

# **INFORME FINAL**

## PROYECTO FIPA N° 2020-20

# **GENÉTICA POBLACIONAL DE** *Dosidicus gigas* **PRESENTE**

# **EN TERRITORIO NACIONAL**

PROPONENTE: UNIVERSIDAD ANDRES BELLO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

RESPONSABLE DE LA PROPUESTA:

DR. CHRISTIAN M. IBAÑEZ CARVAJAL

AUTORES DEL INFORME:

CHRISTIAN M. IBAÑEZ CARVAJAL

SERGIO A. CARRASCO ORDENES

PAMELA M. MORALES HENRÍQUEZ

PABLO A. OYARZÚN CABAÑAS

MARÍA CECILIA PARDO-GANDARILLAS

Mayo 2022



## RESUMEN

El presente documento informa los resultados alcanzados en la ejecución del proyecto FIPA Nº 2020-20, cuyo objetivo general fue identificar genéticamente la existencia de una o más poblaciones o grupos poblacionales de Dosidicus gigas en la costa Este del Océano Pacífico Sur. Se realizaron los muestreos en la zona norte, centro y sur de Chile según lo comprometido en la propuesta. Por parte de la asesoría del proyecto a SUBPESCA se han realizado reuniones, un taller de genética de poblaciones y se ha participado en la reunión de OROPS. Los calamares recolectados fueron de gran tamaño (> 60 longitud del manto), la mayoría de los machos se encontraron en maduración y maduros (estados 2 y 3), mientras que todas las hembras fueron inmaduras (estado 2). Se realizaron las extracciones de ADN satisfactoriamente y se secuenciaron dos genes mitocondriales (COI y ND2) y se obtuvieron SNPs. Los resultados de la secuenciación de los genes mitocondriales COI y ND2, y de los SNPs indicaron que todas las localidades estudiadas de Ecuador, Perú y Chile, y en su conjunto, se caracterizan por una baja diversidad genética y una ausencia de estructura genética espacial, por lo tanto, se sugiere que existiría una unidad genética de D. gigas en el Océano Pacífico Sur. Esta baja diversidad genética estaría asociada a una expansión poblacional reciente (~40000 - 50000 años atrás) según los análisis realizados. La ausencia de estructura genética espacial se asocia a la alta vagilidad de tanto adultos como huevos y paralarvas de las jibias.



### ABSTRACT

This document reports the results achieved in the execution of the FIPA project No. 2020-20, whose general objective was to genetically identify the existence of one or more populations of *Dosidicus gigas* on the east coast of the South Pacific Ocean. Sampling was carried out in the northern, central and southern areas of Chile as agreed in the proposal. SUBPESCA's project advisors held meetings, a workshop on population genetics and participated in the SPRFMO meeting. The squid collected were of large size (> 60 mantle length), most of the males were immature and mature (stages 2 and 3), while all females were immature (stage 2). DNA extractions were successfully performed, and two mitochondrial genes were sequenced (COI and ND2) and SNPs were obtained. The results of the sequencing of the mitochondrial genes COI and ND2, and SNPs indicated that all the studied localities in Ecuador, Peru and Chile, and as a whole, are characterized by low genetic diversity and an absence of spatial genetic structure, therefore, it is suggested that there would be one genetic unit of *D. gigas* in the South Pacific Ocean. This low genetic diversity would be associated with a recent population expansion (~40000 - 50000 years ago) according to the analyses performed. The absence of spatial genetic structure is associated with the high vagility of both adults and eggs and paralarvae of jumbo squid.



# ÍNDICE GENERAL

INDICE ANEXO	7
OBJETIVO GENERAL	
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
ANTECEDENTES	
Antecedentes de la especie	
Historia de vida de <i>Dosidicus gigas</i>	
Estructura de tamaños e identidad genética	
Estudios genéticos en <i>Dosidicus gigas</i>	
Estructuración poblacional con distintos marcadores genéticos en D. gigas	
Justificación del estudio	
METODOLOGÍA DE TRABAJO POR OBJETIVO	
OBJETIVO 1: Elaborar y ejecutar una estrategia de muestreo para <i>Dosidicus gigas</i> Océano Pacífico Sur	en la costa Este del 26
Muestreos	
Mediciones biológicas y biométricas	
Muestreos para los análisis genéticos	
Protocolo para la toma de muestra para extracción de ADN	
Materiales	
Preparación de material previo a la salida a terreno	
METODOLOGIA PARA DESARROLLAR EL OBJETIVO 2: "Ejecutar técnicas de	análisis genético en
Dosidicus gigas que permitan la búsqueda de grupos genéticamente distintos en la cost	a Este del Océano
Pacífico Sur"	
Obtención de secuencias mitocondriales	
Extracción de ADN y amplificación de secuencias mitocondriales	
Obtención de marcadores SNPs	



METODOLOGIA PARA DESARROLLAR EL OBJETIVO 3: "Analizar la existencia de grupos
genéticamente diferentes de <i>Dosidicus gigas</i> en la costa Este del Océano Pacífico Sur"
Análisis de secuencias mitocondriales
Diversidad genética y genealogías de poblaciones
Estructura genética espacial
Análisis de marcadores SNPs
Diversidad genética
Estructura genética poblacional
METODOLOGIA PARA DESARROLLAR EL OBJETIVO 4: "Asesorar a la Subsecretaría de Pesca y
Acuicultura en materias relacionadas con la genética poblacional de Dosidicus gigas y sus respectivas
técnicas de análisis"
Asesoría
RESULTADOS POR OBJETIVO
OBJETIVO 1: Elaborar y ejecutar una estrategia de muestreo para <i>Dosidicus gigas</i> en la costa Este del Océano Pacífico Sur
Mediciones biológicas y biométricas
OBJETIVO 2: Ejecutar técnicas de análisis genético en Dosidicus gigas que permitan la búsqueda de
grupos genéticamente distintos en la costa Este del Océano Pacífico Sur 40
Extracción de ADN y amplificación de secuencias mitocondriales 40
Muestras para obtención de SNPs 43
OBJETIVO 3: Analizar la existencia de grupos genéticamente diferentes de Dosidicus gigas en la costa
Este del Océano Pacífico Sur 44
Análisis de secuencias mitocondriales
Diversidad genética



	47
Analisis genealogicos	
Estructura genética poblacional	
Flujo genético	58
Análisis de marcadores SNPs	
Diversidad genética	61
Estructura genética poblacional	
Inferencia Demográfica	65
OBJETIVO 4: Asesorar a la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura en materias relaciona	das con la
genética poblacional de Dosidicus gigas y sus respectivas técnicas de análisis	67
Curso-Taller "Genética aplicada al manejo de stocks pesqueros"	67
Expositores:	
Sesión 1 lunes 6 de septiembre, 9- 11 hrs	
Sesión 2 miércoles 8 de septiembre, 9-11 hrs	
Sesión 3 lunes 13 de septiembre, 9- 11 hrs	
Sesión 4 miércoles 15 de septiembre, 9- 11 hrs	
SPRFMO 2021. 9th Scientific Committee meeting	
Taller metodológico "Uso de marcadores moleculares de nueva generación (SNPs) para i	dentificación de
unidades genéticas poblacionales de Dosidicus gigas en el Pacífico Sur"	74
Taller de difusión de resultados del PROYECTO FIPA N° 2020-20 "GENÉTICA POBLA	ACIONAL DE
Dosidicus gigas PRESENTE EN TERRITORIO NACIONAL"	75
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	77
CONCLUSIONES	
ACTIVIDADES REALIZADAS	
DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS	
(1) Reunión de coordinación:	



(2)	Solicitud de Pesca de Investigación:	84
(3)	Búsqueda de secuencias en GenBank y otras bases de datos públicas:	84
(4)	Muestreos de jibia zona norte:	84
(5)	Muestreos de jibia zona centro:	84
(6)	Muestreos de jibia zona sur:	84
(7)	Obtención de tejido:	85
(8)	Extracción de ADN:	85
(9)	Reuniones de coordinación de equipo de trabajo:	85
(10)	Asesoría SUBPESCA:	85
(11)	Informes:	85
III. CO	MPOSICIÓN Y ORGANIZACIÓN DEL EQUIPO PROFESIONAL Y TÉCNICO	
REFER	ENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

## **INDICE ANEXO**

ANEXO 1 Acta de primera reunión	
ANEXO 2 Acta de reunión de coordinación	
ANEXO 3 Acta de tercera reunión	
ANEXO 4 Fotografías de los muestreos de jibia	
	100
ANEXO 4 Fotografías de trabajo en laboratorio	
ANEXO 4 Fotografías de trabajo en laboratorio ANEXO 5 Species profile <i>Dosidicus gigas</i>	
ANEXO 4 Fotografías de trabajo en laboratorio ANEXO 5 Species profile <i>Dosidicus gigas</i> Taxonomy	108 109 110
ANEXO 4 Fotografías de trabajo en laboratorio ANEXO 5 Species profile <i>Dosidicus gigas</i> Taxonomy Species characteristics	
ANEXO 4 Fotografías de trabajo en laboratorio ANEXO 5 Species profile <i>Dosidicus gigas</i> Taxonomy Species characteristics Distribution and depth range	
ANEXO 4 Fotografías de trabajo en laboratorio ANEXO 5 Species profile <i>Dosidicus gigas</i> Taxonomy Species characteristics Distribution and depth range Distribution within South Pacific area	
ANEXO 4 Fotografías de trabajo en laboratorio ANEXO 5 Species profile <i>Dosidicus gigas</i> Taxonomy Species characteristics Distribution and depth range Distribution within South Pacific area General habitat and behaviour	



Ref	erences	120
	Impacts of Fishing	119
	Genetic studies of the jumbo squid	118
	Parasites of the jumbo squid	118
	Role of species in the ecosystem	116
	Biological characteristics	113



# ÍNDICE TABLAS Y FIGURAS

# Tablas

<b>Tabla 1.</b> Partidores utilizados para amplificar los genes mitocondriales.    30
Tabla 2. Localidades en Chile donde se recolectaron ejemplares de D. gigas durante el desarrollo del
proyecto. Los animales fueron capturados mediante la pesca artesanal dedicada al recurso jibia 37
Tabla 3. Datos biométricos de los ejemplares de D. gigas (jibias) muestreados durante el desarrollo del
proyecto. MMS = estado de madurez sexual, E2 = estado inmaduro, E3= estado en maduración 39
Tabla 4. Concentraciones de ADN (ng/µl) y absorbancia (A) en las muestras de jibia. N: número de
individuos
Tabla 5. Número de muestras por sitio de muestreo enviadas a secuenciar con la técnica de
representación reducida DArTseq
Tabla 6. Resultados de los índices de diversidad genética de D. gigas, en base a los datos del gen COI,
calculados de los datos del 2021 y de 2005 a 2008. N: tamaño muestral; K: número de haplotipos; Hd:
diversidad haplotípica; S: número de sitios polimórficos; $\pi$ : diversidad nucleotídica; $\Pi$ : número promedio
de diferencias entre pares de secuencias
Tabla 7. Resultados de los índices de diversidad genética de D. gigas, en base a los datos del gen ND2,
calculados de los datos del 2021 y de 2005 a 2008. N: tamaño muestral; K: número de haplotipos; Hd:
diversidad haplotípica; S: número de sitios polimórficos; $\pi$ : diversidad nucleotídica; $\Pi$ : número promedio
de diferencias entre pares de secuencias
Tabla 8. Resultados de los Fst (debajo la diagonal) por pares de localidades (calculado desde las
frecuencias de haplotipos), y los respectivos valores de probabilidad (sobre la diagonal) estimados a
partir de 10100 permutaciones, y contrastado con un nivel significancia alfa corregido por Bonferroni:



un nivel significancia alfa corregido por Bonferroni:  $\alpha$ /N° comparaciones = 0.05/45,  $\alpha$ = 0.0011. Los Fst fueron calculados a partir de las secuencias de ND2 de D. gigas recolectados en diferentes localidades.

**Tabla 11.** Resultados de la Prueba del valor Exacto de Probabilidad (Fisher) entre pares de localidades,

 comprando los Fst con el gen ND2. La Prueba de diferenciación entre todos los pares de localidades fue

 realizada con una cadena de Markov de 1.000.000 de pasos, con un descarte de los 10.000 primeros

 pasos.
 50



**Tabla 14.** Resultados de  $\Phi$ st estimados a partir de las secuencias de ND2 de D. gigas recolectados en diferentes localidades. Los cálculos de  $\Phi$ st fueron realizados a partir del "Método de distancia": N° de diferencia entre secuencias por pares de localidades. Arriba de la diagonal: Valor P (probabilidad). Debajo de la diagonal: número promedio de diferencias por pares entre poblaciones ( $\Phi$ XY). Los valores de probabilidad fueron estimados a partir de 10100 permutaciones, y contrastado con un nivel Tabla 15. Resultados de  $\Phi$ st estimados a partir de las secuencias de ND2 de D. gigas recolectados en diferentes localidades. Los cálculos de  $\Phi$ st fueron realizados a partir del "Método de distancia": Número promedio de diferencia entre secuencias por pares de localidades. Arriba de la diagonal: Valor P (probabilidad). Debajo de la diagonal: diferencias promedio corregida por pares de localidades ( $\Phi$ XY- $(\Phi X + \Phi Y)$  /2)). Los valores de probabilidad fueron estimados a partir de 10100 permutaciones, y contrastado con un nivel significancia alfa corregido por Bonferroni:  $\alpha/N^{\circ}$  comparaciones = 0.05/55,  $\alpha$ = Tabla 16. Resultados del Análisis molecular de la varianza (AMOVA) con el gen COI, realizado entre cinco grupos que incluyen del Ecuador, Perú y 3 zonas de pesca de Chile (obtenidas en el 2021 y del 2005-2008. La sigla gl son los grados de libertad. ..... 56



Tabla 17. Resultados del Análisis molecular de la varianza (AMOVA) con el gen ND2, realizado entre
cinco grupos que incluyen del Ecuador, Perú y 3 zonas de pesca de Chile (obtenidas en el 2021 y del
2005-2008. La sigla gl son los grados de libertad
Tabla 18. Resultados del número efectivo de migrantes estimados con el gen COI, realizado entre todas
las localidades obtenidas en el período 2021 y del 2005-2008 desde Chile y Perú
Tabla 19. Resultados del número efectivo de migrantes estimados con el gen ND2, realizado entre todas
las localidades obtenidas en el período 2021 y del 2005-2008 desde Chile, Perú y Ecuador 59
Tabla 20. Diversidad genética obtenida a partir del análisis de SNPs. Para cada una de las localidades se
indica el tamaño muestral analizado, después de aplicar los filtros para obtener un set de datos de buena
calidad, además de la heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He), y las desviaciones estándar
indicadas como Ho (d.e.) y He (d.e.), respectivamente. Luego se indica el coeficiente de endocruzamiento
FIS, los alelos privados y la riqueza alélica 61
Tabla 21. Diferenciación entre pares de localidades. Bajo la diagonal se indican los valores de Fst
pareados, y sobre la diagonal, se indican los valores P. Se aplicó una corrección de Bonferroni para
corregir el valor de significancia ( $\alpha$ ) utilizado en comparaciones múltiples: el valor de $\alpha$ de 0,05 se dividió
por el número de comparaciones realizadas (15), obteniéndose un α final de 0,0033 62
<b>Tabla 22.</b> Análisis de AMOVA para estimar estructura genética en el set de datos de SNPs.       64
<b>Tabla 23.</b> Equipo de trabajo del proyecto FIPA Nº 2020-20.87
<b>Tabla 24.</b> Detalle de la asignación de actividades del personal profesional y técnico
Tabla 25. Asignación de horas hombre para el proyecto. Profesional técnico profesional y de
contabilidad



## **Figuras**

Figura 1. Hipótesis de las características de historia de vida de Dosidicus gigas en las aguas frente a Chile (extraído de Ibáñez et al. 2015). a) Escenario 1: los calamares adultos desovan en aguas oceánicas y los subadultos regresan a las aguas cercanas a la costa para alimentarse, crecer y madurar hasta alcanzar tamaños de madurez grandes. b) Escenario 2: los calamares adultos desovan y maduran en aguas Figura 2. Localidades donde se colectaron los ejemplares de D. gigas durante el desarrollo del presente proyecto (puntos fucsias) y localidades de donde se tenían muestras previamente recolectadas (puntos Figura 3. Gel de agarosa (2%) mostrando la integridad del ADN extraído de las muestras de tejido de jibias de Coquimbo (DGCB). En la primera columna a la izquierda, se agregó el estándar de tamaños de Figura 4. Gel de agarosa (2%) mostrando las bandas del producto de PCR. En la primera columna a la izquierda, se agregó el estándar de tamaños de fragmentos (ladder molecular). DGSA: Dosisidcus gigas, Figura 5. Red de haplotipos o network para los genes COI y ND2, realizados con datos de los periodos del 2021 y 2005-2008. Cada círculo representa un haplotipo diferente, el tamaño de cada círculo representa la frecuencia del haplotipo en la muestra (con su escala al costado de cada red), los colores indican las localidades en donde se encontró cada haplotipo, y la distancia entre haplotipos indica el Figura 6. Gráfico que muestra el número de grupos o poblaciones iteradas a partir de una función de densidad de probabilidades a posterior, obtenida a partir del análisis GENELAND para los datos COI y 





## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar genéticamente la existencia de una o más poblaciones o grupos poblacionales de *Dosidicus gigas* en la costa Este del Océano Pacífico Sur.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Elaborar y ejecutar una estrategia de muestreo para *Dosidicus gigas* en la costa Este del Océano Pacífico Sur.
- 2. Ejecutar técnicas de análisis genético en *Dosidicus gigas* que permitan la búsqueda de grupos genéticamente distintos en la costa Este del Océano Pacífico Sur.
- Analizar la existencia de grupos genéticamente diferentes de *Dosidicus gigas* en la costa Este del Océano Pacífico Sur.
- 4. Asesorar a la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura en materias relacionadas con la genética poblacional de *Dosidicus gigas* y sus respectivas técnicas de análisis.



### ANTECEDENTES

#### Antecedentes de la especie

El calamar Dosidicus gigas (d'Orbigny 1835), conocido en Chile como jibia, es una especie perteneciente a la Familia Ommastrephidae, que se caracteriza por alcanzar tamaños de hasta 1,2 m de longitud del manto, poseer una compleja estructura de tamaños, mostrar dimorfismo sexual, alta fecundidad, alta voracidad, y diferenciada proporción sexual (Nigmatullin et al. 2001; Keyl et al. 2008; Ibáñez et al. 2015). Este calamar se distingue de otros omastréfidos por su amplio rango geográfico latitudinal, que comprende desde Alaska hasta el sur de Chile en el Océano Pacífico oriental (Keyl et al. 2008; Ibáñez et al. 2015). Es una especie pelágica con una distribución batimétrica que abarca desde la superficie hasta los 1200 m (Nesis 1970; Nigmatullin et al. 2001). Su abundancia poblacional incrementa durante algunos años en los cuales puede ser capturado y constituir un importante recurso pesquero que aún no ha sido valorado ni estudiado a cabalidad (Ibáñez & Ulloa 2014). Su dinámica poblacional estaría relacionada con procesos denso-independientes que regularían la abundancia (**Ibáñez** et al. 2016), con las mayores concentraciónes de jibias en el Pacífico Sureste siendo registradas en áreas altamente productivas donde se encuentran los componentes basales de su dieta, constituida por camarones y cangrejos pelágicos, peces, e incluso calamares (Chong et al. 2005; Ibáñez et al. 2008; Ibáñez & Keyl 2010; Pardo-Gandarillas et al. 2014; Bruno et al. 2021). Por tal razón, la jibia es considerada como una especie con un amplio nicho trófico no-selectivo, que incluye canibalismo, y con altas tasas de consumo (Ibáñez 2013; Bruno et al. 2021).

La especie *Dosidicus gigas* es considerada un recurso marino de gran importancia económica, representando la tercera parte de los desembarques de calamares a nivel mundial (Arkhipkin et al. 2015),



y con una alta demanda de la industria pesquera a nivel nacional (**Ibáñez** & Ulloa 2014). Debido a su amplia distribución en el Pacífico Oriental, varios países (i.e., México, Perú, Chile) explotan comercialmente esta especie, transformándose en la última década en un recurso pesquero de alta relevancia en Chile debido a la extracción y de exportación con fines de consumo humano (**Ibáñez** & Ulloa 2014).

### Historia de vida de Dosidicus gigas

La estrategia reproductiva de la jibia corresponde a la de un desovante múltiple, donde la puesta de huevos ocurre en diferentes períodos, con crecimiento somático entre los distintos eventos y donde los machos maduran sexualmente antes que las hembras (Nesis 1970; Rocha et al. 2001; Ibáñez & Cubillos 2007). En Chile durante la década del 90 se detectaron ejemplares maduros durante todo el año, indicando que la reproducción no es estacional (González & Chong 2006), mientras que en las últimas décadas los reportes de jibia en la zona costera sugieren que se alimenta para crecer, migrando a zonas oceánicas para alcanzar la madurez y desovar (Ibáñez et al. 2015; 2019). Las puestas (masas de huevos) pueden alcanzar unos 3 a 4 m de diámetro y contienen entre 0.6 a 2 millones de huevos (Staaf et al. 2008; Birk et al. 2017). En general las paralarvas de cefalópodos son más abundantes cerca de la costa de Chile (Carrasco et al. 2012, Pardo-Gandarillas et al. 2016) o cerca de las costas de islas oceánicas (Carrasco et al. 2019, 2020), pero en particular las paralarvas de D. gigas solo se han reportado en aguas oceánicas frente a Chile (Ibáñez et al. 2015). Las masas de huevos, paralarvas y juveniles migran pasivamente arrastrados por las corrientes, pero los adultos se desplazan activamente desde sus zonas de alimentación a las zonas de desove a velocidades que varían entre 5 y 25 km por hora (Nesis 1970; Nigmatullin et al. 2001; Keyl et al. 2008; **Ibáñez** et al. 2015). Estas migraciones son masivas, y se ha propuesto un



desplazamiento de las poblaciones de *D. gigas* hacia el norte y noreste desde zonas oceánicas al Golfo de California durante invierno y primavera, para luego regresar en sentido opuesto durante el verano y otoño del hemisferio norte (Ehrhardt et al. 1983). Desplazamientos similares se observan desde el Pacífico ecuatorial hacia las costas de Perú durante primavera y verano del hemisferio sur; como también desde la costa hacia zonas oceánicas en Chile y Perú (Nesis 1970; **Ibáñez** & Cubillos 2007; Alegre et al. 2014). Estos estudios indican que *D. gigas* es una especie caracterizada por una gran vagilidad durante sus diferentes estados ontogénicos (e.g., masas de huevos, paralarvas y adultos), características que tienen una gran influencia en su estructura genética espacial (**Ibáñez** et al. 2011; **Ibáñez** & Poulin 2014).

### Estructura de tamaños e identidad genética

La estructura de tamaños de *D. gigas* es multimodal, variando tanto espacial como temporalmente (Nigmatullin et al. 2001; Chong et al. 2005; **Ibáñez** & Cubillos 2007; Keyl et al. 2008; **Ibáñez** et al. 2019). Varios autores han indicado la posibilidad de que los grupos de calamares que maduran a diferentes tamaños representen unidades genéticamente discretas, pudiendo llegar a corresponder a diferentes poblaciones (Argüelles et al. 2001; Nigmatullin et al. 2001; Key et al. 2008). Sin embargo, estudios moleculares realizados en especímenes de diferentes etapas de madurez sexual recolectados en Perú y México han mostrado que estos fenotipos no son genéticamente diferentes, ya sea utilizando secuencias mitocondriales (Sandoval-Castellanos et al. 2009) como microsatélites (Sánchez et al. 2016). De esta manera, se pudo descartar la existencia de poblaciones diferentes basadas en los tamaños de madurez sexual, y comprobar que la gran flexibilidad fenotípica de esta especie tendría como resultado la amplia variabilidad en tamaños de madurez sexual (Argüelles et al. 2008; Hoving et al. 2013). Más aún, **Ibáñez** et al. (2015) proponen la hipótesis que los efectos epigenéticos impulsados por la



temperatura del mar durante el desarrollo embrionario serían los responsables de esta alta flexibilidad en el tamaño de madurez sexual en *D. gigas* (Figura 1). La plasticidad y flexibilidad fenotípicas se han observado en especies marinas de aguas templadas que experimentan una gran variación temporal y espacial en la temperatura de su hábitat (Piersma & Drent 2003, Somero 2005). En este contexto, las fuerzas epigenéticas parecen ser un mecanismo central que promueve la plasticidad del desarrollo, ya que se ha demostrado que factores ambientales como la temperatura y la nutrición influyen en las pautas de metilación del genoma en invertebrados marinos, alterando las tasas de expresión de los genes (Somero 2005, Harvey et al. 2014). En el caso de *D. gigas*, la temperatura del agua de la zona de desove y la calidad del alimento de las paralarvas podrían ser importantes para determinar el tamaño final de madurez (**Ibáñez** et al. 2015). Se ha evidenciado que el tamaño de las paralarvas recién eclosionadas es menor cuando la temperatura del agua es mayor (>17°C), alcanzando la madurez a menor tamaño y edad (Pecl & Jackson 2008, Arkhipkin et al. 2015).

Por otro lado, al comparar secuencias de ADN de paralarvas, juveniles y adultos de cefalópodos, no se han encontrado diferencias genéticas significativas dentro de una población. Por lo mismo, esta técnica ha permitido identificar las especies de cefalópodos durante los primeros estadios de desarrollo, i.e. el estado de paralarva (**Pardo-Gandarillas** et al. 2016, **Carrasco** et al. 2019, 2020). Esto refuerza la idea de que NO es relevante el tamaño corporal y/o la madurez sexual de los individuos al momento de hacer estudios genético-poblacionales.





**Figura 1**. Hipótesis de las características de historia de vida de *Dosidicus gigas* en las aguas frente a Chile (extraído de Ibáñez et al. 2015). a) Escenario 1: los calamares adultos desovan en aguas oceánicas y los subadultos regresan a las aguas cercanas a la costa para alimentarse, crecer y madurar hasta alcanzar tamaños de madurez grandes. b) Escenario 2: los calamares adultos desovan y maduran en aguas oceánicas alcanzando tamaños de madurez pequeños.



### Estudios genéticos en Dosidicus gigas

Recientes estudios filogenéticos de ADN mitocondrial han confirmado que el calamar gigante Dosidicus gigas pertenece a la subfamilia Ommastrephinae (Pardo-Gandarillas et al. 2018a). En cuanto a la estructura genética dentro de esta especie, se ha sugerido la existencia de dos unidades genéticas; una en el hemisferio norte (México-EE. UU.) y otra en el hemisferio sur (Perú-Chile), que se explican por un modelo de aislamiento por distancia (Sandoval-Castellanos et al. 2007, 2010; Staaf et al. 2010). En la población del hemisferio sur, los estudios que han utilizado el gen mitocondrial del citocromo b (Cyt b) y marcadores RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) evidenciaron diferencias genéticas entre calamares capturados en Perú y los capturados en Chile (Sandoval-Castellanos et al. 2007, 2010). Por el contrario, utilizando secuencias de genes mitocondriales Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) y NADH deshidrogenasa 2 (ND2), estudios sugieren un alto flujo genético entre las poblaciones de Chile y Perú, formando una misma unidad genética (Ibáñez et al. 2011; Ibáñez & Poulin 2014; Sánchez et al. 2016). Por otra parte, una investigación reciente que analizó secuencias del gen mitocondrial ND2 y microsatélites, sugirió la existencia de tres unidades genéticas en el centro de la distribución de la especie, incluyendo las poblaciones de Costa Rica, Ecuador y Perú (Sánchez et al. 2020). Sin embargo, el tamaño muestral no fue homogéneo para todas las localidades, lo que podría generar un sesgo en la interpretación de los resultados.

Todos los estudios realizados hasta la fecha son coherentes al encontrar una baja diversidad genética general, lo que sugiere una expansión demográfica entre el último período glacial y el actual interglacial (Sandoval-Castellanos et al. 2010; **Ibáñez** et al. 2011; **Ibáñez** & Poulin 2014; Sánchez et al. 2016, 2020). Bajos niveles de diversidad genética en animales marinos con grandes tamaños



poblacionales son inusuales, y generalmente ocurren en aquellos que han pasado por drásticas reducciones en el tamaño poblacional, cuellos de botella, o eventos fundadores y que están en proceso de expansión demográfica (Haye et al. 2014; **Oyarzún** et al. 2016; **Pardo-Gandarillas** et al. 2018a, b, c). En este sentido, la variación histórica de la productividad primaria a lo largo del sistema de la corriente de Humboldt habría causado fluctuaciones históricas en el tamaño de la población de *D. gigas* y en su rango de distribución (**Ibáñez** et al. 2011; **Ibáñez** & Poulin 2014). En consecuencia, las grandes poblaciones de calamares actuales son el resultado de expansiones poblacionales relativamente recientes, ya que su diversidad genética todavía no ha alcanzado nuevos niveles de equilibrio (**Ibáñez** et al. 2011; **Ibáñez** & Poulin 2014). Recientemente, Xu et al. (2020) desarrollaron marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) obtenidos mediante la técnica de secuenciación de representación reducida GBS (genotyping-by-sequencing) para ejemplares de *D. gigas* recolectados frente a Ecuador, Perú y Chile. Dicho estudio logró la amplificación exitosa de un subset de 101 SNPs en 108 especímenes, mostrando niveles variados de diversidad (heterocigosidad observada = 0,0 a 1,0; heterocigosidad esperada= 0,03 a 0,5).

### Estructuración poblacional con distintos marcadores genéticos en D. gigas

Las diferencias en los patrones de estructuración genética detectados hasta la fecha en *D. gigas* (indicados en el punto anterior) pueden deberse a la resolución de los marcadores moleculares utilizados y/o a los tamaños muestrales considerados en cada estudio. Por ejemplo, si bien la utilidad de los marcadores RAPDs radica en la obtención de pequeñas secuencias dispersas a lo largo del genoma, tienen la desventaja de ser poco reproducibles porque son muy dependientes de las condiciones de PCR (Butler 2012). Por otra parte, el marcador cyt b ha mostrado baja diversidad en esta especie, por lo que no



permitiría discriminar diferenciación genética a fina escala. En este sentido, la utilización de los genes COI y ND2 han mostrado ser marcadores más adecuados para este tipo de estudios, por lo que serían una mejor alternativa a los anteriores.

El desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva ha ayudado a resolver algunos de estos problemas al permitir el análisis de cientos o miles de loci, en lugar de unas pocas decenas. Una de estas técnicas son las de representación reducida del tipo RAD-seq (restriction site-associated DNA sequencing) o GBS (genotyping by sequencing), que reúnen a una amplia gama de técnicas en que se secuencian regiones asociadas a sitios de corte de enzimas de restricción (Andrews et al. 2016). Estas técnicas utilizan una o dos enzimas de restricción para digerir el ADN, y luego se seleccionan fragmentos de un tamaño adecuado que son posteriormente secuenciados. La razón por la que se digiere el ADN es porque los sitios de restricción están dispersos por todo el genoma, lo que permite hacer un escaneo de la variabilidad a nivel genómico, y al ser conservados, son compartidos entre individuos de una misma especie o especies cercanamente relacionadas, permitiendo el análisis de varios individuos a la vez (Andrews et al. 2016). Estas características las hacen ser herramientas muy útiles para aplicar a estudios ecológicos y evolutivos considerando muestreos poblacionales. Adicionalmente, un escaneo del genoma es menos costoso que la obtención de genomas completos. Sin embargo, su costo sigue siendo mucho más alto que la secuenciación de genes mitocondriales. Es por ello, que este tipo de marcadores sigue siendo útil en estudios de detección de grupos genéticos en especies de amplias distribuciones geográficas, como la de D. gigas, porque es posible analizar muchos más individuos a un precio mucho menor.

Hasta el momento, sólo existe un trabajo publicado en que se ha aplicado este tipo de técnicas en *D. gigas* y corresponde a Xu et al. (2020) mencionado en la sección anterior. En este trabajo sólo se indicaron los niveles medios o bajos de diversidad encontrados. Resultados no publicados del mismo



grupo de investigadores, y presentados en el Segundo workshop de jibias (Second Squid Workshop) 2019 de la Organización Regional de Pesca del Pacífico Sur (ORP-PS, o SPRFMO por sus siglas en inglés), indican que no existirían grupos genéticos diferenciados por tamaño de madurez ni geográficamente (SPRFMO, 2019). En esta misma reunión, se sugirió el aumento del tamaño muestral a analizar, con algunas de las técnicas de secuenciación de representación reducida. Estos aspectos son abordados en la presente propuesta.

En conclusión, una estrategia ideal para el estudio de la estructura genética en *D. gigas* es la utilización de ambas técnicas, (1) secuenciación de genes mitocondriales (i.e. COI y ND2) que permitirán la detección de grupos genéticos a gran escala y la historia demográfica, además de (2) complementar con una técnica de representación reducida (i.e. SNPs), que permita el análisis de muchos más loci para una detección más fina de los grupos genéticos.

### Justificación del estudio

En atención a los acuerdos establecidos por Chile en la Organización Regional de Pesca del Pacífico Sur (ORP-PS) respecto de mejorar el conocimiento del recurso jibia o calamar rojo (*Dosidicus gigas*) en lo relacionado con la genética poblacional de los ejemplares capturados en la Zona Económica Exclusiva del territorio nacional, nace la necesidad de conocer cuántas poblaciones o grupos genéticamente distintos existen en la región para poder establecer unidades de gestión pesquera en el Océano Pacífico Sur y así mejorar el manejo conjunto de esta especie. Por último, la ejecución de este proyecto será de vital importancia para la comparación de datos entre Chile y los demás países de la ORP-PS que buscan mejorar el conocimiento de este ámbito, con el único fin de (i) manejar con mayor eficiencia este recurso



compartido entre naciones, disminuyendo la incertidumbre genética entre las unidades de gestión pesquera existentes, y (ii) mejorar confianzas entre los actores involucrados internacionalmente.



## METODOLOGÍA DE TRABAJO POR OBJETIVO

# **OBJETIVO 1: Elaborar y ejecutar una estrategia de muestreo para** *Dosidicus gigas* en la costa Este del Océano Pacífico Sur.

### Muestreos

Se realizaron muestreos en tres zonas de Chile Estos sitios fueron seleccionados sobre la base de los principales puertos de desembarque de *D. gigas* en los últimos dos años. Los muestreos se efectuaron en las siguientes zonas: zona norte (Región de Coquimbo), zona centro (Región de Valparaíso) y zona sur (Región del Biobío). Es importante destacar que los muestreos se realizaron dentro de la zona de pesca artesanal entre 5 a 90 m de profundidad. Además, los animales fueron capturados mediante pesca directa realizada por los integrantes del equipo o mediante el apoyo de los sindicatos de pescadores de las localidades propuestas.

### Mediciones biológicas y biométricas

En cada localidad se recolectaron entre 20 y 40 individuos de diferentes tamaños (70 - 85 cm LM) siguiendo las indicaciones de Tafur et al. (2016), es decir cada calamar fue sexado, se les medió la longitud del manto (LM) y además se determinó el estado de madurez gonadal para machos y hembras según la escala propuesta por Perea et al. (2018).



### Muestreos para los análisis genéticos

A partir de las muestras de jibia que se recolectaron en cada localidad (total = 130), se extrajo un trozo de tejido del manto para su fijación en soluciones específicas para cada análisis genético como se detalla a continuación.

### Protocolo para la toma de muestra para extracción de ADN

### Materiales

Se utilizaron dos soluciones para fijar las muestras genéticas. El primero es <u>RNAlater</u> (Thermo Fisher Scientific) que es una solución acuosa que evita la degradación de ARN y ADN. Normalmente se utiliza para fijar tejidos que serán utilizados en secuenciaciones genómicas. Otra ventaja es que puede ser almacenado a temperatura ambiente, por lo que es una excelente solución para transportar a terreno. También se utilizó <u>Etanol 96%</u>, que permite la preservación de ADN para la amplificación de los genes mitocondriales (ver más adelante).

### Preparación de material previo a la salida a terreno

Se agregó 1 ml de RNAlater a tubos de 2 ml, tapa rosca (i.e. criotubos). Luego, se ordenaron los tubos en cajas plásticas de 50 posiciones y se agregaron tubos extra vacíos. Se lleva RNAlater en caso de ser necesario rellenar algún tubo en terreno.

En el sitio de muestreo o en un laboratorio, una vez que los individuos de *D. gigas* han sido capturados se procede de la siguiente manera. Las muestras fueron manipuladas con guantes de látex o vinilo para evitar la contaminación. Cada muestra de tejido se manipuló con pinzas y se cortarán con



tijeras de disección o bisturís. Para ello, antes de iniciar el procedimiento en cada animal, el material de disección fue esterilizado con alcohol (96%) o con RNAlater, según corresponda.

De cada individuo muestreado se extrajeron tres trozos de tejido del manto: (1) uno de aproximadamente 4 cm<sup>2</sup> fue preservado en etanol 96%, y mantenido a temperatura ambiente, hasta el momento de la extracción de ADN, (2) el segundo trozo de tejido se preservó en RNAlater de acuerdo con las especificaciones del fabricante (en 5 volúmenes de RNAlater se agregará 1 volumen de tejido - 0,2 cm<sup>2</sup> en 1 ml de RNAlater). El tejido debe ser cortado lo más pequeño posible para generar una mayor cantidad de superficie expuesta a RNAlater, y (3) se tomó una tercera muestra que se guardó en RNAlater como respaldo. Es apropiado mencionar que las muestras pueden ser mantenidas hasta una semana a temperatura ambiente, y luego pueden guardarse a -80°C, para obtener una mayor preservación del ADN hasta el momento de la extracción. A -80°C las muestras pueden estar preservadas durante años.

Declaramos que para esta propuesta estuvieron a disposición 252 muestras de tejido muscular (manto) de *D. gigas* provenientes de ocho localidades de Chile y Perú. Estas muestras fueron obtenidas entre los años 2005 y 2014. Todas las muestras se encuentran preservadas en etanol 96% y en óptimas condiciones para el uso de estudios de genética de poblaciones. Este material ayudará en gran medida a delimitar de manera robusta los grupos genéticos en la costa Este del Océano Pacífico Sur (objetivo 2 y 3).



METODOLOGIA PARA DESARROLLAR EL OBJETIVO 2: "Ejecutar técnicas de análisis genético en *Dosidicus gigas* que permitan la búsqueda de grupos genéticamente distintos en la costa Este del Océano Pacífico Sur"

### Obtención de secuencias mitocondriales

Para dar cumplimiento a los objetivos planteados en este proyecto, se propuso el análisis de dos tipos de marcadores moleculares basados en secuencias de **ADN mitocondrial**. Es importante mencionar que los cefalópodos carecen de la región control (o d-loop) bien definido en su genoma mitocondrial (Akasaki et al. 2006), por lo tanto, no es posible estudiar esta región, como es sugerido en las bases técnicas. Por lo mismo, se procedió a secuenciar otros genes mitocondriales como citocromo oxidasa I (COI) y NADH deshidrogenasa 2 (ND2), que han sido usados exitosamente en *D. gigas* para estudios filogeográficos (Staaf et al. 2010; **Ibáñez** et al. 2011; Sánchez et al. 2016). Además, estos marcadores tienen distintas tasas de mutación en los cefalópodos por lo tanto tienen una diversidad nucleotídica diferente siendo el COI más lento y menos diverso ( $\pi = 0.345$ ) que ND2 ( $\pi = 0.533$ ) (Cheng et al. 2013).

### Extracción de ADN y amplificación de secuencias mitocondriales

Para la obtención de secuencias mitocondriales, el ADN total se extrajo siguiendo el protocolo de extracción salina (Alhjanabi & Martínez 1997). Se utilizaron los partidores universales diseñados por Folmer et al. (1994) y Staaf et al. (2010) para amplificar los genes mitocondriales citocromo oxidasa I (COI) y NADH deshidrogenasa 2 (ND2) (Tabla 1). Para ello, se realizaron reacciones por PCR para cada muestra, las que incluiyeron 0,3 µl de Taq polimerasa (1,5 unidades), 2,5 µl de buffer 10X (50 mM KCl,



10 mM Tris-HCl, pH 8,0), 2 µl de dNTPs 10 µM, 1 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, y 0,5 µl de cada partidor (10 pg/µl). Estas reacciones se llevarán a cabo en el siguiente ciclo térmico: después de una desnaturalización inicial (3 min a 94° C), las mezclas de reacción se someterán a 35 ciclos de 94° C por 40 s, 48° C por 40 s y 72° C por 60 s, seguidos de una extensión final a 72° C por 7 min. Los productos de PCR se purificaron con el sistema Wizard<sup>TM</sup> Prep (Promega) siguiendo los protocolos del fabricante. Los productos de PCR purificados se secuenciaron automáticamente en la empresa Macrogen Inc (Corea del sur). Las secuencias se editaron en el programa ProSeq v.2.9 (Filatov 2002). Luego se verificó el marco de lectura utilizando el código genético mitocondrial de invertebrados en el programa en MEGA X.

Partidor	Dirección 5'-3'	Referencia
LCO1490-forward	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer et al. 1994
HCO2198-reverse	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer et al. 1994
SqSF-forward	GCTGCTAACTTTATTTTGAGC	Staaf et al. 2010
DCOR2-reverse	ATTAGTCTTAGAGAAGTTCC	Staaf et al. 2010

Tabla 1.	Partidores	utilizados	para ami	plificar lo	os genes	mitocondriales.
I WOIN II	I altidoleb	atilizadoo	para am	pillioui ic	Jo Selleo	millio comanales.

### **Obtención de marcadores SNPs**

Para el cumplimiento de este objetivo también se propuso el análisis de SNPs obtenidos mediante una secuenciación de representación reducida que permite realizar un escaneo de la diversidad a nivel genómico. Para esto, se optó por la técnica de DArTseq ofrecida por la empresa Diversity Arrays



Technology Pty Ltd (DArT PL) ubicada en Canberra, Australia. Esta empresa cuenta con la patente US Patent no 6,713,258 B2 de la técnica "Genotyping by hybridisation".

Se enviaron 25 mg de muestras de tejido del manto de *D. gigas* de individuos de Perú y Chile a DArT PL. Las muestras fueron enviadas en etanol 96%. La empresa realizó la extracción de ADN y la secuenciación. La técnica de secuenciación implica la generación de una librería de ADN mediante la digestión del ADN con pares de enzimas de restricción. Luego, se agregaron adaptadores a los fragmentos obtenidos que permiten la secuenciación en la plataforma Illumina, además de una secuencia "barcode" para diferenciar entre las distintas muestras o individuos. Posteriormente, se realizó la secuenciación de fragmentos de 75 pb. Finalmente, la empresa aplicó filtros de calidad al set de datos brutos y entregó un set de datos de secuencias truncadas de 69 pb que incluyen al menos un marcador SNP en ellas. Este set de datos fue revisado y filtrado para obtener secuencias y SNPs de buena calidad con el paquete dartR (Gruber et al. 2018). Los filtros que se aplicaron son: un umbral de 0,99 de repetibilidad, loci presentes en al menos el 90% de las muestras, se aceptó sólo un 15% de loci faltantes por individuo (missing data), se consideró sólo un SNP por secuencia, y se consideraron secuencias de largo entre 20 y 69 pb.



# METODOLOGIA PARA DESARROLLAR EL OBJETIVO 3: "Analizar la existencia de grupos genéticamente diferentes de *Dosidicus gigas* en la costa Este del Océano Pacífico Sur"

### Análisis de secuencias mitocondriales

Diversidad genética y genealogías de poblaciones

A partir de las secuencias de mitocondriales (COI y ND2), se estimaron índices de diversidad estándar como el número de haplotipos (H), el número de sitios polimórficos (S), la diversidad de haplotipos (Hd), el número medio de diferencias por pares ( $\prod$ ), así como la diversidad de nucleótidos ( $\pi$ ) para cada lugar utilizando el programa Arlequin ver 3.5 (Excoffier et al. 2005).

Las relaciones genealógicas entre los haplotipos de distintas regiones del Pacífico sudoriental se evaluaron mediante la construcción de redes de haplotipos de unión mediana utilizando los datos de la secuencia de COI y ND2 en la versión Beta de Hapview (Salzburger et al. 2011).

### Estructura genética espacial

Para evaluar la estructura genética en *D. gigas*, se calcularon los índices de fijación FST por pares entre los lugares de muestreo. La significancia estadística de los valores de FST por pares se calculó utilizando 10.000 permutaciones en el programa Arlequin. Además, para detectar la estructura geográfica entre las muestras, realizamos un análisis de varianza molecular (AMOVA, Excofier et al. 1992) utilizando Arlequin. AMOVA compara grupos de poblaciones que maximizan el componente "entre grupos" de la



varianza genética total y reducen el componente "entre poblaciones dentro de los grupos". La significación de los valores del índice de fijación FST "entre localidades", FSC "entre grupos" y FCT "entre localidades dentro de un grupo" se calculó mediante un procedimiento de permutación no paramétrico con 10000 iteraciones.

Alternativamente, para detectar la estructura geográfica entre las muestras, realizamos un análisis espacial de la variación genética usando el paquete Geneland 4.0.2 (Guillot et al. 2008) implementado en R 4.0.2 (R Core Team, 2020). Este análisis estima cuántos grupos (K) o poblaciones se pueden encontrar en el Pacífico sudoriental (usando COI, NAD2 y los datos de SNPs) utilizando una Cadena de Markov y Monte Carlo (MCMC) con 50 millones de iteraciones y estimando los parámetros cada 10.000 iteraciones. Estos análisis se realizaron utilizando modelos tanto de frecuencias no correlacionadas (vectores de frecuencia de haplotipos mutuamente independientes entre poblaciones) como de frecuencias correlacionadas. Después de la ejecución la convergencia de los análisis se corroboró en el programa Tracer ver1.5 (Rambaut & Drummond 2009) utilizando un 10% de quemado (burn-in) El modelo con el mayor log10 de los Bayes factor (BF, Kass & Raftery 1995) fue elegido en el software Tracer.

Finalmente, se estimó el flujo genético y las tasas de migración entre localidades mediante dos aproximaciones utilizando el programa DNAsp v6.12 (Rozas et al. 2017) bajo un modelo de islas de estructura poblacional. Primero mediante el uso de las frecuencias de haplotipos por localidades usando los métodos de Nei (1973) usando Gst (Hudson et al. 1992), y luego mediante las diferencias nucleotídicas ( $\pi$ ) según Nei (1982) y utilizando Nst según Lynch & Crease (1990).



### **Diversidad genética**

Una vez obtenido un set de datos de SNPs totales y por individuo de buena calidad se procedió a la estimación de diferentes índices de diversidad por localidad de muestreo: heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He), índice de endogamia (FIS), número de alelos privados y la riqueza alélica.

### Estructura genética poblacional

Para estimar la existencia de grupos genéticamente diferentes en *D. gigas*, se realizaron análisis de estructuración genética. Primero, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para observar grupos genéticos, gráficamente. Posteriormente, se realizó un AMOVA (Excofier et al. 1992) para estimar si existe estructuración genética dentro del set de datos analizados. Luego, se estimaron los índices de diferenciación FST por pares de lugares de muestreo. La significancia de los valores de FST se calculó con 10.000 permutaciones.



# METODOLOGIA PARA DESARROLLAR EL OBJETIVO 4: "Asesorar a la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura en materias relacionadas con la genética poblacional de *Dosidicus gigas* y sus respectivas técnicas de análisis"

### Asesoría

Para dar cumplimiento al objetivo específico 4 nuestro equipo de trabajo estuvo en permanente comunicación con la contraparte técnica de SUBPESCA con la intención de proporcionar respuestas a los requerimientos que la subsecretaria tenga en las materias que involucren al proyecto. Comprendemos que es importante que nuestro equipo se esfuerce en explicar los análisis y resultados genéticos a la subsecretaria y FIPA para que sean utilizados como una herramienta pesquera.



## **RESULTADOS POR OBJETIVO**

# **OBJETIVO 1: Elaborar y ejecutar una estrategia de muestreo para** *Dosidicus gigas* en la costa Este del Océano Pacífico Sur

Para cumplir con este objetivo, se realizaron cuatro muestreos que incluyeron las zonas geográficas que abarca la distribución de la jibia en Chile, todos con un tamaño muestral adecuado (19-43 calamares) y acorde a los estudios genéticos-poblacionales relacionado con los objetivos 2 y 3. Los muestreos se efectuaron en las siguientes zonas: zona norte (Región de Coquimbo), zona centro (Región de Valparaíso) y zona sur (Región del Biobío) (ver Tabla 2, Figura 2). Las muestras se recolectaron en los sitios y meses que el recurso jibia estuvo disponible para su pesca (ver carta Gantt), mediante el uso de botes con motor fuera de borda de pescadores artesanales. Es importante destacar que los muestreos se realizaron dentro de la zona de pesca artesanal que opera en las primeras millas náuticas entre 5 a 90 m de profundidad. Los calamares fueron recolectados de la pesca artesanal y muestreados por los integrantes del equipo (ver registro fotográfico en anexos). Adicionalmente, se recolectaron jibias provenientes de Ecuador, se extrajo tejido del manto, y se almacenó a -20°C para estudios genéticos. Estos muestreos fueron realizados por uno de los investigadores extranjeros invitados (Dr. Sebastián Hernández, Universidad Veritas, Costa Rica) a partir de las capturas de los pescadores artesanales en el puerto de Puerto López (Ecuador).


**Tabla 2.** Localidades en Chile donde se recolectaron ejemplares de *D. gigas* durante el desarrollo del proyecto.Los animales fueron capturados mediante la pesca artesanal dedicada al recurso jibia.

Localidades	Zona	Ν	Fecha	Latitud	Longitud
Duarta Lápaz	Faundor	15	01/00/2021	1 551822	80.818061
r uerto Lopez	Ecuador	15	01/09/2021	-1.551655	-00.010001
Coquimbo	Norte Chile	35	24/05/2021	-29.939298	-71.393847
Quintay	Centro Chile	19	05/05/2021	-33.196898	-71.721886
San Antonio	Centro Chile	33	01/04/2021	-33.602117	-71.97447
Lebu	Sur Chile	43	03/06/2021	-37.602265	-73.67535





**Figura 2.** Localidades donde se colectaron los ejemplares de *D. gigas* durante el desarrollo del presente proyecto (puntos fucsias) y localidades de donde se tenían muestras previamente recolectadas (puntos verdes).



## Mediciones biológicas y biométricas

En cada localidad se recolectaron entre 19 y 43 individuos de diferentes tamaños (40 - 85 cm LM). A pesar de que estas estimaciones no se utilizarán en los análisis genéticos, son estimaciones estándares que se proporcionan para describir los ejemplares recolectados. La proporción sexual estuvo ligeramente sesgada hacia las hembras (1.05-1.37; ver Tabla 3). Todas las hembras recolectadas se encontraban inmaduras, mientras que los machos en estados inmaduros y en maduración.

Tabla 3. Datos biométricos de los ejemplares de *D. gigas* (jibias) muestreados durante el desarrollo del proyecto.MMS = estado de madurez sexual, E2 = estado inmaduro, E3= estado en maduración.

Localidades	N	Hembras LM (cm)	Machos LM (cm)	Hembras EMS	Machos EMS
Puerto López	15	40-51	41-49	E2 (10)	E3 (5)
Coquimbo	35	63-84	66-87	E2 (18)	E2 (8), E3 (9)
Quintay	19	75-83	71-79	E2 (11)	E2 (8)
San Antonio	33	59-74	63-73	E2 (17)	E2 (16)
Lebu	43	67-86	69-84	E2 (23)	E2 (7), E3 (13)



**OBJETIVO 2: Ejecutar técnicas de análisis genético en** *Dosidicus gigas* que permitan la búsqueda de grupos genéticamente distintos en la costa Este del Océano Pacífico Sur

# Extracción de ADN y amplificación de secuencias mitocondriales

Para la obtención de secuencias mitocondriales, el ADN total se extrajo siguiendo el protocolo de extracción salina descrito por Alhjanabi & Martínez (1997). Se realizaron extracciones de ADN de 191 individuos. Las muestras de jibias recolectadas estaban en buenas condiciones, presentando altas concentraciones de ADN (>500 ng/µl) y una adecuada proporción de absorbancia 260/280 (~2.0) que indica la pureza del ADN extraído (Tabla 4). La integridad del ADN también se verificó con un gel de agarosa 2% (Fig. 3).

Localidad	Año	Ν	A260/A280	A260/A280	Concentración	Concentración
	captura		Mín.	Máx.	(ng/µl) Mín.	(ng/µl) Máx.
Huarmey, Perú	2008	27	1.95	2.07	100.1	1582.0
Perú Central	2009	13	1.85	2.06	1067.8	2447.4
Callao, Perú	2008	39	1.88	2.07	130.00	2103.5
Coquimbo, Chile	2021	29	1.89	2.03	80.3	507.4
Valparaíso, Chile	2008	29	1.99	2.09	114.3	866.1
San Antonio, Chile	2021	33	1.98	2.09	263.2	773.1
Isla Quiriquina, Chile	2010	21	1.88	2.08	80.0	658.9

**Tabla 4.** Concentraciones de ADN (ng/µl) y absorbancia (A) en las muestras de jibia. N: número de individuos.



Los resultados de PCR, de acuerdo con la metodología propuesta por Ibáñez et al. (2011), obtuvieron bandas únicas para cada individuo que se pueden apreciar en el gel de agarosa de la Figura 4.



**Figura 3.** Gel de agarosa (2%) mostrando la integridad del ADN extraído de las muestras de tejido de jibias de Coquimbo (DGCB). En la primera columna a la izquierda, se agregó el estándar de tamaños de fragmentos (ladder molecular).



Ladder	DGSA10	DGSA06 DGSA04	DGSA07	DGSA05	DGSA11	DGSA15	DGSA16	DGSA18	DGSA19	DGSA22	DGSA25	Control (+) DGSA08	Control (-)
12		-			No.	-	tising				-		

Figura 4. Gel de agarosa (2%) mostrando las bandas del producto de PCR. En la primera columna a la izquierda,

se agregó el estándar de tamaños de fragmentos (ladder molecular). DGSA: Dosisidcus gigas, San Antonio.



## Muestras para obtención de SNPs

En total, se enviaron 188 muestras de tejidos a secuenciar (Tabla 5) mediante la técnica DArTseq a la empresa DArT PL (Australia). Esta empresa realizó la extracción de ADN y la fabricación de la librería de ADN para luego realizar la secuenciación. Durante este procedimiento, detectaron que las librerías generadas no eran de buena calidad, ya sea porque el rango de amplicones que se obtuvo era más bajo que lo esperado (calificándolos como "downshifted"), o porque no se obtuvo amplicones del rango esperado (que calificaron como "failed"). Sólo las muestras calificadas como "failed" no fueron seleccionadas para ser secuenciadas, y por ende, se secuenciaron 146 individuos en total.

 Tabla 5. Número de muestras por sitio de muestreo enviadas a secuenciar con la técnica de representación reducida

 DArTseq.

Localidad	Individuos	Año de	Downshifted	Failed	Individuos
	enviados	colecta			secuenciados
Huarmey, Perú	37	2008	11	19	18
Callao, Perú	37	2008	8	19	18
Coquimbo, Chile	31	2021	1	0	31
Quintay, Chile	16	2021	0	0	16
San Antonio, Chile	16	2021	1	1	15
Isla Quiriquina, Chile	20	2010	5	3	17
Lebu, Chile	31	2021	15	0	31
Total	188				146



# **OBJETIVO 3:** Analizar la existencia de grupos genéticamente diferentes de *Dosidicus gigas* en la costa Este del Océano Pacífico Sur

En esta sección se mostrarán los resultados obtenidos a partir de dos sets de datos: el primero, incluye las muestras que se obtuvieron con este proyecto durante el año 2021. El segundo set de datos incluye muestras previamente obtenidas, entre los años 2005 al 2008.

#### Análisis de secuencias mitocondriales

#### **Diversidad genética**

Se secuenciaron fragmentos de los genes mitocondriales Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) y del gen NADH deshidrogenasa subunidad 2 (ND2) para estimar la diversidad y estructura genética poblacional de D. gigas (Tabla 5).

Los resultados con el gen COI muestran en general una baja diversidad genética en todas las localidades muestreadas (Hd < 0.55, ver Tabla 6), tanto para las localidades muestreadas en el 2021 y durante el 2005-2008. Se detectaron 31 haplotipos en total, y 31 sitios polimórficos, 23 del 2021 y 14 del 2005-2088, en un total de 657 sitios nucleotídicos (largo de las secuencias de COI analizada), y las secuencias evidenciaron ser muy poco diferentes entre ellas, es decir, con menos de 1 nucleótido de diferencia en promedio ( $\Pi$  < 0,598). Mientras, los resultados con el gen ND2 mostraron comparativamente tener una mayor diversidad genética, con tamaños de muestras similares a los realizados con el gen COI. El gen ND2 evidenció un nivel alto de diversidad haplotípica (Hd), >> a 0,7, el doble en el número de haplotipos (67 en total) en contraste a COI, un total de 65 sitios polimórficos



en secuencias de 1.020 nucleótidos de largo, y un número máximo promedio de 1.665 nucleótidos de diferencia entre pares de secuencias (Tabla 7).

**Tabla 6.** Resultados de los índices de diversidad genética de D. gigas, en base a los datos del gen COI, calculados de los datos del 2021 y de 2005 a 2008. N: tamaño muestral; K: número de haplotipos; Hd: diversidad haplotípica; S: número de sitios polimórficos;  $\pi$ : diversidad nucleotídica;  $\Pi$ : número promedio de diferencias entre pares de secuencias.

				Gene	e COI				
Localidad	Ν	K	S	Hd	Hd (d.e)	π	π(d.e)	Π	Π (d.e)
				20	21				
Puerto López, Ecuador	15	5	4	0.476	0.155	0.00081	0.00030	0.533	0.438
Coquimbo	31	6	5	0.455	0.106	0.0008	0.00023	0.554	0.451
Quintay	15	3	2	0.242	0.135	0.0004	0.00022	0.250	0.279
San Antonio	16	3	2	0.342	0.140	0.0006	0.00024	0.358	0.343
Lebu	32	7	7	0.393	0.109	0.0008	0.00025	0.496	0.421
Sub-Total	109	14	13	0.389	0.060	0.00071	0.00013	0.467	0.407
				2005	- 2008				
Huarmey, Perú	27	6	7	0.342	0.117	0.00079	0.00032	0.519	0.433
Callao, Perú	33	8	9	0.544	0.097	0.00129	0.00034	0.848	0.598
Coquimbo	29	8	7	0.431	0.116	0.00093	0.00033	0.613	0.482
Valparaíso	28	4	4	0.206	0.100	0.00043	0.00024	0.286	0.303
Isla Santa María	29	6	5	0.320	0.112	0.00062	0.00025	0.409	0.374
Isla Mocha	23	5	5	0.324	0.124	0.00066	0.00030	0.435	0.387
Sub-Total	169	23	24	0.370	0.048	0.00082	0.00013	0.536	0.444
TOTAL	278	31	31	0.377	0.038	0.00078	0.0001	0.509	0.431



**Tabla 7.** Resultados de los índices de diversidad genética de D. gigas, en base a los datos del gen ND2, calculados de los datos del 2021 y de 2005 a 2008. N: tamaño muestral; K: número de haplotipos; Hd: diversidad haplotípica; S: número de sitios polimórficos;  $\pi$ : diversidad nucleotídica;  $\Pi$ : número promedio de diferencias entre pares de secuencias.

				Ge	en ND2				
Localidad	Ν	K	S	Hd	Hd (d.e)	π	π (d.e)	Π	Π (d.e)
				2	2021				
Puerto López, Ecuador	14	9	16	0.879	0.079	0.0034	0.00076	3.407	1.853
Coquimbo	32	18	19	0.921	0.032	0.0024	0.00037	2.440	1.562
Quintay	16	12	16	0.958	0.036	0.0036	0.00075	3.717	1.928
San Antonio	16	8	13	0.800	0.092	0.0021	0.00064	2.158	1.469
Lebu	31	16	23	0.858	0.054	0.0026	0.00050	2.637	1.624
Sub-Total	109	47	47	0.885	0.025	0.0027	0.00027	2.747	1.467
				200	5 - 2008				
Huarmey, Perú	6	3	3	0.733	0.155	0.0012	0.00042	1.200	0.883
Callao, Perú	16	8	10	0.758	0.11	0.0021	0.00068	2.083	1.228
Coquimbo	20	11	15	0.837	0.077	0.0021	0.00047	2.142	1.242
Valparaíso	20	9	13	0.811	0.066	0.0018	0.00054	1.858	1.110
Isla Quiriquina	19	10	14	0.825	0.084	0.0030	0.00000	3.064	1.667
Sub-Total	81	30	36	0.809	0.040	0.0022	0.00030	2.256	1.254
TOTAL	190	67	65	0.853	0.022	0.0025	0.00020	2.532	1.369



#### Análisis genealógicos

Las relaciones genealógicas mediante Median-Joining Network, que fueron representadas a través de una red de haplotipos (datos poblacionales sin recombinación), realizados con ambos genes, COI y ND2, evidenciaron patrones de "tipo estrella", es decir, con uno o dos haplotipos centrales altamente frecuentes, y éstos rodeados por haplotipos muy poco frecuentes o únicos, unidos por uno hasta tres pasos mutacionales (sitios polimórficos, Fig. 5) entre ellos. Los haplotipos más frecuentes se encontraron en todas las localidades muestreadas en Chile, Perú y Ecuador, y que fueron también encontrados en periodos de tiempo diferentes.



**Figura 5.** Red de haplotipos o network para los genes COI y ND2, realizados con datos de los periodos del 2021 y 2005-2008. Cada círculo representa un haplotipo diferente, el tamaño de cada círculo representa la frecuencia del haplotipo en la muestra (con su escala al costado de cada red), los colores indican las localidades en donde se encontró cada haplotipo, y la distancia entre haplotipos indica el número de pasos mutacionales que los separan.



#### Estructura genética poblacional

Las comparaciones de los valores de Fst (estimado con la frecuencia de haplotipos en COI y ND2) y  $\Phi$ st (el número de diferencias nucleotídicas en COI y ND2) entre pares de secuencias de distintas localidades, y sus respectivos valores de probabilidad, <u>no</u> evidenciaron diferencias genéticas significativas entre localidades con un nivel alfa corregido por Bonferroni (Tablas 8-15), respectivamente. Los valores de ambos índices de fijación de Fst (Tablas 8 y 10) y  $\Phi$ st (Tablas 12, 13, 14 y 15) mostraron ser muy bajos para COI y ND2 respectivamente. Además, los resultados de la prueba de Fisher del valor exacto de p= 0,41487 para COI, y un valor exacto de p= 0.35733 para ND2, y los resultados entre pares de localidades evaluados con un nivel significancia corregido por Bonferroni, mostraron también ausencia de diferencias significativas en los Fst entre pares localidades (ver tabla Tablas 9 y 10).

**Tabla 8.** Resultados de los Fst (debajo la diagonal) por pares de localidades (calculado desde las frecuencias de haplotipos), y los respectivos valores de probabilidad (sobre la diagonal) estimados a partir de 10100 permutaciones, y contrastado con un nivel significancia alfa corregido por Bonferroni:  $\alpha/N^{\circ}$  comparaciones = 0.05/55,  $\alpha$ = 0.00090. Los Fst fueron calculados a partir de las secuencias de COI de *D. gigas* recolectados en diferentes localidades.

	Gen COI		2	2021					200	5-2008		
		Pto López,			San		Huarmey,	Callao,			Isla Sta.	
	Fst \ Valor-P	Ecuador	Coquimbo	Quintay	Antonio	Lebu	Perú	Perú	Coquimbo	Valparaíso	Maria	Isla Mocha
	Puerto López		0.977	0.392	0.834	0.745	0.781	0.850	1.000	0.214	0.757	0.724
	Coquimbo	0.0369		0.239	0.440	0.289	0.481	0.288	0.618	0.075	0.335	0.456
202	Quintay	0.0003	0.0173		0.605	0.626	1.000	0.126	0.465	1.000	1.000	1.000
	San Antonio	0.0436	0.0053	0.0090		0.765	0.829	0.642	0.627	0.213	0.691	0.594
	Lebu	0.0199	0.0046	0.0100	0.0187		0.858	0.196	0.761	0.248	0.735	0.666
	Huarmey Perú	0.0250	0.0061	0.0202	0.0253	0.0148		0.207	0.858	0.574	1.000	1.000
8	Callao, Perú	0.0278	0.0050	0.0409	0.0138	0.0126	0.0120		0.235	0.029	0.134	0.138
-200	Coquimbo	0.0319	0.0118	0.0079	0.0157	0.0116	0.0157	0.0093		0.289	0.860	0.858
02	Valparaíso	0.0269	0.0406	0.0223	0.0093	0.0074	0.0106	0.0667	0.0118		0.700	0.692
ล	Isla Sta. Maria	0.0195	0.0011	0.0216	0.0229	0.0125	0.0245	0.0215	0.0125	0.0086		1.000
	Isla Mocha	0.0187	0.0048	0.0328	0.0120	0.0123	0.0238	0.0271	0.0165	0.0091	0.0232	



**Tabla 9.** Resultados de la Prueba del valor Exacto de Probabilidad (Fisher) entre pares de localidades, comprando los Fst con el gen COI. La Prueba de diferenciación entre todos los pares de localidades fue realizada con una cadena de Markov de 1.000.000 de pasos, con un descarte de los 10.000 primeros pasos.

	GEN COI		,	2021					2005-200	8	
		Pto López,			San		Huarmey,	Callao,			Isla Sta.
	Valor - P exacto	Ecuador	Coquimbo	Quintay	Antonio	Lebu	Perú	Perú	Coquimbo	Valparaíso	María
	Puerto López										
	Coquimbo	0.854									
202	Quintay	0.393	0.343								
	San Antonio	0.839	0.433	0.484							
	Lebu	0.417	0.075	0.635	0.724						
	Huarmey Perú	0.701	0.686	0.826	0.804	0.642					
8	Callao, Perú	0.811	0.153	0.368	0.971	0.089	0.553				
-50	Coquimbo	0.831	0.675	0.912	0.709	0.340	1.000	0.093			
00	Valparaíso	0.172	0.078	0.611	0.221	0.504	0.709	0.056	0.507		
ล	Isla Sta. María	0.667	0.561	0.795	0.769	0.746	0.933	0.277	0.862	1.000	
	Isla Mocha	0.535	0.442	0.945	0.314	0.507	0.861	0.140	0.930	0.389	0.838



**Tabla 10.** Resultados de los Fst por pares de localidades (calculado desde las frecuencias de haplotipos), y los respectivos valores de probabilidad estimados a partir de 10100 permutaciones, y contrastado con un nivel significancia alfa corregido por Bonferroni:  $\alpha/N^{\circ}$  comparaciones = 0.05/45,  $\alpha$ = 0.0011. Los Fst fueron calculados a partir de las secuencias de ND2 de *D. gigas* recolectados en diferentes localidades.

	GEN ND2			2021					2005-2008		
		Pto. López,					Huarmey,	Callao,			Isla
	Fst \ Valor-P	Ecuador	Coquimbo	Quintay	San Antonio	Lebu	Perú	Perú	Coquimbo	Valparaíso	Quiriquina
	Puerto López		0.124	0.327	0.484	0.482	0.102	0.791	0.380	0.141	0.763
	Coquimbo	0.01998		0.622	0.363	0.296	0.513	0.029	0.537	0.369	0.105
202	Quintay	0.00541	-0.00611		0.331	0.361	0.421	0.092	0.292	0.255	0.196
	San Antonio	-0.00525	0.00295	0.00852		0.982	0.459	0.666	1.000	0.760	0.743
	Lebu	-0.00478	0.00267	0.00068	-0.02626		0.532	0.308	0.940	0.673	0.552
	Huarmey, Perú	0.07439	-0.00800	0.01835	-0.01279	-0.00388		0.086	0.494	0.833	0.105
008	Callao Perú	-0.02397	0.04851	0.04047	-0.01252	0.00576	0.10276		0.393	0.089	0.846
5-2	Coquimbo	-0.00044	-0.00556	0.00705	-0.03130	-0.01844	0.00035	-0.00152		0.716	0.631
200	Valparaíso	0.02759	0.00020	0.01159	-0.02263	-0.01270	-0.05763	0.04137	-0.01066		0.203
	Isla Quiriquina	-0.02013	0.02107	0.01539	-0.02052	-0.00756	0.05735	-0.02418	-0.01177	0.01690	

**Tabla 11.** Resultados de la Prueba del valor Exacto de Probabilidad (Fisher) entre pares de localidades, comprando los Fst con el gen ND2. La Prueba de diferenciación entre todos los pares de localidades fue realizada con una cadena de Markov de 1.000.000 de pasos, con un descarte de los 10.000 primeros pasos.

	ND2			2021				20	05-2008	
		Pto. López,					Huarmey,	Callao,		
	Valor - P exacto	Ecuador	Coquimbo	Quintay	San Antonio	Lebu	Perú	Perú	Coquimbo	Valparaíso
	Puerto López									
	Coquimbo	0.105								
02]	Quintay	0.403	0.255							
	San Antonio	0.348	0.848	0.581						
	Lebu	0.255	0.137	0.287	0.984					
	Huarmey, Perú	0.244	0.975	0.967	0.754	0.851				
008	Callao Perú	0.889	0.117	0.209	0.449	0.341	0.113			
5-2	Coquimbo	0.120	0.948	0.367	1.000	0.800	0.833	0.275		
200	Valparaíso	0.043	0.603	0.189	0.839	0.909	0.929	0.044	0.533	
	Isla Quiriquina	0.554	0.231	0.322	0.726	0.460	0.365	0.822	0.459	0.140



**Tabla 12.** Resultados de  $\Phi$ st estimados a partir de las secuencias de COI de *D. gigas* recolectados en diferentes localidades. Los cálculos de  $\Phi$ st fueron realizados a partir del "Método de distancia": N° de diferencia entre secuencias por pares de localidades. Arriba de la diagonal: Valor P (probabilidad). Debajo de la diagonal: número promedio de diferencias por pares entre poblaciones ( $\Phi$ XY). Los valores de probabilidad fueron estimados a partir de 10100 permutaciones, y contrastado con un nivel significancia alfa corregido por Bonferroni:  $\alpha/N^{\circ}$  comparaciones = 0.05/55,  $\alpha$ = 0.00090.

	Gen COI			2021					200	5-2008		
		Pto López,			San		Huarmey,	Callao,			Isla Sta.	
	$\Phi ST \setminus Valor-P$	Ecuador	Coquimbo	Quintay	Antonio	Lebu	Perú	Perú	Coquimbo	Valparaíso	María	Isla Mocha
	Puerto López		0.526	0.300	0.767	0.518	0.598	0.787	0.629	0.300	0.460	0.507
	Coquimbo	0.53556		0.842	0.682	0.057	0.365	0.178	0.148	0.141	0.228	0.575
02]	Quintay	0.39167	0.42500		0.482	0.817	0.864	0.918	0.818	0.668	0.728	0.832
6	San Antonio	0.42917	0.47500	0.31250		0.690	0.753	0.930	0.742	0.365	0.668	0.555
	Lebu	0.51250	0.54375	0.37500	0.42969		0.535	0.077	0.261	0.801	0.662	0.582
	Huarmey Perú	0.51605	0.54444	0.38426	0.43750	0.50463		0.787	0.652	0.544	0.616	0.695
8	Callao, Perú	0.68889	0.73232	0.57955	0.59659	0.69318	0.69136		0.311	0.793	0.881	0.779
20(	Coquimbo	0.56322	0.59425	0.43534	0.48922	0.56034	0.56450	0.75862		0.799	0.302	0.746
02	Valparaíso	0.40952	0.44286	0.26786	0.33036	0.39286	0.39683	0.59091	0.45074		0.558	0.401
5	Isla Sta. María	0.45977	0.49080	0.33190	0.37716	0.45259	0.45849	0.63427	0.51486	0.34975		0.510
	Isla Mocha	0.47826	0.50290	0.33696	0.40489	0.46739	0.47343	0.66930	0.51874	0.36025	0.42129	



**Tabla 13.** Resultados de  $\Phi$ st estimados a partir de las secuencias de COI de D. gigas recolectados en diferentes localidades. Los cálculos de  $\Phi$ st fueron realizados a partir del "Método de distancia": Número promedio de diferencia entre secuencias por pares de localidades. Arriba de la diagonal: Valor P (probabilidad). Debajo de la diagonal: diferencias promedio corregida por pares de localidades ( $\Phi$ XY- ( $\Phi$ X+ $\Phi$ Y) /2)). Los valores de probabilidad fueron estimados a partir de 10100 permutaciones, y contrastado con un nivel significancia alfa corregido por Bonferroni:  $\alpha$ /N° comparaciones = 0.05/55,  $\alpha$ = 0.00090.

	Gen COI			2021					2005-	2008		
	$(\Phi XY-(\Phi X+\Phi Y)/2) \setminus$	Pto López,			San		Huarmey,	Callao,			Isla Sta.	Isla
	Valor-P <sub>corregido</sub>	Ecuador	Coquimbo	Quintay	Antonio	Lebu	Perú	Perú	Coquimbo	Valparaíso	María	Mocha
	Puerto López		0.736	0.932	1.000	0.808	0.977	0.459	0.899	0.906	0.973	0.991
-	Coquimbo	-0.00812		0.145	0.133	0.039	0.195	0.027	0.097	0.055	0.157	0.214
202	Quintay	0.00000	0.02299		0.482	0.540	1.000	0.050	0.326	1.000	0.534	0.835
	San Antonio	-0.01667	0.01882	0.00833		0.362	0.420	0.597	0.350	0.103	1.000	0.112
	Lebu	-0.00215	0.01875	0.00202	0.00254		0.825	0.030	0.045	0.495	0.454	0.490
	Huarmey Perú	-0.00988	0.00817	0.00000	-0.00093	-0.00261		0.206	0.621	1.000	0.895	1.000
8	Callao, Perú	-0.00202	0.03107	0.03030	-0.00682	0.02096	0.00786		0.018	0.031	0.215	0.044
5	Coquimbo	-0.01010	0.01059	0.00369	0.00341	0.00571	-0.00141	0.02773		0.472	0.302	0.733
8	Valparaíso	0.00000	0.02299	0.00000	0.00833	0.00202	-0.00529	0.02381	0.00123		0.304	1.000
ล	Isla Sta. María	-0.01133	0.00936	0.00246	-0.00644	0.00017	-0.00520	0.00560	0.00378	0.00246		0.653
	Isla Mocha	-0.00580	0.00850	-0.00543	0.00833	0.00202	-0.00322	0.02767	-0.00530	0.00000	-0.00054	



**Tabla 14.** Resultados de  $\Phi$ st estimados a partir de las secuencias de ND2 de D. gigas recolectados en diferentes localidades. Los cálculos de  $\Phi$ st fueron realizados a partir del "Método de distancia": N° de diferencia entre secuencias por pares de localidades. Arriba de la diagonal: Valor P (probabilidad). Debajo de la diagonal: número promedio de diferencias por pares entre poblaciones ( $\Phi$ XY). Los valores de probabilidad fueron estimados a partir de 10100 permutaciones, y contrastado con un nivel significancia alfa corregido por Bonferroni:  $\alpha/N^{\circ}$  comparaciones = 0.05/55,  $\alpha$ = 0.00090.

	GEN ND2			2021					2005-2008	3	
		Pto. López,					Huarmey,	Callao,			Isla
	ΦST \ Valor-P	Ecuador	Coquimbo	Quintay	San Antonio	Lebu	Perú	Perú	Coquimbo	Valparaíso	Quiriquina
	Puerto López		0.121	0.307	0.485	0.483	0.104	0.788	0.389	0.143	0.764
	Coquimbo	2.91964		0.603	0.289	0.293	0.443	0.023	0.502	0.344	0.102
20	Quintay	3.44643	3.08203		0.340	0.437	0.301	0.092	0.302	0.258	0.204
	San Antonio	2.75893	2.25781	2.89844		0.980	0.483	0.673	1.000	0.721	0.752
	Lebu	3.02765	2.52823	3.15726	2.32863		0.336	0.251	0.915	0.681	0.551
~	Huarmey, Perú	2.66667	1.95833	2.70833	1.77083	2.01075		0.075	0.373	0.853	0.115
Ĩ	Callao Perú	2.64286	2.34375	2.89062	2.15625	2.43548	2.12500		0.387	0.081	0.837
2-2	Coquimbo	2.76429	2.23750	2.94375	2.10000	2.37581	1.81667	2.15625		0.706	0.635
0	Valparaíso	2.67500	2.14062	2.81250	1.95000	2.21129	1.58333	2.06875	1.97500		0.206
	Isla Quiriquina	3.13534	2.77961	3.28289	2.58882	2.85059	2.45614	2.53289	2.63947	2.50263	



**Tabla 15.** Resultados de  $\Phi$ st estimados a partir de las secuencias de ND2 de D. gigas recolectados en diferentes localidades. Los cálculos de  $\Phi$ st fueron realizados a partir del "Método de distancia": Número promedio de diferencia entre secuencias por pares de localidades. Arriba de la diagonal: Valor P (probabilidad). Debajo de la diagonal: diferencias promedio corregida por pares de localidades ( $\Phi$ XY- ( $\Phi$ X+ $\Phi$ Y) /2)). Los valores de probabilidad fueron estimados a partir de 10100 permutaciones, y contrastado con un nivel significancia alfa corregido por Bonferroni:  $\alpha$ /N° comparaciones = 0.05/55,  $\alpha$ = 0.00090.

	GEN ND2			2021					2005-2008	3	
	$(\Phi XY-(\Phi X+\Phi Y)/2)$	Pto. López,					Huarmey,	Callao,			Isla
	Valor-P <sub>corregido</sub>	Ecuador	Coquimbo	Quintay	San Antonio	Lebu	Perú	Perú	Coquimbo	Valparaíso	Quiriquina
	Puerto López		0.449	0.828	0.412	0.366	0.047	0.861	0.460	0.262	0.812
	Coquimbo	-0.00341		0.381	0.837	0.536	0.100	0.069	0.966	0.509	0.242
12	Quintay	-0.11520	0.00394		0.622	0.485	0.094	0.364	0.310	0.260	0.837
	San Antonio	-0.02353	-0.04111	-0.03906		0.962	0.194	0.260	0.872	0.854	0.483
	Lebu	0.00607	-0.00981	-0.01935	-0.06882		0.196	0.143	0.545	0.770	0.353
~	Huarmey, Perú	0.36337	0.13858	0.25000	0.09167	0.09247		0.015	0.082	0.249	0.040
18	Callao Perú	-0.10211	0.08233	-0.00938	0.03542	0.07554	0.48333		0.216	0.133	0.489
5-2	Coquimbo	-0.01006	-0.05331	0.01436	-0.05022	-0.01353	0.14561	0.04353		0.741	0.213
	Valparaíso	0.04276	-0.00808	0.02522	-0.05811	-0.03594	0.05439	0.09814	-0.02500		0.187
	Isla Quiriquina	-0.10012	0.02768	-0.10760	-0.02251	0.00015	0.32398	-0.04094	0.03626	0.04152	

Los análisis de la varianza molecular (AMOVA), realizados con ambos genes COI y ND2, mostraron que no hay diferencias genéticas significativas entre grupos o poblaciones (FCT). Los grupos comparados mediante el marcador molecular COI fueron: (1) Ecuador: Puerto López, (2) Perú: [Huarmey + Callao], (3) Chile: zona de pesca norte [Coquimbo], (4) Chile: zona de pesca central [Quintay + San Antonio + Valparaíso], (5) Chile: zona de pesca sur [Isla Mocha + Isla Sta. María + Lebu], evidenciando ausencia de quiebre genéticos poblacionales significativos (Tabla 16). Por otro lado, los grupos comparados mediante el marcador molecular ND2, que fueron: Grupos: (1) Ecuador, (2) Perú, (3) Chile: zona de pesca norte, (4) Chile: zona de pesca central, (5) Chile: zona de pesca norte, los resultados tampoco evidenciaron diferencias significativas que sustenten un quiebre genéticos poblacionales (FCT, Tabla 17). El mayor porcentaje de varianza genéticas fue dentro de cada localidad (entre 98 a 100 %), y un porcentaje menor a 1 % fue la variación entre grupos, con ambos marcadores COI y ND2, por lo tanto,



los resultados señalan en términos generales la ausencia de estructuración genética entre los grupos de

Chile, Perú y Ecuador.



**Tabla 16.** Resultados del Análisis molecular de la varianza (AMOVA) con el gen COI, realizado entre cinco grupos que incluyen del Ecuador, Perú y 3 zonas de pesca de Chile (obtenidas en el 2021 y del 2005-2008. La sigla gl son los grados de libertad.

Gen COI										
Grupos: (1) Ecuador: Pto. López, (2) Perú: [Huarmey + Callao], (3) Chile: zona										
de pesca norte [Coquimbo], (4) Chile: zona de pesca central [Quintay + San										
Antonio + Valparaíso], (5) Chile: zona de pesca sur [Isla Mocha + Isla Sta.										
María + Lebu]										
		Suma de	Componentes	% de						
Fuente de variacion	gl	Cudrados	de la Varianza	Variación	Valor P					
Entre Grupos (FCT)	4	1.425	0.00122	0.48	0.3309					
Entre localidades dentro										
de grupos (FSC)	6	1.756	0.00159	0.63	0.0799					
Dentro de localidades										
(FCT)	267	67.283	0.252	98.9	0.0313					
TOTAL	277	70.464	0.25481							

**Tabla 17.** Resultados del Análisis molecular de la varianza (AMOVA) con el gen ND2, realizado entre cinco grupos que incluyen del Ecuador, Perú y 3 zonas de pesca de Chile (obtenidas en el 2021 y del 2005-2008. La sigla gl son los grados de libertad.

Gen ND2										
Grupos: (1) Ecuador, (2) Perú, (3) Chile: zona de pesca norte, (4)										
Chile: zona de pesca central, (5) Chile: zona de pesca norte										
		Suma de	Componentes de	% de						
Fuente de variacion	gl	Cudrados	la Varianza	Variación	Valor P					
Entre Grupos (FCT)	4	4.575	-0.00706	-0.56	0.629					
Entre localidades										
dentro de grupos										
(FSC)	5	6.965	0.00698	0.55	0.255					
Dentro de localidades										
(FCT)	180	227.77	1.26539	100.01	0.413					
TOTAL	189	239.311	1.26531							



Los resultados en la inferencia de grupos de poblaciones a partir de datos genéticos con el gen COI y ND2 individualmente georreferenciados (GENELAND), evidenciaron una alta probabilidad a posteriori (PP>0.6) de la existencia de un único grupo o población de *D. gigas* en el Océano Pacifico Sur (Fig. 6 A y B).



Número de grupos o poblaciones evidenciados en el Pacífico sur

**Figura 6.** Gráfico que muestra el número de grupos o poblaciones iteradas a partir de una función de densidad de probabilidades a posterior, obtenida a partir del análisis GENELAND para los datos COI y ND2.



#### Flujo genético

Las estimaciones de flujo genético con COI y tasas de migración entre localidades sugieren un alto flujo genético de *D. gigas* en el Pacífico Sur. Usando frecuencias de haplotipos por localidades (Nei 1973) se estimaron un gran número de migrantes por generación (Nm > 120, Tabla 18) usando Gst (Hudson et al. 1992), y luego mediante las diferencias nucleotídicas ( $\pi$ ) según Nei (1982), mientras que utilizando Nst según Lynch & Crease (1990) se obtuvieron valores más bajos (Nm < 11, Tabla 19).

 Tabla 18. Resultados del número efectivo de migrantes estimados con el gen COI, realizado entre todas las
 localidades obtenidas en el período 2021 y del 2005-2008 desde Chile y Perú.

Información del número efectivo de migrantes, con el gen COI								
Nei 1973	Gst: 0.00201	Nm: 124.34						
	DeltaSt: 0.00003							
Nei 1982	GammaSt: 0.03662	Nm: 6.58						
Lynch and Crease 1990 (with Jukes								
and Cantor correction)	Nst: 0.02261	Nm: 10.80						
Hudson, Slatkin and Maddison 1992	Fst: 0.02258	Nm: 10.82						

El flujo genético estimado con ND2 y tasas de migración entre localidades sugieren un mayor flujo genético de *D. gigas* en el Pacífico Sur. Usando frecuencias de haplotipos por localidades (Nei 1973) se estimaron un gran número de migrantes por generación (Nm > 1400, Tabla 22) usando Gst (Hudson et al. 1992), mientras que utilizando las diferencias nucleotídicas ( $\pi$ ) según Nei (1982), usando Nst según Lynch & Crease (1990) se obtuvieron valores más bajos (Nm < 40, Tabla 20).



**Tabla 19.** Resultados del número efectivo de migrantes estimados con el gen ND2, realizado entre todas las localidades obtenidas en el período 2021 y del 2005-2008 desde Chile, Perú y Ecuador.

Información del número efectivo de migrantes, con el gen ND2									
Nei 1973	Gst: 0.00034	Nm: 1462.08							
	DeltaSt: 0.00008								
Nei 1982	GammaSt: 0.03216	Nm: 15.05							
Lynch and Crease 1990 (with									
Jukes and Cantor correction)	Nst: 0.01234	Nm: 41.01							
Hudson, Slatkin and Maddison									
1992	Fst: 0.01229	Nm: 41.19							

## Análisis de marcadores SNPs

El set de datos recibido contó con 41.636 SNPs provenientes de 146 individuos en total, en el que se detectó un 44,65% de missing data (SNPs o datos faltantes). En la Fig. 7 se grafica el set de datos total, por SNP e individuo, indicando los genotipos homocigotos y heterocigotos, y los missing data (espacios en blanco). Posterior al filtrado (ver Fig. 7), se recuperó en total 2.128 SNPs y 126 individuos. Se eliminaron 20 individuos en total: una muestra de Lebu (Chile), una de Isla Quiriquina (Chile), cinco de Callao (Perú) y 13 de Huarmey (Perú). Los tamaños muestrales de las poblaciones peruanas quedaron en 13 y 5 para Callao y Huarmey, respectivamente. Una prueba de FST pareado entre estos sitios detectó que no están genéticamente diferenciadas (FST = 0,016, valor P = 0,001), por lo que unimos las muestras de ambas en una misma población, que llamamos "Perú central" para que los análisis siguientes tuvieran tamaños poblacionales más balanceados.





**Figura 7.** Distribución de SNPs por cada individuo de Dosidicus gigas genotipificado en a) el set de datos brutos entregado por DArTseq y b) el set de datos después de haber sido filtrado para obtener SNPs de buena calidad. En el eje x se presentan cada SNPs y en el eje y se indican los individuos. En azul se indica el genotipo homocigoto para el alelo más frecuente, mientras que en rojo se indica el homocigoto para el alelo menos frecuente, en verde se indican el heterocigoto, y en blanco se indican aquellos SNPs faltantes (missing data).



# **Diversidad genética**

La diversidad genética, medida en términos de heterocigosidad, mostró niveles bajos y similares para todas las poblaciones. En la Tabla 20 se indican los índices de diversidad, Ho, He (y sus desviaciones estándar) y FIS, además del número de alelos privados, o los alelos que están presentes en una población, y la riqueza alélica por localidad.

**Tabla 20.** Diversidad genética obtenida a partir del análisis de SNPs. Para cada una de las localidades se indica el tamaño muestral analizado, después de aplicar los filtros para obtener un set de datos de buena calidad, además de la heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He), y las desviaciones estándar indicadas como Ho (d.e.) y He (d.e.), respectivamente. Luego se indica el coeficiente de endocruzamiento FIS, los alelos privados y la riqueza alélica.

Localidad	Ν	Но	Но	He	He	FIS	Alelos	Riqueza
			(d.e.)		(d.e.)		privados	alélica
Perú central	14	0,0572	0,1098	0,0779	0,1315	0,2918	141	1,3465
Coquimbo	30	0,0597	0,1040	0,0808	0,1277	0,2731	303	1,3625
Quintay	15	0,0598	0,1125	0,0792	0,1321	0,2684	158	1,3498
San Antonio	14	0,0591	0,1100	0,0786	0,1307	0,2742	135	1,3536
Isla Quiriquina	18	0,0577	0,1062	0,0773	0,1280	0,2731	157	1,3504
Lebu	29	0,0593	0,1030	0,0801	0,1271	0,2725	344	1,3669



# Estructura genética poblacional

El análisis de Fst pareado para detectar estructuración genética entre sitios de muestreo indicó que ningún par de localidades se diferencia significativamente (Tabla 21). Los valores de Fst fueron bajos, cuyo rango va desde 0,002 entre Perú central y Coquimbo, hasta 0,00004 entre San Antonio y Quintay. Ninguna de los valores de Fst pareado resultaron ser significativos después de realizar una corrección de Bonferroni.

**Tabla 21.** Diferenciación entre pares de localidades. Bajo la diagonal se indican los valores de Fst pareados, y sobre la diagonal, se indican los valores P. Se aplicó una corrección de Bonferroni para corregir el valor de significancia ( $\alpha$ ) utilizado en comparaciones múltiples: el valor de  $\alpha$  de 0,05 se dividió por el número de comparaciones realizadas (15), obteniéndose un  $\alpha$  final de 0,0033.

	Perú central	Coquimbo	Quintay	San Antonio	Isla	Lebu
					Quiriquina	
Perú central	-	0,192	0,612	0,894	0,494	0,143
Coquimbo	0,0020	-	0,973	0,306	0,456	0,113
Quintay	0,0005	0,0027	-	0,527	0,473	0,673
San Antonio	0,0026	0,0009	3,9777 e-05	-	0,428	0,594
Isla	0,0002	0,0003	0,0002	0,0004	-	0,325
Quiriquina						
Lebu	0,0019	0,0014	0,0008	-0,0005	0,0006	-



Posteriormente, se realizó un Análisis de Componentes Principales en el que no se observan agrupaciones dentro de este hiperespacio (Fig. 8). Los dos primeros componentes principales explican el 3,4% de la varianza total, que es un resultado común cuando se trabaja con set de datos de SNPs en los que no hay estructuración genética.



**Figura 8.** Análisis de componentes principales (ACP o PCA por sus siglas en inglés). Se grafican los dos primeros componentes principales (Axis 1 y Axis 2) y el porcentaje de la varianza que explica cada uno (1,7%).



Finalmente, se presenta una tabla de AMOVA (Tabla 22) para estimar la presencia de estructuración genética en este set de datos completo. El valor de p obtenido resultó ser no significativo, por lo tanto, no hay diferencias genéticas entre los distintos sitios de muestreo.

 Tabla 22. Análisis de AMOVA para estimar estructura genética en el set de datos de SNPs.

Fuentes	de	gl	Suma o	de	Desviación de	Componente	Valor P
variación			Cuadrados		los Cuadrados	de Varianza	
					Medios		
Entre grupos		5	0,0077		0,0015	1,6959 e-06	0.3526
Dentro	de	120	0,1811		0,0015	0,0015	
localidades							
Total		125	0,1888		0,0015		

En conclusión, en el set de datos de SNPs no se detectó estructuración genética y no hay diferenciación entre ningún sitio de muestreo.



Los análisis de Bayesian Skyline plots para hacer las inferencias demográficas en base a la genealogía de la jibia de la población del Pacífico sur (elegido con BF=0,166), fueron realizados bajo el modelo de evolución de reloj molecular relajado Log Normal (Bayes Factor = 3,186), y el mejor modelo de sustitución nucleotídica HKY (-lnL = -1146.802, BIC = 9040.981) para el gen COI y el modelo TN93+G  $(-\ln L = -1900.690, BIC = 8461.607)$  para el gen ND2. Estos análisis, efectuados bajo el supuesto de coalescencia y sin un modelo demográfico paramétrico preespecificado, evidencia en ambos una expansión demográfica en la población de jibias del Pacífico sur, el que habría comenzado hace aproximadamente 25000 años atrás con el gen COI, y hace aproximadamente 30000 años atrás con el gen ND2, ambos mostrando un incremento de alrededor de dos órdenes de magnitud en tamaño efectivo. Además, el tiempo estimado hacia el ancestro común más reciente, de aproximadamente 39000 años con el gen COI, sugiere que D. gigas habría experimentado un proceso de diversificación muy reciente del linaje intraespecífico poblacional, que calza además con el tiempo de inicio de la expansión demográfica, lo cual, todos estos procesos ocurrieron en el último periodo glacial del Pleistoceno (entre los 125000-25000 años antes del presente, Lambeck et al. 2014, Rabassa et al. 2005), (Fig. 9 a). Por otro parte, con el gen ND2 evidencia un tiempo estimado de coalescencia hacia el ancestro común más reciente de aproximadamente 125000 años antes del presente (Fig. 9 b), lo que sugiere un linaje genealógico más ancestral, dado que el marcador fue más polimórfico, es decir, más mutaciones producidas, y por ende la historia de coalescencia es más ancestral. No obstante, el tiempo de inicio de su expansión demográfica fue reciente, similar al tiempo de expansión estimado con el COI. Por lo tanto, ambos resultados sugieren que D. gigas habría experimentado cambios en el tamaño efectivo poblacional en el Pacífico sur durante los eventos históricos del último período glacial en el Pleistoceno (LG, Last Glaciations).





**Figura 9.** Resultados de las inferencias demográficas de los Bayesian Skyline plots realizados con los genes a) COI y b) ND2 respectivamente, sobre la base a las genealogías moleculares inferidas de la población de D gigas del Pacífico sur. Intervalo de credibilidad a posteriori (azul) del cambio en el tamaño efectivo poblacional (Ne). Línea roja señala edad o tiempo al Ancestro común más reciente (tACMR) de la población de jibia estimada con el gen a) COI y b) ND2, respectivamente.



**OBJETIVO 4:** Asesorar a la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura en materias relacionadas con la genética poblacional de *Dosidicus gigas* y sus respectivas técnicas de análisis.

Curso-Taller "Genética aplicada al manejo de stocks pesqueros"

Se realizó un taller de genética entre los días 6 y 15 de septiembre del 2021 para capacitar al personal de SUBPESCA en aspectos relacionados con genética de poblaciones marinas. La capacitación se realizó de manera virtual.

PROYECTO FIPA N° 2020-20 GENÉTICA POBLACIONAL DE *Dosidicus gigas* PRESENTE EN TERRITORIO NACIONAL Curso-Taller "Genética aplicada al manejo de stocks pesqueros"

## **Expositores:**

- Dr. Christian Ibáñez (CI)
- Dr. Sergio Carrasco (SC)
- Dra. Mariana Díaz-Santana (MD-S)
- Dra. Pamela Morales (PM)
- Dr. Pablo Oyarzún (PO)
- Dra. María Cecilia Pardo (CP)



Este curso fue dividido en cuatro sesiones que se detallan a continuación:

#### Sesión 1 lunes 6 de septiembre, 9- 11 hrs.

- Introducción al uso de herramientas genéticas en pesquería. (CI, PO, MD-S, SC)
   Objetivo: Conocer la importancia de los estudios genéticos en pesquería.
- 2. Marcadores moleculares para identificación de unidades genéticas poblacionales y para identificación de especies. (PM)

**Objetivo**: Conocer y familiarizarse con los diferentes marcadores moleculares para análisis a diferentes escalas ecológicas y evolutivas (i.e., poblaciones y especies).

## Sesión 2 miércoles 8 de septiembre, 9-11 hrs.

- Fuerzas microevolutivas: Deriva genética, mutaciones, selección y flujo genético. (CI)
   Objetivo: Conocer las fuerzas microevolutivas que se potencian con el efecto de la pesca y las variables ambientales y que generan cambios en las frecuencias genéticas en las poblaciones.
- 4. Diversidad genética y tamaño efectivo poblacional. (PM)

**Objetivo**: Reconocer los efectos de la pesca sobre la diversidad genética y tamaño efectivo poblacional.

## Sesión 3 lunes 13 de septiembre, 9-11 hrs.

1. Detección de la estructura genética poblacional. (CP)



**Objetivo**: Identificar cuantas unidades o poblaciones genéticas se reconocen en los recursos pesqueros mediante métodos estadísticos de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana.

2. Filogeografía. (CP)

**Objetivo**: Reconocer como las genealogías moleculares de las poblaciones cambian a escala temporal y espacial (ecológica y evolutiva) mediante Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana.

# Sesión 4 miércoles 15 de septiembre, 9-11 hrs.

3. Análisis e interpretación de los resultados del proyecto. (CI, PM, PO, CP, MD-S, SC)

**Objetivo**: Entender los principales resultados obtenidos en el proyecto.















# SPRFMO 2021. 9th Scientific Committee meeting

Por otro lado, el director del proyecto, Dr. Christian Ibáñez participó de la reunión "SPRFMO 2021. 9th Scientific Committee meeting", entre los días 27 Septiembre – 2 Octubre 2021 para presentar resultados preliminares del proyecto FIPA 2020-20. A continuación, se incluyen algunas imágenes de las reuniones en modalidad virtual.






También como parte de la asesoría a SUBPESCA se elaboró de una nueva versión de la ficha técnica de *Dosidicus gigas* (Species profile) para ser presentada en SPRFMO (ver Anexo 5).



# Taller metodológico "Uso de marcadores moleculares de nueva generación (SNPs) para identificación de unidades genéticas poblacionales de *Dosidicus gigas* en el Pacífico Sur".

Se realizó un taller de metodológico online (virtual) durante el día 01 de julio de 2022. Taller metodológico "Uso de marcadores moleculares de nueva generación (SNPs) para identificación de unidades genéticas poblacionales de *Dosidicus gigas* en el Pacífico Sur". A continuación, se incluyen algunas imágenes de la reunión en modalidad virtual.







### Taller de difusión de resultados del PROYECTO FIPA N° 2020-20 "GENÉTICA POBLACIONAL DE *Dosidicus gigas* PRESENTE EN TERRITORIO NACIONAL"

Finalmente se realizó el taller final de manera hibrida (presencial y virtual) durante el día 11 de julio de 2022. Taller de difusión de resultados del PROYECTO FIPA N° 2020-20 "GENÉTICA POBLACIONAL DE *Dosidicus gigas* PRESENTE EN TERRITORIO NACIONAL". A continuación, se incluyen algunas imágenes de la reunión en modalidad virtual.











## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los marcadores moleculares utilizados (ADNmt y SNPs) resultaron efectivos para estimar la diversidad genética de la jibia en el Pacífico Sur. Ambos marcadores mitocondriales mostraron diferentes índices de diversidad genética, siendo COI más bajo con 31 haplotipos (Hd = 0.37) y ND2 más variable con 67 haplotipos (Hd = 0.85). Este hallazgo es similar a lo descrito anteriormente para COI (Staff et al. 2010, Ibáñez et al. 2011, Ibáñez & Poulin 2014) y ND2 (Staff et al. 2010, Sánchez et al. 2016, 2020). A pesar de que ND2 es más variable que COI, ambos marcadores se representan en su genealogía como redes de haplotipos tipo estrella, lo que indica que la población de *D. gigas* del Pacífico Sur ha experimentado una expansión poblacional reciente (25.000 años atrás, Fig. 9) con un ACMR de entre 40.000 y 125.000 para cada gen (COI y ND2). Estas expansiones poblacionales se han estimado entre 40,000 y 50,000 años para ambos marcadores (Ibáñez et al. 2011, Sánchez et al. 2016) usando diferentes tasas de mutación (COI: 2.0E<sup>-8</sup>, ND2: 1.2E<sup>-8</sup>). Estos eventos poblacionales coinciden con el último periodo glacial del Pleistoceno (entre los 125000-25000 años atres del presente, Lambeck 2004, Rabassa 2008).

Los SNPs también revelaron una baja diversidad genética (He y Ho < 0.1) y una muy baja endogamia (FIS < 0.3). Este hecho no es raro, ya que es muy evidente la baja cantidad de individuos heterocigotos (Fig. 7). Además, la baja He con SNPs también se ha reportado en otra especie de calamar *Doryteuthis opalescens* en California (He y Ho < 0.15, Cheng et al. 2021). En esta especie de calamar (*D. opalescens*, Cheng et al. 2021) se evidenció un bajo Ho y He entre localidades a lo largo de la costa de California (> 1000 km) con un tamaño muestral similar (n = 10 - 24) al de este estudio en *D. gigas* (n = 15 - 31). Resultados similares con SNPs (baja heterocigosidad) se han encontrado con otros cefalópodos (*Cranchia scabra, Pyroteuthis margaritifera*, y *Vampyroteuthis infernalis*) en el Atlántico



(Timm et al. 2020). Esto sugiere que nuestra estimación de la heterocigosidad de *D. gigas* con SNPs mediante DArTseq es acorde a lo registrado en otros estudios con cefalópodos y el tamaño muestral representa la diversidad genética de la población con un bajo nivel de incerteza.

La ausencia de estructura genética encontrada con ambos marcadores mitocondriales (COI y ND2) y con tres aproximaciones (Fst pareados, AMOVA y Geneland) sugieren que los individuos de D. gigas que habitan en el Pacífico Sur corresponden a una unidad genética. Los estudios previos que utilizaron los mismos marcadores hacen conclusiones similares sobre la ausencia de diferencias genéticas entre los grupos (Staff et al. 2010, Ibáñez et al. 2011, Ibáñez & Poulin 2014, Sánchez et al. 2016, 2020). Más aún otros estudios utilizando otros marcadores moleculares (RAPDs, Cytb, microsatélites) tampoco encuentran diferencias entre los calamares D. gigas del Pacífico sur (Sandoval-Castellanos et al. 2007, 2010, Sánchez et al. 2016, 2020). Esta ausencia de estructura genética espacial se refuerza con el alto flujo genético entre las localidades muestreadas encontrado con ambos marcadores moleculares (COI y ND2) reforzando la idea de una unidad genética de D. gigas en el Pacífico Sur. De la misma forma, tanto los Fst pareados como el AMOVA realizado con SNPs, no muestran diferencias entre las localidades muestreadas, reforzando más aun la existencia de una sola unidad genética de D. gigas en el Pacífico sur. En el estudio mencionado sobre D. opalescens (Cheng et al. 2021) tampoco se encontraron diferencias entre localidades a lo largo de la costa de California (> 1000 km) con un tamaño muestral similar (n = 10 - 24) al de este estudio en D. gigas (n = 15 - 31). Tanto D. gigas como D. opalescens tienen fase larval dispersiva y migraciones estacionales de los adultos que contribuyen a la conectividad dentro de su distribución geográfica. Contrariamente, el pulpo holobentónico (no poseen estado larval) Hapalochlaena maculosa presenta un patrón clinal de estructura genética (inferida con SNPs) en toda su área de distribución geográfica, con un flujo genético presente a través del intercambio de alelos entre poblaciones adyacentes (Morse et al. 2018). Los datos entregados por los SNPs ponen en evidencia que



las estrategias de historia de vida de los cefalópodos tienen una fuerte influencia en los patrones de conectividad entre poblaciones, como se había sugerido anteriormente en estudios utilizando otras técnicas genéticas (Carvalho & Nigmatullin 1998, Ibáñez & Poulin 2014).

En el Pacífico Sur se han reportado varios taxa de invertebrados con patrones de homogeneidad genética, debido a que poseen larvas planctónicas que viven varias semanas en la columna de agua, tal es el caso del cangrejo *Cancer setosus*, el gastrópodo *Concholepas concholepas*, el bivalvo *Mesodesma donacium* y el pulpo *Octopus mimus* (Gómez-Uchida et al. 2003; Cárdenas et al. 2009a, Thiel et al. 2007, Pardo-Gandarillas et al. 2018). Un patrón similar de homogeneidad genética se ha observado en peces que tienen un amplio rango geográfico como la merluza común *Merluccius gayi gayi*, el jurel *Trachurus murphyi* y la sierra *Thyrsites atun* (Galleguillos et al. 2000; Cárdenas et al. 2009b, Hüne et al. 2021). Por lo tanto, no es de extrañar que la jibia *D. gigas* no presente estructura genética espacial, ya que tienen huevos y paralarvas planctónicas que aportan a una alta conectividad y flujo genético dentro de una amplia distribución geográfica en donde se producen grandes migraciones de los adultos.

Las extensas migraciones estacionales de *D. gigas*, en el Pacífico Sur, de hasta 1000 kilómetros, han sido relacionadas con la alimentación activa, la migración y la maduración (Nesis 1970, Nigmatullin et al. 2001, Ibáñez & Cubillos 2007, Keyl et al. 2008). Estos calamares pueden desplazarse a una velocidad de 8 a 30 kilómetros por día durante sus migraciones, alcanzando entre 200 y 1000 km en un par de semanas (Markaida et al. 2005, Gilly et al. 2006b, Stewart et al. 2012). Además, las migraciones pasivas de las masas de huevos pelágicos y las paralarvas pueden contribuir a un alto flujo genético y a la dispersión de larga distancia a lo largo de su área de distribución. Además, hay que considerar la alta fecundidad de las hembras que puede alcanzar de 15 a 18 millones de huevos (Nigmatullin & Markaida 2009), lo que aumenta la probabilidad de dispersión a lo largo del Océano Pacífico.



Los fenotipos de D. gigas que maduran a diferentes tamaños (pequeños, medianos, grandes) no representan unidades genéticamente independientes, ya que no existen diferencias genéticas con los dos marcadores moleculares usados comparando jibias de diferentes lugares (Chile, Perú y Ecuador) y además de diferentes morfotipos (medianos y grandes). Esta ausencia de grupos poblacionales asociados al tamaño había sido previamente reportada utilizando diferentes marcadores moleculares (Cytb, ND2, microsatélites: Sandoval-Castellanos et al. 2009, Sánchez et al. 2016, 2020). Se ha sugerido una hipótesis ecológico-evolutiva para explicar este fenómeno. Los calamares que se desarrollan (huevos) y nacen (paralarvas) en zonas de alta temperatura o en años de alta temperatura (i.e., El NIÑO) alcanzan la madurez sexual antes y a menor tamaño debido a mecanismos de regulación epigenético (Ibáñez et al. 2015). La regulación epigenética es un mecanismo central que promueve la plasticidad del desarrollo, ya que se ha demostrado que factores ambientales como la temperatura y la nutrición afectan a los patrones de metilación del genoma en los invertebrados marinos, alterando las tasas de expresión génica (Somero, 2005; Harvey et al. 2014). Además, tanto la plasticidad fenotípica como la flexibilidad fenotípica se observan comúnmente en las especies marinas que habitan en hábitats templados, que experimentan un gran rango de variación temporal y espacial en las temperaturas (Piersma & Drent, 2003; Somero, 2005) como es el caso de las poblaciones de D. gigas en el Pacífico Sur.

Entre los desarrollos más recientes de la genética molecular mediante la secuenciación de nueva generación (NGS), el método del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) ha surgido como un método más preciso, rentable y rápido que ofrece muchas ventajas comparativas con los marcadores moleculares antes utilizados (Rafalski 2002, van Deventer et al. 2020), tales como secuencias de ADN y/o microsatélites. Los marcadores SNP se encuentran en todo el genoma; son estables y se obtienen fácilmente utilizando protocolos de genotipado de alto rendimiento con análisis de datos automatizados (van Deventer et al. 2020). Entre los diferentes métodos (e.g., RADseq, ddRAD, GBS) la plataforma



DArTseq<sup>™</sup>, desarrollada por Diversity Arrays Technology (https://www.diversityarrays.com), es uno de estos enfoques que ha experimentado un creciente interés en todo el mundo, ya que es capaz de generar miles de SNP de alta calidad de manera óptima y rentable (Sansaloni et al. 2011, Nguyen et al. 2018, van Deventer et al. 2020). El enfoque DArTseq, una variante del genotipado por secuenciación (GBS), implementa métodos de reducción de la complejidad que se dirigen eficazmente a las secuencias poco repetidas del genoma (Melville et al. 2017). Además, este proceso se optimiza para cada organismo y aplicación, probando diferentes combinaciones de enzimas de restricción (ER) y seleccionando la combinación más eficaz para reducir la complejidad del genoma (van Deventer et al. 2020). Básicamente las diferencias entre los diferentes métodos de genotipado para la búsqueda de SNPs son las enzimas de restricción utilizadas, pero más importante podría ser que la plataforma DArTseq, representa una alternativa robusta y rentable a las plataformas de genotipado existentes, que puede ser utilizada en numerosas especies incluyendo animales con información genética limitada o inexistente.



## CONCLUSIONES

- 1. Todos los marcadores moleculares (ADNmt y SNPs) demuestran la existencia de un solo grupo genético poblacional de *Dosidicus gigas* en el Pacífico Sur.
- Los marcadores mitocondriales mostraron diferentes índices de diversidad genética, siendo COI más bajo con 31 haplotipos (Hd = 0.37) y ND2 más variable con 67 haplotipos (Hd = 0.85), sin embargo, ambos marcadores mostraron el mismo patrón de ausencia de estructuración genética poblacional.
- 3. Los SNPs son capaces de detectar patrones finos de estructuración genética, y aun así en este estudio no mostraron estructuración genética poblacional. Incluso los SNPs mostraron baja proporción de heterocigotos y por lo tanto baja heterocigosidad esperada y observada (He y Ho < 0.1).
- El flujo genético entre las localidades muestreadas fue alto para ambos marcadores mitocondriales (COI y ND2) reforzando la idea de una unidad genética de *D. gigas* en el Pacífico Sur.
- 5. El hecho que no existan diferencias genéticas con tres (ADNmt y SNPs) marcadores moleculares de jibias de diferentes lugares (Chile, Perú y Ecuador) y además de diferentes morfotipos (medianos y grandes) refuerza la idea que estos fenotipos que maduran a diferentes tamaños no representan unidades genéticamente independientes.



### ACTIVIDADES REALIZADAS

Las actividades del proyecto se iniciaron con una reunión online de coordinación del equipo de trabajo con la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (ver anexo).

Se solicitó a la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura los permisos para pesca de investigación. Todos los muestreos fueron realizados entre el 3° y 5° mes. No obstante, la obtención de tejido para los análisis genéticos se realizó en forma paralela con el fin de optimizar los tiempos, recursos humanos y materiales. Una vez obtenidos los tejidos de cada animal, estos se mantuvieron en congeladores hasta su posterior análisis en las dependencias de UNAB.

La extracción de ADN, amplificación de genes (PCR), y electroforesis se realizaron entre los meses 3° y 8° del proyecto, en el laboratorio de Ecología y Biodiversidad (UNAB). Para el actual preinforme final, ya se han completado los muestreos, la obtención de tejido, la extracción de ADN, y la secuenciación de las muestras.

# DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

### (1) Reunión de coordinación:

Al inicio del proyecto, se realizó una reunión virtual donde se presentó el plan de trabajo, metodologías, y se coordinaron las actividades a realizar con FIPA y la contraparte técnica de la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura.



### (2) Solicitud de Pesca de Investigación:

Para realizar los muestreos, se tramitó con la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura el permiso de pesca de investigación de acuerdo con los requerimientos correspondientes.

### (3) Búsqueda de secuencias en GenBank y otras bases de datos públicas:

En esta actividad se realizó una búsqueda exhaustiva de secuencias de ADN en bases de datos públicas como GenBank. Además, se solicitó directamente a diferentes autores dicha información proveniente de sus respectivos artículos científicos.

### (4) Muestreos de jibia zona norte:

Esta actividad consistió en coordinar y llevar a cabo las salidas a terreno previamente descritas en la metodología (Tabla 1), con el fin de colectar las muestras de jibia que se preservaron inmediatamente en etanol y RNAlater. Todas las muestras fueron almacenadas en las dependencias del laboratorio de Ecología y Biodiversidad (UNAB) para su procesamiento.

### (5) Muestreos de jibia zona centro:

Esta actividad consistió en coordinar y llevar a cabo las salidas a terreno previamente descritas en la metodología (Tabla 1), con el fin de colectar las muestras de jibia que se preservaron inmediatamente en etanol o RNAlater. Todas las muestras fueron almacenadas en las dependencias del laboratorio de Ecología y Biodiversidad (UNAB) para su procesamiento.

### (6) Muestreos de jibia zona sur:

Esta actividad consistió en coordinar y llevar a cabo las salidas a terreno previamente descritas en la metodología (Tabla 1) con el fin de colectar las muestras de jibia que se preservaron inmediatamente en etanol o RNAlater. Todas las muestras fueron almacenadas en las dependencias del laboratorio de Ecología y Biodiversidad (UNAB) para su procesamiento.



### (7) Obtención de tejido:

Esta actividad se realizó en terreno y consistió en el corte de un trozo de tejido del manto de cada calamar en duplicado. Posteriormente se fijó una muestra en etanol 96% para la extracción de ADN y para la secuenciación de genes mitocondriales, y la otra en RNAlater para la adquisición de ADN de alta calidad para la obtención de SNPs.

### (8) Extracción de ADN:

Esta actividad se realizó en el Laboratorio de Ecología y Biodiversidad de la UNAB y consiste en el tratamiento de la muestra de tejido para la extracción de su ADN mediante un métodosalino (ver métodos).

### (9) Reuniones de coordinación de equipo de trabajo:

Las reuniones del equipo de trabajo se realizaron periódicamente para coordinar las actividades, dar a conocer los avances y planificar actividades siguientes. Estas se llevaron a cabo de manera virtual e incluyeron, al menos una vez al mes, contacto remoto (e.g., Zoom, Meet) con los expertos internacionales.

### (10) Asesoría SUBPESCA:

Se realizó un curso de genética en dos sesiones en la modalidad online para asesorar a SUBPESCA en materias relacionadas al proyecto (Tabla 6) y además un taller metodológico sobre el uso de SNPs. Los contenidos y el material suministrado permitieron comprender el uso de marcadores moleculares en estudios de estructuración genética del calamar *Dosidicus gigas*.

### (11) Informes:

A los 5 meses de iniciado el proyecto se entregó un informe de avance con las actividades y los resultados obtenidos a la fecha, de acuerdo con el plan de actividades y carta Gantt (Tabla 4).



A los 14 meses de iniciado el proyecto se entregó el pre-informe final con las actividades y los resultados obtenidos a la fecha, de acuerdo con el plan de actividades y carta Gantt (Tabla 4).

A los 17 meses de iniciado el proyecto se entregó el informe final con las actividades y los resultados

obtenidos a la fecha, de acuerdo con el plan de actividades y carta Gantt (Tabla 4).



# III. COMPOSICIÓN Y ORGANIZACIÓN DEL EQUIPO PROFESIONAL Y TÉCNICO

**Tabla 23.**Equipo de trabajo del proyecto FIPA N° 2020-20.

Nombre	Profesión	Institución	Función				
Christian M. Ibáñez	Biólogo Marino	Universidad	Director del				
	Dr. Ecología y Biología Evolutiva	Andrés Bello	Proyecto				
Pablo A. Oyarzún	Biólogo Marino	Universidad	Investigador				
	Dr. Biología Marina	Andrés Bello					
María C. Pardo-	Bióloga	Universidad	Investigadora				
Gandarillas	Dra. Ecología y Biología Evolutiva	Andrés Bello					
Pamela Morales	Bióloga	Independiente	Investigadora				
	Dra. Ecología y Biología Evolutiva						
Sergio A. Carrasco	Biólogo Marino	Independiente	Investigador				
	Dr. Biología Marina						
Mariana Díaz-	Bióloga	Universidad	Investigadora				
Santana	Dra. Ciencias Pesqueras	Andrés Bello					
Karina Acevedo	Bióloga	Universidad	Técnico				
		Andrés Bello					
Jennifer Catalán	Bióloga	Universidad	Técnico				
		Andrés Bello					



Tabla 24.Detalle de la asignación de actividades del personal profesional y técnico.

ACTIVIDADES		MESES DE PROYECTO																		
	ACTIVIDADES		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	Reunión de coordinación (online)	Х																		
2	Solicitud de Permiso de Pesca de Investigación	х																		
3	Busqueda de secuencias en GenBank y otras bases de datos públicas		х	Х																
4	Muestreos de jibia zona norte		Х	Х																
5	Muestreos de jibia zona centro		Х	Х																
6	Muestreos de jibia zona sur		х	Х																
7	Muestreos de jibia en Perú		Х	Х																
8	Obtención de tejido			Х	Х															
9	Extracción de ADN			Х	Х	х	х													
10	Amplificación genes mitocondriales						Х	Х	Х											
11	Preparación de ADN para DArTseq y SNPs						х	х	х											
12	Purificación y secuenciación de genes (MACROGEN, KOREA)						Х	Х	Х											
13	Edición de secuencias (Procedimiento bioinformatico)						х	х	х											
14	Análisis de estructuración y diversidad genética ADNmt							Х	Х	Х	Х									
15	Análisis de estructuración y diversidad genética SNPs																Х	Х	Х	Х
16	Analisis filogeografico usando coalescencia												Х	Х	Х	Х				
17	Reuniones de coordinación de equipo de trabajo		х	Х	Х	х	х	х	х	Х	х	Х	х	х	Х	х	х	х	х	х
18	Asesoría SUBPESCA					Х					Х									
19	Preparación de informes				Х	х			Х	Х	х	Х				х	х	х	х	х
20	Informe de avance					Х														
21	pre-informe final																Х			
22	informe final																			х
23	23 Analisis y respuesta a eventuales observaciónes al informe final																	Х	х	Х
24	24 Coordinación taller de difusión																	Х	х	
25	Taller de difusión (Santiago)																			Х

Tabla 25. Asignación de horas hombre para el proyecto. Profesional técnico profesional y de contabilidad.

NOMBRES	Rol	H/SEM	H/MES	MESES	H/PROYEC	
CI = Christian Ibañez	Director del proyecto	20	80	14	1120	
PO = Pablo Oyarzún	Investigador	10	40	14	560	
MCP = Maria Cecilia Pardo	Investigador	10	40	12	480	
PM = Pamela Morales	Investigador	10	40	12	480	
SC = Sergio Carrasco	Investigador	10	40	12	480	
MD-S= Mariana Diaz	Investigador	5	20	12	240	
KA = Karina Acevedo	Personal Técnico	26	104	10	1040	
JC = Jennifer Catalan	Personal Técnico	26	104	10	1040	
AC= Asistente de contabilidad	Contador	10	40	14	560	
		127	508			



# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Alegre A, Menard F, Tafur R, Espinoza P, Arguelles J, et al. (2014) Comprehensive Model of Jumbo Squid *Dosidicus gigas* Trophic Ecology in the Northern Humboldt Current System. PLoS ONE 9(1): e85919.
- Aljanabi, S. M., and Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nuc. Acids Res. 25, 4692–4693. doi: 10.1093/nar/25.22.4692
- An, J., Lee, M., Min, M.S., Lee, M., Lee, H., 2007. A molecular genetic approach for species identification of mammals and sex determination of birds in a forensic case of poaching from South Korea. Forensic Sci. Int. 167, 59–61
- Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., & Hohenlohe, P. A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. Nature Reviews Genetics, 17(2), 81–92.
- Argüelles, J., P.G. Rodhouse, P. Villegas & G. Castillo. (2001). Age, growth, and population structure of the jumbo flying squid *Dosidicus gigas* in Peruvian waters. Fish. Res., 54: 51-61.
- Arkhipkin, Alexander I., Paul G. K. Rodhouse, Graham J. Pierce, Warwick Sauer, Mitsuo Sakai, Louise Allcock, Juan Arguelles, John R. Bower, Ggladis Castillo, Luca Ceriola, Chih-Shin Chen, Xinjun Chen, Mariana Diaz-Santana, Nicola Downey, Angel F. González, Jasmin Granados Amores, Corey P. Green, Angel Guerra, Lisa Hendrickson, Christian Ibáñez, Kingo Ito, Patrizia Jereb, Yoshiki Kato, Oleg N. Katugin, Mitsuhisa Kawano, Hideaki Kidokoro, Vladimir V. Kulik, Vladimir V. Laptikhovsky, Marek R. Lipinski, Bilin Liu, Luis Mariategui, Wilbert Marin, Ana Medina, Katsuhiro Miki, Kazutaka Miyahara, Natalie Moltschaniwskyj, Hassan Moustahfid, Jaruwat Nabhitabhata, Nobuaki Nanjo, Chingis M. Nigmatullin, Tetsuya Ohtani, Gretta Pecl, J. Angel A. Perez, Uwe Piatkowski, Pirochana Saikliang, Cesar A. Salinas-Zavala, Michael Steer, Yongjun Tian, Yukio Ueta,



Dharmamony Vijai, Toshie Wakabayashi, Tadanori Yamaguchi, Carmen Yamashiro, Norio Yamashita, and Louis D. Zeidberg. (2015) World Squid Fisheries. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture 23: 92–252.

- Birk M.A., C. Paight & B.A. Seibel (2017) Observations of multiple pelagic egg masses from smallsized jumbo squid (*Dosidicus gigas*) in the Gulf of California, Journal of Natural History, 51:43-44, 2569-2584
- Bruno C., Cornejo C.F., Riera R. & Ibáñez C.M. (2020) What is on the menu? Feeding, consumption and cannibalism in exploited stocks of the jumbo squid *Dosidicus gigas* in south-central Chile. Fisheries Research. Aceptado.

Butler, J. M. (2012). Non-human DNA. In Advanced Topics in Forensic DNA Typing, 473–495.

- **Carrasco SA**, AI Varela, **CM Ibáñez**, J Sellanes, M Thiel (2020) Paralarval and juvenile stages as a proxy of cephalopod diversity in the Juan Fernández and Desventuradas Ecoregion, Southeast Pacific Ocean. Bulletin of Marine Science 96 (2): 263-280.
- Carrasco SA, E Meerhoff, B Yannicelli, CM Ibáñez (2019) First records and descriptions of early life stages of cephalopods from Rapa Nui (Easter Island) and the nearby Apolo seamount. Pacific Science 73 (1):161-174.
- **Carrasco SA**, R Maltrain, F Villenas, MA Vega (2012) New records of early life-stages of cephalopods in the Chiloé Interior Sea. Latin American Journal of Aquatic Research 40 (1): 229-235.
- Cheng, S. H., Gold, M., Rodriguez, N., & Barber, P. H. (2021). Genome-wide SNPs reveal complex fine scale population structure in the California market squid fishery (*Doryteuthis opalescens*).
   Conservation Genetics, 22(1), 97-110.



- Chong, J., C. Oyarzún, R. Galleguillos, E. Tarifeño, R.D. Sepúlveda & C.M. Ibáñez. (2005). Parámetros biológico-pesqueros de la jibia *Dosidicus gigas* (Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae) frente a la costa de Chile central (29°S-40°S) durante 1993-1994. Gayana, 69: 319-328.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., and Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3, 294–299.
- González, P., & Chong, J. (2006). Biología reproductiva de *Dosidicus gigas* D'Orbigny 1835 (Cephalopoda, Ommastrephidae) en la zona norte-centro de Chile. Gayana 70(2): 237-244.
- Hoving, H.J.T., W.F. Gilly, U. Markaida, K.J. Benoit-Bird, Z.W. Brown, P. Daniel, J.C. Field, L.Z. Parassenti, B. Liu & B. Campos. (2013). Extreme plasticity in life-history strategy allows a migratory predator (jumbo squid) to cope with a changing climate. Glob. Change Biol., 19: 2089-2103.
- Hudson, R.R., M. Slatkin & W. P. Maddison. (1992). Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. Genetics 132: 583-589.
- **Ibáñez C.M.** & L.A. Cubillos (2007) Seasonal variation in the length structure and reproductive condition of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) off central-south Chile. Scientia Marina 71(1): 123-128.
- **Ibáñez C.M.** (2013) El impacto ecológico del calamar *Dosidicus gigas* sobre las poblaciones de merluzas en el Océano Pacífico. Amici Molluscarum 21(1): 7-16.
- Ibáñez C.M., López-Córdova D., Zúñiga A., Arancibia H. (2019) Condición reproductiva de la jibia Dosidicus gigas en la zona costera del centro-sur de Chile. Revista de Biología Marina y Oceanografía 54 (1): 36-42.
- **Ibáñez CM** & P Ulloa (2014) Desarrollo de la pesquería y comercialización del calamar *Dosidicus gigas* en Chile. Amici Molluscarum 22: 7-14.



- **Ibáñez CM** & Poulin E (2014) Genetic structure and diversity of squids with contrasting life histories in the Humboldt Current System. Hidrobiologica 24: 1-10.
- **Ibáñez CM**, RD Sepúlveda, P Ulloa, F Keyl & MC **Pardo-Gandarillas** (2015) The Biology and Ecology of the Jumbo Squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda) in Chilean waters: a review. Latin American Journal of Aquatic Research 42: 402-414.
- Ibáñez, C.M. & F. Keyl. (2010). Cannibalism in cephalopods. Rev. Fish Biol. Fisher., 20: 123-136.
- Ibáñez, C.M., H. Arancibia & L.A. Cubillos. (2008). Biases in determining the diet of jumbo squid Dosidicus gigas (D'Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae) off southern-central Chile (34°S-40°S). Helgoland Mar. Res., 62: 331-338.
- Ibáñez, C.M., J. Argüelles, C. Yamashiro, R.D. Sepúlveda, M.C. Pardo-Gandarillas & F. Keyl (2016) Population dynamics of the squids *Dosidicus gigas* (Oegopsida: Ommastrephidae) and *Doryteuthis gah*i (Myopsida: Loliginidae) in northern Peru. Fisheries Research 173: 151–158.
- **Ibáñez, C.M.,** L.A. Cubillos, R. Tafur, J. Argüelles, C. Yamashiro & E. Poulin. (2011). Genetic diversity and demographic history of *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in the Humboldt Current System. Mar. Ecol. Prog. Ser., 431: 163-171.
- Keyl, F., J. Argüelles, L. Mariátegui, R. Tafur, M. Wolff & C. Yamashiro. (2008). A hypothesis on range expansion and spatio-temporal shifts in size-at-maturity of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) in the eastern Pacific Ocean. CalCOFI. Invest. Rep., 49: 119-128.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol. Biol. Evol. 35, 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096



- Lambeck, K., Rouby, H., Purcell, A., Sun, Y., & Sambridge, M. (2014). Sea level and global ice volumes from the Last Glacial Maximum to the Holocene. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111, 15296–15303.
- Lynch, M. and T. J. Crease, (1990). The analysis of population survey data on DNA sequence variation.Mol. Biol. Evol. 7: 377-394.
- Melville, J., Haines, M. L., Boysen, K., Hodkinson, L., Kilian, A., Smith Date, K. L., ... & Parris, K. M. (2017). Identifying hybridization and admixture using SNPs: application of the DArTseq platform in phylogeographic research on vertebrates. Royal Society open science, 4(7), 161061.
- Morse, P., Kjeldsen, S. R., Meekan, M. G., Mccormick, M. I., Finn, J. K., Huffard, C. L., & Zenger, K. R. (2018). Genome-wide comparisons reveal a clinal species pattern within a holobenthic octopod—the Australian Southern blue-ringed octopus, *Hapalochlaena maculosa* (Cephalopoda: Octopodidae). Ecology and evolution, 8(4), 2253-2267.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc.Natl. Acad. Sci. USA 70: 3321-3323.
- Nei, M. (1982). Evolution of human races at the gene level, pp. 167-181. In B. Bonne-Tamir, T. Cohen, and R. M. Goodman (eds.), Human genetics, part A: The unfolding genome. Alan R. Liss, New York.
- Nesis, K.N. (1970). The biology of the giant squid of Peru and Chile, *Dosidicus gigas*. Okeanology, 10: 140-152.
- Nesis, K.N. (1983). *Dosidicus gigas*. In: P.R. Boyle (ed.). Cephalopod life cycles, Vol. 1. Species accounts. Academic Press, London, pp. 216-231.
- Nguyen, N. H., Premachandra, H. K. A., Kilian, A., & Knibb, W. (2018). Genomic prediction using DArT-Seq technology for yellowtail kingfish Seriola lalandi. BMC genomics, 19(1), 1-9.



- Nigmatullin, Ch.M., K.N. Nesis & A.I. Arkhipkin. (2001). A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). Fisheries Research, 54: 9-19.
- **Oyarzún PA,** JE Toro, JI Cañete, JPA Gardner (2016) Bioinvasion threatens the genetic integrity of native diversity and a natural hybrid zone: smooth-shelled blue mussels (*Mytilus* spp.) in the Strait of Magellan. Biological Journal of the Linnean Society 117: 574-585.
- **Oyarzún PA,** Toro JE, Nuñez JJ, Gardner JPA (2019) Genetic variability of *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca: Bivalvia): the genetic pattern of an invasive marine species. ISJ-Invertebrate Survival Journal. 16:206.
- Pardo-Gandarillas M.C., C.M. Ibáñez, C. Yamashiro, E. Poulin (2018b) Demographic model and genetic diversity of *Octopus mimus* (Cephalopoda: Octopodidae) along the Humboldt Current System. Hydrobiologia 808:125–135.
- Pardo-Gandarillas M.C., C.M. Ibáñez, F.I. Torres, V. Sanhueza, A. Fabres, J. Escobar-Dodero, F.O. Mardones, M.A. Méndez (2018c) Phylogeography and species distribution modelling reveal the effects of the Pleistocene Ice Age on an intertidal limpet from the Southeastern Pacific. Journal of Biogeography 45(8): 1751-1767.
- Pardo-Gandarillas M.C., F.I. Torres, D. Fuchs, C.M. Ibáñez (2018a) Updated molecular phylogeny of the squid family Ommastrephidae: insights into the evolution of spawning strategies. Molecular Phylogenetics and Evolution 120: 212-217.
- **Pardo-Gandarillas M.C.**, K. Lohrmann, M. George-Nascimento & **C.M. Ibáñez** (2014) Diet and parasites of *Dosidicus gigas* in Humboldt Current System. Molluscan Research 34: 10-19.
- Rabassa, J., Coronato, A. M., & Salemme, M. (2005). Chronology of the Late Cenozoic Patagonian glaciations and their correlation with biostratigraphic units of the Pampean region (Argentina). Journal of South American Earth Sciences, 20, 81–103.



- Rafalski, A. (2002). Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. Current opinion in plant biology, 5(2), 94-100.
- Rocha, F., A. Guerra & F. González. (2001). A review of the reproductive strategies in cephalopods.Biol. Rev., 76: 291-304.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E.,
  Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets.
  Mol. Biol. Evol. 34: 3299-3302.
- Salzburger, W., Ewing, G. B., & Von Haeseler, A. (2011). The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. Molecular Ecology, 20, 1952–1963.
- Sanchez G, K Kawai, C Yamashiro, R Fujita, T Wakabayashi, M Sakai, and T Umino. (2020). Patterns of mitochondrial and microsatellite DNA markers describe historical and contemporary dynamics of the Humboldt squid *Dosidicus gigas* in the Eastern Pacific Ocean. Reviews in Fish Biology and Fisheries https://doi.org/10.1007/s11160-020-09609-9
- Sanchez G, S. Tomano, C. Yamashiro, R. Fujita, T. Wakabayashi, M. Sakai, T. Umino. (2016). Population genetics of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in the northern Humboldt Current system based on mitochondrial and microsatellite DNA markers. Fisheries Research 175: 1 – 9.
- Sandoval-Castellanos, E., M. Uribe-Alcocer & P. Díaz-Jaimes. (2007). Population genetic structure of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) evaluated by RAPD analysis. Fish. Res., 83: 113-118.
- Sandoval-Castellanos, E., M. Uribe-Alcocer & P. Díaz-Jaimes. (2009). Lack of genetic differentiation among size groups of jumbo squid (*Dosidicus gigas*). Cienc. Mar., 35: 419-428.



- Sandoval-Castellanos, E., M. Uribe-Alcocer & P. Díaz-Jaimes. (2010). Population genetic structure of Humboldt squid (*Dosidicus gigas*) inferred by mitochondrial DNA analysis. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 385: 73-78.
- Sansaloni, C., Petroli, C., Jaccoud, D., Carling, J., Detering, F., Grattapaglia, D., & Kilian, A. (2011). Diversity Arrays Technology (DArT) and next-generation sequencing combined: genome-wide, high throughput, highly informative genotyping for molecular breeding of Eucalyptus. In BMC proceedings (Vol. 5, No. 7, pp. 1-2). BioMed Central.

SPRFMO (2019) Second Squid Workshop Report. 20 p. Wellington, New Zealand 2019

- Staaf DJ, Camarillo-Coop S, Haddock SHD, Nyack AC, Payne J, Salinas-Zavala CA, Seibel BA, Trueblood L, Widmer C, Gilly WF. (2008). Natural egg mass deposition by the Humboldt squid (*Dosidicus gigas*) in the Gulf of California and characteristics of hatchlings and paralarvae. J Mar Biol Assoc United Kingdom. 88:759–770.
- Staaf, D.J., R.I. Ruiz-Cooley, C. Elliger, Z. Lebaric, B. Campos, U. Markaida & W.F. Gilly. (2010). Ommastrephid squids *Sthenoteuthis oualaniensis* and *Dosidicus gigas* in the eastern Pacific show convergent biogeographic breaks but contrasting population structures. Mar. Ecol. Prog. Ser., 418: 165-178.
- Tafur Jiménez, R., Mariátegui Rosales, L., Condori Condori, W., & Buitrón Díaz, B. (2016). Protocolo para muestreo biológico y biométrico de cefalópodos. Inf Inst Mar Perú, 43(4): 375-401.
- Timm, L. E., Bracken-Grissom, H. D., Sosnowski, A., Breitbart, M., Vecchione, M., & Judkins, H. (2020). Population genomics of three deep-sea cephalopod species reveals connectivity between the Gulf of Mexico and northwestern Atlantic Ocean. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 158, 103222.



van Deventer, R., Rhode, C., Marx, M., & Roodt-Wilding, R. (2020). The development of genome-wide single nucleotide polymorphisms in blue wildebeest using the DArTseq platform. Genomics, 112(5), 3455-3464.



# ANEXO 1 Acta de primera reunión

Valparaíso, 9 de marzo de 2021

#### Acta de Acuerdos

#### Primera Reunión Proyecto FIPA 2020-20

El presente documento resume comentarios y términos de acuerdo de la primera reunión de coordinación del Proyecto FIPA 2020-20 "Genética poblacional de *Dosidicus gigas* presente en el territorio nacional". En la reunión estuvieron presente Marcos Troncoso (Subsecretaria de Pesca y Acuicultura), Malú Zavando (FIPA), Christian Ibáñez (UNAB, Investigador Responsable del Proyecto), Pablo Oyarzún (UNAB, Investigador del Proyecto), María Cecilia Pardo (UNAB, Investigador del Proyecto). Esta se dio inicio a las 10:30 hrs. vía remota.

La reunión comenzó con la presentación de algunos aspectos administrativos que señaló Malú Zavando. Con respeto a ese tema, Pablo Oyarzún preguntó sobre la posibilidad de modificar la fecha de entrega del informe de avance, debido a la situación sanitaria, entre otras cosas. Esto dado a que ha pasado un mes desde que se firmó el contrato. En respuesta, M. Zavando señaló que esta modificación es posible realizarla, sin embargo, para ello se debe enviar una carta mediante e-mail a las autoridades de FIPA para que sea considerado. También indicó que normalmente esta petición demora aproximadamente una semana. Sugiere realizar esta petición en un momento más próximo a la entrega del primer informe, o una vez que se tenga mayor claridad en cuanto a los tiempos necesarios.

Por otro lado, Christian Ibáñez mencionó algunas posibles dificultades que podrían suscitar en la relación a los muestreos, principalmente en aquellas localidades del norte Chile y Perú. No obstante, también indicó que el equipo consultor realizará todos los esfuerzos para llevar a cabo estos muestreos.



En respuesta, Marcos Troncoso, afirmó que tal como se proponen los muestreos en el proyecto, se respeta el rango de distribución de la especie acordado, es decir las tres zonas de pesca (norte, centro y sur) en Chile, y por ende, se mantiene como fue solicitado en las bases del proyecto. No obstante, recalca que se deben realizar esfuerzos para muestrear la tercera y segunda Regiones.

También, M. Troncoso contextualizó los objetivos del proyecto en términos de la problemática y de los intereses de la subsecretaria. Además, mencionó que el equipo profesional del proyecto debería participar de la próxima reunión de la ORP como apoyo técnico al departamento.

Finalmente, María Cecilia Pardo consultó sobre el permiso de pesca de investigación. En respuesta, M. Troncoso mencionó que es importante que el proyecto realice esta solicitud lo antes posible, porque es un trámite que demora aproximadamente un mes. También recalcó algunas indicaciones para realizarlo de buena manera.

Finalmente, la reunión concluye a las 11:20 hrs.

Firman para conformidad,

Dr. Christian Ibáñez.	Biol. Mar. Marcos Troncoso.	Ingeniero Pesquero						
Inv. Responsable	Contraparte Técnica	Malú Zavando						
Universidad Andrés Bello	SUBPESCA	FIPA						

Dr. Pablo Oyarzún C.

Dra. María Cecilia Pardo

Coinvestigador

Coinvestigador

Universidad Andrés Bello

Universidad Andrés Bello







## ANEXO 2 Acta de reunión de coordinación

Santiago, 18 de junio de 2021

Acta de Acuerdos

### Segunda Reunión Proyecto FIPA 2020-20

El presente documento resume comentarios y términos de acuerdo de la segunda reunión de coordinación del Proyecto FIPA 2020-20 "Genética poblacional de *Dosidicus gigas* presente en el territorio nacional". En la reunión estuvieron presentes Marcos Troncoso (Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, SUBPESCA), Christian Ibáñez (UNAB, Investigador Responsable del Proyecto), Sergio Carrasco (Investigador del Proyecto), Pamela Morales (Investigadora del Proyecto) y Mariana Díaz (Investigadora del Proyecto). Esta reunión se inició a las 9:30 hrs., vía remota utilizando la aplicación zoom.

La reunión comenzó con el Sr. Marcos Troncoso (SUBPESCA) comentando la importancia del OBJETIVO 4, "Asesorar a la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura en materias relacionadas con la genética poblacional de *Dosidicus gigas* y sus respectivas técnicas de análisis". La idea de la asesoría de UNAB a SUBPESCA va a significar traspasar la información de este proyecto a la delegación que asistirá a la Organización Regional de Ordenamiento Pesquero del Pacifico Sur (ORP-PS) el próximo mes de septiembre. Por ello, se realizará una reunión con la SUBPESCA y luego otra reunión con la delegación chilena antes de la reunión de la ORP-PS. También menciona que algunos investigadores de este proyecto serán parte de la comisión, de preferencia Christian Ibáñez y un par integrantes más. Por otra parte, Ibáñez sugiere que participen en la reunión de la ORP-PS alguien con dominio de los temas genéticos en animales marinos externo al proyecto. Al respecto, Troncoso nos insta a sugerirle nombres



de investigadores para invitarlos como colaboradores a esta reunión y que estén atentos a la discusión de los resultados.

En cuanto al taller de capacitación que debemos impartir, Troncoso sugiere que podemos ver en conjunto los caminos más factibles para que participe la mayor cantidad la gente de SUBPESCA que puedan estar interesados. Este taller debe ser impartido antes de la reunión de la ORP-PS en modalidad online. Para resumir, (i) se realizará una reunión con la subsecretaria, (ii) se realizará otra reunión previa a la ORP-PS con la delegación chilena para mostrar nuestros resultados, y (iii) se deberá enviar un resumen de los resultados del proyecto que serán presentados en la reunión ORP-PS a fines de julio.

La reunión concluye a las 10:50 hrs.

Firman para conformidad,

Biol. Mar. Marcos Troncoso. Contraparte Técnica SUBPESCA

Dr. Christian Ibáñez.

Inv. Responsable

Universidad Andrés Bello

Dra. Mariana Díaz-Santana

Coinvestigadora

Universidad Andrés Bello



Dr. Sergio Carrasco

Coinvestigador Independiente

Dra. Pamela Morales

Coinvestigadora independiente





## ANEXO 3 Acta de tercera reunión

Valparaíso, 23 de marzo de 2022

### Acta de Acuerdos

### **Reunión Proyecto FIPA 2020-20**

El presente documento resume comentarios de acuerdo de la tercera reunión de coordinación del Proyecto FIPA 2020-20 "Genética poblacional de *Dosidicus gigas* presente en el territorio nacional". En la reunión estuvieron presente Marcos Troncoso (Subsecretaria de Pesca y Acuicultura) y Christian Ibáñez (UNAB, Investigador Responsable del Proyecto). Esta se dio inicio a las 17:00 hrs. vía remota.

La reunión comenzó con la presentación de información sobre las próximas reuniones de asesoría (objetivo 4) por parte de Marcos Troncoso. Se informó que en abril y mayo se realizarán reuniones de coordinación para el próximo taller de OROPS. La reunión de OROPS de este año 2022 se realizará presencial durante el mes de septiembre en Seúl, Corea. Se sugirió que otros investigadores del proyecto puedan participar de las reuniones virtuales.

Finalmente, la reunión concluye a las 18:00 hrs. Firman para conformidad,

Christian M. Ibáñez

Universidad Andres Bello

Marcos Troncoso

Subsecretaría de Pesca y Acuicultura







# ANEXO 4 Fotografías de los muestreos de jibia





# Muestreo de jibias en Quintay









Muestreo de jibias en Coquimbo



# Muestreo de jibias en Lebu



# ANEXO 4 Fotografías de trabajo en laboratorio



# Trabajo en laboratorio


# ANEXO 5 Species profile *Dosidicus gigas*.

Code: GIS

Scientific name: Dosidicus gigas



MBARI



Sonja Heinrich, 2004

(c)2003



### Taxonomy

Phylum	Mollusca
Class	Cephalopoda
Order	Teuthida
Family	Ommastrephidae
Genus and species	Dosidicus gigas (d'Orbigny, 1835)
Scientific synonyms	None
Common names	Humboldt squid, jumbo flying squid, jumbo squid, jibia, pota.
Molecular (DNA or	Available in the Barcode of Life Data System (BOLD), at:
biochemical) bar	http://www.boldsystems.org
coding	(Ref.:https://www.boldsystems.org/index.php/Public SearchTerms?query=%22Dosidi
	cus%20gigas%22[tax], see in Public Data to access DNA sequences)

## **Species characteristics**

### Distribution and depth range

*Dosidicus gigas* is a common species to the Eastern Pacific, ranging from Alaska to Southern Chile, and to 140°W at the equator (Figure 1) (Nesis 1983, Nigmatullin et al. 2001, Ibáñez et al. 2015). Its range is stretched meridionally and is semi-oceanic (Nigmatullin et al. 2001).



Adult squid undergo diel vertical migration with a night lift to the 0-200 m water layer, plunging in the daytime to 800-1000 m and deeper (Yatsu et al. 1999; Nigmatullin et al. 2001, Gilly et al. 2006, Bazino et al. 2010, Sakai et al. 2017, Csirke et al. 2018).



#### Dosidicus gigas

Figure 1. Known distribution of D. gigas. Source: Roper, Nigmatullin and Jereb (2010).

#### **Distribution within South Pacific area**

Straddling stocks occur off the coasts of Peru, Chile and Ecuador. Proportions inside and outside EEZs are unknown but trends have shown an increase of abundance in the high seas when coastal numbers are high. Large aggregations have been found in the zone of divergence of the Peruvian Oceanic current (17-22° S) (Nigmatullin 2002). *Dosidicus gigas* is commonly found along the entire Peruvian coast, occupying areas located between 10 and more than 500 nautical miles (nm) away from the coast (Csirke *et al.* 2015), however large concentrations occur along the coast of northern Peru (Taipe et al. 2001). In Chile, the *D. gigas* fishery is carried out in an extensive area from 32°30'S to 40°S and from the coast to 84°W (Fernandez & Vasquez 1995, Cubillos *et al.* 2004, Ibañez *et al.* 2015).



#### General habitat and behaviour

*Dosidicus gigas* is a pelagic species inhabiting offshores areas of the continental shelves, from the surface to depths of at least 1200 m (Nigmatullin *et al.* 2001). It can aggregate in schools that vary during the ontogeny (juvenile: 20-40 individuals; subadults: 20-200 individuals; adult: 2-5 to 10-12 individuals).

#### Population units and intraspecific groups

Based on biogeographic examinations, some authors proposed the existence of at least two stocks or populations units of jumbo flying squid (*D. gigas*) throughout its range in the Eastern Pacific Ocean, one in the northern hemisphere and one in the southern hemisphere (Wormuth 1976, 1998, Nesis 1983, Clarke & Paliza 2000). This has been confirmed by recent genetic studies evidencing that the jumbo flying squid off Mexico (NE Pacific) and off Peru and Chile (SE Pacific) belong to separate populations and have been separated for a long enough time to develop significant genetic differences (Sandoval-Castellanos et al. 2007, 2009, 2010, Staaf et al. 2010).

About intraspecific groups, Nigmatullin et al. (2001) identified and described three intraspecific groups of this species that have been observed in both the northern (Bazino et al. 2007, Markaida 2006) and southern hemisphere (Arguelles et al. 2001, 2008, 2017, 2018, Arguelles & Tafur 2010, Arguelles & Taipe 2018, Liu et al. 2013, 2013a, Li et al. 2016, 2017, Arkhipkin et al. 2015, Csirke et al. 2015), distinguishable by their maximum size and by the size at which male and females reach sexual maturity. Several authors have indicated the possibility that groups of squids that mature at different sizes represent genetically discrete units, even at the sub-population or sub-specific level (Nesis, 1983; Argüelles et al., 2001; Nigmatullin et al., 2001). However, molecular studies using specimens of different stages of sexual maturity collected from Peru and Mexico have demonstrated that these phenotypes are not genetically different (Sandoval-Castellanos et al., 2009, Sánchez et al. 2006) and only represent the large phenotypic



flexibility of this species (Hoving et al., 2013). The size variation observed in *D. gigas* is possibly a phenotypic response closely linked to the environmental conditions that interfere with the ontogeny of this species, changing the population structure and geographic distribution according to the cohort that is influenced by temperature and other environmental conditions (Liu *et al.* 2010, Bazzino 2014; Chen *et al.* 2014; Arkhipkin *et al.* 2015. Ibáñez et al. 2015).

#### **Biological characteristics**

According to Nigmatullin et al. 2001, in terms of many of the important morpho-functional characteristics such as the development of the jet propulsion system, fins, gladius, brain, statocysts, statoliths, etc., *D. gigas* has no substantial differences from the other four genera of Ommastrephinae (Ommastrephes, Stenoteuthis, Eucleoteuthis and Hyaloteuthis). Distinguished by the absence of large mantle skin photophores (only minor photophores are present), absence of eye and intestinal photophores in paralarval (which are present in juveniles and subadults), and elongates and attenuated arm ends. The arms of *D. gigas* have up to 200 pairs of suckers. The gladius is a typical ommastrephid type and characterized by double marginal ribs on the rachis, long lateral plates, being arc-like bent on the short stem, and the drop-like callus of the hypostracum on the ventral side of cone flages.

*Dosidicus gigas* has a conical-cylindrical mantle whose greatest radius is not always located in the open part, but often reaches its maximum near the middle portion. This does not seem related to gonadic growth or maturation since it is also observed in immature specimens. The radius of the mantle is reduced gradually towards the area of insertion of the fins, ending as a conical tip. The edge of the bade of the mantle in its ventral portion slightly turns outwards and upwards, between the cartilages that join the mantle with the siphon.



The fins have a rhomboid shape. The siphon is strong and muscular, with deep invagination and anterodorsally rounded. The faveola - the cleft that gives space to the siphon at the back of the head - has on average seven longitudinal grooves and four to five secondary folds on either side. The cartilage that joins the mantle with the head has an inverted T-shape bifurcation, characteristic of the ommastrephidae family.

The head is generally wider in the back, with two large, very conspicuous globular eyes, without eyelids (oegopsida) and placed on the sides of the head with an anterior projection. With a proportionally large and strong beak. The eight arms are practically identical, except for the right or left IV arm of the males, which is hectocotylized (copulatory organ), whose protective membrane is remarkably thick and has 13 holes on one side.

The arms' ends are narrow and have 100 to 200 tiny suckers. In the corneal rings of the larger suckers there are from 8 to 25 little teeth. In the tentacular club the suckers are arranged in four rows. The two tentacles are thinner twice longer than arms The color of the skin can range from pale pink to purple, passing through brown (Ehrhardt et al. 1986, Roper et al. 2010).

*Dosidicus gigas* are monocyclic, presenting only one reproductive season during their life. There is a distinct peak of spawning during spring and summer in the southern hemisphere (Nigmatullin et al. 2001). In Peruvian waters, spawning extends throughout the year, with a main spawning peak during October to January, and a secondary peak in July and august. (Tafur & Rabi 1997, Tafur et al. 2001). Individual spawning periods are long and intermittent (batch spawning) (Nigmatullin et al. 2001). Spawning takes place both over the continental slope and in adjacent oceanic areas, presumably near surface-water layers. In the Gulf of California, an egg mass was found in warm waters (25-27°C) at a depth of 16 m. The egg mass resembled a semi-transparent grey cloud, with dimensions ranged from 3-4 m for the major equatorial diameter (Staaf et al. 2008).



*Dosidicus gigas* has a flexible and opportunistic behaviour (Markaida 2006) which allows to respond quickly to environmental variability (Rodhouse & Nigmatullin 1996); which is evidenced in changes in distribution, abundance, growth rate, size at maturity and longevity associated with the availability of food and oceanographic conditions (Arguelles et al. 2008).

*D. gigas* grows quickly and does not live longer than 2 years, having an average life span of ~1 year (Arkhipkin & Murzov 1986, Masuda et al. 1998, Arguelles et al. 2001; Nigmatullin et al. 2001, Markaida et al. 2004, Liu et al. 2013, Goicochea-Vigo et al. 2019), although, some very large individuals can live for 18 months to 2 years (Nigmatullin et al. 2001). Liu *et al.* (2010) determined that *D. gigas* can live between 1.5 to 2 years, research developed by reading statoliths. However, other investigations have determined that this species can live up to 2.6 years, depending on its ontogenetic development (Keyl *et al.* 2010, Arkhipkin *et al.* 2015).

Regarding the size at maturity, Nigmatullin et al. (2001) have reported three population groups, each with different maturity ranges, including small (130-260 mm and 140-340 mm for males and females respectively), medium (240-420 and 280-600 mm for males and females, respectively) and large sizes at maturity (> 400-500 and 550-650 to 1000-1200 mm for males and females, respectively). These groups have been reported by Tafur et al. (2018) for the period 1989-2016, estimating the average mantle size (or length) at first maturity for smaller specimens around 201 mm in males (with annual estimates between 91 and 336 mm) and 306 mm in females (with annual estimates between 186 and 447 mm). For larger specimens, first maturity was estimated at 514 m for males and 642 mm for females. In EEZ off the Chilean coast, only individual with large size at maturity (56.5 and 63.8 cm of mantle length for males and females, respectively) have been found (Liu et al. 2010). The maximum potential fecundity was estimated in 32 million oocytes, and this potential is closely related to female size (Nigmatullin & Markaida 2008).



Embryonic development lasts for 6-9 days at 18°C, with mantle lengths (ML) at hatching averaging around 1.1 mm (Yatsu et al. 1999). In another study, Sakai et al. (2018) evaluated the early stages of embryonic development of jumbo flying squid under controlled condition, determining that at 20°C the eggs hatched 6.5 days after spawning. Ontogenesis includes the following phases: paralarvae (1-10 mm ML), juvenile (15-100mm ML), sub-adult (150-350 mm ML), and adult (400-1000 mm ML), with three transitional periods. During these periods the morphology, food spectrum, and ecological status of the squid change (see Nigmatullin et al. 2001).

#### **Role of species in the ecosystem**

*Dosodicus gigas* is thought to play an important role in oceanic food webs. They are prey to a variety of predators such as pelagic fish, marine birds, and mammals. Juveniles are preyed upon by large carnivorous fish, small tuna, squid, and gulls. Sub-adults are preyed upon by dorado, snake mackerel, yellowfin tuna, and other large tunas, fur seals; whereas adults are preyed by sharks, swordfish, striped marlin, sperm whales and pilot whales (Nigmatullin et al. 2001, Ibáñez et al. 2015). Sperm whale stomach contents from the southeast Pacific have shown that *D. gigas* is their main prey (Clarke et al. 1988). Before the moratorium on commercial whaling, the biomass of *D. gigas* consumed by exploited sperm whales in the eastern Pacific was estimated to be nearly 10 million tonnes (Clarke et al. 1988). Studies in the Gulf of California have reported that the jumbo squid feeds predominantly on mesopelagic fishes such as myctophids. Pteropods, micronekton squid, megalopae, and euphausiids have also been reported in the stomachs of jumbo squid (Markaida 2006a).

In the Southeast Pacific, *D. gigas* preys are similar to those recorded in the Gulf of California. A predominance of myctophids was observed, however, the gonostomatid *Vinciguerria lucetia* was the second in fish prey importance (Shchetinnikov 1989). The jumbo flying squid in the northern Peruvian



Current system consume high percentages by weight of mesopelagic fish, such as *Vinciguerria lucetia*, *Lampanyctus* spp., *Myctophum nitidulum*, *M. aurolaternatum* and *Diogenichthys laternatus*, as well as cephalopods, including their own species (cannibalism), the squid *Abraliopsis affinis*, the nautilus *Argonauta* spp., several species of Loliginidae, and other invertebrates such as euphausidae and the squat lobster *Pleuroncodes monodon* (Alegre at al. 2014).

*Dosidicus gigas* are recognized as voracious and adaptable predators of a broad range of prey including small crustaceans and fishes at early life stages and shift to micronekton, larger fishes, and cephalopods (including cannibalism) as they grow (Nigmatullin et al., 2001; Alegre et al., 2014, Pardo-Gandarillas et al. 2014, Bruno et al. 2021). Ontogenetic changes in the morphology of the capture apparatus (e.g., arms and beaks) seem to reflect the increasing capacity to seize or bite different size spectrum of prey (Franco-Santos and Vidal, 2014; Gong et al., 2018). Prey size increases as the squid grow (Schchetinnikov, 1989). Prey size, on average, is commonly between 5-7 cm and occasionally larger 10-15 cm for larger adult squid (Markaida & Sosa-Nishizaki 2003). A high occurrence of cannibalism (up to 70%) has been observed (Markaida 2006a).

Stable isotope analyses have complemented stomach content studies, suggesting that larger adult squid consumed prey of a higher trophic position than myctophids (Ruiz-Cooley *et al.* 2006, Pardo-Gandarillas et al. 2014, Bruno et al. 2021). However, in Peruvian waters the high inter individual variability of nitrogen isotope with mantle length indicates that *D. gigas* can prey on a high variety of resources at any stages of their life cycle (Lorrain et al. 2011, Arguelles *et al.* 2012), indicating that *D. gigas* has a high potential to adapt to environmental changes.

The majority of feeding records of *D. gigas* are descriptive (Fernández & Vásquez, 1995; Ibáñez *et al.*, 2008). Few studies have found that *D. gigas* collected off the Chilean coast do not show feeding differences related to their sexual and ontogenetic condition (Ulloa *et al.*, 2006, 2012; Pardo-Gandarillas



*et al.*, 2014). Apparently, variability in stomach contents occurs on a seasonal and geographic scale, possibly due to changes in prey availability in the HCS (Humboldt Current System) ecosystem (Chong *et al.*, 2005; Pardo-Gandarillas *et al.*, 2014, Bruno et al. 2021).

#### Parasites of the jumbo squid

Parasitic fauna associated with *D. gigas* caught in oceanic and coastal waters off Central Chile (32°S-40°S) is composed by cestode larvae: *Hepatoxylon trichiuri* (Holten, 1802) (abundance of 2.6 and prevalence of 70.2%), *Tentacularia coryphaenae* Bosc, 1802 (0.1 abundance, 5.6% prevalence), plerocercoid *Tetraphyllidea* (9.1 abundance, 83.1% prevalence), *Pelichnibothrium speciosum* Monticelli, 1889, *Anisakis* Type I (0.06 abundance, 6.5% prevalence) and *Anisakis* type II (0.52 abundance, 17.7% prevalence). Among the parasite species mentioned, *H. trichiuri* is a newly recorded parasite of *D. gigas* in the latitudes of the southeastern Pacific. Other taxa were previously described for *D. gigas* inhabiting Ecuador, Peru, and northern Chile (Shukhgalter & Nigmatullin, 2001). However, genetic studies have suggested the presence of nematodes larvae associated with the jumbo squid, with limited information about the taxa and their visual identification (Pardo-Gandarillas *et al.*, 2009). The composition and abundance of the parasite communities of *D. gigas* in each zone (Pardo-Gandarillas *et al.*, 2014).

#### Genetic studies of the jumbo squid



Recent phylogenetic studies of mitochondrial DNA have confirmed that the giant squid D. gigas belongs to the Ommastrephinae subfamily (Pardo-Gandarillas et al. 2018a). Regarding the genetic structure of the species, the existence of two genetic units has been suggested, one in the northern hemisphere (Mexico-USA) and another in the southern hemisphere (Peru-Chile), which are explained by a model of isolation by distance (Sandoval-Castellanos et al. 2007, 2010; Staaf et al. 2010. All the studies carried out to date are consistent in finding a low general genetic diversity, which suggests a demographic expansion between the last glacial period and the current interglacial period (Sandoval-Castellanos et al. 2010; Ibáñez et al. 2011; Ibáñez & Poulin 2014; Sánchez et al. 2016, 2020). Low levels of genetic diversity in marine animals with large population sizes are unusual and generally occur in those that have undergone drastic reductions in population size, bottlenecks, or founding events and are in processes of demographic expansion (Haye et al. 2014; Oyarzún et al. 2016; Pardo-Gandarillas et al. 2018a, b, c). In this sense, the historical variation of primary productivity along the Humboldt Current System would have caused historical fluctuations in the population size of D. gigas and in its range of distribution (Ibáñez et al. 2011; Ibáñez & Poulin 2014). Consequently, today's large squid populations are the result of relatively recent population expansions, as their genetic diversity has not yet reached new levels of equilibrium (Ibáñez et al. 2011; Ibáñez & Poulin 2014).

#### **Impacts of Fishing**

#### Habitat damage

Considering the highly selective type of fishing methods (jiggers) that are mostly employed, habitat damage is likely to be minimal.



- Alegre, A., Ménard, F., Tafur, R., Espinoza, P., Argüelles, J., Maehara, V., Flores, O., Simier, M., Bertrand, A. (2014). Comprehensive model of Jumbo squid *Dosidicus gigas* trophic ecology in the Northern Humboldt current system. *PLoS One* 9(1), e85919: 11p doi: 10.1371/journal. pone.008591
- Arguelles, J., Rodhouse, P.G., Villegas, P., Castillo, G. (2001). Age, growth and population structure of the jumbo flying squid *Dosidicus gigas* in Peruvian waters. *Fisheries Research* 54: 51-31.
- Argüelles, J., Tafur, R., Taipe, A., Villegas, P., Keyl, F., Dominguez, N., Salazar ,M. (2008). Size increment of jumbo flying squid *Dosidicus gigas* mature females in Peruvian waters, 1989–2004. *Progress in Oceanography*. 79: 308-312.
- Argüelles, J., Tafur, R. (2010). New insights on the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* in the Northern Humboldt Current System: size at maturity, somatic and reproductive investment. *Fisheries Research.* 106: 185-192.
- Arguelles, J., Lorrain, A., Cherel, Y., Graco, M., Tafur, R., Alegre, A., Espinoza, P., Taipe, A., Ayón,
  P., Bertrand, A. (2012). Tracking habitat and resources use for the jumbo squid *Dosidicus gigas*: a stable isotope analysis in the Northern Humboldt Current System. *Marine Biology* 159: 2105-2116
- Argüelles, J., Csirke, J., Mariategui, L., Castillo, R. (2017). Distribution, size composition, possible stock structure and the assessment of jumbo flying squid (*Dosidicus gigas*) off Peru. Paper presented at the 5th meeting of the Scientific Committee of the SPRFMO, Shanghai, China. 23-28 September. SPRFMO Doc. SC5-SQ07\_ rev1: 11 p. (<u>https://www.sprfmo.int/assets/SC5-2017/</u> SC5-SQ07-rev1-Distribution-Size-Stock-structure-andAssessment-for-Jumbo-flying-squid.pdf)



- Argüelles, J., Taipe, A. (2018). Variabilidad espacio temporal de la estructura por tallas de *Dosidicus gigas* (d'Orbignyi, 1835) en aguas peruanas entre 1958 y 2012. *Boletin Instituto Mar Perú*. 33(2): 167-177.
- Arkhipkin, A., Murzov, S. (1986). Age and growth patterns of *Dosidicus gigas* (Ommastrephidae). In: Ivanov, B. (Ed.) Present state of fishery for squids and prospects of its development. VNIRO Press, Moscow. (In Russian, Spanish Translation). 107-123.
- Arkhipkin, A., Rodhouse, P., Pierce, G., Sauer, W., Sakai, M., Allcock, L., Arguelles, J., Bower, J.,
  Castillo, G., et al. (2015). World squid fisheries. *Reviews in fisheries science & aquaculture*, 23:2, 92-252, DOI: 10.1080/23308249.2015.1026226.
- Arkhipkin A., Argüelles J., Shcherbich Z. & Yamashiro C. (2015) Ambient temperature influences adult size and life span in jumbo squid (*Dosidicus gigas*), Can. J. Fish. Aquat. Sci. 72: 400–409.
- Bazino, G., Salinas-Zavala, C., Markaida, U. (2007). Variability in the populations structure of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) in Santa Rosalia, Central Gulf of California. *Ciencias Marinas* 33 (2): 173-186.
- Bazino, G., Gilly, W., Markaida, U., Salizas-Zavala, C., Ramos-Castillejo, J. (2010). Horizontal movements, vertical-habitat utilization and diet of the jumbo squid (*Dosidicus gigas*) In the Pacific Ocean off Baja California Sur, Mexico. *Progress in Oceanography* 86:59-71.
- Bazzino, G (2014). Length—Weight Relationships and Condition Factors of the Humboldt Squid (*Dosidicus gigas*) from the Gulf of California and the Pacific Ocean, Journal of Shellfish Research 33(3): 769-780.
- Chen, X., H. Lu, B. Liu & Y. Chen (2011) Age, growth, and population structure of jumbo flying squid, *Dosidicus gigas*, based on statolith microstructure off the exclusive economic zone of Chilean waters.
  J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 91: 229-235



- Chen, X., Li, J., Liu, B. *et al.* (2014) Fishery biology of jumbo flying squid *Dosidicus gigas* off Costa Rica Dome, J. Ocean Univ. China 13, 485–490.
- Clarke, R., Paliza, O., Aguayo, A. (1988). In: Pilleri, G. (Ed.), Sperm whale of the southeast Pacific. Part IV fatness, food and feeding. Investigations on Cetacea, Vol. XXI, pp. 53-195.
- Clarke, R., Paliza, O. (2000). The Humboldt Current squid *Dosidicus gigas* (Orbigny, 1835). *Revista de Biologia Marina y Oceanografia*. 35: 1-38.
- Csirke, J., Alegre, A., Argüelles, J., Guevara-Carrasco, R., Mariátegui, L., Segura, M., Tafur, R., Yamashiro, C. (2015). Main biological and fishery aspects of the jumbo squid (*Dosidicus gigas*) in the Peruvian Humboldt Current System. Paper presented at the 3rd meeting of the Scientific Committee of the SPRFMO. Port Vila, Vanuatu. 28 September - 3 October 2015. SPRFMO Doc. SC-03-27: 33p. (http://www.sprfmo.int/assets/Meetings/ Meetings-2013-plus/SC-Meetings/3rd-SC-Meeting-2015/ Papers/SC-03-27-Biological-and-fishery-aspects-of-thejumbo-squid-in-the-Peruvian-Humboldt-current.pdf)
- Csirke, J., Arguelles, J., Alegre, A., Ayon, P., Bouchon, M., Castillo, G., Castillo, R., Cisneros, R.,
  Guevara-Carrasco, R., Lau, L., Mariátegui, L., Salazar, C., Tafur, R., Torrejon, J., Yamashiro, C.
  (2018). Biology, population structure and fisheries of jumbo flying squid (*Dosidicus gigas*) in Peru. *Boletin Instituto Mar Perú* 33(2):302-364.
- Cosgrove, JA, Sendall, KA. (2005). First records of *Dosidicus gigas*, the Humboldt squid in the temperate Northeastern Pacific. Archives of the British Columbia Royal Museum, Victoria, Canada. 10 p. (https://www.researchgate.net/publication/265815348)
- Cubillos, L., Ibáñez, Ch., Gonzales, C., Sepúlveda, A., Gallardo, M., Garrido, J., Cid, E., Bruno, C., Pincheira, C., Mena, R., Carrasco, P., Torres, R., Vera, C. (2004). Informe Final.



Pesca de jibia (Dosidicus gigas) con red de cerco entre la V y X regiones, año 2003. Instituto de Investigación pesquera. 48 p.

d'Orbigny, A. (1835). Mollusques. Voyage dans l'Amérique Méridionale 5 (3), 758 pp. (1835-1847).

- Ehrhardt, NM., Solis, NA., Jacquemin, PS., Ortiz, J., Ulloa, P., Gonzales, G., García, F. (1986). Análisis de la biología y condiciones del stock del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el Golfo de California México, durante 1980. *Ciencia Pesquera. Inst. Nal. Pesca. Sria Pesca. México* 5:63-76.
- Fernandez, F., Vasquez, J.A. (1995). The jumbo flying squid *Dosidicus gigas* (Orbigny, 1835) in Chile: analysis of an ephemeral fishery. *Estudios Oceanologicos 14*: 17-21.
- Franco-Santos, RM., Vidal, EAG. (2014). Beak development of early squid paralarvae (Cephalopoda: Teuthoidea) may reflect an adaptation to a specialized feeding mode. *Hydrobiologia* 725, 85–103.
- Gilly, WF., Elliger, CA., Salinas, CA., Camarilla-Coop, S., Bazzino, G., Beman, M. (2006) Spawning by jumbo squid Dosidicus gigas in San Pedro Martir Basin, Gulf of California, Mexico. *Marine Ecology Progress Series 131*: 125-133.
- Goicochea-Vigo, C., Morales-Bohorquez, E., Zepeda-Benitez, V., Hidalgo-de-la-Toba, J., Aguirre-Villaseñor, H., Mostacero-Koc, J., Atoche-Suclupe, D. (2019). Age and growth estimates of the jumbo flying squid (*Dosidicus gigas*) off Peru. *Aquatic Living Resources*. 32:7
- Gong, Y., Ruiz-Cooley, RI., Hunsicker, ME., Li, Y., Chen, X. (2018). Sexual dimorphism in feeding apparatus and niche partitioning in juvenile jumbo squid *Dosidicus gigas*. *Marine Ecology Progress Series*. 607, 99–112.
- Haye, P. A., Segovia, N. I., Muñoz-Herrera, N. C., Gálvez, F. E., Martínez, A., Meynard, A., PardoGandarillas M.C., Poulin E. & Faugeron, S. (2014). Phylogeographic structure in benthic marine invertebrates of the southeast Pacific coast of Chile with differing dispersal potential. PLoS One, 9(2), e88613.



- Ibáñez CM & Poulin E (2014) Genetic structure and diversity of squids with contrasting life histories in the Humboldt Current System. Hidrobiologica 24: 1-10
- Ibáñez, C.M., L.A. Cubillos, R. Tafur, J. Argüelles, C. Yamashiro & E. Poulin. (2011). Genetic diversity and demographic history of *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in the Humbold Current System. Mar. Ecol. Prog. Ser., 431: 163-171.
- Ibáñez, Ch., Sepúlveda, R., Ulloa, P., Keyl, F., Pardo-Gandarillas, C. (2015). The biology and ecology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda) in Chilean waters: a review. Latin American Journal of Aquatic. Research. 43(3):402-414.
- Keyl, F., Argüelles, J., Tafur, R.(2011) Interannual variability in size structure, age, and growth of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) assessed by modal progression analysis, ICES Journal of Marine Science, Volume 68, Issue 3:507–518.
- Li, G., Chen, X., Zou, X., Liu, B. (2016). China's National Report Part II: Squid Jigging Fishery. Paper presented at the 4th meeting of the Scientific Committee of the SPRFMO. The Hague, Kingdom of the Netherlands, 10-15 October 2016. SPRFMO Doc. SC-04-11 rev1: 11 p. (<u>http://www</u>. sprfmo.int/assets/Meetings/Meetings-2013-plus/SCMeetings/4th-SC-Meeting-2016/SC04papers/SC-04- 11-rev1-Chinas-Annual-Report-Part-II-Revised-Squidjigging-fishery.pdf)
- Li, G., Chen, X., Liu, B., Xu, L. (2017). China's Annual Report to the 2017 SPRFMO Scientific Committee, Part II: the squid jigging fishery. Paper presented at the 5th meeting of the Scientific Committee of the SPRFMO. Shanghai, China, 23-28 September 2017. SPRFMO Doc. SC5-Doc. 17:
  - 9 p. (http://www.sprfmo.int/assets/00-SC5-2017/SC5- Doc17-Chinas-Annual-report-part-II-Squid.pdf)
- Liu, B., Chen, X., Lu, H., Chen, Y., Qian., W. (2010). Fishery biology of the jumbo flying squid *Dosidicus gigas* off the Exclusive Economic Zone of Chilean waters. *Scientia Marina* 74 (4):687-695.



- Liu, B., Chen, X., Chen, Y., Tian, S., Li, J., Fang, Z., Yang, M. (2013). Age, maturation, and population structure of the Humboldt squid *Dosidicus gigas* off the Peruvian Exclusive Economic Zones. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. Vol. 31(1): 81-91.
- Liu, B., Chen, X., Yi, Q. (2013a). A comparison of fishery biology of jumbo flying squid, *Dosidicus gigas* outside three Exclusive Economic Zones in the Eastern Pacific Ocean. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 31(3): 523-533. (http://dx.doi.org/10.1007/s00343-013-2182-3)
- Liu, B., Chen, X., Chen, Y., Tian, S., Li, J., Fang, Z., Yang, M. (2013). Age, maturation and population structure of the Humboldt squid *Dosidicus gigas* off Peruvian Exclusive Economic Zones. *Chinese Journal of Oceanology and limnology*. 31(1):81-91.
- Lorrain, A., Arguelles, J., Alegre, A., Munaron, JM., Richard, P., Cherel, Y. (2011). Sequential isotopic signature along gladius highlights contrasted individual foraging strategies of jumbo squid (Dosidicus gigas). Plos ONE 6(7): e22194. doi:10.1371/journal.pone.0022194
- Markaida, U., Quinonez-Velazquez, C., Sosa-Nishizaki, O. (2004). Age, growth and maturation of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Gulf of California, Mexico. *Fisheries Research* 66: 31-47.
- Markaida, U., Sosa-Nishizaki, O. (2003). Food and feeding habits of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Gulf of California, Mexico. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 83: 507-522.
- Markaida, U. (2006a). Food and feeding of jumbo squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California and adjacent waters after the 1997-98 El Nino event. *Fisheries Research* 79(1-2): 16-27.
- Markaida, M. (2006<del>b</del>). Population structure and reproductive biology of jumbo squid *Dosidicus gigas* from the Gulf of California after the 1997-98 El Nino event. *Fisheries Research 19*: 28-37.



- Masuda, S., Yokawa, K., Yatsu, A., Kawahara, S. (1998). Growth and population structure of *Dosidicus gigas* in the Southeastern Pacific Ocean. In: Okutani, T. (Ed.) Contributed papers to International symposium on large pelagic squids, July 18-19, 1996, JAMARC, Tokyo, pp. 107-118.
- Nesis, KN. (1983). *Dosidicus gigas*. In Boyle, P.R. (Ed.), Cephalopod Life Cycles. Volume 1. Academic Press, London. 215-231.
- Nigmatullin, CM., Nesis, K.N., Arkhipkin, A.I. (2001). A review on the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fisheries Research* 54: 9-19.
- Nigmatullin, Ch. M., (2002). Preliminary estimates of total stock size and production of Ommastrephid squids in the world ocean. *Bulletin of Marine Science* 71(2): 1134.
- Nigmatullin, Ch., Markaida, U. (2008). Oocyte development, fecundity and spawning strategy of large sized jumbo squid *Dosidicus gigas* (Oegopsida: Ommastrephinae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 89(4):789-801.
- Oyarzún PA, JE Toro, JI Cañete, JPA Gardner (2016) Bioinvasion threatens the genetic integrity of native diversity and a natural hybrid zone: smooth-shelled blue mussels (Mytilus spp.) in the Strait of Magellan. Biological Journal of the Linnean Society 117: 574-585.
- Pardo-Gandarillas, M.C., K. Lorhmann, A.L. Valdivia & C.M. Ibáñez. (2009). First record of parasites of Dosidicus gigas (d'Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Humboldt Current System off Chile. Rev. Biol. Mar. Oceanogr., 44: 397-408.
- Pardo-Gandarillas, M.C., K. Lorhmann, M. GeorgeNascimento & C.M. Ibáñez. (2014). Diet and parasites of Dosidicus gigas (d'Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Humboldt Current System. Molluscan Res., 34: 10-19.



- Pardo-Gandarillas M.C., F.I. Torres, D. Fuchs, C.M. Ibáñez (2018a) Updated molecular phylogeny of the squid family Ommastrephidae: insights into the evolution of spawning strategies. Molecular Phylogenetics and Evolution 120: 212-217.
- Pardo-Gandarillas M.C., C.M. Ibáñez, C. Yamashiro, E. Poulin (2018b) Demographic model and genetic diversity of Octopus mimus (Cephalopoda: Octopodidae) along the Humboldt Current System. Hydrobiologia 808:125–135.
- Pardo-Gandarillas M.C., C.M. Ibáñez, F.I. Torres, V. Sanhueza, A. Fabres, J. Escobar-Dodero, F.O. Mardones, M.A. Méndez (2018c) Phylogeography and species distribution modelling reveal the effects of the Pleistocene Ice Age on an intertidal limpet from the Southeastern Pacific. Journal of Biogeography 45(8): 1751-1767.
- Rodhouse, P.G., Nigmatullin, Ch.M. (1996). Role as consumers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 351: 1003–1022.
- Roper, F.E., Nigmatullin, C., Jereb P. (2010). Family Ommastrephidae *Steenstrup*, *1857*: 269-347. *In* P. Jereb & C.F.E. Roper, eds. (2010). Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date. Volume 2. Myopsid and Oegopsid Squids. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes, FAO, Rome, No. 4, Vol. 2: 605p. +10 colour plates. http://www.fao.org/3/i1920e/i1920e.pdf
- Ruiz-Cooley, R.I., Markaida, U., Gendron, D., Aguiniga, S. (2006). Stable isotopes in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) beaks to estimate its trophic position: comparison between stomach contents and stable isotopes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 86(2): 437-445.
- Sakai, M., Tsuchiya, K., Mariategui, L., Wakabayashi, T., Yamashiro, C. (2017). Vertical migratory behavior of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) off Peru: records of Acoustic and pop-up Tags. JARQ 51(2): 171-179. <u>https://www.jircas.go.jp</u>



- Sakai, M., Vijai, D., Yamashiro, C., Wakabayashi, T. (2018). Observations on embryos and embryonic development from an egg mass of the jumbo squid *Dosidicus gigas* spawned under captive conditions. *Boletin Instituto Mar Perú* 33(2): 153-159.
- Sanchez G, S. Tomano, C. Yamashiro, R. Fujita, T. Wakabayashi, M. Sakai, T. Umino. (2016). Population genetics of the jumbo squid Dosidicus gigas (Cephalopoda: Ommastrephidae) in the northern Humboldt Current system based on mitochondrial and microsatellite DNA markers. Fisheries Research 175: 1 – 9.
- Sanchez G, K Kawai, C Yamashiro, R Fujita, T Wakabayashi, M Sakai, and T Umino. (2020). Patterns of mitochondrial and microsatellite DNA markers describe historical and contemporary dynamics of the Humboldt squid Dosidicus gigas in the Eastern Pacific Ocean. Reviews in Fish Biology and Fisheries
- Sandoval-Castellanos, E., Uribe-Alcocer, M., Díaz-Jaimes, P. (2007). Population genetic structure of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) evaluated by RAPD analysis. *Fisheries Research*. 83: 113–118.
- Sandoval-Castellanos, E., Uribe-Alcocer, M., Díaz-Jaimes, P. (2009). Lack of genetic differentiation among size groups of jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *Ciencias Marinas*. 35(4): 419–428.
- Sandoval-Castellanos, E., Uribe-Alcocer, M., Díaz-Jaimes, P. (2010). Population genetic structure of the Humboldt squid (*Dosidicus gigas*, d'Orbigny, 1835) inferred by mitochondrial DNA analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 385: 73–78.
- Shchetinnikov, A.S. (1989). Food spectrum of *Dosidicus gigas* (Oegopsida) in the ontogenesis. *Zoologicheskii Zhurnal* 68: 28-39 [In Russian with English Abstract].
- Shukhgalter, O.A. & Ch.M. Nigmatullin. 2001. Parasitic helminths of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in open waters of the central east Pacific. Fish. Res., 54: 95-110.



- Staaf, D., Camarillo-Coop, S., Haddock, S., Nyack, A.L., Payne, J., Salinas-Zavala, C., Seibel, B., Trueblood, L., Widmer, C. (2008). Natural egg mass deposition by the Humboldt squid (*Dosidicus* gigas) in the Gulf of California and characteristics of hatchlings and paralarvae. *Journal of the marine Biological Association of the United Kingdom*, 88(4):759-770.
- Staaf, D.J., Ruiz-Cooley, R.J., Elliger, C., Lebaric, Z., Campos, B., Markaida, U., Gilly, W.F. (2010). Ommastrephid squids *Sthenoteuthis oualaniensis* and *Dosidicus gigas* in the eastern Pacific show convergent biogeographic breaks but contrasting population structures. *Marine Ecology Progress Series.* 418: 165-178
- Taipe, A., Yamashiro, C., Mariategui, L., Rojas, P., Roque, C. (2001). Distributions and concentrations of jumbo flying squid (*Dosidicus gigas*) off the Peruvian coast between 1991 and 1999. *Fisheries Research* 54: 21-32.
- Tafur, R., Villegas, P., Rabi, M., Yamashiro, C. (2001). Dynamics of maturation, seasonality and reproduction and spawning grounds of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in Peruvian waters. *Fisheries Research* 54: 35-50.
- Tafur, R., Rabi, M. (1997). Reproduction of the jumbo flying squid, *Dosidicus gigas* (Orbingy, 1835)(Cephaloopda: Ommastrephidae) off Peruvian coasts. *Scientia Marina* 61 (suppl. 2): 33-37.
- Tafur, R., Perea, A., Buitrón, B. (2018). Aspectos reproductivos del calamar gigante *Dosidicus gigas* (d'orbigny, 1835) en el mar peruano. *Boletín Instituto Mar Perú*. 33 (2):119-136
- Wormuth, J.H. 1976. The biogeography and numerical taxonomy of the oegopsid squid family Ommastrephidae in the Pacific Ocean. *Bulletin of the Scripps Institution of Oceanography*. 23: 90 p.
- Wormuth, J.H. 1998. Workshop deliberations on the Ommastrephidae; a brief history of their systematics; and a review of the systematics, distribution, and biology of the genera *Martialia* Rochebrune and Mabille, 1889; *Todaropsis* Girard, 1890; *Dosidicus* Steenstrup, 1857; *Hyaloteuthis*



Gray, 1849 and *Eucleoteuthis* Berry, 1916. In Voss, N. A., M. Vecchione, R. B. Toll & M. J. Sweeney (Eds.) *Systematics and biogeography of cephalopods. Smith. Contrib. Zool.* 586 (II): 373-384

Yatsu, A., Yamanaka, K., Yamashiro, C. (1999). Tracking experiments of the jumbo squid, *Dosidicus gigas*, with an ultrasonic telemetry system in the Eastern Pacific Ocean. *Bull. Nat. Res. Inst. Far Seas Fish.* 36: 55-60.