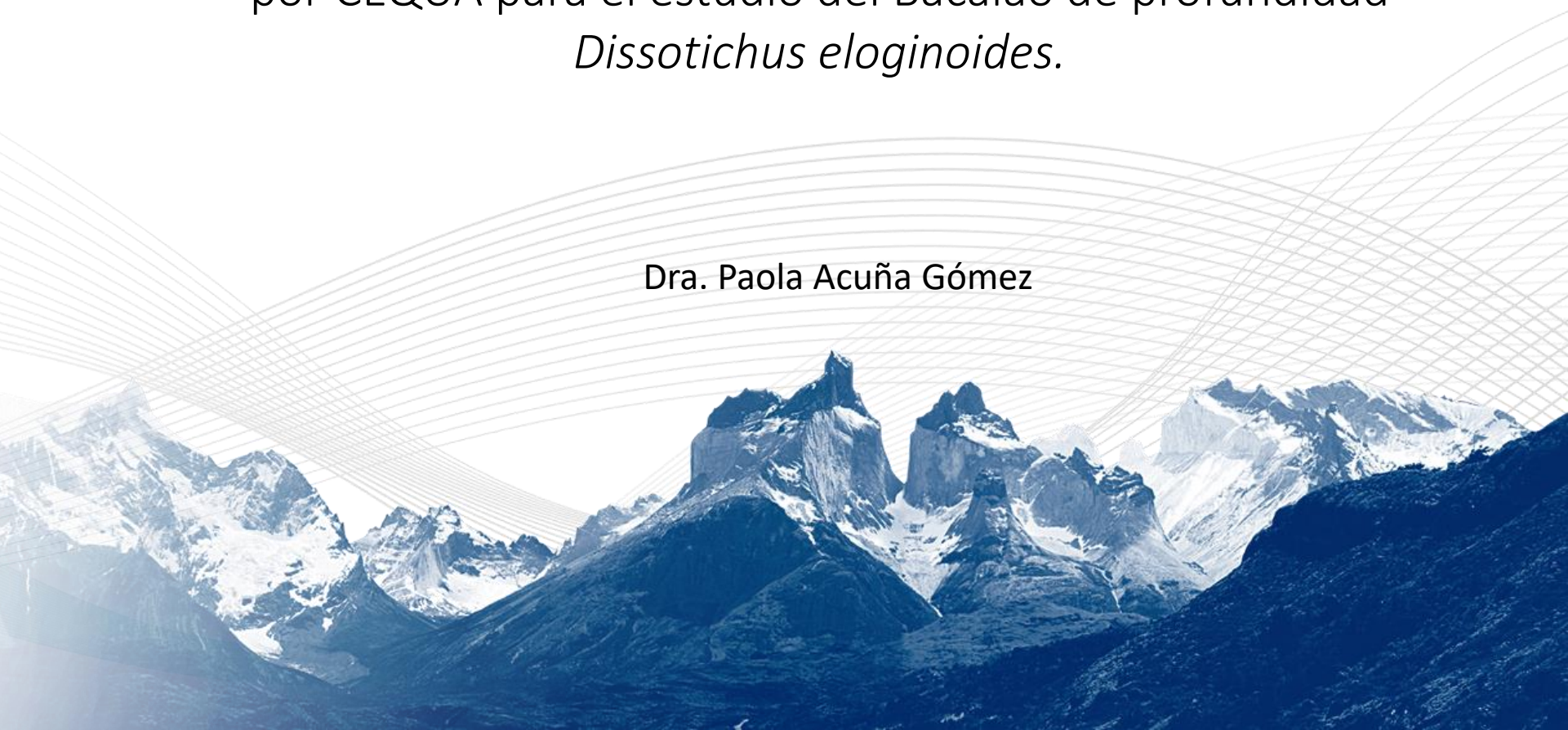


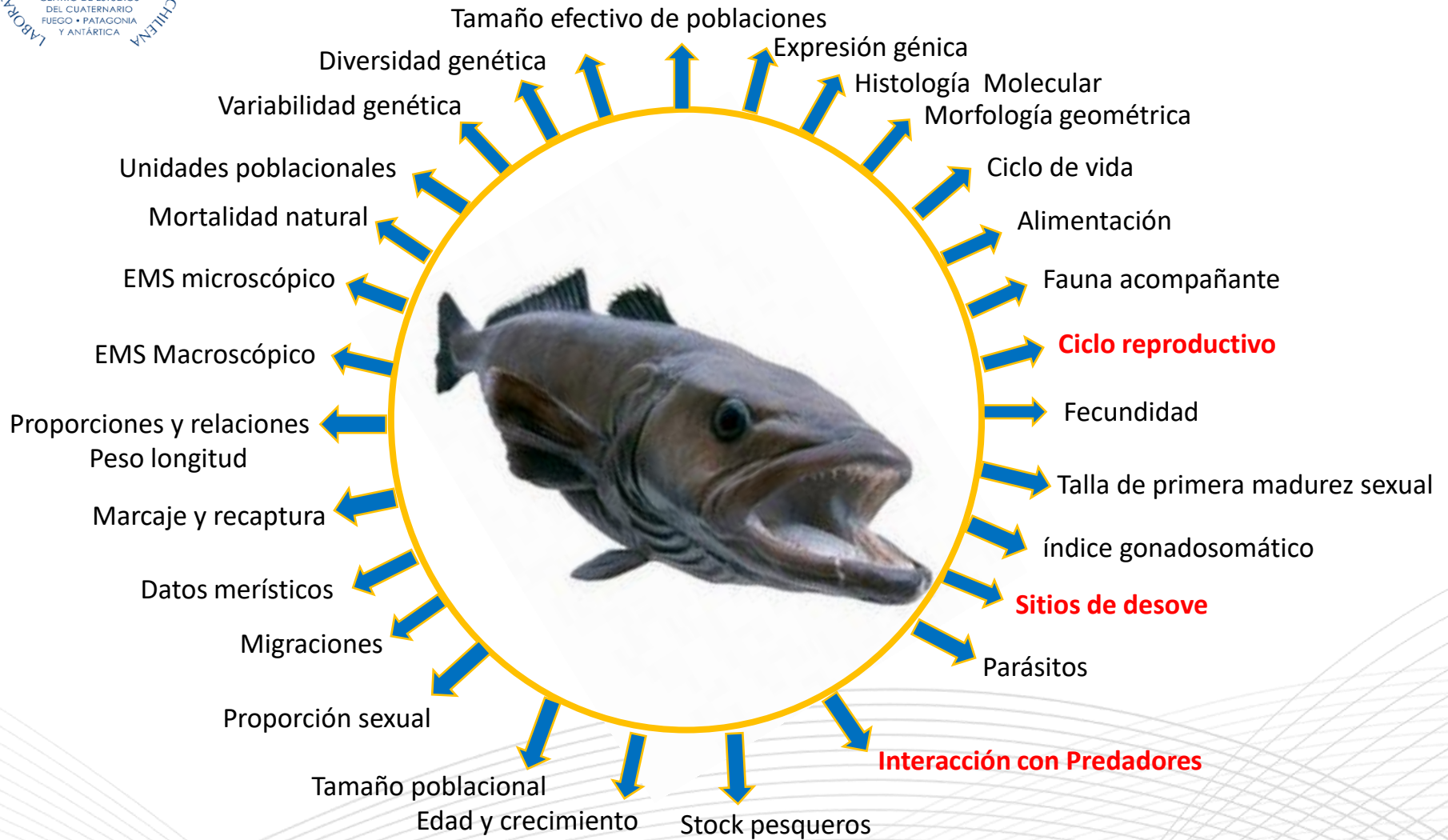


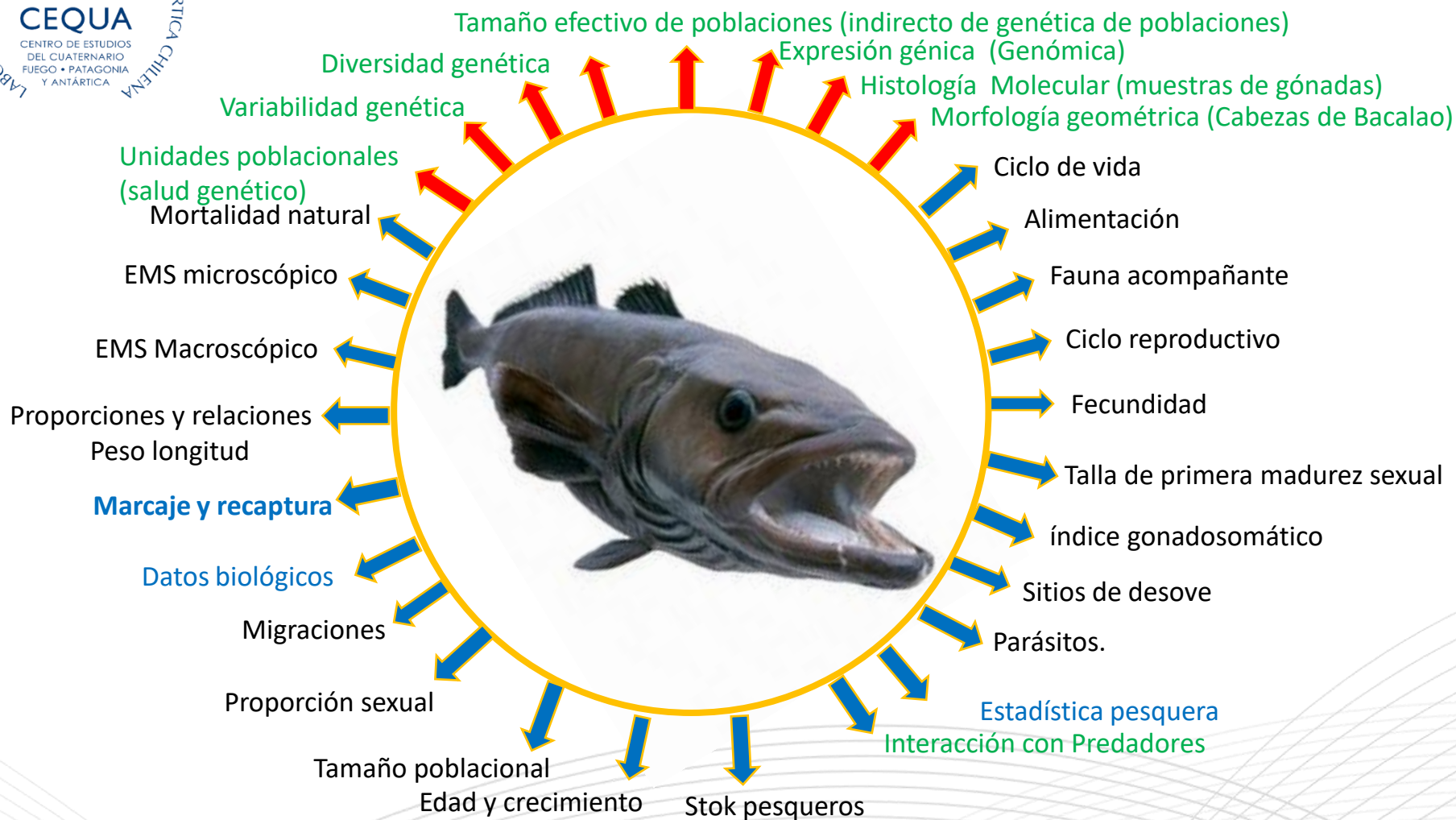
Avances y desafíos en la investigación asociativa propuesta
por CEQUA para el estudio del Bacalao de profundidad
Dissotichus elonginoides.

Dra. Paola Acuña Gómez



Análisis provocador de septiembre de 2015, Primer Seminario de Bacalao.





- 1.- Vinculación con GlobalPesca (inmediata)
- 2.- Vinculación con AOBAC (agosto de 2016)
- 3.- Propuesta de Investigación: Estimación de costos, Fuente de financiamiento, profesionales a cargo de la investigación (2016 en adelante)

Estudios a desarrollar:

- 3^a. Interacción bacalao - Orcas (otros mamíferos)
- 3b. ¿Cómo determinamos stock poblacionales?
Genética y genómica (marcadores moleculares)
- 3c.- Morfología geométrica
- 3d.- Datos históricos de captura biológica y de la pesquería.
- 4.- Retomar el programa de marcaje y recaptura.....

Interacción bacalao - Orcas (otros mamíferos):

- 1.- Material gráfico de los mamíferos marinos asociados a la captura de bacalao.
- 2.- Material que sirvió para elaboración de calendarios con el propósito de familiarización con las especies.
- 3.- Capacitación a la tripulación de los barcos de Global Pesca.
- 4.- Propuesta de fotoidentificación de Orcas a AOBAC...

CREACIÓN Y MANTENCIÓN DE UN CATÁLOGO DE FOTO-IDENTIFICACIÓN DE ORCAS (*ORCINUS ORCA*) PARA LA ASOCIACIÓN GREMIAL DE OPERADORES DE BACALAO DE PROFUNDIDAD DE MAGALLANES (AOBAC)

Preparado por Fundación CEQUA
Departamento de Ecología de Ecosistemas Acuáticos
Laboratorio de Mamíferos Marinos

Foto-Identificación de Orcas (*Orcinus orca*) en zona de pesca de bacalao de profundidad



Iniciado en 2017 como parte del estudio COLTO sobre depredación 2017-2018 en colaboración con:

- Asociación Gremial de Operadores de Bacalao de Profundidad, Punta Arenas, Chile
- **Paul Tixier, School of Life and Environmental Sciences, Deakin University, Australia**
- Jorge Acevedo, Laboratorio de Mamíferos Marinos de Fundación CEQUA, Punta Arenas, Chile
- Observadores a bordo del Instituto de Fomento Pesquero (IFOP), Punta Arenas, Chile



Durante el transcurso de este año se han recibido dos set fotográficos:

-Set Fotográfico 1 (Orcas Tipo A)

Barco: Global Pesca I

N° de fotografías: 624

N° de Individuos fotografiados: 27

N° de individuos con ID: 25

-Set Fotográfico 2 (Orcas Tipo A) *

Barco: Puerto Williams

N° de fotografías: 1.774

N° de Individuos fotografiados: 24

N° de individuos recapturados: 17

N° de individuos nuevos: 7

-Set Fotográfico 2 (Orcas Tipo D) *

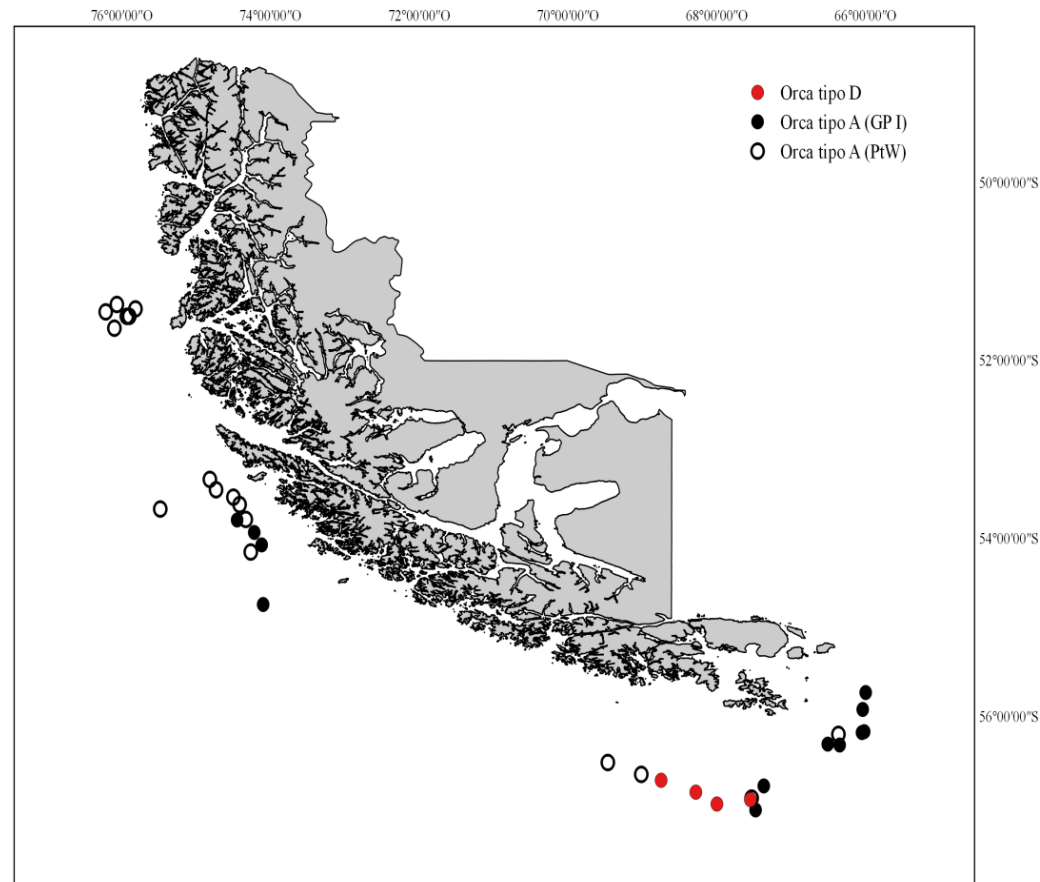
Barco: Puerto Williams

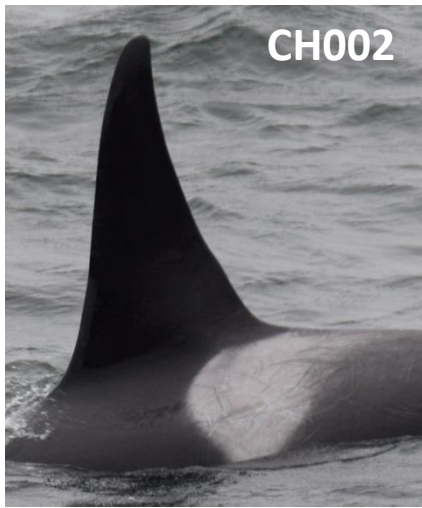
N° de fotografías: 111

N° de Individuos fotografiados: 8

N° de individuos con ID: 7

* Aún en proceso de validación cruzada





Ejemplo de foto-identificación de orcas tipo A.

Orca tipo D.



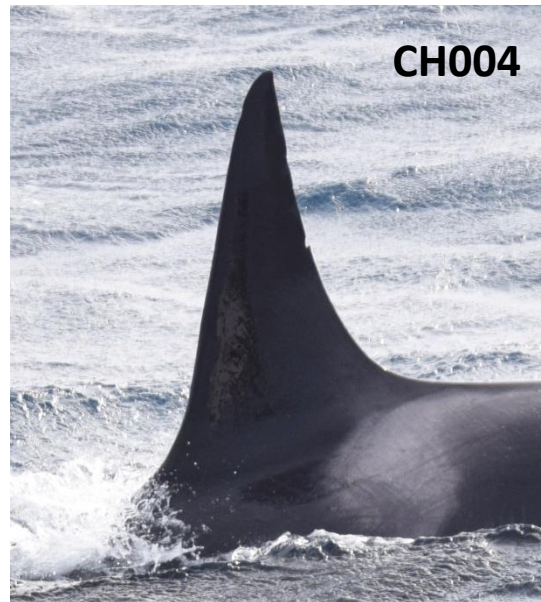
CH001

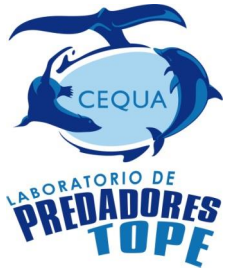


CH002



CH004



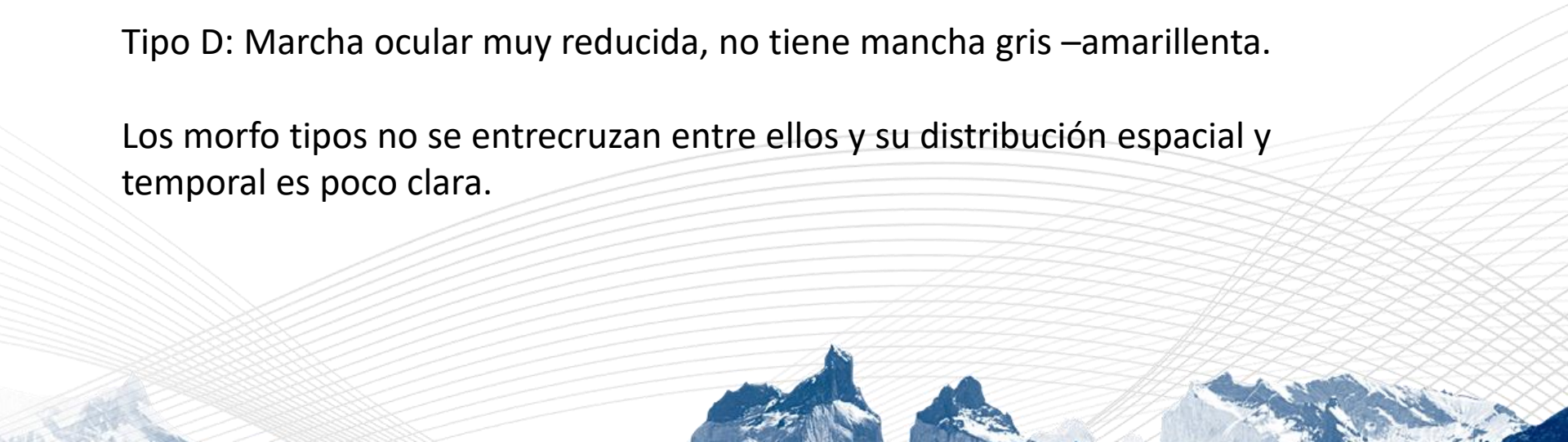


La foto-id, nos permitirá entender la dinámica de las orcas en los mares del sur de Chile. Por ejemplo se esperaba encontrar solo la orca tipo A que interactuando, aparentemente también lo haría el tipo D (al igual sucede en las islas Crozet), pero en un área muy específica.

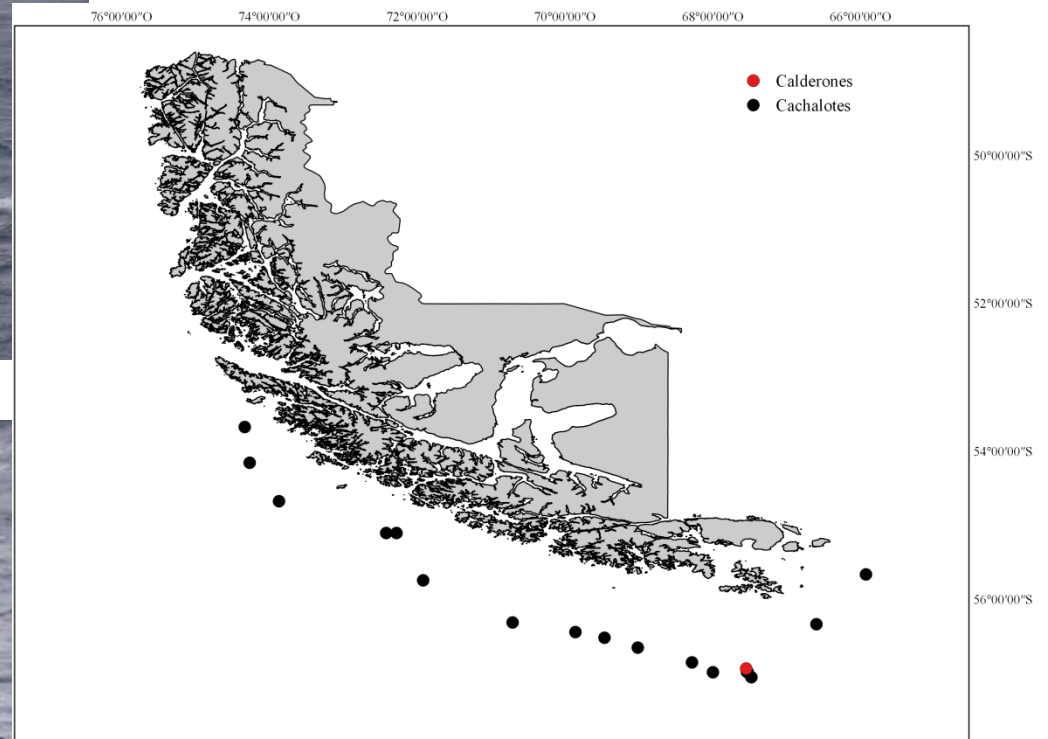
Tipo A: Es el más grande. Tiene una mancha ocular horizontal al eje cuerpo, no presenta coloración gris-amarillenta y su distribución es subantártica.

Tipo D: Mancha ocular muy reducida, no tiene mancha gris –amarillenta.

Los morfo tipos no se entrecruzan entre ellos y su distribución espacial y temporal es poco clara.



Adicionalmente, se está recibiendo información sobre otras especies de cetáceos, tal como cachalotes y calderones de aletas cortas.



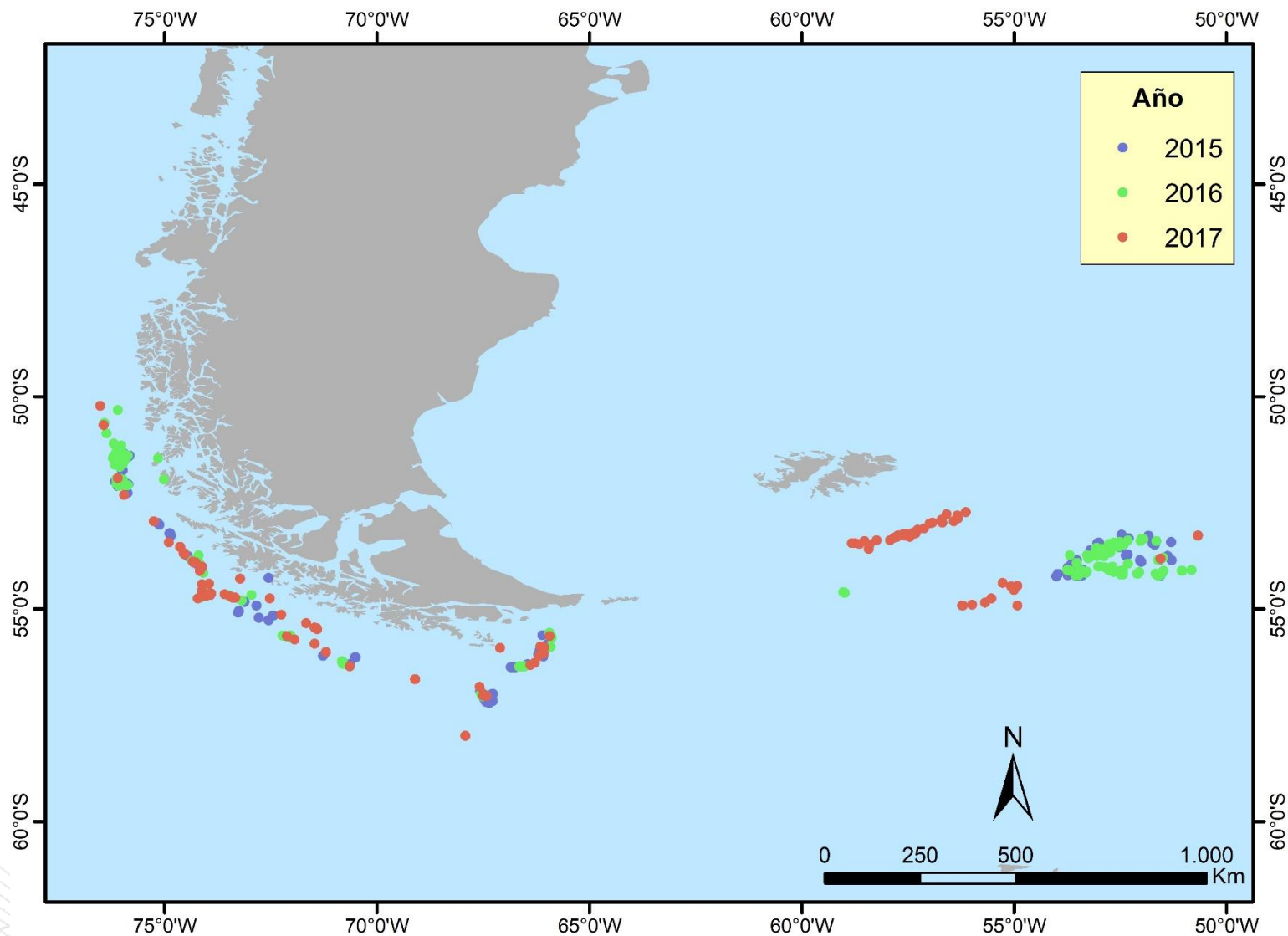
Concluido la investigación del Dr. Paul Tixier ha sido compromiso de CEQUA continuar con el programa de Fotoidentificación....

MCs. Dr. © Jorge Acevedo, Biol. Mar Benjamín Cáceres
M. Vet Anelio Aguayo.

3b. Identificación de stock con herramienta molecular.

- Vínculo con GlobalPesca inicia en 2015
- Capacitación en toma de muestra (desde músculo y aleta) a observadores de IFOP en 2015 y a trabajadores de GlobalPesca durante 2016 y 2017.
- A la fecha hay una colección referenciada de 939 tejidos.

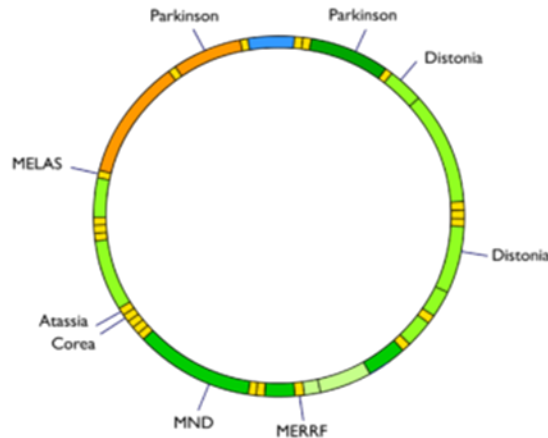
Mapa de sitios de muestreo



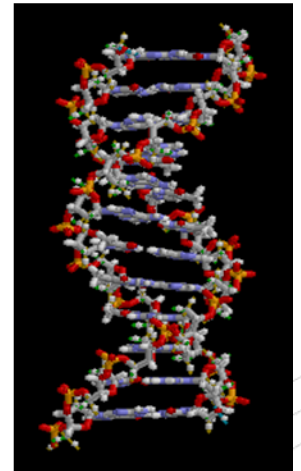
N= 939 organismos

Gen es un segmento de ADN codificante, es decir, al ser “leído” entrega un producto.

El genoma mitocondrial contiene 37 genes que participan en la fosforilación oxidativa, proceso metabólico que da energía a la célula.

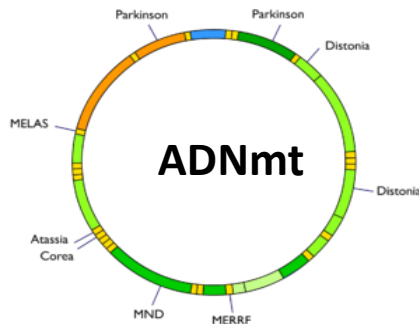


El genoma nuclear a diferencia se compone de 20.000 a 25.000 genes que participan en infinidad de procesos para llevar a cabo el funcionamiento de un organismo.



.....Genes y también las regiones regulatorias, que se encuentran en la vecindad de los genes, y cuya función radica en regular la participación de un gen en toda la vida de un organismo.

Definiendo stocks mediante marcadores moleculares

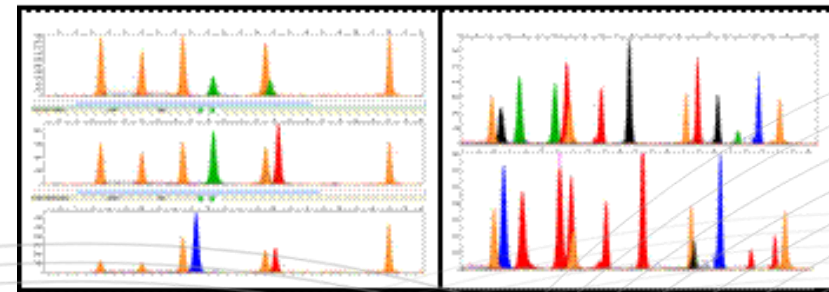


- Información de flujo genético histórico. Historia evolutiva
- Genes fundadores
- Estructura de poblaciones
- Conocer el pool genético (Base para acuicultura)
- Filogenia de las especies ligados al linaje materno.
- Denominación de origen, identificación geográfica
- Trazabilidad

- Información de flujo genético reciente, migración de las poblaciones (frecuencias alélicas, deriva génica y flujo genético).
- Alta variabilidad.
- Estudios de variación genética dentro y entre las especies
- Definir unidades de manejo (stocks). Determinar el origen de individuos. **Estimación tamaño efectivo poblacional (N_e).**



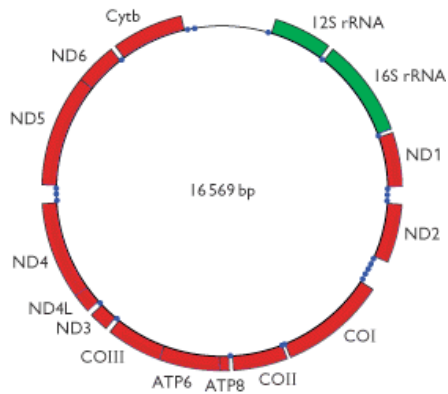
Microsatélites



¿Valor del estudio completo?

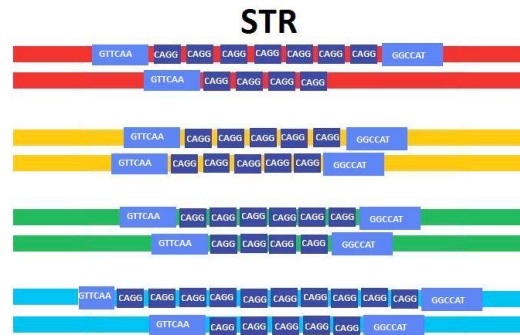
1.000 organismos

Mitocondriales



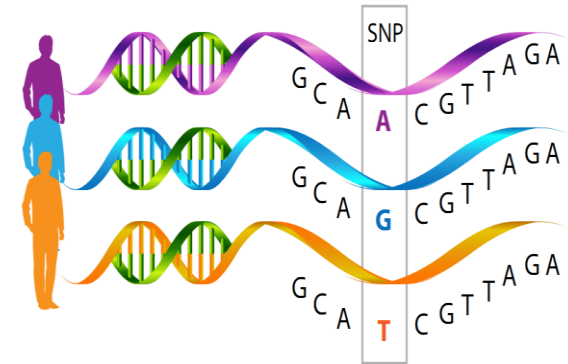
\$58.392.840

Microsatélites



\$60.435.334

SNPs



\$24.396.481

\$143.224.655

**FIC – R 2015 / Corfo 2016 / Fondef / Fondecyt /
Fortalecimiento de Centro regional (2017-2019) vinculación e
investigación emblemática entre tanto CIENCIA SOLIDARIA**



III Concurso de Fortalecimiento y Desarrollo de Centros Regionales 2016

Proyecto: *“Investigación asociativa en fiordos y canales: ciencia con recursos públicos y privados para el desarrollo territorial”*

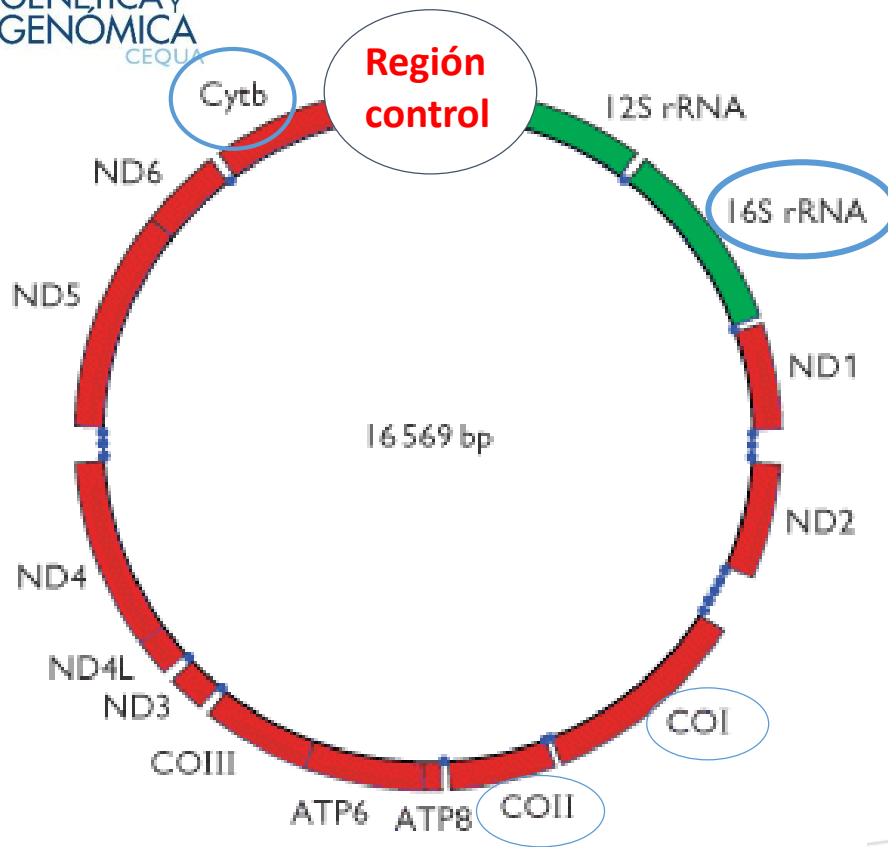
Dra. Paola Acuña Gómez
Directora Ejecutiva Fundación CEQUA



Aporte de AOBAC: pecuniario
Aporte de Globalpesca: valorizado M\$170.000



Que marcadores moleculares seleccionamos y porque?



Altamente variable en peces, permite analizar diferencias entre individuos = **variación genética**

Análisis para identificar especie
Identificar si hay una región que solo se presente en un grupo de organismos de un sitio? Certificación de origen.

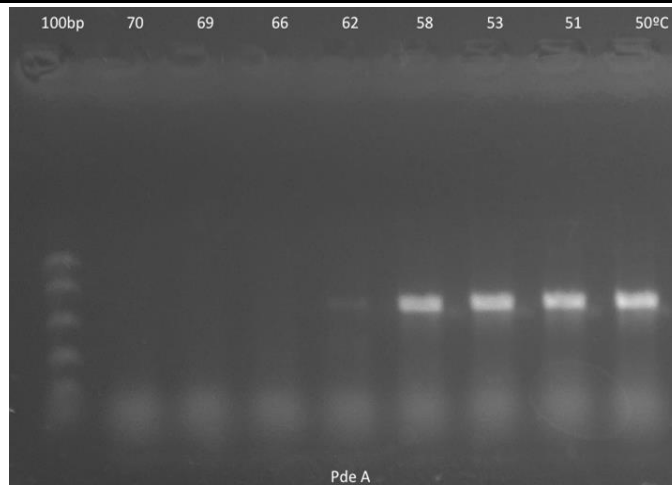
- ✓ **Ancestro común.**
- ✓ Eventos en el pasado que afectaron la población.
- ✓ La población se encuentra en recuperación después de algún evento ?

ADN mitocondrial TODO EL GENOMA DEL BACALAO SE CONOCE

Las regiones de los genes que vamos a analizar se han analizado por los australianos comparación de resultados y en Chile con los resultados de Sandra Ferrada y col.

Estandarización de PCR gen 16s *Dissostichus eleginoides* (Pde).

Lab Name	Original Name	Sequence	TM	
PDeAF	16SAR-L	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	52,3	58
PDeAR	16SBR-H	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	64	

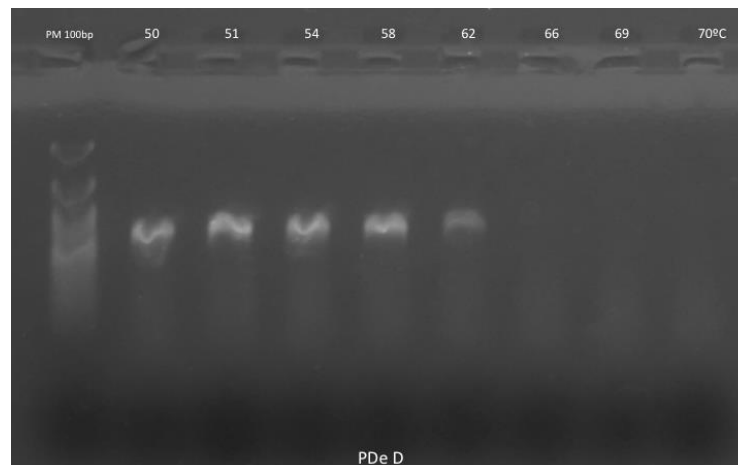


Mix Promega	Concentración	1x
5x PCR Buffer	1x	5
Mg ²⁺ 25mM	2,5mM	2,5
dNTPs 10mM	0,2mM	0,5
PDeAF 10uM	0,8uM	2
PDeAR 10uM	0,8uM	2
GoTaq DNA Polimerasa	1U	0,125
ADN	40nd	2
H ₂ O MiliQ	-	11,875

Condiciones de amplificación por PCR	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Denaturación inicial	95	03:00
Denaturación	95	00:45
Alineamiento	50-70	00:45
Extensión	72	01:30
Extensión final	72	10:00
Mantención	4	∞
40 ciclos		

Estandarización de PCR gen COI I *Dissostichus eleginoides* (Pde).

Lab Name	Original Name	Sequence	TM	
PDeDF	COIFishF2_t1	CGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	62,5	64
PDeDR	COIFishR_t1	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	66,3	

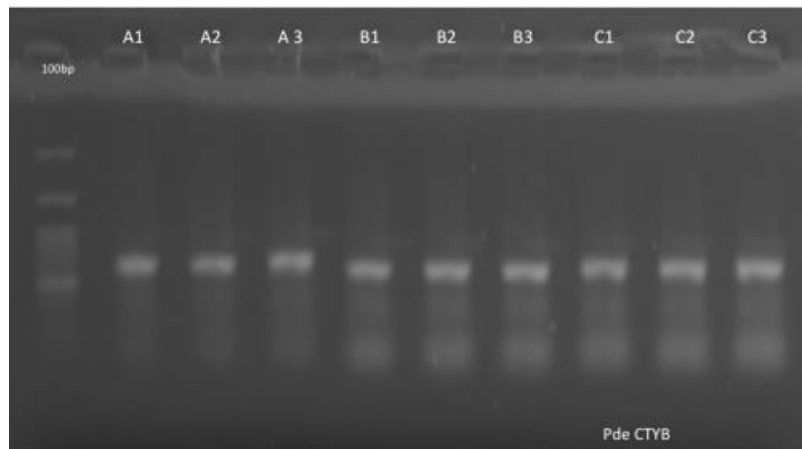


Mix Promega	Concentración	1x
5x PCR Buffer	1x	5
Mg ⁺² 25mM	2,5mM	2,5
dNTPs 10mM	0,2mM	0,5
PDeDF uM	0,8uM	2
PDeDR uM	0,8uM	2
GoTaq DNA Polimerasa	1U	0,125
ADN	40nd	2
H ₂ O MiliQ	-	10,875

Condiciones de amplificación por PCR	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Denaturación inicial	95	03:00
Denaturación	95	00:25
Alineamiento	50-70	00:25
Extensión	72	01:00
Extensión final	72	10:00
Mantención	4	∞
40 ciclos		

Estandarización de PCR CTY B *Dissostichus eleginoides* (Pde).

Lab Name	Original Name	Sequence	TM	
PDeBF	CyT-b1	CGTTTACCTGGGGTCAAATGT	62,9	60
PDeBR	CyT-b2	GGGGAAGAAGATGAGGAAAAT	57,4	



Mix Promega	Concentración	1x
5x PCR Buffer	1x	6
Mg ⁺² 25mM	2,4mM	2,4
dNTPs 10uM	0,24mM	0,6
PDeBF 10uM	0,24uM	0,6
PDeBF 10uM	0,24M	0,6
GoTaq DNA Polimerasa	1U	0,125
ADN	40nd	1
H ₂ O MiliQ	-	13,675

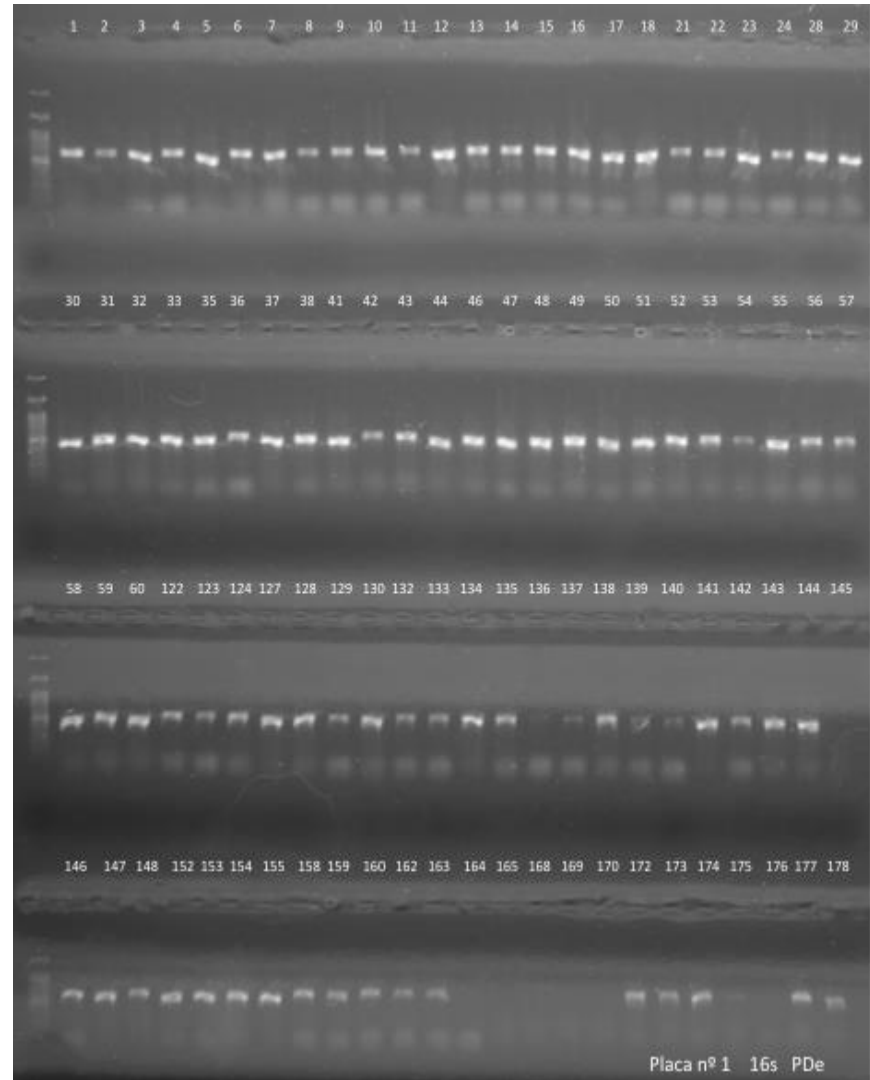
Condiciones de amplificación por PCR	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Denaturación inicial	95	03:00
Denaturación	95	00:45
Alineamiento	51	01:00
Extensión	72	01:00
Extensión final	72	10:00
Mantención	4	∞
40 ciclos		

Selección de muestras para análisis prospectivo Pde.

Amplificación por PCR gen 16s *Dissostichus eleginoides* (Pde).

Mix Promega	Concentración	1x
5x PCR Buffer	1x	5
Mg ²⁺ 25mM	2,5mM	2,5
dNTPs 10mM	0,2mM	0,5
PDeAF 10uM	0,8uM	2
PDeAR 10uM	0,8uM	2
GoTaq DNA Polimerasa	1U	0,125
ADN	40nd	2
H ₂ O MiliQ	-	10,875

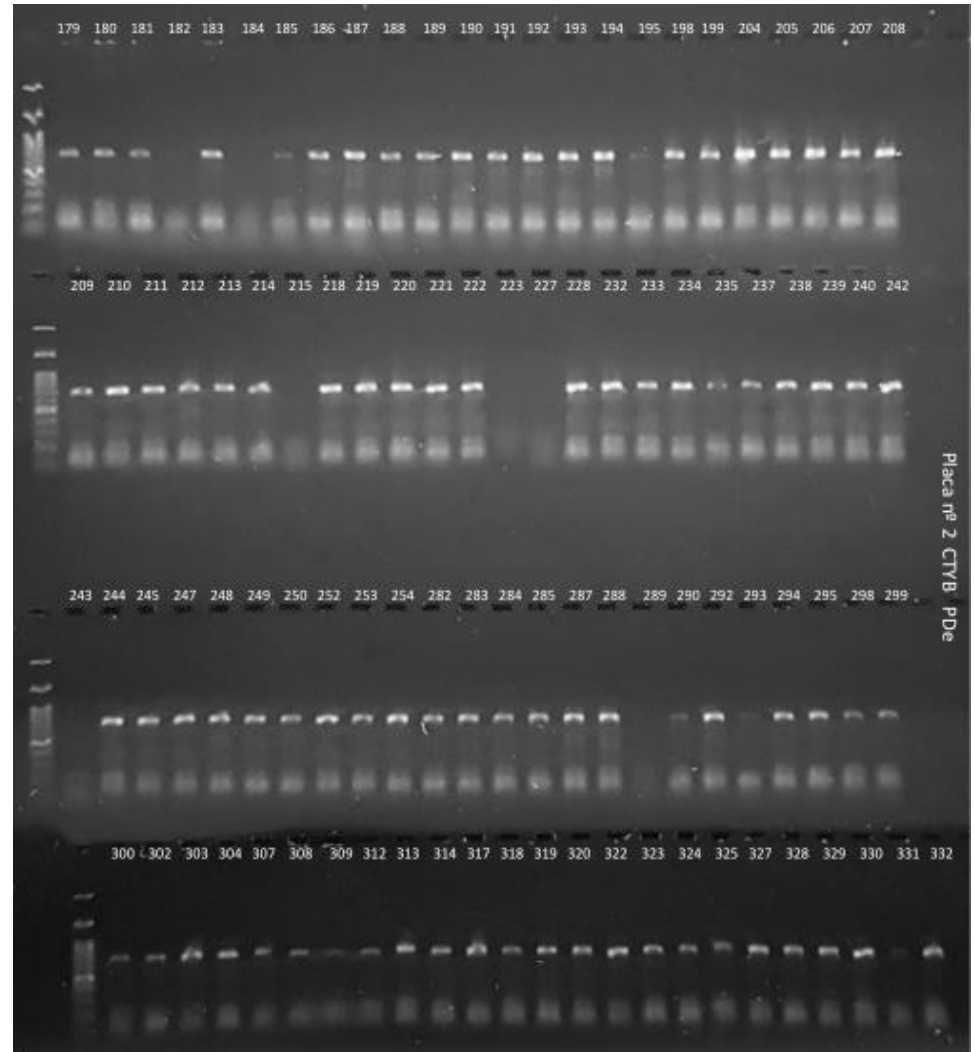
Condiciones de amplificación por PCR	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Denaturación inicial	95	03:00
Denaturación	95	00:45
Alineamiento	57	00:45
Extensión	72	01:30
Extensión final	72	10:00
Mantención	4	∞
40 ciclos		



Amplificación por PCR gen CTY B *Dissostichus eleginoides* (Pde).

Mix Promega	Concentración	1x
5x PCR Buffer	1x	6
Mg ²⁺ 25mM	2,5mM	2,4
dNTPs 10mM	0,2mM	0,6
PDeBF 10uM	0,8uM	0,6
PDeBR 10uM	0,8uM	0,6
GoTaq DNA Polimerasa	1U	0,125
ADN	40nd	1
H ₂ O MiliQ	-	13,675

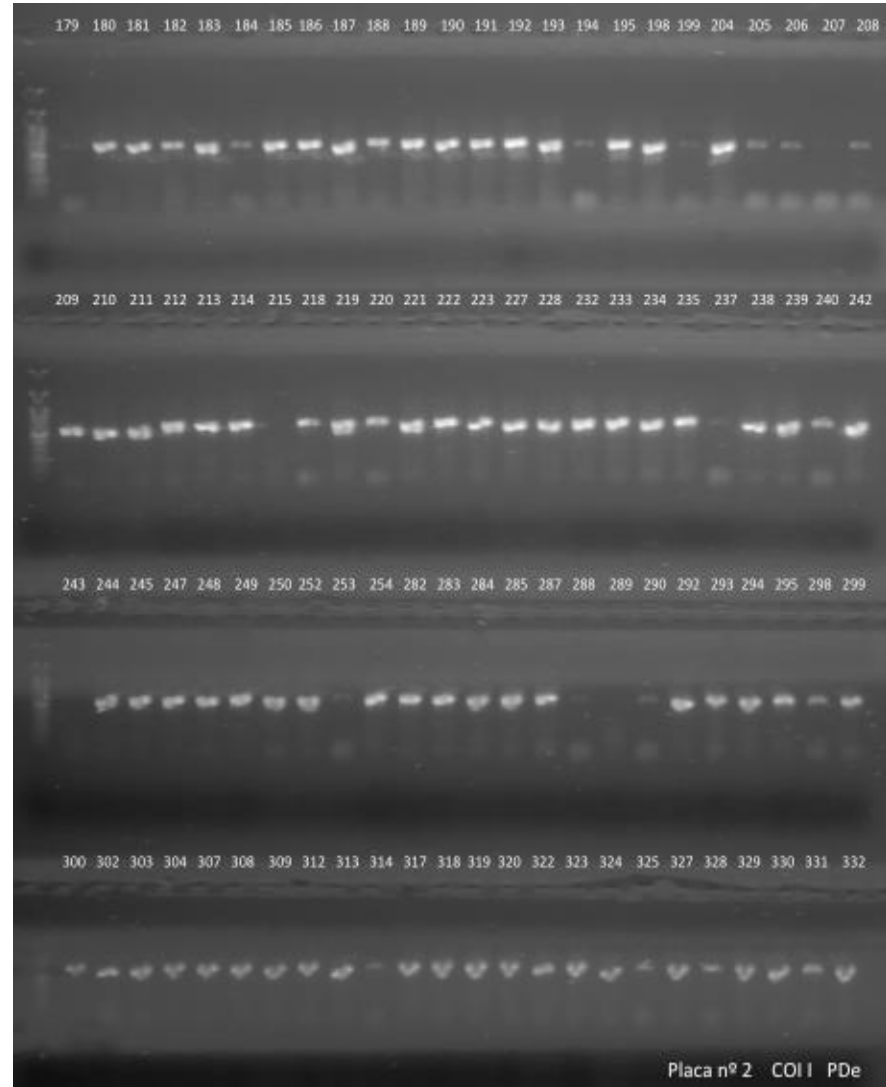
Condiciones de amplificación por PCR	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Denaturación inicial	95	03:00
Denaturación	95	00:45
Alineamiento	51	01:00
Extensión	72	01:00
Extensión final	72	10:00
Mantención	4	∞
40 ciclos		



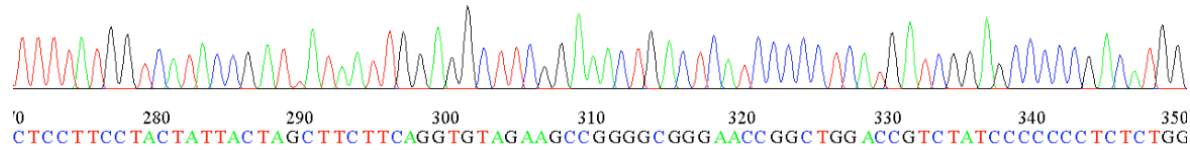
Amplificación por PCR gen COI I *Dissostichus eleginoides* (Pde).

Mix Promega	Concentración	1x
5x PCR Buffer	1x	5
Mg ²⁺ 25mM	2,5mM	2,5
dNTPs 10mM	0,2mM	0,5
PDeDF 10uM	0,8uM	2
PDeDR 10uM	0,8uM	2
GoTaq DNA Polimerasa	1U	0,125
ADN	40nd	2
H ₂ O MiliQ	-	10,875

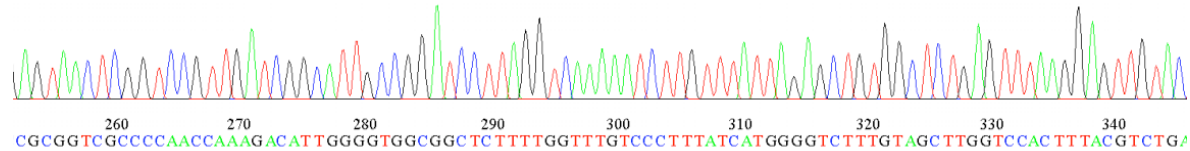
Condiciones de amplificación por PCR	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Denaturación inicial	95	03:00
Denaturación	95	00:25
Alineamiento	58	00:25
Extensión	72	01:00
Extensión final	72	10:00
Mantención	4	∞
40 ciclos		



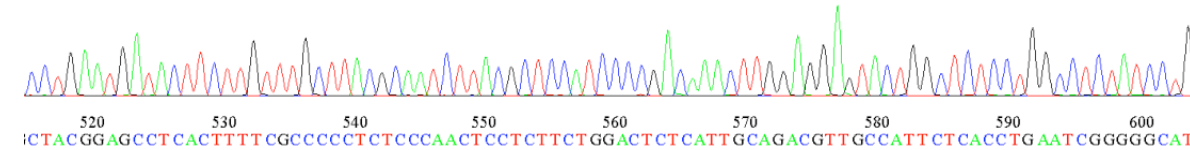
Resultados de secuenciación



COI I
nº241



16S
nº223



CTY B
nº222

Tesista de Doctora, Griselda Gallegos:
Genética y Dinámica poblacional del bacalao de profundidad (*Dissothichus eleginoides*) en la región de Magallanes y Antártica chilena.

Dra. Fabiola Arcos

Ing. Diana Schofield

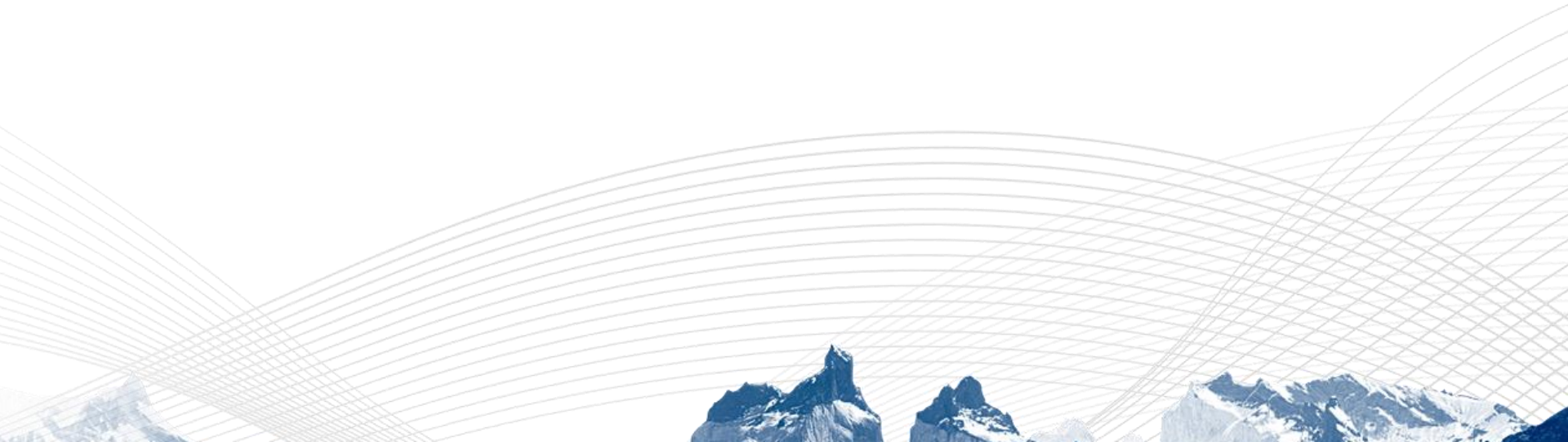
Ing. María Jesus Friedli

MCs. Ing. Carlos Olave

Dra. Paola Acuña

Morfología geométrica

- Se trabajará con cabezas de bacalao de diferentes localidades, aporte GlobalPesca
- Será un complemento a los resultados genéticos

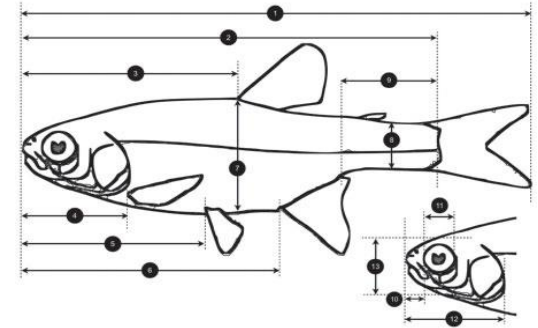


DESAFIOS

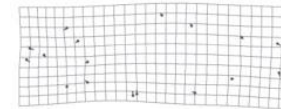
Estudios Morfológicos

Una de las aproximaciones relevantes para esclarecer la clasificación de especies es la morfometría, que estudia la variación de la forma de los organismos.

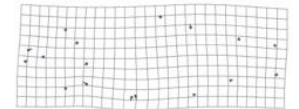
Morfometría tradicional: Analiza variables como longitudes, anchos y alturas sin la posibilidad de abstraer la forma de los organismos.



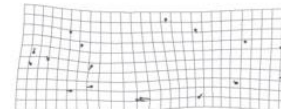
Morfometría Geométrica: estudio de la forma en un espacio **bi o tridimensional** para investigar los cambios morfológicos. Estos cambios se visualizan mediante un conjunto de puntos morfométricos los cuales se encuentran en la misma ubicación de un organismo a otro, permitiendo abstraer la forma mediante programas computacionales.



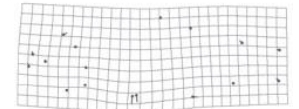
Ch. australe - Ch. galusdae



Ch. australe - Ch. interruptus



Ch. australe - Ch. pisciculus



Ch. galusdae - Ch. interruptus

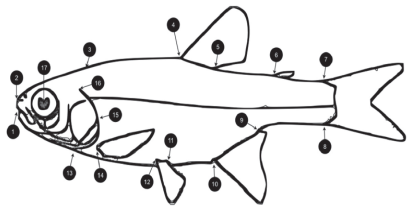
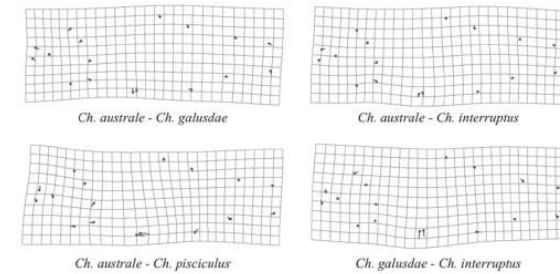
Morfometría Geométrica

CAPTURA DE
IMAGEN

- Contraste y Escalas (mismo color de la muestra)
- Posición de la escala y altura (Área). Macro, Luz (artificial, natural). Tamaño y tipo del archivo.
- Código fotos y Programas de edición

Aplicaciones

- Diferencias dentro o entre poblaciones
- Diferencia entre macho y hembra.
- Diferencias entre poblaciones según su distribución geográfica
- Cambios en la desviación de la simetría
- Cambios producidos durante el ciclo de vida
- Cambios morfológicos producto de los genes
- Diferencias morfológicas con grandes cambios
- Cambios en la forma de restos materiales utilizados en la antigüedad





3d.- Datos históricos de captura biológica y de la pesquería.

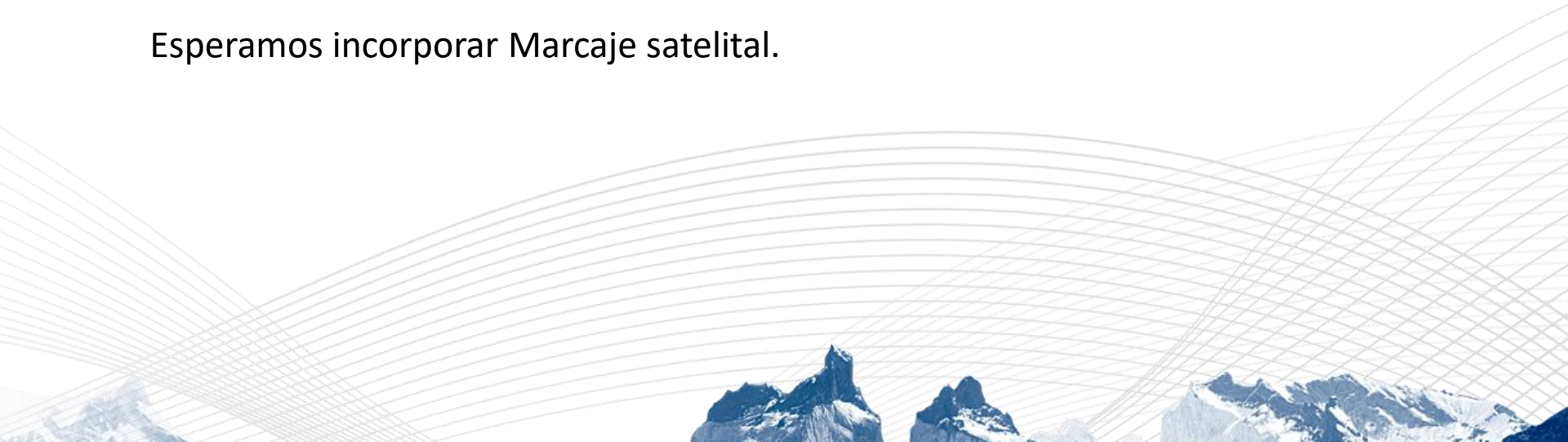
Intranet de Global Pesca

Agradecer al Ing. Pablo Infante Larraguibel

4.- Retomar el programa de marcaje y recaptura.....

Para nuestra investigación, la movilidad de los ejemplares de bacalao, la entendemos Como “genes en movimiento”

Esperamos incorporar Marcaje satelital.



5d.- Data layer implementada por GlobalPesca

- Objetivo de vincular e interpretar parámetros físico – químicos a gran profundidad con datos biológicos.
- Sumar información de parámetros y variables oceanográficos a la red de monitoreo que hemos iniciado en la región.

Fundamental:

- Que la autoridad Pesquera comprenda que hay nuevas investigaciones a Considerar en los planes de manejo y determinación de normativas.
- Con la Industria dar el salto para investigación independiente usando su plataforma de trabajo.



Agradecimientos:

- AOBAC
- Global Pesca
- Comité Organizador del Seminario Bacalao 2017
- Centro Regional Fundación CEQUA
- Gobierno Regional de Magallanes
- Conicyt
- Lab. Predadores Tope de CEQUA
- Lab. Genética y genómica de CEQUA.
- Lab. de Sistema de Información geográfica de CEQUA.
- Dr. © Paul Tixier, asesor internacional
- Prof. Anelio Aguayo, asesor experto de CEQUA.
- Pablo Infante Lagarribel

CAPTURA RESPONSABLE PESQUERÍA SUSTENTABLE ::



MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCIÓN

Paola Acuña Gómez
paola.acuna@cequa.cl