

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRAFICAS
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA**



INFORME FINAL

**PROYECTO DEL FONDO DE INVESTIGACION PESQUERA
Nº 99-12**

“UNIDADES POBLACIONALES DE PEZ ESPADA”

**DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCION**

Participantes:

**Ricardo Galleguillos G.
Rolando Montoya
Lilian Troncoso G.**

CONCEPCION, JULIO DEL 2001.

ÍNDICE GENERAL

ANTECEDENTES.....	1-3
OBJETIVOS.....	3
➤ ANÁLISIS DE MARCADORES ALOENZIMÁTICOS.....	4-5
➤ ANÁLISIS DE MARCADORES MOLECULARES.....	6-11
DISCUSION.....	12-13
CONCLUSIONES.....	14
BIBLIOGRAFÍA.....	15

ÍNDICE TABLAS

TABLA 1. Sistemas enzimáticos obtenidos para <i>Xiphias gladius</i> .	16
TABLA 2. Frecuencias alélicas de cinco loci enzimáticos en <i>X. gladius</i> .	17
TABLA 3. Número de haplotipos de <i>X. gladius</i> obtenidos para cuatro endonucleasas.	18
TABLA 4. Haplotipos combinados de <i>X. gladius</i> por localidad analizada.	19

ÍNDICE FIGURAS

FIGURA 1. Patrones electroforéticos de los loci PGI-2 y GLIO-1 en <i>X. gladius</i> .	20
FIGURA 2. Región d-loop amplificada y digerida con la enzima Alu I.	21
FIGURA 3. Región d-loop amplificada y digerida con la enzima Rsa I.	21
FIGURA 4. Región d-loop amplificada y digerida con la enzima Taq ^α I.	22
FIGURA 5. Región d-loop amplificada y digerida con la enzima Alu I y Hha I.	22
FIGURA 6a. Gráfico de las frecuencias de haplotipos para la enzima Alu I	23
FIGURA 6b. Gráfico de las frecuencias de haplotipos para la enzima Rsa I.	24
FIGURA 7. Gráfico de las frecuencias de haplotipos compuestos para las diferentes regiones analizadas.	25
FIGURA 8. Amplificación del gen nuclear Calmodulina en <i>X. gladius</i> de Chile, Ecuador y México.	26
FIGURA 9. Amplificación del gen nuclear Calmodulina, tomada de Chow & Takeyama (2000).	26

ANTECEDENTES

La albacora *Xiphias gladius*, por su historia de vida y gran vagilidad sugiere un alto grado de flujo génico y escasa subdivisión genética entre las poblaciones. Esta especie se encuentra distribuida mundialmente en mares tropicales, subtropicales y templados. Logra alcanzar los 540 Kg y pueden vivir más o menos hasta los 29 años. Desde el punto de vista pesquero, el promedio anual de captura muestra tres regiones de abundancia; el Pacífico noroeste, el suroeste y una tercera área en el Pacífico sureste.

En estudios de análisis de captura mensual por unidad de esfuerzo se observa que la abundancia del pez espada se extiende en forma continua desde el oeste del Pacífico Norte hacia el Este durante el otoño e invierno y que durante el verano la pesquería del norte se restringe al Pacífico Oeste.

Las capturas en el Pacífico Este son marcadamente continuas a través del Ecuador, este tipo de información ha permitido establecer para algunos autores la existencia de 2 a 3 poblaciones que se traslaparían en el Pacífico Este.

A pesar de soportar amplios rangos de temperatura, el pez espada se encuentra generalmente asociado a temperaturas de aguas superficiales entre 18°C y 30°C. Por lo general son animales solitarios y altamente migratorios, ocurriendo su primer desove alrededor de los cinco años de edad. Desde el punto de vista de la estacionalidad larval y su abundancia esto es muy evidente en el Pacífico Norte y Sur lo que sugiere la posibilidad de una subdivisión poblacional.

El análisis poblacional de esta especie se ha basado principalmente en la determinación de stock asociados a los diferentes océanos del mundo. Las técnicas moleculares basadas en la variabilidad aloenzimática, del ADN mitocondrial y de genes nucleares están siendo aplicadas exitosamente en la determinación de unidades poblacionales en esta especie (Grijalva-Chon et al 1994, 1996; Alvarado-Bremer et al. 1995; Rosel & Block 1996; Chow 1999; Chow & Takeyama 2000).

Antecedentes genéticos

La determinación de subpoblaciones de la albacora utilizando proteínas como marcadores genéticos ha sido evidenciada por Grijalva-Chon *et al.* (1996), ellos estimaron la variabilidad aloenzimática de

esta especie, comparando muestras provenientes de Baja California y de la Islas de Hawai. Utilizaron cuatro sistemas variables (Fosfoglucoisomerasa, Octanol deshidrogenasa y Proteínas totales 2 y 3), encontrando diferencias significativas para las frecuencias alélicas entre muestras en el locus PROT3. Las albacoras del pacífico tienen una baja heterocigosidad (0,020) comparadas con 0,055 para el resto de peces marinos.

Estudios realizados utilizando la frecuencia de distribución de haplotipos del ADN mitocondrial han mostrado diferencias significativas entre muestras de *X. gladius* provenientes del Mediterráneo, Atlántico y Pacífico (Rosel & Block 1995, Alvarado-Bremer *et al* 1996, Chow *et al* 1997), lo que estaría indicando que las poblaciones de albacora se estructuran a una escala global ya que las estimaciones de intercambio genético entre poblaciones de una misma cuenca presentan un alto grado de panmixia. Por otra parte, Grijalva-Chon *et al* 1994, Rosel & Block 1996 y Chow *et al* 1997, han encontrado homogeneidad en la frecuencia de haplotipos entre los océanos Indico y Pacífico, pero se han detectado diferencias significativas entre muestras del norte del Atlántico y el sur (Alvarado-Bremer *et al* 1996, Chow *et al* 1997).

Los resultados obtenidos usando el análisis de RFLP de ADNmt en muestras de *X. gladius* del lado occidental, central y oriental del Pacífico norte, sugieren que existe un alto flujo génico que previene la diferenciación poblacional, por lo que las albacoras del Pacífico norte representarían un stock único (Grijalva-Chon 1994; Chow 1999).

En un reciente estudio Reeb *et al.* (2000), secuenciaron las bases de la región control de la región d-loop del ADNmt de ejemplares provenientes del Océano Pacífico Norte y Sur. Los autores rechazan la hipótesis de que las poblaciones sean homogéneas en el Pacífico, las poblaciones sur y norte del Pacífico Oeste divergen de manera significativa, mientras que las del Pacífico Este parecen ser genéticamente continuas. Las muestras obtenidas en el Pacífico, corresponden a Australia, Japón, Hawai, México, Chile, California del Sur y el Centro Ecuatorial. Se encontró diferencias altamente significativas entre muestras del Pacífico Oeste Norte y Sur, donde las muestras de Japón y Hawai, son diferentes a las de Australia y el centro ecuatorial. Los autores consideran finalmente que en términos de manejo pesquero se debería considerar al menos, la existencia de dos stock en el Pacífico, uno sur y otro norte, donde migran a través de las zonas costeras de varias naciones y tienen además presencia en aguas internacionales.

Antecedentes entregados por Chow & Takeyama (2000) usando el gen nuclear de la Calmodulina (CaM) y la región d-loop del ADN mt detectado por el análisis de RFLP y secuencia de nucleótidos para muestras de albacora del Mediterráneo, Atlántico y del Indo pacífico, señalan diferencias significativas en las frecuencias alélicas para el gen nuclear entre las albacoras del Mediterráneo y del Atlántico Noroeste respecto de las del Atlántico tropical y el Indo pacífico. Un análisis combinado del gen CaM y el d-loop indican que existen a lo menos 4 unidades reproductivas: Mediterráneo, Atlántico Noroeste, Tropical y Atlántico Sur e Indo pacífico.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar unidades poblacionales de pez espada *Xiphias gladius* en el Océano Pacífico mediante estudios de ADN mitocondrial y electroforesis de isoenzimas en gel de almidón.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Seleccionar la zona del ADN mitocondrial y de los loci que codifican las proteínas o enzimas polimórficas, que se utilizarán en la diferenciación de las unidades poblacionales.
2. Establecer las frecuencias alélicas de los marcadores genéticos protéínicos polimórficos en las muestras de *X. gladius* provenientes de las costas de Chile y de otras regiones del Pacífico.
3. Establecer las frecuencias de haplotipos obtenidos del segmento del ADN mitocondrial en muestras de *X. gladius* provenientes de diferentes regiones del Océano Pacífico.
4. Establecer las frecuencias alélicas de un gen nuclear en muestras de *X. gladius* de diferentes regiones del Océano Pacífico.
5. Comparar las frecuencias de los polimorfismos entre las muestras de pez espada de diferentes regiones del Pacífico.

I. ANALISIS DE PROTEINAS

Materiales y métodos

De acuerdo con la estandarización de los sistemas enzimáticos, se utilizó tejido muscular y del corazón para el análisis electroforético de proteínas. Los tejidos fueron macerados con 20 µl de agua destilada y el sobrenadante fue absorbido con papel filtro e insertado en una matriz de almidón al 12%. La separación de las proteínas se realizó aplicando 50 mal por 5h. y se tiñó específicamente para los sistemas enzimáticos Fosfoglucomutasa (*PGM*), Glioxalasa (*GLIO*), Aspartato aminotransferasa (*AAT*), Fosfoglucoisomerasa (*PGI*) e Isocitrato deshidrogenasa (*IDH*).

Las muestras de *Xiphias gladius* analizadas electroforéticamente corresponden a las siguientes:

- A (37°35'S-38°25'S; 73°59'W-75°15'W) cuadra de Lebu
- B (28°54'S-29°49'S; 80°58'W-81°26'W) cuadra de Atacama
- C (25°04'S-27°15'S; 78°17'W-82°04'W) cuadra de Antofagasta
- D (25°14'S-27°41'S; 77°42'W-81°03'W) cuadra de Antofagasta
- E (34°33'S-35°44'S; 79°26'W-82°31'W) cuadra de Juan Fernández
- F (34°55'S-35°44'S; 79°26'W-82°00'W) cuadra de Juan Fernández

El análisis genético poblacional se realizó utilizando el programa computacional BIOSYS 1.7 (Swofford & Selander, 1989).

RESULTADOS

Para la estandarización de los marcadores proteínicos de *Xiphias gladius*, se utilizaron muestras de tejidos de músculo, hígado y corazón. La tabla 1 contiene el listado de los sistemas enzimáticos estandarizados con su respectivo código internacional, número de loci, tejido y tampón en el cual se obtuvo la mejor resolución.

Se obtuvo un total de 16 sistemas proteínicos con 26 presuntos loci. De éstos, 21 resultaron monomórficos y 5 polimórficos; PGM-1, GLIO, AAT-2, PGI-2 e IDH-2, lo cual entrega un porcentaje de polimorfismo de 19,2%.

En el locus Fosfoglucomutasa (PGM-1) se observó un total de cuatro alelos, denominados 120, 110, 100 y 80; el locus PGI-2 presenta 3 alelos (100, 90 y 80), al igual que los loci AAT-1 e IDH-2 con los alelos 120, 100, 80 cada uno, en el locus Glioxalasa (GLIO-1) se observó dos alelos 100 y 80. La Figura 1 muestra un patrón de bandas electroforéticas obtenidas para los loci PGI-2 y GLIO-1.

Se analizó un total de 301 ejemplares para el locus PGM-1, 320 para el locus GLIO-1, 309 individuos para el locus AAT-2, 294 ejemplares para el locus PGI-2 y 304 ejemplares para el locus IDH-2. La Tabla 2 resume el número de individuos por localidad y las frecuencias de los alelos para cada locus.

El análisis genético poblacional no mostró desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg para ninguna de las poblaciones analizadas. El número promedio de alelos por locus y por población varió entre 2 y 3. Los valores de heterocigosidad por muestra fluctuaron entre $0,082 \pm 0,025$ y $0,151 \pm 0,033$, con un valor promedio de $0,11 \pm 0,027$. La heterocigosidad promedio por locus por individuo para esta especie fue de $0,024 \pm 0,033$.

En el análisis comparativo entre muestras se obtuvo un valor promedio de $F_{st} = 0,018$, no significativo, lo que sugiere que no existen diferencias entre las muestras analizadas. Los valores de identidad genética fluctuaron entre 0,996 y 1, reafirmando la alta homogeneidad genética de frecuencias aloenzimáticas entre las seis muestras analizadas.

II. ANALISIS ADN

Materiales y métodos

Se extrajo ADN de muestras de músculo y/o corazón de *X. gladius*, provenientes del área costera de Chile (V-VIII región), Juan Fernández, Ecuador y Australia por el Pacífico sur y de Hawaii, Baja California (en el informe se clasifica como México) para el Pacífico norte.

Para la extracción de ADN se utilizó el método del SDS, descrito por Grijalva-Chon *et al.* (1994). Se disectó 100 mg de tejido muscular estriado y se homogenizó con 500 µl de tampón STE (10 mM Tris. HCl, pH= 8.0, 10 mM NaCl y 50 mM EDTA). Se agregó 25 µl de SDS 20% y 50 µl de Proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó por toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se retomó el Protocolo del CTAB desde las extracciones orgánicas hasta terminar disolviendo el ADN en 100 µl de TE.

En la amplificación del fragmento D-loop por PCR se utilizaron varias parejas de partidores, siendo la más adecuada CB3R-L y 12SAR-H, cada amplificación se realizó en un volumen de 25 µl que contenía tampón de amplificación (10 mM Tris. HCl, pH= 9.0, 50 mM de KCl y 0.1% de Tritón X-100), 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 1 uM de cada partidor y 1 Unidad de Taq ADN polimerasa (Promega).

Se utilizó un termociclador Perkin Elmer modelo 480 y alternativamente en un Techne modelo Progene. El programa de temperaturas fue de: 1 ciclo de 10 min. a 95 °C, 0.5 min. a 60 °C y 2 min. a 72 °C; seguido de 40 ciclos de 0.5 min. a 95 °C, 0.75 min. a 54 °C y 2 min. a 72 °C y finalmente 1 ciclo de 5 min. a 72 °C. La digestión del fragmento D-loop se realizó con las enzimas de restricción que mostraron polimorfismo : Alu I, Hha I, Rsa I y Taq^α I.

La amplificación del intrón 4-5 del gen de la Calmodulina se realizó utilizando los partidores 4F (5'-CTGACCATGATGGCCAGAAA-3') y 5R (5'-GTTAGCTTCTCCCCCAGGTT-3') y en un volumen de 25 µl que contenía tampón de amplificación (10 mM Tris. HCl, pH= 9.0, 50 mM de KCl y 0.1% de Tritón X-100), 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 1 uM de cada partidor y 1 Unidad de Taq ADN polimerasa (Promega).

El programa de termociclado fue el siguiente: 1 ciclo de 1 min. a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 30 min. a 95 °C, 1 min. a 60 °C y 2 min. a 72 °C, finalizando con 1 ciclo de 10 min. a 72 °C. Para la digestión se hace con 8µl de la mezcla de amplificación más 1µl de tampón NEB 2 y 1µl de Bst UI (10 u) digerido por 3 horas a 37°C.

La visualización de los fragmentos tanto para el gen nuclear como para el d-loop se realizó en un gel de agarosa sumergido al 3%, luego de la tinción con Bromuro de etidio.

Para el análisis genético poblacional se utilizó el programa computacional ARLEQUIN v.2000 (Scheinder, Roessli & Excoffer, 2000). La diversidad genética fue estimada mediante el siguiente algoritmo: $h = (1 - \sum x_i^2) / n(n-1)$, donde x_i es la frecuencia de un haplotipo y n es el tamaño de la muestra.

El análisis de diferenciación de los haplotipos entre las diferentes regiones se realizó utilizando una prueba de probabilidades exactas (Raymond & Rousset, 1995).

RESULTADOS

Para la extracción del ADN se probaron tres métodos que fueron: extracción simple según Gjetvaj et al 1997, el método de extracción del CTAB (Doyle & Doyle, 1987), y finalmente el método de extracción del SDS (Sambrook et al. 1989) citado por Grijalva-Chon et al. (1994). Las mejores amplificaciones se obtuvieron al usar el ADN extraído con el método del SDS, utilizando la pareja de partidores 12 SAR-H/CB3R-L

El fragmento del ADN mitocondrial empleado para realizar el análisis fue el D-loop. Para la elección de las enzimas de restricción que tuvieran sitios de corte en dicho fragmento se probaron 11 enzimas de 4 y 5 pb: BstN I, Dde I, Dpn II, Hae III, Hha I, Hinf I, Mse I, Msp I, Nci I, Rsa I y Taq^α I.

La búsqueda de diversidad genética en la región D-loop mitocondrial de *X. gladius* se realizó probando 6 enzimas de restricción: Alu I, Dde I, Hha I, Nla III, Rsa I y Taq^α I, endonucleasas que han sido descritas por otros autores para la detección de polimorfismos para esta región mitocondrial. El análisis de la variabilidad en este estudio se realizó utilizando las enzimas **Alu I**, **Rsa I**, **Hha I** y **Taq^α I**, basados en el significativo polimorfismo encontrado, con Alu I y Hha I se detectaron 4 haplotipos diferentes y para Rsa I se observó 7 haplotipos. Estas enzimas han sido utilizadas por otros autores como indicadores de diferenciación entre muestras de pez espada de diferentes cuencas oceánicas como el Mediterráneo, Atlántico e Indico.

En la presente investigación se analizó un total de 200 ejemplares con la enzima **Alu I**, 198 con **Rsa I**, 205 con **Hha I** y 202 con **Taq^α I**. Con la endonucleasa Taq^α I se obtuvo dos haplotipos (A y B), para Alu I y Hha I se obtuvo cuatro (A,B,C y D) y la con mayor polimorfismo fue Rsa I con siete haplotipos (A,B,C,D,E,F y G).

La Figura 2 muestra la región d-loop mitocondrial amplificada por PCR y digerida con la enzima de restricción **Alu I**, se observan los diferentes haplotipos encontrados. La Figura 3 entrega los diferentes haplotipos encontrados para la enzima **Rsa I**. En la Figura 4 se observan los haplotipos obtenidos para la enzima **Taq^α I** y en la figura 5 se observa una combinación de haplotipos de las enzimas **Alu I** y **Hha I**.

En la tabla 3 se entrega el número de ejemplares por haplotipo para cada enzima y para las zonas de Chile sector costa, Chile sector Juan Fernández, Ecuador, México, Hawaii y Australia.

La enzima **Hha I** presentó 4 haplotipos pero con una baja frecuencia de ellos, el haplotipo B resultó ser el más frecuente para todas las zonas, los valores de diversidad fueron bajos; 4,8 para la zona costera de Chile; 8,1 para el área de Juan Fernández y 25,2 para la muestra del Ecuador.

Para la **Taq^α I** no se observaron diferencias en la frecuencia del haplotipo más común (A), presentando un bajo grado de variabilidad que fluctuó entre 0 y 19,4.

Para la enzima **Alu I** el haplotipo A es el más común y se encuentra similarmente representado en las muestras de las seis zonas, el índice de diversidad (**h**) obtenido fluctúa en un rango de 50 a 67,5 y el valor más bajo está dado para la muestra de Australia (**h**=50). La figura 6a entrega una representación gráfica de la frecuencia de haplotipos para esta enzima, en ella se observa que el haplotipo C está mayormente representado en la muestra de Hawaii y el haplotipo D no se observó en la muestra de Australia.

En la enzima **Rsa I** los haplotipos A y C fueron los más comunes con alternancia entre ellos para algunas regiones. Los valores de diversidad genética fluctuaron entre 57,2 y 72,8 siendo este último valor para la zona de Hawaii. En la muestra de Chile costa se observó el haplotipo G de baja frecuencia, que no está presente en las otras muestras. En la figura 6b se representó gráficamente las frecuencias de los haplotipos más comunes A, B y C, el haplotipo D representa a todos los otros haplotipos presentes en las diferentes muestras. Se observa que el haplotipo B no está presente en la muestra de Chile costa y en la muestra de Australia. La representación del haplotipo D es mayor para la muestra de Hawaii, seguida de Australia.

En la Tabla 4 se entrega la distribución de combinaciones de haplotipos para las cuatro endonucleasas analizadas. La combinación ABCA es la más frecuente para Chile, Ecuador, México y Australia, en cambio para Hawaii la combinación de haplotipos más común es ABDA. En términos de variabilidad, los valores obtenidos fueron muy similares entre las muestras analizadas y no se observaron diferencias significativas entre ellos.

En la Figura 7 se representó gráficamente las combinaciones de haplotipos más comunes para las cuatro enzimas y los haplotipos menos frecuentes se agruparon en la categoría otros. Se observa que la distribución de combinaciones como ABAA y DBAA es similar en las diferentes zonas. Para Chile y Australia no aparece la combinación ABDA, encontrándose altamente representada para Hawaii y en menor grado en Ecuador y México. Por otro lado la combinación ABCA se encontró en mayor porcentaje en cinco zonas, observándose un menor valor para Hawaii.

La muestra de Chile, considerando los ejemplares de la zona costera y los de Juan Fernández, presentó la mayor variabilidad de combinaciones haplotípicas (22) y la menor se observó en la muestra de Australia con seis combinaciones.

En el análisis genético se consideró en un test exacto de diferenciación poblacional, con el cual se obtuvo un valor significativo al considerar la totalidad de las localidades ($p=0,00001$), estimándose de esta manera que las muestras analizadas no corresponden a muestras homogéneas. Para definir que poblaciones mostraban mayores diferencias se consideró el análisis por parejas y se obtuvo valores significativos a un $p = 0,05$ entre las muestras de Chile Costa - Hawaii ($0,0005 \pm 0,008$); Chile Costa - Australia ($0,00001 \pm 0,0000$); Mexico - Australia ($0,029 \pm 0,0041$) Hawaii - Australia ($0,015 \pm 0,0046$).

En la aplicación del F_{st} para la combinación por parejas de poblaciones, se obtuvo valores significativos entre Chile Costa - Australia ($0,054 p<0,01$), Chile - Hawaii ($0,07p< 0,01$), Hawaii-Ecuador ($0,034 p<0,05$) y Hawaii - Australia ($0,054 p<0,05$).

El análisis comparativo general muestra una tendencia a agrupar las muestras de Chile Costa, Chile Juan Fernández, Ecuador y México. Las muestras de Hawaii y Australia son las que se diferencian significativamente del resto y también lo hacen entre sí.

En el estudio de la variabilidad del gen nuclear de la calmodulina (Objetivo específico 4). De acuerdo a lo planteado por Chow & Takeyama (2000), la secuencia de nucleótidos descrita para este gen, se correspondería con la existencia de dos alelos A y B para las poblaciones del pez espada a nivel mundial.

En nuestra investigación el análisis de las muestras para este gen consideró, 61 ejemplares de la zona costera de Chile, 18 de Juan Fernández, 26 de Ecuador, 24 de México, 33 de Hawaii y 33 de Australia. Los patrones de bandas obtenidos, corresponden a homocigotos del alelo A (Figura 8) para todas las poblaciones analizadas, no se observaron ejemplares heterocigotos. Este resultado indica una alta homogeneidad para el Pacífico y no nos permite realizar una diferenciación dentro de esta cuenca.

La figura 9 muestra un patrón de bandas obtenidos por Chow & Takeyama para el gen CaM en muestras de pez espada de diferentes regiones en la que se observan ejemplares homocigotos y heterocigotos de los alelos A y B.

DISCUSIÓN

En la presente investigación, la información obtenida en el análisis poblacional de los polimorfismos aloenzimáticos nos señalan que la especie *X. gladius*, presenta bajos niveles de variabilidad genética, (0,024) en contraste con un valor de variabilidad cercano a 0,06 que presentan, en general, los peces marinos.

La comparación de las frecuencias alélicas para los marcadores proteínicos entre muestras de la costa de Chile y de Juan Fernández para los diferentes loci analizados no mostraron diferencias significativas como para considerar una diferenciación poblacional.

En el informe de avance se planteó la alternativa de reemplazar los marcadores proteínicos por el análisis del gen nuclear de la calmodulina (CaM) ya que este marcador ha sido recientemente utilizado para caracterizar y separar ejemplares de *Xiphias gladius* provenientes del Pacífico, Atlántico Sur y Norte. Los resultados obtenidos en nuestra investigación para la CaM mostraron un genotipo único para las muestras de Chile, Ecuador, México, Hawaii y Australia, lo que estaría indicando una alta homogeneidad genética en el Pacífico. Esto es coincidente con los antecedentes entregados por Chow & Takeyama (2000) para muestras del Pacífico (Perú y Japón), en las que los ejemplares analizados fueron asignados como homocigotos del alelo A.

El análisis poblacional mostró, en la zona del d-loop del ADN mitocondrial, que la variación de la diversidad genética intrapoblacional es muy similar entre las muestras. Al mismo tiempo se observa que las muestras más extremas, Hawaii y Australia presentan diferencias genéticas importantes con el resto de las muestras analizadas, Chile, Ecuador y México.

Considerando los antecedentes entregados por las investigaciones genéticas realizadas por varios autores en el pez espada, estos indican que esta especie se encuentra estructurada genéticamente, y proponen la existencia de al menos cuatro grandes stocks; un grupo Mediterráneo, otro grupo Atlántico Norte, el grupo Sur Atlántico, y el grupo Indo Pacífico. Sin embargo, ha sido bastante difícil demostrar la estructura poblacional de la especie dentro del Pacífico, debido fundamentalmente a que no es posible agrupar individuos con similares haplotipos para el análisis de frecuencia, si se considera la gran variabilidad que existe en los marcadores genéticos que se han empleado en los diferentes estudios.

Chow et al. (1997), ocupando las mismas técnicas de la presente investigación, concluyen que el grado de diferenciación del pez espada en el Pacífico es muy bajo, lo que contrasta con la estructura poblacional encontrada, por ejemplo, en el Atlántico. Ellos plantean que desde el punto de vista paleontológico, todos los restos fósiles de la familia Xiphiidae han sido encontrados en el Mediterráneo y el Atlántico, lo que sugiere que *X. gladius* se habría originado en esas áreas. De tal manera, que es posible postular que la inmigración al Pacífico del pez espada estaría dada recientemente, durante el Plioceno, tiempo insuficiente para que las moléculas de ADN hayan acumulado suficientes mutaciones que permitan hacer diferenciaciones genéticas significativas entre las poblaciones del Pacífico.

Una de las investigaciones que postula un cierto grado de diferenciación es la de Reeb y colaboradores (2000), quienes sugieren un patrón biogeográfico de estructura poblacional, donde las poblaciones Norte y Sur del Pacífico Oeste parecen diverger. Sin embargo, en el Pacífico Este las poblaciones parecen estar interconectadas a través del Ecuador. Los autores establecen las dificultades de demostrar estadísticamente un cierto patrón de estructura poblacional para el pez espada en la cuenca del Pacífico, pero plantean que desde el punto de vista de la administración pesquera se pueden establecer dos unidades de explotación en el Pacífico, un stock norte y otro sur que convergen en el Ecuador.

Se puede establecer en general que los resultados obtenidos en la presente investigación permiten identificar dentro del Pacífico Este un grupo de poblaciones genéticamente muy similares que corresponden a Chile, Ecuador y México, lo que podría ser extrapolado a ejemplares del pez espada de países como Perú y Colombia. Diferenciándose de las muestras de Hawaii y Australia. Otros autores consideran a Hawaii como parte de las poblaciones del Pacífico Este y Australia es considerada como parte de las poblaciones del Pacífico Sur Oeste.

CONCLUSIONES

La variabilidad genética obtenida a través de marcadores proteínicos indican que *X. gladius* tiene un bajo valor de heterocigosidad promedio por locus ($0,024 \pm 0,033$). Los sistemas enzimáticos que mostraron variabilidad genética fueron: Fosfogluoisomerasa (PGI), Glioxalasa (GLIO), Fosfoglucomutasa (PGM), Isocitrato deshidrogenasa (IDH) y Aspartato aminotransferasa (AAT).

La comparación de las frecuencias alélicas para los marcadores proteínicos entre muestras de la costa de Chile y de Juan Fernández para los diferentes loci analizados no mostraron diferencias significativas.

El gen del ADN nuclear (calmodulina, CaM), mostró un único genotipo (homocigotos AA) en las muestras del Chile, Ecuador, México, Hawaii y Australia.

El fragmento d-loop del ADN mitocondrial fue analizado con cuatro enzimas de restricción, Alu I, Rsa I, Hha I y Taq^α I. Siendo las enzimas Rsa I y Alu I las más polimórficas con 4 y 7 haplotipos respectivamente.

En el análisis comparativo entre muestras se observó una afinidad genética mayor entre las muestras de Chile, Ecuador y México contra las de Hawaii y Australia. Por lo consideramos que las poblaciones que transitan por la zona económica del mar chileno corresponderían a ejemplares que provienen a lo menos de la zona de Baja California, hacia el Sur.

Aún cuando no hemos contado con las muestras de Japón, podemos señalar que los últimos trabajos de investigación, Reeb et al. (2000) consideran a las muestras de esta área como un stock propio del Pacífico Oeste.

BIBLIOGRAFIA

- Alvarado Bremer J, JR Baker, J Mejuto. 1995. Mitochondrial DNA control region sequences indicate extensive mixing of the swordfish (*Xiphias gladius* L) populations in the Atlantic Ocean. *Can J. Fish. Aquat Sciences* 52: 1720-1732.
- Alvarado Bremer J, J Mejuto, TW Greig & B Ely. 1996. Global population structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) as revealed by analysis of the mitochondrial DNA control region. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 197: 295-310.
- Chow S, H Okamoto, Y Uozumi, Y Takeuchi & H Takeyama. 1997. Genetic stock structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) inferred by PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA control region. *Mar. Biol.* 127: 359-367.
- Chow S. 1999. genetic comparison of Pacific and Mediterranean swordfish, *Xiphias gladius*, by RFLP analysis of the mitochondrial D-loop region. NOAA Technical Report NMFS 142: 239-244.
- Chow S, H Takeyama. 2000. Nuclear and mtDNA analyses reveal four genetically separated breeding units of the swordfish. *J Fish Biol.* 56: 1087-1098.
- Grijalva-Chon JM, Numachi H, Sosa-Nishizaki O, de la Rosa-Vélez J. 1994. Mitochondrial DNA analysis of North Pacific swordfish *Xiphias gladius* population structure. *Mar.Ecol.Prog. Ser* 115: 15-19.
- Grijalva-Chon JM, De la Rosa-Vélez and O. Sosa-Nishizaki. 1996. Allozyme variability in two samples of swordfish, *Xiphias gladius* L., in the North Pacific Ocean. *Fishery Bulletin* 94:589-594.
- Raymond m & F Rousset. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- Reeb CA., L Arcangeli, BA Block. 2000. Structure and migration corridors in Pacific populations of the swordfish *Xiphias gladius*, as inferred through analyses of mitochondrial DNA. *Marine Biology* 136: 1123-1131.
- Rosel PE, Block BA. (1996). Mitochondrial control region variability and global population structure in the swordfish, *Xiphias gladius*. *Mar. Biol.* 125: 11-22.

Tabla 1. Sistemas enzimáticos, tampón de corrida y número de loci obtenidos para la albacora (*Xiphias gladius*).

C: corazón; M: músculo; H: hígado
* indica polimorfismo

ENZIMA		E.C. N°	Loci	Tejido	Tampón
Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa	GPD	1.1.1.8	2	C	4
Lactato deshidrogenasa	LDH	1.1.1.27	1	M-C	2
Malato deshidrogenasa	MDH	1.1.1.37	2	M	3
Enzima Malica	ME	1.1.1.40	2	M	2
Isocitrato deshidrogenasa*	IDH	1.1.1.42	1	M	3
Fosfogluconato deshidrogenasa	PGD	1.1.1.44	1	M-C	4
Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	G6PD	1.1.1.49	1	C	2
Octanol deshidrogenasa	ODH	1.1.1.73	1	H	3
Xantino deshidrogenasa	XDH	1.1.1.204	1	H	3
Tetrazolio oxidasa	TO	1.15.1.1	2	M-C	3
Aspartato amino transferasa*	AAT	2.6.1.1	2	M-C	2
Fosfoglucomutasa*	PGM	2.7.5.1	1	M-C	3
Esterasa (naftil acetato)	EST	3.1.1.1	3	M	1
Glioxalasa*	GLIO	4.4.1.5	1	M-C	2
Fosfoglucoisomerasa*	PGI	5.3.1.9	2	M	3
Proteínas Totales	PT		3	M	1

(1): Litio pH 8.0, (2): Borato pH 8.0 (3): Triscitrato pH 8.0 (4): Poulik discontinuo pH 8.2

TABLA 2: Frecuencias alélicas obtenidas en cinco muestras de *Xiphias gladius*

LOCUS	ALELO	A	B	C	D	E	F
PGM-1	(N)	31	16	28	63	64	99
	100	1,000	1,000	0,857	0,913	0,867	0,854
	110	0,000	0,000	0,107	0,071	0,102	0,076
	120	0,000	0,000	0,000	0,016	0,031	0,005
	80	0,000	0,000	0,036	0,000	0,000	0,066
GLIO-1	(N)	36	31	26	62	64	101
	100	1,000	0,919	0,981	0,944	0,938	0,990
	80	0,000	0,081	0,019	0,056	0,063	0,010
AAT-2	(N)	34	28	26	56	65	100
	100	0,944	0,964	1,000	0,985	0,908	0,920
	120	0,028	0,036	0,000	0,009	0,085	0,060
	80	0,028	0,000	0,000	0,009	0,080	0,020
PGI-2	(N)	36	18	25	38	67	110
	100	0,969	0,944	0,900	0,868	0,903	0,909
	90	0,031	0,028	0,080	0,079	0,060	0,059
	80	0,000	0,028	0,020	0,053	0,037	0,032
IDH-2	(N)	31	24	25	56	66	102
	100	0,985	0,958	0,980	0,982	0,977	0,985
	120	0,005	0,042	0,000	0,009	0,000	0,005
	80	0,010	0,000	0,020	0,009	0,023	0,010

TABLA 3: Número de individuos de *X. gladius* por haplotipos para las cuatro enzimas analizadas por localidad, e índice de diversidad genética (h).

	Chile (Zona Costera)		Chile (Isla J. Fernández)		Ecuador		México		Hawaii		Australia	
Alu I	N= 39		N=48		N= 37		N=26		N= 22		N= 28	
A	22	56.41	21	43.8	23	62.2	16	61.5	10	45.5	20	71.43
B	5	12.82	13	27.1	8	21.6	2	7.69	2	9.1	2	7.14
C	4	10.26	12	25	1	12.7	4	15.4	8	36.4	6	21.43
D	8	20.51	2	4.1	5	13.5	4	15.4	2	9.1	0	0
h	62.89		68.53		56.32		59.08		67.53		45.50	
Rsa I	N=41		N= 46		N= 37		N= 24		N= 22		N= 28	
A	10	24.39	24	52.2	14	37.8	12	50	7	31.82	10	35.7
B	0	0	1	2.1	2	5.4	1	4.2	1	4.55	0	0
C	25	60.98	17	36.9	13	35.1	9	37.5	4	18.18	10	35.7
D	0	0	3	6.5	5	13.5	2	8.3	7	31.82	0	0
E	3	7.32	0	0	2	5.4	0	0	1	4.55	8	28.6
F	0	0	1	2.2	1	2.7	0	0	2	9.09	0	0
G	3	7.32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
h	57.19		59.90		72.82		62.68		78.79		68.78	
Hha I	N=42		N=48		N= 37		N=26		N= 24		N= 28	
A	1	2.38	2	4.17	2	5.4	0	0	0	0	0	0
B	41	97.62	46	95.83	32	86.5	24	92.3	24	100	28	100
C	0	0	0	0	1	2.7	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	2	5.4	2	7.7	0	0	0	0
h	4.76		8.12		25.23		14.77		0		0	
Taq I	N=38		N=50		N= 38		N=28		N= 24		N= 28	
A	34	89.47	48	96.0	36	94.7	27	96.4	24	100	28	100
B	4	10.53	2	4.0	2	5.3	1	3.6	0	0	0	0
h	19.35		7.84		10.24		7.14		0		0	

Tabla 4: Distribución de las combinaciones de haplotipos dados para las enzimas Alu I, Hha I, Rsa I y Taq I (de izquierda a derecha), en muestras de *X. gladius*. **n** = número de ejemplares, **H** = Diversidad genotípica.

	Chile <i>Zona costera</i>		Chile <i>J. Fernández</i>		Ecuador		Mexico <i>Baja California</i>		Hawaii		Australia	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
AAAA	0		1	2,2	0		0		0		0	
AAAB	0		1	2,2	1	2,7	0		0		0	
AACB	1	2,6	0		0		0		0		0	
ABAA	1	2,6	5	10,9	4	10,8	5	22,7	1	4,8	4	14,3
ABAB	0		1	2,2	0		0		0		0	
ABBA	0		1	2,2	1	2,7	0		0		0	
ABCA	15	39,5	11	23,9	12	32,4	6	27,3	2	9,5	8	28,6
ABCB	1	2,6	0		0		1	4,6	0		0	
ABDA	0		0		2	5,4	1	4,6	5	23,8	0	0
ABEA	0		0		2	5,4	0		1	4,8	8	28,6
ABFA	0		0		1	2,7	0		1	4,8	0	
ABGA	3	7,9	0		0				0		0	
BADB	0		0		1	2,7	0		0		0	
BBAA	4	10,5	10	21,7	2	5,4	1	4,6	2	9,5	2	7,1
BBBA	0		0		1	2,7	0		0		0	
BBCA	0		2	4,4	0		0		0		0	
BBDA	0		0		2	5,4	0		0		0	
BBEA	1	2,6	0		0		0		0		0	
BBFA	0		1	2,2	0		0		0		0	
BCAA	0		0		1	2,7	0		0		0	
BDAA	0		0		1	2,7	1	4,6	0		0	
CBAA	2	5,3	5	10,9	1	2,7	1	4,6	3	14,3	4	14,3
CBBA	0		0		0		0		1	4,8		
CBCA	1	2,6	4	8,7	0		2	9,1	2	9,5	2	7,1
CBDA	0		2	4,4	0		1	4,6	0		0	
CBCB	1	2,6	0	1,6	0		0		0		0	
CBFA	0		0		0		0		1	4,8	0	
DBAA	3	7,9	1	2,2	3	8,1	2	9,1	1	4,8	0	
DBCA	4	10,5	0		1	2,7	0		0		0	
DBDA	0		1	2,2	0		0		0		0	
DBEA	0		1	2,2	0		0		0		0	
DBEB	1	2,6	0		0		0		0		0	
DBFA	0		0		0		0		1	4,8	0	
DDAA	0		0		1	2,7	1	4,5	0		0	
N	38		46		37		22		21		28	
H		82,4		87,6		88,2		88,3		92,4		81,5

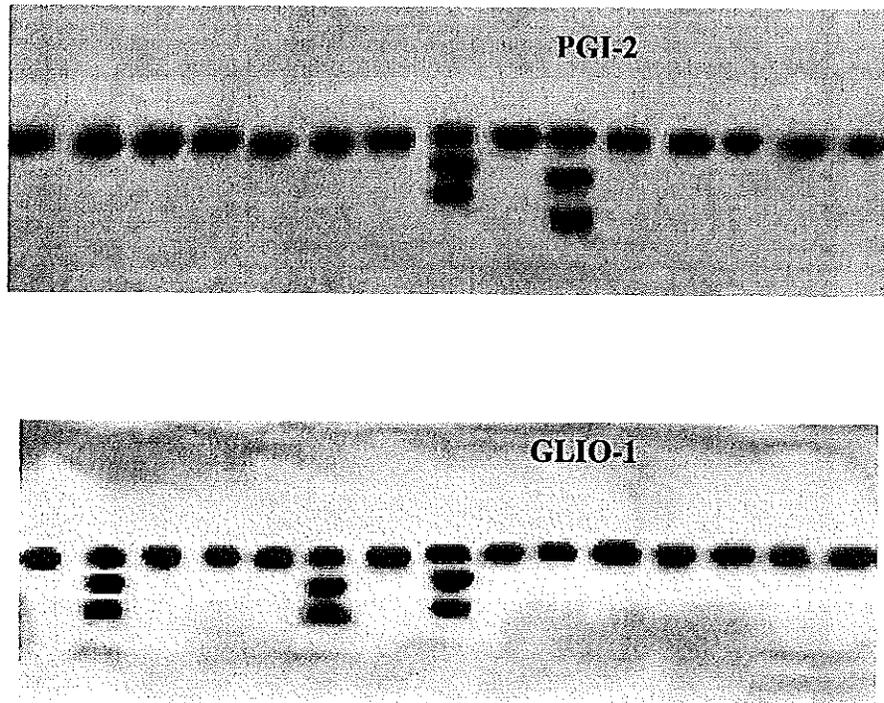


Figura 1: Patrones electroforéticos obtenidos para los locus enzimáticos PGI-2 y GLIO-1 en la especie *Xiphias gladius*,

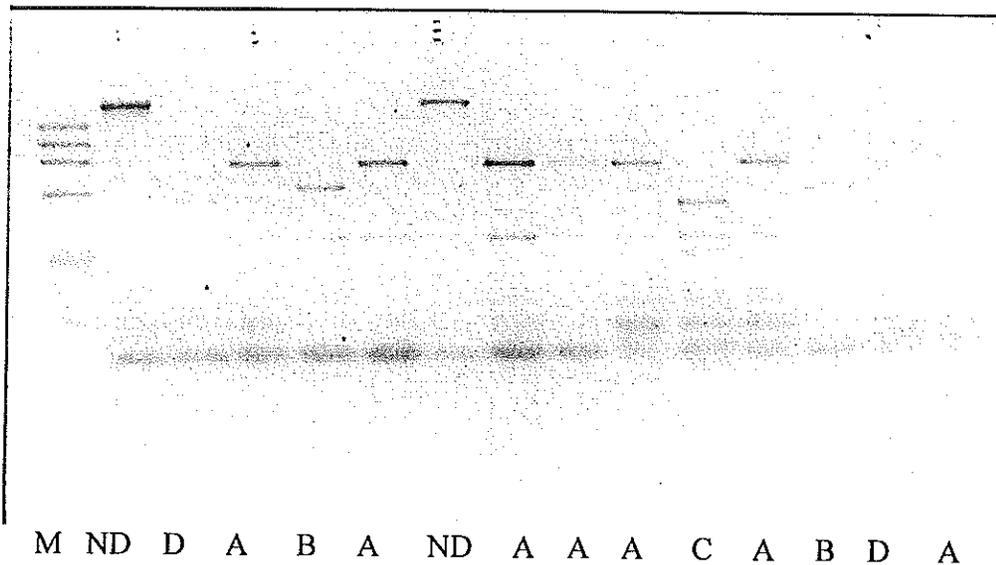


Figura 2: Región D-loop mitocondrial amplificada por PCR desde el ADN mt de *X. gladius* y digerida con la enzima de restricción **Alu I**, Diferentes haplotipos encontrados (A -D), D-loop no digerido (ND), Marcador de tamaño molecular (M),

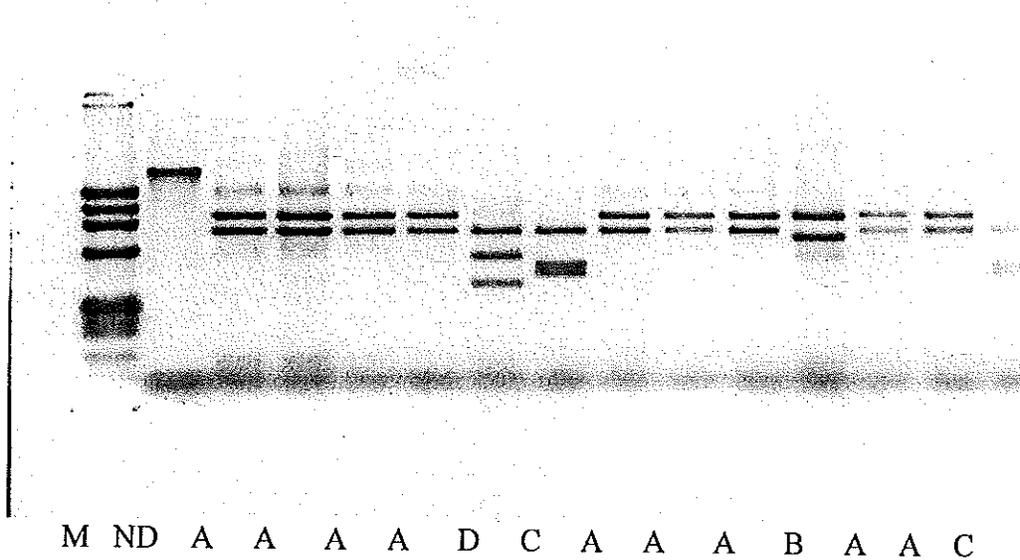


Figura 3: Región D-loop mitocondrial amplificada por PCR desde el ADN mt de *X. gladius* y digerida con la enzima de restricción **Rsa I**, Diferentes haplotipos encontrados (A -D), D-loop no digerido (ND), Marcador de tamaño molecular (M),

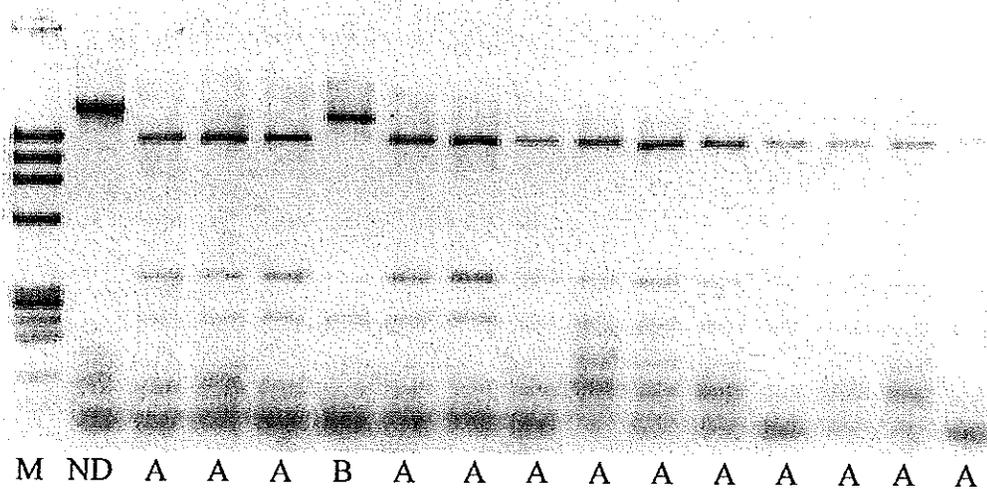


Figura 4: Región D-loop mitocondrial amplificada por PCR desde el ADN mt de *X. gladius* y digerida con la enzima de restricción *Taq*^a I, Diferentes haplotipos encontrados (A - B), D-loop no digerido (ND), Marcador de tamaño molecular (M),

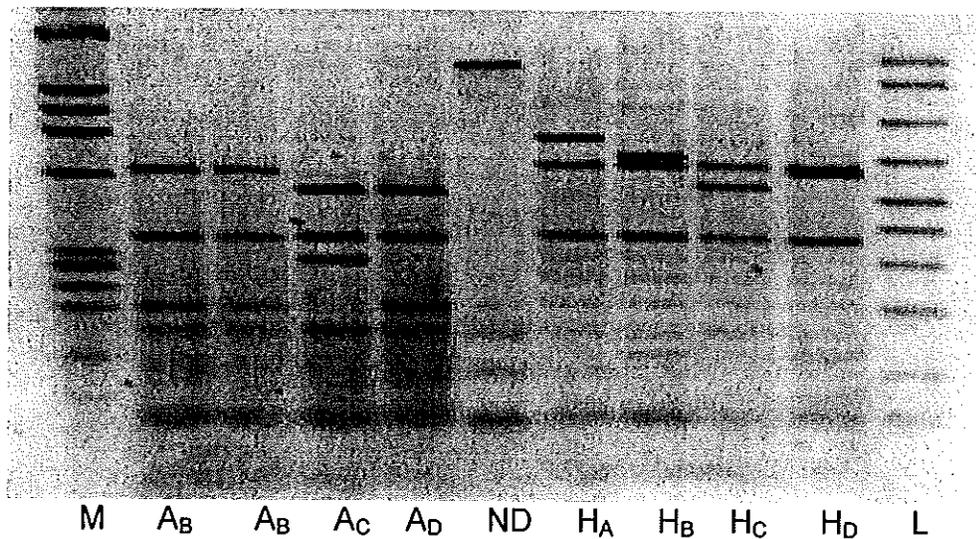


Figura 5: Digestión con las enzimas de restricción *Alu* I (A) y *Hha* I (H) de la región D-loop mitocondrial amplificada por PCR desde el ADN mt de *X. gladius*, D-loop no digerido (ND), Marcadores de tamaño molecular (M y L),

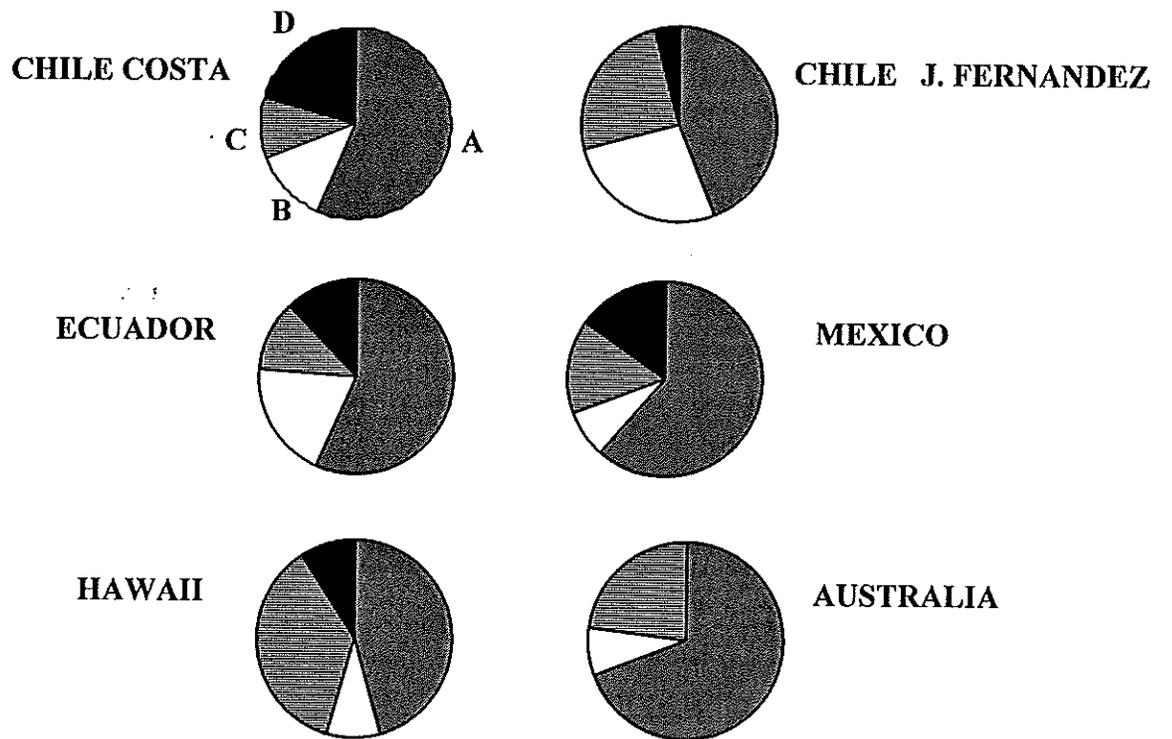


Figura 6a: Representación gráfica de las frecuencias de haplotipos A, B, C y D para la enzima de restricción Alu I

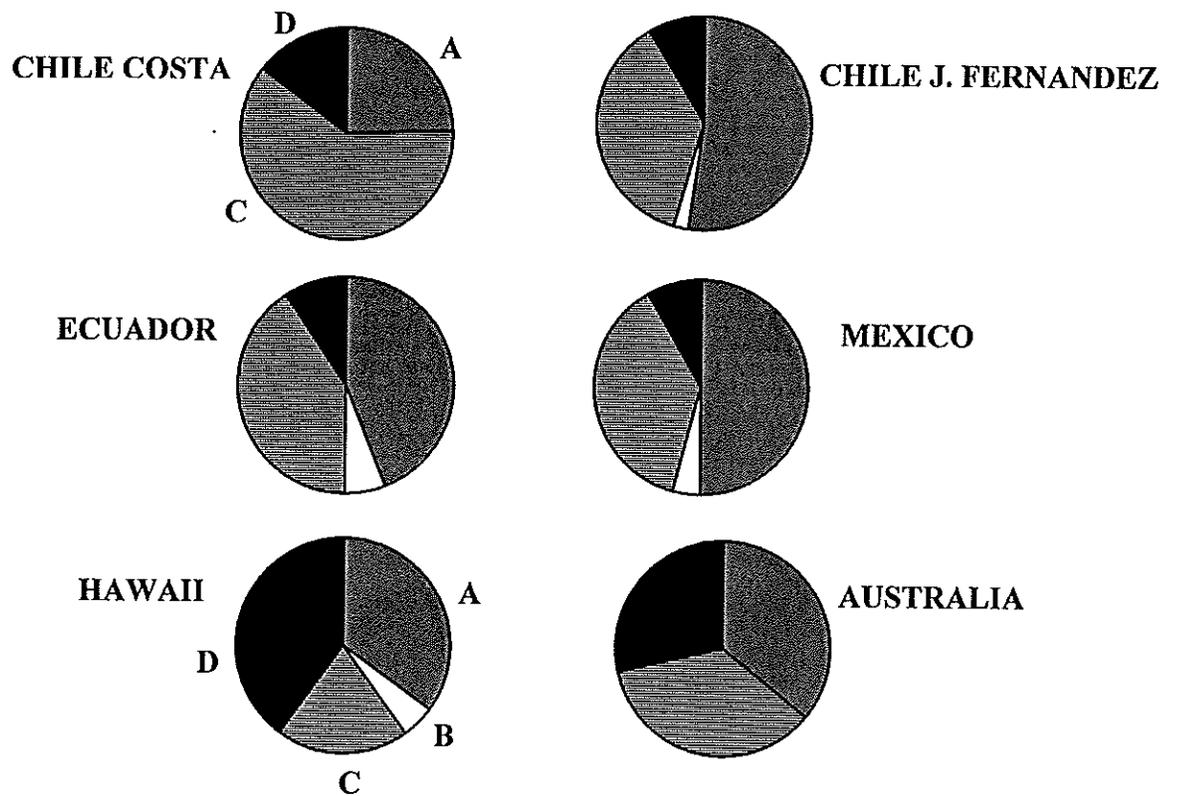
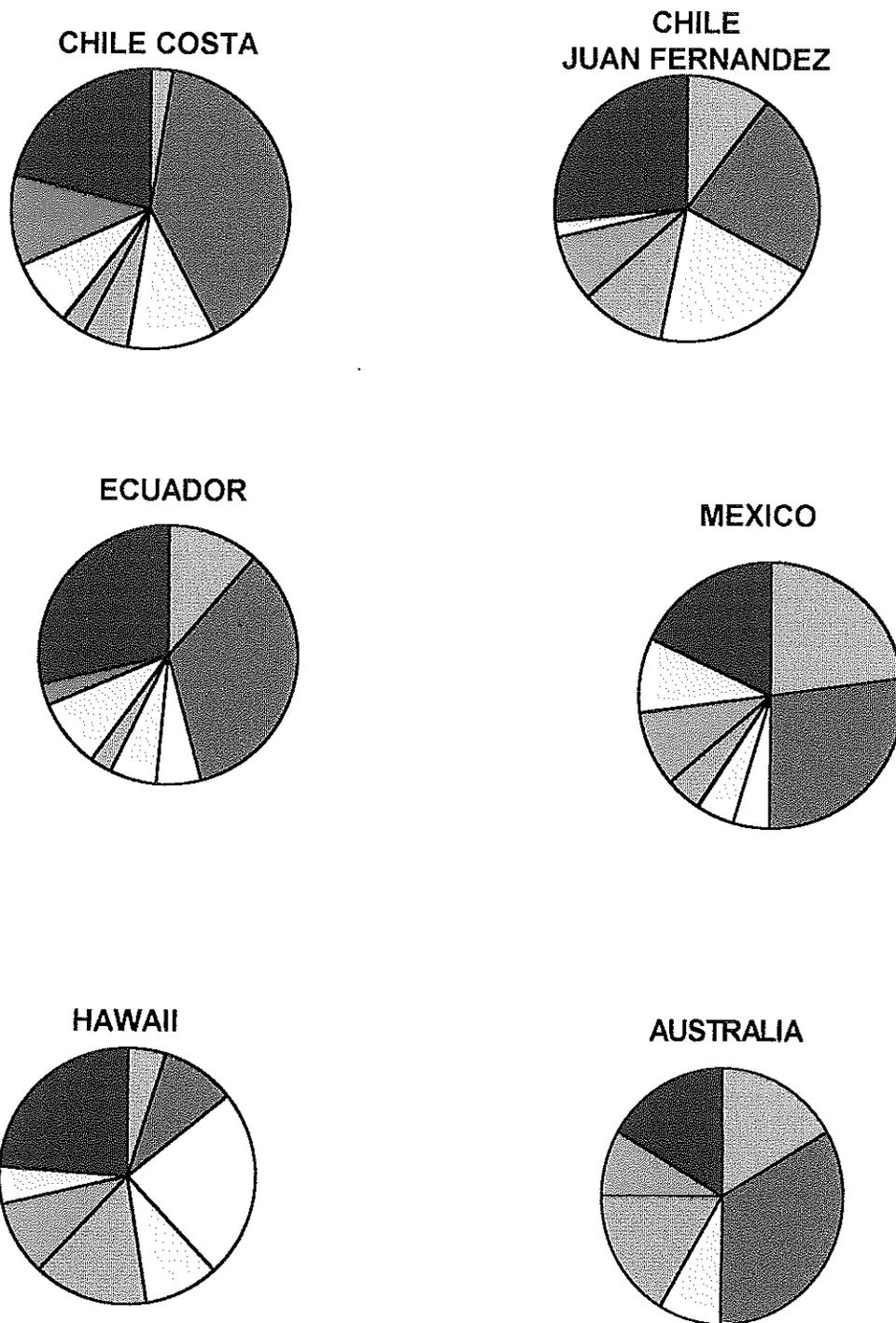


Figura 6b: Representación gráfica de las frecuencias de haplotipos más comunes A, B, C y D (en este último se consideraron todos los demás haplotipos) para la enzima Rsa I.



HAPLOTIPOS:

■ ABAA ■ ABCA □ ABDA □ BBAA ■ CBAA ■ CBCA □ DBAA ■ DBCA ■ Otros

Figura 7: Representación gráfica de la frecuencia de haplotipos compuestos en *X. gladius* para las diferentes Regiones analizadas.

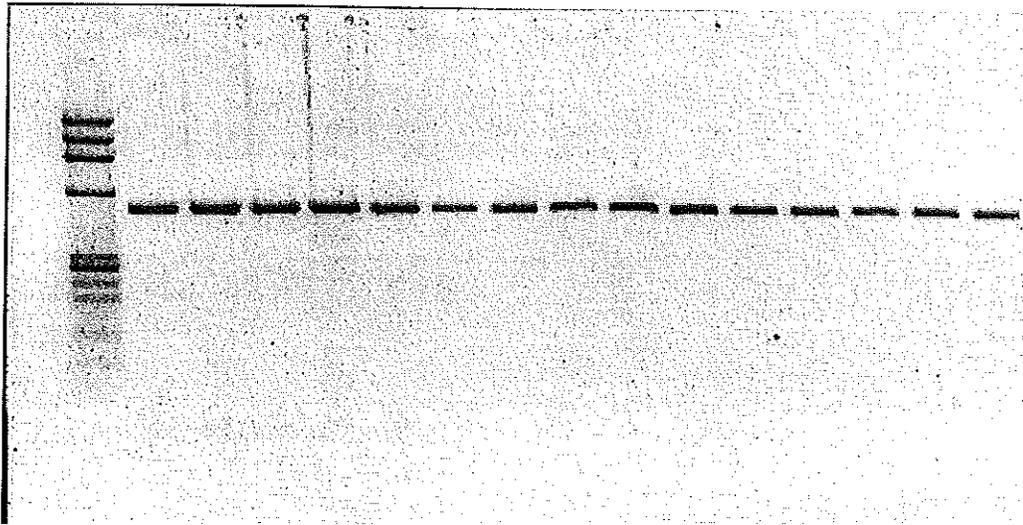


Figura 8 Amplificación por PCR del intrón 4-5 del gen nuclear Calmodulina de ejemplares homocigotos (AA) de *X. gladius* de Chile, Ecuador y México, con posterior digestión con la enzima de restricción Bst UI.

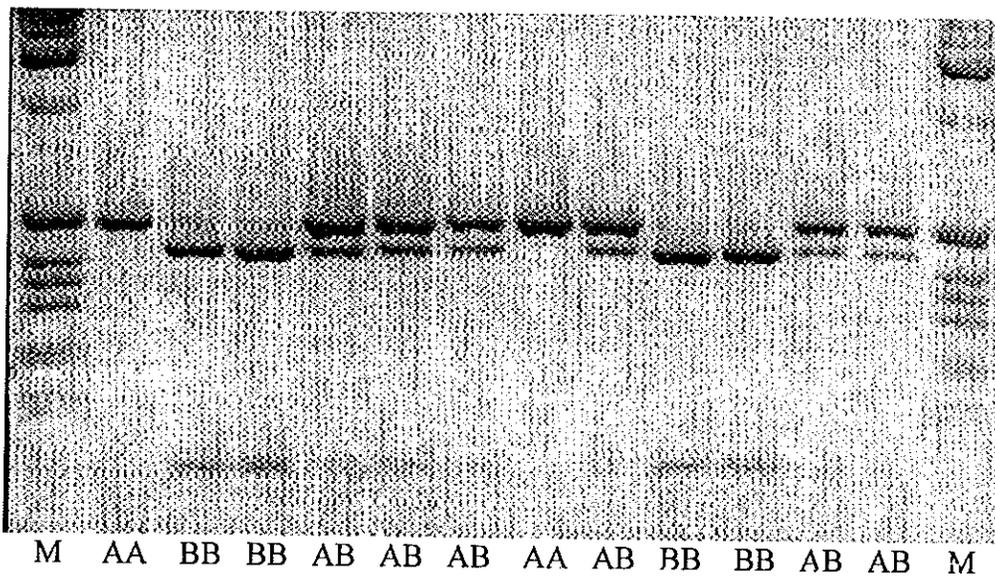


Figura 9: Amplificación por PCR del intrón 4 del gen nuclear Calmodulina de *X. gladius* y posterior digestión con la enzima de restricción Bst UI, Homocigotos (AA y BB), heterocigotos (AB), Marcador de tamaños moleculares (M), Tomada de Chow & Takeyama (2000).