{.5}, \hat{K}) & \hat{c}(\hat{l}_{.5}, \hat{l}_{\infty}) & \hat{c}(\hat{l}_{.5}, \hat{l}_0) & \hat{v}(\hat{l}_{.5}) \end{array} \right] \left[\begin{array}{c} \frac{\partial a_{.5}}{\partial K} \\ \frac{\partial a_{.5}}{\partial l_{\infty}} \\ \frac{\partial a_{.5}}{\partial l_0} \\ \frac{\partial a_{.5}}{\partial l_{.5}} \end{array} \right]^{1/2}$$

Las derivadas parciales en esta fórmula fueron derivadas analíticas calculadas con el Computer Algebra System Maxima 5.15.0.

Para realizar la estimación se utilizó código R 2.7.1, que permite realizar todo el proceso de análisis, desde los vectores de longitud y estado de madurez (0 para inmaduro, 1 para maduros) básicos, hasta la estimación de los parámetros, esto último utilizando la función de maximización no lineal, `nlm()`. Para la estimación de $a_{.5}$ y de su error estándar se escribió una función original en código R 2.7.1, que llamamos a `50.vbf()`, y que tiene como argumentos a los 11 valores distintos de la fórmula matricial, proporcionados por el usuario.

4.3.3. Resultados

- i. *Comparación de la estructura de tallas de los stocks Atlántico y Pacífico, considerando la variabilidad interanual de las diferencias.*

Se realizó un análisis de los datos crudos con el fin de comparar las medias de los stock del Pacífico y del Atlántico (Tabla 19) se observa que los ejemplares del Atlántico sur tienden a presentar una mayor talla media que los ejemplares del Pacífico sur. La talla media por año tiende a presentar una mayor variabilidad en la zona del Pacífico sur que en la zona del Atlántico sur (Figuras 9 y 10). Los datos crudos de frecuencia de tallas en categorías de 1 cm se muestran en la Figura 11. En general se observan diferencias entre los años y entre las dos zonas, aunque la forma general de la estructura de

talla se mantiene relativamente estable, con predominancia de individuos entre 50 y 60 cm, excepto en el año 2004 en la zona del Pacífico, que muestra una estructura completamente diferente a las restantes diez combinaciones de año y zona.

Tabla 19: Talla media, desviación estándar, talla máxima, mínima y mediana para merluza de tres aletas provenientes de las zonas 1 (Pacífico sur) y 4 (Atlántico sur).

Año	Media		Desviación estándar		Máximo		Mediana		Mínimo	
	Atlántico	Pacífico	Atlántico	Pacífico	Atlántico	Pacífico	Atlántico	Pacífico	Atlántico	Pacífico
1998	50,5		5,43		60		52		35	
1999	51,1		4,74		61		52		38	
2001	52,2		5,07		61		54		34	
2002	51,3	49,9	6,72	7,83	65	67	53	53	18	21
2003	48,52	49	6,97	8,74	64	62	49	52	18	23
2004	50,6	45,4	6,07	6,04	67	64	51	44	22	32
2005	51,1	50	5,88	7,38	64	69	52	50	18	27
2006	49,9		6,63		65		51		29	
2007	50,1	51,1	5,95	7,44	66	65	50	52	21	29

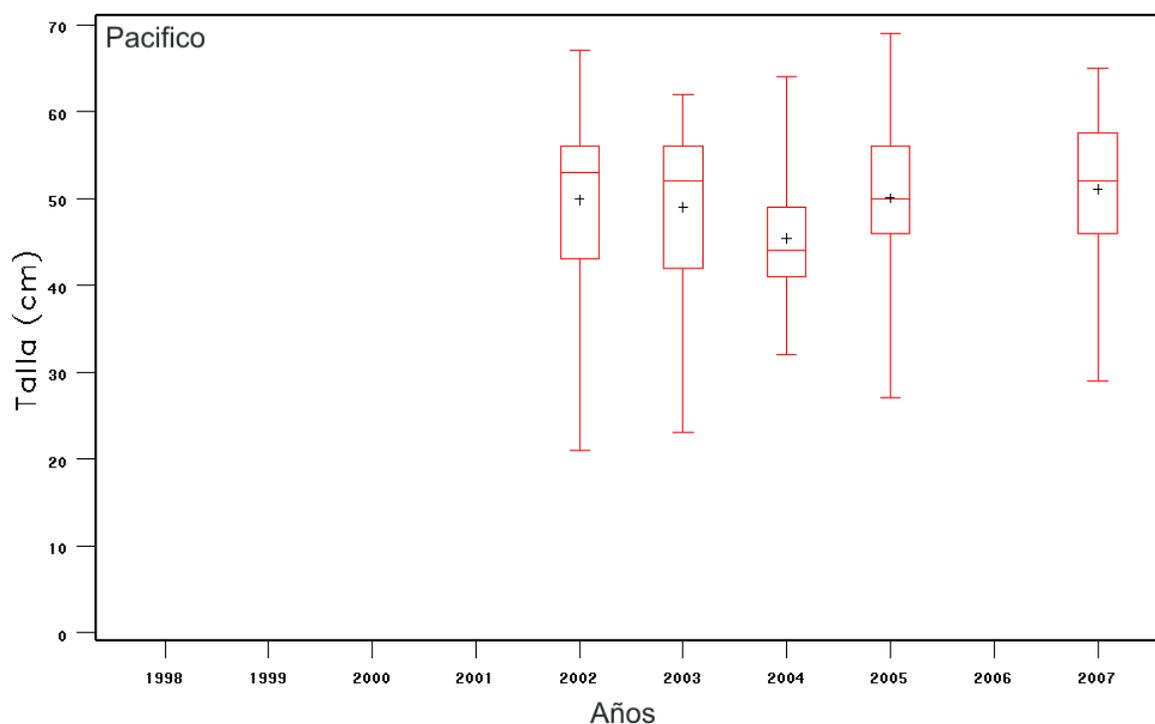


Figura 9: Diagramas de Tukey para las medias de tallas de merluza de tres aletas en zona 1 (Pacífico sur).

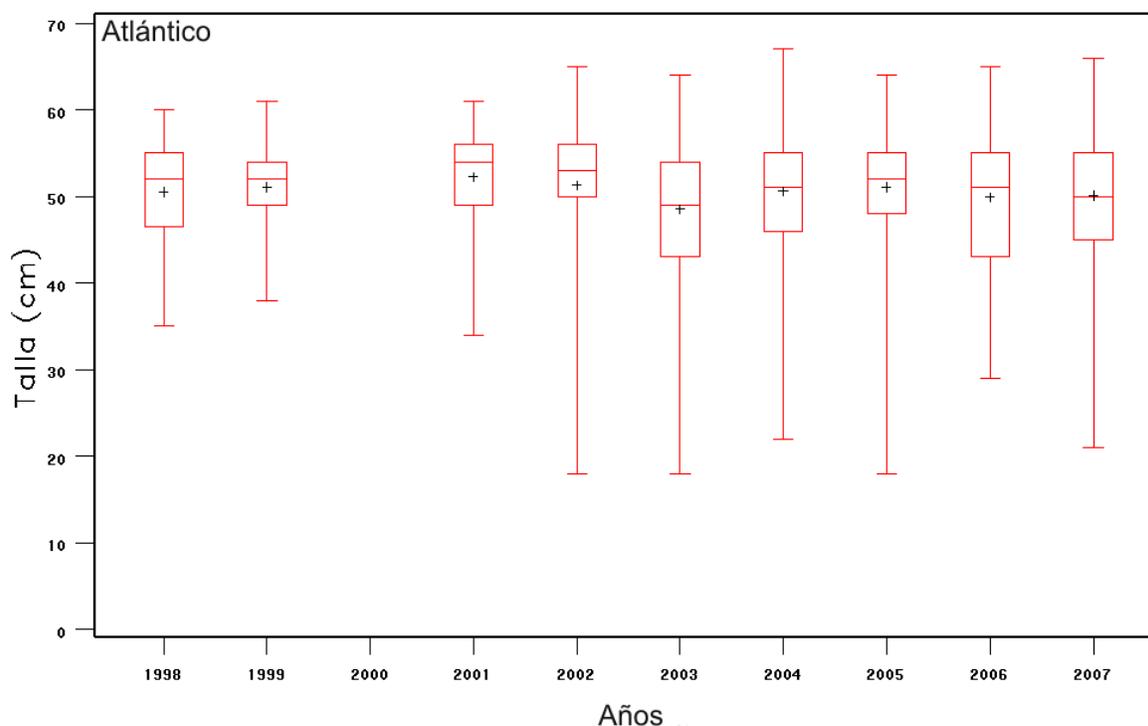


Figura 10: Diagramas de Tukey para las medias de tallas de merluza de tres aletas zona 4 (Atlántico sur).

Para disminuir la variabilidad muestral, los datos de talla se agruparon en categorías de 5 cm (Figura 12). Estos datos difieren entre las dos grandes zonas y esta diferencia ocurre aún cuando se despeja el efecto del año (Tabla 20). En definitiva, el modelo más apoyado por los datos contiene diferencias entre zonas que van cambiando con los años. Al inspeccionar las Figuras 11 y 12 se aprecia que en el Atlántico Sur hay menor presencia de tallas menores que en el Pacífico sur. Esto puede deberse a que en el lado Atlántico hay una mayor presencia de peces de mayor talla, o que la selectividad de la flota Atlántica es más específica hacia los tamaños mayores que la flota del Pacífico, o a una combinación de ambos factores. Estas diferencias se observaron aún cuando se disminuyó la resolución de la medición de talla, desde grupos de 1 cm a grupos de 5 cm.

Tabla 20: Resultados de la prueba de razón de verosimilitud para varias hipótesis concernientes con las diferencias en la estructura de tallas entre el Pacífico Sur y el Atlántico Sur, el quinto modelo incluye interacción y efectos principales.

Modelo	GL residuales	Devianza residual	GL	Razón de verosimilitud	Pr(> χ^2)
Nulo	100	234995,5			
Año	90	232994,6	10	2000,89	<10 ⁻⁶
Zona	50	229596,8	40	3397,84	<10 ⁻⁶
Zona + Año	40	227751,4	10	1845,3	<10 ⁻⁶
Zona * Año	0	226263,0	40	1488,4	<10 ⁻⁶

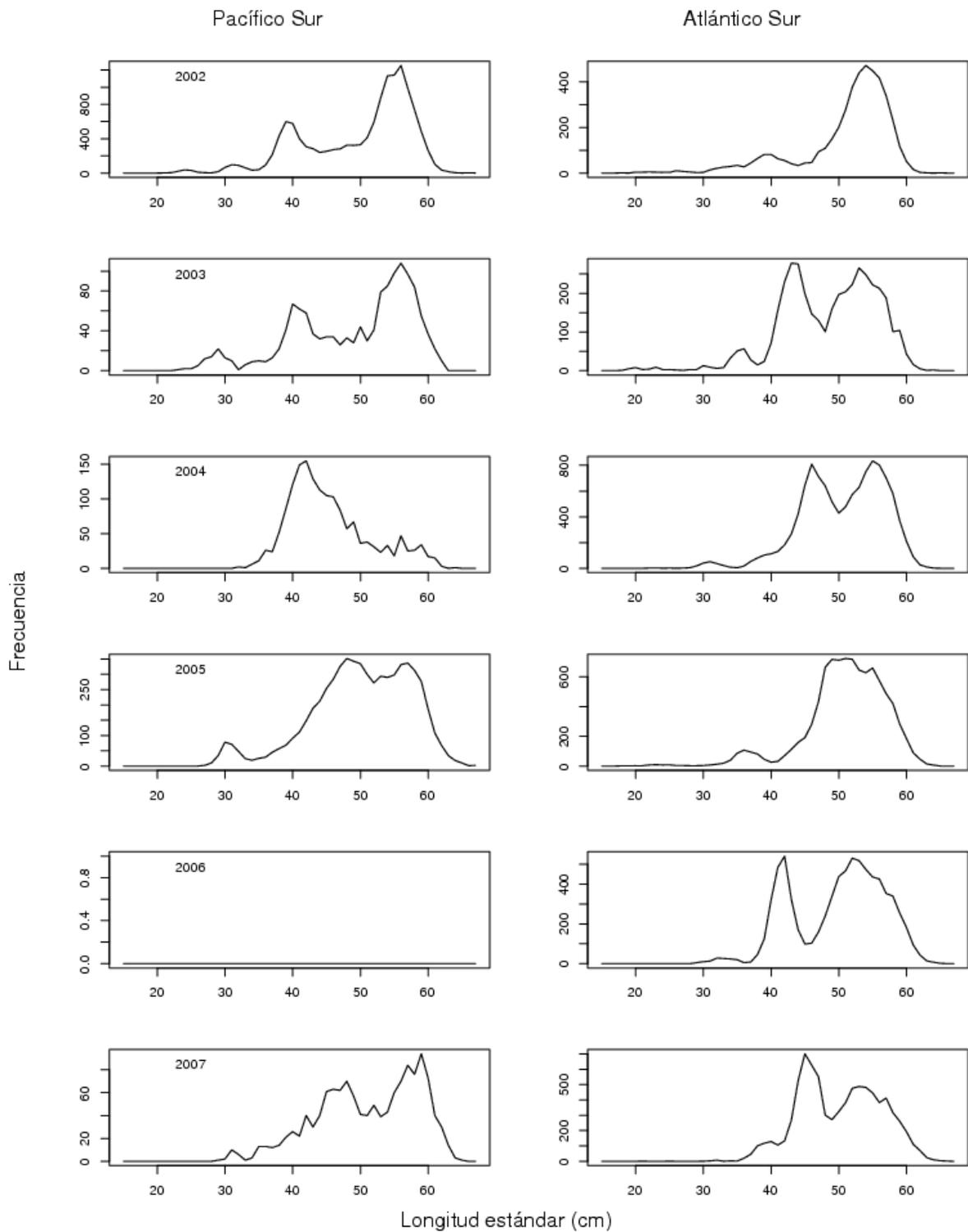


Figura 11: Estructuras de tallas de merluza de tres aletas en el lado Pacífico y Atlántico de América del Sur. No se dispuso de los datos del año 2006 en el Pacífico Sur.

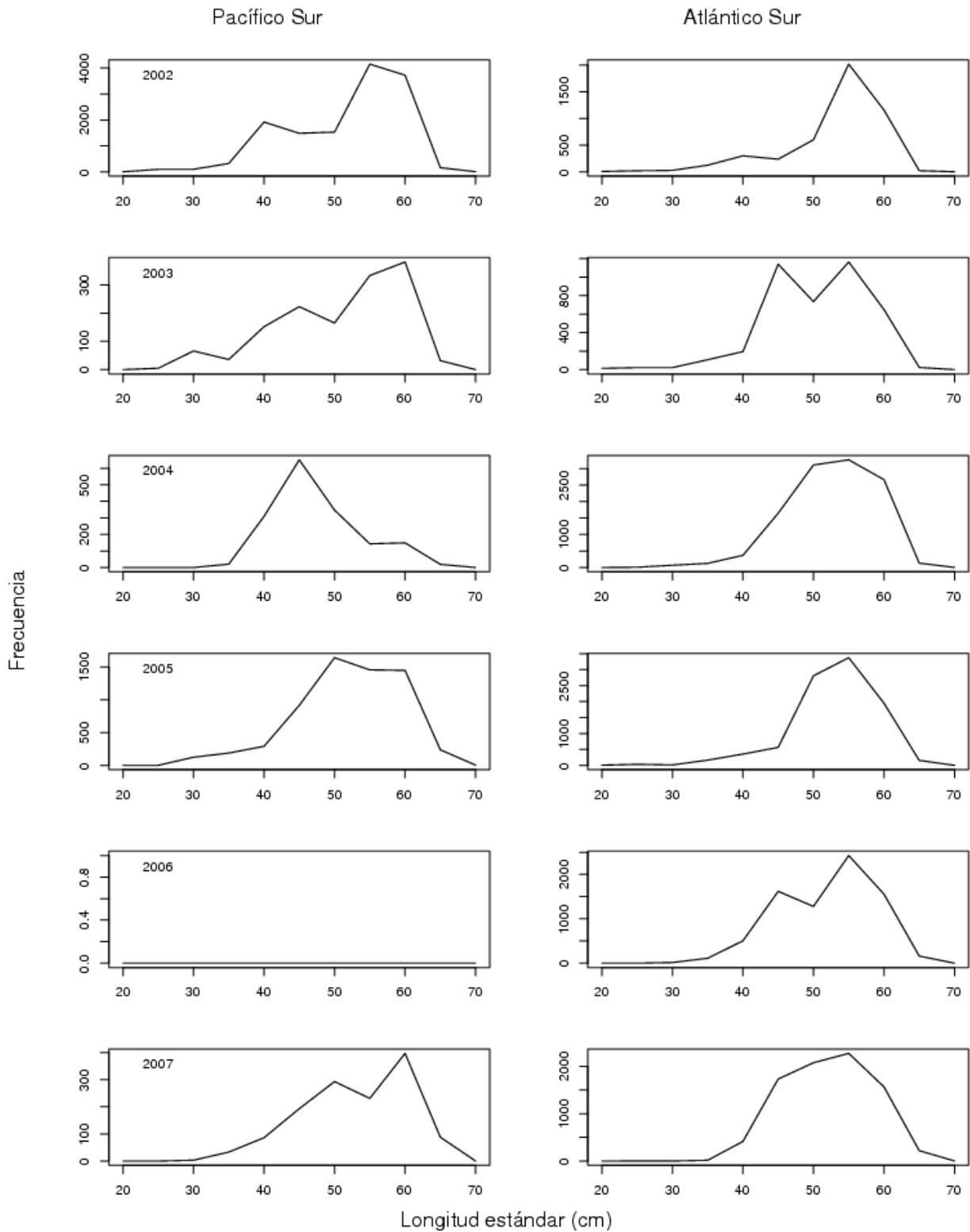


Figura 12: Re-agrupamiento de los datos de estructura de tallas en categorías de cinco cm para los análisis de modelación estadística.

ii. *Ajuste y comparación de modelos de crecimiento de los stocks Atlántico y Pacífico.*

Los datos crudos de edad y longitud que fueron usados en la modelación se muestran en la Figura 13, para ambas zonas consideradas separadamente, y en ambos sexos, el modelo que proporciona una mejor explicación de los datos de edad y longitud es el de von Bertalanffy (Tabla 21, Figura 13).

Asimismo, el modelo que considera que en ambas zonas los peces crecen con su propio modelo de crecimiento von Bertalanffy, para cada sexo, es superior al modelo que supone que existe un único modelo de crecimiento para cada sexo. Por lo tanto, nuestra conclusión es que existen diferencias en el crecimiento de hembras y machos de merluza de tres aletas entre ambos lados de Sudamérica. Los parámetros ajustados y sus errores estándar se informan en la Tabla 22.

En general, las hembras alcanzan mayores longitudes que los machos a ambos lados de Sudamérica y los peces de ambos sexos son de mayor longitud en el lado Atlántico. Las tasas de crecimiento son diferentes entre zonas, a juzgar por la forma de las curvas de crecimiento (Figura 13). En el Atlántico, los peces crecen más rápido en su etapa juvenil.

Tabla 21: Comparación de modelos de crecimiento de Schnute y von Bertalanffy en merluza de tres aletas de ambos lados de Sudamérica.

		Hembras		Machos	
		Atlántico Sur	Pacífico Sur	Atlántico Sur	Pacífico Sur
Schnute	Máximo función de soporte	-8872.3	-397.6	-8439.2	-118.9
	Número de parámetros	4	4	4	4
	AIC	17752.6	803.2	16886.4	245.8
von Bertalanffy	Máximo función de soporte	-8865.6	-397.6	-8431.6	-119.5
	Número de parámetros	3	3	3	3
	AIC	17737.1	801.2	16869.3	245.0
Una zona	Máximo función de soporte	-10997.93		9417.65	
	Número de parámetros	3		3	
	AIC	22001.87		18841.3	
Dos Zonas	Máximo función de soporte	-9269.9		-8558.1	
	Número de parámetros	6		6	
	AIC	18545.8		17122.2	

Tabla 22: Parámetros y sus errores estándar (entre paréntesis) de los modelo de crecimiento seleccionados para merluza de tres aletas de ambos lados de Sudamérica

		Atlántico Sur	Pacífico Sur
Hembras	l_{∞} (cm)	59.0 (0.1)	55.8 (2.3)
	l_0 (cm)	13.6 (0.3)	28.3 (1.2)
	K (año ⁻¹)	0.214 (0.002)	0.089 (0.017)
Machos	l_{∞} (cm)	55.0 (0.1)	48.0 (2.1)
	l_0 (cm)	11.8 (0.3)	30.4 (2.1)
	K (año ⁻¹)	0.244 (0.002)	0.110 (0.037)

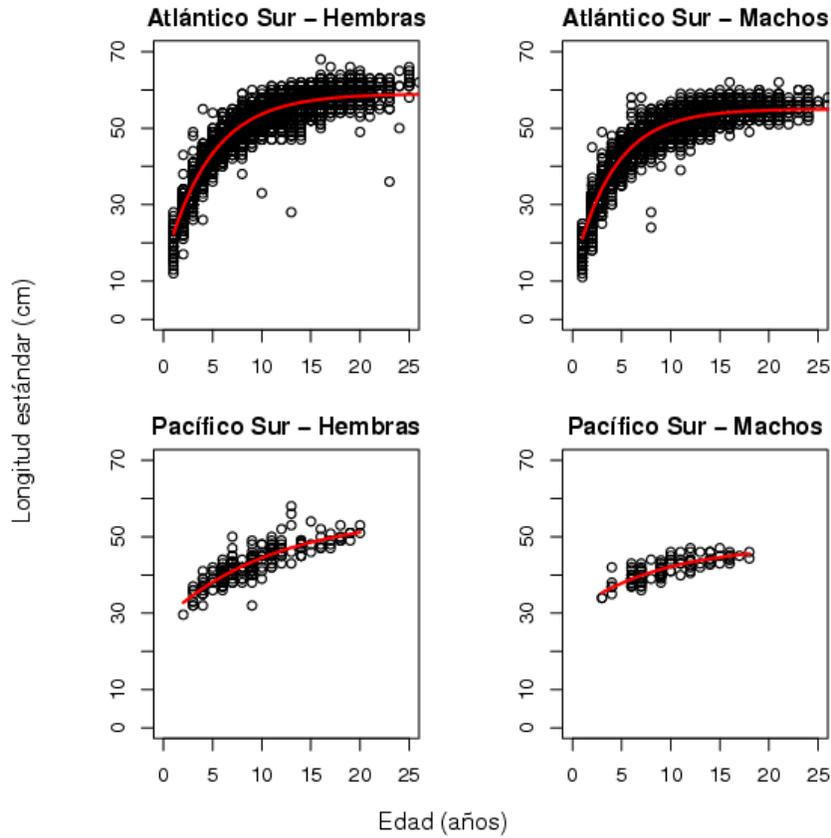


Figura 13: Modelo de crecimiento de von Bertalanffy en merluza de tres aletas de ambos lados de Sudamérica.

iii. Estimación y comparación de los modelos de madurez sexual.

El modelo de madurez sexual como función de la longitud que considera que los stocks de merluza de tres aletas del Atlántico Sur y del Pacífico Sur presentan distintos parámetros, es superior al modelo que considera que ambos stocks maduran según los mismos parámetros, para ambos sexos (Tabla 23). Las diferencias entre ambos stock son claras, a juzgar por la magnitud de las diferencias entre los AIC. En el caso de la comparación con los datos de machos, se ignoraron los datos del Pacífico Sur provenientes del proyecto FIP 2005-06, puesto que estos datos rindieron una estimación exacta, no estadística, de la longitud de 50% de madurez (ver más adelante).

Tabla 23: Comparación del modelo de madurez sexual como función de la longitud de merluza de tres aletas para dos zonas, Atlántico Sur versus Pacífico Sur.

	Hembras		Machos	
	Una Zona	Dos Zonas	Una Zona	Dos Zonas
Máximo función de soporte	-1321.79	-779.43	-645.73	-568.57
Número de parámetros	2	6	2	4
AIC	2647.57	1570.85	1295.47	1145.14

Las diferencias en el modelo de madurez sexual entre ambas zonas corresponden a longitudes de 50% y de 95% mucho menores en las hembras del Atlántico Sur que en las hembras del Pacífico Sur, mientras que en los machos las diferencias se deben sólo a una menor longitud de 95% de madurez en el Atlántico Sur (Tabla 24). En el caso de los machos esto indica una mayor gradualidad en el Pacífico Sur, lo cual se observa claramente en la ojiva de madurez sexual (Figura 14). En el caso de las hembras, la diferencia es tan importante que a la longitud en que las hembras del Pacífico Sur alcanzan el 50% de maduración, las hembras del Atlántico Sur alcanzan un 95% de maduración (Tabla 24).

Los autores del Informe Final del proyecto FIP 2001-20 (Lillo et al. 2002) consideraron inválidos sus datos de madurez sexual obtenidos en ese proyecto, y por lo tanto decidieron no ajustar una ojiva de madurez. Al realizar el análisis de los datos reportados en ese proyecto, se observa que en efecto la talla de madurez sexual de las hembras es sumamente alta comparada con los resultados del lado Atlántico (Tabla 24), que abarcan 20 años de muestreos. En cambio, los resultados reportados en el proyecto FIP 2005-06 producen una estimación de talla de madurez sexual de las hembras que se aproxima mucho más a la observada en el lado Atlántico (Tabla 24). Siguiendo el criterio de Lillo et al. (2002), respecto del Pacífico Sur estamos descartando los resultados obtenidos con los datos del proyecto FIP 2001-20, y consideramos válidos sólo los resultados basados en los datos del proyecto FIP 2005-06.

En el caso de los machos del Pacífico Sur (proyecto FIP 2005-06) la progresión desde inmaduros a maduros ocurrió exactamente desde la longitud 28 cm a la longitud 29 cm, lo que implica una longitud de 50% de madurez de 28,5 cm. Este resultado puede ser considerado cuestionable puesto que no se observaron machos inmaduros (Figura 14). Sin embargo, la similaridad de este valor con el obtenido desde la base de datos del Atlántico (e incluso en la dudosa base de datos de madurez sexual del proyecto FIP 2001-20, Tabla 24) hace pensar que puede ser válido, y por lo tanto es reportado en este estudio. No obstante lo anterior, no es posible usar este estimado en la estimación de la edad de 50% de madurez de machos para el Pacífico Sur, porque este valor de longitud de 50% de madurez sexual es mayor que la longitud inicial l_0 proveniente del modelo de crecimiento (Tabla 22), lo que produce valores infactibles al usar la ecuación para a_5 . En consecuencia sólo se compara la edad de 50% de madurez entre hembras de ambos lados de América del Sur.

En el Atlántico Sur la edad de maduración es similar en hembras y machos, cerca de los dos años de vida, y en el caso de las hembras, ésta es muy diferente al mismo parámetro de la historia de vida en el Pacífico Sur (Tabla 25). Esto se debe tanto a las diferencias en las tasas de crecimiento reportadas en Crec_RR.odt como a las diferencias en maduración sexual. Las hembras en el Atlántico Sur maduran tres años antes que las hembras del Pacífico Sur.

Tabla 24: Parámetros ajustados de la ojiva de madurez de merluza de tres aletas en el Atlántico Sur y en Pacífico Sur. Errores estándar entre paréntesis.

		Hembras	Machos
Longitud de 50% (cm)	Atlántico Sur	29.6 (0.4)	29.7 (0.3)
	Pacífico Sur – FIP 2001-20	46.3 (1.3)	30.4 (2.8)
	Pacífico Sur – FIP 2005-06	38.3 (0.9)	28.5
Longitud de 95% (cm)	Atlántico Sur	38.4 (0.4)	38.1 (0.3)
	Pacífico Sur – FIP 2001-20	74.7 (3.3)	48.1 (1.3)
	Pacífico Sur – FIP 2005-06	44 (0.8)	-----

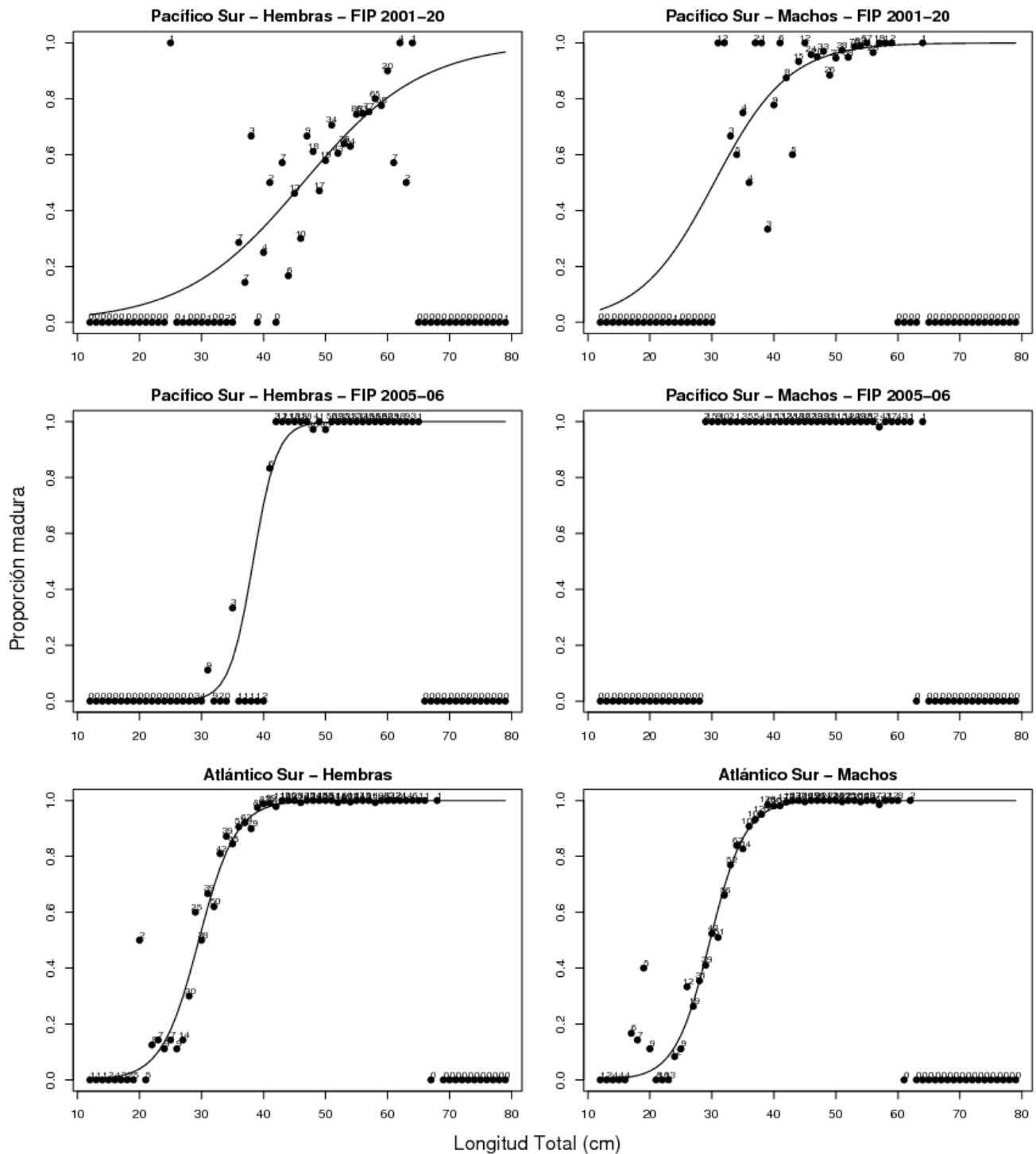


Figura 14: Ojivas de madurez sexual de merluza de tres aletas en el Pacífico Sur y en el Atlántico Sur. Los números indican el número de observaciones en cada categoría de longitud.

Tabla 25: Edad de 50% de maduración sexual de merluza de tres aletas en el Atlántico Sur y en Pacífico Sur. Errores estándar entre paréntesis.

	Hembras	Machos
Atlántico Sur	2.02 (0.07)	2.20 (0.09)
Pacífico Sur – FIP 2005-06	5.12 (0.66)	-----

4.3.4. Discusión

Los análisis basados en verosimilitud realizados sobre diferentes bases de datos colectadas durante la ejecución del proyecto, de diferencias y similitudes entre divisiones espaciales mayores del stock de merluza de tres aletas en la plataforma continental sur de Sudamérica, permitieron realizar análisis de:

- 1) estructuras de tallas observadas por las flota pesquera de las Falklands en el lado Atlántico, y la flota chilena en el lado Pacífico,
- 2) edad y longitud,
- 3) estado de madurez sexual y longitud,

Se pudo distinguir estos estudios como orientados a procesos biológicos los que corresponden a procesos fuertemente afectados por la condiciones de vida de las cohortes una vez que van progresando a través del tiempo en distintos ambientes ecológicos;

Los resultados indican fuertes diferencias en todos los procesos de la historia de vida de las cohortes. En ese sentido los stocks del Atlántico Sur y del Pacífico Sur serían stocks que pueden ser considerados funcionando de manera separada una vez que se realiza el reclutamiento. En particular, no se sustenta la hipótesis que existe intercambio de peces adultos entre los dos lados de Sudamérica.

4.4. Evaluación de posibles diferencias intra-específicas en la composición de la fauna parasitaria de *M. australis*.

Mario George-Nascimento¹, K. González¹, D. Moscoso¹ & A. Lafon²

¹ Universidad Católica de la Santísima Concepción.

² Universidad Austral de Chile, Centro Trapananda.

4.4.1. Introducción.

El uso de los parásitos como indicadores de stocks de peces explotados comercialmente ya tiene tradición (MacKenzie 2002, Mackenzie et al. 2008) . Sin embargo, en el estudio de la biología poblacional en merluza de tres aletas se han utilizado los caracteres morfométricos, reproductivos y de crecimiento (Hanchet 1999), pero no los parasitarios, con la excepción del myxozoo *Kudoa allaria* (Agnew et al. 2003), en este estudio se encontraron variaciones significativas entre cohortes de *M. australis* en la magnitud del parasitismo por *K. allaria* que fueron interpretadas como resultantes de las variaciones periódicas de la cubierta de hielo y de la temperatura superficial del mar que afectarían diferencialmente el reclutamiento del parásito en el tiempo. Estos resultados señalan que el empleo de los parásitos como marcas naturales de las poblaciones de hospedadores requiere tener en cuenta que existen modificaciones en el tiempo de sus parámetros poblacionales. Por otra parte, los antecedentes de la biología poblacional de la merluza de tres aletas señalan que luego del reclutamiento de las larvas, los adultos vuelven a desovar a sus lugares de origen, por lo que constituirían stocks diferentes (Hanchet 1999). Los antecedentes parasitológicos para esta especie son escasos e incluyen el registro ya mencionado del myxozoo *Kudoa allaria* (Agnew et al. 2003), y del monogeneo *Diclidophora micromesisti* (Suriano & Martorelli 1984). Este informe analiza la información parasitaria de 165 ejemplares de la merluza de tres aletas obtenidos desde cuatro zonas de pesca en el cono sur de Sudamérica, con el objeto de interpretar la información desde una perspectiva biológico poblacional. Es decir, si existen variaciones significativas entre las zonas de pesca en las parasitosis de la merluza de tres aletas, éstas pudiesen indicar cierto grado de discretitud de las poblaciones de esta especie alrededor del cono sur de Sudamérica.

4.4.2. Materiales y métodos.

Las muestras provenientes del Zona 1 (Taitao-Caleta Coralie; n = 68), Zona 2 (Is. Diego Ramírez) (n=11) y Zona 3 (I. Navarino) (n=41) fueron tomadas entre octubre y diciembre del año 2006, en tanto que la de Zona 4 (Is. Malvinas o Falkland) (n = 45) fue tomada en diciembre de 2007. En total se examinaron 165 ejemplares a los que se les determinó su longitud horquilla (LH, cm), peso corporal (g), sexo, estado de madurez sexual y parasitismo. Considerando que algunos ejemplares tenían la aleta caudal deteriorada, se utilizó la longitud horquilla. La significancia estadística de las diferencias en el tamaño corporal de los peces entre las zonas de pesca fue evaluada mediante análisis de la varianza de una vía. Entre las variables parasitarias se determinó la prevalencia y abundancia para cada taxon, según zonas de pesca. Además, se registró la abundancia total, riqueza taxonómica, diversidad, dominancia y composición de los ensambles de parásitos encontrados en cada individuo hospedador. Para ello se emplearon métodos tradicionales ya descritos en la literatura (George-Nascimento M. & Arancibia 1994). Se evaluó la asociación entre los descriptores parasitológicos y la longitud horquilla con el coeficiente de correlación de Pearson. Se usaron análisis de covarianza de dichos descriptores, en los que la longitud estándar fue la covariable y la zona de pesca fue el factor.

Las variaciones en la composición de los ensambles de parásitos encontrados en cada individuo hospedador (= infracomunidades) fueron resumidas mediante un análisis de correspondencia con efecto de arco corregido (DCA), y un posterior análisis de la varianza de los puntajes de la ordenación, con las zonas de pesca como variables independientes (factor).

Finalmente, se usaron análisis discriminantes lineales simples (ADL) para confrontar las asignaciones de los ejemplares a cada una de las cuatro zonas de pesca. En todos los ADL se consideró que las probabilidades de pertenecer a cada grupo eran proporcionales a su representación en el conjunto de grupos. En una etapa posterior del ADL se empleó un método paso a paso para seleccionar al subconjunto de predictores que satisficiera un nivel de significancia igual a $P < 0,05$ para entrar al modelo.

En los ADL se usó como variables independientes el $\log_{10}(x+1)$ de la abundancia (x) de cada uno de los 19 taxa y 6 descriptores numéricos de las infracomunidades de parásitos: la abundancia total de parásitos, la riqueza taxonómica, la diversidad, la dominancia y los puntajes de las ordenaciones mediante el análisis de correspondencia DCA en los dos primeros ejes. El empleo de la transformación al $\log_{10}(x+1)$ de la abundancia de cada taxon se fundamenta en la necesidad de tratar de normalizar la altamente dispersa distribución de los datos y así cumplir con los supuestos del análisis. Se usó como criterio de normalidad el entregado por la prueba Kolmogorov-Smirnov, y como criterio de “outlier”, aquel dato que estaba más allá de 1,96 errores estándar de la media aritmética de su grupo. La eventual multicolinealidad de los predictores fue controlada con un nivel de tolerancia igual a 0,01.

4.4.3. Resultados.

El análisis de la varianza de la longitud horquilla mostró diferencias significativas entre las zonas de pesca ($F_{(3, 161)} = 5,07$, $P < 0,01$), las que consistían en que los ejemplares provenientes de Zona 4 (Is. Malvinas o Falkland) poseían mayor LH que los de las muestras del Zona 1 (Taitao - Caleta Coralie) e Zona 2 (Is. Diego Ramírez) (Tabla 26).

Tabla 26: Número de ejemplares examinados (n), promedio y desviación estándar de la longitud horquilla de 165 ejemplares de merluza de tres aletas (*M. australis*) provenientes de cuatro zonas de pesca.

	Zona 1 (Taitao - Caleta Coralie) n = 68	Zona 2 (Is. Diego Ramírez) n = 11	Zona 3 (I. Navarino) n = 41	Zona 4 (Is. Malvinas o Falkland) n = 45
Longitud horquilla (d. e.)	42,9 (3,57)	40,7 (2,85)	44,0 (7,95)	46,1 (3,56)

El análisis de correlación de Pearson señaló que la abundancia de *Anisakis*, *Contracaecum*, Nematoda indet., Acanthocephala indet., *Grillotia*, *Derogenes*, Hemiuridae, *Diclidophora* y *Kudoa* mostraban coeficientes positivos y significativos en el conjunto de los datos ($P < 0,05$, $n = 165$ en todos los casos). En los análisis de la covarianza de la abundancia parasitaria en los que se consideró a la longitud horquilla como covariable (se excluyó a Acanthocephala indet. y *Grillotia*, porque poseían muy baja prevalencia en la mayoría de las zonas de pesca), se observaron diferencias significativas entre zonas de pesca en las pendientes de las regresiones entre la abundancia parasitaria y la longitud horquilla en: *Corynosoma*, *Hepatoxylon* y Hemiuridae. En aquellos taxa en los que no había diferencias entre las pendientes de dichas regresiones, se encontró que la zona de pesca tenía un efecto

significativo en las variaciones de la abundancia de *Anisakis*, *Contracaecum*, *Hysterothylacium*, *Ascarophis*, Nematoda indet., *Kudoa* y los quistes de etiología desconocida (Q.E.D.) (Tabla 27 y 28).

La abundancia total ($r = 0,487$), riqueza taxonómica ($r = 0,333$), diversidad ($r = 0,211$), y dominancia ($r = 0,347$) en las infracomunidades de parásitos se correlacionaban positivamente con la longitud de *M. australis* ($P < 0,05$ en todos los casos, $n = 165$). Sin embargo, ninguno de los descriptores comunitarios mostró diferencias significativas entre zonas de pesca en las pendientes de sus regresiones con la longitud horquilla (valores de $F_{(3, 157)} < 2,22$, $P > 0,05$). Finalmente, se encontró que la zona de pesca tenía un efecto significativo en las variaciones de la composición, abundancia total, riqueza taxonómica y diversidad, luego de corregir por el efecto de la covariable. Un resumen de dichas comparaciones se indica en la Tabla 29.

Tabla 27: Prevalencia (P, en %) y abundancia (A) de parásitos encontrados en 165 ejemplares de merluza de tres aletas (*M. australis*) provenientes de cuatro zonas de pesca. n = número de hospedadores examinados (Q.E.D.= quistes de etiología desconocida)

TAXA	Zona 1 (Taitao - Caleta Coralie) n = 68		Zona 2 (Is. Diego Ramírez) n = 11		Zona 3 (I. Navarino) n = 41		Zona 4 Islas Malvinas n = 45	
	P	A	P	A	P	A	P	A
PARASITARIOS								
ECTOPARÁSITOS								
<i>Diclidophora</i>	58,8	1,93	63,6	2,09	65,8	2,41	82,2	3,73
<i>Chondracanthus</i>	8,9	0,23	0,0	0,00	2,4	0,02	2,2	0,02
ENDOPARÁSITOS								
ADULTOS								
<i>Ascarophis</i>	16,2	0,62	72,7	4,09	61,0	7,10	4,4	0,04
<i>Cucullanus</i>	0,0	0,00	0,0	0,00	2,4	0,02	2,2	0,02
Acanthocephala	0,0	0,00	0,0	0,00	2,4	0,05	0,0	0,00
<i>Derogenes</i>	10,3	0,10	8,6	0,09	9,7	0,15	24,4	0,27
Hemiuridae	16,2	0,51	18,2	0,54	43,9	1,54	31,1	0,39
<i>Kudoa</i>	82,3	28,54	36,4	1,36	56,1	12,66	84,4	10,82
ENDOPARÁSITOS								
LARVALES								
<i>Anisakis</i>	98,5	13,01	100	6,54	87,8	19,12	97,8	14,04
<i>Hysterothylacium</i>	80,1	3,38	36,4	0,54	26,8	0,76	82,2	1,87
<i>Contracaecum</i>	73,5	1,91	45,4	0,64	48,8	1,68	24,4	0,40
<i>Pseudoterranova</i>	0,0	0,00	0,0	0,00	4,9	0,07	0,0	0,00
Nematoda indet..	36,8	0,97	18,2	0,27	17,1	0,36	60,0	1,00
<i>Hepatoxylon</i>	73,5	4,66	36,4	0,45	21,9	0,29	24,4	0,38
<i>Diphyllobothrium</i>	7,3	0,09	9,1	0,09	7,3	0,07	0,0	0,00
Pseudophyllidea	7,3	0,12	9,1	0,09	0,0	0,00	0,0	0,00
<i>Grillotia</i>	0,0	0,00	0,0	0,00	4,9	0,05	11,1	0,16
<i>Corynosoma</i>	7,3	0,50	0,0	0,00	12,2	0,12	0,0	0,00
OTROS								
Q.E.D.	5,9	0,37	27,3	0,73	21,9	0,66	0,0	0,00
TOTAL	100	56,95	100	17,54	100	47,15	100	36,04

Tabla 28: Coeficientes de correlación de Pearson de la abundancia de cada taxon parasitario con la longitud horquilla de *M. australis* (n= 165, valores en negrita indican $p < 0,05$), resultados de la prueba de comparación de pendientes entre zonas de pesca, de la comparación de medias y de pruebas *a posteriori* (en negritas se indica las diferencias en pendientes). Los números de la última columna corresponden a las zonas de pesca según lo indicado en Tabla 26

TAXA	Correlación con LH	Diferencia de pendientes entre zonas de pesca	Diferencia de medias entre zonas de pesca	Prueba a posteriori
PARASITARIOS				
ECTOPARÁSITOS				
<i>Diclidophora</i>	0,195	NO	NO	
<i>Chondracanthus</i>	0,062	NO	NO	
ENDOPARÁSITOS				
ADULTOS				
<i>Ascarophis</i>	-0,033	NO	SI	2>3>1=4
<i>Cucullanus</i>	-0,088	NO	NO	
Acanthocephala	0,169	NO	NO	
<i>Derogenes</i>	0,179	NO	NO	
Hemiuridae	0,290	SI		3>1=4
<i>Kudoa</i>	0,331	NO	SI	1>2=3; 4>2
ENDOPARÁSITOS				
LARVALES				
<i>Anisakis</i>	0,762	NO	SI	4>3=2>1
<i>Hysterothylacium</i>	0,080	NO	SI	1>2=3; 4>3
<i>Contracaecum</i>	0,207	NO	SI	1=3>4
<i>Pseudoterranova</i>	0,022	NO	NO	
Nematoda indet..	0,296	NO	SI	4>3
<i>Hepatoxylon</i>	0,086	SI		1>2=3=4
<i>Diphyllobothrium</i>	-0,037	NO	NO	
Pseudophyllidea	0,025	NO	NO	
<i>Grillotia</i>	0,314	SI		
<i>Corynosoma</i>	0,034	SI		1>4
OTROS				
Q.E.D.	-0,036	NO	SI	3>4

El análisis de correspondencia de la composición de las infracomunidades de parásitos mostró un valor propio $\lambda = 0,502$ en el primer gradiente, y $\lambda = 0,342$ en el segundo. La representación gráfica sus variaciones entre zonas de pesca con la LH se muestran en la Figura 15. El análisis de la covarianza indica que la zona de pesca da cuenta del 58 y 19 % de la varianza de los puntajes de las observaciones en el primer y segundo gradiente composicional, respectivamente, luego de considerado el efecto de la covariable. Estos valores son estadísticamente significativos ($P < 0,05$).

El ADL efectuado sobre la abundancia de los 19 taxa parasitarios junto a los 6 descriptores numéricos de las infracomunidades mostró una alta tasa de asignaciones correctas (74,5%, lambda de Wilks = 0,2722, $F_{(72, 413.27)} = 3,13$, $P < 0.0001$) (Tabla 30). En el modelo algebraico utilizado, las funciones de clasificación para cada una de las muestras se señalan en la Tabla 31.

Tabla 29: Promedio y desviación estándar (entre paréntesis) de la abundancia total, riqueza taxonómica, diversidad, dominancia y composición de las infracomunidades de parásitos en 165 ejemplares de merluza de tres aletas (*M. australis*) provenientes de cuatro zonas de pesca. Las letras indican las diferencias entre parejas de medias ajustadas por la covariable (least square means).

	Zona 1 (Taitao - Caleta Coralie) n = 68	Zona 2 (Is. Diego Ramírez) n = 11	Zona 3 (I. Navarino) n = 41	Zona 4 Islas Malvinas n = 45
Abundancia total	56,9 (53,9)A	17,54 (7,76)B	47,14 (79,49)A	36,04 (31,54)A
Riqueza	5,84 (1,63)A	4,82 (1,83)A	4,97 (2,02)B	5,31 (1,53)A
Diversidad	1,56 (0,42)A	1,30 (0,46)A	1,35(0,46)B	1,43 (0,38)A
Dominancia	0,25 (0,14)A	0,24 (0,15)A	0,24 (0,18)A	0,29 (0,15)A
Composición (1er eje)	103 (62,1)B	204 (60,0)A	194 (70,6)A	119 (42,1)B
(2° eje)	169 (28,4)A	139 (47,4)B	135 (65,2)B	166 (20,5)A

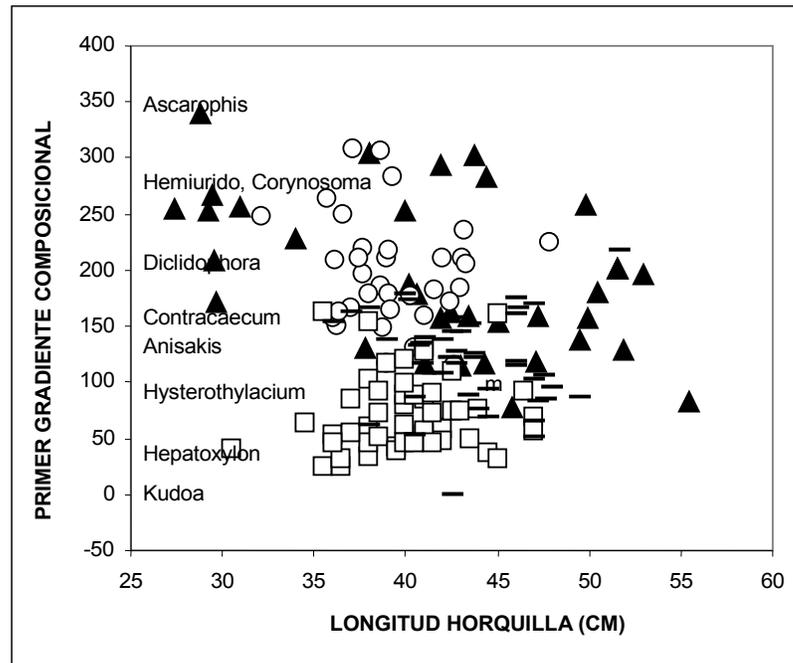


Figura 15: Relación entre el primer gradiente composicional de las infracomunidades de parásitos expresado en unidades de desviación estándar x 100, y longitud horquilla de *M. australis* según zona de pesca (□: zona 1, O: zona 2, ▲: zona 3, ■: zona 4).

La 1^{era} variable canónica da cuenta del 49,41% de la varianza entre muestras, y la segunda del 44,75%, por lo que en conjunto explican el 94,16%. Luego de un análisis discriminante paso a paso, se observó que el taxon más asociado a la primera función discriminante es *Ascarophis*, en tanto que *Hepatoxylon* es predominante en la segunda función discriminante (Tabla 32). Ninguna otra variable cumple con los requerimientos antedichos para ser incorporada al modelo. En gran medida, estos

son los patrones que se observan en la Figura 15, resultantes de la ordenación de las infracomunidades con análisis de correspondencia.

Tabla 30: Clasificación de los ejemplares de merluza de tres aletas de cuatro zonas de pesca según análisis discriminante simple de la composición de los ensambles de 19 taxa parasitarios encontrados en 165 individuos hospedadores y de 6 descriptores cuantitativos de las infracomunidades.

	% correcto	Zona 1 (Taitao - Caleta Coralie)	Zona 2 (Is. D. Ramírez)	Zona 3 (I. Navarino)	Zona 4 Islas Malvinas	Total
Zona 1 (Taitao - Caleta Coralie)	80,9	55	4	7	2	68
Zona 2 (Is. Diego Ramírez)	27,3	3	3	3	2	11
Zona 3 (I. Navarino)	61,0	6	4	25	6	41
Zona 4 (Islas Malvinas)	88,9	5	0	0	40	45
Total	74,5	79	11	35	50	165

Tabla 31: Funciones de clasificación de 19 taxa parasitarios y de seis descriptores cuantitativos de las infracomunidades en *M. australis* para cada una de las cuatro zonas de pesca consideradas.

	Zona 1 (Taitao - Caleta Coralie)	Zona 2 (Islas Diego Ramírez)	Zona 3 (I. Navarino)	Zona 4 (Islas Malvinas)
Constante	-144.8	-162.0	-149.9	-163.3
<i>Diclidophora</i>	-1.026	-1.152	-1.048	-0.924
<i>Chondracanthus</i>	-0.116	-0.103	-0.121	-0.702
<i>Ascarophis</i>	-0.652	-0.713	-0.550	-0.688
<i>Cucullanus</i>	5.152	3.706	7.262	7.085
Acanthocephala	2.468	2.599	2.834	3.885
<i>Derogenes</i>	4.456	4.147	3.752	6.456
Hemiuridae	-0.045	-0.104	-0.092	-0.088
<i>Kudoa</i>	0.457	0.467	0.445	0.456
<i>Anisakis</i>	-0.667	-0.664	-0.609	-0.660
<i>Hysterothylacium</i>	-0.387	-0.625	-0.568	-0.583
<i>Contracaecum</i>	-4.078	-4.257	-3.818	-4.637
<i>Pseudoterranova</i>	5.544	3.559	5.848	6.968
Nematoda indet.	-1.091	-1.303	-1.209	-0.536
<i>Hepatoxylon</i>	-0.628	-0.860	-0.906	-0.940
<i>Diphyllobothrium</i>	-1.425	-1.442	-0.958	-2.799
Pseudophyllidea	5.427	7.163	5.545	6.549
<i>Grillotia</i>	15.657	16.804	16.759	19.817
<i>Corynosoma</i>	0.165	-0.132	-0.187	0.041
Q.E.D.	-9.660	-10.045	-9.712	-10.300
Abundancia total	0.051	0.048	0.051	0.046
Riqueza	-14.628	-14.825	-14.906	-16.429
Diversidad	113.072	116.490	113.816	121.830
Dominancia	196.675	205.541	196.852	213.005
Composición (1 eje)	0.525	0.566	0.539	0.540
Composición (2eje)	0.656	0.662	0.646	0.689

Tabla 32: Coeficientes de correlación de la abundancia de cada uno de los 19 taxa parasitarios y de seis descriptores cuantitativos de las infracomunidades en *M. australis* con las dos primeras funciones discriminantes.

Variable	1 ^{er} eje Canónico	2 ^o eje Canónico
<i>Diclidophora</i>	-0,207	0,108
<i>Chondracanthus</i>	0,074	-0,179
<i>Ascarophis</i>	0,433	0,542
<i>Cucullanus</i>	-0,047	0,089
Acanthocephala	0,061	0,109
<i>Derogenes</i>	-0,173	0,042
Hemiuridae	0,003	0,210
<i>Kudoa</i>	-0,072	-0,179
<i>Anisakis</i>	-0,171	-0,093
<i>Hysterothylacium</i>	-0,130	-0,592
<i>Contracaecum</i>	0,335	-0,232
<i>Pseudoterranova</i>	0,085	0,153
Nematoda indet.	-0,229	-0,190
<i>Hepatoxylon</i>	0,304	-0,731
<i>Diphyllobothrium</i>	0,145	-0,029
Pseudophyllidea	0,101	-0,166
<i>Grillotia</i>	-0,212	0,103
<i>Corynosoma</i>	0,116	-0,053
Q.E.D.	-0,072	-0,394
Riqueza	-0,013	-0,239
Diversidad	0,206	0,167
Dominancia	0,099	-0,134
Composición (1 eje)	0,258	0,666
Composición (2eje)	-0,173	-0,355

4.4.4. Discusión.

Este es el primer estudio de la composición y de la variación espacial del parasitismo de la merluza de tres aletas entre zonas de pesca que, además, abarcan la vertiente Pacífica y Atlántica del cono sur de Sudamérica. Las muestras examinadas contenían un espectro amplio de LH de los hospedadores, lo que permite inferir sus modificaciones a lo largo de su ontogenia.

La interpretación de los resultados requiere considerar las características de la biología de los parásitos involucrados en las diferencias encontradas entre zonas de pesca. Entre los ectoparásitos, no se encontraron diferencias notables en prevalencia o abundancia (*Diclidophora micromesisti* y *Chondrachantus* sp.) lo que sugiere que estos taxa se transmiten en forma homogénea entre sus hospedadores en el rango geográfico muestreado. Estos parásitos son de ciclo de vida directo por lo que se transmiten entre los peces mediante estados larvales planctónicos, es decir, de vida libre.

Entre los endoparásitos que alcanzan su estado adulto en *M. australis*, se destacan las diferencias encontradas en la prevalencia y/o abundancia de *Ascarophis* sp. entre las muestras más australes del océano Pacífico (Islas Diego Ramírez e Isla Navarino) con la de Zona 4 (Is. Malvinas o Falkland) y con las del Zona 1 (Taitao - Caleta Coralie). Además, se destaca la mayor prevalencia y abundancia de *Derogenes* sp. en las Zona 4 (Is. Malvinas o Falkland). Finalmente, cabe señalar la menor prevalencia y abundancia de *Kudoa* sp. en las muestras provenientes de Diego Ramírez e Isla Navarino. Al respecto, los taxa que alcanzan su madurez sexual en los peces se transmiten mediante la ingestión de presas que albergan los estados larvales de los parásitos (hospedadores

intermediarios). En consecuencia, las diferencias encontradas responden necesariamente a variaciones de la dieta de la merluza de tres aletas entre las zonas de pesca examinadas. En general, y en los casos de *Ascarophis* sp. y *Derogenes* sp., las diferencias pueden asociarse a variaciones geográficas en el consumo de crustáceos responsables de su transmisión, pero que se desconocen. En el caso de *Kudoa* sp., las diferencias pueden deberse a variaciones geográficas en el consumo de poliquetos bentónicos, que serían sus hospedadores intermediarios. Sin embargo, las diferencias por este último parásito han de interpretarse como variaciones de más largo plazo que la de los otros dos taxa porque este es un parásito cuya infección no desaparece durante la ontogenia del hospedador.

Los taxa que utilizan a la merluza de tres aletas como hospedador intermediario también se transmiten a ella por la ingestión de presas infectadas con los estados larvales previos, y alcanzan su madurez sexual en los depredadores de *M. australis*. Entre ellos se cuentan peces (el caso de *Hysterothylacium* sp.), elasmobranquios (*Grillotia*, *Hepatoxylon*) y mamíferos (*Anisakis*, *Contracaecum*, *Pseudoterranova*, *Diphyllobothrium*, Pseudophyllidea, *Corynosoma*). De éstos, y entre los que mostraron mayores diferencias entre zonas de pesca se destacan *Hysterothylacium*, *Grillotia* y *Hepatoxylon*. Estas diferencias han de interpretarse en forma similar al caso de *Kudoa*, porque son infecciones de larga duración en el pez hospedador. En consecuencia, dichas diferencias sugieren que los hospedadores elasmobranquios que transmiten *Grillotia* son más frecuentes en la vecindad ecológica de *M. australis* en el Océano Atlántico, en tanto que los elasmobranquios en los que madura *Hepatoxylon* son más comunes en la vecindad ecológica de los ejemplares del Pacífico Sur. Finalmente, los quistes de etiología desconocida (QED) pueden representar una patología que parece ser más frecuente en las Islas Diego Ramírez y en la isla Navarino. Sin embargo, se desconoce su persistencia a lo largo de la ontogenia de *M. australis*.

En suma, las diferencias en el parasitismo que se observan entre las cuatro zonas de pesca pueden interpretarse como resultantes de las condiciones ecológicas en que viven las merluzas de tres aletas en las distintas zonas de pesca y señalan que no constituyen una unidad ecológicamente homogénea, la que se distinguiría por la permanencia diferencial de las merluzas de tres aletas en cada zona de pesca.

4.5. Comparación de la composición microquímica de otolitos de merluza de tres aletas *Micromesistius australis* entre áreas de reproducción de los océanos Atlántico y Pacífico.

Edwin Niklitschek¹, David Secor², Rubén Roa³, Alejandra Lafon¹, Ximena Valenzuela¹

¹Universidad Austral de Chile, Centro Trapananda.

²University of Maryland Center for Environmental Science.

³Universidad de Concepción, Departamento de Oceanografía.

4.5.1. Introducción

Los otolitos son estructuras calcáreas, constituidas principalmente de carbonato de calcio, las que se encuentran situados en el interior del aparato vestibular (oído interno de los peces teleósteos). Su función fisiológica es mantener la orientación y/o equilibrio (Campana 1999). Los otolitos han sido utilizados principalmente como marcadores cronológicos, debido a que en su estructura queda registrados patrones estacionales en forma de anillos concéntricos, conocidos también como bandas de crecimiento, los que pueden ser evaluados a nivel macro y microscópico, este último permite obtener registros diarios (Pannella 1971, Campana & Thorrold 2001). Los otolitos, además tienen la habilidad de incorporar a su matriz de carbonato de calcio inclusiones sutiles de elementos químicos las que se incorporan diariamente, registrando así las variables ambientales como temperatura y salinidad (Campana & Thorrold 2001, Elsdon & Gillanders 2004). Ya que los otolitos son estructuras metabólicamente inertes, no se produce reabsorción o movilización de los elementos incluidos en ellos durante su vida. Por lo tanto, la composición química de los otolitos sirve como marcas naturales o señales químicas que reflejan diferencias en la composición química de hábitat particulares, transformándose en un reflejo de las condiciones medioambientales que experimenta cada pez en forma individual (Secor et al. 1995b, Campana 2005). Lo anterior lo convierte en una excelente herramienta para reconstruir la historia ambiental de una especie y sus patrones migratorios (Secor et al. 1995b, Thorrold et al. 1997, Begg et al. 2005, Campana 2005).

Las concentraciones absolutas y relativas de elementos químicos mayores y menores han sido utilizadas como indicadores de la historia ambiental de diversas especies ícticas, destacando el uso de las concentraciones de estroncio y bario. Los estudios muestran que la concentración de estroncio en el otolito (Sr/Ca) es un indicador de salinidad y temperatura, con una relación directamente proporcional a la salinidad del ambiente (Secor et al. 1995b, Elsdon & Gillanders 2003a, Elsdon & Gillanders 2006a). Lo contrario ocurre con bario, cuya presencia en otolitos (Ba/Ca) mantiene una relación negativa con la salinidad del ambiente, dando cuenta de ambientes con baja concentración salina (Elsdon & Gillanders 2004, Martin & Wuenschel 2006). Otros importantes indicadores utilizados como registro de las condiciones ambientales que experimenta el pez son los isótopos estables de carbono y oxígeno ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$). La proporción de isótopos de oxígeno en el otolito se encontraría relacionada con la temperatura, mientras que la de isótopos de carbono estaría relacionada con el metabolismo, actividad reproductiva y/o nivel trófico (Kalish 1991, Wurster et al. 1999, Rooker & Secor 2004). A partir de estos principios, la composición de microelementos e isótopos estables ha sido crecientemente empleada para la discriminación de stocks y contingentes de recursos como bacalao del Atlántico (Campana et al. 1994), lubina rallada (Secor et al. 2001), atún aleta amarilla (Rooker & Secor 2004), polaca (Bickford & Hannigan 2005), arenque (Clausen et al. 2007), y perca blanca (Kerr et al. 2007), entre varias otras especies.

En la presente investigación, condujimos un estudio piloto orientado a evaluar el potencial discriminante de algunos microelementos y de los cocientes isotópicos de carbono y oxígeno en secciones de otolitos correspondientes al primer año de vida de merluza de tres aletas, para determinar la procedencia de muestras de dos zonas de reproducción del recurso en aguas de los océanos Atlántico y Pacífico, y someter a prueba la hipótesis de un stock único en el cono sur de Sudamérica.

4.5.2. Materiales y métodos

Se analizó un total de 30 otolitos sagita provenientes de las dos principales áreas de desove conocidas para esta especie en el Pacífico SE (zona 1) y en el Atlántico SW (zona 4). Los 15 otolitos correspondientes a la zona 1, procedieron de un lance comercial efectuado el 30 de junio de 2006 en el área del Golfo de Penas (47°09' S, 75°36' W). Los otolitos procedentes de la zona 4, fueron obtenidos desde dos lances comerciales realizados los días 8 y 15 de marzo de 2007. El primero de ellos (n=6) fue obtenido en la posición 51°15' S, 63°17' W, el segundo (n=9), en las coordenadas 51°58' S, 63°17' W.

Los otolitos fueron extraídos, limpiados y preparados de acuerdo al protocolo ya descrito en la sección 4.2.2. Fueron transportados hasta el Laboratorio Biológico de Chesapeake del Centro para el Medioambiente de la Universidad de Maryland, donde trabaja el Dr. David Secor. Allí los otolitos fueron embebidos en resina plástica (Secor et al. 1995a) y seccionados utilizando una sierra Beuhler-ISOMET de baja velocidad de corte. Se generó secciones de 2 mm de espesor cruzando transversalmente el core del otolito. Las secciones embebidas del otolito fueron pegadas a una base plástica de 2 mm de espesor, de tal forma que el pegamento tuvo contacto con la resina pero no con el otolito. Cada sección fue luego montada sobre un portaobjetos petrográfico usando pegamento termoplástico. Utilizando un micro taladro de 500 μm (New Wave Research), se extrajo secciones de core de 1,2×0,7×2 mm de área. Los fragmentos extraídos del core fueron separados en dos porciones con ayuda de un mortero. Una porción para el análisis de isótopos estables y otra porción para análisis de microelementos.

Cada sub-muestra fue descontaminada de acuerdo a la técnica descrita por Rooker *et al.* (2001). En breve, los fragmentos fueron sumergidos por 5 minutos en ácido nítrico al 1% para remover la contaminación de la superficie. Luego, fueron lavados con agua doblemente deionizada (DDIH₂O) por 5 minutos para remover el ácido nítrico. Finalmente, los fragmentos fueron secados en una campana de flujo laminar (Class 100 laminar flow hood) y almacenados en viales plásticos limpios. Todos los instrumentos fueron descontaminados con 10% de HCl, DDIH₂O, y secado con nitrógeno comprimido ultra limpio, entre muestras.

El análisis de composición de los microelementos Ba, Sr, Mn, Mg y Ca fue efectuado mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICPMS). Para estos efectos, cada muestra (n=30) fue pesada (precisión 0,01 mg), colocada en un tubo de micro centrífuga plástico y, luego, digerida en ácido nítrico concentrado. La cantidad de ácido utilizado y el volumen del digerido fueron proporcionales al peso de la muestra, procurando que las soluciones resultantes fueran de similar composición para minimizar posibles efectos de la matriz sobre el análisis instrumental. Las digestiones fueron diluidas con DDIH₂O, hasta obtener una concentración de HNO₃ al 1%. Estándares internos fueron agregados a todas las soluciones para compensar por la probable deriva del instrumento. Luego de pre-concentrar las muestras, éstas fueron introducidas en un ICPMS Hewlett-Packard 4500 cuadrupole para su análisis. Los niveles de Mg, Mn y Ba fueron cuantificados usando el método de estándares internos. Los niveles de Ca y Sr fueron determinados utilizando estándares de calibración externos. Muestras controles de otolitos certificados de referencia

(Yoshinaga et al. 2000) generados en el Instituto Nacional de estudios Medioambientales (NIES) de Japón, fueron también analizadas en varias ocasiones para evaluar la exactitud de las cuantificaciones, aunque no se realizó en forma simultánea con las muestras.

Los fragmentos destinado al análisis de isótopos estables ($n=30$) fueron pulverizados con un mortero y enviados al Laboratorio de Geoquímica de Isótopos de la Universidad de Arizona (Kerr et al. 2007). Las proporciones de isótopos $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{13}\text{C}$ fueron medidas con un dispositivo automatizado de preparación de carbonato KIEL-III, acoplado a un espectrómetro de radio-gas Finnigan MAT 252. Las muestras de otolitos fueron digeridas con ácido fosfórico deshidratado en vacío, a 70°C , y el CO_2 generado por la reacción analizado para determinar los isótopos $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$. Los resultados fueron expresados en partes por mil relativas a un estándar (Vienna Pee Dee Belemnite, VPDB), usando los estándares internacionales NBS-19 y NBS-18.

4.5.3. Análisis estadístico

Se realizó un análisis exploratorio univariado y multivariado (GLM) de las concentraciones de microelementos e isótopos estables similar al descrito para la morfometría de otolitos. Junto a la zona de procedencia de las muestras, se consideró los efectos del sexo, longitud del pez, peso de la muestra analizada y concentración de calcio en la misma. Estas últimas dos covariable fueron incluídas debido a evidencia empírica de correlación en estudios anteriores (D. Secor, com. pers.).

El análisis univariado se efectuó a través de dos enfoques complementarios. El primero de ellos correspondió a un modelo lineal general equivalente a una ANCOVA tradicional donde la variable respuesta correspondió a cada uno de los microelementos/isótopos analizados y las variables explicativas correspondieron a la zona de procedencia de la muestra y el conjunto de covariables antes señaladas. Se aplicó un procedimiento de selección de covariables “hacia atrás”, donde se excluyó aquellas variables cuya probabilidad del valor F se encontró por debajo del 5%. El segundo enfoque correspondió a un análisis de regresión logística, donde la variable respuesta correspondió a la zona de procedencia de la muestra (Atlántico=1; Pacífico=0) y las variables explicativas a las concentraciones del conjunto de microelementos o de isótopos analizados. En este caso se aplicó idéntico procedimiento y criterio de selección de variables.

El análisis multivariado correspondió a un análisis discriminante lineal (ADL) efectuado separadamente sobre microelementos e isótopos. En ambos casos se efectuó un primer análisis utilizando el conjunto de todas las variables predictivas, y otro utilizando un sub-conjunto de variables orientado a obtener un modelo más parsimonioso y evitar efectos indeseados de la inclusión de variables con poco o nulo poder predictivo. Para este fin, se aplicó un procedimiento de selección de variables explicativas basado en el coeficiente de determinación de la variable escrutada por parte de la variable dependiente. Utilizando nuevamente un procedimiento “hacia atrás”, se mantuvo en el modelo aquellos predictores cuyo coeficiente de determinación presentó un nivel de significancia (test F) del 10%, habida cuenta de los efectos de las variables previamente incorporadas en el modelo (Klecka 1980).

Para los análisis de regresión logística y discriminante, y considerando las correlaciones identificadas en el análisis univariado exploratorio de los datos, se estandarizó las concentraciones de microconstituyentes, dividiendo las concentraciones de Ba, Ca, Mg y Mn, primero por la masa de la muestra analizada y luego por la media del cociente concentración/masa de todas las muestras ($n=30$). La concentración estandarizada de estroncio correspondió al cociente Sr/Ca de cada muestra dividido por la media del cociente Sr/Ca de todas las muestras ($n=30$).

4.5.4. Resultados

El análisis exploratorio sugirió diferencias en las concentraciones de estroncio y bario y de los isótopos de carbono y oxígeno entre las dos zonas (Figura 16). Aunque este análisis gráfico también refleja efectos evidentes de la talla y el sexo sobre las concentraciones de ambos minerales e isótopos (Figura 16), el análisis multivariado preliminar de los datos, con todas las variables predictivas incluidas, confirmó la existencia de un efecto significativo de la zona, una vez considerados los efectos de sexo y longitud. De este modo, el mejor modelo (menor AIC) fue aquel que tomó en cuenta los tres factores: zona, sexo y longitud del pez (Tabla 33).

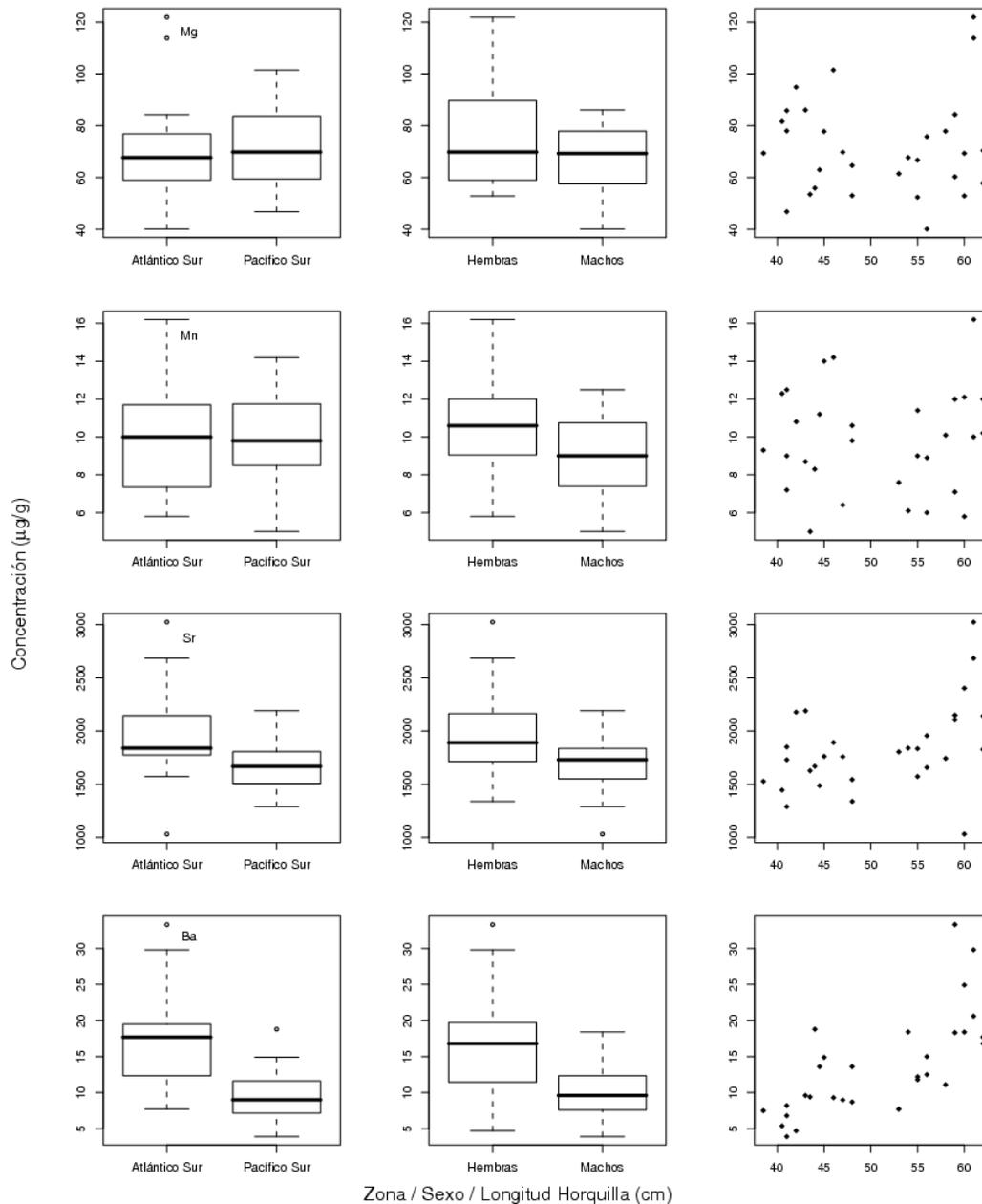


Figura 16: Distribución de los datos crudos de concentración de minerales e isótopos en los otolitos de merluza de tres aletas, por zona y sexo, y efecto de la talla.

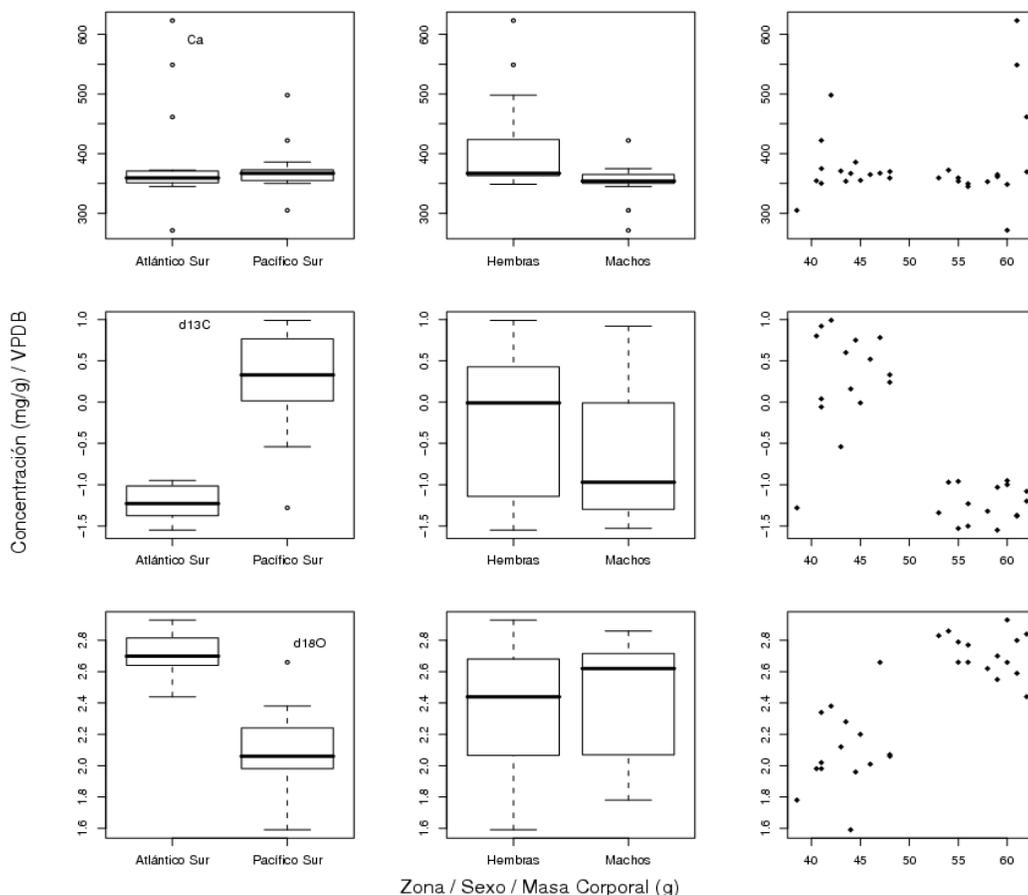


Figura 16: Continuación.

Tabla 33: Análisis de varianza de la comparación de un modelo multivariado nulo sin efecto de zona, versus uno en que la zona es un factor significativo, versus otro en que tanto la zona, como el sexo, y la longitud del pez afectan la composición química de los otolitos de merluza de tres aletas.

Modelo	GL residuales	Var. Generalizada	Pillais	F aprox.	GL numerador	GL denominador	Pr(>F)
Nulo	29	41.595					
Zona	28	28.996	0.941	45.198	7	20	$<10^{-6}$
Zona+Sexo+Longitud	26	24.822	0.929	2.600	14	42	0.0085

Micro-constituyentes

El análisis univariado de las distintas concentraciones de microelementos (ANCOVA) indicó un efecto significativo del peso de la muestra analizada sobre la concentración de los microelementos Ba, Ca, Mg y Mn. De manera similar, encontramos concentraciones significativamente mayores de Ba y Ca en hembras, así como también una asociación positiva entre las concentraciones de calcio y estroncio. Habida cuenta del efecto de estas co-variables, fue posible identificar diferencias significativas entre los grupos Atlántico (zona 4) y Pacífico (zona 1) respecto de sus concentraciones de Ba y Sr. En efecto, las concentraciones medias de Ba y Sr fueron más altas en las muestras procedentes del Océano Atlántico alcanzando valores de $18 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm 1,1$ (EE) y $1950 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm 60$ (EE),

respectivamente. En el grupo de muestras obtenido en el Océano Pacífico la concentración media de Ba fue de $9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm 1,1$ (EE), mientras que la de Sr llegó a $720 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm 60$ (EE).

El análisis de regresión logística sólo indicó efectos significativos del bario sobre la probabilidad de las muestras de pertenecer a alguno de los dos stocks, ya sea aplicando una selección de variables explicativas “hacia atrás” o analizando un constituyente a la vez. El modelo predictivo resultante fue definido por la ecuación,

$$p(A) = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 \cdot Ba)}}$$

donde,

$$\beta_0 = 0,6 \pm 0,54 \text{ EE}$$

$$\beta_1 = 3,4 \pm 1,30 \text{ EE}$$

El modelo multivariado indicó que la zona de procedencia de las muestras explicó el 43,3% ($p < 0,05$) de la varianza del conjunto de micro-constituyentes analizados (Ba, Ca, Mg, Mn, Sr/Ca). La validación cruzada del modelo discriminante lineal correspondiente (Tabla 34) indicó una tasa media de error del 37%, con una incertidumbre claramente mayor para el grupo Atlántico, cuya tasa de error fue del 47% (Tabla 35). Luego del proceso de selección de variables explicativas aplicado, se generó un modelo discriminante alternativo que sólo incluyó Ba y Mg y el cual mostró menores tasas de error, con una tasa global del 30% (Tabla 36). Consistente con la matriz de errores, el análisis gráfico del modelo simplificado indica una agrupación más clara de las muestras del Océano Pacífico en torno a valores relativamente bajos de Ba y relativamente altos de Mg (Figura 17).

Tabla 34: Coeficientes canónicos de las funciones discriminantes construidas para la asignación de muestras de otolitos a sus respectivas zonas de procedencia. Se incluye también resultados del test de Wilk para cada modelo discriminante.

Microelementos/ Isótopos/ Test de Wilk	Modelo discriminante		
	Mg+Mn+Ba+Ca +Sr/Ca	Mg+Ba	$\delta^{13}\text{C} + \delta^{18}\text{O}$
Mg	-1,594	-1,169	
Mn	0,033		
Ba	1,420	1,809	
Ca	0,707		
Sr/Ca	0,487		
$\delta^{13}\text{C}$			0,911
$\delta^{18}\text{O}$			-0,899
Wilk's lamda			
Valor F	3,66	8,32	116,89
p(>F)	<0,05	<0,01	<0.001

Tabla 35: Matriz de asignación y errores del modelo discriminante lineal construido en base a todos los micro-constituyentes analizados en secciones del primer año de vida de otolitos de merluza de tres aletas (Ba, Ca, Mg, Mn, Sr/Ca).

Grupo de origen	Grupo asignado		Tasa de error
	Atlántico	Pacífico	
Atlántico	8	7	0,47
Pacífico	4	11	0,27
Total	12	18	0,3

Tabla 36: Matriz de asignación y errores del modelo discriminante lineal construido en base a micro-constituyentes seleccionados: Ba y Mg, analizados en secciones del primer año de vida de otolitos de merluza de tres aletas.

Grupo de origen	Grupo asignado		Tasa de error
	Atlántico	Pacífico	
Atlántico	9	6	0,40
Pacífico	3	12	0,20
Total	12	18	0,30

Isótopos estables

El análisis univariado de isótopos estables indicó un efecto significativo ($p < 0,001$) del área de muestreo sobre las concentraciones relativas de los isótopos $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ (Figura 18). La concentración relativa de $\delta^{13}\text{C}$ fue mayor en las muestras del Pacífico ($0,3 \text{ ‰} \pm 0,11 \text{ EE}$) que en aquellas procedentes del Atlántico ($-1,2 \text{ ‰} \pm 0,11 \text{ EE}$). Inversamente, la concentración media de $\delta^{18}\text{O}$ fue mayor en el caso de las muestras del Atlántico ($2,71 \text{ ‰} \pm 0,051 \text{ EE}$) que en las del Pacífico ($2,1 \text{ ‰} \pm 0,051 \text{ EE}$). El análisis de regresión logística indicó un efecto significativo ($p < 0,05$) de cualquiera de los dos isótopos sobre la probabilidad de las muestras de pertenecer a un determinado grupo, con un ajuste levemente mejor para el caso de $\delta^{18}\text{O}$ ($\text{AIC}=14,05$) que de $\delta^{13}\text{C}$ ($\text{AIC}=14,1$). Lamentablemente no fue posible ajustar un modelo conjunto para ambos isótopos.

El análisis multivariado indicó que un 89% de la variabilidad en la concentración de los isótopos $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ fue explicada por la zona de procedencia. Ambas variables fueron seleccionadas por el procedimiento de selección de predictores aplicado para la construcción del modelo discriminante lineal (MDL). El respectivo MDL (Tabla 34) fue capaz de asignar con éxito la totalidad de las muestras a su respectiva zona de procedencia indicando separación completa de ambos grupos a lo largo del eje bi-variado definido por ambos isótopos (Figura 18).

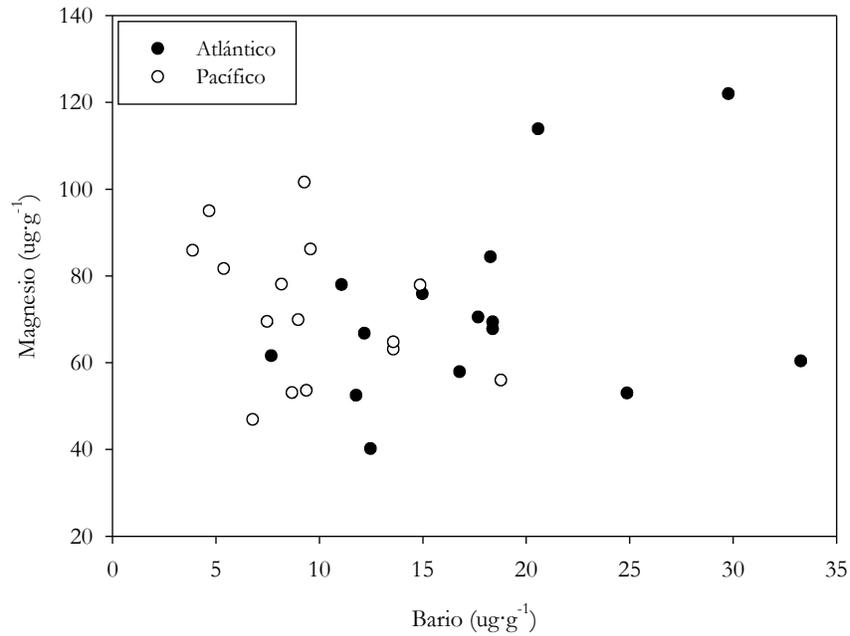


Figura 17: Distribución de muestras de otolitos procedentes de los océanos Atlántico y Pacífico a lo largo de los ejes de concentración de Ba y Mg medidas en secciones correspondientes al primer año de vida de merluza de tres aletas.

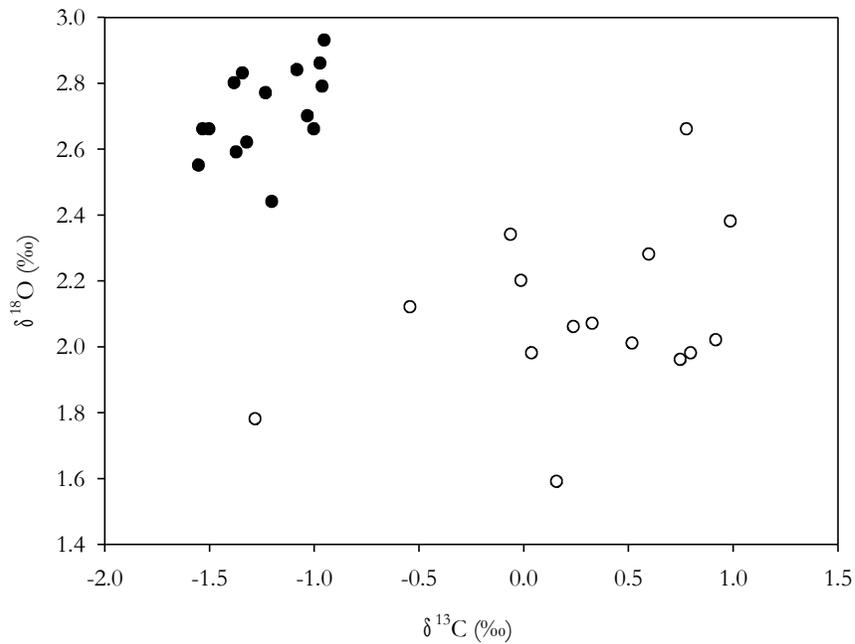


Figura 18: Distribución de muestras de otolitos procedentes de los océanos Atlántico y Pacífico a lo largo de los ejes de concentración relativa de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ en secciones correspondientes al primer año de vida de merluza de tres aletas.

4.5.5. Discusión

El análisis de los resultados de este estudio piloto indicó un alto potencial discriminante de las concentraciones relativas de ambos isótopos estudiados: $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$, los cuales permitieron una separación completa de las muestras según su origen. Se debe reconocer, sin embargo el pequeño tamaño de la muestra, especialmente respecto del número de lances que alcanzó a un lance en el Pacífico y dos lances en el Atlántico. Aunque la ausencia de diferencias significativas entre los dos lances del Atlántico sustentan una expectativa de baja variabilidad entre lances, sería altamente recomendable evaluar la consistencia inter-anual e inter-lances de las diferencias encontradas.

El poder discriminante de los micro-constituyentes resultó más bajo, con una tasa media de error del 30% para un modelo basado en las concentraciones absoluta de bario y magnesio. Este análisis indicó una mayor variabilidad y tasa de error en las muestras del Océano Atlántico, lo que parece contra-intuitivo dada la mayor estabilidad ambiental esperada para zonas de crianza más oceánicas. Mientras que tales resultados podrían ser un artefacto del bajo tamaño muestral, podrían reflejar también una mayor dispersión de los huevos y larvas del stock Atlántico.

En general, el análisis indicó mayores concentraciones absolutas y relativas de Ba, Mg y $\delta^{13}\text{C}$ en las secciones de otolitos correspondientes al Océano Atlántico. La mayor concentración de $\delta^{13}\text{C}$ en las muestras del Océano Atlántico es consistente con la expectativa de una mayor temperatura media en su respectiva zona de crianza, dado el posible efecto de la corriente cálida de Brasil y la ausencia de grandes aportes fluviales de agua dulce como los existentes en la zona Pacífica. Esta última, de ubicación más costera y contigua a los fiordos y canales de la Patagonia chilena, es evidentemente afectada por la corriente fría de Humboldt y sus impactos meteorológicos asociados.

Las mayores concentraciones de bario en los otolitos de la zona del Pacífico parecen, por su parte, contradecir la expectativas derivadas de una asociación negativa entre bario y salinidad descrita por varios autores (Elsdon & Gillanders 2004, Martin & Wuenschel 2006). Sin embargo, los mayores niveles de bario, y posiblemente magnesio, podrían responder a mayores concentraciones ambientales de bario en las aguas costeras del Pacífico, situación ya descrita al comparar bahías y aguas costeras abiertas en Australia (Hamer et al. 2006).

En síntesis, los resultados obtenidos a la fecha indican un alto potencial del análisis de las concentraciones de isótopos estables de carbono y oxígeno en otolitos de merluza de tres aletas, como herramienta para la identificación de unidades poblacionales de esta especie. La expansión del presente estudio a una escala mayor permitiría corroborar la evidencia proporcionada, que indica una separación completa de las áreas de crianza (primer año de vida) y el retorno de los reproductores a áreas de crianza también separadas. La validación de estos marcadores permitiría también poder estimar las contribuciones proporcionales de cada stock a las capturas comerciales obtenidas en áreas de alimentación o migración como las Islas de Los Estados o las aguas sub-Antárticas.

4.6. Utilidad de un marcador molecular para la trazabilidad de productos derivados de *Micromesistius australis*(SOBREOFERTA).

Sandra Ferrada¹, Cristian Canales-Aguirre¹, Ricardo Galleguillos¹, Sofía Astete¹ (Colaborador)

¹Universidad de Concepción, Departamento de Oceanografía

4.6.1. Introducción

La trazabilidad es una herramienta utilizada para rastrear el origen del producto y sus insumos dentro de la cadena de abastecimiento de alimentos, ya que permite identificar y registrar cada producto desde su origen hasta el final de la cadena de comercialización. A partir del 1 de enero del 2005 todas las empresas del sector alimentario, incluyendo el pesquero, deben implementar un sistema de trazabilidad, conforme a lo establecido en el artículo 18 del Reglamento Europeo 20 178/2002 (DOCE 01.02.2002), la Ley de Bioterrorismo (FDA, 2002) y la COOL (Country of origin labeling).

En Chile, el Servicio Nacional de Pesca desde el año 2003 está exigiendo requisitos básicos de trazabilidad para todos los establecimientos pesqueros que procesen bajo un programa de Aseguramiento de Calidad (PAC), para lo cual se exige la identificación del género y especie en el etiquetado de todos los productos comerciales. En el caso de productos procesados, la identificación de la especie es más complicada, ya que existe degradación de las biomoléculas (enzimas, proteínas) durante el procesamiento. Esta limitación promueve la búsqueda de marcadores moleculares (Biocoding), que permitan amplificar moléculas de ADN a partir de las moléculas degradadas, haciendo más fiable el proceso de identificación. *M. australis* se comercializa en forma de surimi, harina y fresco congelado, siendo exportado principalmente a Japón. La necesidad de tener un marcador que pueda identificar recursos pesqueros es de suma importancia al momento de establecer los procedimientos para trazar o identificar las especie en cualquiera de sus presentaciones, evitando así fraudes alimentarios, conflictos de tipo sanitario y generando una herramienta de fiscalización rápida y precisa. El objetivo de este estudio es desarrollar y determinar la utilidad de un marcador molecular para la trazabilidad de productos derivados de *M. australis*.

4.6.2. Materiales y métodos

Emulación de proceso industrial.

Dado que los principales formatos de comercialización son a través de surimi y fresco congelado, se trabajó con muestras frescas conservadas en alcohol, y muestras procesadas emulando el proceso de producción de surimi sometiendo las muestras a altas temperaturas y presión en autoclave, se emuló el proceso al no tener la seguridad de la presencia de la especie en los productos comercializados en el mercado. Se analizaron 39 muestras de tejido de *M. australis*, las cuales fueron colocadas dentro de un autoclave. La temperatura utilizada para emular el proceso fue aproximadamente de 126°C y la presión utilizada 1.38 Bar (20 psi). Con la finalidad de comparar la utilidad del marcador en la diferenciación especie-específica, se comparó con 17 diferentes especies que representan recursos importantes en Chile.

Extracción de ADN, amplificación y secuenciación del gen COI

El aislamiento del ADN genómico se realizó mediante un protocolo estándar con digestión con proteinasa K, extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol absoluto (Sambrook et al. 1989). El ADN fue resuspendido en agua ultrapura (GIBCO Technology™), cuantificado en un

Biophotometer Eppendorf® y diluido a 20 ng/μL. El fragmento COI (~650pb) fue amplificado según protocolo y partidores descritos por (Ivanova et al. 2007) para peces. Para la amplificación de la COI se utilizaron los partidores C_FishF1t1/C_FishR1t1 y VR1-t1/VF2-t1. La reacción PCR se realizó en un volumen final de 50 ul, el cual contiene 1/10 de ADN templado, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP's, 0,2 μM de cada partidador, 0,5 U/μl de Taq ADN polimerasa (Biotools) con su respectivo tampón 10X (Tris-HCl 20 mM pH 8.4, KCl 50 mM) y H₂O libre de DNAsa y RNAsa (Gibco). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MJ Research® modelo PT-200 con el siguiente programa: denaturación inicial con un ciclo inicial de 94°C por 60 seg., 5 ciclos (94°C por 30 seg.; 45°C por 90 seg.; 72°C por 60 seg.), 35 ciclos (94°C por 30 seg.; 51°C por 90 seg.; 72°C por 60 seg.) y un ciclo de extensión final (72°C por 5 min.). Los productos PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% (TBE 0.5X), mediante tinción con bromuro de etidio y fotografiados en el sistema de foto-documentación de UVP®, para confirmar una amplificación exitosa. Para obtener la secuencia de nucleótidos del marcador mitocondrial COI, se utilizó un secuenciador automático (modelo ABI Prism 3730, PE Biosystems), bajo las siguientes condiciones: 2 μl de Dye terminator mix v3.1, 1 μl de Buffer de secuenciación (2,5X), 1 μl de partidador (10 μM) y 5 μl del amplicon + agua ultra pura. Buffer de secuenciación 2,5X: (200 mM Tris-HCl pH 9; 5 mM MgCl₂).

Análisis de Secuencias

El alineamiento de secuencias del fragmento COI se realizó mediante el programa SEQUENCHER™ y visualmente. La identificación específica fue realizada mediante un análisis de distancias genéticas y visualizadas mediante un cladograma, esto se realizó en el programa MEGA v4.0 (Tamura et al. 2007).

4.6.3. Resultados y discusión.

La extracción de ADN desde el tejido muscular de *M. australis* que fue sometido a altas temperaturas emulando el proceso de producción de surimi, generó ADN en calidad y cantidad suficiente para análisis posteriores de secuenciación. El análisis de agrupamiento generó claramente un clado para cada especie sometida a análisis diferenciándose claramente *M. australis* (Figura 19). Además es posible observar que las especies con mayor cercanía genética corresponden a *Merluccius gayi* y *Merluccius australis*, gadiformes. Las metodologías de identificación específica, métodos inmunoquímicos, ELISA e.g. (Giovannacci et al. 2004), o técnicas más contemporáneas, métodos de ADN e.g. (Hsieh et al. 2005) son una buena herramienta para identificar que especies componen productos alimenticios procesados. En organismos marinos, se ha desarrollado en i) Crustáceos: (Pascoal et al. 2008); ii) Peces: (Quinteiro et al. 2001, Pérez et al. 2004) (Yamashita et al. 2008). Si bien, estos estudios utilizan principalmente, el gen mitocondrial Cyt b, entregándoles muy buenos resultados, la limitación es que si desean utilizar los partidores en otras especies es posible que estos no funcionen. En este estudio, se utilizó la COI dando buenos resultados, esto principalmente por las características del marcador. Este gen ha sido utilizado ampliamente en estudios comparativos interespecíficos, destacándose como locus diagnóstico entre especies estrechamente relacionadas. Lo anterior debido a que la diversidad en la secuencia aminoacídica de la sección 5' del gen es suficientemente alta como para diferenciar categorías taxonómicas. Actualmente, a través del proyecto mundial Barcoding Animal Life, más de 13.000 especies representativas de 11 phyla han sido analizadas bajo el estudio de la COI (Hebert et al. 2003, Ward et al. 2005), demostrando su utilidad como marcador diagnóstico.

En suma, queda de manifiesto la potencial utilidad del marcador molecular Citocromo Oxidasa I, como herramienta de trazabilidad de productos derivados (e.g. surimi) para esta especie y otras de importancia comercial en la costa chilena. Los resultados de este tipo de análisis son de gran utilidad

en el fortalecimiento del desarrollo tecnológico empresarial nacional y de relaciones institucionales internacionales que lo han implementado. Tienen como destinatarios principales a las empresas procesadoras de productos acuícolas, asociaciones de industriales pesqueros, asociación de pescadores artesanales, empresas exportadoras de productos alimenticios, laboratorios de control de calidad, asociaciones de consumidores, fiscalización del cumplimiento de la normativa alimentaria y fiscalización por SERNAPESCA.

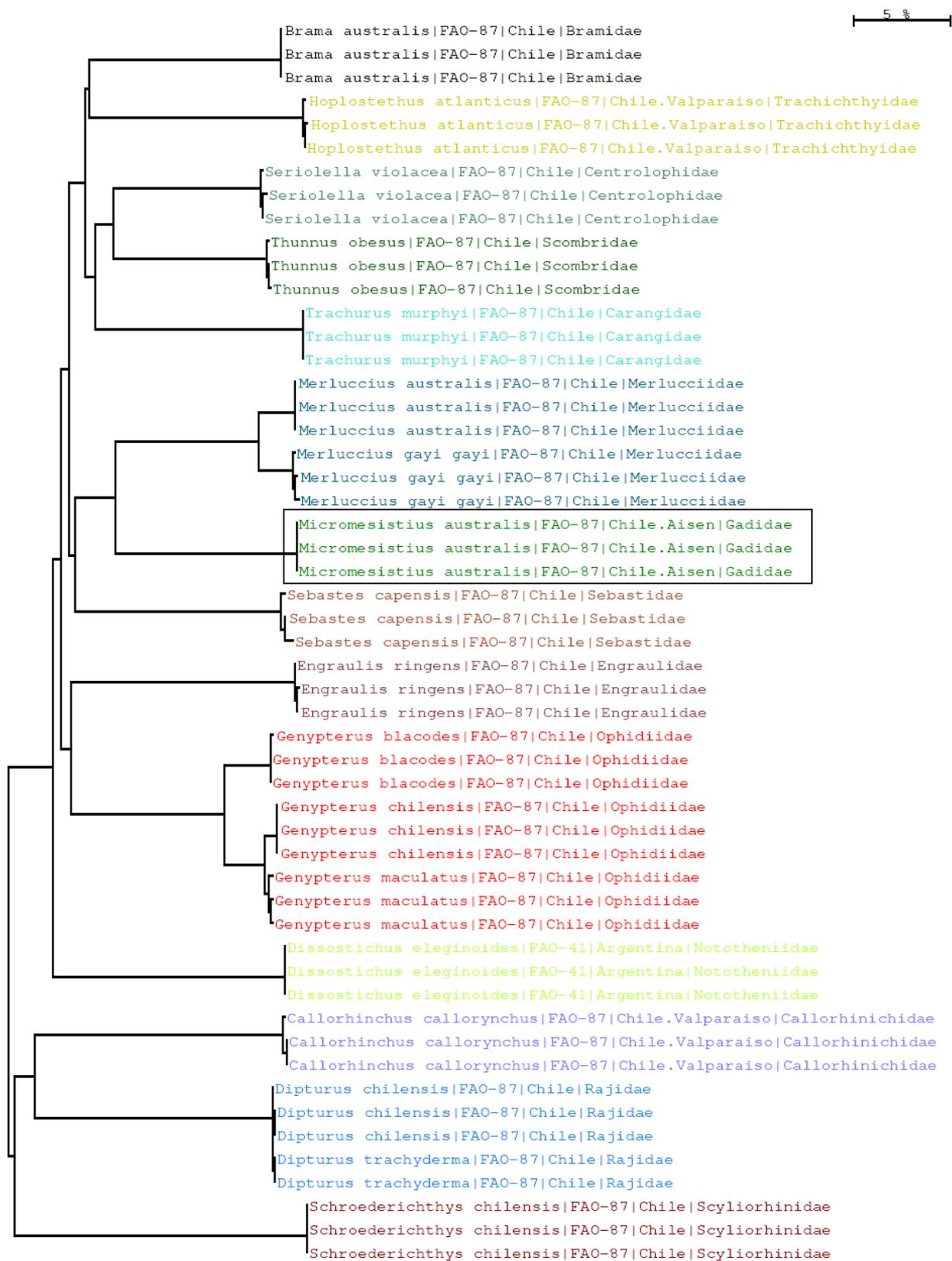


Figura 19: Análisis de distancias genéticas para secuencias de la COI para 18 especies de importancia comercial en la costa chilena. En el recuadro se encuentra *Micromesistius australis*.

4.7. Conclusiones generales

- El presente estudio siguió una aproximación holística, donde se combinó las principales técnicas de análisis utilizadas actualmente para identificación de stocks pesqueros. Estas incluyeron técnicas de análisis fenotípico: morfometría de otolitos, parámetros clave de la historia de vida, prevalencia parasitaria, composición de isótopos en otolitos; y técnicas moleculares.
- Si bien el diseño implementado presentó dificultades, se obtuvo suficientes muestras que permitieron alcanzar niveles adecuados de potencia estadística (>80%) para la totalidad de los análisis empleados.
- El análisis genético no mostró evidencia de segregación poblacional evolutiva entre peces capturados en la zona de Malvinas/Falkland y aquellos capturados en distintas zonas del Océano Pacífico (aguas Chilenas). Esta información fue consistente tanto al usar técnicas basadas en microsatélites como aquellas basadas en la secuenciación de ADN mitocondrial (D-loop, ND1).
- En contraste con los resultados de las técnicas moleculares, todos los indicadores de segregación ecológica (composición de tallas, edad de primera madurez, morfometría de otolitos, composición parasitaria, composición de microelementos e isótopos estables en otolitos) sustentaron la hipótesis de dos poblaciones separadas. Destacaron entre estas técnicas el análisis de isótopos estables y morfometría de otolitos, los que permitieron 100% y 94% de discriminación entre stocks, respectivamente.
- Dentro del contexto de stocks ecológicamente separados, fue posible obtener evidencia de segregación tanto en su origen (isótopos estables en secciones de otolitos correspondientes al primer año de vida), como en sus áreas de alimentación (composición parasitaria).
- Las técnicas que alcanzaron mayor resolución discriminante (elevada potencia a un bajo número muestral) correspondieron al análisis de parásitofauna e isótopos estables en otolitos ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$). Para la discriminación entre los stocks Pacífico y Atlántico se estimó tamaños mínimos estimados de sólo 11 y 13 muestras independientes, para parásitos e isótopos estables, respectivamente.
- El análisis de composición parasitaria sugirió posibles diferencias dentro de la zona del Pacífico, donde la zona 1 presentó diferencias significativas respecto de las zonas 2 y 3. Esto podría significar la existencia de más de un stock o de múltiples contingentes dentro del stock presente en aguas Chilenas.
- Desde el punto de vista del manejo pesquero, y ante la existencia de dos stocks segregados en ambos océanos, surge la clara necesidad de dilucidar la participación de cada stock en las capturas obtenidas por la flota Argentina, especialmente en la zona de Islas de Los Estados, donde podría estarse interceptando el flujo migratorio del stock Pacífico.

4.8. Referencias

- Abaunza, P., A.G. Murta, N. Campbell, R. Cimmaruta, A.S. Comesaña, G. Dahle, M.T.G. Santamaría, L.S. Gordo, S.A. Iversen, K. MacKenzie, A. Magoulas, S. Mattiucci, J. Molloy, G. Nascetti, A.L. Pinto, R. Quinta, P. Ramosb, A. Sanjuan, A.T. Santos, C. Stransky & C. Zimmermann. 2008. Stock identity of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in the Northeast Atlantic and Mediterranean Sea: Integrating the results from different stock identification approaches. *Fish. Res.* 89: 196-209.
- Agnew, D.J., T.R. Marlow, K. Lorenzen, J. Pompert, R.C. Wakeford & G.A. Tingley. 2003. Influence of Drake Passage oceanography on the parasitic infection of individual year-classes of southern blue whiting *Micromesistius australis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 254: 281-291.
- Akasaki, T., T. Yanagimoto, K. Yamakami, H. Tomonaga & S. Sato. 2006. Species identification and PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene in cod fish (Order Gadiformes) products. *Journal of Food Science* 71.
- Araneda, C. 2004. Apunte de marcadores moleculares. Accessed on 15-10-2008, 2004.
- Arkhipkin, A. & R. Roa-Ureta. 2005. Identification of growth models for squids. *Marine and Freshwater Research* 56: 371-386.
- Ayvazian, S.G., T.P. Bastow, J.S. Edmonds, J.H. Gabrielle & B. Nowara. 2004. Stock structure of Australian herring (*Arripis georgiana*) in southwestern Australia. *Fish. Res.* 67: 39-53.
- Becerra, V. & M. Paredes. 1999. Uso de los marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica* 60: 270-279.
- Begg, G., S. Campana, A.J. Fowler & I.M. Suthers. 2005. Otolith research and application: current directions in innovation and implementation. *Mar. Freshwater Res.* 56: 477-483.
- Begg, G., W. Overholtz & N. Munroe. 2001. The use of internal otolith morphometrics for identification of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) stocks on George Bank. *Fish. Bull.* 99: 1-14.
- Begg, G.A. 2005. Life history parameters. pp. 119-150. *In*: S. Cadrin, K.D. Friedland & J. Waldman (ed.) *Stock identification methods: Applications in fishery science* Elsevier Academic Press.
- Begg, G.A., K.D. Friedland & J.B. Pearce. 1999. Stock identification and its role in stock assessment and fisheries management: an overview. *Fish. Res.* 43: 1-8.
- Begg, G.A. & J.R. Waldman. 1999. An holistic approach to fish stock identification. *Fish. Res.* 43: 35-44.
- Bembo, D., G. Carvalho, M. Snow, N. Cingolani & T. Pitcher. 1995. Stock discriminations among European anchovies *Engraulis encrasicolus* by means of PCR-amplified mitochondrial DNA analysis. *Fishery Bulletin* 94: 31-40.
- Bernatchez, L. & R.G. Danzmann. 1993. Congruence in control-region sequence and restriction-site variation in mitochondrial DNA of brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchell). *Mol. Biol. Evol.* 10: 1002-1014.
- Bickford, N. & R. Hannigan. 2005. Stock identification of walleye via otolith chemistry in the Eleven Point River, Arkansas. *North American Journal of Fisheries Management* 25: 1542-1549.
- Brophy, D. & P.A. King. 2007. Larval otolith growth histories show evidence of stock structure in Northeast Atlantic blue whiting (*Micromesistius poutassou*). *ICES J. Mar. Sci.* 64: 1136-1144.
- Cadrin, S. & K.D. Friedland. 1999. The utility of image processing techniques for morphometric analysis and stock identification. *Fish. Res.* 43: 129-139.
- Cadrin, S., K.D. Friedland & J. Waldman. 2005. Stock identification methods - An overview. pp. 3-6 *Stock identifications methods. Applications in Fishery Science. In*: E.A. Press (ed.), San Diego, California.
- Campana, E. & S. Thorrold. 2001. Otoliths, increments, and elements: keys to a comprehensive understanding of fish populations? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58: 30-38.
- Campana, S. 2005. Otolith science entering the 21st century. *Marine and Freshwater Research* 56: 485-495.
- Campana, S. & J.M. Casselman. 1993. Stock discrimination using otolith shape analysis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 1062-1083.

- Campana, S.E. 1999. Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 188: 263-297.
- Campana, S.E., A.J. Fowler & C.M. Jones. 1994. Otolith elemental fingerprinting for stock identification of Atlantic cod (*Gadus morhua*) using laser ablation ICPMS. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51: 1942-1950.
- Canales, C. 2006. Variabilidad genética y estructuración poblacional del congrio dorado, *Genypterus blacodes* (Schneider, 1801) en la zona sur de Chile (41°28,6'ls; 57° 00'ls), mediante el uso de marcadores microsatélites. Tesis para optar al grado de Licenciado en Ciencias y al título profesional Biólogo Marino. Universidad Católica de la Santísima Concepción, Talcahuano.
- Cardinale, M., P. Doering-Arjes, M. Kstowsky & H. Mosegard. 2004. Effects of sex, stock, and environment on the shape of known-age Atlantic cod (*Gadus morhua*) otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 61: 158-167.
- Carvalho, G.R. & L. Hauser. 1999. Molecular markers and the species concept: new techniques to resolve old disputes? *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9: 379-382.
- Casella, G. & R.L. Berger. 1990. *Statistical Inference*, Belmont, California, USA.
- Cassia, M.C. 2000. Age and growth of the southern blue whiting *Micromesistius australis* in the SW Atlantic. *Sci. Mar.* 64: 269-274.
- Castonguay, M., P. Simard & P. Gagnon. 1991. Usefulness of Fourier analysis of otolith shape for atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) stock discrimination. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48(2): 296-302.
- Castro-Papillón, J.A., M. Soto-Buá, H. Rodríguez-Domínguez, J. Majuto-García, C.A. Fernandez & J.M. García-Estévez. 2002. Selecting parasites for use in biological tagging of the atlantic swordfish (*Xipbias gladius*). *Fish. Res.* 59: 259-262.
- Céspedes, R., L. Adasme, P. Gálvez, D. Boré, R. Tascheri, C. Montenegro, C. Bravo, H. Robotham & A. Zuleta. 1998. Análisis de la pesquería de merluza de tres aletas en la zona sur- austral. Informe final proyecto FIP 96-39. Fondo de Investigación Pesquera, Valparaíso, Chile. 124 p.
- Clausen, L.A.W., D. Bekkevold, E.M.C. Hatfield & H. Mosegaard. 2007. Application and validation of otolith microstructure as a stock identification method in mixed Atlantic herring (*Clupea harengus*) stocks in the North Sea and western Baltic. *ICES J. Mar. Sci.* 64: 377-385.
- Córdova, J., M. Barbieri, M. Espejo, A. Saavedra, V. Ojeda, L. Muñoz, L. Chong, R. Céspedes, L. Adasme, J. Oliva & E. Díaz. 2003. Evaluación hidroacústica del stock desovante de merluza de tres aletas en su unidad de pesquería, año 2002. Informe final proyecto FIP 2002-20. IFOP, Valparaíso. 76 p.
- Córdova, J. & R. Céspedes. 1997. Pesca de investigación de la fluctuación interanual y comportamiento del recurso merluza de tres aletas. Informe final. IFOP, Valparaíso. 34 p.
- Cousseau, M. & R. Perrota. 2000. Peces marinos de Argentina: biología, distribución, pesca. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Mar del Plata (Argentina). 167 p.
- Cronin, M., W. Spearman, R. Wilmont, J. Patton & J. Bickbam. 1993. Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 708-715.
- Cruz, P., C.H. Mejia-Ruiz, R. Perez-Enriquez & A.M. Ibarra. 2002. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Molecular Ecology Notes* 2 (3): 239-241.
- Cuyás, C., J.J. Castro, A.T. Santana-Ortega & E. Carbonell. 2004. Insular stock identification of *Serranus atricauda* (Pisces:Serranidae) through the presence of *Cerathotoa steindachneri* (Isopoda: Cymothoidae) and *Pentacapsula cutanea* (Myxozoa Pentacapsulidae) in the Canary Islands. *Sci. Mar.* 68: 159-163.
- Chen, Y.-H. & J.-T. Kao. 2006. Multinomial logistic regression approach to haplotype association analysis in population-based case-control studies. *BMC Genetics* 7(43).
- Chistiakov, D.A., B. Hellemans & F.A.M. Volckaert. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255: 1-29.

- De Woody, J. & J. Avise. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology* 56: 461-473.
- Di Finizio, A., G. Guerriero, G.L. Russo & G. Ciarcia. 2007. Identification of gadoid species (Pisces, Gadidae) by sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial 12S and 16S rRNA gene fragments. *Eur Food Res Technol* 225: 337-344.
- Edwards, C. & D. Skibinski. 1987. Genetic variation of mitochondrial DNA in mussel (*Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*) population from South West England and South Wales. *Marine Biology* (Berlin). 94: 547-556.
- Elsdon, T.S. & B.M. Gillanders. 2002. Interactive effects of temperature and salinity on otolith chemistry: challenges for determining environmental histories of fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59: 1796-1808.
- Elsdon, T.S. & B.M. Gillanders. 2003a. Reconstructing migratory patterns of fish based on environmental influences on otolith chemistry. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13: 219-235.
- Elsdon, T.S. & B.M. Gillanders. 2003b. Relationship between water and otolith elemental concentrations in juvenile black bream *Acanthopagrus butcheri*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 260: 263-272.
- Elsdon, T.S. & B.M. Gillanders. 2004. Fish otolith chemistry influenced by exposure to multiple environmental variables. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 313: 269-284.
- Elsdon, T.S. & B.M. Gillanders. 2005. Consistency of patterns between laboratory experiments and field collected fish in otolith chemistry: an example and applications for salinity reconstructions. *Mar. Freshwater Res.* 56: 609-617.
- Elsdon, T.S. & B.M. Gillanders. 2006a. Identifying migratory contingents of fish by combining otolith Sr:Ca with temporal collections of ambient Sr:Ca concentrations. *Journal of Fish Biology* 69: 643-657.
- Elsdon, T.S. & B.M. Gillanders. 2006b. Temporal variability in strontium, calcium, barium, and manganese in estuaries: Implications for reconstructing environmental histories of fish from chemicals in calcified structures. *Est. Coas. Shel. Sci.* 66: 147-156.
- Espinoza, J.P., R. Galleguillos & S. Astete. 2002. Análisis isoenzimático en *Brama australis* (Valenciennes 1837) (Pisces, Perciformes, Bramidae) en la zona-centro sur de Chile. *Gayana* 66: 237-242.
- Falush, D., M. Stephens & J.K. Pritchard. 2003. Inference of population structure: extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.
- Ferrada, S., K. Hernández, R. Montoya & R. Galleguillos. 2002. Estudio poblacional del recurso anchoveta (*Engraulis ringens* Jenyns 1842) (Clupeiformes, Engraulidae), mediante análisis de ADN. *Gayana* 66: 243-248.
- Ferreira, M. & D. Grattapaglia. 1989. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. pp. 221. *In: C.d.R.G.y.B. Embrapa* (ed.), Brasilia.
- Galleguillos, R. & S. Astete. 2003. Caracterización genética de *D. eleginoides* y comparación de las poblaciones presentes entre la VIII y XI Regiones. *In: Oyarzún et. al* (ed.) Monitoreo de la pesquería artesanal de bacalao de profundidad entre la VIII y XI Regiones. Informe Final Proyecto FIP N° 2001-16, Universidad de Concepción, Concepción.
- Galleguillos, R., J. Chong, C. Oyarzún, M. Oliva & R. Roa. 1996. Unidades de stock en los recursos sardina común y anchoveta de la zona centro-sur. Informe final proyecto FIP 94-20. Universidad Católica de la Santísima Concepción, Talcahuano. 64 p.
- Galleguillos, R., S. Ferrada, C.E. Hernández, C. Canales-Aguirre, G. Aedo, M. San Martín & S. Astete. 2008. Unidades poblacionales del bacalao de profundidad. Informe Final FIP 2006-41. Universidad de Concepción, Concepción. 165 p.
- Galleguillos, R., R. Montoya, T. L., M. Oliva, C. Oyarzún & L. Castro. 1998. Identificación de unidades de stocks en el recurso merluza de cola en el área de distribución de la pesquería. Informe final proyecto FIP 96-30. Universidad de Concepción, Concepción (Chile). 81 p.
- Galleguillos, R. & A. Torres. 1988. Identificación de unidades poblacionales pelágicas. Tercera etapa.

- Informe Final. Universidad de Concepción, Concepción. 67 p.
- Galleguillos, R., L. Troncoso & C. Oyarzún. 1997. Diferenciación poblacional en la sardina chilena *Strangomera bentincki* (Pisces: Clupeidae) análisis genético de variabilidad proteínica. *Revista Chilena de Historia Natural* 70: 351-361.
- Galleguillos, R., L. Troncoso, C. Oyarzún, M. Astorga & M. Peñaloza. 2000. Genetic differentiation in chilean hake *Merluccius gayi gayi* (Pisces: Merlucciidae). *Hydrobiologia* 420: 49-54.
- George-Nascimento M. & H. Arancibia. 1994. La fauna parasitaria y la morfometría de la merluza austral *Merluccius australis* (Hutton) y su aporte a la distinción de unidades de stock. *Biología Pesquera* 23: 31-47.
- Giovannacci, I., C. Guizard, M. Carlier, V. Duval, J.L. Martin & C. Demeulemester. 2004. Species identification of meat products by ELISA. *International Journal of Food Science and Technology* 39: 863-867.
- González, D. 1998. Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. *Revista Mexicana de Micología* 14: 1-21.
- Guerra Sierra, A. & J.L. Sánchez Lizaso. 1998. Fundamentos de explotación de recursos vivos marinos, Zaragoza (España). 249 p.
- Hamer, P.A., G.P. Jenkins & P. Coutin. 2006. Barium variation in *Pagrus auratus* (Sparidae) otoliths: A potential indicator of migration between an embayment and ocean waters in south-eastern Australia. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 68: 686-702.
- Hanchet, S. 1999. Stock structure of southern blue whiting (*Micromesistius australis*) in New Zealand waters. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 33: 599-609.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball & J.R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol]* 270: 313-321.
- Hoffmann, R., L. Boore & M. Brown. 1992. A novel mitochondrial genome organization for the blue Mussel, *Mytilus edulis*. *Genetics* 131: 397-412.
- Hsieh, H.M., C.C. Tsai, L.C. Tsai, H.L. Chiang, N.E. Huang, R.T.P. Shih, A. Linacre & J.C.I. Lee. 2005. Species identification of meat products using the cytochrome b gene. *Forensic Science Journal* 4: 29-36.
- Hubert, N., R. Hanner, E. Holm, N.E. Mandrak, E. Taylor, M. BurrIDGE, D. Watkinson, P. Dumont, A. Curry, P. Bentzen, J. Zhang, J. April & L. Bernatchez. 2008. Identifying canadian freshwater fishes through DNA barcodes. pp. e2490 PLoS ONE.
- Imsiridou, A., H. Hardy, N. Maudling, G. Amoutzias & J.-M.Z. Comenges. 2003. Computer notes. Web database of molecular genetic data from fish stocks. *J. Hered.* 94: 265-270.
- Incorvaia, I. & D.R. Hernández. 2006. Nematodos parásitos como indicadores biológicos de *Macruronus magellanicus*. Informe Técnico n°61. INIDEP, Mar del Plata, Argentina. 24 p.
- Ivanova, N.V., T.S. Zemlak, R.H. Hanner & P.D.N. Hebert. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7: 544-548.
- Jarne, P. & J. Lagoda. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* 11: 424-430.
- Kalish, J.M. 1991. ¹³C and ¹⁸O isotopic disequilibria in fish otoliths: metabolic and kinetic effects. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 75: 191-203.
- Kasapidis, P. & A. Magoulas. 2008. Development and application of microsatellite markers to address the population structure of the horse mackerel *Trachurus trachurus*. *Fish. Res.* 89: 132-135.
- Kerr, L.A., D.H. Secor & R.T. Kraus. 2007. Stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$) and Sr/Ca composition of otoliths as proxies for environmental salinity experienced by an estuarine fish. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 349: 245-253.
- Klecka, W.R. 1980. Discriminant analysis Sage University paper series on quantitative applications in the social sciences, Sage Publications, Beverly Hills.
- Kohlmann, K., R. Gross, A. Murakaeva & P. Kersten. 2003. Genetic variability and structure of common

- carp (*Cyprinus carpio*) populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Aquat. Living Resour.* 16: 421-431.
- Koljonen, M.L. & R. Wilmont. 2005. Genetic analysis: allozymes. pp. 295-309. *In*: S. Cadrin, K.D. Friedland & J. Waldman (ed.) *Stock identification methods: Applications in fishery science*, Elsevier Academic Press.
- Larsson, L.C., L. Laikre, S. Palm, C. André, G.R. Carvalho & N. Ryman. 2007. Concordance of allozyme and microsatellite differentiation in a marine fish, but evidence of selection at a microsatellite locus. *Molecular Ecology* 16: 1135-1147.
- Lillo, S., R. Bahamonde, C. Cancino, J. Saavedra, A. Saavedra & F. Flores. 2007. Estimación *in situ* de la fuerza blanco (TS) de merluza de tres aletas. Informe final proyecto FIP 2005-29. IFOP, Valparaíso. 56 p.
- Lillo, S. & R. Céspedes. 1998. Análisis de los procesos migratorios y biológicos del recurso merluza de tres aletas. Informe final. . IFOP, Valparaíso. 39 p.
- Lillo, S., R. Céspedes, V. Ojeda, E. Díaz, Y. Muñoz, A. Saavedra, J. Oliva & L. Adasme. 2002. Evaluación hidroacústica de merluza de tres aletas. Informe Final, Proyecto FIP 2001-20. Instituto de Fomento Pesquero, Valparaíso.
- Lillo, S., R. Céspedes, V. Ojeda & A. Saavedra. 2005. Evaluación hidroacústica del stock parental de merluza de tres aletas en su unidad de pesquería, año 2004 (Fase 1)•. Fondo de Investigación Pesquera, Valparaíso, Chile. FIP 2004-08-1. 53 p.
- Litt, M. & A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 397-401.
- Lopera, N., R. Pereira, R. Nardez, J. Povh, P. Gomes, L. Vargas & C. Mangolin. 2008. Variabilidad genética de lotes de *Brycon orbignyanus* utilizados en programas de repoblamiento: manejo y conservación. *Acta biol. Colomb.* 13: 107-118.
- Luque, J., A. Herráez. 2001. *Biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. pp. 469, Barcelona, España.
- Macchi, G.J. & M. Pájaro. 1999. Features of the reproductive biology of the southern blue whiting (*Micromesistius australis*). *En*: *Reproductive hábitat, biology and acoustic biomass estimates of the southern blue whiting (Micromesistius australis) in the sea off southern patagonia*. *Doc. Cient. INIDEP.* 5: 67-79 p.
- Macchi, G.J., M. Pájaro, O.C. Wöhler, M.J. Acevedo, R.L. Centurión & D.G. Urteaga. 2005. Batch fecundity and spawning frequency of southern blue whiting (*Micromesistius australis*) in the southwest Atlantic Ocean. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 39: 993-1000.
- MacKenzie, K. 2002. Parasites as biological tags in population studies of marine organisms: an update. *Parasitology* 124: 153-163.
- Mackenzie, K., N. Campbell, S. Mattiucci, P. Ramos, A.L. Pinto & P. Abaunza. 2008. Parasites as biological tags for stock identification of Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus*. *Fish. Res.* 89: 136-145.
- Márquez, M.E.I. 1991. Aplicación del análisis electroforético de las proteínas musculares para el estudio de identificación de la especie *Micromesistius australis* (polaca). Instituto Antártico Argentino. 378.
- Martin, G.B. & M.J. Wuenschel. 2006. Effect of temperature and salinity on otolith element incorporation in juvenile gray snapper *Lutjanus griseus*. *Marine Ecology-Progress Series* 324: 229-239.
- Mattiucci, S., V. Farina, N. Campbell, K. MacKenzie, P. Ramos, A.L. Pinto, P. Abaunza & G. Nascetti. 2008. *Anisakis* spp. larvae (Nematoda: Anisakidae) from Atlantic horse mackerel: Their genetic identification and use as biological tags for host stock characterization. *Fish. Res.* 89: 146-151.
- McGoldrick, D.J., D. Hedgecock, L.J. English, P. Baoprasertkul & R.D. Wars. 2000. The transmission of microsatellite alleles in Australian and North American stocks of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), selection and null alleles. *Journal of Shellfish Research.* 19: 779-788.
- Metzgar, D., J. Bytof & C. Wills. 2000. Selection against frameshift mutations limits microstallite expansion in coding DNA. *Genome Research.* 10: 72-80.

- Moran, P., A.W. Ryan, C. Rico & G.M. Hewitt. 1999. Four microsatellite loci in the gadoid fish, blue whiting *Micromesistius poulassou* (Risso 1826). *Animal Genetics* 30: 463-464.
- Moxon, E.R. & C. Wills. 1999. DNA microsatellites: agents of evolution. *Scientific American* 1: 94-99.
- Niklitschek, E., R. Roa, S. Ferrada, A. Lafon, E. Galleguillos, M. George-Nascimento & P.Toledo. 2009. Unidades poblacionales de orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*). Informe final proyecto FIP 2006-55. Universidad Austral de Chile (Centro Trapanada), Coyhaique, Chile. 140 p.
- O'Brien, R.G. & K.E. Muller. 1993. Unified power analysis for t-tests through multivariate hypotheses. pp. 297-344. *In: L.K. Edwards (ed.) Applied analysis of variance in behavioral science*, Marcel Dekker, New York, USA.
- O'Brien, R.G. 1998. A tour of UnifyPow: a SAS module/macro for sample-size analysis. pp. 1346-1355. *In: S. Institute (ed.) 23rd SAS Users Group International Conference*, Cary, NC (USA).
- Ojeda, P., E. Poulin, I. Kornfield, L. Cardenas, A. Silva & F. Ogalde. 2002. Identificación de unidades de stock del jurel (*Trachurus murphyi* Nichols) en el Pacífico Sudoriental mediante análisis de marcadores moleculares. Informe Final. 72 p.
- Ojeda, V., F. Cerna, M. Aguayo, I. Payá & C. Chong. 1998. Estudio de crecimiento y construcción de claves talla edad de merluza de tres aletas y merluza de cola (FIP97-15). Instituto de Fomento Pesquero, Valparaíso (Chile). 1-134 p.
- Oke, C., Y.C. Crozier, R.H. Crozier & R.D. Ward. 1999. Microsatellites from a teleost, orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*), and their potential for determining population structure. *Molecular Ecology* 8: 2141-2152.
- Ovenden, J. 1990. Mitochondrial DNA and marine stock assesment: A review. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 41: 835-853.
- Oyarzún, C., S. Gacitúa, M. Araya, L. Cubillos, R. Galleguillos, C. Pino, G. Aedo, M. Salamanca, M. Pedraza & J. Lamilla. 2003. Monitoreo de la pesquería artesanal de bacalao de profundidad entre la VIII y XI regiones. Informe Final Proyecto FIP N° 2001-16. Departamento de Oceanografía, Universidad de Concepción, Concepción (Chile). 225 p.
- Pájaro, M. & G.J. Macchi. 2001. Spawning pattern, length at maturity, and fecundity of the southern blue whiting (*Micromesistius australis*) in the south-west Atlantic Ocean. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 35: 375-385.
- Palumbi, S. 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. pp. 665. *In: D.C.M. Hillis, B. Mable (ed.) Molecular Systematics*, Sinauer Associates, Inc. Publishers, USA.
- Pannella, G. 1971. Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. *Science*. 173: 1124-1127.
- Pardo-Gandarillas, M., F. Duarte, J. Chong & C. Ibáñez. 2007. Dieta de tiburones juveniles *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758) (Carcharhiniformes: Carcharhinidae) en la zona litoral centro-sur de Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 42(3): 365-369.
- Park, J., J. Lee, J. Kim, H. Lee & S. Min. 1993. Mitochondrial cytochrome *b* sequence variation in Korean salmonids. *Journal of Fish Biology*. 56 (5): 1145-1154.
- Pascoal, A., J. Barros-Velázquez, A. Cepeda, J.M. Gallardo & P. Calo-Mata. 2008. Identification of shrimp species in raw and processed food products by means of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method targeted to cytochrome b mitochondrial sequences. *Electrophoresis* 29: 3220-3228.
- Payá, I., P. Rubilar, H. Pool, R. Céspedes, H. Reyes, N. Ehrhardt, L. Adasme & H. Hidalgo. 2002. Evaluación de merluza de cola y merluza de tres aletas. Informe final proyecto FIP 2000-15. IFOP, Valparaiso (Chile). 163 p.
- Peakall, R. & P.E. Smouse. 2006. GENALEX6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6: 288-295.
- Pérez, M., C. Álvarez, M. Balado, A.G. Cabado, J.M. Vieites & P. Presa. 2004. Genetic identification of south atlantic hakes (*M. australis* and *M. hubbsi*) in the food chain by PCR-RFLPs on the cytochrome b gene. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 13(2): 59-67.

- Pressa, P., M. Pérez & A. Díaz. 2002. Polymorphic microsatellite markers for blue mussels (*Mytilus spp.*). Conservation Genetics. 3: 441- 443.
- Pritchard, J.K., M. Stephens & P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945-959.
- Quinteiro, J., R. Vidal, M. Izquierdo, C.G. Sotelo, M.J. Chapela, R.I. Perez-Martin, H. Rehbein, G.L. Hold, V.J. Russell, S.E. Pryde, C. Rosa, A.T. Santos & M. Rey-Mendez. 2001. Identification of hake species (*Merluccius* genus) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region. J. Agric. Food Chem. 49: 5108-5114.
- Rice, W.E. 1989. Analyzing tables of statistical tests. Evolution 43: 223-224.
- Rico, C., K.M. Ibrahim, I. Rico & G.M. Hewitt. 1997. Stock composition in North Atlantic populations of whiting using microsatellite markers. Journal of Fish Biology 51: 462-475.
- Roa-Ureta, R., B. Ernst & F. Tapia. 1999. Estimation of size at sexual maturity: an evaluation of analytical and resampling procedures. Fishery Bulletin 97: 570-580.
- Robertson, S. & S. Talman. 2002. Shape analysis and ageing of orange roughy otoliths from the South Tasman Rise. Final report to the Australian fisheries management authority, 16 pp. Marine Freshwater Resources Institute. Victoria. 16 p.
- Rocha-Olivares, A. & J. Sandoval-Castillo. 2003. Diversidad mitocondrial y estructura genética en poblaciones alopátricas del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* Ciencias Marinas 29: 197-209.
- Rooker, J. & D.H. Secor. 2004. Stock structure and mixing of Atlantic bluefin tuna: evidence from stable $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ isotopes in otoliths. Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT 56: 1115-1120.
- Rooker, J.R., V.S. Zdanowicz & D.H. Secor. 2001. Chemistry of tuna otoliths: assessment of base composition and postmortem handling effects. Mar. Biol. 139: 35-43.
- Rozas, J., J. Sanchez-DelBarrio, X. Messeguer & R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism by the coalescent and other methods. Bioinformatics 19: 2496-2497.
- Ryan, A.W., V. Mattiangeli & J. Mork. 2005. Genetic differentiation of blue whiting (*Micromesistius poutassou* Risso) populations at the extremes of the species range and at the Hebridese Porcupine Bank spawning grounds. ICES J. Mar. Sci. 62: 948-955.
- Ryan, A.W., P.J. Smith & J. Mork. 2002. Genetic differentiation between the New Zealand and Falkland Islands populations of southern blue whiting *Micromesistius australis*. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 36: 637-643.
- Saavedra, A., V. Correa, R. Cespedes, V. Ojeda C., L. Adasme, E. Diaz, J. Oliva & P. Rojas. 2007. Evaluación hidroacústica stock parental merluza de tres aletas en su unidad de pesquería, Año 2005. Instituto de Fomento Pesquero, Valparaíso, Chile. FIP 2005-06. 48 p.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. 1659 p.
- Sánchez, R., J. Ciechomzki & E. Acha. 1986. Estudios sobre la reproducción y fecundidad de la polaca (*Micromesistius australis* Norman, 1937) en el mar Argentino. Res. Invest. Des. Pesq. 6: 21-43.
- Schlotterer, C. & D. Tautz. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids. Res. 20: 211-215.
- Schneider, S., D. Roessli & L. Excoffier. 2000. A software for population genetics data analysis, University of Geneva. Switzerland, Geneva.
- Secor, D.H. 1999. Specifying divergent migrations in the concept of stock: the contingent hypothesis. Fish. Res. 43: 13-34.
- Secor, D.H., J.M. Dean & E.H. Laban. 1995a. Manual for otolith removal and preparation for microstructural examination. Belle W. Baruch institute for marine biology and coastal research. 84 p.
- Secor, D.H., A. Henderson-Arzapalo & P.M. Piccoli. 1995b. Can otolith microchemistry chart patterns of migration and habitat utilization in anadromous fishes? J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 192: 15-33.
- Secor, D.H., J.R. Rooker, E. Zlokovitz & V. Zdanowicz. 2001. Identification of riverine, estuarine, and

- coastal contingents of Hudson River striped bass based upon otolith elemental fingerprints. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 211: 245-253.
- Shieh, G. 2000. On power and sample size calculations for likelihood ratio tests in generalized linear models. *Biometrics* 56: 1192-1196.
- Shinde, D., L. Lai, F.Z. Sun & N. Arnheim. 2003. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. *Nucleic Acids Res.* 31: 974-980.
- Smith, P.J. 2005. Random amplified polymorphic DNA (RAPD). pp. 371-387. *In*: S. Cadrin, K.D. Friedland & J. Waldman (ed.) *Stock identification methods: applications in fishery science*, Elsevier Academic Press.
- Smith, P.J., S.G. Robertson, P. Horn, B. Bull, O.F. Anderson, B.R. Stanton & C.S. Oke. 2002. Multiple techniques for determining stock relationships between orange roughy, *Hoplostethus atlanticus*, fisheries in the eastern Tasman Sea. *Fish. Res.* 58: 119-40.
- Song, Q., E. Fickus & P. Cregan. 2002. Characterization of trinucleotide SSR motifs in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 104 (2-3): 286-293.
- Spanakis, E., N. Tsimenides & E. Zoures. 1989. Genetic difference between populations of sardine *Sardina pilchardus*, and anchovy *Engraulis encrasicolus*: in the Aegean and Ionian seas. *J. Fish Biol.* 35: 365-378.
- Strachan, T. & A.P. Read. 1999. *Human molecular genetics 2. Cap11.2. Genetic markers.*, Garland Science, New York and London.
- Stransky, C. 2004. Stock separation and growth of redfish (genus *Sebastes*) in the North Atlantic by means of shape and elemental analysis of otoliths. *Fachbereich Biologie, Universität Hamburg, Hamburg.* 132 p.
- Stransky, C. 2005. Geographic variation of golden redfish (*Sebastes marinus*) and deep-sea redfish (*S. mentella*) in the North Atlantic based on otolith shape analysis. *ICES J. Mar. Sci.* 62: 1691-1698.
- Suriano, D.M. & S.M. Martorelli. 1984. Monogéneos parásitos de peces pertenecientes al Orden Gadiformes de la plataforma del mar Argentino. *Revista del Museo de La Plata (Zoología)* 13: 1-16.
- Swain, D.P., J.A. Hutching & C.J. Foote. 2005. Environmental and genetic influences on stock identification characters. pp. 45-85. *In*: S.X. Cadrin, K.D. Friedland & J.R. Waldman (ed.) *Stock identification methods*, Elsevier Academic Press, Burlington-San Diego-London.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Res.* 17: 6463-6471.
- Thorrold, S., C. Jones & S. Campana. 1997. Response of otolith microchemistry to environmental variations experienced by larval and juvenile Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Limnol. Oceanogr.* 42: 102-111.
- Thresher, R.E. 1999. Elemental composition of otoliths as a stock delineator in fishes. *Fish. Res.* 43: 165-204.
- Tomo, A. & M.E.I. Márquez. 1980. Estudio electroforético de la especie *Micromesistius australis* capturada en aguas subantárticas y antárticas. *Instituto Antártico Argentino.* 260.
- Tracey, S., J. Lyle & G. Duhamel. 2006. Application of elliptical Fourier analysis of otolith form as a tool for stock identification. *Fish. Res.* 77: 138-147.
- Uchida, D.G.-., D. Weetman, L. Hauser, R. Galleguillos & M. Retamal. 2003. Allozyme and AFLP analyses of genetic population structure in the hairy edible crab *Cancer setosus* from the Chilean coast. *Journal of Crustacean Biology* 23: 486-494.
- Valdivia, I.M., R.A. Chávez & M.E. Oliva. 2007. Metazoan parasites of *Engraulis ringens* as tools for stock discrimination along the Chilean coast. *Journal of Fish Biology* 70: 1504-1511.
- Venables, W.N. & B.D. Ripley. 2002. *Modern applied statistics with S.* Springer, New York. 495 p.
- Vignal, A., D. Milan, M. SanCristobal & A. Eggen. 2002. A review on SNP and other types of molecular

- markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.* 34: 275-305.
- Volpedo, A.V., P. Miretzky & A. Fernandez Cirelli. 2006. Stocks pesqueros de *Cynoscion guatucupa* y *Micropogonias furnieri* (Pisces, Sciaenidae), en la costa atlántica de Sudamérica: comparación entre métodos de identificación. *Memoria* 66: 115-130.
- Waldman, J. 2005. Definition of stocks. An evolving concept. pp. 7-16. *In*: S. Cadrin, Friedland, K, J. Waldman Eds (ed.) *Stock identification methods. Applications in fishery science*, Elsevier Academic Press, USA.
- Ward, R., A. Appleyard, K. Daley & A. Reilly. 2001. Population structure of pink ling (*Genypterus blacodes*) from south-eastern Australian waters, inferred from allozyme and microsatellite analyses. *Mar. Freshwater Res.* 52: 965-973.
- Ward, R., M. Woodwark & D.O.F. Skibinski. 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater and anadromous fish. *Journal of Fish Biology* 44: 213-232.
- Ward, R.D. 2000. Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia* 420: 191-201.
- Ward, R.D., T.S. Zemlak, B.H. Innes, P.R. Last & P.D.N. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosoph. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci* 360: 1847-1857.
- Was, A., E. Gosling, K. McCrann & J. Mork. 2008. Evidence for population structuring of blue whiting (*Micromesistius poutassou*) in the Northeast Atlantic. *ICES J. Mar. Sci.* 65: 216-225.
- Wattier, R., C.R. Engel, P. Saumitou-Laprade & M. Valero. 1998. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Mol. Ecol. Notes* 7: 1569-1573.
- Weber, J. 1990. Informativeness of human (dC- dA)_n, (dG-dT)_n polymorphism. *Genomics* 7: 524-530.
- Wirgin, I. & J.R. Waldman. 2005. Use of nuclear DNA in stock identification: single-copy and repetitive sequence markers. pp. 331-370. *In*: S. Cadrin, K.D. Friedland & J. Waldman (ed.) *Stock identification methods: applications in fishery science*, Elsevier Academic Press.
- Wöhler, O.C., H.D. Cordo, J. Hansen & C. Cassia. 2001. Análisis secuencial de la población de la polaca (*Micromesistius australis*) en el período 1987-1997, ajustado con valores de rendimiento por unidad de esfuerzo de pesqueros comerciales. *Res. Invest. Des. Pesq.* 14: 37-56.
- Wurster, C., W. Patterson & M. Cheatham. 1999. Advances in micromilling techniques: a new apparatus for acquiring high-resolution oxygen and carbon stable isotope values and major/minor elemental ratios from accretionary carbonate. *Computers & Geosciences* 25: 1159-1166.
- Yamashita, M., Namikoshi A., Iguchi J., Takashima Y., Hossain M.A., Yabu T. & Y. Yamashita. 2008. Molecular Identification of Species and the Geographic Origin of Seafood pp. 297-306. *In*: K. Tsukamoto, T. Kawamura, T. Takeuchi, J. T. D. Beard & M.J. Kaiser (ed.) *Fisheries for Global Welfare and Environment*, 5th World Fisheries Congress.
- Yoshinaga, J., A. Nakama, M. Morita & J.S. Edmonds. 2000. Fish otolith reference material for quality assurance of chemical analyses. *Marine Chemistry* 69: 91-97.
- Zane, L., L. Bargelloni & T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation. A review *Molecular Ecology* 11: 1-16.
- Zbawicka, M., D. Skibinski & R. Wenne. 2003. Doubly uniparental transmission of mitochondrial DNA length variants in the mussel *Mytilus trossulus*. *Marine Biology* 142: 455-460.
- Zhanjiang, L. 2005. Amplified fragment length polymorphism (AFLP). pp. 389-411. *In*: S. Cadrin, K.D. Friedland & J. Waldman (ed.) *Stock identification methods: applications in fishery science*, Elsevier Academic Press.

ANEXO I: TALLERES REALIZADOS CON MOTIVO DEL PROYECTO FIP 2006-15

1.- TALLER METODOLÓGICO, CONCEPCIÓN, SEPTIEMBRE DE 2007

El taller metodológico organizado por la Universidad Austral de Chile, se realizó en el Salón de Videoconferencias de la Universidad de Concepción entre las 15:00 y 19:00 hrs del día 16 de Mayo de 2007. Contó con la presencia de profesionales de la Subsecretaría de Pesca, del Fondo de Investigación Pesquera, un representante de Pesquera Friosur e investigadores de la Universidad de Concepción y de la Universidad Austral de Chile (Tabla 37).

Se expuso cinco presentaciones (Figura 20) en las que se presentó el enfoque del proyecto, metodología y antecedentes bibliográficos que sustentan las técnicas elegidas:

- Historia de vida y biología de merluza de tres aletas.
- Oferta técnica y metodología para la aplicación de marcadores moleculares, análisis de la composición parasitaria y análisis de otolitos y su aplicación en la identificación de unidades poblacionales de merluza de tres aletas.
- Metodología de modelación estadística e integración de las distintas fuentes de información generadas para la identificación de unidades poblacionales.
- Programa de trabajo, requerimiento de información y plazos de ejecución del proyecto.

En la primera exposición Alejandra Lafon presentó un compendio bibliográfico de la historia de vida de merluza de tres aletas, incluyendo las hipótesis relacionadas con la dinámica espacial del recurso y su posible asociación con migraciones reproductivas. Luego, Ricardo Galleguillos mostró el estado del arte de las técnicas genéticas y su utilidad en la identificación de unidades poblacionales, haciendo especial referencia a los dos métodos que se aplicarán en el estudio. A continuación, Karen González presentó los métodos de análisis de la fauna parasitaria, luego de una discusión entre la audiencia se sugirió aumentar el número muestral inicial ($n=35$) a 50 ejemplares.

Posteriormente Edwin Niklitschek hizo un resumen de los métodos de análisis de variabilidad en la morfometría de otolitos y explicó que se hará un estudio exploratorio de microelementos en ejemplares del Atlántico y Pacífico, para evaluar su utilidad en la discriminación de unidades poblacionales entre especímenes procedentes del Atlántico y del Pacífico. Este último análisis se realizará en la Universidad de Maryland, Estados Unidos.

Rubén Roa presentó un modelo para la integración de las distintas fuentes de información en la definición de unidades poblacionales de merluza de tres aletas, considerando las áreas de interés. Se acordó realizar reuniones de trabajo con los líderes de los distintos objetivos para revisar en conjunto los supuestos de este modelo.

Se discutió sobre la necesidad de contar con la información biológica-pesquera generada por los programas de seguimiento de recursos pesqueros que mantiene el Instituto de Fomento Pesquero. Dado que merluza de tres aletas no es una especie objetivo atrayente para la flota pesquera, los antecedentes estadísticos sobre distribución y abundancia son escasos, siendo de gran ayuda la valiosa información recopilada tanto por este tipo de programas, como por proyectos del Fondo de Investigación Pesquera. Otro tema a tratar fue la fecha de adjudicación del proyecto (marzo de 2007), que no es conveniente para la obtención de muestras dado que éstas sólo se pueden recolectar

entre agosto y diciembre, fecha en la cual el recurso está presente en aguas chilenas. Por este motivo se acordó desfazar el inicio de actividades hacia el segundo semestre de 2007, lo que significó la reprogramación de los plazos de ejecución del proyecto.

El Taller concluyó con una discusión abierta sobre las presentaciones y metodologías expuestas.

Tabla 37. Lista de asistentes al taller metodológico.

Nombre	Institución
Darío Rivas	Subsecretaría de Pesca
Rubén Pinochet	Fondo de Investigación pesquera
Grimur Eiríksson	Pesquera Friosur
Alejandra Lafon	Universidad Austral de Chile
Edwin Niklitschek	Universidad Austral de Chile (Videoconferencia)
Karen González	Universidad Católica de la Santísima Concepción
Cristian Canales-Aguirre	Universidad de Concepción
Ciro Oyarzún	Universidad de Concepción
Ricardo Galleguillos	Universidad de Concepción
Rubén Roa	Universidad de Concepción
Sandra Ferrada	Universidad de Concepción
Sofía Astete	Universidad de Concepción



Universidad Austral de Chile

Centro Tropicana

**Unidades poblacionales de merluza de tres aletas (*Micromesistius australis*),
Proyecto FIP 2006-15**

Programa de Actividades Taller Metodológico.

Concepción, 16 de mayo de 2007.

Sal: La Escondida, Universidad de Concepción

- | | |
|-------|---|
| 14:40 | Resumen del proyecto y de los antecedentes biológicos y pesqueros de <i>M. australis</i> .
Alejandra Lafon, Universidad Austral de Chile. |
| 15:00 | Oferta técnica y metodología para la aplicación de marcadores moleculares en la identificación de unidades poblacionales de merluza de tres aletas.
Ricardo Galleguillos, Universidad de Concepción. |
| 15:30 | Coffe Break, 15 minutos |
| 15:45 | Oferta técnica y metodología para el análisis de la composición parasitaria.
Karen González, Univ. Católica de la Santísima Concepción. |
| 16:15 | Oferta técnica y metodología para el análisis de otolitos y su aplicación en la identificación de unidades poblacionales.
Edwin Niklitschek, Universidad Austral de Chile. |
| 16:45 | Coffe Break, 15 minutos |
| 17:00 | Oferta técnica y métodos de análisis estadístico integrado para la identificación de stocks.
Rubén Roa, Universidad de Concepción. |
| 17:30 | Programa de trabajo, requerimiento de información y plazos de ejecución.
Edwin Niklitschek, Rubén Roa. |
| 18:00 | Cocktail |

Figura 20: Programa del taller metodológico del proyecto FIP 2006-15 realizado en la ciudad de Concepción.

2.- TALLER DE DIFUSIÓN DE RESULTADOS, VALPARAÍSO, DICIEMBRE DE 2008

El taller de difusión de resultados organizado por la Universidad Austral de Chile, se realizó en el Salón de la SUBPESCA en Valparaíso, entre las 14:30 y 19:00 hrs del día 17 de diciembre de 2008. Contó con la presencia de profesionales de la Subsecretaría de Pesca, del Fondo de Investigación Pesquera, del Instituto de Fomento Pesquero, del Centro de Estudios Pesqueros e investigadores de la Universidad de Concepción, Universidad Católica de la Santísima Concepción y de la Universidad Austral de Chile (Tabla 38).

Se expuso siete presentaciones siguiendo el esquema del programa del taller (Figura 21) en las que se presentó los resultados del proyecto obtenidos para los distintos objetivos específicos.

En la primera exposición (Introducción al proyecto y presentación de objetivos) se hizo un resumen de la historia de vida de merluza de tres aletas, incluyendo las hipótesis relacionadas con la dinámica espacial del recurso y su posible asociación con migraciones reproductivas y una introducción a los objetivos del proyecto.

La segunda presentación (Revisión bibliográfica de las metodologías más robustas para la identificación de unidades poblacionales de merluza de tres aletas) se hizo un compendio de las principales técnicas usadas para determinar unidades de poblacionales de merluza de tres aletas, poniendo énfasis en las utilizadas en el presente proyecto.

En la tercera presentación (Identificar unidad(es) poblacional(es) en merluza de tres aletas y su respectiva área de distribución geográfica) se mostró el diseño experimental utilizado. Los resultados del análisis de potencia y tamaño muestral indicaron distintos tamaños mínimos de muestras, dependiendo de la hipótesis evaluada y de la técnica empleada. Es importante que las muestras sean independientes, para esto el muestreo debe ser aleatorio en lances, fechas y barcos tanto como sea posible. Las técnicas que mostraron mayor potencia estadística correspondieron a los análisis de isótopos estables en otolitos y de composición parasitaria. Dentro de las técnicas moleculares, las secuenciaciones de Dloop y ND1 mostraron una mayor potencia, a igual número de muestras. La comparación de estadios de madurez sexual, por su parte, mostró una potencia relativamente alta, con un tamaño mínimo de sólo 137 hembras requerido para comparar las zonas 1 y 4, casi un orden de magnitud por debajo del tamaño requerido para los mismos fines utilizando la estructura de tallas.

A continuación, se presentaron los resultados del análisis de genética de poblaciones, indicando que de acuerdo a lo obtenido, la hipótesis de que en el cono sur de América existe un stock genético único que se alimenta y mezcla en aguas subantárticas, para luego incorporarse aleatoriamente a alguno de los flujos migratorios que les conducen a las zonas de desove resulta la más plausible.

Posteriormente, (Evaluación de posibles diferencias intra-específicas en la composición de la fauna parasitaria de *M. australis*) se presentó los resultados del análisis de la fauna parasitaria, y se concluyó que a la luz de los antecedentes biológicos para esta especie, los resultados deben interpretarse como producto de las condiciones ecológicas en que viven las merluzas de tres aletas en las distintas zonas de pesca y señala que no constituyen una unidad ecológicamente homogénea, la que se distinguiría por su permanencia diferencial en cada zona de pesca.

En la séptima presentación se discutió los resultados de los análisis de la morfometría de otolitos y de los parámetros clave de la historia de vida de merluza de tres aletas, según estructura de tallas, modelos de crecimiento y modelos de madurez sexual de ambos stock (Pacífico versus Atlántico). El análisis discriminante aplicado a la morfometría de otolitos mostró que el modelo que considera a la zona como factor predictor de la estructura multivariada de los coeficientes es significativamente mejor que el modelo que considera a los datos de ambas zonas agrupados, por lo que la metodología

parece adecuada como herramienta en la discriminación de unidades poblacionales. Por su parte los análisis de los parámetros de la historia de vida (estructura de tallas, modelos de crecimiento y modelo de madurez) todos coinciden en que los mejores modelos son aquellos que indican diferencias en los stock de merluza de tres aletas entre ambos lados de Sudamérica.

En la última presentación (Comparación de la composición microquímica de otolitos de merluza de tres aletas *Micromesistius australis* entre áreas de reproducción de los océanos Atlántico y Pacífico) se mostró los resultados del estudio de análisis de microelementos realizado a ejemplares provenientes del Pacífico sur y del Atlántico sur. Los resultados de estos análisis indican una clara separación de ambas unidades de stock, más fuertemente presentada en los resultados de análisis de isótopos estables de otolitos. Estos análisis se realizaron en la Universidad de Maryland en Estados Unidos.

A modo de conclusión en la última presentación, referida también a la integración de los resultados de las distintas aproximaciones utilizadas para la definición de unidades poblacionales, mostró tendencias discrepantes. Si se incluye en el análisis de integración los resultados de genética, no se evidencia diferencias significativas, pero estas resultan claras al excluirlas. Esto sin lugar a dudas está relacionado con el tipo de escala utilizada y el tiempo de respuesta de la población. Basta un pequeño flujo génico para evitar estructuración genética en las poblaciones, pero sin embargo a escala ecológica es posible observar diferencias claras entre ellas que son evidenciadas estadísticamente, por ejemplo, a través del estudio de parasitismo y de isótopos de otolitos.

La discusión en torno a que metodología utilizar para la definición de unidades poblacionales, su significado biológico y utilidad para el manejo es un tema de permanente discusión. La opinión entre los presentes es que dado que la pesquería opera a una escala más ecológica que evolutiva se debería dar mayor peso a atributos ecológicos.

El Taller concluyó con una discusión abierta sobre las presentaciones y resultados expuestos.

Tabla 38. Lista de asistentes al taller de difusión de resultados del proyecto “Unidades poblacionales de merluza de tres aletas realizado en Valparaíso, el 17 de diciembre de 2008.

Participantes	Institución
Daniela Cajas	SUBPESCA
Cristian Canales	IFOP
Renato Céspedes	IFOP
Marcelo Feltrim	IFOP
Ricardo Galleguillos	Universidad de Concepción
Patricio Galvez	IFOP
Mario George-Nacimiento	Universidad Católica de la Santísima Concepción
Edwin Niklitschek	Centro Trapananda-Universidad Austral de Chile
Rubén Pinochet	FIP
Dario Rivas	SUBPESCA
Ruben Roa	Universidad de Concepción
Pedro Rubilar	CEPES
Pamela Toledo	Centro Trapananda-Universidad Austral de Chile
Alejandro Zuleta	CEPES



Universidad Austral de Chile
Centro Trapananda

Unidades poblacionales de merluza de tres aletas (*Micromesistius australis*).

Proyecto FIP 2006-15

Programa de Actividades, taller de difusión de resultados.

Valparaíso, 17 de diciembre de 2008.

14:30 – 15:00 Palabras de bienvenida y presentación del proyecto.

Edwin Niklitschek, Universidad Austral de Chile.

15:00 - 15:25 Revisión bibliográfica de las metodologías más robustas para la identificación de unidades poblacionales. (Objetivo 1).

Pamela Toledo, Universidad Austral de Chile.

15:25 – 15:40 Diseño experimental (temporal y geográficamente adecuado) para identificar unidad(es) poblacional(es) de la especie. (Objetivo 2).

Edwin Niklitschek, Universidad Austral de Chile.

15:40 – 15:55 Café

15:55 – 16:25 Análisis de genética de poblaciones.

Ricardo Galleguillos, Universidad de Concepción

16:25 – 16:35 Utilidad de un marcador molecular para la trazabilidad de productos derivados de *Micromesistius australis*.

Ricardo Galleguillos, Universidad de Concepción.

16:35 – 17:05 Evaluación de posibles diferencias intra-específicas en la composición de la fauna parasitaria de *M. australis*.

Mario George-Nacimiento, Universidad Católica de la Santísima Concepción.

17:05 – 17:30 Parámetros clave de la historia de vida.

Rubén Roa, Universidad de Concepción

17:30 – 17:50 Morfometría y composición microquímica de otolitos

Edwin Niklitschek, Universidad Austral de Chile.

17:50 – 18:30 Conclusiones y discusión con panelistas y asistentes.

18:30 Cierre

Figura 21: Programa del taller de difusión de resultados del proyecto FIP 2006-15

ANEXO II: PERSONAL PARTICIPANTE POR OBJETIVO ESPECÍFICO DEL PROYECTO.

Objetivo 1: Realizar una revisión bibliográfica de las metodologías más robustas para la identificación de unidades poblacionales (e.g. ADN, electroforesis de isoenzimas en gel de almidón, índices merísticos y/o estudios de parásitos, entre otros).

Nombre	Rol en el proyecto	Institución
Ximena Valenzuela	Revisión bibliográfica de metodologías para identificación de unidades poblacionales	Universidad Austral de Chile
Edwin Niklitschek	Elaboración de informe	Universidad Austral de Chile

Objetivo 2: Establecer un diseño experimental (temporal y geográficamente adecuado) que permita identificar la(s) unidad(es) poblacional(es) de la especie.

Nombre	Rol en el proyecto	Institución
Edwin Niklitschek	Análisis estadístico. Preparación y edición de informes	Universidad Austral de Chile
Rubén Roa	Análisis estadístico y preparación de informe	Universidad de Concepción

Objetivo 3: Identificar unidad(es) poblacional(es) en merluza de tres aletas (*Micromesistius australis*) y su respectiva área de distribución geográfica.

Nombre	Rol en el proyecto	Institución
Ricardo Galleguillos	Supervisión general y asesoría experta	Universidad de Concepción
Cristian Canales-Aguirre	Análisis de laboratorio preparación de informes.	Universidad de Concepción
Sandra Ferrada	Análisis de laboratorio y estadístico, preparación de informes.	Universidad de Concepción
Sofía Astete	Análisis de laboratorio genético	Universidad de Concepción
Ariel Pacheco	Análisis de imágenes de otolitos.	Universidad de Concepción
Eduardo Hernández	Coordinación muestreo biológico, lectura de edad, manejo de base de datos, preparación de informes.	Universidad Austral de Chile
Francesca Barattini	Preparación de otolitos, lectura de edad.	Universidad Austral de Chile
Edwin Niklitschek	Análisis estadístico y preparación y edición de informes	Universidad Austral de Chile

Rubén Roa	Análisis estadístico integrado.	Universidad de Concepción
Mario George-Nacimiento	Responsable científico, supervisión laboratorio, análisis de datos y resultados	Universidad Católica de la Santísima Concepción
Karen González	Análisis de laboratorio parásitos.	Universidad Católica de la Santísima Concepción
Alejandra Lafon	Coordinación muestreo biológico.	Universidad Austral de Chile
Pamela Toledo	Lectura de edad. Preparación y edición de informes.	Universidad Austral de Chile

Sobreoferta: Desarrollo de un marcador molecular para la trazabilidad de productos derivados de *Micromesistius australis*.

Nombre	Rol en el proyecto	Institución
Ricardo Galleguillos	Supervisión general y asesoría experta	Universidad de Concepción
Cristian Canales-Aguirre	Análisis de laboratorio, preparación de informes.	Universidad de Concepción
Sandra Ferrada	Análisis de laboratorio, preparación de informes.	Universidad de Concepción
Sofía Astete	Análisis de laboratorio genético	Universidad de Concepción