

Proyecto
POR LA PESCA

**Avances recientes del estudio genómico
para identificar divergencia genética
poblacional entre perico/dorado
(*Coryphaena hippurus*) capturado en el
Océano Pacífico Suroriental**

Proyecto **POR LA PESCA**

Avances recientes del estudio genómico para identificar divergencia genética poblacional entre perico/dorado (*Coryphaena hippurus*) capturado en el Océano Pacífico Suroriental

Preparado por:

Sofía Ortega-García¹, Ulianov Jakes-Cota¹, Pindaro Díaz-Jaimes², Adan Fernando Mar-Silva², Maried Ochoa-Zavala², Giovanna Sotil³, Ana Alegre³, Paul Guarnizo³, Esteban Elías-Méndez⁴

¹Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR)

²Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

³Instituto del Mar del Perú (IMARPE)

⁴Instituto Público de Investigación de Acuicultura y Pesca (IPIAP)

Ecuador, 20 de febrero de 2024

Este reporte del proyecto Por la Pesca es posible gracias al generoso apoyo del pueblo estadounidense a través de la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID). Los contenidos son responsabilidad de los autores y no reflejan necesariamente los puntos de vista de USAID o del Gobierno de los Estados Unidos.

1. PRIMERA CAMPAÑA DE COLECTA

Siguiendo el protocolo de muestreo establecido, durante los meses de enero-febrero del 2023 se llevó a cabo la colecta de especímenes de dorado adultos en las localidades marcadas en la **figura 1**. Debido a que hubo oportunidad de iniciar la colecta de organismos durante el mes de diciembre del 2022, se decidió iniciar el muestreo y continuarlo hasta febrero del 2023 (**Tabla 1**). Las estimaciones de la L_{50} (talla a la cual el 50 % de la población de encuentra madura), varían a lo largo de la distribución de este recurso. Particularmente para Ecuador se ha estimado de 92.89 cm para Esmeraldas, 82.31 para Manta y 68.83 para Santa Rosa. En Ecuador se considera como talla mínima legal de captura 80 cm de longitud total establecida mediante Acuerdo Ministerial Nro. MAGAP-SRP-2011-070 (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca, 2011), mientras que en Perú es de 70 cm de longitud furcal establecida mediante Resolución Ministerial Nro. 249-2011-PRODUCE (Ministerio de la Producción, 2011). Si consideramos como juveniles a los organismos menores a 70 cm de LF, se podría considerar como juvenil a un organismo de 63 cm de LF capturado en Matarani, Perú, durante la primera colecta.

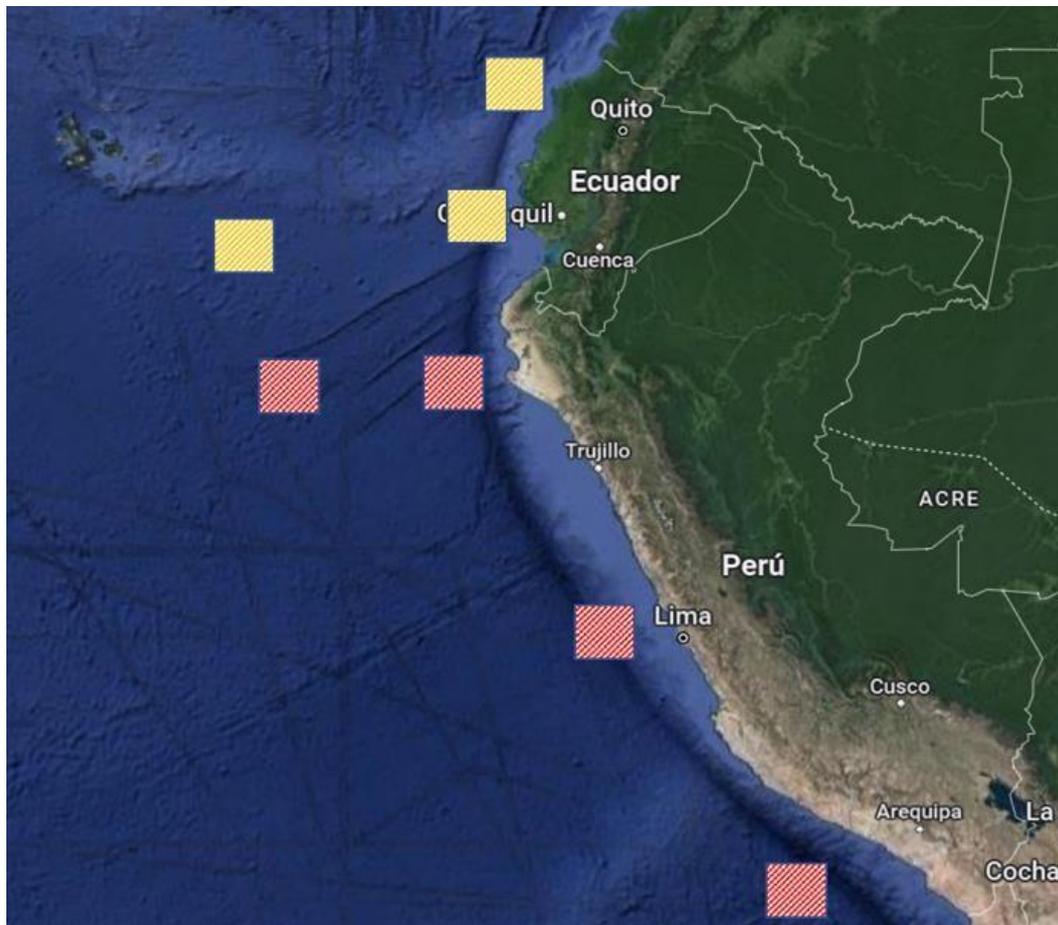


Figura 1. Localidades de muestreo establecidas para el proyecto estudio genómico para identificar divergencia genética poblacional entre perico/dorado (*Coryphaena hippurus*) capturado en Perú (recuadros rojos) y Ecuador (recuadros amarillos).

Tabla 1. Número de organismos y rango de tallas de los dorados muestreados en cada una de las localidades en Perú y Ecuador.

País	Localidad	Mes	No. organismos	Rango de tallas longitud furcal (cm)
Ecuador	Esmeraldas	Febrero	12	75-103
	Manta	Diciembre	10	86-113
	Manta	Febrero	10	76-96
	Santa Rosa	Diciembre	10	80-96
	Santa Rosa	Febrero	10	81-99
Perú	Paita [norte]	Febrero	35	73-128
	Pucusana [centro]	Diciembre	10	77-110
	Matarani [sur]	Diciembre	10	88-113
	Matarani [sur]	Enero	10	63-114

La estructura de tallas de los dorados adultos muestreados en Ecuador se presenta en la **figura 2**.

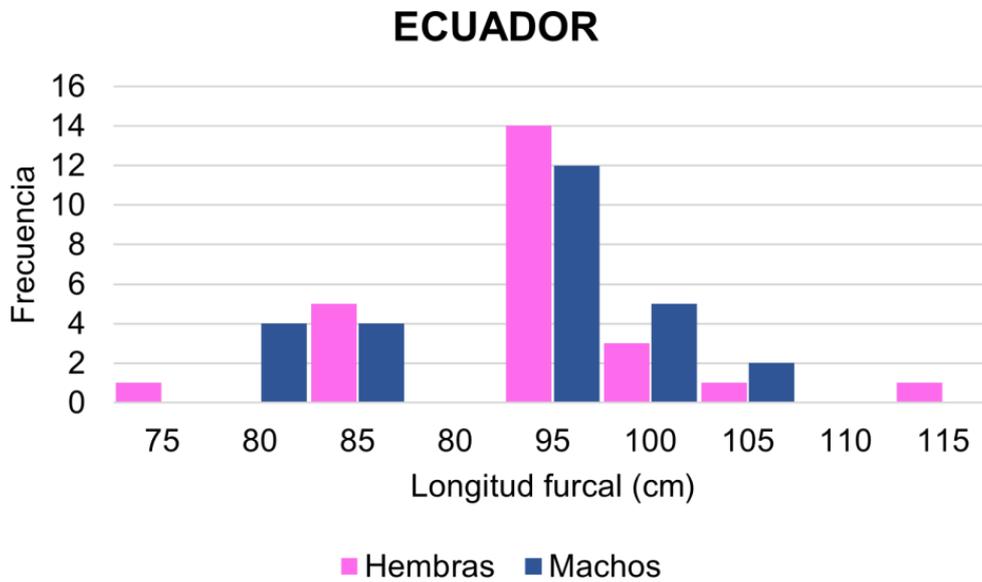


Figura 2. Estructura de tallas de dorados machos y hembras adultos muestreados en Ecuador de diciembre/2022 a febrero/2023.

La estructura de tallas de los dorados adultos muestreados en Perú se presenta en la **figura 3**.

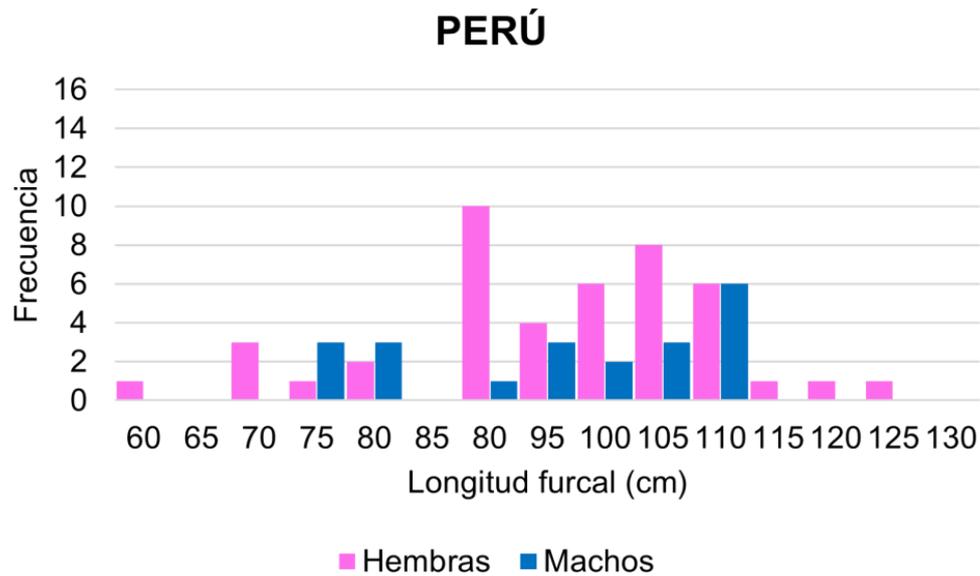


Figura 3. Estructura de tallas de dorados machos y hembras muestreados en Perú durante el periodo diciembre 2022-febrero 2023.

El número de organismos por sexos muestreados en cada localidad se presenta en la **tabla 2**.

Tabla 2. Número de organismos de los dorados muestreados por mes en cada una de las localidades en Perú y Ecuador.

País	Localidad	Mes	Machos	Hembras	Total
Ecuador	Esmeraldas	Febrero	6	6	12
	Manta	Diciembre	5	5	10
	Manta	Febrero	5	5	10
	Santa Rosa	Diciembre	6	4	10
	Santa Rosa	Febrero	5	5	10
Subtotal			27	25	52
Perú	Paita [norte]	Febrero	12	23	35
	Pucusana [centro]	Diciembre	6	4	10
	Matarani [sur]	Diciembre	1	9	10
	Matarani [sur]	Enero	2	8	10
Subtotal			21	44	65
Total			48	69	117

Las posiciones geográficas donde se capturaron los organismos muestreados por localidad se presenta en la **figura 4**.

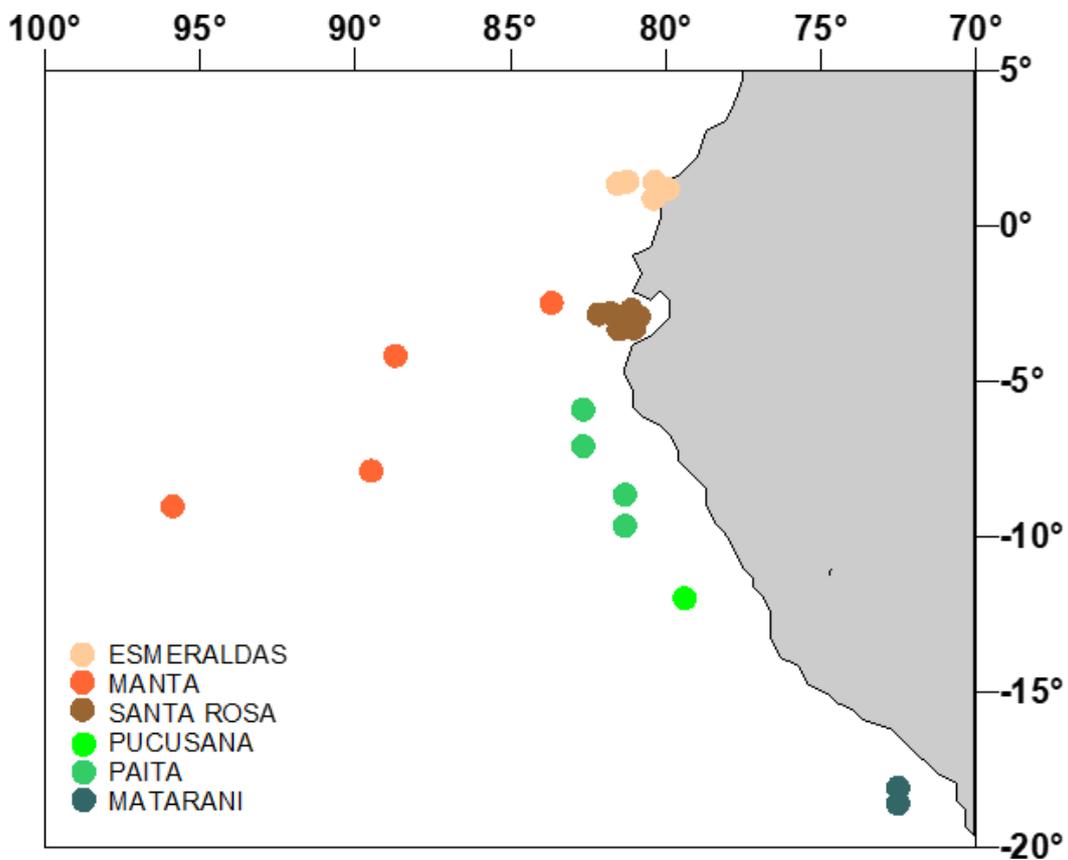


Figura 4. Posición de captura de los dorados muestreados en las diferentes localidades de Ecuador y Perú.

Durante esta primera etapa se tenía contemplado el muestreo de 60 organismos en Ecuador y 80 en Perú, desafortunadamente en ambas localidades el número de dorados muestreados fue menor debido a la disponibilidad del recurso, en gran parte como consecuencia de la presencia de un evento El Niño costero que se presentó en el área de estudio durante los primeros meses del 2023.

Este evento está representado por el Índice Costero El Niño (ICEN), establecido por la Comisión Multisectorial encargada del Estudio del Fenómeno El Niño (ENFEN) para el diagnóstico de El Niño y La Niña en el Perú (ENFEN, 2012; Takahashi et al., 2014).

Este evento, representa la variabilidad del clima regional en el este del Océano Pacífico ecuatorial, que incluye las zonas frente a Ecuador y norte del Perú (**figura 5**). Las imágenes de satélite de temperatura superficial del mar durante los meses de muestreo se presentan en la **figura 6**.

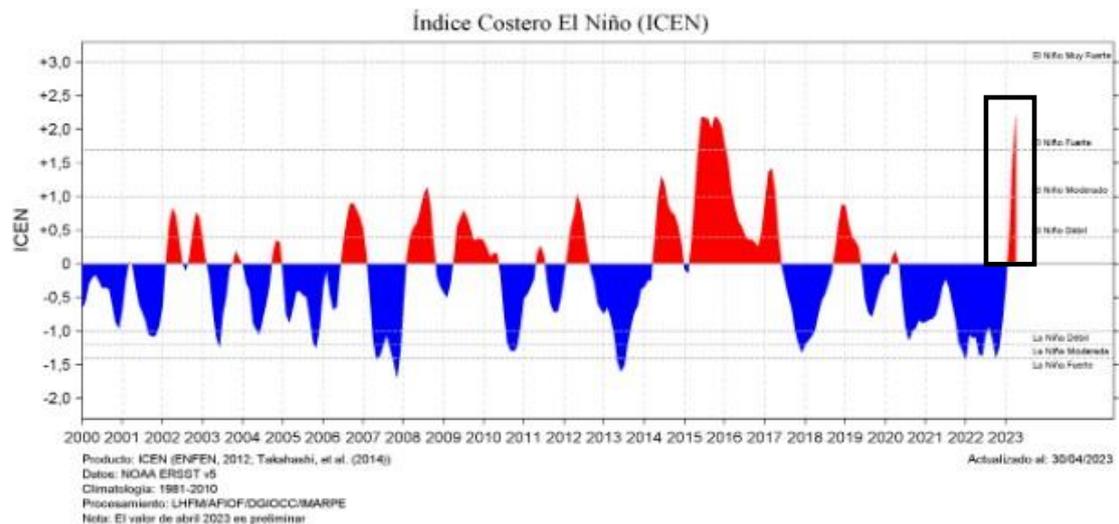


Figura 5. Serie de tiempo del Índice Costero El Niño (ENFEN, 2012; Takahashi *et al.* 2014) desde el año 2000. Procesamiento: LHFMAFIOF/DGIOCC/IMARPE. Tomado de https://www.imarpe.gob.pe/imarpe/index2.php?id_seccion=101780903000000000000000

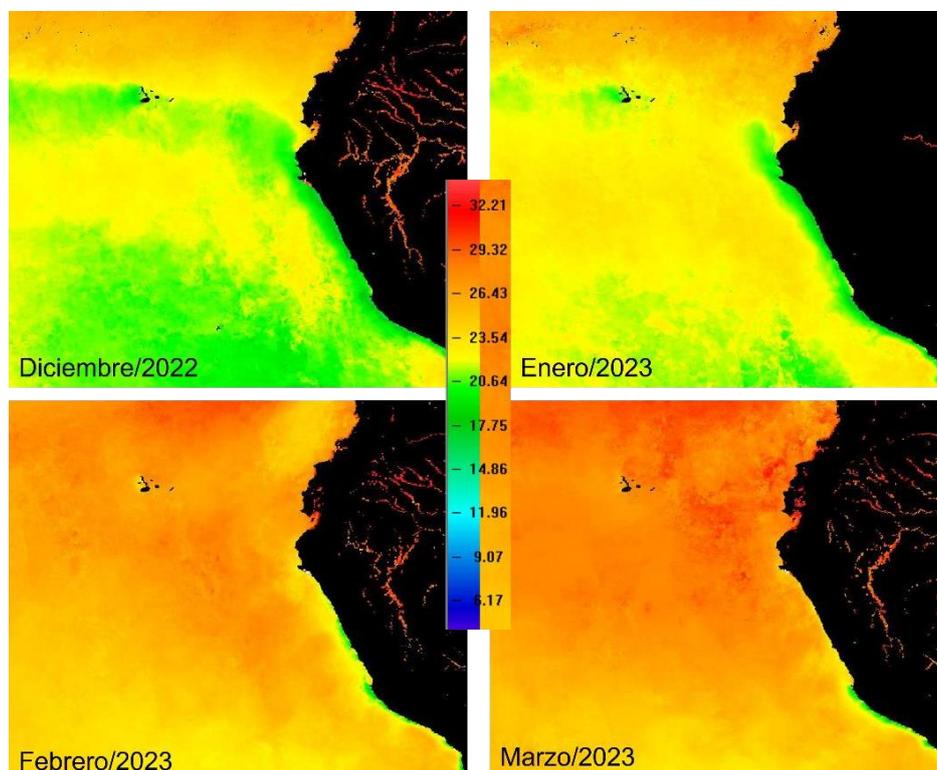


Figura 6. Temperatura promedio mensual de los meses en que se llevaron a cabo las colectas de muestras de dorado adulto.

2. SEGUNDA CAMPAÑA DE COLECTA

Conforme al cronograma establecido, durante los meses de junio y julio del 2023 se llevó a cabo la colecta de juveniles, sin embargo, solo se pudo realizar en dos localidades de Ecuador: Manta y Santa Rosa con 10 y 20 organismos, respectivamente, siendo en Santa Rosa donde fue posible coleccionar organismos más pequeños (**Tabla 3**).

Considerando la talla mínima de 70 cm para organismos adultos, varios de los organismos muestreados no podrían considerarse como juveniles. Esto implica que solo tendríamos 11 organismos de Santa Rosa que podrían catalogarse como juveniles. En ninguna de las localidades de Perú (Paíta, Pucusana, Matarani) fue posible coleccionar juveniles.

Tabla 3. Número y descripción de organismos muestreados por localidad en Ecuador.

Localidad	Rango de tallas (cm)	Machos	Hembras	Total
Manta	73-93	3	7	10
Santa Rosa	64-84	10	10	20

La posición geográfica de donde se capturaron los organismos se muestra en la **figura 7**, donde se puede observar que los juveniles coleccionados en Santa Rosa fueron relativamente costeros, en Manta hubo tanto costeros como oceánicos.

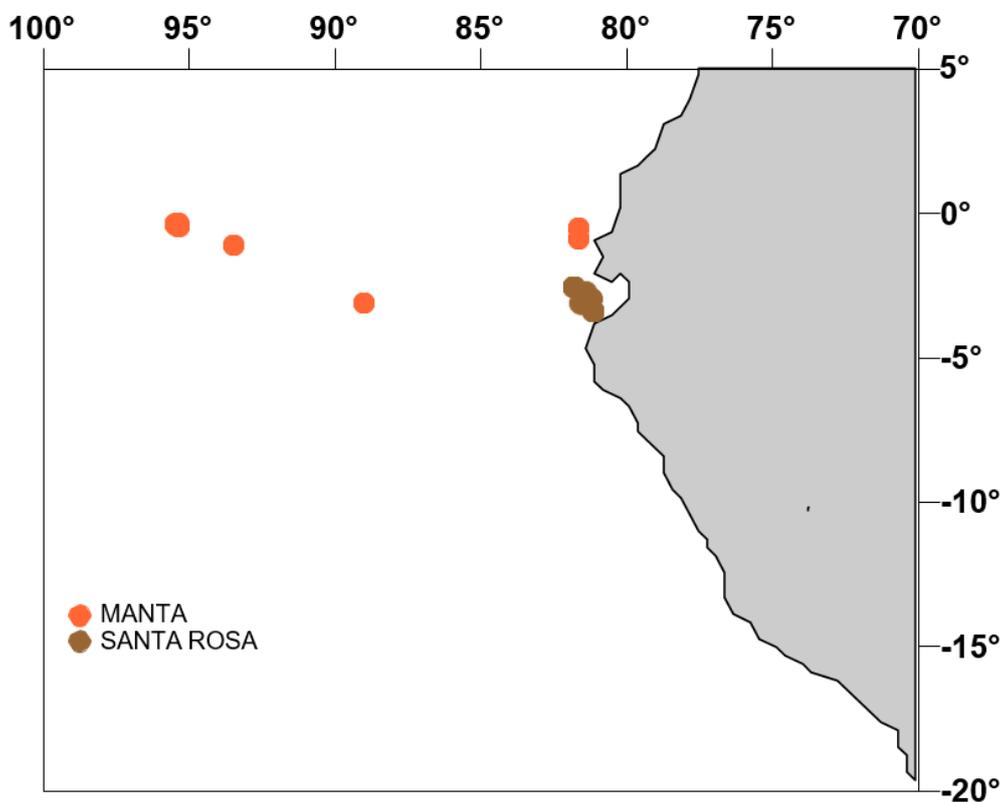


Figura 7. Posición geográfica de captura de los organismos muestreados.

A diferencia de los primeros meses del año, la temperatura superficial del mar estuvo más baja en aguas frente a Perú con un promedio de 21.5 °C, quizá esa fue una de las principales razones de no encontrar organismos juveniles (**figura 8**).

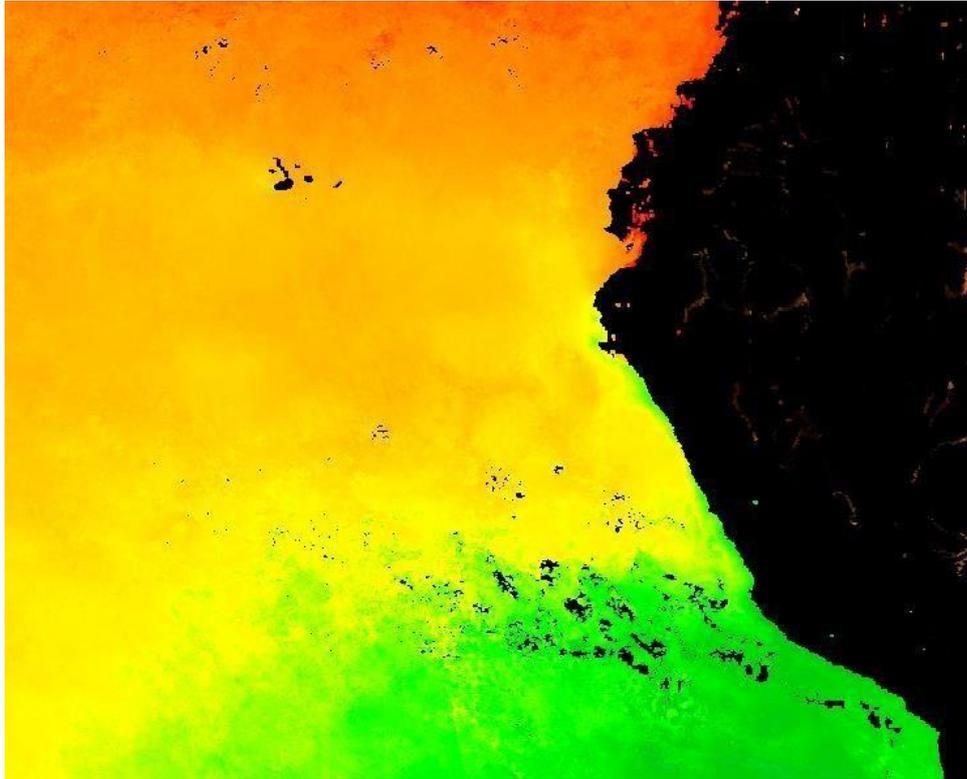


Figura 8. Temperatura superficial del mar promedio durante el mes de julio de 2023.

3. TRABAJO DE LABORATORIO

En el Laboratorio de Genética del Instituto del Mar del Perú (IMARPE), todas las extracciones fueron evaluadas en calidad mediante electroforesis en geles de agarosa; y en pureza utilizando un espectrofotómetro Nanodrop OneC, y en cantidad mediante fluorimetría en un equipo Qubit. Todas las muestras de buena calidad fueron normalizadas a una misma concentración. Posteriormente, en el Laboratorio del Instituto Público de Investigación de Acuicultura y Pesca (IPIAP) de Ecuador, se llevó a cabo la digestión del ADN de las muestras colectadas en la primera y segunda campaña de muestreo, utilizando las enzimas Bam_HI, Cla_I y Msp_I (**figura 9**), mismas que fueron llevadas a la Ciudad de México para la preparación de las librerías. De las muestras de Perú, diez no se pudo extraer el DNA, por lo que finalmente se trabajó con un total de 55 muestras.

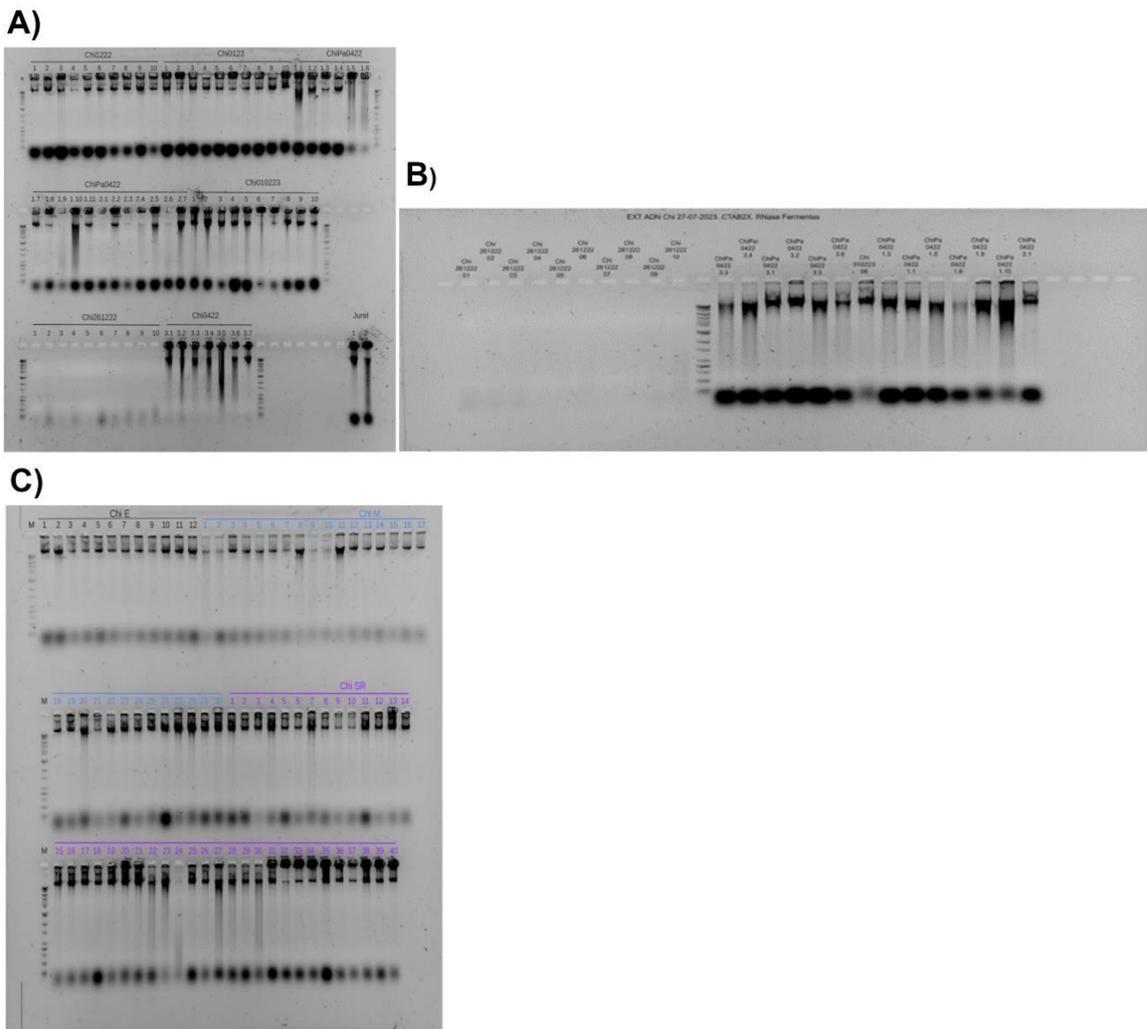


Figura 9. Extracciones de ADN evaluadas en geles de agarosa al 1%. **A)** y **B)** Muestras de Perú. **C)** Muestras de Ecuador. Imagen proporcionada por Giovanna Sotil y Paul Guarnizo.

4. TALLER DE ENTRENAMIENTO EN EL LABORATORIO DEL INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA-UNAM

Del 6 al 19 agosto del año en curso, la Dra. Giovanna Sotil y Paul Guarnizo viajaron a la Ciudad de México para llevar a cabo un taller de entrenamiento en el proceso de las librerías en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Autónoma de México. Este taller estuvo coordinado por el Dr. Píndaro Díaz y se contó con la participación del Dr. (C) Adán Fernando Mar Silva. Durante los primeros dos días se evaluó que la digestión del ADN genómico estuviera correcta, lo cual se realizó mediante el uso de las enzimas de restricción. Se elaboraron cinco librerías genómicas siguiendo el protocolo 3RAD para visualizar en el gel de agarosa los productos finales de la librería. Una vez que se constató que las enzimas funcionaron fragmentando el ADN genómico y que la genoteca se podía realizar, éstas fueron elaboradas para la totalidad de las muestras.

Durante la elaboración de las librerías, en primer lugar, se explicó el proceso de ligación y el uso de los adaptadores necesarios en el segundo paso que es la construcción de las

genotecas. En segundo lugar, se realizó una limpieza de los productos de la ligación mediante el uso de perlas magnéticas. Finalmente, las librerías genómicas fueron terminadas usando una reacción de PCR corta, la cual fue visualizada en un gel de agarosa al 1.5%. Cabe remarcar que en todo momento tanto la Dra. Sotil como Paul Guarnizo, participaron tanto en la explicación teórica como en la elaboración de la librería. Durante este proceso, se prepararon bibliotecas genómicas de 55 muestras de Perú y 82 de Ecuador (**Tabla 4**). Los organismos corresponden a las seis localidades establecidas inicialmente (**Figura 1**).

Tabla 4. Número total muestras por localidad en Perú y Ecuador.

Localidad	País	Número de muestras	Rango de tallas (cm)
Pucusana	Perú	10	77-110
Paita	Perú	35	73-128
Matarani	Perú	10	63-114
Esmeraldas	Ecuador	12	
Manta	Ecuador	30	
Santa Rosa	Ecuador	40	

Para evaluar la calidad del ADN, se visualizó el ADN genómico total en un gel de agarosa al 1.5 %. La cuantificación de las muestras se realizó mediante fluorometría utilizando un equipo Qubit. Todas las muestras fueron estandarizadas a una concentración final de 20 ng/ul.

4.1. Preparación de biblioteca genómica mediante el protocolo 3RAD

Las bibliotecas de genomas se prepararon utilizando el protocolo 3RAD. El 3RAD es un protocolo de ADN asociado a sitios de restricción (RADseq) que se utiliza para el descubrimiento y genotipado de SNP. Como se describió en informes anteriores, el primer paso del método consistió en la digestión del ADN utilizando tres enzimas de restricción. La ventaja de utilizar múltiples enzimas es la eliminación de quimeras y lecturas de duplicación. Durante la ligación, se ligan adaptadores bicatenarios modificados a cada fragmento de ADN, que permiten la ligación a sitios de reconocimiento específicos para cada enzima (los adaptadores están diseñados para sólo dos enzimas). La posterior implementación de un ciclo de temperaturas simultáneamente al proceso de digestión y ligación permite separar los dímeros-adaptadores utilizando la tercera enzima. Inicialmente se realizó una prueba enzimática para evaluar qué enzimas mostraban mejores resultados en el paso de digestión. El conjunto de enzimas utilizado en el presente trabajo fue Bam_HI, Cla_I y Msp_I. Como era de esperarse se observó una degradación gradual del ADN en lugar de una banda de alto peso molecular. Después del paso de digestión y ligación, se llevó a cabo una breve PCR. Esta PCR permite completar la biblioteca de cuatro índices.

Considerando que cada pool es de 96 muestras, con la finalidad de utilizar adecuadamente la celda de flujo y no desperdiciar lecturas, se agregaron muestras de juveniles y adultos que se habían colectado durante los mismos meses en Cabo San Lucas y Puerto Ángel, Oaxaca, cabe aclarar que de esta última localidad el rango de tallas

va de 23 a 29 cm. En total se elaboraron un total de 192 bibliotecas genómicas siguiendo los pasos de digestión, ligación y PCR. En el proceso de PCR se esperaba la amplificación de fragmentos entre 400 y 800 pares de bases (pb), en la **figura 10** y **figura 11** es posible visualizar la mayor concentración de estos tamaños de fragmentos.

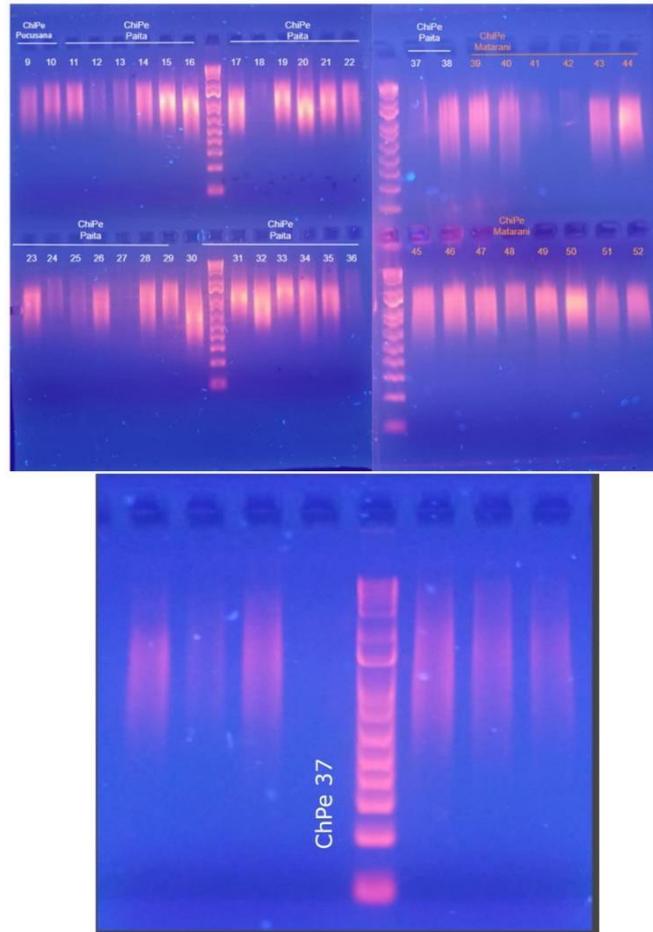


Figura 10. Bibliotecas genómicas elaboradas con el protocolo 3RAD de muestras recolectadas en Perú.

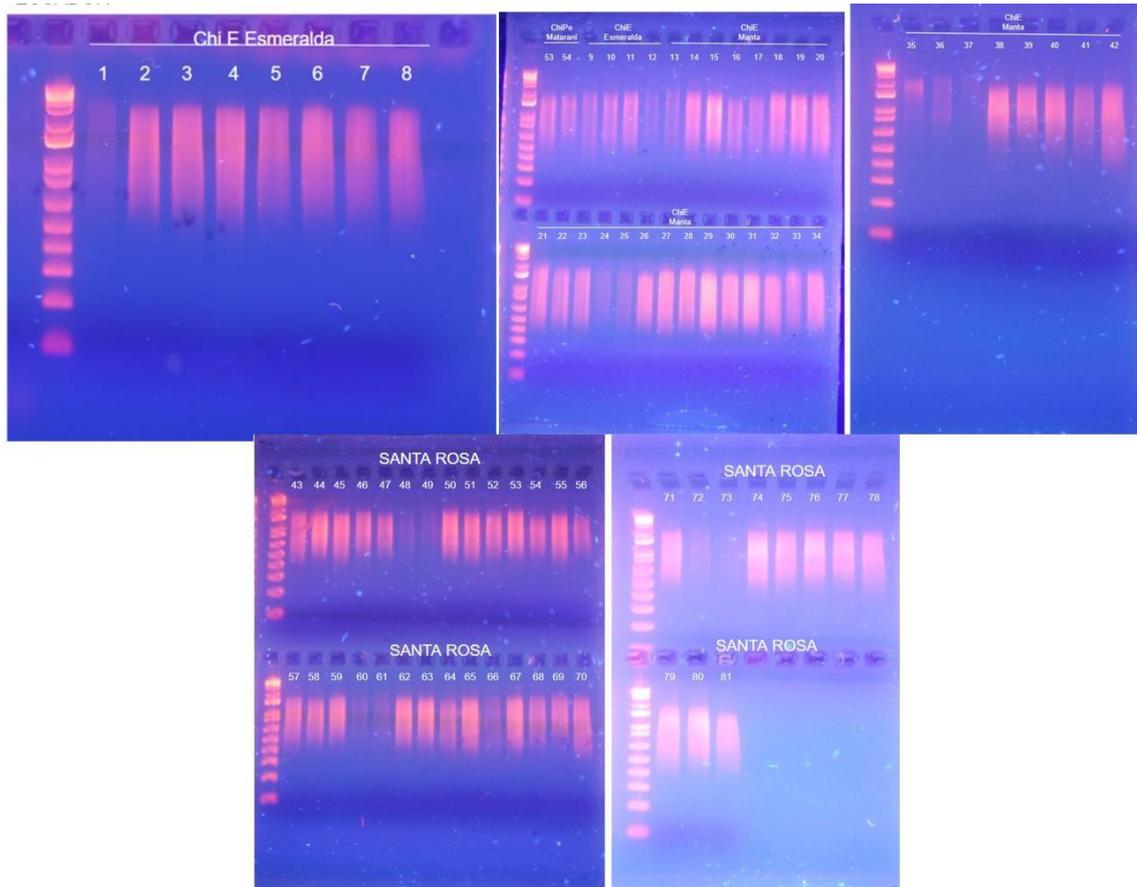


Figura 11. Bibliotecas genómicas elaboradas con el protocolo 3RAD de muestras recolectadas en Ecuador.

La correcta amplificación del tamaño esperado de los fragmentos nos permite concluir que la elaboración de las bibliotecas genómicas fue exitosa. El último paso en el laboratorio consistió en la cuantificación de bibliotecas. Se necesitaba una concentración mínima de 15 ng/ul para una secuenciación exitosa. Se enviarán bibliotecas para cada muestra para una selección de fragmentos adicionales (fragmentos de 500 pb) utilizando el equipo de preparación pippin y el proceso de secuenciación posterior en la Universidad de Georgia. Esperamos obtener 2.000.000 de secuencias para cada muestra para un total de 384 millones de lecturas.

5. REFERENCIAS

- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca (MAGAP). (2011). Acuerdo Ministerial Nro. MAGAP-SRP-2011-070: Talla mínima de captura del recurso dorado en Ecuador.
- Ministerio de la Producción (PRODUCE). (2011). Resolución Nro. 249-2011-PRODUCE: Talla mínima de captura del recurso perico en Perú.