

DESENVOLUPAMENT I APLICACIÓ DELS MICROSATÈL·LITS A L'ESTUDI DE LA DINÀMICA REPRODUCTIVA DE LA GAMBA ROSADA (ARISTEUS ANTENNATUS)

Laia Planella Albí

Per citar o enllaçar aquest document:
Para citar o enlazar este documento:
Use this url to cite or link to this publication:
<http://hdl.handle.net/10803/664235>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

TESI DOCTORAL

DESENVOLUPAMENT I APLICACIÓ DELS MICROSATÈL·LITS
A L'ESTUDI DE LA DINÀMICA REPRODUCTIVA
DE LA GAMBA ROSADA (*Aristeus antennatus*)

LAIA PLANELLA I ALBI





Fotografia de coberta exterior i interior: Francesc Rabat

Disseny de la coberta interior i exterior: Alicia Vogel

Maquetació: Susanna Berga

Queda rigorosament prohibida la reproducció total o parcial d'aquesta tesi. Cap part d'aquesta publicació, inclòs el disseny de la coberta pot ser reproduïda o utilitzada sense autorització prèvia de l'autora.



Tesi doctoral

DESENVOLUPAMENT I APLICACIÓ DELS MICROSATÈL·LITS
A L'ESTUDI DE LA DINÀMICA REPRODUCTIVA DE
LA GAMA ROSADA (*Aristeus antennatus*)

Laia Planella i Albi

2018

Programa de Doctorat en Ciència i Tecnologia de l'Aigua

Dirigida per:

Dra. Maria Inés Roldán Borassi

Dra. Sandra Heras Mena

Tutora:

Dra. Maria Inés Roldán Borassi

Memòria presentada per optar al títol de doctora per la Universitat de Girona



La Dra. Maria Inés Roldán Borassi, Professora Titular de Genètica i la Dra. Sandra Heras Mena, Agregada Interina, ambdues del Departament de Biologia de la Universitat de Girona,

DECLAREM

que aquest treball, titulat **Desenvolupament i aplicació dels microsatèl·lits a l'estudi de la dinàmica reproductiva de la gamba rosada (*Aristeus antennatus*)**, que presenta Laia Planella i Albi per a l'obtenció del títol de Doctora, ha estat realitzat sota la nostra direcció.

I, perquè així consti i tingui els efectes oportuns, signem aquest document.

Maria Inés Roldán Borassi

Sandra Heras Mena

Girona, 27 d'abril de 2018

a la iaia Teresa
a la meua mare
a la Nox

AGRAÏMENTS

El desenvolupament d'aquesta tesi ha estat possible gràcies a:

- Universitat de Girona per l'ajut UdG per a investigadors en formació 2014 (BR-2014).
- Ajuntament de Palamós i Servei d'Arxiu Municipal de Palamós pel suport financer del projecte La gamba de Palamós: noves eines genètiques per a la sostenibilitat del recurs pesquer a la confraria de Palamós (Beca Cooperativa la Equitativa 2013-2014).
- *Ministerio de Economía y Competitividad* pel suport financer del projecte *CONNECTividad poblacional en la gamba rosada, Aristeus antennatus, en el Mediterráneo noroccidental entre el Golfo de León y el Golfo de Valencia. - Flujo GÉNico (CONNECTA-GEN)* (CTM2014-54648-C2-2-R).
- Universitat de Girona pel suport financer del projecte Recursos genètics marins d'interès alimentari: aplicació de marcadors moleculars en l'estudi de poblacions naturals explotades (MPCUdG2016/132).
- Universitat de Girona per l'ajut complementari per a la mobilitat d'investigadors de la UdG (MOB16) a través del qual he realitzat una estada d'1 mes de durada al *Departamento de Genética de la Universidad de Santiago de Compostela*, Lugo, Espanya, amb el Dr. Manuel Vera Rodríguez i Prof. Dr. Paulino Martínez Portela.

AGRAÏMENTS PERSONALS

Quan has acabat de redactar la tesi i t'adones que la pàgina d'agraïments personals és completament blanca, et fa entreveure que potser és l'apartat més difícil d'escriure. Difícil perquè et porta molts records, difícil perquè fas un feedback dels últims anys de la teva vida i difícil perquè aquí s'acaba definitivament una etapa i s'obre la porta d'una altra.

Durant aquests darrers 5 anys m'he creuat amb molta gent, però algunes persones m'han ajudat especialment ja sigui en l'àmbit professional o personal i és a elles a qui vull dedicar unes línies.

Primer agrair a la Marina l'oportunitat de realitzar la tesi i viure en primera persona el món de la investigació.

Seguidament, li vull dir a la Sandra gràcies per tot! Gràcies per iniciar-me al món del laboratori, gràcies per ensenyar-me les tècniques, gràcies per ajudar-me en la redacció dels articles, gràcies per transmetre'm la il·lusió per la ciència, gràcies pels múltiples consells i, sobretot... gràcies per fer possible que avui acabi d'escriure la tesi. Si no hagués estat per tu, faria anys que hi hauria renunciat, però la teva constància per lluitar pel que t'entusiasma ha aconseguit que la muntanya russa de la meva tesi hagi arribat a bon port.

Agrair a en José Luís les seves fantàstiques explicacions sobre estadística, la resolució de dubtes quan ha fet falta, l'ajuda inqüestionable en la discussió dels resultats i les correccions dels articles.

També vull enviar les gràcies a en Manel per ajudar-me a ordenar les idees i a redactar els articles. Agrair-li també que m'acollís a Lugo com si fos de la família i m'ensenyés una forma diferent de treballar i de viure.

Ja fora de l'àmbit acadèmic, vull donar les gràcies a en Rabat per les fotografies que il·lustren aquesta tesi i a l'Alícia pel disseny de la coberta exterior i interior i l'assessorament en el disseny de la tesi.

Finalment, agrair el suport incondicional de la meva família: la meva Mare pels seus consells i superació personal, el meu Pare per recordar-me que els problemes són relatius i l'Èric per ensenyar-me que la constància tard o d'hora dóna els seus fruits. I les gràcies més especials són per l'Isaac, la Nox, en Bic i en Nus, les persones humanes o no que han patit més directament els mals humors i nervis derivats de la tesi, però en canvi, mai han deixat d'insistir en que els acompanyés a la muntanya, per recordar-me, que la vida s'ha de viure.

LLISTA DE PUBLICACIONS DERIVADES DE LA TESI

Dels resultats d'aquesta tesi n'han derivat 2 publicacions científiques. El factor d'impacte i la posició de la revista dins l'àrea d'estudi estan detallats tenint en compte l'última actualització (2016) del *Journal Citation Report*:

Heras S, Planella L, Caldarazzo I, Vera M, García-Marín JL, Roldán MI (2016) Development and characterization of novel microsatellite markers by Next generation sequencing for the blue and red shrimp *Aristeus antennatus*. PeerJ 4: e2200.

Factor d'impacte de la revista Peer J el 2016: 2.2 Factor d'Impacte de la revista durant els 5 últims anys: 2.354. Aquesta revista es troba a la posició 20/64 (Q2) de l'àrea d'estudi Ciències Multidisciplinars.

Planella L, Heras S, Vera M, García-Marín JL, Roldán MI (2017) An optimized high quality male DNA extraction from spermatophores in open thelycum shrimp species. Integrative Zoology 12(5): 351-436.

Factor d'impacte de la revista Integrative Zoology el 2016: 2.07 Factor d'Impacte de la revista durant els 5 últims anys: 1.705. Aquesta revista es troba a la posició 32/162 (Q1) de l'àrea d'estudi de Zoologia.

LLISTA D'ABREVIATURES

µg	<i>microgram</i>
µl	<i>microlitres/microlitre</i>
µM	<i>micromolar/micromolar</i>
♀	<i>femella/female</i>
♂	<i>mascle/male</i>
°	<i>graus/degrees</i>
°C	<i>graus Celsius/Celsius degree</i>
'	<i>minuts/minutes</i>
“	<i>segons/seconds</i>
\$	<i>Dòlar/ Dollar</i>
€	<i>Euro/Euro</i>
%	<i>percentatge/percent sign</i>
6-FAM	<i>6-carboxyfluorescein</i>
A	<i>adenina</i>
Aa	<i>Aristeus antennatus</i>
AFLP	<i>amplified fragment length polymorphism</i>
AO	<i>Atlantic Ocean</i>
BLASTn	<i>basic local alignment search tool for nucleotides</i>
bp	<i>base pairs</i>
C	<i>citòsina/citochine</i>
CEGEN-UPF	<i>Pompeu Fabra University's Genomics Service</i>
cm	<i>centímetre</i>

COI	citocrom C oxidasa subunitat I
CPUE	captura per unitat d'esforç
CSIC	Consell Superior d'Investigacions Científiques
DAPC	<i>discriminant analysis of principal components</i>
ddH₂O	aigua doblement destil·lada/ <i>double distilled water</i>
DGPAM	Direcció General de Pesca i Afers Marítics
DNA	àcid desoxiribonucleic/ <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNA_{mt}	DNA mitocondrial
DNA_r	DNA ribosomal
dNTP	<i>deoxynucleoside triphosphate</i>
DTT	<i>dithiothreitol</i>
E	est
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic/ <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EEP	<i>primer extension enrichment protocol</i>
EM	est de la Mediterrània/ <i>Eastern Mediterranean</i>
Esp	espermatòfor
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FIASCO	<i>fast isolation by AFLPs of sequences containing repeats</i>
F_{IS}	<i>inbreeding coefficient</i>
F_{IT}	<i>overall inbreeding coefficient of an individual relative to the total population</i>
F_{ST}	<i>overall genetic divergence among populations</i>
G	guanina/ <i>guanine</i>
g	<i>times gravity</i>
GFCM	<i>General Fisheries Commission for the Mediterranean</i>
GSA	<i>geographical sub-areas</i>
GSM	<i>generalized stepwise model</i>
h	<i>hours</i>
HCl	<i>hydrogen chloride</i>
H_E	heterozigositat esperada/ <i>expected heterozygosity</i>

H_i	heterozigositat observada mitjana per individu dins de la subpoblació
Hi-Di	<i>highly deionized</i>
H_o	heterozigositat observada/ <i>observed heterozygosity</i>
H_s	heterozigositat esperada mitjana a la subpoblació assumint aparellament a l'atzar
H_T	heterozigositat esperada al global de la població assumint aparellament a l'atzar
HW	Hardy-Weinberg
HWE	equilibri de Hardy-Weinberg/ <i>Hardy-Weinberg equilibrium</i>
IAM	<i>infinite allele model</i>
IEO	<i>Instituto Español de Oceanografía</i>
ind	individu
IO	<i>Indian Ocean</i>
IPD	idèntic per descendència
IPS	idèntic per estat
IRAP	<i>inter-retrotransposon amplified polymorphism</i>
ISSR	<i>inter-simple-sequence repeat</i>
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
KAM	<i>k-allele model</i>
kb	quilobase
kg	quilogram
km	quilòmetre
Lc	longitud del cefalotòrax
LIG	Laboratori d'Ictiologia Genètica
M	molar/ <i>molar</i>
m	metre
mAlc	<i>mean of assignment index</i>
màx	màxim
mg	mil·ligram/ <i>milligram</i>
MgCl₂	clorur de magnesi/ <i>magnesium chloride</i>
min	minuts
ml	mil·lilitre/ <i>millilitre</i>

mM	mil·limolar/ <i>millimolar</i>
mm	mil·límetre/ <i>millimetre</i>
MOÇ	Moçambic
MOZ	<i>Mozambique</i>
MP	<i>multiplex</i>
MSC	<i>Marine Stewarship Council</i>
mtDNA	<i>mitochondrial DNA</i>
MM	<i>molecular marker</i>
N	nord
n	<i>individuals number</i>
N50	llargada mínima que tenen el 50% dels contigs generats/ <i>number of contigs that accounts for more than 50% of the genome assembly</i>
NA	nombre d'adults/ <i>number of adults</i>
N_A	nombre d'aleles per locus
NaCl₂	clorur sòdic
NaK	<i>sodium-potassium ATPase α-subunit</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ND	no disponible
Ne	mida efectiva de la població/ <i>population effective size</i>
NEsp	nombre d'espermatozòids
ng	nanogram/ <i>nanogram</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NH₄	amoni/ <i>ammonium</i>
NLP	nombre de loci polimòrfics
nM	nanomolar/ <i>nanomolar</i>
NS	no significatiu/ <i>not significant</i>
OA	oceà Atlàntic
OLC	<i>overlap-layout-concensus</i>
OM	oest de la Mediterrània
P	proporció d'aleles amplificats

P	valor de significació/ <i>calculated probability</i>
pb	parells de bases
PCR	reacció en cadena de la polimerasa/ <i>polymerase chain reaction</i>
PEPCK	<i>phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>
pH	<i>potential of hydrogen</i>
PI	<i>probability of identity</i>
PIMA	<i>PCR isolation of microsatellite arrays</i>
PSP	<i>pesca profunda-sperimentale</i>
r	<i>relatedness</i>
RAPD	<i>randomly amplified polymorphic DNA</i>
rDNA	<i>ribosomal DNA</i>
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
RNase	<i>ribonuclease</i>
rpm	revolucions per minut/ <i>revolutions per minute</i>
r_{xy}	<i>expected relatedness</i>
s	segon/ <i>second</i>
SAC	<i>Scientific Advisory Committee on Fisheries of the GFCM</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SE	<i>standard error</i>
Select.	selectiva
SGP	Secretaria General de Pesca
SMM	<i>stepwise mutation model</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SP	<i>singleplex</i>
Sp.	espècie
SRS	<i>sweepstakes reproductive success</i>
SSR	<i>simple sequence repeats</i>
STR	<i>short tandem repeats</i>
T	timina
T°	temperatura

Ta	<i>annealing temperature</i>
TENS	<i>tris, EDTA, NaCl₂ i SDS</i>
TNE	<i>trisHCl, EDTA, SDS, sodium chloride</i>
TPM	<i>two phase model</i>
Trio ML	<i>triadic likelihood estimator</i>
Tris	<i>2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol</i>
U	<i>unitats/units</i>
UdG	<i>Universitat de Girona/University of Girona</i>
v.	<i>version</i>
vAIC	<i>variance of the assignment index</i>
WM	<i>Western Mediterranean</i>
WWF	<i>World Wild Foundation</i>
X	<i>concentrated solution</i>
Z	<i>z-score</i>

ÍNDIX DE FIGURES

- Figura 1.** Factors que afecten la dinàmica d'aparellament i en conseqüència el sistema d'aparellament d'una espècie segons Klug (2011). **Pàg. 14**
- Figura 2.** Cronologia dels descobriments genètics més importants des de 1958. **Pàg. 19**
- Figura 3.** Evolució de la utilització dels marcadors genètics moleculars a partir de la cerca d'articles científics referenciats a la base de dades *ISI Web of Knowledge*. **Pàg. 24**
- Figura 4.** Mecanisme de *slipped-strand mispairing* que origina els diferents al·lels d'un locus microsatèl·lit. **Pàg. 29**
- Figura 5.** Metodologia utilitzada per 454 de Roche per amplificar fragments de DNA units a perles d'agarosa. **Pàg. 31**
- Figura 6.** Descripció de les principals característiques morfològiques d'*Aristeus antennatus* segons Fischer *et al.* (1981). **Pàg. 42**
- Figura 7.** Distribució geogràfica mundial d'*Aristeus antennatus*. **Pàg. 43**
- Figura 8.** Dimorfisme sexual en *Aristeus antennatus*. **Pàg. 44**
- Figura 9.** Espermatòfor d'*Aristeus antennatus*. **Pàg. 47**
- Figura 10.** Principals àrees de pesca d'*Aristeus antennatus* (blau) i les sub-àrees geogràfiques (1-30) de la mar Mediterrània i la mar Negra definides per la GFCM. **Pàg. 50**
- Figura 11.** Evolució del pes i el valor d'*Aristeus antennatus* capturada a Palamós durant els anys 1979-2016 segons la Confraria de Pescadors de Palamós (2017). **Pàg. 52**

- Figura 12.** Marcadors moleculars utilitzats prèviament i localitats analitzades en *Aristeus antennatus*. Pàg. 54
- Figura 13.** Esquema dels cicles inicials de la reacció en cadena de la polimerasa seguint el procediment descrit per Schuelke (2000). Pàg. 69
- Figura 14.** Esquema de la validació al laboratori dels loci microsatèl·lits putatius identificats informàticament. Pàg. 70
- Figura 15.** Esquema dels tres sistemes d'amplificació conjunta o *multiplex* (MP) desenvolupats en *Aristeus antennatus*. Pàg. 71
- Figura 16.** Agarose (1%) gel stained with ethidium bromide (0.5 mg/ml) of DNA samples extracted by phenol:chloroform:isoamyl alcohol protocol (lane 1) or differential lysis protocol (lane 2) from 20 spermatophores. Pàg. 92
- Figura 17.** Genotyping Aa138 and Aa681 microsatellite loci in females (lanes 1 and 3) and spermatophores removed from females' thelyca (lanes 2 and 4). Pàg. 94
- Figura 18.** Discriminant analysis of principal components (DAPC) among females, males and spermatophores. Pàg. 107
- Figura 19.** Evolució de l'ús dels marcadors genètics moleculars en crustacis a partir de la cerca d'articles científics referenciats a la base de dades *ISI Web of Knowledge*. Pàg. 118
- Figura 20.** Detall de la col·locació de l'espermatòfor al telicle de la femella. Pàg. 128

Taula 1.	Sistemes d'aparellament observats en crustacis segons Subramoniam (2016).	Pàg. 17
Taula 2.	Avantatges i inconvenients dels diferents marcadors moleculars segons Schlötterer (2004).	Pàg. 27
Taula 3.	Estudis genètics en <i>Aristeus antennatus</i> .	Pàg. 53
Taula 4.	Mostreig realitzat en <i>Aristeus antennatus</i> .	Pàg. 65
Taula 5.	Characteristics of 35 new microsatellite markers developed for <i>Aristeus antennatus</i> .	Pàg. 82
Taula 6.	Results of genetic diversity of the 35 microsatellite loci in one locality from Western Mediterranean of <i>Aristeus antennatus</i> .	Pàg. 85
Taula 7.	Microsatellite profiles from females and spermatophores removed from females' thelyca.	Pàg. 93
Taula 8.	Characteristics of the singleplex and the three multiplex PCR reactions to amplify 13 microsatellite loci in <i>Aristeus antennatus</i> .	Pàg. 103
Taula 9.	Summary statistics of genetic diversity in females, males and spermatophores of <i>Aristeus antennatus</i> .	Pàg. 105
Taula 10.	Bootstrap test to compare the relatedness \pm standard error (SE) between groups using TrioML estimator.	Pàg. 109
Taula 11.	Identificació i desenvolupament de loci microsatèl·lits en crustacis.	Pàg. 120
Taula S1.	Sequences of the 35 polymorphic microsatellite loci.	Pàg. 179
Taula S2.	Mean relatedness \pm variance per 7 relatedness estimators for simulated population consisting of 1,000 pairs of unrelated, second cousin and first cousin pairs with allele frequencies taken from field data.	Pàg. 193

ÍNDIX DE REQUADRES

Requadre 1.	Equilibri de Hardy-Weinberg (HWE).	Pàg. 34
Requadre 2.	Estadístics F (Wright 1951) segons Holsinger i Weir (2009).	Pàg. 35
Requadre 3a.	Coeficient de parentiu segons Weir <i>et al.</i> (2006) i de Speed i Balding (2015).	Pàg. 37
Requadre 3b.	Coeficient de parentiu segons Weir <i>et al.</i> (2006) i de Speed i Balding (2015).	Pàg. 38
Requadre 4.	Classificació biològica d' <i>Aristeus antennatus</i> (en gris) segons de Grave i Fransen (2011).	Pàg. 41

ÍNDEX

RESUM _____	Pàg. 2
RESUMEN _____	Pàg. 4
SUMMARY _____	Pàg. 6
INTRODUCCIÓ GENERAL _____	Pàg. 11
Multiplicitat de sistemes d'aparellament en crustacis	Pàg. 12
Cronologia dels descobriments genètics i els marcadors moleculars	Pàg. 18
Eines estadístiques per a l'anàlisi genètica de les poblacions	Pàg. 33
La gamba rosada <i>Aristeus antennatus</i>	Pàg. 40
OBJECTIUS _____	Pàg. 59
MATERIAL I MÈTODES _____	Pàg. 63
Material biològic	Pàg. 64
Extracció de DNA	Pàg. 64
Loci microsatèl·lits	Pàg. 66
Anàlisi de dades	Pàg. 72

RESULTATS _____	Pàg. 75
Capítol 1: Development and characterization of novel microsatellite markers by Next generation sequencing for the blue and red shrimp <i>Aristeus antennatus</i>	Pàg. 76
Capítol 2: An optimized high quality male DNA extraction from spermatophores in open thelyca shrimp species	Pàg. 87
Capítol 3: Inferring the mating system and mate choice of the blue and red shrimp, <i>Aristeus antennatus</i>	Pàg. 98
DISCUSSIÓ _____	Pàg. 115
CONCLUSIONS GENERALS _____	Pàg. 141
BIBLIOGRAFIA _____	Pàg. 147
MATERIAL SUPLEMENTARI _____	Pàg. 179
Material Suplementari Capítol 1	Pàg. 179
Material Suplementari Capítol 3	Pàg. 193

RESUMS

RESUM

La gamba rosada, *Aristeus antennatus*, és un crustaci decàpode que habita a la mar Mediterrània, l'oceà Atlàntic i les aigües africanes de l'oceà Índic sobre fons tous del talús continental associats a canyons. La seva importància comercial a la Mediterrània occidental ha incidit en que fos catalogada com a espècie prioritària per a la gestió pesquera. Els marcadors microsatèl·lits, formats per repeticions curtes en tàndem (SSR), poden contribuir al coneixement d'alguns aspectes de la biologia d'*A. antennatus* desconeguts fins al moment, amb l'objectiu de desenvolupar estratègies de maneig efectives per a la conservació del recurs pesquer a llarg termini.

En aquesta tesi s'han desenvolupat 97 loci microsatèl·lits putatius en *A. antennatus* a partir de la *Next generation sequencing* (NGS). Inicialment, el seu polimorfisme es testà en un panell preliminar de 15 individus representatius dels quatre estocs genètics mundials de l'espècie i s'obtingueren un total de 35 loci microsatèl·lits polimòrfics. Aquests loci variables s'utilitzaren per caracteritzar 20 individus d'una localitat de la mar Mediterrània occidental. El nombre d'alel·les per locus i l'heterozigositat esperada oscil·laren entre 2 i 14 i entre 0,050 i 0,968, respectivament. Cap loci presentà desequilibri de lligament, símptoma inequívoc de la seva independència. El poder de resolució dels loci polimòrfics per a anàlisis de parentiu fou superior al 97%, conclouent doncs que aquest panell de marcadors microsatèl·lits podia contribuir a l'estudi de la dinàmica reproductiva d'*A. antennatus*.

Les característiques biològiques d'*A. antennatus* impedeixen conèixer el seu sistema d'aparellament de forma directa mitjançant l'assignació parental. No obstant, és possible inferir-lo a partir dels espermatòfors units al telicle de la femella durant l'aparellament. El primer pas de qualsevol estudi genètic és l'obtenció de DNA de suficient puresa per garantir la fiabilitat dels

resultats posteriors. Tanmateix, quan el mascle diposita l'espermatòfor al telicle de la femella, cèl·lules femenines s'adhereixen a les capes externes de l'espermatòfor i això es tradueix en una barreja de DNA. Per resoldre aquest inconvenient, s'ha desenvolupat un protocol d'extracció de DNA diferencial, fiable i no invasiu, per aïllar el DNA del mascle a partir dels espermatòfors units al telicle de la femella. Aquest mètode proporciona DNA d'alta qualitat i quantitat per ser amplificat per PCR i permetre un correcte genotipatge del mascle. L'aplicació d'aquesta tècnica pot augmentar el rendiment de la indústria de cultiu, evitant la manipulació dels mascles durant el procés de selecció. A més, també és aplicable a poblacions naturals de gambes explotades per estimar l'estructura poblacional de mascles, l'estratègia reproductiva i el flux gènic a fi d'afavorir una gestió sostenible del recurs.

La dinàmica reproductiva d'una espècie engloba paràmetres a tenir en compte a l'hora d'avaluar un estoc i aplicar determinades mesures de gestió, ja que incideix directament sobre la proporció de sexes, l'endogàmia, la dinàmica poblacional i la resiliència de les poblacions en front a pertorbacions ambientals i antropogèniques. Malgrat això, el coneixement sobre de la dinàmica reproductiva d'*A. antennatus* és escàs. En la present tesi s'ha investigat el sistema d'aparellament de l'espècie i la possible existència de selecció de parella. Els resultats han permès detectar aparellaments múltiples tant en femelles com en mascles, indicant poliginàndria en *A. antennatus* en condicions naturals. Per altra part, hi ha indicis de l'existència de selecció de parella en funció del menor grau de parentiu. Aquesta capacitat aparent d'*A. antennatus* per discriminar entre individus en base a la dissimilaritat genètica obre nous camps de recerca per explorar els possibles factors i mecanismes que influeixen en l'elecció de parella en l'espècie.

RESUMEN

La gamba rosada, *Aristeus antennatus* (Crustacea, Decapoda), es una especie marina que habita en fondos fangosos de la plataforma continental a lo largo de los cañones submarinos del mar Mediterráneo, el océano Atlántico y las aguas africanas del océano Índico. En el mar Mediterráneo es un recurso intensamente explotado por lo que ha sido incluido en la lista de especies prioritarias para la gestión de sus pesquerías. Los microsatélites o *short tandem repeats*, son marcadores genéticos hipervariables que pueden ser útiles para abordar diferentes aspectos biológicos desconocidos de *A. antennatus*, con el fin de desarrollar estrategias de manejo efectivas para la conservación del recurso pesquero a largo plazo.

En esta tesis, utilizando *Next generation sequencing* (NGS) se han desarrollado 97 nuevos microsatélites putativos que se comprobaron en un panel de 15 individuos representativos de los cuatro *stocks* genéticos a escala mundial de la especie. En una muestra de 20 individuos del mar Mediterráneo occidental, se confirmaron 35 microsatélites polimórficos útiles en la especie. El número de alelos por locus y la heterocigosidad esperada varió entre 2 y 14 y entre 0,050 y 0,968, respectivamente. No se detectó desequilibrio de ligamiento lo que indica independencia de los loci. Además, presentaron un 97% de poder de resolución para estudios de parentesco, hecho que permite profundizar en el conocimiento de la dinámica reproductora de la especie.

Las características biológicas de *A. antennatus* impiden el estudio de su sistema de apareamiento mediante análisis de paternidad. Aun así, es posible inferirlo a través de los espermátóforos adheridos al telicum de la hembra durante la cópula. La premisa fundamental para asegurar el éxito de cualquier análisis genético es que el DNA sea puro. Dado que los espermátóforos están adheridos externamente al telicum de la hembra, células femeninas se mezclan con las masculinas.

Para resolver este inconveniente, se desarrolló un protocolo de extracción de DNA diferencial, fiable y no invasivo, para aislar el DNA masculino de los espermatozoides unidos al telum femenino. Este protocolo proporciona DNA de alta calidad y cantidad para la posterior amplificación por PCR y el correcto genotipado del macho. Este nuevo protocolo puede ser utilizado en especies similares de cultivo intensivo, para la selección de machos evitando el estrés por manipulación. Asimismo, en las especies explotadas, puede ayudar a estimar la estructura poblacional de los machos, conocer la estrategia reproductiva y el flujo génico entre las poblaciones con el objetivo de potenciar una gestión sostenible del recurso pesquero.

Conocer la dinámica reproductiva de una especie es crucial para evaluar los *stocks* y aplicar medidas correctas de gestión de la pesca, debido a su efecto directo sobre la proporción de sexos, la cantidad de endogamia, la dinámica poblacional y la resiliencia de las poblaciones a las perturbaciones ambientales. Escaso es el conocimiento sobre el sistema de apareamiento y las posibles preferencias a la hora de elegir pareja en *A. antennatus*. En esta tesis, el sistema de apareamiento y la selección de pareja se han abordado mediante el análisis de genotipos multilocus. Se han detectado apareamientos múltiples tanto en las hembras como en los machos, lo que indica que el sistema de apareamiento de la especie es poliginándrico. Además, se observaron indicios de selección de pareja en función del menor grado de parentesco. Esta aparente habilidad de la gamba rosada para discriminar entre individuos abre nuevas líneas de investigación para explorar los factores y mecanismos que facilitan dicho comportamiento en la especie.

SUMMARY

The blue and red shrimp, *Aristeus antennatus* (Crustacea, Decapoda), is a marine species that inhabits muddy bottoms of the continental slope along the submarine canyons of the Mediterranean Sea, the Atlantic Ocean and African waters of the Indian Ocean. It is a commercially important crustacean in the Western Mediterranean Sea and has been listed as a priority species for fishery management. Hypervariable microsatellite markers that are short tandem repeats (SSR) could be a useful tool to address different unknown biological aspects of *A. antennatus* that can contribute to develop effective conservation, management and long-term sustainability strategies for this marine resource.

In this thesis, 97 potential and novel microsatellite loci were developed from Next generation sequencing (NGS) data, and then were tested on a preliminary panel of 15 individuals representing the four worldwide genetic stocks of the species. The 35 microsatellites confirmed as polymorphic were used to characterize 20 individuals from the Western Mediterranean Sea. The number of alleles per locus and expected heterozygosity ranged from 2 to 14 and from 0.050 to 0.968, respectively. No linkage disequilibrium was detected, indicating the independence of the loci. Moreover, they had a resolving power higher than 97% for parentage studies. Therefore, these loci can provide insights into the reproductive dynamics of the species.

Paternity analysis have provided insights into the mating system of numerous species in the wild. However, the particular biological characteristics of *A. antennatus* make impossible to get the offspring. The only way to infer the mating system of the species is analysing the spermatophores attached in female thelycum during copulation. However, before these microsatellites could be feasible applied in any molecular analysis of *A. antennatus*, it must first ensure that the DNA was completely pure. Due to the fact that spermatophores are attached in female thelycum, the masculine cells are

mixed with the feminine ones. For this reason, a reliable and non-invasive differential DNA extraction protocol to isolate male DNA from spermatophores attached in female thelycum has been developed. This protocol provides high quality and quantity DNA for subsequent PCR amplification and male genotyping. This new approach will increase the profitability of culture industry improving male selection avoiding the stress of male by handling. Likewise, it can be applied to wild shrimp populations to estimate male population structure, reproductive strategy and gene flow in exploited species with the aim to improve sustainable management plans.

Reproductive dynamics is crucial for stock assessment and fisheries management due to its direct effect on the sex ratio, the amount of inbreeding, the population dynamics and the resilience of a population after an environmental perturbation. However, information regarding the mating system and mate choice preferences is still largely unknown in *A. antennatus*. In this study, the mating system as well as putative mate choice were evaluated. Evidences of multiple mating for both females and males indicate a polygynandrous mating system in *A. antennatus* under natural conditions. In addition, putative mate choice preferences toward unrelated partners were detected. This apparent ability of *A. antennatus* to select mating partners based on genetic dissimilarity open up new research avenues to explore the possible factors and mechanisms that influence mate choice in this species.

INTRODUCCIÓ GENERAL

INTRODUCCIÓ GENERAL

El propòsit d'aquesta introducció és oferir al lector els coneixements essencials sobre els sistemes d'aparellament en crustacis, la genètica de poblacions i la gamba rosada, *Aristeus antennatus*, per a facilitar l'enteniment d'aquest treball. *A. antennatus* és actualment una de les espècies marines més preuades a nivell culinari a la Mediterrània occidental (Sardà 2000). De fet, constitueix el principal motor econòmic de moltes confraries catalanes tot i no ser l'espècie més pescada en pes segons l'Estadística Oficial de Pesca de la Generalitat de Catalunya (Gorelli *et al.* 2014). La correcta gestió d'aquesta pesqueria és indispensable per a garantir l'estabilitat tant de l'espècie com de l'entramat socioeconòmic que deriva de la mateixa (Leonart i Maynou 2003; Gorelli *et al.* 2014). Per això, cal ampliar el coneixement sobre la biologia, l'ecologia i la dinàmica poblacional de l'espècie per implementar mesures de gestió precises per assegurar la continuïtat del recurs (Kindsvater *et al.* 2016). L'aplicació d'eines genètiques moleculars en espècies marines ha permès donar resposta a preguntes obertes, per exemple, del camp de l'ecologia i el comportament, sense necessitat d'estudis basats en l'observació (Burton 2009). Les dades genètiques han contribuït a la identificació d'estocs, a revelar patrons de dispersió segons sexes o a determinar el sistema d'aparellament; factors que són decisius en la dinàmica poblacional d'una espècie (Waples 1989).

MULTIPLICITAT DE SISTEMES D'APARELLAMENT EN CRUSTACIS

Els crustacis es caracteritzen per presentar una elevada diversitat morfològica, fisiològica, ecològica i de formes de vida (Martin i Davis 2001; Schram 2013). La majoria tenen vida lliure però alguns són sèssils o fins i tot paràsits (Subramoniam 2016). Dins d'aquesta varietat, les especialitzacions més sorprenents es donen en el context de la reproducció i, en particular, del comportament reproductor (Vogt 2016). La multiplicitat de mecanismes sexuals descrits en crustacis té una íntima relació amb la determinació del sexe, que en algunes espècies ve condicionada exclusivament per les interaccions gèniques, mentre que en d'altres, l'ambient hi té un paper determinant (Mittwoch 1996). La majoria dels crustacis són gonocòrics (sexes separats), tanmateix, l'autofecundació (autogàmia), la partenogènesi (desenvolupament d'un gàmeta fins a formar un individu adult sense necessitat de fecundació) o l'androdioècia (població formada per mascles i hermafrodites) s'han descrit en els grups més primitius (ordres Notostraca i Concostraca) (Ombretta *et al.* 2005). Dins la classe Malacostraca, l'hermafroditisme és molt freqüent, ja sigui simultani (producció de gàmetes d'ambdós sexes al mateix temps) o seqüencial (producció de gàmetes d'ambdós sexes alternativament) (Clark 1978). L'hermafroditisme simultani és característic d'algunes espècies de percebes, cefalocàrids (Charniaux-Cotton i Payen 1985) o concostracis (Sassaman i Weeks 1993). En canvi, el seqüencial es dona en algunes espècies de decàpodes dels infraordres Caridea, Thalassinidae i Amoura i del subordre Isopoda (Bauer 1986a; Charnov 1993). Derivat de l'hermafroditisme seqüencial, tot i que també s'ha observat en espècies gonocòriques (*Cherax quadricarinatus*), s'han identificat individus amb intersexualitat, els quals presenten característiques intermèdies entre els dos sexes (Thorne i Fielder 1991). Altrament, tot i que en una proporció molt baixa, s'han detectat casos de ginandromorfisme (presència de trets femenins i masculins simultàniament en un individu de forma bilateral) en diverses espècies com *Nephrops norvegicus* amb una proporció de 1:10000 individus a la població (Farmer 1972). De la mateixa manera, la fecundació en els crustacis pot ser tant externa com interna però en ambdós casos implica l'activació inicial dels gàmetes, el reconeixement dels gàmetes entre ells, la interacció esperma-oòcit i la fusió nuclear (Subramoniam 2016). En la majoria de grups, l'esperma es transfereix per mitjà d'espermatòfors que es dipositen sobre l'exosquelet de la femella o dins dels receptacles seminals (Subramoniam 1993).

Tanmateix, en els individus de la infraclasse Cirripedia l'esperma es transmet utilitzant un medi fluid de plasma seminal (Subramoniam 1993). L'ús d'espermatòfors és important perquè en la majoria d'espècies els espermatozoides són aflagel·lats i immòbils i, a més, permeten reduir la pèrdua de gàmetes en el medi (Felgenhauer i Abele 1991). La morfologia dels espermatòfors varia substancialment segons el mecanisme de transferència i el tipus de fecundació (Subramoniam 1993). En general, les espècies amb fecundació interna fabriquen espermatòfors simples i rudimentaris que es contraposen a les estructures complexes de les espècies amb fecundació externa (Subramoniam 1993).

El tipus de sexualitat (p.ex. gonocòrics, hermafrodites) sumat a factors fisiològics, morfològics, comportamentals i ambientals determinen la *fitness* d'un individu, la qual no recau només en la capacitat d'aquest per sobreviure, sinó també en la destresa que té per aparellar-se (nombre de còpules) i reproduir-se (nombre de descendents) (Bateman 1948; Darwin 1871). Darwin (1871) postulà la teoria de la selecció sexual per explicar l'accés limitat a l'aparellament i com això genera un biaix en el nombre de còpules i en l'èxit reproductor dels individus. La selecció sexual és un component fonamental per explicar la diversitat de sistemes d'aparellament que avui es troben en crustacis (**Figura 1**; Sainte-Marie 2007; Vogt 2013). Tanmateix, hi ha altres factors claus com l'anisogàmia, el nombre de femelles receptives, la muda o les diferents històries de vida entre sexes que també participen activament en aquesta decisió (**Figura 1**; Klug 2011; Subramoniam 2013). L'anisogàmia es dona quan els mascles produeixen gàmetes petits, molt nombrosos i de baix cost energètic, mentre que les femelles els produeixen grans, menys nombrosos i d'elevat cost energètic (Clutton-Brock i Parker 1992). Aquesta desigualtat propicia que els mascles maximitzin la seva *fitness* aparellant-se amb el màxim nombre de femelles possibles, mentre que les femelles ho fan seleccionant mascles amb determinades característiques físiques o beneficis genètics (Clutton-Brock i Parker 1992). La *ratio* de sexes operativa està fortament subjecta al temps de receptivitat de les femelles. En la llagosta *Homarus americanus*, les femelles s'aparellen majoritàriament just després de la muda, però el seu grau de receptivitat varia segons la maduresa gonadal, que depèn de la presència d'espermatòfor (Subramoniam 2016). En canvi, les femelles de l'infraordre Brachyura només estan receptives durant el període d'intermuda (Famílies Grapsidae i Ocypodidae) o de postmuda (Famílies Cancridae i Portunidae). De

fet, la muda fixa el moment exacte de la còpula i de la fecundació en moltes espècies. Això explica que els mascles hagin desenvolupat comportaments reproductors de vigilància precòpula i postcòpula, per assegurar la seva presència en el moment de receptivitat de la femella i per certificar l'origen exclusiu de la descendència (Grafen i Ridley 1983). En les gambes de la superfamília Penaeoidea, la relació entre la muda i l'aparellament depèn del tipus de telicle. El telicle és la modificació externa de les esternites posteriors del cefalotòrax de la femella i/o les coxes, que s'utilitzen per a acceptar i emmagatzemar l'espermatòfor (Bauer 1986b). En espècies amb telicle obert, les femelles copulen durant la intermuda quan l'exosquelet està dur i calcificat, mentre que en les espècies amb telicle tancat, les femelles muden just abans de l'aparellament (Asakura 2009).

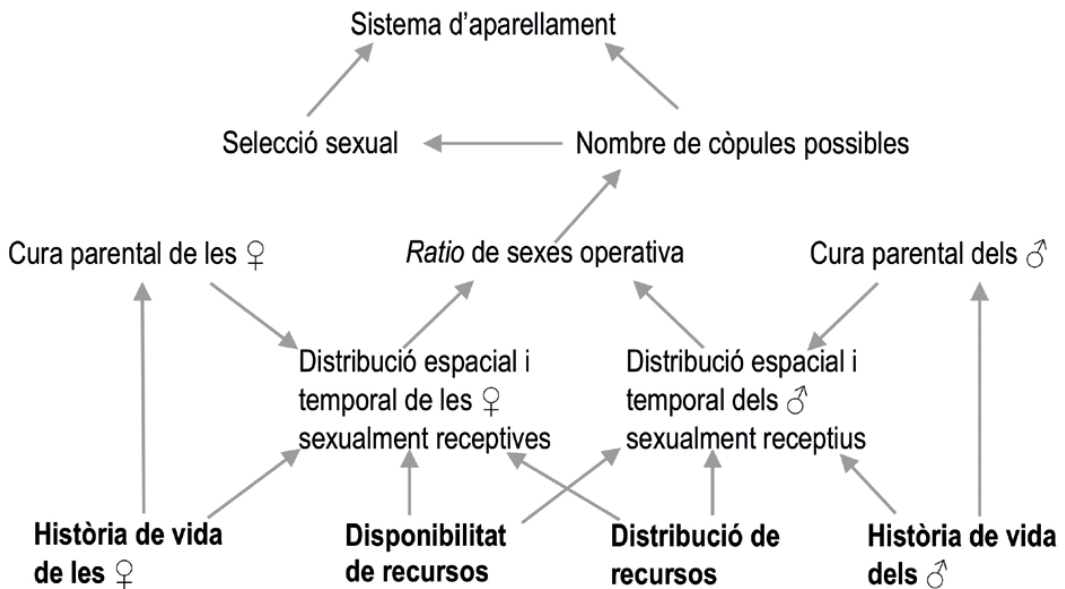


Figura 1. Factors que afecten la dinàmica d'aparellament i en conseqüència el sistema d'aparellament d'una espècie segons Klug (2011).

Els sistemes d'aparellament descriuen els mecanismes utilitzats per a cercar i assegurar parella, els vincles entre reproductors, el nombre de còpules i la naturalesa de la cura parental (Subramoniam 2013). Tradicionalment, aquests es definien en base a l'observació, però l'arribada de tècniques genètiques moleculars per inferir la relació genètica entre individus va revolucionar la forma d'entendre els sistemes d'aparellament, demostrant que els comportaments socials observats no sempre es corresponen amb l'aparellament genètic

(Jossart *et al.* 2014). Els sistemes bàsics d'aparellament en crustacis són la monogàmia i la poligàmia. Tanmateix, a la **Taula 1** es descriuen les subdivisions d'aquestes dues estratègies bàsiques d'aparellament en d'altres de més específiques. La monogàmia té lloc quan un individu es reproduïx sexualment només amb una parella del sexe oposat. Wickler i Seibt (1981) descriueren dos tipus de monogàmia en crustacis: la sexual i la social. La monogàmia sexual, amb funció purament reproductora, succeeix en algunes espècies d'amfípodes i isòpodes aquàtics, on els mascles un cop s'han aparellat, vigilen la femella fins que es produeix la fecundació i posteriorment l'abandonen. Contràriament, la monogàmia social, característica d'algunes espècies de crancs que viuen en simbiosi amb equinoderms o amb esponges i gambes de l'infraordre Caridea associades a coralls, implica l'existència d'un vincle cooperatiu entre la parella per defensar el refugi i els recursos alimentaris (Subramoniam 2016). La cúspide de l'organització social animal s'assoleix amb la verdadera socialització (veure **Taula 1**) on els individus adults de diverses generacions cohabituen, es divideixen el treball, tenen cura parental conjunta de la descendència i la tasca de reproducció queda relegada a una o múltiples femelles (*Synalpheus regalis* i *Synalpheus longicarpus*, respectivament) (Duffy *et al.* 2002). Aquesta forma de vida i de reproduir-se també és típica dels crancs bromèlia, *Metopaulias depressus* (Diesel i Schubart 2007).

La poligàmia té lloc quan un individu es reproduïx sexualment amb més d'una parella del sexe oposat (Subramoniam 2016). Existeixen tres tipus de poligàmia en crustacis: poligínia, poliàndria i poliginàndria (Subramoniam 2016). Generalment, l'aparellament múltiple és característic d'espècies sense receptacle seminal, doncs sinó, la femella utilitza la reserva d'esperma per a múltiples fecundacions (Subramoniam 2016). La poligínia consisteix en la relació d'un mascle amb dues o més femelles. En crustacis s'han descrit tres variants d'aquesta estratègia reproductiva: a) la poligínia de carrera competitiva, freqüent en l'ordre Anostraca i el cranc violinista, *Uca paradussumieri* (Murai *et al.* 2002), la qual té lloc quan els mascles eviten enfrontaments entre conespecífics i focalitzen la seva tasca en buscar i inseminar femelles receptives (Alcock 1980). Aquestes, a canvi, reben esperma d'un mascle diferent a cada posta incrementant així la variabilitat genètica de la descendència (Belk 1991); b) la polígina per defensa de l'hoste és característica de crustacis simbiotes amb invertebrats marins, on el mascle defensa un hoste en el qual habiten les femelles,

morfològicament molt simples i amb alt risc de depredació. Aquest s'ocupa de foragitar agressivament els intrusos i, com a recompensa, té accés a totes les femelles de l'hoste que custodia (Thomas i Barnard 1983; Shuster i Wade 1991), i c) la poliginia centrada en les femelles és típica de crustacis simbiòtics, on l'hoste acull a una densitat de femelles elevada. Els mascles, en aquest cas, van deambulant per dins l'hoste i entre hostes en busca de femelles receptives. Quan en troben, les guarden i les protegeixen d'altres mascles fins al moment de l'aparellament. Després fugen a la recerca de noves oportunitats en el mateix o diferent hoste. Les femelles, per la seva part, es resisteixen a la còpula amb determinats mascles i seleccionen aquells que incrementen el seu èxit reproductor (Subramoniam 2016).

La poliàndria es produeix quan una femella té relació amb dos o més mascles. En moltes espècies, especialment en aquelles que els mascles tenen diferents morfotipus, les femelles s'aparellen amb múltiples exemplars per evitar ser assetjades sexualment amb l'ús de la força (poliàndria per conveniència), però acaben seleccionant l'esperma del millor mascle perquè fertilitzi el 100% dels seus oòcits (selecció críptica de les femelles) (Bauer 2004). Les femelles de la gamba carídea *Rhynchocinetes typus*, tenen una clara preferència pels mascles robustos (Thiel i Hinojosa 2003). Malgrat això, accepten esperma de mascles subordinats quan encara no estan apunt per pondre, evitant així ser lesionades. Els mascles robustos, contràriament, esperen pacientment que les femelles comencin a alliberar els ous per transferir el seu espermatòfor i assegurar així el 100% de la descendència (Thiel i Hinojosa 2003). Estratègies similars s'han observat en la gamba d'aigua dolça *Macrobrachium rosenbergii* (Ra'Anan i Sagi 1985), el cranc de riu *Orconectes rusticus* (Snedden 1990), el cranc blau *Cancer sapidus* (Jivoff i Hines 1998) o l'isòpode *Lirceus fontinalis* (Sparkes *et al.* 2000).

La poliginàndria ocorre quan tant mascles com femelles tenen relació amb dos o més individus del sexe contrari. Quan aquest comportament es dona amb alta freqüència a causa d'una elevada densitat de població i reiteració de postes, la poliginàndria esdevé promiscuïtat. Aquest tipus d'aparellament en crustacis ha evolucionat com una ramificació del *pure searching mating system* (Wickler i Seibt 1981) el qual és freqüent en gambes de la superfamília Penaeoidea que viuen en agregats (*Sicyonia dorsalis*) i també en gambes de l'infraordre Carídea que habiten dins d'hostes amb múltiples simbiòtics (*Rhynchocinetes*

urita) (Subramoniam 2016). Els mascles són de mida més petita que les femelles i en general no acostumen a presentar caràcters sexuals dimòrfics. Això els confereix un gran avantatge per a cercar femelles receptives per contacte visual o quimiorceptors. No hi ha vigilància precopulatòria de les femelles i l'única competència entre mascles és l'agilitat, rapidesa i eficiència per localitzar-les. Un cop s'hi han aparellat, continuen buscant noves

Taula 1. Sistemes d'aparellament observats en crustacis segons Subramoniam (2016).

Sistema d'aparellament	Definició
1. Monogàmia <i>Monogamy</i>	Cada mascle i cada femella tenen només una parella.
1a. Monogàmia social <i>Social monogamy</i>	Aparellament exclusiu entre una femella i un mascle que pot durar una època de reproducció o tota la vida.
1b. Parelles persistents <i>Persistent pairs</i>	El mascle surt a buscar recursos i proporciona cura parental de manera aïllada. Les femelles estan receptives totes alhora.
1c. Parelles seqüencials <i>Sequential pairs</i>	Després de l'aparellament el mascle abandona el refugi mentre la femella es queda a alliberar els ous. El mascle segueix en busca de noves femelles de forma seqüencial.
1d. Verdadera monogàmia <i>Eumonogamy</i>	El mascle i la femella formen parelles cooperatives per viure i guardar el refugi.
2. Poligàmia <i>Polygamy</i>	Sistema d'aparellament on com a mínim un individu de la parella té aparellament múltiple.
2a. Poliginia <i>Polygyny</i>	Els mascles tenen múltiples parelles heterosexuales mentre que cada femella només s'aparella amb un mascle.
2b. Poliàndria <i>Polyandry</i>	Les femelles tenen múltiples parelles heterosexuales mentre que cada mascle només s'aparella amb una femella.
2c. Poliginàndria <i>Polygynandry</i>	Tant mascles com femelles tenen múltiples parelles heterosexuales. La promiscuïtat és l'extrem de la poliginàndria on cada mascle i cada femella té moltes parelles heterosexuales.
3. Verdadera socialització <i>Eusociality</i>	Una única femella reproductora que forma part d'una colònia d'individus organitzats. Elevat biaix reproductor.
4a. Aparellament en massa amb semelparitat <i>Semelparous mass mating</i>	Tant mascles com femelles tenen un únic cicle reproductor al llarg de la seva vida.
4b. Aparellament en massa amb iteroparitat <i>Iteroparous mass mating</i>	Tant mascles com femelles tenen múltiples cicles reproductors al llarg de la seva vida.
5. Aparellament conjunt de mascles neotènics <i>Aggregational mating by neotenous males</i>	Simultàniament, diversos mascles neotènics escalen la regió ventral de la femella fins a dipositar els espermatòfors.

oportunitats. Simultàniament, les femelles també poden aparellar-se amb múltiples mascles ja sigui per evitar coaccions o bé per un benefici genètic (Subramoniam 2016).

Aquesta varietat de sistemes d'aparellament han permès als crustacis adaptar-se a tots els hàbitats imaginables del medi aquàtic i terrestre. La majoria dels grans decàpodes, alliberen larves planctòniques al medi (Duffy i Thiel 2007). Antagònicament, els petits crustacis o els crustacis terrestres alliberen la descendència al medi quan aquesta està totalment desenvolupada (Duffy i Thiel 2007). De la forma de dispersar-se dels individus al llarg del seu cycle vital en depèn l'estructura poblacional de l'espècie. En canvi, el comportament reproductor fixa les oportunitats per aparellar-se (Duffy i Thiel 2007). Altres factors extrínsecs com la disponibilitat dels recursos o la depredació també són característiques fonamentals per entendre com s'han diversificat els sistemes de reproducció i aparellament en crustacis (**Figura 1**; Klug 2011).

CRONOLOGIA DELS DESCOBRIMENTS GENÈTICS I ELS MARCADORS MOLECULARS

Els orígens de la genètica es remunten als anys 1850s, quan Gregor Mendel, un monjo austríac, encreuava plantes de pesolera (*Pisum sativum*) entre elles amb diferents característiques (altura, color i textura de les llavors i fruits) amb l'objectiu d'entendre com els caràcters es transmetien d'una generació a la següent (Gayon 2016). Després de vuit anys d'experiments i anàlisis estadístiques, Mendel proposà els tres principis bàsics de l'herència: el principi d'uniformitat, el principi de la segregació independent i el principi de la transmissió independent, els quals es recullen en l'obra *Versuche über Pflanzen-Hybriden* que fou publicada l'any 1866 (**Figura 2**; Mendel 1866). Paral·lelament, dos naturalistes britànics, Charles Darwin i Alfred Russel Wallace, revolucionaren la societat de l'època al publicar un article on s'exposava que les espècies canviaven al llarg del temps i que la selecció natural era el mecanisme que actuava sobre elles per a originar-ne de noves. Un any més tard d'exposar públicament les seves idees (1859), Darwin publicà un text més extens conegut com *On the Origin of Species* (**Figura 2**; Seward 1909). L'any 1900, tres botànics: Hugo de Vries als Països Baixos, Carl Erich Correns a Alemanya i Erich von Tschermak a Àustria, van redescobrir de forma independent les lleis de Mendel (Bateson 1902).

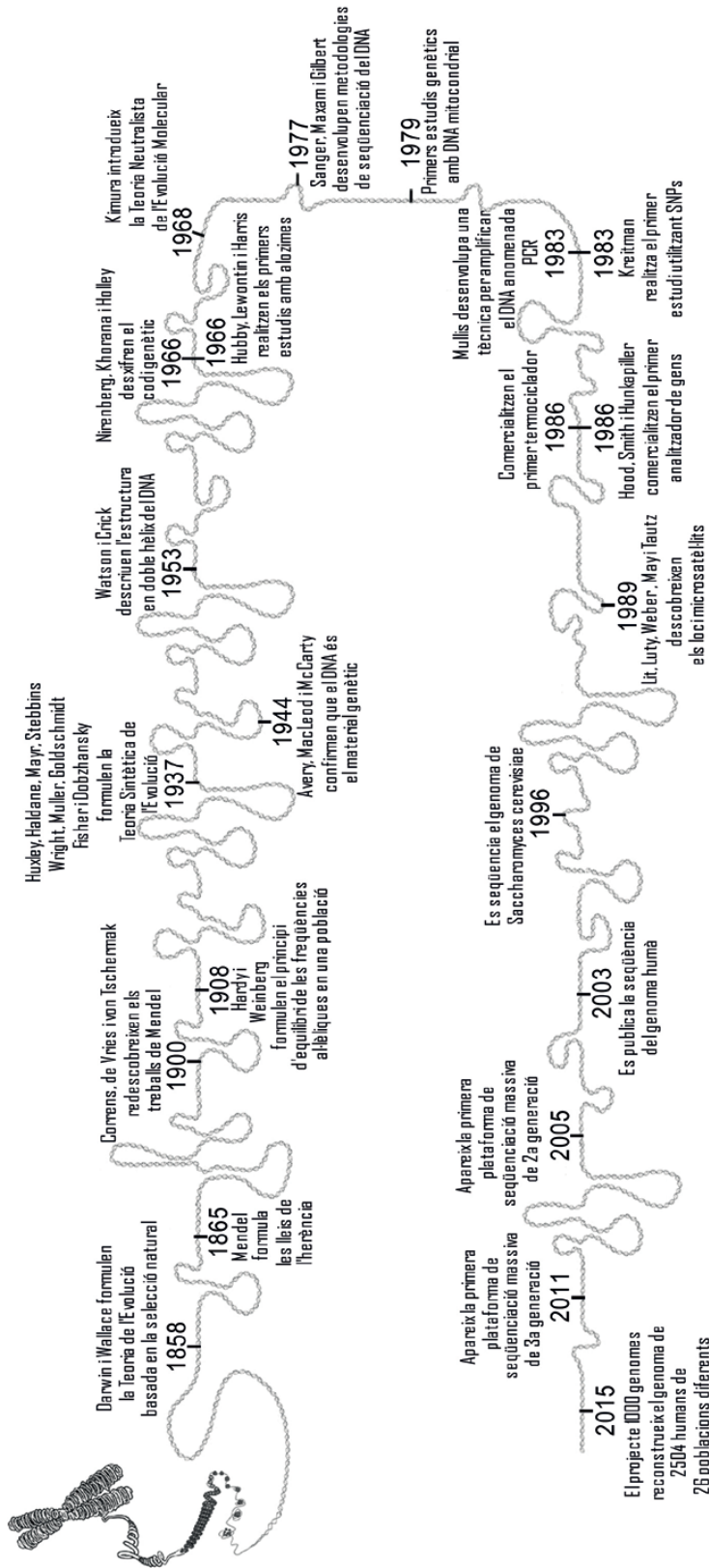


Figura 2. Cronologia dels descobriments genètics més importants des de 1858.

William Bateson, un coneixedor de les obres de Mendel, l'any 1902 va extrapolar les lleis de l'herència al regne animals alhora que donava nom a la genètica i introduïa els mots al·lel, homozigot, heterozigot i epístasi (Bateson 1902). Al mateix temps, Wilhelm Johannsen definia els conceptes de fenotip, genotip, selecció i gen (Johannsen 1903). Paral·lelament, Godfrey Harold Hardy a Anglaterra i Wilhelm Weinberg a Alemanya demostraven que en una població amb aparellament a l'atzar i en absència de factors pertorbadors (migració, mutació, selecció natural o deriva genètica), les freqüències al·leliques d'una població es mantenen constants d'una generació a la següent (Stern 1943). Això és el que avui coneixem com a equilibri Hardy-Weinberg (HWE), utilitzat en la genètica de poblacions per a determinar si una població està en equilibri per a un determinat gen (**Figura 2**; Stern 1943). Des dels anys 1920s fins a mitjans dels 50s, una sèrie d'experiments en bacteris i bacteriòfags van demostrar que el DNA contingut en el nucli cel·lular era transferit de generació en generació i que aquesta molècula tenia la capacitat de transformar les propietats de la cèl·lula (Steinman i Moberg 1994). Griffith amb els seus experiments de transformació va observar que hi havia algun tipus de substància dins les cèl·lules bacterianes letals que era capaç de convertir una soca bacteriana no letal en letal (Griffith 1928). Però foren Oswald Avery, Colin Munro MacLeod i Maclyn McCarty que treballant en la mateixa línia de recerca, l'any 1944 van identificar el DNA com la molècula responsable de la transformació de les soques no letals en letals (**Figura 2**; Avery *et al.* 1944). Això passava just abans que James Watson i Francis Crick identifiquessin el 1953 l'estructura tridimensional del DNA (**Figura 2**; Watson i Crick 1953). Malgrat això, varen passar diversos anys i estudis, incloent l'experiment dels genetistes americans Matthew Meselson i Franklin Stahl, abans que els primers autors descobriessin la relació exacta entre l'estructura del DNA i la seva replicació (Meselson i Stahl 1958; Pray 2008). Al mateix temps, altres investigadors com George Gamow suggerien que el DNA contenia un codi que era el responsable de la producció de proteïnes. Experiments incloent els processos de transcripció i traducció van conduir a Crick al desenvolupament del Dogma Central de la Biologia Molecular (Crick 1970) i a mitjans dels anys 60s el codi genètic va ser desxifrat (**Figura 2**; Khorana *et al.* 1966; Nirenberg *et al.* 1966).

Paral·lelament durant les dècades 1930s i 1940s Sewall Wright, Hermann Joseph Muller, Theodore Dobzhansky, Richard Benedict Goldschmidt, Julian Sorell Huxley, Ronald Aylmer

Fisher, John Burdon Sanderson Haldane, Ernst Mayr i George Ledyard Stebbins uniren les idees darwinistes amb les lleis de l'herència creant la Teoria Sintètica de l'Evolució, on les mutacions són el motor de l'evolució i la selecció natural el sedàs que afavoreix uns o altres canvis per a crear noves espècies (**Figura 2**; Fisher 1930; Dobzhansky 1937). Durant els anys 60s, gràcies a l'aplicació dels primers marcadors moleculars, s'observà una elevada diversitat genètica dins les poblacions naturals, fet poc esperable si la selecció natural consistia en escollir unes mutacions i eliminar-ne unes altres (Kimura 1991). Fou llavors que Motoo Kimura va posar en dubte la Teoria Sintètica de l'Evolució argumentant que les mutacions que persisteixen en una població són neutres (no tenen efecte en la supervivència ni en la reproducció dels individus) i, en conseqüència, no estan subjectes a la selecció natural sinó a l'atzar (deriva genètica). Kimura posteriorment elaborà la Teoria Neutralista de l'Evolució Molecular on suggeria que la deriva genètica era la principal responsable de l'evolució (**Figura 2**; Kimura 1968).

Les millores tecnològiques de mitjans del segle XX van propiciar grans avenços en el camp de la genètica i la biologia molecular. L'any 1973, Walter Gilbert i Allan Maxam van aconseguir seqüenciar 24 bases nitrogenades del DNA utilitzant un mètode de degradació química molt laboriós, lent i tòxic (Gilbert i Maxam 1973). Amb el mateix objectiu, dos anys més tard, Frederick Sanger aconseguí seqüenciar un fragment de DNA a partir d'un mètode ràpid i eficient anomenat didesoxi o de terminació de cadena que utilitzava un enzim, la DNA polimerasa, per a sintetitzar cadenes de DNA de llargada variable (**Figura 2**; Sanger *et al.* 1977). El mètode de la seqüenciació de Sanger es va implementar de forma rutinària amb la comercialització del primer analitzador de gens d'*Applied Biosystems* l'any 1986 (Adams 2008). Dos anys abans, Kary Banks Mullis inventà un procediment per amplificar fragments de DNA que revolucionaria la genètica moderna: la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) que fou descrita posteriorment en l'article de Saiki *et al.* (1985) i automatitzada als laboratoris d'arreu del món a partir del 1986 amb la comercialització del primer termociclador (**Figura 2**; Adams 2008). Les següents dues dècades van venir marcades pel desenvolupament de plataformes de bases de dades *online* per emmagatzemar informació genètica de seqüències de DNA (GENBANK, 1982), de proteïnes (SWISS-PROT, 1986) i d'informació genòmica (ACEDB, 1989). Paral·lelament, es van desenvolupar múltiples *software* lliures per a la comunitat científica per tal d'analitzar

la quantitat de dades generades (MAPMARKER, 1987; CLUSTAL MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT, 1988; BLAST, 1990). S'aconseguí la seqüenciació completa del primer genoma eucariota (*Saccharomyces cerevisiae*, 1996) i la posada en marxa del *Human Genome Project* (1990) amb l'establiment de la base de dades *ENSEMBL GENOME BROWSER* l'any 2001 (Adams 2008). Fou en el moment de completar el genoma humà que s'adonaren de la necessitat de desenvolupar noves tecnologies de seqüenciació molt més potents així com bases de dades genòmiques més grans per a resoldre la complexitat de les qüestions biològiques (Goodwin *et al.* 2016). Tanmateix, el limitat rendiment de la seqüenciació de Sanger utilitzant els analitzadors de gens sumat als elevats costos de producció, creaven un mur aparentment infranquejable per a l'avanç de la genètica (Goodwin *et al.* 2016). Malgrat això, a mitjans dels anys 2000, es va posar en marxa la primera plataforma d'alt rendiment de seqüenciació (454 de Roche) la qual marcà l'inici de la seqüenciació massiva en paral·lel coneguda també com a *Next generation sequencing* (NGS) (**Figura 2**; Goodwin *et al.* 2016). La NGS de segona generació permetia seqüenciar múltiples fragments de material genètic en paral·lel i generar així una enorme quantitat de seqüències curtes (*reads*) a baix cost (Kulski 2016). No obstant, el *handicap* més gran era realitzar un correcte assemblatge (sense ambigüitats) dels *reads* curts per a aconseguir *contigs* llargs i obtenir un genoma complet (Heather i Chain 2016). Nombroses plataformes de seqüenciació massiva de segona generació se sumaren a 454 com Illumina, SOLiD o Ion Torrent, les quals difereixen en la metodologia de seqüenciació, la longitud dels fragments generats, la freqüència i tipus d'errors de seqüenciació, el rendiment i el preu (Heather i Chain 2016). A partir de l'any 2011 van néixer les primeres plataformes de seqüenciació massiva de tercera generació les quals resolien el problema de l'assemblatge dels fragments repetits, generant *reads* més llargs (10-50 kb de mitjana) però de baixa qualitat, a partir d'una sola molècula (**Figura 2**). Actualment, la plataforma més utilitzada és PacBio RSII de Pacífic BioSciences tot i que recentment, Oxford Nanopore Technologies ha començat a comercialitzar el MinION, un aparell portable (3 cm x 10 cm) capaç de seqüenciar en molt poc temps un genoma bacterià sencer a baixa qualitat. Aquesta portabilitat i rapidesa han fet que avui es puguin obtenir respostes clíniques ràpides i *in situ* al lloc de mostreig (Goodwin *et al.* 2016; Quick *et al.* 2016).

MARCADORS MOLECULARS

En la majoria de les espècies marines, el nostre coneixement recau només en allò que som capaços d'observar. De fet hi ha dos principals problemes: el primer, que només podem mostrear part de la columna d'aigua i el segon, que només observem els individus durant una fracció del seu cicle vital (Burton 2009). Tot i que contínuament s'estan desenvolupant eines de seguiment a fi de comprendre les migracions reproductores o els patrons d'aparellament, l'aplicació d'eines genètiques moleculars és imprescindible per a comprendre l'ecologia de les espècies marines (Awise 1998; Burton 2009). Els marcadors moleculars durant els últims anys ens han permès identificar noves espècies, comprendre la seva alimentació, conèixer l'estructura genètica de les poblacions naturals, identificar estocs genètics, revelar patrons de dispersió segons sexes o estimar la grandària efectiva de les poblacions naturals (Awise 1998; Burton 2009). Un marcador molecular és un fragment de DNA o una proteïna (Moritz i Hillis 1996), que presenta suficient polimorfisme per a realitzar estudis de diversitat intraespecífica o interespecífica (Hillis *et al.* 1996).

Les alozimes foren els primers marcadors moleculars que s'usaren per a resoldre qüestions ecològiques i evolutives durant els anys 70s i 80s (**Figura 3**; May 1992). Les alozimes o variants al·lèliques d'un enzim són fàcilment distingibles en un gel d'electroforesi gràcies al diferent pes molecular i càrrega elèctrica dels al·lèls provocada per la substitució d'un aminoàcid per un altre (Schlötterer 2004). Per contra, no sempre estan subjectes a evolució neutra (Hudson *et al.* 1994) i no permeten detectar el nombre de mutacions entre un i altre al·lèl conseqüència de la degeneració del codi genètic (Schlötterer 2004). Durant els anys 60s Arber, Smith i Nathans descobriren els RFLPs (*restriction fragment length polymorphism*), els primers marcadors moleculars basats en el DNA que evitaven el problema de la redundància del codi genètic (**Figura 3**; Schlötterer 2004). Aquests, permeten detectar variacions dels fragments de DNA perquè una substitució en una de les bases de la seqüència diana de l'enzim de restricció canvia el patró de mida del fragment resultant (Schlötterer 2004). Aquests marcadors s'utilitzaren per mapejar gens i localitzar gens deleteris en el genoma (Schlötterer 2004). També permeteren realitzar les primeres anàlisis amb DNA mitocondrial (DNA_{mt}) i DNA ribosomal (DNA_r), els quals són primordials per a la genètica de poblacions, la biogeografia i la filogenètica (Awise 2004). El principal obstacle

dels RFLPs i motiu de la seva reduïda aplicació, fou la dificultat d'obtenir sondes específiques per a poder visualitzar cada fragment (Awise 2004). Posteriorment, es descobriren els minisatèl·lits que són repeticions en tàndem de 6 a 100 pb que assoleixen llargades de 0,5 kb a 50 kb (Figura 3; Vergnaud i Denoeud 2000). El seu elevat polimorfisme va revolucionar la medicina forense i els testos de paternitat (Armour *et al.* 1990). Tanmateix, menys rellevància van tenir en el camp de la genètica de poblacions i el mapeig del genoma donada la complexitat de lectura dels al·lèls i les elevades quantitats de DNA (100 ng) requerides per a la correcta visualització de les bandes (Armour *et al.* 1990). La invenció de la PCR l'any 1983 va marcar l'inici de l'aplicació dels marcadors genètics moleculars basats en aquesta tècnica. La seqüenciació de gens o fragments s'ha utilitzat àmpliament en la genètica de poblacions des de finals dels 80s perquè és el mètode de millor resolució (Figura 3; Awise 2004). Tot i això, presenta alguns inconvenients com la seqüenciació innecessària de zones conservades, el disseny de *primers* específics o l'elevat cost de la seqüenciació (Schlötterer 2004). Paral·lelament a la seqüenciació de gens, s'iniciaren els

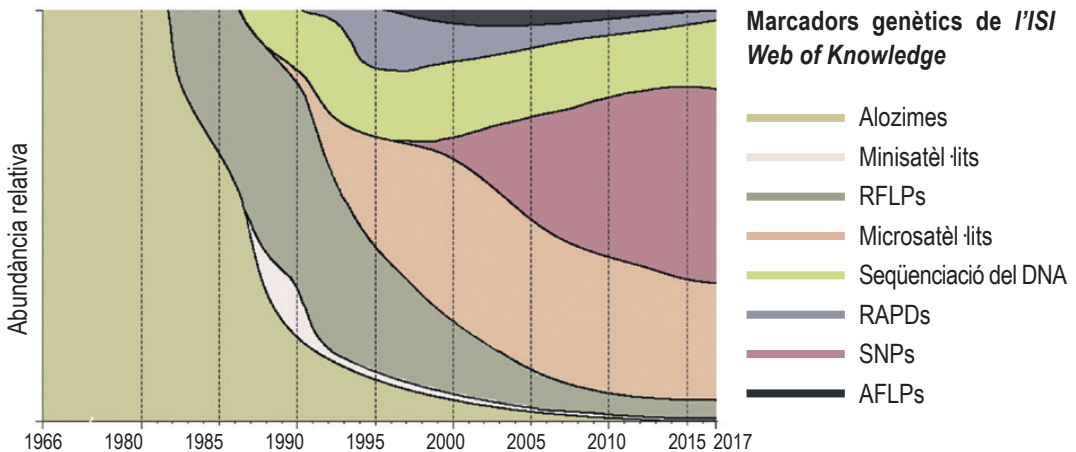


Figura 3. Evolució de la utilització dels marcadors genètics moleculars a partir de la cerca d'articles científics referenciats a la base de dades *ISI Web of Knowledge*. A l'eix horitzontal es representen els anys de publicació dels articles i en el vertical l'abundància relativa de cada marcador genètic respecte al total de marcadors genètics utilitzats. AFLP: *amplified fragment length polymorphism*; RAPD: *randomly amplified polymorphic DNA*; RFLP: *restriction fragment length polymorphism*; SNP: *single nucleotide polymorphism*. Els tòpics i booleans utilitzats inclouen (*allozyme or allozymes or alloenzyme or alloenzymes or "allelic variants of enzymes"*), (*RFLP or RFLPs or "restriction fragment length polymorphism"*), (*minisatellite or minisatellites*), (*"_{mt}"DNA or "DNA sequencing" not "Next generation sequencing"*), (*microsatellite or microsatellites or SSR or SSRs or STR or STRs*), (*RAPD or RAPDs or "randomly amplified polymorphic DNA"*), (*AFLP or AFLPs or "amplified fragment length polymorphism"*) i (*SNP or SNPs or "single nucleotide polymorphism"*). Totes les cerques es van realitzar el 27 de setembre de 2017.

primers estudis amb marcadors microsatèl·lits, formats per un motiu de repetició de 2 a 6 nucleòtids que es repeteixen en tàndem un nombre variable de vegades (**Figura 3**; Tautz 1989). Aquests marcadors hipervariables i molt abundants en el genoma de les espècies, han estat fonamentals per a resoldre amb precisió testos de paternitat, mapeig del genoma i estructura poblacional (Schlötterer 2004). No obstant, el complex sistema de mutació i els artefactes derivats de la PCR han complicat en alguns casos l'automatització de la lectura dels al·lels (Schlötterer 2004). Altres marcadors com els RAPDs, ISSRs, IRAPs i AFLPs aparegueren a partir dels anys 90s i requereixen encebadors que s'uneixen a múltiples llocs del genoma, la naturalesa dels quals determina el seu nom (**Figura 3**; Schlötterer 2004). Els RAPDs (*randomly amplified polymorphic DNAs*) usen encebadors de poques bases; els ISSRs (*inter-simple-sequence repeats*) encebadors complementaris a zones repetides; i els IRAPs (*inter-retrotransposon amplified polymorphism*) encebadors que flanquegen els retrotransposons. Alternativament, els AFLPs (*amplified fragment length polymorphism*) són fragments de restricció que poden ser amplificats gràcies a l'addició d'un connector a la zona diana (Zabeau i Vos 1993). En tots els casos anteriors, l'anàlisi del producte de PCR genera múltiples bandes que mostren presència o absència de variació entre individus. El principal avantatge dels RAPDs, ISSRs i IRAPs és que no requereixen que es conegui la seqüència diana on hibridar els *primers*, però, malauradament, s'ha detectat baixa reproductibilitat dels resultats en alguns d'ells (Schierwater i Ender 1993). A partir de l'any 1996 els SNPs, mutacions d'una sola base dins el genoma, han guanyat terreny en el camp de la genètica, especialment des que els costos de la seqüenciació massiva han baixat dràsticament i ha estat possible aïllar-los en gran nombre utilitzant com a DNA de partida el material genètic d'un *pool* d'individus (Helyar *et al.* 2011). Els SNPs s'estan utilitzant actualment per a estudis de mapeig del genoma, per inferir la història evolutiva de les espècies i per determinar paràmetres poblacionals. Tot i l'elevada reproductibilitat dels SNPs, la seva identificació dins el genoma està esbiaixada a favor dels que presenten alta freqüència i això pot generar un biaix en el càlcul d'alguns paràmetres poblacionals com la F_{ST} , les freqüències al·lèliques i el desequilibri de lligament (Helyar *et al.* 2011).

Al llarg dels anys, avenços en el camp de la genètica i la biologia molecular han portat a desenvolupar diversos tipus de marcadors genètics moleculars la popularitat dels quals

ha anat creixent o decreixent segons la novetat i l'arribada de nous marcadors (**Figura 3**; Schlötterer 2004). Tanmateix, un marcador molecular tradicional no té perquè ser pitjor que un marcador recentment descobert; la decisió de quin escollir ha d'estar en funció de l'objectiu d'estudi (**Taula 2**). Els aspectes a considerar alhora de seleccionar el millor marcador són: a) quin nivell de variabilitat es necessita. Per a estudis intrapoblacionals són necessaris alts o molt alts nivells de variabilitat. Per contra, nivells mitjans de variabilitat són adequats quan comparem poblacions diferents o nivells baixos són aconsellables per a estudis de filogènia, i b) la naturalesa de la informació requerida. Ploidia del marcador (haploides/diploides), nivell de precisió de la informació (dominant/codominant), tipus d'herència (biparental/parental/maternal), existència o no de recombinació i sistema de mutació (Chenuil 2006). En espècies no models on el genoma és desconegut, el cost de desenvolupament dels marcadors també és un aspecte clau en la decisió, per això, cal fer un balanç entre els costos de desenvolupament i la seva efectivitat a fi d'escollir la millor opció (Chenuil 2006). De fet no hi ha un únic marcador ideal per a cada estudi però s'aconsellen marcadors hipervariables per a inferir parentiu o testos forenses (Schlötterer 2004). Els loci microsatèl·lits són una bona opció perquè en baix nombre aporten molta informació i són relativament senzills d'aïllar. De la mateixa manera, un panell molt ampli d'SNPs podria també aportar el mateix detall, però els costos de desenvolupament són més elevats (Schlötterer 2004).

Per els motius esmentats, en la present tesi es va optar per desenvolupar i aplicar marcadors microsatèl·lits.

MARCADORS MICROSATÈL·LITS

Els microsatèl·lits, també anomenats SSR (*simple sequence repeat*) o STR (*short tandem repeats*), són seqüències de DNA distribuïdes heterogèniament pel genoma dels organismes eucariotes i procariotes (Tautz 1989; Zane *et al.* 2002), formades per un motiu de repetició d'entre 2 i 6 bases nitrogenades que es repeteixen en tàndem de 5 a 50 vegades (Tautz 1989; Arcot *et al.* 1995; Schlötterer 2000). Gràcies a les característiques intrínseques que presenten: herència mendeliana, codominància i elevat potencial de

Taula 2. Avantatges i inconvenients dels diferents marcadors moleculars segons Schlötterer (2004).

Marcador	Avantatges	Inconvenients
Alozimes	<ul style="list-style-type: none"> • Econòmicament barates • Protocols universals 	<ul style="list-style-type: none"> • Requereixen material fresc o congelat • Alguns locus presenten inestabilitat proteica • Nombre limitat de marcadors disponibles • Poden estar subjectes a selecció
RAPDs i derivats	<ul style="list-style-type: none"> • Econòmicament barats • Produeixen un gran nombre de bandes, les quals poden ser caracteritzades individualment 	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa reproductibilitat • Majoritàriament dominants • Difícils d'analitzar • Difícils d'automatitzar • La comparació creuada entre estudis és difícil
Seqüències de DNA	<ul style="list-style-type: none"> • Alta resolució • No esbiaixades per selecció • La comparació creuada entre estudis és fàcil 	<ul style="list-style-type: none"> • Significativament més cares que altres tècniques
Microsatèl·lits	<ul style="list-style-type: none"> • Altament informatius: molts al·lels i alta heterozigositat. • Baix biaix de selecció • Fàcils d'aïllar 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta taxa de mutació • Mutacions complexes • Difícils d'automatitzar • La comparació creuada entre estudis requereix preparació.
SNPs	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa taxa de mutació • Elevada abundància • Fàcils de tipificar • La comparació creuada entre estudis és fàcil 	<ul style="list-style-type: none"> • Relativament cars d'aïllar • Biaix d'identificació i selecció. Es tendeix a utilitzar aquells que tenen més alta freqüència en la població. • Baix contingut d'informació amb un sol locus

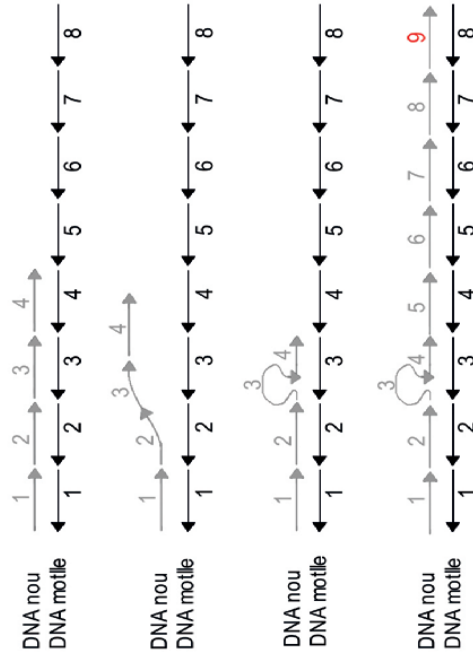
resolució s'han aplicat a un ventall d'estudis molt divers (Guichoux *et al.* 2011). Considerats generalment com a marcadors neutres, s'han utilitzat per a anàlisis de parentiu, inferència del sistema d'aparellament, assignació parental, identificació d'estocs genètics, estructura poblacional i maneig de recursos naturals (Zane *et al.* 2002). A més, les seves aplicacions han abastat altres disciplines de la ciència incloent la medicina forense, la taxonomia, la filogènia, la biologia de la conservació o la genòmica funcional entre d'altres (Ellegren 2004). Els microsatèl·lits es classifiquen segons la llargada del motiu de repetició en: di-, tri-, tetra-, penta- i hexanucleòtids (Goldstein i Schlötterer 1999). Tanmateix, errors durant la polimerització donen lloc a situacions particulars que alguns autors utilitzen també com a sistema de classificació: a) microsatèl·lit imperfecte: mutació a l'atzar d'una base del motiu de repetició; b) microsatèl·lit interromput: addició o pèrdua d'una base dins el motiu de repetició, i c) microsatèl·lit compost: presenta més d'un motiu de repetició diferent (Goldstein i Schlötterer 1999).

L'elevada taxa de mutació que presenten, estimada entre 10^{-2} i 10^{-6} per locus per generació (Schlötterer 2000), es manifesta en forma de canvi en el nombre de repeticions del motiu bàsic (Schlötterer i Tautz 1992). Aquesta inestabilitat molecular ve donada per dos mecanismes en proporcions desiguals: a) el plegament erroni d'alguna cadena durant la replicació del DNA (Tachida i Iizuka 1992), i b) la recombinació (Harding *et al.* 1992). El primer, sobre el qual recauen la majoria de les mutacions, és anomenat *slipped-strand mispairing* i ocorre quan per error, durant la polimerització, la cadena de DNA motlle se separa de la cadena que s'està sintetitzant de nou (**Figura 4**; Levinson i Gutman 1987). Aquesta separació pot comportar un aparellament erroni de bases entre les dues cadenes de DNA al reiniciar-se la replicació. Si la cadena de DNA que s'ha aparellat erròniament és la sintetitzada de nou, l'al·lel de nova formació tindrà més unitats de repetició que l'al·lel motlle. Per contra, si la cadena de DNA que s'ha aparellat malament és la motlle, el resultat serà la pèrdua d'unitats de repetició en l'al·lel nou (**Figura 4**; Ellegren 2004). Alguns d'aquests errors de polimerització són corregits pel sistema de reparació d'aparellaments erronis, però molts s'escapen i esdevenen mutacions noves (Li *et al.* 2002). El segon mecanisme és la recombinació que o implica un intercanvi desigual de material genètic entre cadenes o la conversió gènica, que es dona quan una secció de material genètic d'un cromosoma es copia a un altre cromosoma, però el DNA del cromosoma donant es manté invariable (Ellegren 2004). L'eficiència d'aquests dos mecanismes depèn d'altres factors com la mida del motiu de repetició, la mida de l'al·lel, la posició dins el cromosoma, la quantitat de GC a les regions flanquejants, la divisió cel·lular o el sexe (Li *et al.* 2002).

S'han proposat diversos models per explicar els processos mutacionals que afecten els loci microsatèl·lits (Estoup *et al.* 2002 i referències incloses): a) el model d'al·lells infinits (IAM: *infinite allele model*) on s'assumeix que les mutacions poden crear infinites repeticions del motiu bàsic sense que la proximitat en nombre de repeticions indiqui major proximitat evolutiva; b) el model de mutació per passos (SMM: *stepwise mutation model*) on les mutacions poden guanyar o perdre una unitat de repetició amb la mateixa probabilitat i a més, la proximitat en el nombre de repeticions entre dos al·lells indica proximitat evolutiva; c) la generalització del model de mutació per passos (GSM: *generalized stepwise model*) on es contempla que els processos mutacionals poden implicar un increment o disminució

Increment del nombre de repeticions

Al·lel nou amb més repeticions que l'al·lel motlle



Disminució del nombre de repeticions

Al·lel nou amb menys repeticions que l'al·lel motlle

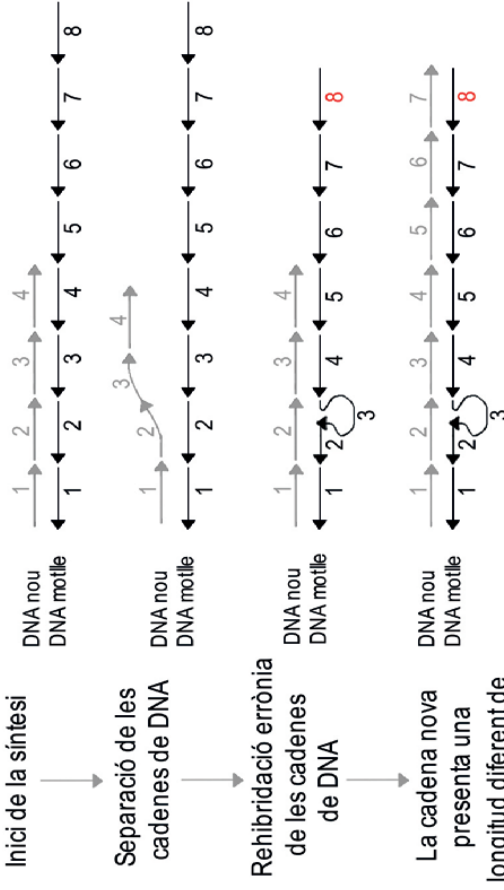


Figura 4. Mecanisme de *slipped-strand mispairing* que origina els diferents al·lels d'un locus microsatèl·lit. A l'esquerra s'observa la formació d'un nou al·lel amb més nombre de repeticions (9) que l'al·lel motlle (8) i a la dreta la formació d'un nou al·lel amb menys nombre de repeticions (7) que l'al·lel motlle (8). Modificat d'Ellegren (2004).

d'un gran nombre d'unitats de repetició alhora; d) el model de dues fases (TPM: *two phase model*) que és una extensió del SMM on també es contempla que els processos mutacionals poden implicar un increment o disminució d'un gran nombre d'unitats de repetició alhora, i e) el model de *k*-al·lels (KAM: *k-allele model*) que assumeix l'existència de *k* estats al·lèlics en un locus i que la probabilitat de mutar d'un estat a qualsevol altre (*k*-1) és equiprobable (Estoup *et al.* 2002 i referències internes). D'aquests models, el més acceptat és el model de mutació per passos amb la incorporació de la premissa del model de dues fases (Estoup *et al.* 2002 i referències incloses).

El principal handicap dels marcadors microsatèl·lits correspon a l'aïllament de *novos*, especialment en espècies no models amb informació genòmica limitada (Zane *et al.* 2002). Els mètodes tradicionals basats en el clonatge i la captura dels híbrids per posteriorment seqüenciar-los per Sanger són lents, tècnicament laboriosos i cars (Zane *et al.* 2002; Santana *et al.* 2009). Sortosament, els avenços tecnològics i metodològics han facilitat considerablement la identificació d'aquests marcadors durant els últims anys (Guichoux *et al.* 2011). El principal factor ha estat l'emergència de plataformes de seqüenciació massiva (NGS) que han reduït en temps i cost el procés d'identificació d'STRs (Abdelkrim *et al.* 2009; Rasmussen i Noor 2009; Santana *et al.* 2009; Andrés *et al.* 2012). No menys important ha estat el desenvolupament de sistemes d'amplificació conjunta (*multiplex*) per aconseguir un alt poder de resolució en temps rècord (Butler *et al.* 2001). Múltiples plataformes de NGS coexisteixen al mercat i les diferències entre elles fan referència a la forma de generar genoteques, la llargada dels *reads* resultants i la cobertura del genoma (Metzker 2010). Així, algunes plataformes presenten avantatges importants respecte a d'altres en contextos determinats. Per exemple, Illumina s'aconsella per identificar noves variants genètiques per reseqüenciació del genoma, gràcies a que genera un elevat volum de bases nucleotídiques d'alta qualitat en una sola carrera. 454 de Roche, en canvi, es recomana quan s'ha d'assemblar un genoma sense informació prèvia (de *novos*); o Helicos BioSciences és útil per obtenir informació quantitativa a partir d'RNA-seq (Metzker 2010).

En la present tesi es va optar per la piroseqüenciació de 454 de Roche (**Figura 5**). Aquesta metodologia detecta mitjançant fluorescència, quan la DNA polimerasa afegeix

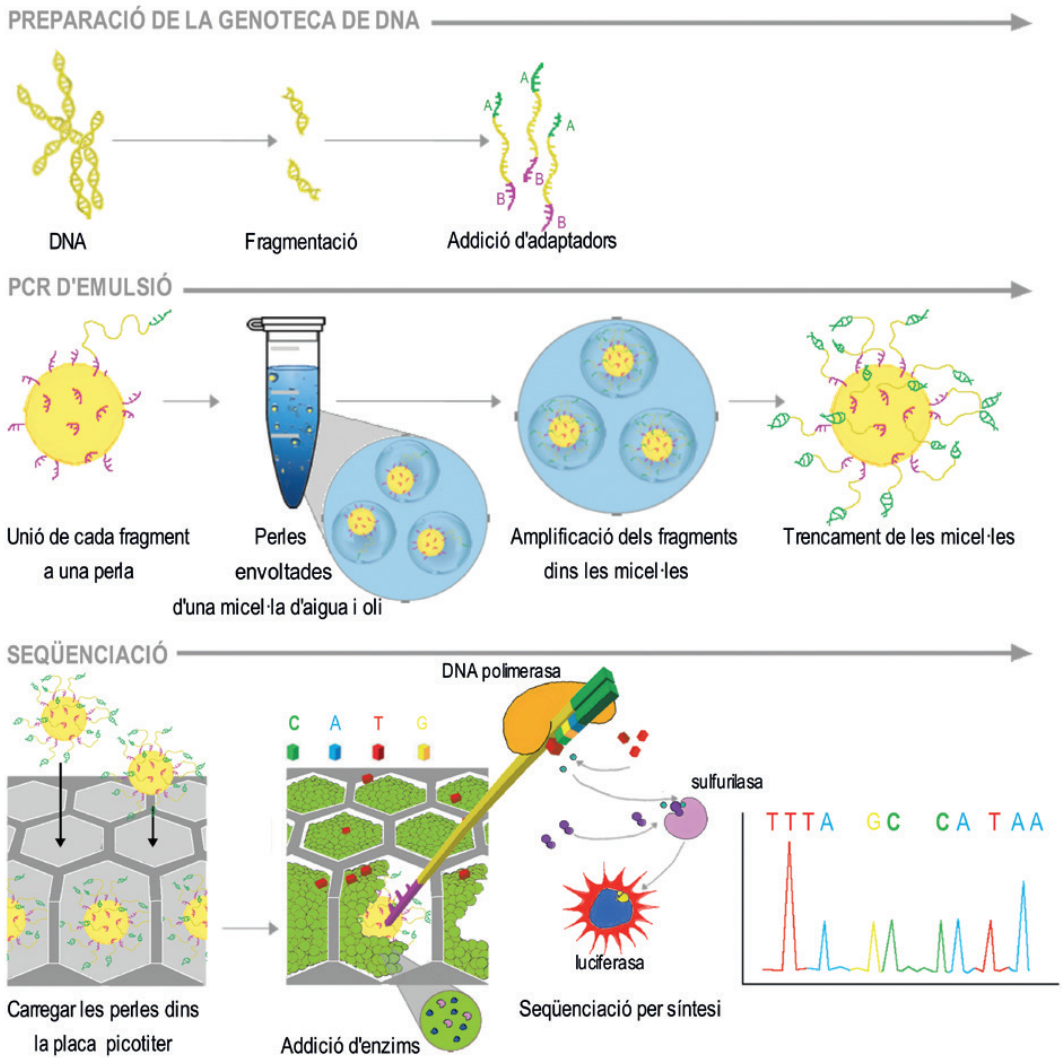


Figura 5. Metodologia utilitzada per 454 de Roche per amplificar fragments de DNA units a perles d'agarosa. Es barregen els fragments de DNA i les perles d'agarosa unides a oligonucleòtids complementaris als adaptadors dels fragments en una proporció 1:1. Els complexos fragment-perla són encapsulats mitjançant agitació en micel·les aquoses envoltades d'oli que contenen els reactius de la PCR. Un cop realitzada l'amplificació, les perles resultants estan envoltades d'aproximadament 1 milió de còpies del fragment original. Seguidament són transferides a una placa *picotiter* on tindrà lloc la piroseqüenciació.

un nou nucleòtid a la cadena de nova síntesi, perquè allibera d'una pirofosfatasa que desencadena una successió de reaccions que finalitzen amb la producció de llum per l'enzim luciferasa (Mardis 2008; Metzker 2010). La quantitat de llum produïda és proporcional al nombre d'homonucleòtids incorporats a la cadena. La seqüenciació de 454 de Roche s'inicia amb el trencament del genoma en fragments petits (300-800 pb) als quals s'hi uneixen dos adaptadors, un complementari a una perla d'agarosa i l'altre

complementari als *primers* universals que amplificaran els fragments (**Figura 5**; Mardis 2008). A continuació es mesclen els fragments de la genoteca amb perles d'agarosa envoltades d'oligonucleòtids complementaris als adaptadors específics dels fragments. Com a resultat, cada perla s'associa només a un fragment (**Figura 5**; Mardis 2008). El complex fragment-perla és individualitzat en una micel·la d'aigua i oli on hi ha els reactius necessaris per a iniciar-se la PCR d'emulsió. Dins de cada micel·la es produeixen aproximadament un milió de còpies de cada fragment les quals queden enganxades a la superfície de la perla d'agarosa (**Figura 5**; Mardis 2008). Aquests fragments amplificats individualment són seqüenciats en massa. Per fer-ho, primer es disposa cada perla en un pou de la placa de seqüenciació *picotiter* on també s'afegeixen els enzims de la reacció de piroseqüenciació (**Figura 5**; Mardis 2008). Un cop centrifugada l'emulsió per assegurar que tots els enzims envolten la perla d'agarosa, se subministren els 4 nucleòtids coneguts complementaris a l'adaptador universal que ampliarà els fragments. Així, el *software* calibra la intensitat de llum que desprèn un sol nucleòtid al afegir-se a la cadena i és capaç d'interpretar quants homopolímers s'han afegit en rebre intensitats de llum superiors (Mardis 2008). D'aquesta manera comença la piroseqüenciació on a cada cicle se subministra només un tipus de nucleòtid (A/T/C/G). Si el nucleòtid subministrat és incorporat a la cadena, el pou allibera un feix de llum que és captat i interpretat pel *software* de l'aparell (*Genome Sequencer FLX analyzer*) el qual afegeix aquella base a la seqüència que s'està dibuixant (**Figura 5**; Mardis 2008). Donat que a cada cicle només s'incorpora un sol nucleòtid, els errors en aquest tipus de seqüenciació són baixos (Mardis 2008; Metzker 2010). Els grans avantatges de la piroseqüenciació són la rapidesa alhora de completar el procés i l'elevada longitud dels fragments resultants (700-800 pb) en comparació a d'altres plataformes de seqüenciació. Per contra, el principal inconvenient són les falses insercions o delecions produïdes quan s'uneixen més de 6 homopolímers consecutius a la cadena de nova síntesi (Liu *et al.* 2012). A partir de les dades genòmiques de la NGS i la posterior anàlisi bioinformàtica s'obtenen els loci microsatèl·lits sobre els quals cal dissenyar *primers* complementaris a la regió flanquejant de cada locus, validar els *primers* per PCR i detectar l'existència de polimorfisme en cadascun d'ells (Zalapa *et al.* 2012).

EINES ESTADÍSTIQUES PER A L'ANÀLISI GENÈTICA DE LES POBLACIONS

La genètica de poblacions estudia quantitativament la variació genètica dins i entre poblacions i els factors evolutius que expliquen els canvis al llarg del temps i l'espai (Hallerman 2003). Les poblacions estan formades per individus genèticament diferents i els genotips d'aquests individus determinen unes freqüències al·lèliques poblacionals, les quals permeten calcular la diversitat genètica poblacional. Diverses forces microevolutives actuen sobre els individus d'una població i els seus genotips i en conseqüència modifiquen les freqüències al·lèliques de la població: mutació, selecció natural, migració i deriva genètica (Hartl i Clark 1989). El principi de Hardy-Weinberg descriu que la quantitat de variabilitat genètica en una població es manté constant d'una generació a la següent en absència d'influències evolutives (**Requadre 1**). La desviació de les proporcions de Hardy-Weinberg indica que sobre la població actua alguna o algunes de les forces evolutives com la selecció, el flux gènic, la mutació, la deriva o l'aparellament no aleatori (Rousset i Raymond 1995). La mutació és la principal força evolutiva per originar nous al·lèls, però altres factors actuen incrementant-ne o disminuint-ne l'ocurrència (Hedrick 2005). La deriva genètica que de forma atzarosa transfereix uns al·lèls i d'altres no a la següent generació, afecta notablement a poblacions petites (efecte coll d'ampolla) o a poblacions fragmentades (efecte fundador) reduint la variació genètica intrapoblacional i incrementant la divergència entre poblacions (Hedrick 2005). La migració actua en sentit contrari a la deriva, introduint nous al·lèls externs a la població, reduint així les adaptacions locals i la conseqüent diferenciació poblacional (Hedrick 2005). La selecció natural actua, en molts casos, de forma direccional. Aquells al·lèls que aporten un avantatge (augment de la *fitness*) són transferits a la següent generació, per contra, els que són desfavorables, tendeixen a desaparèixer de la població. En altres casos però, la selecció actua preservant múltiples al·lèls del *pool* gènic (favorables i desfavorables) generant polimorfisme equilibrat (Hedrick 2005).

Dins d'una població, el sistema d'aparellament i la dispersió dels individus són dos factors claus per explicar l'estructura poblacional i el flux gènic. Els estadístics F són els més utilitzats per descriure patrons d'estructuració genètica dins i entre poblacions a partir de la variància de les freqüències al·lèliques (Wright 1951, 1969) i els nivells

Requadre 1.**Equilibri de Hardy-Weinberg (HWE)**

Assumpcions del model de HW:

- Aparellament a l'atzar dins la població
- Mida de la població infinita
- Efecte negligible de les mutacions i la migració
- La selecció natural no actua sobre els gens estudiats

Donada una població en equilibri, examinant un locus amb dos al·lels (**A** i **a**), la proporció d'homozigots (**AA** i **aa**) i heterozigots **Aa** tindrà la següent relació:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

on **p** és la freqüència de l'al·lel "**A**" i **q** és la freqüència de l'al·lel "**a**" a la població. En l'equació, **p**² representa la freqüència d'homozigots **AA**, **q**² la freqüència d'homozigots **aa** i **2pq** la freqüència dels heterozigots **Aa**. A més, la suma de les freqüències dels dos al·lels ha de sumar sempre 1, per tant:

$$p + q = 1$$

Si es coneix el nombre d'individus de la població que presenten cadascun dels tres genotips diferents (**AA**, **aa** i **Aa**) aleshores aïllant **p** i **q** de l'equació inicial podem calcular les freqüències al·lèliques de la població:

$$p = \frac{2(n^\circ AA) + (n^\circ Aa)}{2[(n^\circ AA) + (n^\circ Aa) + (n^\circ aa)]}$$

$$q = \frac{2(n^\circ aa) + (n^\circ Aa)}{2[(n^\circ AA) + (n^\circ Aa) + (n^\circ aa)]}$$

En genètica de poblacions, l'equació de Hardy-Weinberg s'utilitza per mesurar si les freqüències al·lèliques observades a la població (**p** i **q**) difereixen significativament de les freqüències esperades pel model. Per conèixer el valor de significació s'utilitza la **X**²:

$$X^2 = \sum \frac{(\text{Observada} - \text{Esperada})^2}{\text{Esperada}}$$

d'heterozigositat esperada (Nei 1973). Wright (1951) va demostrar que la variació genètica en una població subdividida es pot analitzar a tres nivells diferents: dels individus dins la seva subpoblació (F_{IS}), de les subpoblacions dins la població total (F_{ST}) i dels individus dins la població total (F_{IT}). Desenvolupà tres estadístics **F** relacionats de la forma següent: $(1-F_{IT}) = (1-F_{IS})/(1-F_{ST})$ i que serveixen de referència quantitativa per a estudis de genètica de poblacions i de biologia evolutiva (**Requadre 2**; Holsinger i Weir 2009). La F_{IS} informa del sistema d'aparellament de la població objecte d'estudi (**Requadre 2**). Valors negatius de F_{IS} indiquen excés d'heterozigots respecte a l'esperat per Hardy-Weinberg, indicant una possible selecció a favor de l'heterozigot. Valors de F_{IS} propers a 0 indiquen aparellament

a l'atzar. Contràriament, una deficiència en el nombre d'heterozigots respecte a l'esperat per Hardy-Weinberg resulta en una F_{IS} positiva que indica consanguinitat. Tanmateix, valors positius de la F_{IS} poden ser conseqüència d'una subdivisió de la població: si els individus mostrejats pertanyen a diferents subpoblacions, l'estima de la F_{IS} és una combinació de dèficit d'heterozigots a nivell intrapoblacional i interpoblacional (Efecte Wahlund) (Holsinger i Weir 2009). La F_{ST} mesura la quantitat de diferenciació entre subpoblacions així com el grau de similitud entre els individus d'una població (**Requadre 2**). Valors de F_{ST} iguals a 0 indiquen que les freqüències al·lèliques són idèntiques en totes les subpoblacions estudiades i que, per tant, no hi ha diferenciació entre elles ($H_t = H_s$). Per contra, valors d' F_{ST} propers a 1 indiquen que cada subpoblació té al·lèls diferents fixats ($H_s = 0$) i, per tant, les freqüències al·lèliques de les subpoblacions són completament diferents (Holsinger i Weir 2009).

Requadre 2.

Estadístics F (Wright 1951) segons Holsinger i Weir (2009)

F_{IT} (overall fixation index): correlació entre els gàmetes d'un individu respecte als gàmetes de la població total, o dit d'una altra manera, desviació de les freqüències genotípiques esperades per Hardy-Weinberg de la població total. Rang: (-1,+1) on -1 correspon a l'absència d'heterozigots i +1 a l'excés d'heterozigots.

$$F_{IT} = (H_T - H_i) / H_T$$

on H_T és l'heterozigositat esperada al global de tota la població assumint que està en equilibri de Hardy-Weinberg i la H_i és l'heterozigositat observada mitjana per individu dins de la subpoblació.

F_{IS} (inbreeding coefficient): correlació entre els gàmetes d'un individu respecte als gàmetes de la subpoblació a la qual pertany, o dit d'una altra manera, desviació mitjana de les freqüències genotípiques esperades per Hardy-Weinberg de dins les subpoblacions. Rang: (-1, +1) on -1 correspon a l'excés d'heterozigots i +1 a l'absència d'heterozigots.

$$F_{IS} = (H_s - H_i) / H_s$$

on H_s és l'heterozigositat esperada mitjana a la subpoblació assumint equilibri de Hardy-Weinberg.

F_{ST} (fixation index): correlació entre els gàmetes seleccionats a l'atzar d'una subpoblació respecte als de la població sencera, o dit d'una altra manera, proporció de diversitat genètica deguda a les diferències en les freqüències al·lèliques entre poblacions. Rang: (0, +1) on 0 correspon a l'absència de diferenciació entre subpoblacions i +1 a la diferenciació completa.

$$F_{ST} = (H_T - H_s) / H_T$$

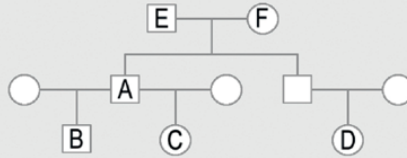
Una altra mesura per conèixer l'estructura poblacional i el flux gènic és l'estudi de la *relatedness* (r) o coeficient de parentiu que es defineix com la probabilitat que un grup de gens provinguin d'un gen ancestral o el que és el mateix, la probabilitat que aquests gens siguin

idèntics per descendència (IPD; Weir *et al.* 2006). Dos individus tindran un parentiu si l'al·lel o els al·lels d'un d'ells són IPD respecte els de l'altre individu (Weir *et al.* 2006). El coeficient de parentiu entre dos individus es pot calcular fàcilment en presència del pedigrí complet d'ambdós individus (**Requadre 3a**). No obstant, en les poblacions naturals el pedigrí és desconegut i l'única forma d'estimar el parentiu és utilitzant marcadors moleculars (**Requadre 3b**; Oliehoek *et al.* 2006). El grau de parentiu entre dos individus per un locus concret és un valor estimat calculat a partir dels genotips d'aquells dos individus i les freqüències al·lèliques d'aquell locus a la població de referència, que idealment corresponen a la població ancestral. La mitjana dels valors de parentiu dels múltiples loci analitzats dona una estima del grau de parentiu global entre dos individus si els marcadors genètics utilitzats han estat escollits a l'atzar (Wang 2016). S'han desenvolupat 7 principals estimadors del parentiu que es classifiquen segons la seva naturalesa en: estimadors de moment o *methods of moment estimators*, que estimen el parentiu entre individus en termes d'IPD (Queller i Goodnight 1989; Li *et al.* 1993; Ritland 1996; Lynch i Ritland 1999; Wang 2002) i estimadors basats en la probabilitat o *maximum likelihood estimators*, que calculen la probabilitat de que els individus mantinguin una relació particular en base a les dades genètiques (Anderson i Weir 2007; Wang 2007). No hi ha cap estimador que sigui millor que un altre en tots els escenaris, per això es recomana realitzar simulacions per a seleccionar el millor estimador en base a l'objectiu d'estudi (Taylor 2015).

La dispersió és una altra característica de la història vital dels organismes amb importants implicacions sobre la dinàmica poblacional i la genètica de l'espècie (Temple *et al.* 2006). Donades les dificultats logístiques que comporta el seu estudi, majoritàriament és inferida utilitzant dades genètiques en comptes d'observacions de camp (Mossman i Waser 1999; Goudet *et al.* 2002; Lawson Handley i Perrin 2007). En algunes espècies, els mascles i les femelles presenten patrons diferents de dispersió (*sex-biased dispersal*) on un sexe és filopàtric i l'altre es dispersa com a conseqüència de la competència pels recursos (Greenwood 1980), l'aparellament (Dobson 1982) o la prevenció de l'endogàmia (Pusey 1987). Existeixen dues tipologies d'anàlisis basades en eines genètiques moleculars per inferir el *sex-biased dispersal*: anàlisis a nivell de poblacions i anàlisis a nivell d'individu. Les primeres tracten la "població" (que pot ser una localitat de mostreig) com la unitat bàsica d'anàlisi i usen eines

Requadre 3a.**Coefficient de parentiu segons Weir et al. (2006) i de Speed i Balding (2015)**

Els al·lels són idèntics per descendència (IPD) si provenen d'un avantpassat comú el qual pot ser a la generació anterior o diverses generacions endarrere. Dos al·lels són idèntics per estat (IPS) si presenten la mateixa seqüència de DNA, tot i que no forçosament implica que provinquin d'un avantpassat comú. Tot i que a nivell de genotips podem saber quins són idèntics per estat, hem d'inferir mitjançant pedigrí o probabilitats si també són idèntics per descendència.

**En base al pedigrí**

El parentiu és interpretat com el nombre de passos o camins necessaris i possibles per a connectar dos individus d'un arbre genealògic assumint que els fundadors (E i F) no estan emparentats. Així el coeficient de parentiu (r) entre els individus B i C es calcula de la següent manera:

$$r(B,C) = \sum_A \frac{1+f_A}{2^{g_A+1}}$$

On el \sum és la suma del càlcul d' r independent per a cadascun dels avantpassats comuns recents (A) entre B i C. És a dir, individus del pedigrí que passen gens directament als individus que volem estudiar a través de rutes independents. g_A és el nombre de connexions pare-fill en el camí entre B i C via A, i f_A és el coeficient de consanguinitat d'A, que equival al coeficient dels seus pares. En aquest exemple i tenint en compte que els fundadors no tenen consanguinitat, els mitjos germans B i C tenen un sol antecessor comú A amb $g_A = 2$. Per tant, $r(B,C) = 1/2^3$. Els cosins B i D tenen dos antecessors comuns E i F amb $g_E = g_F = 4$. Per tant, $r(B,D) = 2 \times (1/2^5)$.

$r(B,C)$ es pot interpretar com la fracció dels al·lels d'un locus de l'individu B que són IPD dels de l'individu C. Hi ha 15 possibles estat d'IPD pels 4 al·lels de B i C, que es redueixen a 9 si no tenim en compte l'origen matern o patern de cadascun d'ells i a 3 si no hi ha endogàmia: tenir 0, un o dos parells d'al·lels IBD (k_0 , k_1 i k_2 respectivament). La taula mostra les tres probabilitats de ser idèntic per descendència ($k_{0,1,2}$) i el coeficient de parentiu (r) per a cada relació.

Relació	k_2	k_1	k_0	$r = k_1/4 + k_2/2$
Bessons	1	0	0	1/2
Germans complets	1/4	1/2	1/4	1/4
Pares-fills	0	1	0	1/4
Dobles primers cosins	1/16	3/8	9/16	1/8
Mitjos germans	0	1/2	1/2	1/8
Primers cosins	0	1/4	3/4	1/16
No relacionats	0	0	1	0

genètiques com els estadístics F , el coeficient de parentiu i els testos d'assignació per a identificar els patrons de migració segons sexes entre poblacions (Goudet *et al.* 2002). Les segones utilitzen referències espacials dels genotips multilocus com a unitat bàsica d'anàlisi, amb l'objectiu d'identificar diferències en els patrons de dispersió entre sexes a

Requadre 3b.

Coeficient de parentiu segons Weir *et al.* (2006) i de Speed i Balding (2015)

Sense pedigrí

En absència de pedigrí el coeficient de parentiu s'ha de calcular a partir dels genotips de la parella d'individus i les freqüències al·lèliques d'aquell locus a la població de referència. Molts models poblacionals incorporen la següent expressió per descriure la probabilitat que dos al·lells homòlegs siguin del tipus a (p_{aa}) on p_a és la probabilitat que un al·lel sigui del tipus a :

$$p_{aa} = r p_a + (1 - r) p_a^2$$

Aquesta equació està basada en la idea que els dos al·lells tenen un mateix origen i que efectivament corresponen només a un al·lel observat amb probabilitat p_a . Contràriament, si els dos al·lells són independents, ambdós són a amb probabilitat p_a^2 . Substituint a l'equació inicial $U_1=1$ si el primer al·lel és a o $U_1=0$ si no ho és i el mateix pel segon al·lel U_2 , tenim: $E[U_1] = E[U_2] = p_a$, $\text{Var}[U_1] = \text{Var}[U_2] = p_a(1 - p_a)$ i $E[U_1 U_2] = p_{aa}$. L'equació inicial queda de la següent manera:

$$r = \frac{p_{aa} - p_a^2}{p_a(1 - p_a)} = \frac{E[(U_1 - p_a)(U_2 - p_a)]}{\sqrt{\text{Var}[U_1] \text{Var}[U_2]}} = \text{Cor}[U_1, U_2]$$

Si els dos al·lells són mostrejats aleatòriament a la subpoblació, llavors r equival a F_{ST} . Tanmateix, si l'al·lel correspon als individus B i C, membres d'un pedigrí amb fundadors no relacionats, la r a la primera equació és $r(B,C)$ estimada mitjançant pedigrí i la p_a són les probabilitats dels al·lells fundadors a la població de referència. La segona fórmula, amb variacions, és utilitzada en la genètica de la conservació per estimar r utilitzant marcadors polimòrfics com els loci microsatèl·lits.

baixa escala geogràfica (de pocs a centenars de metres) a partir de l'autocorrelació genètica espacial que permet detectar si la similitud genètica entre individus veïns és més gran que l'esperada per atzar (Epperson 2005).

Existeixen dues metodologies per inferir possibles patrons de dispersió asimètrics entre sexes: utilitzant marcadors amb herència biparental (alozimes, microsatèl·lits o SNPs) o comparant marcadors amb diferent tipus d'herència (herència autosòmica versus herència materna) (Prugnolle i de Meeus 2002). Dins dels marcadors amb herència biparental hi ha múltiples eines genètiques d'anàlisi: a) el coeficient de parentiu (r) que preveu que si els individus no es dispersen del lloc natal, aquests estan més relacionats, de mitjana, que individus agafats a l'atzar de tota la població. Per tant, quan un sexe és filopàtric i l'altre

sexe es dispersa, els individus del sexe filopàtric tenen una *relatedness* més elevada que els del sexe dispersant (Prugnolle i de Meeus 2002); b) la F_{ST} de Wright que preveu que el sexe que es dispersa més tingui una F_{ST} entre subpoblacions més baixa que el sexe que es dispersa menys, i c) l'índex d'assignació, el qual determina la probabilitat de que un genotip s'hagi originat a la població on s'ha mostrejat (Waser i Strobeck 1998) i preveu que el sexe dispersant tingui un valor més negatiu de l'índex d'assignació corregit que el sexe filopàtric (Favre *et al.* 1997). Dins els índex d'assignació també s'inclou l'anàlisi de la variància dels índex d'assignació corregits (vA/c) on les variàncies més altes són característiques del sexe dispersant. Ambdues metodologies d'assignació comparen mascles i femelles utilitzant els procediments aleatoris de Goudet *et al.* 2002. Els mètodes d'herència biparental basats en la F_{ST} i la *relatedness* tenen l'inconvenient de la pseudoreplicació, donat que la mida de la mostra és inferior al nombre de comparacions per parelles generades i en conseqüència el nombre de graus de llibertat és artificialment augmentat i el resultat de la significació també (Prugnolle i de Meeus 2002). Això es pot corregir assegurant que només s'utilitzen les dades d'una població una vegada o bé comparant les diferències observades entre sexes de la mostra estudiada amb una distribució generada on l'assignació del sexe de cada individu de la subpoblació és aleatòria respectant la *ratio* de sexes observada (Goudet *et al.* 2002).

Per altra part, el mètode que compara marcadors moleculars amb diferent tipus d'herència es basa en la premissa que els marcadors d'herència uniparental tenen un dels dos sexes que no contribueix al genoma de la descendència (Awise 2004). Contràriament, els marcadors d'herència biparentals, ambdós sexes contribueixen per igual a la diversitat genètica de la progènie (Awise 2004). Per tant, diferències en el nivell d'estructura genètica detectada pels dos tipus de marcadors indiquen asimetria en la dispersió de sexes (Prugnolle i de Meeus 2002). Aquest mètode basat en la comparació entre marcadors amb diferent tipus d'herència, té l'inconvenient que pot detectar erròniament diferències en el nivell d'estructura genètica a causa d'una taxa de mutació diferent i/o una estima de la mida efectiva de la població desigual entre marcadors (Chesser i Baker 1996). Per evitar aquests errors, és important utilitzar marcadors amb taxes de mutació semblants (Balloux *et al.* 2000) així com tenir en compte la màxima informació demogràfica possible sobre l'espècie objecte d'estudi (Petit *et al.* 2001).

LA GAMBA ROSADA *Aristeus antennatus*

SISTEMÀTICA

La gamba rosada, *Aristeus antennatus* (Risso 1816), és un crustaci pertanyent a l'ordre Decapoda i família Aristeidae. L'ordre Decapoda comprèn 4048 espècies de gamba distribuïdes en quatre llinatges diferents. El subordre Dendrobranchiata amb 68 gèneres i 533 espècies i els infraordres Procarididea amb 2 gèneres i 6 espècies, Stenopodidea amb 12 gèneres i 71 espècies i Caridea amb 389 gèneres i 3488 espècies (**Requadre 4**; de Grave i Fransen 2011). El subordre Dendrobranchiata es distingeix per: a) presència de dendrobrànquies (brànquies amb un eix central que es ramifiquen en dos); b) quela en els tres primers parells de pereïopodis; c) pleura del segon segment abdominal no solapada amb la pleura del primer segment (tret diferencial respecte al subordre Caridea); d) prominents articulacions entre els pleòmers; e) ous fecundats alliberats a l'aigua d'on surten larves *naupli* o *protozoa*; f) petasma en els mascles, i g) pleopodis sense apèndix intern (Tavares i Martin 2010). Actualment aquest subordre comprèn dues superfamílies: la Penaeoidea i la Sergestoidea. La primera superfamília inclou les famílies Aristeidae, Benthesicymidae i Solenoceridae que reuneixen espècies d'aigües profundes, i les Penaeidae i Sicyoniidae que reuneixen espècies del talús continental. La segona superfamília només inclou la família Sergestidae, que engloba tant espècies marines com d'aigües dolces (Tavares i Martin 2010).

La família Aristeidae es caracteritza per la presència de rostre de mida variable sempre acabat en punta (llarg en femelles i juvenils; curt en mascles), un peduncle ocular proveït de tubercle a la part interna, absència d'espines postorbitals, solc cervical que es pot estendre fins a la línia mitja del cefalotòrax, apèndix reproductor masculí originat a partir de l'endopodi del 2n parell de pleopodis el qual no presenta projeccions laterals i telson amb espines mòbils (Fischer *et al.* 1981). Aquesta família inclou l'espècie *A. antennatus*, que com el seu nom comú indica, mostra una coloració rosada-vermellosa, més clara en els exemplars juvenils i més viva i fosca en els adults (**Figura 6**). L'espècie es distingeix per presentar tres dents a la part superior del rostre, el prosartema de l'antènula molt reduït i el cefalotòrax amb carena, sense espina hepàtica i amb solc cervical curt (mai sobrepasant la regió dorsal). Per altra

part, presenta tots els segments abdominals acabats amb una petita espina i a més, el I, II i III no són carenats, mentre que el IV, V i VI sí. Finalment, el telson es caracteritza per ser llarg i fi, comprimit lateralment i acabat en punta (Fischer *et al.* 1981).

Requadre 4.

Classificació biològica d'*Aristeus antennatus* (en gris) segons de Grave i Fransen (2011)

Fílum Arthropoda

Subfílum Crustacea

Classe Malacostraca

Subclasse Eumalacostraca

Superordre Eucarida Calman 1904

Ordre Decapoda

Subordre Pleocyemata Burkenroad 1963

Infraordre Caridea Dana 1852

Infraordre Procarididea Felgenhauer i Abele 1983

Infraordre Stenopodidea Bate 1888

Subordre Dendrobranchiata Bate 1888

Superfamília Sergestoidea Dana 1852

Superfamília Penaeoidea Rafinesque 1815

Família Benthescymidae Wood-Mason i Alcock 1891

Família Penaeidae Rafinesque 1815

Família Sicyoniidae Ortmann 1898

Família Solenoceridae Wood-Mason i Alcock 1891

Família Aristeidae Wood-Mason 1891

Gènere *Aristaeomorpha* Wood-Manson i Alcock 1891

Gènere *Aristaeopsis* Wood-Mason i Alcock 1891

Gènere *Aristeus* Duvernoy 1840

Aristeus alcocki Ramadan 1938

Aristeus antennatus Risso 1816

Aristeus antillensis Milne-Edwards i Bouvier 1909

Aristeus mabahissae Ramadan 1938

Aristeus pallidicauda Komai 1993

Aristeus semidentatus Bate 1881

Aristeus varidens Holthius 1952

Aristeus virilis Bate 1881

Gènere *Austropenaeus* Pérez Farfante i Kensley 1997

Gènere *Hemipenaeus* Bate 1881

Gènere *Hepomadus* Bate 1881

Gènere *Parahepomadus* Crosnier 1978

Gènere *Plesiopenaeus* Bate 1881

Gènere *Pseudoaristeus* Crosnier 1978

BIOLOGIA DE L'ESPÈCIE

Aristeus antennatus és una espècie depredadora oportunista amb una dieta variable en funció de l'estació de l'any i la batimetria. S'alimenta bàsicament d'organismes endobentònics (poliquets, bivalves i crustacis decàpodes que viuen en galeries) tot i que estacionalment i localment es pot alimentar d'organismes epibentònics com els ofiuroides i els amfípodes (Cartes i Sardà 1989).

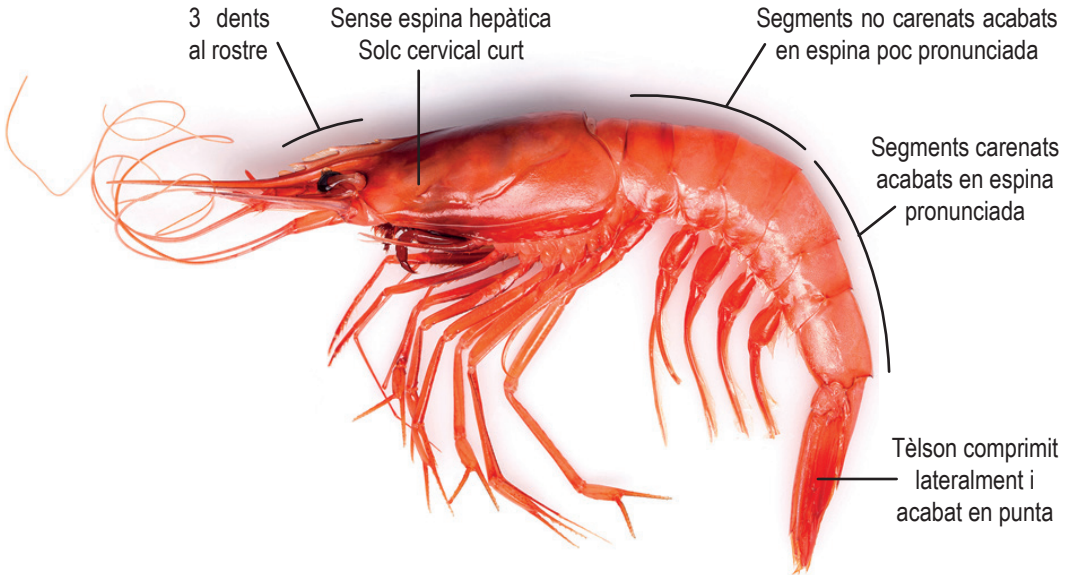


Figura 6. Descripció de les principals característiques morfològiques d'*Aristeus antennatus* segons Fischer *et al.* (1981). Fotografia de Francesc Rabat 2017.

Habita en fons arenosos i fangosos del talús continental associats a canyons, distribuïts a l'oceà Atlàntic oriental (OA), des de Portugal fins a les illes de Cap Verd, a l'oest i est de la mar Mediterrània (OM i EM, respectivament) i a l'oceà Índic, concretament al canal de Moçambic (MOÇ) (Figura 7; Arrobas i Ribeiro-Cascalho 1987; Tobar i Sardà 1987; FAO 2015). El patró de creixement de l'espècie difereix segons sexe i àrea geogràfica essent sempre les femelles de major mida que els mascles (oest de la Mediterrània ♂: Longitud del cefalotòrax (Lc) màx = 54 mm; ♀: Lc màx = 76 mm; Sarà i Demestre 1987) (Cau *et al.* 2002; Deval i Kaporis 2016 i referències incloses). La longevitat de vida de l'espècie està en discussió però podria estar compresa entre els 4 i els 6 anys (Demestre 1990; Demestre i Leonart 1993; Ragonese i Bianchini 1996; Cau *et al.* 2002). És l'espècie mediterrània coneguda amb un rang de distribució batimètrica més ampla oscil·lant dels 80 (Nouar 2001) als 2800 m de profunditat

(Sardà *et al.* 2003b; Sardà i Company 2012). L'abundància d'individus és molt heterogènia al llarg de la columna d'aigua: a profunditats inferiors als 1000 m la densitat mitjana és de més de 1000 individus per km²; en l'estrat de 1000 a 1500 m l'abundància es manté moderada amb > 300 ind/km² i decreix dràsticament a partir dels 1500 m fins a densitats inferiors a 50 ind/km² (Sardà *et al.* 2004a). També hi ha una marcada segregació batimètrica per sexes i talles on les



Figura 7. Distribució geogràfica mundial d'*Aristeus antennatus*. Est de l'oceà Atlàntic: del sud de Portugal a l'illa de Cap Verd (Holthuis 1980); la mar Mediterrània (Holthuis 1980); oest de l'oceà Atlàntic: províncies de Bahia i Espírito Santo a Brasil (Serejo *et al.* 2007); oest de l'oceà Índic: illes Maldives a Zanzíbar, Bazaruto a Moçambic i Natal a Sud-àfrica (de Freitas 1985).

femelles adultes habiten a profunditats inferiors als 1000 m, mentre que els mascles ho fan a les capes més profundes (Sardà *et al.* 2004a). No obstant, durant l'època d'aparellament (de finals de primavera a principis d'estiu) es formen agrupacions reproductores a profunditats entre 600 i 800 m amb una proporció de mascles inferior al 40% al OM i 50% al EM, que augmenta fins a arribar a una *ratio* de sexes 1:1 als 1000 m de profunditat (Sardà *et al.* 1994; Sardà *et al.* 2003a; Sardà *et al.* 2004a i referències incloses; Deval i Kapiris 2016). Un cop transcorregut l'aparellament, l'agrupació es dispersa i els mascles retornen a les profunditats mentre les femelles romanen al talús superior (Sardà *et al.* 1994; Sardà *et al.* 1997). La talla dels individus determina també la dinàmica poblacional al llarg de la columna d'aigua. L'eclosió

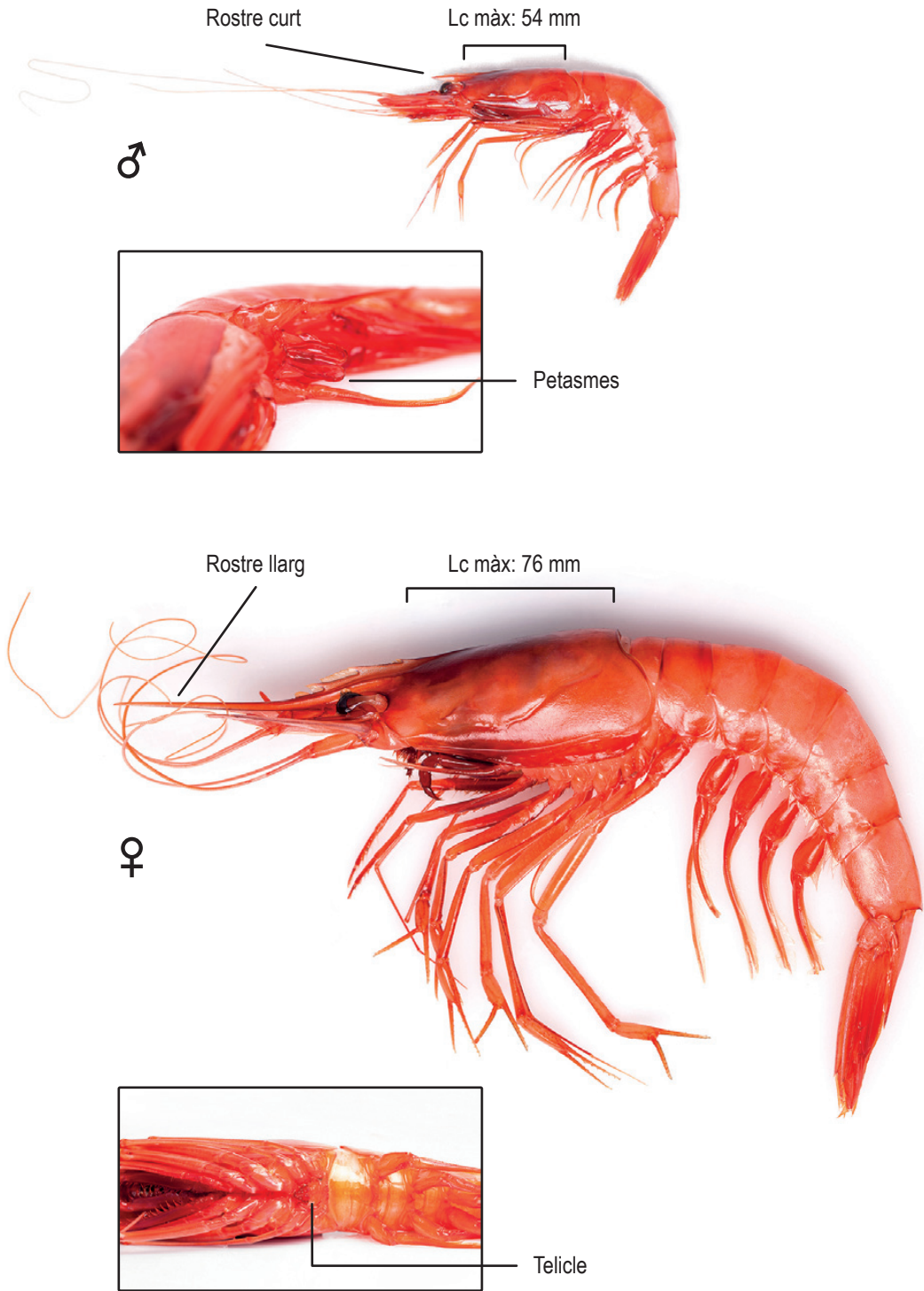


Figura 8. Dimorfisme sexual en *Aristeus antennatus*. A la part superior s'observa un mascle tipus amb el detall dels apèndixs reproductors anomenats petasmes. A la part inferior es mostra una femella tipus amb el detall de l'estructura reproductora anomenada telicle. Lc màx: longitud màxima del cefalotòrax segons Sardà i Demestre (1987). Fotografia de Francesc Rabat 2017.

dels ous entre els 600 i els 1000 m de profunditat (juny-agost) marca l'inici d'una migració ontogènica dels primers estadis larvaris cap a la superfície on l'abundància d'aliment propicia la continuació del seu desenvolupament larvari (Carbonell *et al.* 2010). En etapa de juvenil primerenc ($L_c \leq 15$ mm), els individus realitzen una segona migració ontogènica cap a les profunditats (entre 1050 i 1500 m) per assolir l'etapa de juvenil ($15 \text{ mm} < L_c \leq 20$ mm) i dispersar-se per les aigües profundes (entre 1200 i 2800 m). Posteriorment, una tercera migració cap a capes més superficials (400-900 m) marcarà l'inici de l'etapa de preadult ($20 \text{ mm} < L_c \leq 28$ mm) (Sardà i Cartes 1997; Cartes i Demestre 2003; Sardà *et al.* 2003b; Sardà i Company 2012).

A. antennatus és una espècie gonocòrica amb clar dimorfisme sexual; els mascles són més petits que les femelles i presenten rostre curt a l'arribar a la maduresa sexual (**Figura 8**; Sardà i Demestre 1987; Sardà i Demestre 1989; Demestre 1990; Demestre i Fortuño 1992). La maduresa gonadal varia segons el sexe; mentre que els mascles són fèrtils durant tot l'any, les femelles presenten fertilitat estacional, assolint la màxima capacitat reproductora de maig a agost a la Mediterrània occidental i de juny a setembre a la Mediterrània oriental (Sardà i Demestre 1987; Deval i Kaporis 2016). La impossibilitat de mantenir i reproduir l'espècie en captivitat, juntament amb les limitacions per observar la còpula en el medi natural fan que el sistema d'aparellament d'*A. antennatus* sigui fins avui desconegut. Durant l'aparellament, el mascle transfereix l'espermatozoid a la femella utilitzant els petasmes i aquest és fixat al telicle (cavitat quadrangular envoltada d'espines i cetes adjacent al gonòpor femení, entre l'esternita XIII i XIV del cefalotòrax) (**Figura 8**; Demestre i Fortuño 1992). L'espècie no presenta receptacle seminal i això comporta una elevada complexitat morfològica de l'espermatozoid el qual està format per 5 capes de material acel·lular que embolcallen i protegeixen l'esperma aflagel·lat i immòbil fins al moment de la fecundació (**Figura 9**; Orsi Relini i Tunesi 1987). Cada espermatozoid està constituït per dos hemiespermatozoides que s'uneixen íntimament en el moment de la deposició (Orsi Relini i Tunesi 1987; Demestre i Fortuño 1992; Demestre *et al.* 1997). L'espermatozoid té una part externa, en contacte amb el medi aquàtic, on s'hi troben les capes de protecció més rígides o ales i una capa interna, en contacte amb els gonòpors femenins, on hi ha la massa espermàtica i les capes de protecció mucilaginoses (Orsi Relini i Tunesi 1987). Observant

l'espermatòfor des d'una vista frontal respecte a la femella, a la part superior, s'identifiquen clarament dues protuberàncies arrodonides on hi ha la massa espermàtica (**Figura 9**). A partir del mes de juny, la majoria de femelles sustenten un espermatòfor al telicle però n'hi ha algunes que en porten dos o fins i tot tres, els quals, romanen fixats fins al moment de la fecundació. De quants mascles diferents provenen aquests múltiples espermatòfors és fins avui una incògnita. L'elevada fecunditat anual de les femelles (600.000 oòcits/femella a la Mediterrània nord-occidental i 598.584 oòcits/femella a la mar Jònica; Demestre 1990, 1995; Kapiris i Thessalou-Legaki 2006, respectivament) genera discrepàncies en el nombre de postes anuals. Sardà i Demestre (1987), Demestre (1995) i Kapiris Thessalou-Legaki (2006) suggereixen que hi podrien haver de dues a quatre postes per període reproductor en funció del nombre de mudes i talla. Per contra, Carbonell *et al.* (2006) proposen que només hi hauria una sola posta anual i que la deposició de l'espermatòfor en la femella estimularia la maduració ovàrica. El desenvolupament larvari de l'espècie és, fins a dia d'avui una gran incògnita. El cicle larvari va ser descrit morfològicament per primera vegada per Heldt (1938, 1954, 1955), qui va classificar les larves d'*A. antennatus* en quatre gran estadis: *nauplis*, *zoea*, *mysis* i postlarva. Des de llavors, s'han trobat poques larves putatives de l'espècie i totes elles en les capes superficials de la columna d'aigua (*Protozoa II*: Dos Santos 1998, Carbonell *et al.* 2010, Torres *et al.* 2013; *Protozoa III*: Carbonell *et al.* 2010; *Zoea I*: Carbonell *et al.* 2010; *Mysis II*: Torres *et al.* 2013).

PESQUERIA

Els països costers a la mar Mediterrània tenen una llarga història vinculada a l'explotació del mar. La pesca d'*Aristeus antennatus* s'inicià els anys 1930s al mar Lìgur i s'estengué durant les següents dècades a altres zones de la Mediterrània nord-occidental, al mar d'Alboran, al canal de Moçambic i a la costa portuguesa (Fiorentino *et al.* 1998; Fiorentino 2000; Sardà *et al.* 2004b; Van der Elst i Everett 2015). Durant els anys 80s es detectà el primer col·lapse de l'estoc al mar Lìgur, que provocà una profunda davallada en les captures durant pràcticament una dècada (Fiorentino *et al.* 1998). L'any 1994, l'estoc d'*A. antennatus* de la costa de Portugal també es va col·lapsar, després de diversos anys de pesca intensiva (Figueiredo *et al.* 2001).

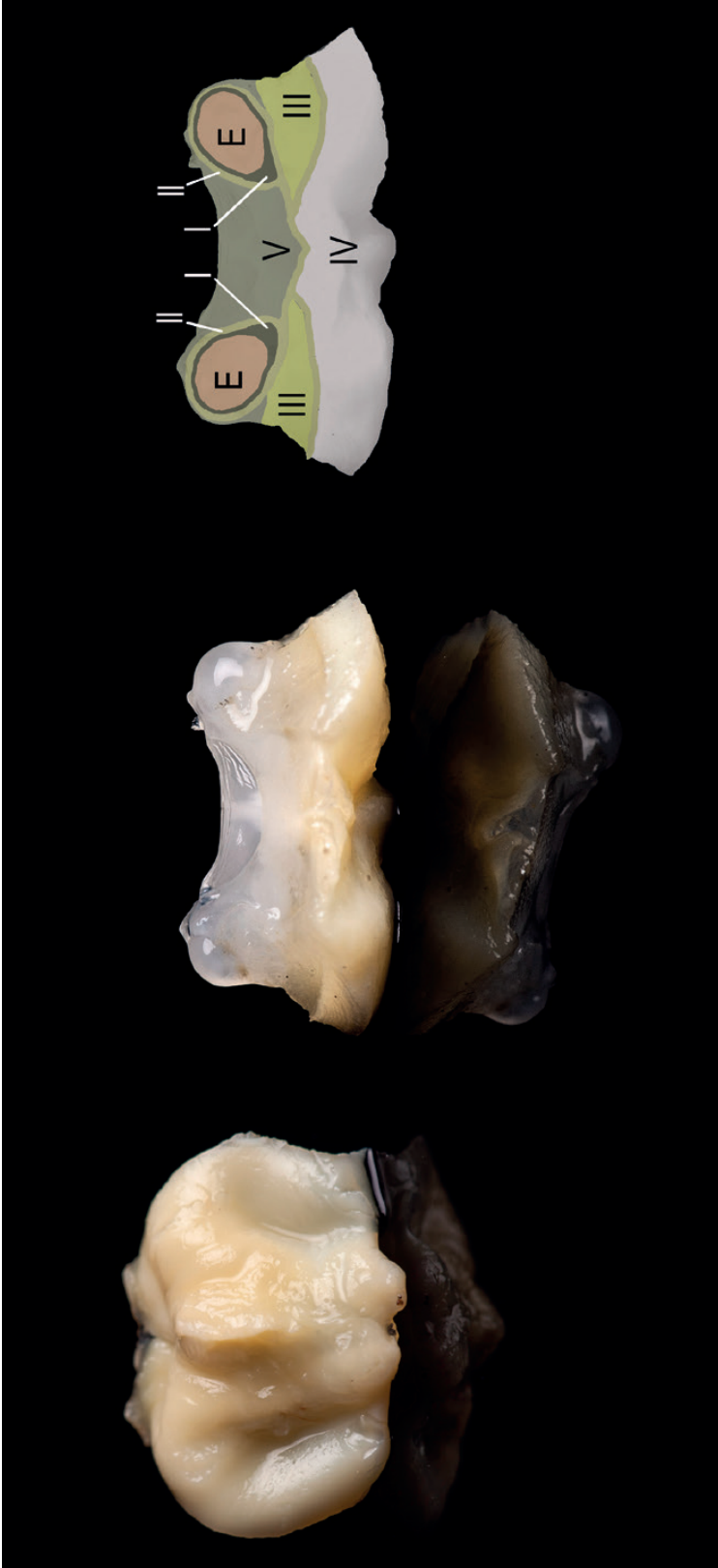


Figura 9. Espermatòfor d'*Aristeus antennatus*. D'esquerra a dreta: fotografia de la cara externa, fotografia de la vista frontal en relació a la femella i esquema de la secció sagital de la vista anterior on s'observen les diferents capes identificades per Orsi Relini i Tunesi (1987). Els números I, II, III, IV i V són capes acetil·lulars, mentre que la capa E conté la massa espermàtica. Fotografia de Francesc Rabat 2017.

L'any 1952 la *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) va crear la *General Fisheries Commission for the Mediterranean* (GFCM) per tal de conservar i explotar de forma sostenible els recursos marins, així com desenvolupar de forma responsable l'aqüicultura a la mar Mediterrània i la mar Negra, incloent també les aigües que els connecten (FAO *Statistical Area 37*). Així, la mar Mediterrània va ser dividida en sub-àrees geogràfiques (GSAs) per a una avaluació regional dels recursos (**Figura 10**; Bensch *et al.* 2009; GFCM Resolution 2009). El grup de treball d'espècies de profunditat de la GFCM ha dut a terme diverses avaluacions dels estocs d'*A. antennatus* de les GSA 1, 5, 6 i 9 i en totes elles l'estoc s'ha considerat sobreexplotat en la majoria d'anys avaluats (GFCM SAF 2007, 2008, 2009, 2010, 2011a, 2011b, 2011c, 2012a, 2012b, 2014a, 2014b, 2014c, 2014d, 2016a, 2016b, 2016c i 2016d). En conseqüència, el comitè científic de la GFCM ha aconsellat una reducció progressiva de l'esforç pesquer i una reducció en la mortalitat de pesca per evitar el col·lapse del recurs (GFCM 2016). Ja l'any 2005, el SAC (*Scientific Advisory Committee on Fisheries* de la GFCM) suggeria que es desenvolupessin plans de regulació de les pesqueries de fons a totes aquelles àrees geogràfiques amb espècies prioritàries sobreexplotades, com és el cas d'*A. antennatus* (Bensch *et al.* 2009). No obstant, a dia d'avui, només se n'ha desenvolupat un a l'estret de Sicília específic per a la gamba *Parapenaeus longirostris* (GFCM Recommendation 2015) i se'n preveu un altre, a curt termini, per a les gambes vermelles (*Aristaeomorpha foliacea* i *A. antennatus*) a la Mediterrània oriental (GFCM 2016).

A Catalunya, *A. antennatus* és pescada exclusivament a profunditats compreses entre els 300 i els 900 m, on els agrupaments de femelles madures a finals de primavera i principis d'estiu (entre 600 i 800 m) així com de preadults a la tardor i l'hivern (entre 500 i 600 m) proporcionen uns ingressos anuals estables per a la pesqueria monoespecífica (Gorelli *et al.* 2014). Donada la seva importància gastronòmica a la Mediterrània occidental, la gamba pot assolir preus de mercat que ronden els 200 €/Kg durant períodes nadalencs o de vacances (Guillen i Maynou 2015; Gorelli *et al.* 2016). De fet, és el principal motor econòmic de moltes confraries catalanes aportant de mitjana el 22% dels beneficis nets anuals tot i representar només el 3% de les captures totals en pes (Estadística Oficial de Pesca de la Generalitat de Catalunya 2016). L'exemple més rellevant és la Confraria de Palamós, on l'espècie va representar el

27% dels desembarcaments en pes i el 56% dels ingressos totals l'any 2015 (Figura 11; Castaño 2016). La Confraria de Palamós des de l'any 2007 ha impulsat la Marca de Garantia Gamba de Palamós, d'acord amb la *Ley 17/2001 de 7 diciembre de Marcas* (BOE núm. 294 de 7 de diciembre de 2001) amb l'objectiu d'assegurar la traçabilitat del producte, augmentar la confiança del consumidor, incrementar el valor de la gamba i protegir-ne el recurs. L'any 2013 es va implementar un pla de gestió local per a la Gamba de Palamós (Orden AAA/923/2013, BOE 2013) de forma conjunta entre la Confraria de Pescadors de Palamós, la Direcció General de Pesca i Afers Marítims (DGPAM), la *Secretaria General de Pesca del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente* (SGP) i el Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC). El pla estipula, entre d'altres restriccions que la xarxa d'arrossegament ha de tenir una malla quadrada mínima de 40 mm, amb filaments que no superin els 3 mm de diàmetre; l'esforç pesquer ha de ser de 5 dies la setmana i un màxim d'11,5 hores al dia; cap embarcació pot fer més de dos arrossegaments per zona de pesca i dia (de les 7 zones definides); s'especifica una veda de pesca durant 60 dies l'any repartida de la forma següent: 39 dies a partir del 6 de gener, 7 dies a partir de la segona setmana de març i 14 dies corresponents a la primera i tercera setmana de març. A més, també hi ha el compromís de reduir la flota en un 20% a finals del 2017 i la prohibició d'augmentar la potència dels equipaments a més de 500 cavalls (BOE 2013). Les anàlisis preliminars publicades per Gorelli *et al.* 2014 indiquen que la nova mida i forma de les xarxes és més selectiva a l'hora d'evitar capturar les talles petites i no afecta la captura dels individus de mida gran. Estudis similars realitzats amb la mateixa espècie en altres localitats de la Mediterrània occidental (OM) i oriental (EM) han arribat també a les mateixes conclusions (Samy-Kamal *et al.* 2015; Deval *et al.* 2015, respectivament). Tanmateix, calen els resultats definitius dels 5 anys d'estudi per a validar que el pla local de gestió té una conseqüència directe en l'augment de la talla mínima dels individus capturats i l'augment de les CPUEs (captures per unitat d'esforç). Actualment, la gamba pescada a Palamós (GSA6), està sent avaluada dins el projecte *Medfish*, coordinat per la *World Wild Foundation* (WWF) i el *Marine Stewardship Council* (MSC). Aquest projecte de 24 mesos de durada, inicialment ha analitzat 100 pesqueries d'entre Espanya i França, de les quals 14 estan essent preavaluades; una d'elles és *A. antennatus* pescada a la Confraria de Palamós. Utilitzant els estàndards MSC per a la pesca sostenible, s'ha realitzat

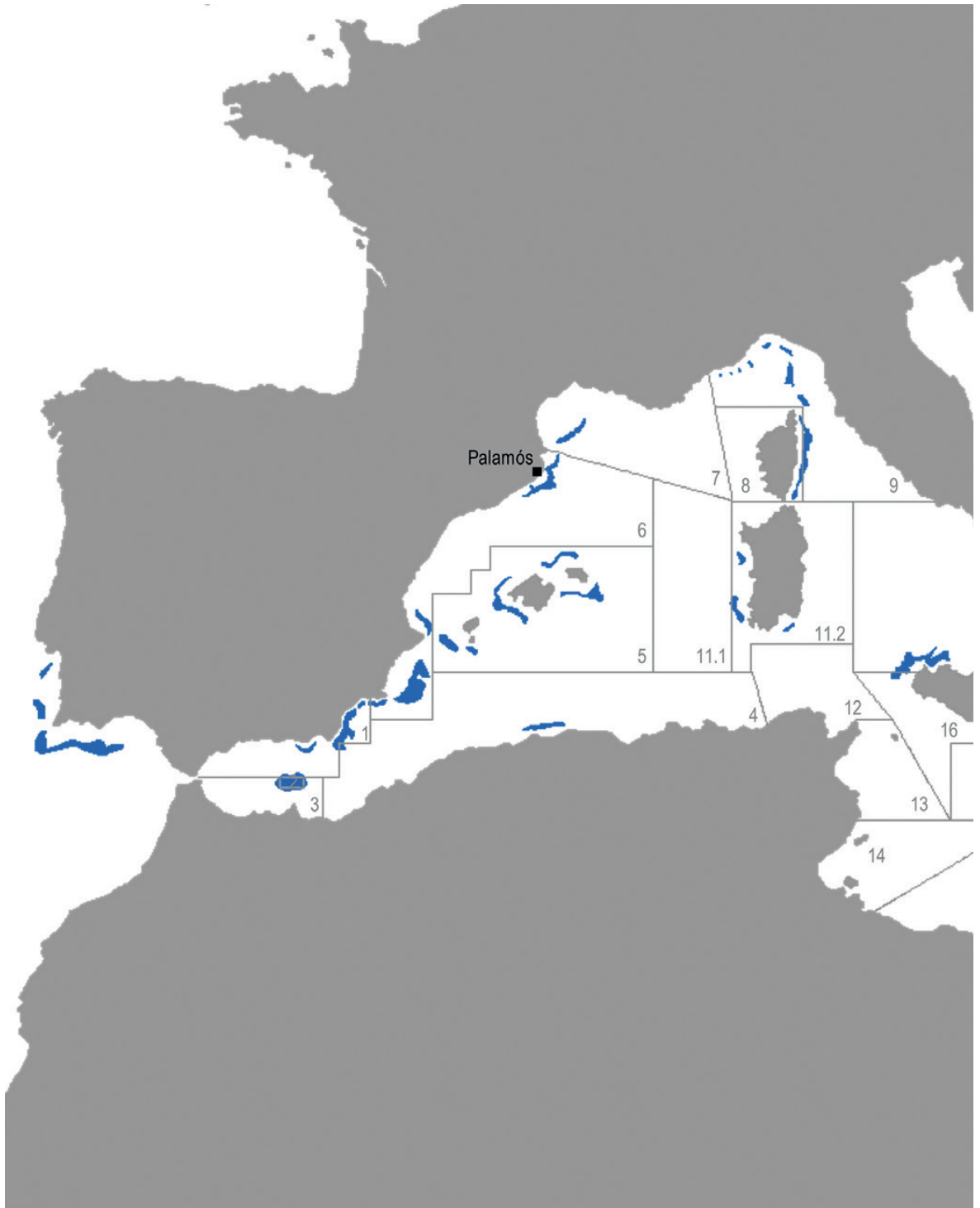
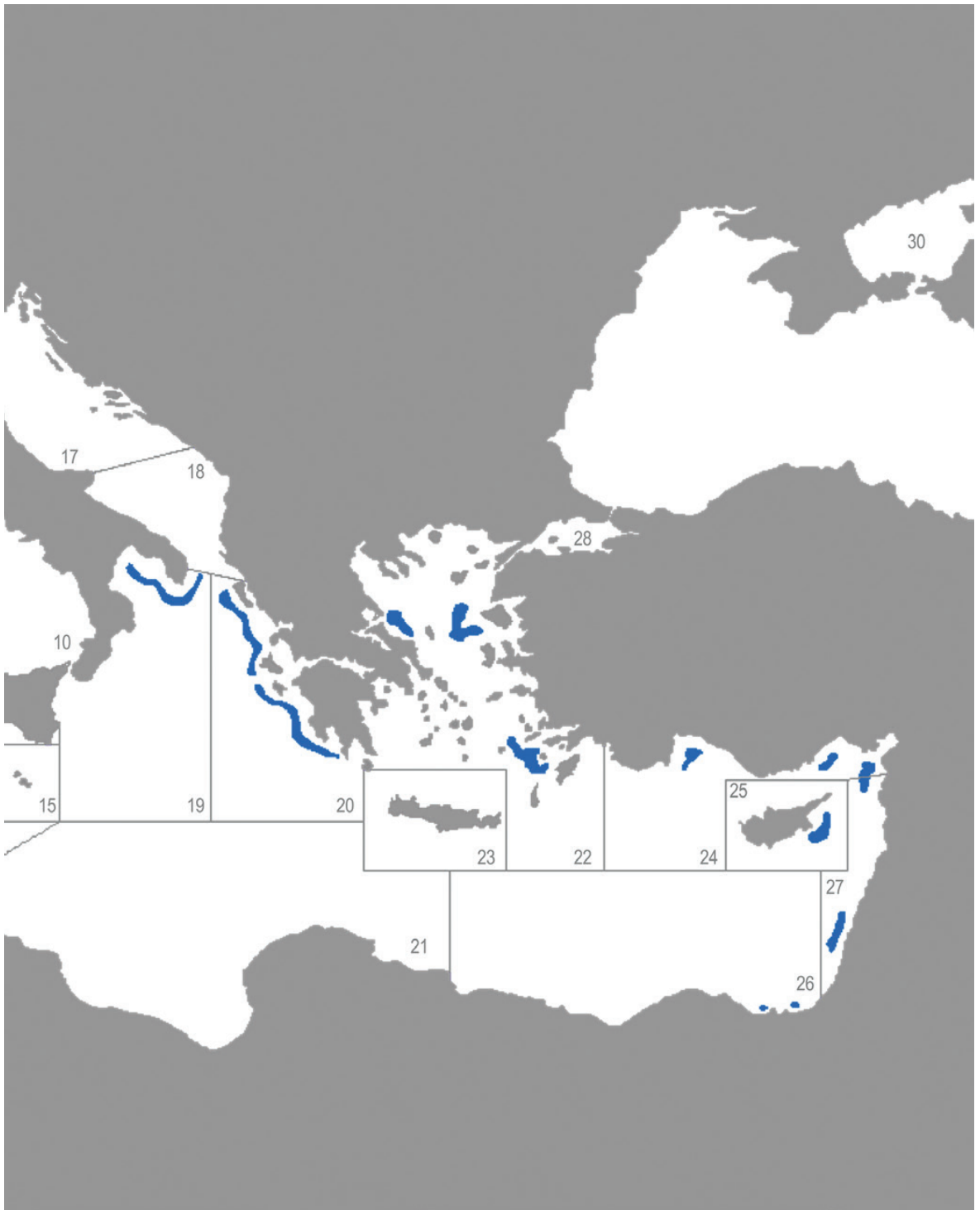


Figura 10. Principals àrees de pesca d'*Aristeus antennatus* (blau) i les sub-àrees geogràfiques (1-30) de la mar Mediterrània i la mar Negra definides per la GFCM (Arrobas i Ribeiro-Cascalho 1987; Fiorentino *et al.* 1998; García-Roriguez i Esteban 1999; Sardà 2000; Papaconstantinou i Kaporis 2001; EC 2004; D'Onghia *et al.* 2005; Massutí i Reñones 2005; Özcan *et al.* 2009; Palmas *et al.* 2015; Silva *et al.* 2015; Farrag 2016; Russo *et al.* 2017).



una preavaluació exhaustiva de la població objectiu, l'ecosistema i la gestió (publicada a novembre de 2016) per tal impulsar millores en la gestió, corregir les deficiències detectades i orientar la pesqueria cap a la sostenibilitat del recurs. La preavaluació conclou que la Confraria de Palamós actualment no superaria el procés d'avaluació complet MSC per tal d'aconseguir l'acreditació MSC de qualitat, però té un elevat potencial de millora per assolir-lo durant els següents anys si es compleixen les mesures que es proposaran a partir de setembre de 2017 (Castaño 2016).

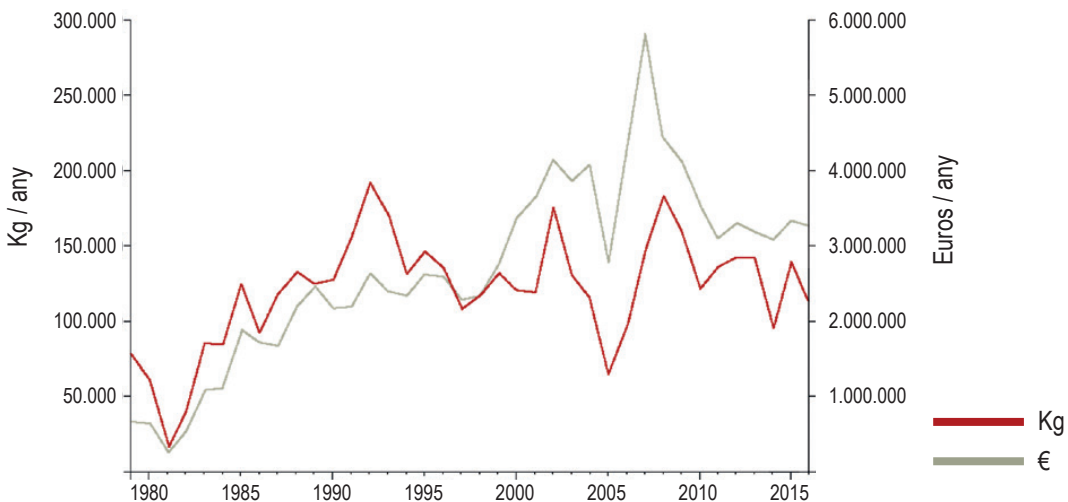


Figura 11. Evolució del pes i el valor d'*Aristeus antennatus* capturada a Palamós durant els anys 1979-2016 segons la Confraria de Pescadors de Palamós (2017).

ESTUDIS GENÈTICS EN L'ESPÈCIE

Estudis genètics previs en *Aristeus antennatus* han permès resoldre qüestions fonamentals relacionades amb la identificació d'estocs i la filogeografia de l'espècie. Sardà *et al.* (1998), analitzant dades morfològiques i genètiques va publicar el primer estudi amb l'objectiu d'identificar poblacions diferents al llarg de la Mediterrània i aigües atlàntiques adjacents (**Taula 3; Figura 12**). Una dècada més tard, diversos autors s'endinsaren en l'estudi de l'estructura poblacional de l'espècie a diferents nivells geogràfics utilitzant marcadors mitocondrials i nuclears (**Taula 3; Figura 12; Maggio *et al.* 2009; Roldán *et al.* 2009; Fernández *et al.* 2011; Cannas *et al.* 2012b; Lo Brutto *et al.* 2012; Marra *et al.* 2015**). Paral·lelament, Sardà *et al.* (2010), amb l'objectiu d'avaluar el flux gènic existent a nivell batimètric van analitzar individus a 4 profunditats de la columna d'aigua. Més recentment, Fernández *et al.* (2013b) determinà la filogeografia de l'espècie analitzant un gen mitocondrial i gens nuclears (**Taula 3**).

Taula 3. Estudis genètics en *Aristeus antennatus*. COI: citocrom C oxidasa subunitat I; AFLP: amplified fragment length polymorphism; PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase; NaK: sodium-potassium ATPase α -subunit.

Objectiu	Article	Marçador	Regions analitzades	Nombre de localitats	
Estructura poblacional geogràfica	Sardà <i>et al.</i> 1998	2 loci enzimàtics	oest de la Mediterrània	7	
			Mediterrània central	1	
			est de la Mediterrània	1	
			oceà Atlàntic	2	
Estructura poblacional batimètrica	Roldán <i>et al.</i> 2009	COI (514 pb) i 16S rDNA (547 pb)	oest de la Mediterrània	3	
			Maggio <i>et al.</i> 2009	regió control (369 pb)	6
			Fernández <i>et al.</i> 2011	oest de la Mediterrània	7
				est de la Mediterrània	1
Filogeografia	Fernández <i>et al.</i> 2013b	COI (514 pb), PEPCK, NaK	oest de la Mediterrània	1	
			est de la Mediterrània	1	
			oceà Atlàntic	1	
			canal de Moçambic	1	
Estructura poblacional batimètrica	Cannas <i>et al.</i> 2012b	8 loci microsatèl·lits	oest de la Mediterrània	9	
			Lo Brutto <i>et al.</i> 2012	145 loci AFLPs i regió control (369 pb)	6
	Marra <i>et al.</i> 2015	COI (514 pb) i 16S rDNA (546 pb)	Mediterrània central	2	
			oceà Atlàntic	1	
	Sardà <i>et al.</i> 2010	16S rDNA (547 pb)	Mediterrània central	10	
			oest de la Mediterrània (350, 700, 1100 i 1500 m de profunditat)	1	

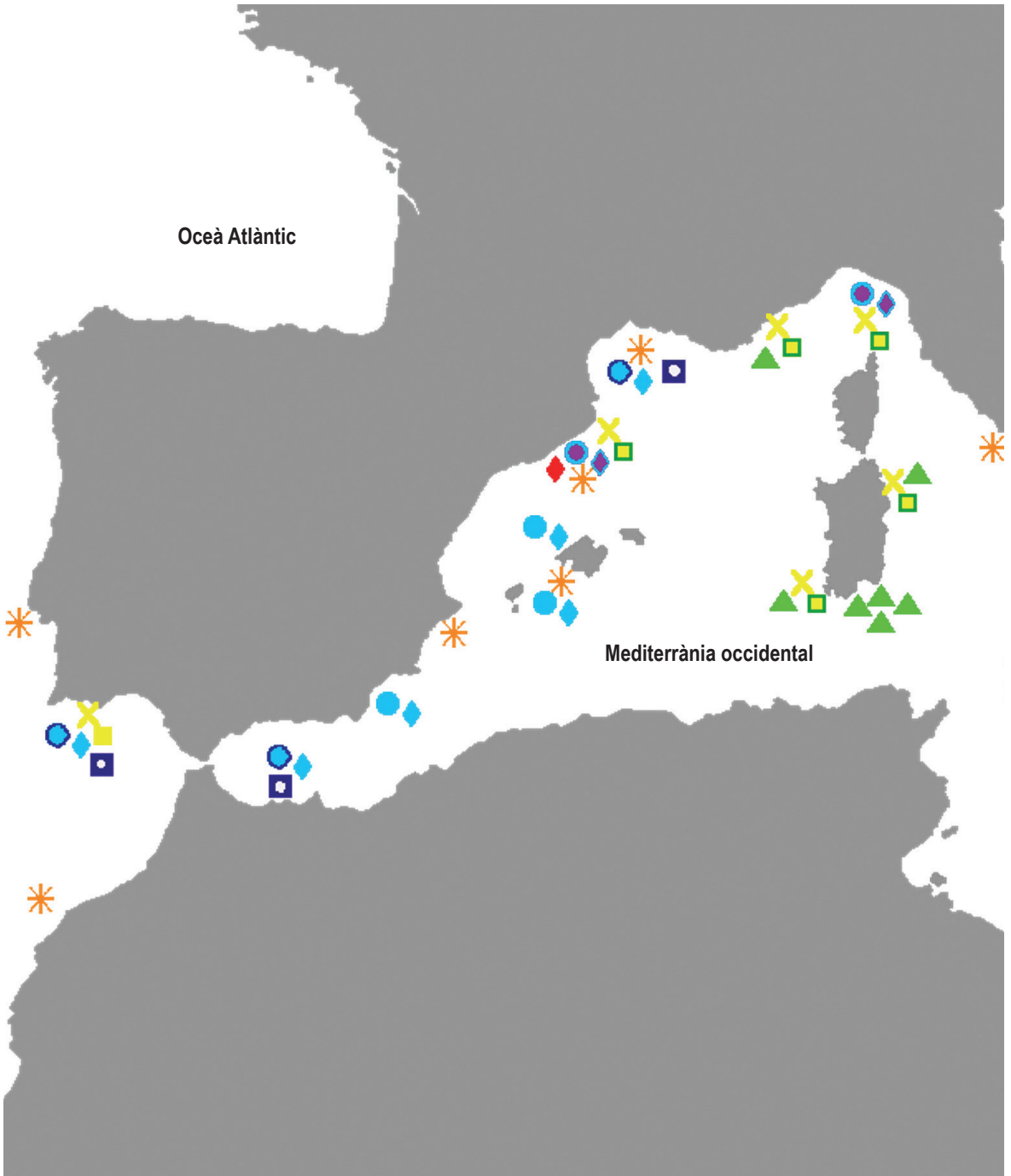
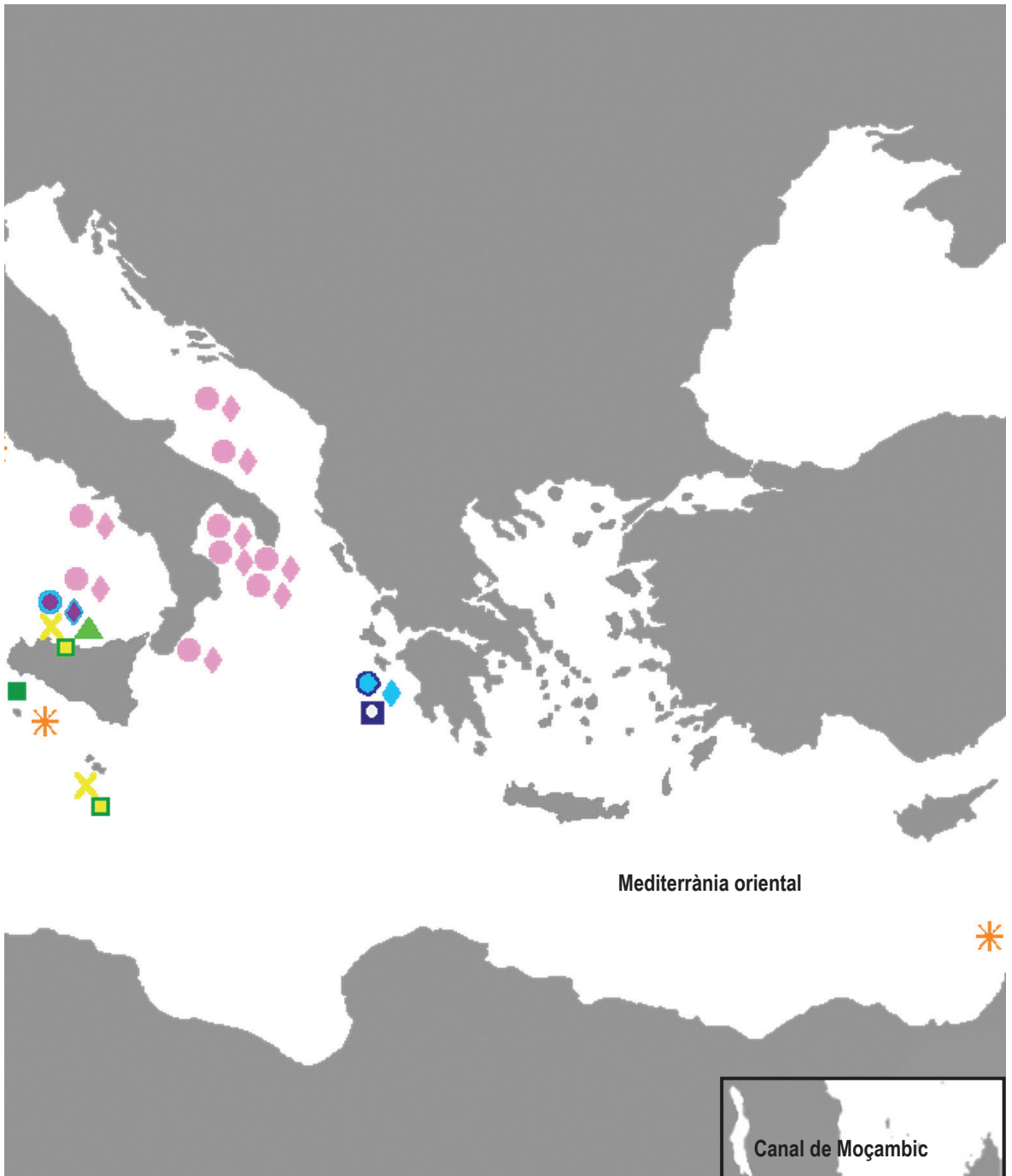


Figura 12. Marcadors moleculars utilitzats prèviament i localitats analitzades en *Aristeus antennatus*.

- | | |
|--------------------------------|---------------------------------|
| — Sardà <i>et al.</i> 1998 | — Cannas <i>et al.</i> 2012b |
| — Maggio <i>et al.</i> 2009 | — Lo Brutto <i>et al.</i> 2012 |
| — Roldán <i>et al.</i> 2009 | — Fernández <i>et al.</i> 2013b |
| — Sardà <i>et al.</i> 2010 | — Marra <i>et al.</i> 2015 |
| — Fernández <i>et al.</i> 2011 | |



El símbol correspon al marcador molecular analitzat en cada estudi:

- | | |
|--|-------------------|
| * Alozimes | X AFLP |
| ■ Regió control | ▲ Microsatèl·lits |
| ● Citocrom C oxidasa subunitat I (COI) | ◻ PEPCK i NaK |
| ◆ 16S _r DNA | |



OBJECTIUS

OBJECTIUS

Els estudis genètics previs en la gamba rosada, *Aristeus antennatus*, s'han centrat fonamentalment en determinar la filogènia i l'estructura poblacional de l'espècie tant a nivell geogràfic com batimètric. Les dades genètiques poden aportar també informació molt valuosa per a comprendre el comportament reproductor i els patrons de dispersió de l'espècie. El propòsit d'aquest treball és doncs comprendre la dinàmica reproductiva d'*A. antennatus* a partir d'eines genètiques moleculars desenvolupades per a tal fi. Aquest objectiu global, s'ha desglossat en els següents objectius concrets:

- 1** • Desenvolupar i caracteritzar loci microsatèl·lits polimòrfics útils per a anàlisis poblacionals a baixa escala geogràfica.
 - a) Identificar loci microsatèl·lits partint dels amplicons obtinguts per NGS (454 de Roche).
 - b) Validar els loci microsatèl·lits putatius en individus de tot el rang de distribució geogràfic de l'espècie.
 - c) Analitzar la diversitat genètica en individus de la Mediterrània nord-occidental a partir dels loci polimòrfics detectats.

- 2** • Desenvolupar un protocol d'extracció de DNA diferencial per aïllar selectivament el material genètic del mascle de dins l'espermatozòid dipositat sobre el telicle de la femella.

- 3** • Inferir la dinàmica reproductiva d'*A. antennatus* al canyó de Palamós.
 - a) Calcular la taxa d'aparellaments múltiples.
 - b) Determinar l'origen dels múltiples espermatozòids units al telicle d'algunes femelles.
 - c) Identificar l'existència o no de selecció de parella.
 - d) Conèixer els patrons de dispersió segons sexes.

MATERIAL I MÈTODES

MATERIAL I MÈTODES

Els objectius d'aquesta tesi estan subdividits en tres capítols cadascun dels quals conté una secció dedicada exclusivament a la metodologia. Tanmateix, en aquest apartat es fa una síntesi dels procediments globals realitzats.

MATERIAL BIOLÒGIC

S'han processat un total de 228 individus adults de gamba rosada, *Aristeus antennatus*, procedents majoritàriament de la Mediterrània nord-occidental (OM) però també i en menor mesura, de la Mediterrània oriental (EM), l'oceà Atlàntic (OA) i el canal de Moçambic (MOÇ) a l'oceà Índic. A més, s'han analitzat 81 espermatòfors procedents de Palamós.

La procedència de les mostres, l'any de captura, el nombre d'individus analitzats, el sexe i en quin capítol han estat utilitzats es resumeix a la **Taula 4**. Les mostres de Faro (OA) i Blanes (OM) van ser obtingudes de pescadors locals el dia de la seva captura, mentre que les mostres de la mar Jònica (37° 37' N, 21° 03' E) i del canal de Moçambic (17° 32' S, 38° 29' E) van ser recol·lectades durant les campanyes MEDITS08 i MOZ0308 del *Instituto Español de Oceanografía* (IEO), respectivament. Altrament, els exemplars de Palamós van ser capturats al calador de pesca de Sant Sebastià (41° 52' N, 03° 23' E) per l'embarcació pesquera Nova Gasela i seleccionats a bord de la mateixa embarcació.

Tots els individus utilitzats es transportaren al laboratori amb gel. Un cop al laboratori, es van separar i individualitzar els espermatòfors de les femelles i es van congelar en sec. Posteriorment, s'individualitzà el teixit muscular abdominal de cadascun dels individus en etanol 95% per a la seva conservació i emmagatzematge. Actualment, aquestes mostres es troben dipositades a la col·lecció de teixits del Laboratori d'Ictiologia Genètica (LIG) de la Universitat de Girona.

EXTRACCIÓ DE DNA

L'extracció de DNA de les mostres s'ha dut a terme utilitzant dos protocols diferents segons la naturalesa de les mateixes, adults versus espermatòfors. En el cas dels individus adults es van incubar 10 mg de teixit muscular a 37°C durant 2 h amb 600 µl de tampó TENS (50 mM Tris a pH 8; 100 mM EDTA a pH 8, 100 mM NaCl₂ i 2% sodi dodecil sulfat) per a lisar les cèl·lules i 40 µl (20 mg/ml) de proteïnasa K per digerir les proteïnes i evitar l'acció de les DNases que podrien digerir el DNA. El DNA genòmic es va aïllar i purificar seguint el protocol del fenol:cloroform:alcohol isoamílic descrit per Sambrook *et al.* (1989) afegint un

Taula 4. Mostreig realitzat en *Aristeus antennatus*. Es detalla el capítol, la localitat, l'any de mostreig, el nombre d'exemplars adults i/o espermatòfors (NA i NEsp, respectivament), el sexe dels individus adults i el protocol d'extracció dels espermatòfors. ND: no disponible; Esp: espermatòfors.

Capítol	Localitat	Any	NA	Sexe	NE	Protocol d'extracció espermatòfors
Capítol 1: Development and characterization of novel microsatellite markers by Next generation sequencing for the blue and red shrimp <i>Aristeus antennatus</i>	Blanes (OM)	2010	26	ND	-	-
	mar Jònica (EM)	2008	3	ND	-	-
	Faro (OA)	2007	4	ND	-	-
	canal de Moçambic (MOÇ)	2008	3	ND	-	-
Capítol 2: An optimized high quality male DNA extraction from spermatophores in open thelycum shrimp species	Palamós (OM)	2013	20	♀	20	10 Esp. protocol Sambrook et al. 1989 10 Esp. protocol Planella et al. 2017
Capítol 3: Inferring the mating system and mate choice of the blue and red shrimp, <i>Aristeus antennatus</i>	Palamós (OM)	2015	52	♀	61	61 Esp. protocol Planella et al. 2017
			59	♂		

segon cicle de rentat amb etanol al 70% a -20°C per a una millor purificació. En el cas dels espermatòfors, el protocol emprat s'ha desenvolupat dins el marc dels objectius generals d'aquesta tesi doctoral i, per tant, està explícitament detallat al Capítol 2 dels resultats.

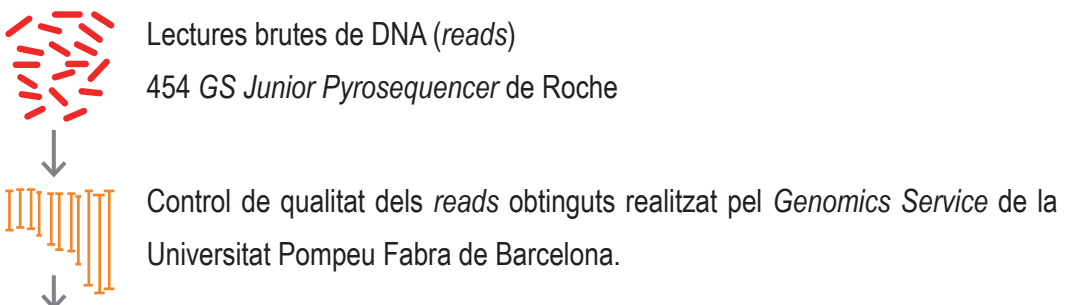
La qualitat i integritat del DNA resultant, aplicant els dos protocols d'extracció, fou comprovada mitjançant electroforesi en gel d'agarosa a l'1% on s'hi agregà GelRed™ 10.000X (Biotium) o bromur d'etidi (0,5 mg/ml) per a visualitzar les bandes de DNA amb el transil·luminador de llum ultraviolada. La concentració de les extraccions es mesurà amb l'espectrofotòmetre NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) i posteriorment, les mostres es van diluir fins a obtenir alíquotes de 30-50 ng/ μl de concentració de DNA.

LOCI MICROSATÈL·LITS

En aquest apartat es detallen aspectes metodològics no aprofundits en els capítols d'aquesta tesi doctoral. Per una part, aquests aspectes metodològics fan referència al desenvolupat i la identificació de nous marcadors moleculars mitjançant NGS. Per altra part, també s'especifiquen detalls de la validació dels loci microsatèl·lits desenvolupats així com del muntatge de les tres PCRs *multiplex*.

DESENVOLUPAMENT I IDENTIFICACIÓ DE LOCI MICROSATÈL·LITS

A partir dels fragments (*reads*) obtinguts de la seqüenciació massiva utilitzant el 454 GS *Junior Pyrosequencer* de Roche, es va realitzar l'assemblatge dels mateixos per les zones solapades sense utilitzar cap genoma de referència (*de novo*), generant així seqüències més llargues (*contigs*) sobre les quals identificar els loci microsatèl·lits. El procés es descriu en l'esquema de continuació:





Assemblar el genoma: Algorisme OLC (*overlap-layout-consensus* o solapament-composició-consens).

Programa: GS DE NOVO ASSEMBLER inclòs dins de NEWBLER (454 de Roche Life Sciences 2006-2012; Roche, Bramfort, CT, EUA).

Fases: _____

a) buscar solapaments mitjançant la comparació de lectures per parelles totes contra totes. El *software* precalcula el contingut de *k-mers* de tots els *reads*, selecciona candidats solapats que comparteixen *k-mers* i computa els possibles alineaments. La detecció de solapaments és sensible a la mida dels *k-mers*, la longitud mínima de solapament i al percentatge mínim d'identitat dels solapaments.

b) construcció i manipulació d'un gràfic de solapament el qual no té perquè incloure totes les seqüències.

c) construcció d'una seqüència consens (*contig*) mitjançant l'alineament múltiple de les lectures (Miller *et al.* 2010).



Avaluació de l'assemblatge.

Programa: GS DE NOVO ASSEMBLER inclòs dins de NEWBLER (454 de Roche Life Sciences 2006-2012; Roche, Bramfort, CT, EUA). Eines:

Llargada d'N50: determinar la llargada mínima que tenen el 50% dels *contigs* generats (El-Metwally *et al.* 2013).

GAGAGA
TACTAC
ATATAT
GAGTGAG

Identificació de seqüències repetides. Programa: TANDEM REPEATS FINDER (Benson 1999).

L'algorisme utilitza una finestra lliscant per buscar nucleòtids iguals separats per una determinada distància (detecta un motiu de repetició que es va reiterant). Si hi ha



un aparellament total o parcial entre els nucleòtids d'aquestes còpies (*k-tuple*: nombre de nucleòtids que han de ser iguals entre còpies) la seqüència és indexada i posteriorment filtrada d'acord amb criteris estadístics (longitud de la seqüència, probabilitat d'aparellament o probabilitat d'*indels*) i d'altres paràmetres introduïts com la mida de la regió flanquejant.



Disseny de *primers*.

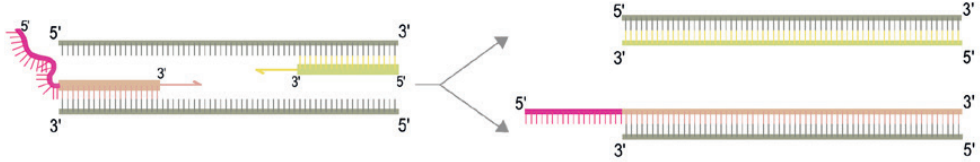
Programa: PRIMER3 (Untergasser *et al.* 2012)

VALIDACIÓ DELS LOCI MICROSATÈL·LITS I PCRs *MULTIPLEX*

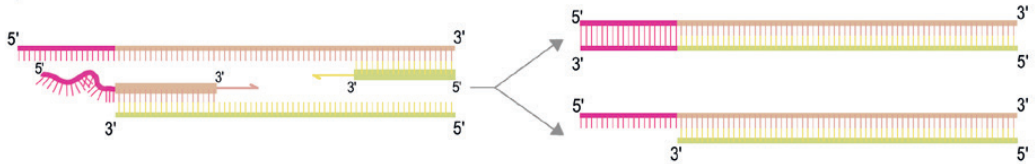
El procediment de Schuelke (2000) amb tres encebadors o *primers* diferents (*primer forward* específic unit a la sonda complementària al *primer* M13, *primer reverse* específic i *primer forward* M13 universal marcat amb fluorocrom 6-FAM) fou utilitzat per a amplificar els fragments (**Figura 13**). Durant el primer cicle de la PCR, els *primers forward* (units a la sonda complementària al *primer* M13) i els *primers reverse* específics del locus microsatèl·lit, s'uneixen al DNA motlle i s'inicia la síntesi de les noves cadenes de DNA. En el segon cicle de PCR, els mateixos *primers forward* i *reverse* s'uneixen a una de les dues cadenes sintetitzades durant el primer cicle. El resultat final d'aquest segon cicle de PCR és que totes les cadenes de DNA sintetitzades de nou porten en algun extrem, la seqüència complementària al *primer* M13. A partir del tercer cicle de reacció i fins al final del procés, l'encebador M13 marcat amb 6-FAM substitueix al *forward* específic unit a la sonda complementària al *primer* M13. Perquè aquest desplaçament del *primer forward* per l'M13 tingui lloc, la concentració inicial del *primer* M13 ha de ser 5X la del *primer forward* (Schuelke 2000). Els loci microsatèl·lits putatius identificats informàticament es

testaren al laboratori per verificar el seu polimorfisme en l'espècie seguint l'esquema de la **Figura 14**.

Primer cycle de PCR



Segon cycle de PCR



Tercer cycle de PCR

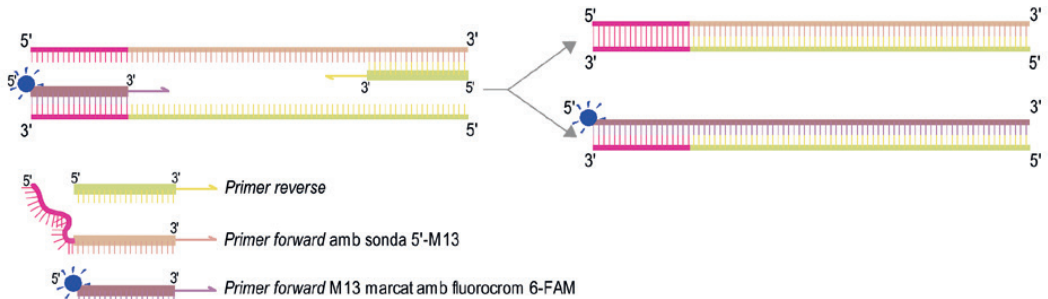


Figura 13. Esquema dels cicles inicials de la reacció en cadena de la polimerasa seguint el procediment descrit per Schuelke (2000). Aquest protocol permet reduir els costos de genotipatge dels loci microsatèl·lits gràcies a la utilització d'un primer universal (M13) marcat amb fluorocrom 6-FAM que és complementari a la sonda unida als primers forward específics de cada fragment a amplificar. Modificat de Schuelke (2000).

Un cop validats els loci microsatèl·lits al laboratori, se'n seleccionaren 13 de polimòrfics a la Mediterrània occidental en base a la seva òptima amplificació i lectura. Set dels tretze loci eren dinucleòtids (Aa123, Aa138, Aa421, Aa681, Aa1061, Aa1255 i Aa1444), tres trinucleòtids (Aa496b, Aa667 i Aa1195), un tetranucleòtid (Aa956) i dos pentanucleòtids (Aa751 i Aa818). Es dividiren els loci segons temperatura d'hibridació (*annealing*) dels primers a la cadena motlle (50°C o 60°C) i es buscaren incompatibilitats entre ells utilitzant el software AUTO DIMER (Vallone i Butler 2004). L'extrem 5' dels primers forward seleccionats es marcà amb un dels quatre fluorocroms: PET (vermell), NET (groc), 6-FAM (blau) i VIC (verd) per a poder automatitzar la lectura dels genotips dels individus amb

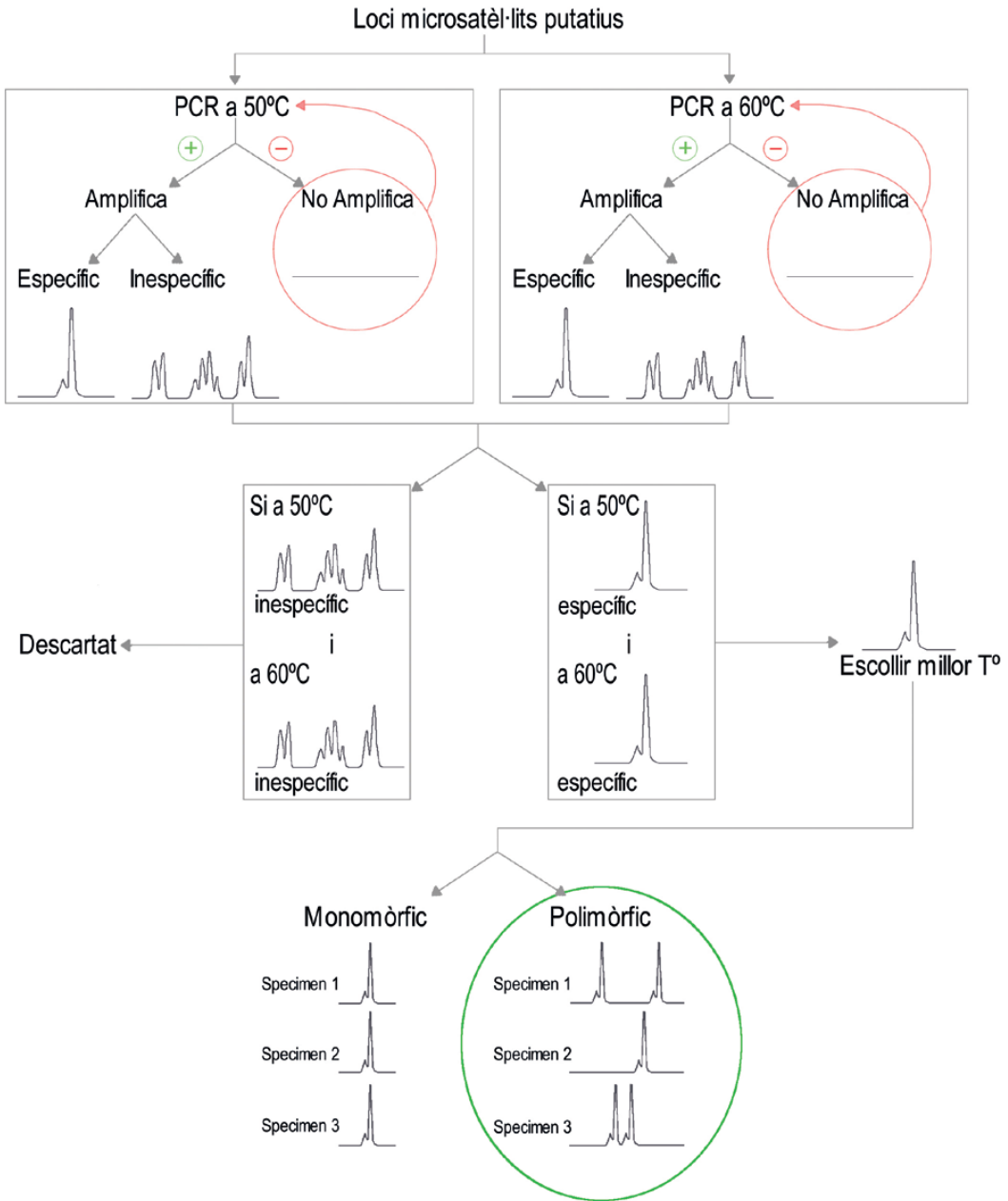


Figura 14. Esquema de la validació al laboratori dels loci microsatèl·lits putatius identificats informàticament.

el programa GENEIOUS (Kearse *et al.* 2012). El color de la fluorescència de cada locus se seleccionà tenint en compte que aquells amb mida dels al·lels similars i igual temperatura d'*annealing* tinguessin fluorocroms diferents. Així, s'agruparen els loci amb al·lels de mida petita (menys de 150 pb), mitjana (150-250 pb) i gran (més de 250 pb) i s'assignà a cadascun d'ells un fluorocrom diferent dins del conjunt. Tenint en compte les incompatibilitats i la

temperatura d'hibridació dels *primers* a la cadena motlle, el rang de mida dels al·lels i el color del fluorocrom, cadascun dels loci es va emplaçar en un dels tres sistemes d'amplificació conjunta o *multiplex* (Figura 15). S'afegiren de forma seqüencial i a una concentració equimolar els parells de *primers* de cada locus establerts per formar part d'una *multiplex* determinada. Posteriorment, s'ajustaren les concentracions dels *primers* a la reacció final per aconseguir una intensitat del senyal dels al·lels homogènia per a tots els loci. En el cas del locus que no es va poder integrar en cap *multiplex*, s'amplificà de forma independent però el producte resultant s'afegí al producte d'un dels tres sistemes *multiplex* per a l'anàlisi conjunt dels fragments a l'analitzador de gens (Figura 15).

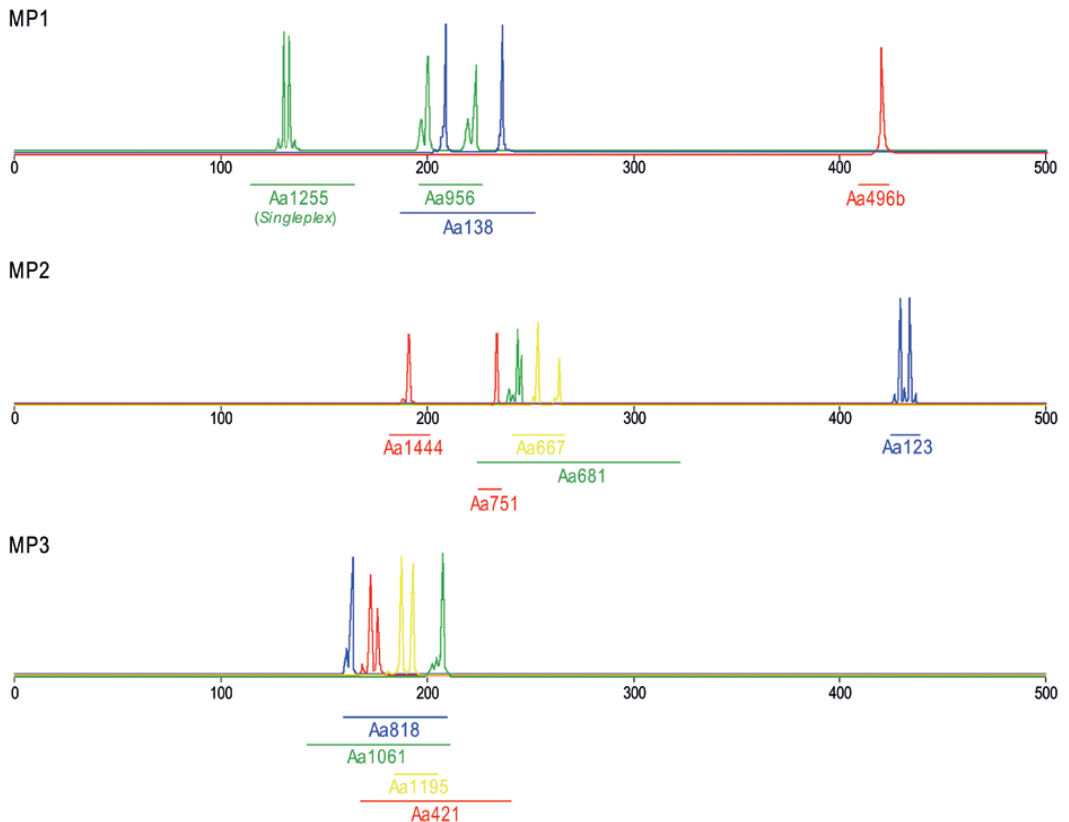


Figura 15. Esquema dels tres sistemes d'amplificació conjunta o *multiplex* (MP) desenvolupats en *Aristeus antennatus*. La *multiplex* 1 inclou tres loci i 1 que s'amplificà de forma independent (*singleplex*) però s'afegí al producte de la *multiplex* 1 per a l'anàlisi conjunt dels fragments a l'analitzador de gens; la *multiplex* 2 inclou 5 loci i la *multiplex* 3 inclou 4 loci.

ANÀLISIS DE DADES

Existeix un elevat ventall d'anàlisis de dades possibles partint de genotips multilocus (Luikart i England 1999). No obstant, en aquesta tesi s'han utilitzat aquelles anàlisis que permeten inferir la genètica de poblacions i el parentiu d'*Aristeus antennatus*.

- a) Diversitat genètica: per avaluar els nivells de diversitat genètica s'ha estimat l'heterozigositat observada (H_O), l'heterozigositat esperada (H_E), el nombre d'al·lels per locus (N_A) i el coeficient de consanguinitat (F_{IS}) dels diferents loci microsatèl·lits amb els programes GENEPOP (Rousset 2008) i FSTAT (Goudet 2001). La desviació de les freqüències al·lèliques esperades per Hardy-Weinberg així com el desequilibri de lligament entre parelles de loci també s'ha calculat utilitzant els mateixos programes. El programa MICRO-CHECKER (Van Oosterhout *et al.* 2004) s'usà per identificar al·lels nuls i la seva freqüència va ser estimada amb el programa FREENA (Chapuis i Estoup 2007). Els programes CERVUS i GIMLET s'utilitzaren per a calcular la probabilitat d'exclusió i la probabilitat d'identitat dels loci microsatèl·lits (Kalinowski *et al.* 2007; Valière 2002, respectivament).
- b) Diferenciació poblacional i estructura poblacional: la diferenciació entre parelles de poblacions va ser estimada mitjançant F_{ST} i els valors de significació foren calculats amb el programa FSTAT (Goudet 2001). L'estructura poblacional es representà mitjançant l'anàlisi discriminant de components principals (DAPC) amb el *software* ADEGENET (Jombart 2008) implementat a l'R (R Core Team 2015).
- c) Sistema d'aparellament i parentiu: el sistema d'aparellament de l'espècie es va inferir mitjançant el reagrupament de genotips iguals amb el programa GIMLET (Valière 2002). El grau de parentiu entre individus, així com la diferència de parentiu entre grups d'individus es va estimar utilitzant l'estimador de Wang (2007) implementat en el *software* COANCESTRY (Wang 2011). El programa HYBRIDLAB s'usà per a simular individus a partir de les freqüències al·lèliques de la població de referència (Nielsen *et al.* 2006).

RESULTS

RESULTATS

Els principals resultats obtinguts en aquesta tesi estan presentats en forma de tres capítols d'acord amb els objectius detallats prèviament.

En el Capítol 1, s'han desenvolupat i caracteritzat nous loci microsatèl·lits en la gamba rosada, *Aristeus antennatus*, per ser aplicats posteriorment a l'estudi de la dinàmica reproductiva de l'espècie.

El Capítol 2 consisteix en el desenvolupament d'un protocol d'extracció de DNA diferencial que permet aïllar DNA dels espermatòfors units al telicle de la femella amb suficient puresa i quantitat per ser amplificat per PCR i obtenir un correcte genotipatge del mascle copulador.

Finalment, en el Capítol 3 s'ha aplicat un panell de 13 loci microsatèl·lits polimòrfics, prèviament desenvolupats en el Capítol 1, per inferir alguns paràmetres de la dinàmica reproductiva de l'espècie desconeguts fins al moment, com són el sistema d'aparellament, la possible existència de selecció de parella i la dispersió desigual entre sexes en el medi natural.

CAPÍTOL 1.

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF NOVEL MICROSATELLITE MARKERS BY NEXT GENERATION SEQUENCING FOR THE BLUE AND RED SHRIMP *Aristeus antennatus*

GENERAL INSIGHT

The demersal blue and red shrimp, *Aristeus antennatus* (Crustacea, Decapoda), is distributed in the Mediterranean Sea, eastern Atlantic waters adjacent to Gibraltar Strait and the Indian Ocean from Mozambique to Zanzibar (Fernández *et al.* 2013b and references therein) and has been recorded recently from the Brazilian coast (Serejo *et al.* 2007). The species inhabits the muddy bottoms of the continental slope along submarine canyons, ranging from 80 to 2800 m depth, making this the most eurybathic species in the Mediterranean Sea, and has a complex demographic structure in the water column (Sardà *et al.* 2010 and references therein). Populations in shallower waters (< 1,000 m depth) which are exploited by commercial fishing are mainly composed of large and mature females with a low but significant proportion of males that return to deeper grounds after mating takes place, principally in summer. Populations in deeper waters (> 1,000 m depth), which are not fished, have lower abundances and biomasses and are mainly composed of males and juveniles (Sardà *et al.* 2010).

Exploited since the 1950s, the global catch has increased annually, reaching 1851 tonnes in 2013 (FAO 2015). Currently the focus of an important trawl fishery because of its high value in Mediterranean fish markets (60-120 \$/kg), neither international conservation strategies nor worldwide sustainable management policies have been developed for this species despite priority listing for action by the Scientific Advisory Committee (SAC) of the General Fisheries Commission for the Mediterranean Sea (FAO 2006). An annual 60 days local closure in the fishing area of Palamós (Spanish Western Mediterranean) has been recently implemented, aimed at achieving the sustainable exploitation in this fishing ground (BOE 2013).

Although studies have addressed *A. antennatus* biology and ecology, mainly of the Mediterranean populations (Fernández 2012 and references therein), a major problem in

achieving sustainable fisheries management is the identification of the biological units supporting the fishery, or the so-called genetic stocks (FAO 1993). Mitochondrial DNA (mtDNA) diversity analyses of *A. antennatus* populations on a broad oceanographic scale have detected four genetic stocks: The Western Mediterranean Sea (WM), the Eastern Mediterranean Sea (EM), the Atlantic Ocean (AO) and the Indian Ocean (IO), but have failed to distinguish genetic divergence within the regional level (Maggio *et al.* 2009; Roldán *et al.* 2009; Fernández *et al.* 2011; Marra *et al.* 2015). Surveys using a small number of microsatellites isolated using the FIASCO protocol (Zane *et al.* 2002) failed to distinguish any type of population structure within Italian fishing grounds (Cannas *et al.* 2008; Cannas *et al.* 2012b).

Nevertheless, microsatellites have proved their utility in identifying genetic stocks in marine penaeoid shrimps around the world (Benzie 2000; Brooker *et al.* 2000; Supungul *et al.* 2000; Ball and Chapman 2003; Maggioni *et al.* 2003; Waqairatu *et al.* 2012; Abdul-Aziz *et al.* 2015) and it is possible that a greater number of these might provide higher resolution in other Mediterranean and Mozambique populations. Next generation sequencing (NGS) based on 454 pyrosequencing has enabled a high-throughput approach and has demonstrated its usefulness in the development of SSRs in non-model organisms (Schoebel *et al.* 2013; Sousa-Santos *et al.* 2015). Long reads generated by 454 sequencing are expected to contain SSRs and their flanking regions that are needed to develop methods for SSR screening among populations.

The aim of our study was the development and characterization of novel polymorphic microsatellite loci for *A. antennatus* to provide additional markers necessary to analyse the structure and connectivity of blue and red shrimp populations at smaller geographical scales both geographically and bathymetrically, but particularly within for the Western Mediterranean, and to provide insights into this species' reproductive behaviour through enabling parentage analysis.

MATERIALS AND METHODS

DNA extraction for Next generation sequencing

Genomic DNA isolation was performed from 10 mg of muscle tissue stored in 95%

ethanol of an individual (Blanes2010; specimen-voucher: LIG-UDG: Aa:872, stored at our laboratory) by means of two series of Sambrook *et al.* (1989) phenol:chloroform:isoamyl alcohol extraction protocol, with minor modifications. Individual sequencing must always be preferred to avoid sequencing errors that can be confused with new alleles when a pool of individuals is performed (Cutler and Jensen 2010; Anand *et al.* 2016). The sample was treated between the series with 1 µl RNase A (20 mg/ml; Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) and incubated at 37 °C for 30 min. The high quality of extracted DNA was checked by resolution on a 0.8% agarose gel with ethidium bromide (0.5 mg/ml) and was quantified using both a NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (136 ng/µl; Thermo Fisher Scientific) and Picogreen reagent® (60 ng/µl; Thermo Fisher Scientific) with a Paradigm Detection Platform (Beckman Coulter) (CEGEN-UPF Services).

Next generation sequencing and De Novo Assembly

Two Shotgun Whole-genome sequencing was performed on a Roche 454 GS Junior Pyrosequencer (Pompeu Fabra University's Genomics Service; Barcelona, Spain). The reads obtained were assembled into contigs using the GS DE NOVO ASSEMBLER program included in the NEWBLER software package v. 2.7. (Roche 454 Life Sciences 2006-2012) using the default settings with two modifications to take into account that *Aristeus antennatus* is a diploid (heterozygoteMode: True), eukaryotic organism (largeGenome: True).

Microsatellite loci identification

To avoid redundancy with previous reported microsatellites, a BLASTn search employing our entire database and using a significance threshold of e-values < 10⁻¹⁰ was performed against all published *A. antennatus* microsatellites (Cannas *et al.* 2008). All contigs matching with already available *A. antennatus* microsatellites were not included in the further microsatellite development. Remaining contigs were scanned with TANDEM REPEATS FINDER v. 4.04 (Benson 1999) to detect microsatellite motifs. Alignment parameters of match, mismatch and indels were set as 2, 7 and 7, respectively; minimum alignment score to report repeats was set to 30; maximum period size to 5 and matching and indel probabilities were set as 0.8 and 0.1, respectively. In addition, the option of flanking sequence was considered to record up to 500 nucleotides on each side of the repeat in order to later design specific PCR primers.

Contigs containing tandem repeats with at least 30 bp of flanking regions were used for primer design with PRIMER3 v. 0.4 (Untergasser *et al.* 2012) using the following conditions: Contiguous repeat areas that were less than 100 bp apart were considered the same locus (interrupted microsatellite), PCR product size ranged from 100 to 450 bp and PCR primers design followed the default general primer picking settings consisting of an optimal primer length of 20 bp (ranging between 18-27 bp), an optimal annealing temperature of 60°C (ranging between 57-63°C) and a GC content optimized between 20 and 80%.

Verification of putative microsatellites

Putative microsatellites were preliminarily screened for amplification success and polymorphism by genotyping a panel of 15 *A. antennatus* individuals representative of four geographic areas showing significant genetic divergences with mitochondrial markers: WM (n = 5), EM (n = 3), AO (n = 4) and IO (n = 3) (Fernández *et al.* 2011). For each individual, the total DNA extraction was conducted following the standard phenol:chloroform:isoamyl alcohol procedure (Sambrook *et al.* 1989). The approach of Schuelke (2000), which included three primers in a nested PCR, was conducted for SSR genotyping. For each locus, we used a non-labelled specific forward primer with a universal 19 bp 5'-M13 tail (5'-CACGACGTTGTAACGAC-3'), a non-labelled specific reverse primer and the universal fluorescently 6-FAM-labelled M13 as the third primer. This reduced genotyping costs because only a common fluorescently labelled primer was required for all putative microsatellite verifications.

Putative microsatellites were amplified in 20 µl of individual (singleplex) PCR reactions containing 0.5 U of EcoTaq DNA polymerase (Ecogen), 2 µl 10X PCR buffer, 0.6 µl MgCl₂ (50 mM), 2 µl dNTP (10 mM), 0.2 µM of both reverse and 6-FAM-labeled M13 primers, 0.04 µM forward primer and 1 µl DNA template (30-50 ng) plus ddH₂O. PCR reactions were performed on a MJ Research PTC-200 thermal cycler (Bio-Rad) under the following conditions: An initial denaturation at 92°C for 2 min; followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at the optimal temperature at 50°C or 60°C (Table 5) for 90 s and extension at 72°C for 90 s; followed by a final extension at 60°C for 30 min.

Subsequently, 2 μ l of amplified product was added to 10 μ l of Hi-Di (highly deionized) formamide with 0.1 μ l of GeneScan™ 500 LIZ size standard (Applied Biosystems) and were loaded on to an ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Finally, allele scoring, after manually checking, was performed using GENEIOUS v. 7.1.9 (Kearse *et al.* 2012).

Data analysis

In order to assess the usefulness for population genetics studies, all loci yielding reliable polymorphism were further evaluated by genotyping 20 individuals collected from the same WM locality (Blanes: 41°35' N, 02°50' E) used in the preliminary screening. For each locus, observed heterozygosity (H_O), expected heterozygosity (H_E) and inbreeding coefficient (F_{IS}) were estimated with GENEPOP v. 4.2.2 (Rousset 2008) using allele identity. For loci where at least 70% of individuals were genotyped, departures from Hardy-Weinberg expectations (HWE) and linkage disequilibrium for each pair of loci were also tested using GENEPOP v. 4.2.2 (Rousset 2008). Significance level was adjusted using Bonferroni correction for multiple testing. MICRO-CHECKER v. 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004) was used to check for the presence of null alleles, stuttering or allele dropout in loci that presented significant departure from HWE. In addition, the combined non-exclusion probability test was conducted with CERVUS v. 3.0.3 (Kalinowski *et al.* 2007) to check for efficiency of these loci for inferring parentage analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Next generation sequencing and De Novo Assembly

During the last decade, 454 pyrosequencing technology has been used widely to develop microsatellites in non-model organisms (Leese *et al.* 2012; Schoebel *et al.* 2013), as it is faster and more cost-effective than the previous methodologies (e.g. FIASCO protocol). The Shotgun Whole-genome sequencing with a Roche 454 pyrosequencer on the *Aristeus antennatus* genome produced 165,507 reads with an average length of 343 bp (56,772,861 bp in total). Comparatively, the number of reads and total bp sequenced conforms to the values obtained by Leese *et al.* (2012) for other crustaceans, including decapods, using the same type of approach (49,802-186,890 and 12,098,817-55,152,741, respectively). Our average read length was clearly above the range of previous crustacean studies (211.5-265.5 bp). Up

to 10,613 of the obtained reads were assembled into 2,029 contigs covering 895,246 bp of the *A. antennatus* genome and the number of singletons was 128,835. These contigs had an average length of 873 bp (range: 100 to 12,986 bp) and N50 contig size was 858 bp.

Microsatellite loci identification and development

No homology with already available *A. antennatus* microsatellites was found in the BLASTn search, except for our contig00595 that matched the microsatellite Ant93 described in Cannas *et al.* (2008) (GENBANK accession number EU417952).

In 247 contigs, a total of 317 tandem repeats were identified with TANDEM REPEATS FINDER of which 241 presented motifs with a period size of di- (31%), tri- (27%), tetra- (24%) or pentanucleotides (18%), repeated at least 5 times. The di-, tri- and tetranucleotides are the most common repeat motifs for microsatellite loci described in decapod shrimps (Scarborough *et al.* 2002), the dinucleotides being the most abundant of them (Meehan *et al.* 2003; Robainas *et al.* 2003; Pan *et al.* 2004; Zeng *et al.* 2013; Baranski *et al.* 2014).

One hundred and ten of the putative microsatellite markers presented a minimum of 30 flanking bp, likely useful for primer design and PRIMER 3 software suggested specific primer pairs for 97 of these markers. These results were in the range observed in previous searches undertaken on crustaceans including decapods (25 to 1,420 putative markers) when stringent filters were used on massive 454 sequencing datasets (Leese *et al.* 2012). From the preliminary evaluation, 93 out of 97 microsatellites have amplified PCR products. After discarding primer pairs producing unexpected size fragments for microsatellite loci or which were monomorphic, 35 markers yielded reliable microsatellite variation with a total of 144 alleles ranging from 2 to 11 alleles per locus with an average of 4.1 (Table 5). Sequences of the contigs including these polymorphic markers were submitted to GENBANK (Accession Numbers: KU195267-KU195299) (Table 5 and Table S1). The proportion of success (36%) in detecting polymorphic loci for putative microsatellite markers was consistent to that achieved in decapods (15-68%; Meehan *et al.* 2003; Dambach *et al.* 2013; Dao *et al.* 2013; Miller *et al.* 2013), in other marine species [e.g. 29% in a mollusc (Pardo *et al.* 2011) and too in fishes (~40%; Sousa-Santos *et al.* 2015; Williams *et al.* 2015)].

Table 5. Characteristics of 35 new microsatellite markers developed for *Aristeus antennatus*. Ta: Annealing temperature; N_A : Number of alleles; Allele Size Range: Size of sequenced allele; GENBANK: Accession number of the sequenced allele. Forward primers were tailed with M13 at 5' and allele size range included 19 bp of M13.

Locus name	Repeat motif	Primer sequence 5'-3'	Ta (°C)	N_A	Allele Size Range	GENBANK
Aa1a	(AG) ₇	F: TTTACAGCATTCTTGAACG R: GAGGAGCAGGGAGGTAGGTC	50	4	455-461(455)	KU195267
Aa1b	(AACA) ₇	F: GTGTAGTGTCTCGGGACCT R: CCGTAGATCGGCCTGTACTT	50	3	447-455(447)	KU195267
Aa60	(TA) ₅₇	F: TTTGCCTTTCGATTTTTACC R: TTTTCGGTTTCCAGAAATTCG	60	3	197-313(307)	KU195268
Aa123	(AT) ₁₀	F: TACATGCGTTGGGAACGATA R: GGTGGTTTGTCCATGATTC	60	6	444-454(448)	KU195269
Aa125	(TA) ₈	F: GACTCGCTCGCACACATAAA R: AAATCTGGGTGTGCAAGGTC	60	3	245-249(249)	KU195270
Aa127	(AC) ₁₅	F: TTTTGACGGTGGATCAGACA R: GTGTGTGCGCAACTCTCG	60	4	351-373(371)	KU195271
Aa138	(AG) ₂₃	F: ACCAGCTCTCAGAAGGCTCA R: TGTTTCTGAGTGTGGCAACC	50	11	217-249(231)	KU195272
Aa173	(TTTG) ₅	F: CCCAAAGCTCTAGCAACGTC R: GAGAGGAGATCGGTCTGTCTG	60	6	139-363(351)	KU195273
Aa243	(ATAC) ₅	F: CACCTTCAACAGCACACACC R: CCTTCATGACCTTGGCAGTT	60	3	352-360(356)	KU195274
Aa268	(TTCAA) ₅	F: GCTTTTTGCAGGGCATGTAT R: TGAGTCAGCTGCCACGAC	60	2	161-196(161)	KU195275
Aa274	(GTG) ₃₁	F: CTTCTGGAGACAGCACACA R: ACGACACCTGCATCACCATA	60	8	360-435(390)	KU195276
Aa315	(AGC) ₅	F: CTTCTGTGCTCTCCTGGAC R: TCTCCGCATCTTCTTCGTTT	60	2	417-423(423)	KU195277
Aa421	(AG) ₁₃	F: CAAACTGGATCTCTTCGCCA R: GGCAACTTTGTAATCTCTGTTGTC	60	7	197-251(205)	KU195278
Aa496a	(AAT) ₇	F: AAAAGAAATAGGCCAGAAGTGC R: GACGTTCCCTGGAGGTGTTA	60	2	168-171(171)	KU195279
Aa496b	(AAC) ₅	F: TCCAGGGAACGTCCTTACAC R: GAGCCTGAGATCTTGGGTGA	50	2	427-436(436)	KU195279
Aa510	(TCA) ₅	F: GTGGTAGCGAAACCTTTGGA R: ACAAGCTCGAGCCACTGAAT	60	7	255-351(339)	KU195280
Aa590	(CTAAT) ₁₃	F: CCTCCCTGACACCCTGTTTA R: CCAGCATAGCCTTGATTTGG	50	5	393-523(408)	KU195281
Aa667	(GAA) ₅	F: GCAACTGAGAGCCACAGTCA R: TTCAGCACGACTCTGGATTG	50/60	3	269-275(272)	KU195282
Aa681	(CA) ₂₁	F: AATTGCGAAACTTCCGACAC R: AAAAGACGCAGGGAAGGTCT	60	9	250-340(256)	KU195283
Aa691	(CT) ₉	F: GGTTGCCAGAGCACGATAAT R: ACATCCGCATTCTCTTCGAC	50	2	136-142(142)	KU195284
Aa751	(AATTA) ₅	F: GTGTGAATCGACCGAATCT R: GCGACAAAAGTGATGACCAA	60	2	245-250(250)	KU195285
Aa785	(AAG) ₆	F: TATTTTTCCCTGGCTTGAC R: ACCAGGCAGCCAGTCTATGT	60	5	375-477(459)	KU195286

Locus name	Repeat motif	Primer sequence 5'-3'	Ta (°C)	N _A	Allele Size Range	GENBANK
Aa818	(CAATT) ₅	F: GCGATCACTGAACAGGAATG R: TGGGTAAGTCCTAATGGACTGG	60	3	189-209(194)	KU195287
Aa867	(AAC) ₇	F: GGCTTTTCGATTGATGTTGGT R: TAGCCCCTGAGTGTGTGATG	50	3	147-153(150)	KU195288
Aa956	(AGAT) ₆	F: CTTGCACATAACGCAGGTGT R: CGCATGTTGTGTTGATTTCCG	50	3	219-231(231)	KU195289
Aa1061	(AG) ₇	F: ACCGGCACTAGGTTGGACTA R: CGGACCATGAGCTTTCAAAT	60	4	208-224(212)	KU195290
Aa1129	(CAT) ₁₀	F: TCAGGTGTGAGAGCAGGTTG R: TTAATGACCATGGCTTGTGC	60	2	210-213(213)	KU195291
Aa1169	(CAG) ₅	F: TGTCACGCTTCCCAACTA R: CTGCCTCCTGCAGCTGTATT	60	3	243-261(261)	KU195292
Aa1195	(AGC) ₃₃	F: GGGGAGGAGCAGAGACAGTA R: ACGCTGTTACCTCGGCTTTA	60	4	213-222(219)	KU195293
Aa1222	(TTCA) ₆	F: CGTTCGTCCTTTCTTTCCAC R: TTGTCTGCTCTTCCTATGTTGC	60	3	160-172(168)	KU195294
Aa1255	(AT) ₁₇	F: TGTCACGTTTGGGTTTCTGA R: GCCGTGGTGGAAATTATCAT	50	5	144-158(158)	KU195295
Aa1408	(ATTT) ₅	F: CCAGCCATACTCTGTCACCA R: TTTTGAGCGGGAAGTCATTC	50/60	3	171-187(183)	KU195296
Aa1444	(AT) ₁₀	F: TTTGGAGAGTGGTTTGCTCA R: GCCATCACCACAACAACAG	60	7	197-211(199)	KU195297
Aa1450	(AG) ₇	F: TCGGGAAGACGCTTCTTTTA R: AGAACACCCTGCCCTTACAT	60	3	205-287(207)	KU195298
Aa1690	(TTGA) ₅	F: AGGACGACACTGTGTGTGGA R: TCTGCCAAGTTGAAACATCTG	60	2	112-152(152)	KU195299

Population genetic analysis

Of the 35 initial loci, 32 were polymorphic in the Western Mediterranean sample analysed with a mean number of alleles per locus of 4.8 (2-14) and a mean observed and expected heterozygosity of 0.350 (0.000-1.000) and 0.521 (0.050-0.968), respectively (Table 6). The number of alleles detected in our study resembled that previously shown in the Italian study (3-13; Cannas *et al.* 2008), but our estimates of observed and expected heterozygosity were broader than 0.20-0.85 and 0.23-0.89 in Cannas *et al.* (2008). In decapod shrimps, levels of polymorphism are usually high, with abundant alleles and often heterozygosity levels close to 1.0 (Scarborough *et al.* 2002).

Among the 32 polymorphic loci, no linkage disequilibrium was detected after Bonferroni correction ($P = 0.000$), suggesting their independent segregation. In 28 out of 32 polymorphic

loci, proper amplification was obtained for more than 70% of the analysed specimens ($n = 20$). In 21 out of 28 the polymorphic loci, genotype proportions were consistent with HWE expectations after Bonferroni correction ($P = 0.002$), with a mean number of alleles per locus of 4.4 and a mean expected heterozygosity of 0.455, which are in line with those obtained by Cannas *et al.* (2008) in 9 loci (5.3 and 0.637, respectively). MICRO-CHECKER revealed null alleles (non-amplified alleles by PCR due mainly to mutations in flanking regions) as likely involved in significant heterozygote deficiency (positive F_{IS} values, see **Table 6**) observed in six loci. In addition, stuttering in two loci (Aa818 and Aa1444) contributed to genotype scoring errors. In most studies in other decapods, significant departures from HWE resulted in positive F_{IS} values (Supungul *et al.* 2000; Ball and Chapman 2003; Pan *et al.* 2004; Cannas *et al.* 2008; Dambach *et al.* 2013; Miller *et al.* 2013).

Despite the majority of these authors arguing that, the most probable reason for HWE departures was the presence of null alleles; this suggestion was only tested and confirmed by one study (Miller *et al.* 2013). In this study, regarding the Aa315 locus, all the analysed individuals showed the same heterozygote genotype, and MICRO-CHECKER failed to detect any genotyping error. It may be indicative of two duplicate regions; with no variation within regions but different fixed allele when compared (Moen *et al.* 2008).

The application of microsatellite markers also has proven its utility to study mating systems and paternity in decapod shrimps (Bilodeau *et al.* 2005). In our study, using the 21 loci under HWE to test their potential in parentage analysis, the combined exclusion probability in parentage assignment was 0.979 for a candidate parent when parents were unknown and the combined exclusion probability for the identity of two unrelated individuals was 0.999. Thus, these results indicate the effectiveness of these loci for future parentage studies in natural populations of *A. antennatus*.

Massive sequencing by a 454 pyrosequencing platform of the *A. antennatus* genome has allowed the development, validation and characterization of 35 new polymorphic microsatellite loci which greatly increases the number of available microsatellites from the eight microsatellites previously described (Cannas *et al.* 2008). This larger set of loci will

Table 6. Results of genetic diversity of the 35 microsatellite loci in one locality from Western Mediterranean of *Aristeus antennatus*. P: Proportion of amplified individuals (%); N_A : Number of alleles; Allele Size Range including 19 bp of M13; H_O : Observed heterozygosity; H_E : Expected heterozygosity; F_{IS} : Inbreeding coefficient; P : Calculated probability; *: Significant departure from HWE, loci with $P \geq 70\%$ (see text); •: Locus with signs of null allele.

Locus name	P	N_A	Allele Size Range	H_O	H_E	F_{IS}	P	Null allele frequency
Aa1a	95	4	455-463	0.684	0.643	-0.064	0.095	
Aa1b	100	2	447-451	0.300	0.434	0.309	0.280	
Aa60	5	1	307	0.000	0.000	-----	-----	
Aa123	100	5	444-452	0.700	0.645	-0.086	0.244	
Aa125	50	3	245-249	0.200	0.589	0.660	-----	
Aa127 •	70	4	351-375	0.214	0.679	0.684	0.002*	0.259
Aa138	100	14	213-249	0.750	0.921	0.186	0.041	
Aa173	85	4	131-351	0.177	0.276	0.360	0.069	
Aa243	100	5	352-376	0.500	0.458	-0.092	0.490	
Aa268	10	1	161	0.000	0.000	-----	-----	
Aa274	65	12	363-468	0.231	0.968	0.762	-----	
Aa315	100	2	417-423	1.000	0.500	-1.000	0.000*	-----
Aa421 •	95	7	197-261	0.211	0.816	0.742	0.000*	0.319
Aa496a	95	3	162-171	0.316	0.477	0.337	0.019	
Aa496b	100	2	427-436	0.450	0.355	-0.267	0.528	
Aa510	85	6	255-351	0.235	0.502	0.531	0.007	
Aa590	85	3	398-523	0.471	0.443	-0.062	1.000	
Aa667	100	5	260-275	0.650	0.732	0.112	0.171	
Aa681	100	11	250-340	0.650	0.800	0.188	0.261	
Aa691	95	3	140-144	0.263	0.240	-0.098	1.000	
Aa751	100	2	245-250	0.200	0.390	0.487	0.054	
Aa785	95	7	375-486	0.316	0.564	0.440	0.012	
Aa818 •	100	7	184-214	0.250	0.715	0.650	0.000*	0.258
Aa867	100	2	150-153	0.000	0.100	1.000	0.026	
Aa956	100	4	219-231	0.650	0.672	0.033	0.806	
Aa1061 •	100	5	208-226	0.250	0.703	0.644	0.000*	0.253
Aa1129	100	2	210-213	0.050	0.050	0.000	1.000	
Aa1169	55	2	249-261	0.000	0.182	1.000	-----	
Aa1195	100	3	213-219	0.600	0.615	0.024	0.893	
Aa1222	100	2	168-172	0.050	0.050	0.000	1.000	
Aa1255 •	90	6	144-158	0.222	0.672	0.669	0.001*	0.255
Aa1408	100	3	171-187	0.200	0.190	-0.056	1.000	
Aa1444 •	95	9	197-221	0.316	0.771	0.590	0.000*	0.243
Aa1450	55	3	205-209	0.091	0.527	0.828	-----	
Aa1690	100	1	152	0.000	0.000	-----	-----	

provide a stronger set of tools to: a) perform parentage studies, and b) examine connectivity patterns (horizontal and vertical) including examining the population structure of this species at a variety of geographical scales and, particularly, between fished populations in shallow waters and deeper unfished populations. This contribution will also assist to the responsible and sustainable management of this exploited marine resource, by means of a feasible strategy of temporal genetic monitoring.

CAPÍTOL 2.

AN OPTIMIZED HIGH QUALITY MALE DNA EXTRACTION FROM SPERMATOPHORES IN OPEN THELYCA SHRIMP SPECIES

GENERAL INSIGHT

Advances in genomic and marker-assisted selection (MAS) open up new opportunities in selective breeding programs in shrimp culture by improving product quality, feed conversion rate, reproductive efficiency, stress tolerance and disease resistance (Du *et al.* 2010; Gjedrem *et al.* 2012; Yu *et al.* 2015). The accurate selection of breeders is the main concern for selective programs in aquaculture industry (Goyard *et al.* 2008; Rye 2012). Individual genotyping helps to prevent inbreeding in culture lines and to maintain the adaptive potential of stocks through appropriate management of breeding groups in each generation (Benzie 2000; Davis and Hetzel 2000). Male genotyping is employed to identify sires contributing to the offspring, to identify breeding pairs and therefore to estimate effective male population size ($N_{e\text{♂}}$) in uncontrolled mating populations (Gonzalez *et al.* 2010). Exploited crustacean decapod species such as the blue and red shrimp, *Aristeus antennatus*, are currently reducing population size due to the decline of harvested stocks (Fernández 2012), which promotes an increased need for gathering biological information (e.g. genetic diversity, reproductive biology, mating strategy, family relationship and stock structure) to develop sustainable fisheries regulation (Ward 2000).

The crucial step of most genetic studies is the extraction of DNA with sufficient quantity and quality. Several protocols for genomic DNA isolation have been applied to shrimp species, such as phenol:chloroform:isoamyl alcohol (Sambrook *et al.* 1989), salting out (Aljanabi and Martinez 1997) or prepGEM™ insect DNA extraction kit (ZyGEM, Hamilton, New Zealand; Dierens *et al.* 2014). Nevertheless, in several marine species often males are absent from sampled populations or DNA extraction methods require invasive handling protocols interfering with further reproduction (Chamberlain *et al.* 1983; Sandifer *et al.* 1984; Arce *et al.* 2000). In shrimp species with open thelycum such as the blue and red shrimp, *Aristeus antennatus*, or the whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Arce *et al.* 2000; Fernández 2012), mating individuals

could be identified by genotyping female muscle tissue and male spermatophore removed from the thelycum after mating. However, spermatophores pulled up from thelycum could be contaminated by female cells, bringing an unfavorable n male/n female ratio DNA. As it has been observed in biological traces of human sexual assaults, during PCR amplification of DNA targets, the sperm profile is partially or completely masked by female DNA (Cerri *et al.* 2003). As a result, it is impossible to ensure whether the sperm DNA profile is obtained or not. The most common protocol used to solve this problem is differential DNA extraction (Carson *et al.* 2012), which takes advantage of the differences in membrane properties between sperm cells and any other kind of cells, in order to separate them. Female cells are lysed first with proteinase K and an anionic detergent, and then the membranes of sperm are broken using a detergent solution containing dithiothreitol (DTT) to get male DNA (Gill *et al.* 1985).

Up to date, there is not a specific protocol to isolate a clean high quality sperm DNA from spermatophores attached in female thelycum. Using *A. antennatus* as a model, in this paper we introduce a differential DNA extraction protocol to obtain male DNA with enough quantity and quality to assign the genotype accurately. This new approach can be applied in experimental cultured and wild shrimp species with open thelyca to assist in male selection for breeding programs. This procedure could be also valuable to genetically identify reproductive parameters (effective male population size, mating behavior and gene flow) in exploited species, where direct observational data are unavailable or not possible to collect such data.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

Twenty fresh *Aristeus antennatus* females carrying a spermatophore in the thelycum were selected on board of “*Nova Gasela*” trawling vessel among shrimps caught off Palamós, Spain. Females were kept on ice until they arrive to the laboratory, where spermatophores were removed with tweezers from females thelyca and stored separately in 1.5 ml eppendorf without ethanol to further DNA extraction. Female muscle tissue was preserved in 95% ethanol until DNA extraction.

DNA extraction

Using a modified phenol:chloroform:isoamyl alcohol protocol outlined in Fernández *et al.* (2013a), genomic DNA was extracted from all 20 females and from a subset of 10 spermatophores. In the other 10 spermatophores, genomic DNA was extracted with a modified Yoshida *et al.* (1995) differential extraction protocol to compare these results with those obtained by phenol:chloroform:isoamyl alcohol protocol (**Table 7**). This modified protocol to obtain DNA from spermatophores comprised the following steps:

1. Place the protuberances of the spermatophore (sperm sacs) face up to avoid losing sperm.
2. Cut each spermatophore in approximately 16 square pieces.
3. Transfer the tissue into sterilized 1.5 ml eppendorf tube with 500 µl of lysis solution 1 (TNE buffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM ethylenediamine tetraacetate (EDTA) and 100 mM sodium chloride; 1% sodium dodecyl sulphate (SDS); 100 µg/ml Proteinase K).
4. Mix by inversion and incubate at 1,000 rpm for 6 h at 70°C in a shaker/incubator (VorTemp 56) to allow female cell lysis.
5. Transfer the homogenate to a new eppendorf tube and discard the undigested material.
6. Spin at 16,300 g for 8 min at room temperature to pellet the sperm cells.
7. Decant supernatant in order to remove all lysed female cellular materials. There should be no supernatant in the tube.
8. Soak the sperm pellet with 100 µl of TNE buffer for a few seconds and carefully discard the supernatant.
9. Gently resuspend the pellet (sperm) in 500 µl of lysis solution 2 (TNE buffer; 1% SDS; 100 µg/ml Proteinase K; 0.04 M dithiothreitol (DTT)).
10. Incubate sperm at 56°C for 15 h at 1,000 rpm in a shaker/incubator (VorTemp 56) to induce cell lysis.
11. Add 500 µl of phenol and mix briefly until an emulsion is formed.

12. Spin tubes at 15,600 g for 4 min.
13. Transfer 400 μ l of the supernatant to a new 1.5 ml eppendorf tube containing 250 μ l of phenol and 250 μ l of chloroform:isoamyl alcohol (24:1). Mix briefly until an emulsion forms.
14. Spin tubes at 15,600 g for 4 min.
15. Transfer 500 μ l of the supernatant phase to a new 1.5 ml eppendorf tube containing 50 μ l 3 M sodium acetate (pH 5.3) and 1,000 μ l of ice-cool absolute ethanol. Mix the solution by inverting the tube a couple of times.
16. Spin tubes at 16,300 g for 15 min.
17. Remove the ethanol from the tube and further dry the pellet in a heater at 37°C.
18. Rehydrate DNA with 25 μ L of ultra-pure water and store it at -20°C.

DNA concentration and integrity were respectively evaluated by NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) and by loading 10 μ l of DNA on 1% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 mg/ml), in the presence of 72 to 1,350 bp DNA ladder (DNA Molecular Weight Marker I; Roche Applied Science).

Polymerase chain reaction evaluation

Success and reliability of the differential male DNA extraction protocol was checked by comparing spermatophore and female genotypes at two polymorphic microsatellite loci (Aa138: GENBANK accession no. KU195272; Aa681: GENBANK accession number KU195283) previously described for *A. antennatus* (Heras *et al.* 2016).

Single PCR amplification was performed for each locus in 15 μ l reaction mixture containing 10X NH₄ Reaction Buffer, 1.5-4.5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 200 nM of each primer (forward and reverse), 0.025 U of BIOTAQ™ DNA Polymerase (Bioline) and 40 ng of template DNA. Forward primers for these two loci were 5' labelled with 6-FAM (Aa138) and VIC (Aa681) fluorescent dyes. Thermal PCR cycling conditions were: An initial denaturation step of 2 min at 94°C followed by 30 cycles of 30 s at 94°C, 1 min and 30 s at 50°C (for Aa138) or 60°C (for Aa681) and 1 min and 30 s at 72°C, with a final extension of 30 min at 60°C. Two μ l of

PCR product were then mixed with 0.1 μl of GeneScan™ 500 LIZ size standard (Applied Biosystems) and 10 μl of Hi-Di formamide (Applied Biosystems) and denatured during 3 min at 95°C. Resulting amplicons were run on an ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) at the *Laboratori d'Ictiologia Genètica, Universitat de Girona, Spain*. Individual genotypes were scored, after manually checking, using GENEIOUS v. 7.1.9 software (Kearse *et al.* 2012). Putative male genotypes were verified by comparing alleles amplified from the spermatophore with the female genotype as source of contamination.

RESULTS AND DISCUSSION

Spectrophotometric measurements to determine the amount of DNA extracted from spermatophores did not vary substantially between both protocols used in this study. The phenol:chloroform:isoamyl alcohol protocol achieved values ranging from 10.9 to 147.5 ng/ μl with a mean of 80.92 (\pm 49.01) ng/ μl , while differential extraction protocol reached values ranging from 44.1 to 169.0 ng/ μl with a mean of 83.58 (\pm 39.50) ng/ μl , being such differences between protocols no significant (two-tailed *t*-test = -0.134; *P* = 0.895). Reduced amount of DNA in some spermatophores were probably due to the release of the sperm in a previous female spawning event (Demestre 1995).

Spermatophores DNA integrity checked by agarose gel electrophoresis showed that both phenol:chloroform:isoamyl alcohol and differential extraction protocols successfully yielded high-molecular-weight DNA in almost all samples (**Figure 16**). Nevertheless, the phenol:chloroform:isoamyl alcohol protocol resulted in signals of putative degraded DNA (smearing) in 6 out of 10 extractions, and a very weak DNA band was detected in other 3 out of 10 extractions. Smearing was not detected using the differential extraction protocol in any sample, but four extractions showed a very weak or no visible DNA. At any case, successfully PCR amplifications were obtained for all 20 studied spermatophores for two microsatellite loci.

In 7 out of 10 spermatophore DNA extractions using the phenol:chloroform:isoamyl alcohol protocol, three or more alleles were detected in at least one locus (**Taula 7; Figure 17**). Concordance of the extra alleles with the ones observed in female genotype indicated

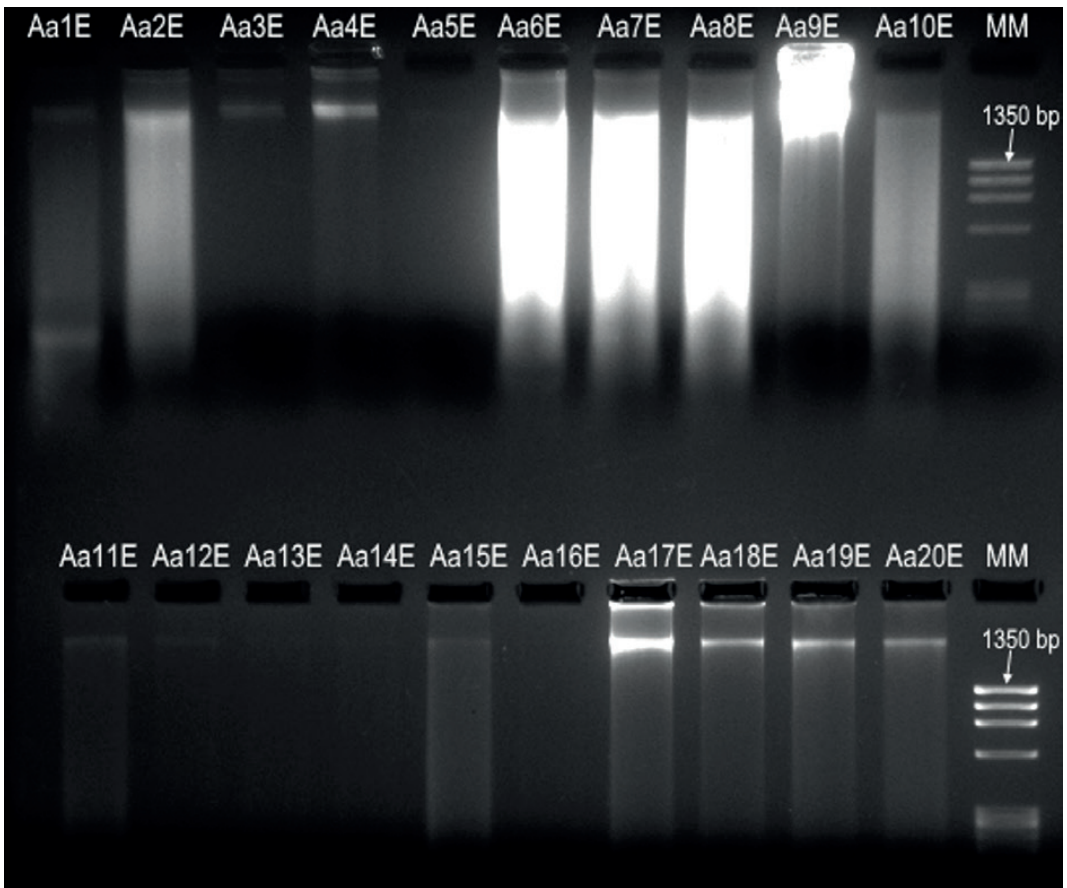


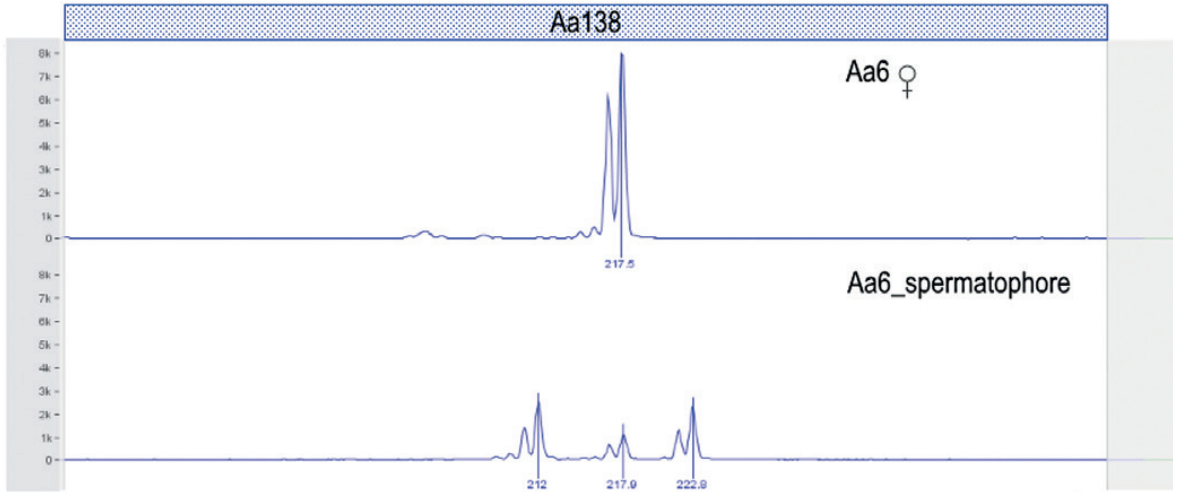
Figure 16. Agarose (1%) gel stained with ethidium bromide (0.5 mg/ml) of DNA samples extracted by phenol:chloroform:isoamyl alcohol protocol (lane 1) or differential lysis protocol (lane 2) from 20 spermatophores. MM: Molecular marker.

without any doubt contamination from female tissue. This proportion of extractions mixed with female tissue also questioned male genotype in those cases when spermatophore alleles fully matched female genotype, such as in individuals 3 and 7 for locus Aa138, or 1 and 7 for locus Aa681 (**Table 7**). The suggested male genotype from individual 7, matching female genotype at both loci, is clearly unlikely given the high level of polymorphism described in them (Aa138: 14 alleles; Aa681: 11 alleles; Heras *et al.* 2016). Altogether, a single male (Aa5) was undoubtedly genotyped at the two loci using phenol:chloroform:isoamyl alcohol protocol. In contrast and for each locus, PCR amplifications from DNA isolated by the differential extraction protocol resulted in an allele pair for seven spermatophores, which was not observed in the respective female genotype, indicating reliability of male genotyping (**Figure 17**). The large proportion of directly assigned male genotypes, and a

Table 7. Microsatellite profiles from females and spermatophores removed from females' thelyca. From Aa1 to Aa10 spermatophore DNA extraction was done by phenol:chloroform:isoamyl alcohol protocol. From Aa11 to Aa20 spermatophore DNA extraction was done by differential lysis protocol. Female genotype, alleles amplified from spermatophore and putative male genotype for Aa138 and Aa681 microsatellite loci. ?†: Male genotype is unlikely given the high level of polymorphism of Aa138 and Aa681 loci.

Specimen	Locus Aa138			Locus Aa681		
	Female	Spermatophore	Male	Female	Spermatophore	Male
Aa1	217/217	215/217	215/215 or 215/217	236/264	236/264	236/264?†
Aa2	195/201	195/201/217	217/217 or 217/201 or 217/195	230/230	230/236	236/236 or 236/230
Aa3	207/217	207/217	207/217?†	236/236	236/264	264/264 or 264/236
Aa4	199/207	199/207/217	217/217 or 217/199 or 217/207	236/236	236/238	238/238 or 238/236
Aa5	215/217	195/215/217/219	195/219	250/250	238/250/264	238/264
Aa6	217/217	211/217/223	211/223	236/238	236/238/264	264/264 or 264/236 or 264/238
Aa7	199/211	199/211	199/211?†	236/236	236/236	236/236?†
Aa8	201/217	197/201/215/217	197/215	236/236	236/250	250/250 or 250/236
Aa9	195/223	195/213/223	213/213 or 213/195 or 213/223	236/316	236/240/316	240/240 or 240/236 or 240/316
Aa10	201/201	201/205	205/205 or 205/201	230/236	230/232/236/238	232/238
Aa11	213/223	203/213	203/213	236/270	236/262	236/262
Aa12	205/217	195/217	195/217	236/236	264/322	264/322
Aa13	199/219	207/225	207/225	240/240	236/236	236/236
Aa14	203/243	217/221	217/221	238/238	236/236	236/236
Aa15	221/231	199/217	199/217	236/238	230/236	230/236
Aa16	201/227	201/231	201/231	236/236	238/264	238/264
Aa17	187/221	217/219	217/219	236/236	250/264	250/264
Aa18	201/217	213/223	213/223	238/238	236/264	236/264
Aa19	197/197	217/231	217/231	236/264	228/250	228/250
Aa20	211/227	201/217	201/217	236/250	236/266	236/266

a) Phenol:chloroform:isoamyl alcohol



b) Differential lysis

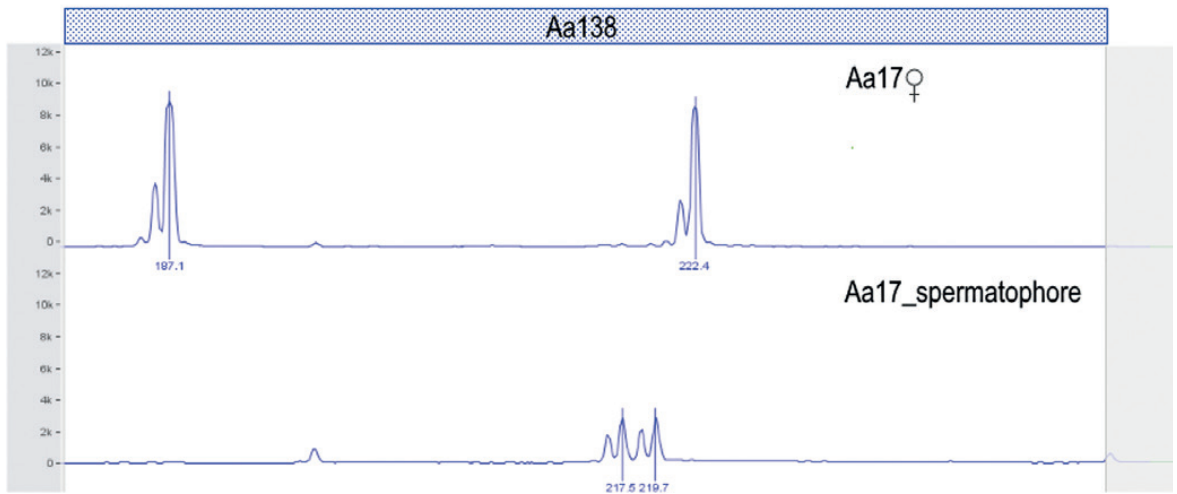
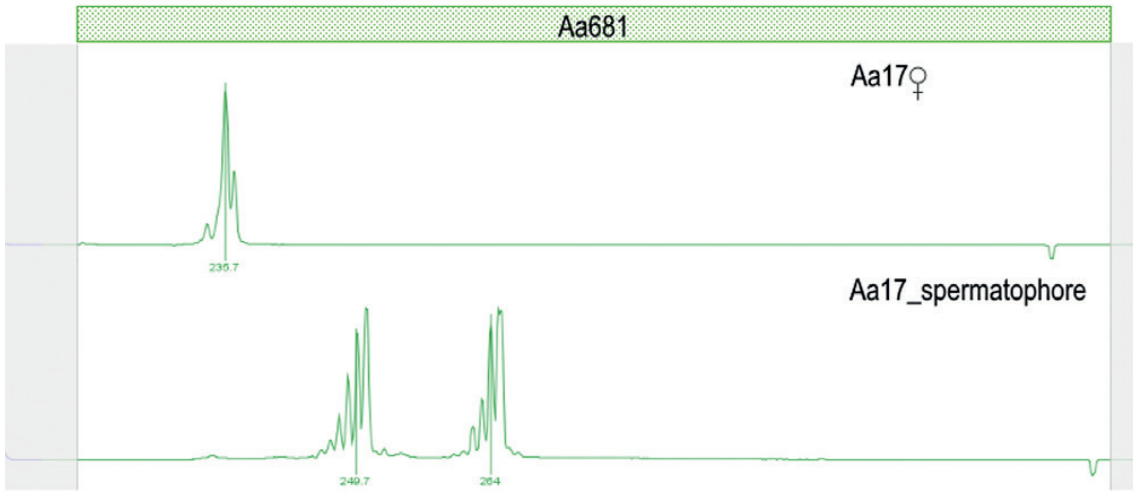
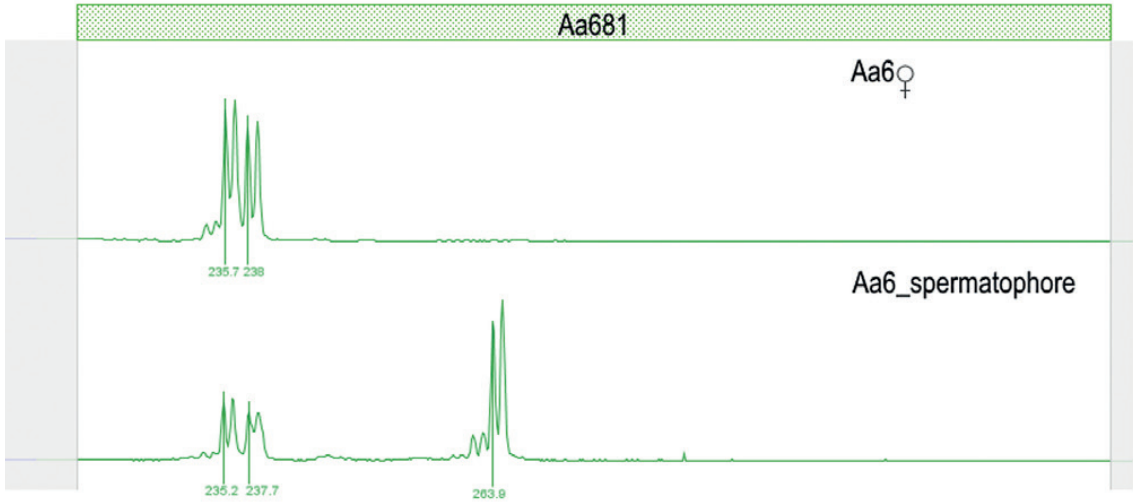


Figure 17. Genotyping Aa138 and Aa681 microsatellite loci in females (lanes 1 and 3) and spermatophores removed from females' thelyca (lanes 2 and 4). a) DNA from spermatophore isolated by phenol:chloroform:isoamyl alcohol protocol. b) DNA from spermatophore isolated by differential lysis protocol.



differential extraction protocol always producing a microsatellite spermatophore profile with only two alleles, one of them non-shared with the respective female, suggested that likely the spermatophore allele pair reflects the male genotype in all cases. Moreover, the peak heights from spermatophore samples isolated by differential extraction protocol were as high and clear as the peaks from female specimens (**Figure 17**), pointing out an optimum DNA concentration to perform genotyping.

Microscope observations of pellet indicated that extractions by the phenol:chloroform:isoamyl alcohol protocol resulted in almost intact membranes of the sperm cells. This membrane resistance is due to the presence of disulfide bonds in sperm membrane proteins that make them more resistant than female epithelial cells to standard DNA extraction protocols (Li 2015). Therefore, likely DNA extracted from spermatophore with the phenol:chloroform:isoamyl alcohol protocol is mostly composed of female DNA from epithelial cells in thelycum, and in lower amount by DNA from the few sperm cells broken by chance. In contrast, the differential extraction protocol is enriched in sperm cells after step 6, and then sperm cells are lysed in order to release male DNA in step 9. Thus, the differential extraction protocol provides specific male DNA with enough quantity and quality for subsequent PCR amplification and male genotyping. Nevertheless, washing steps 8, 13 and 15 could reduce the amount of male DNA in some extractions (Nori and McCord 2015).

Certainly, male DNA has been successfully obtained from several shrimp tissues in the past, including muscle tissue or sperm, but these male tissues can be extracted only when individuals are present in the sample and after invasive handling or lethal protocols (Chamberlain *et al.* 1983). The protocol described in our work provides a suitable non-invasive procedure to reliably identify mating males.

The similarity among open thelyca shrimp species regarding spermatophore structure and its docking system on female thelycum (Perez-Farfante 1975; Subramoniam 1993), suggest that our DNA differential extraction protocol could be applied not only in *Aristeus antennatus* but also in a variety of cultured (e.g. *Litopenaeus vannamei*) and wild shrimp species (e.g. giant red shrimp, *Aristaeomorpha foliacea*, and northern white shrimp,

Penaeus setiferus). Our method do not require the capture of males, and hence could be relevant to analyze mating pairs in species where mating males are difficult to capture as in *A. antennatus*. In this species sampling in the reproductive season are often composed by mature females carrying spermatophores (Sardà *et al.* 1997). Thus, the present protocol can be used to estimate male population structure, reproductive strategy and even gene flow in such exploited species with the aim to improve sustainable management plans. In the same way, this procedure could be also valuable to other spermatophore-using species, such as myriapods, arachnids and insects, where spermatophores are deposited in the environment (e.g. scorpions) or are held by males and later picked up by females (e.g. centipedes; Brusca and Brusca 2003).

CAPÍTOL 3.

INFERRING THE MATING SYSTEM AND MATE CHOICE OF THE BLUE AND RED SHRIMP, *Aristeus antennatus*

GENERAL INSIGHT

Mating system have numerous implications for the ecology and evolution of the species due to their effects on the population dynamics, the effective population size, the amount of inbreeding and relatedness among individuals (Iacchei *et al.* 2013; Ribolli *et al.* 2015). Understanding the reproductive dynamics of exploited marine species is crucial for a proper stock assessment and sustainable fisheries management (Bailie *et al.* 2011 and references therein). Despite the variety of mating patterns described for crustaceans (updated in Subramoniam 2016), in exploited marine species, research has often focused on the reproductive morphological traits, the size and age at first maturity, the fecundity or the spawning frequency, and less attention has been devoted to social interactions, mating systems, mate choice or sex-biased dispersal (López-Martínez *et al.* 2005; Bailie *et al.* 2011). In addition, the reproductive biology of several marine species is poorly known because the nature of their habitat imposes technical difficulties to observe mating in the field, particularly for deep-sea species inhabiting extreme habitats, and captive conditions might alter the mating behavior or the kinship structure in laboratory experiments (Jorquera *et al.* 2016).

The mating system may be simply described according to the number of mates that individuals do during the breeding season (Asakura 2009). In addition to the basic definition, mating systems have also been described in terms of the genetic relationships between mating individuals (Asakura 2009). The particular reproductive strategy in a population is toward improving offspring production and viability (Barbosa *et al.* 2012). Inbreeding depression caused by the mating of related individuals often results in a lower offspring survival and an overall decline of the population (Hedrick and Garcia-Dorado 2016). Dispersal and mate choice prevent mating between closely related individuals (Clarke and Faulkes 1999), but mate choice based on kin recognition is observed in invertebrate species. For instance, females of the German cockroach, *Blattella germanica*, mate preferentially

with distantly related males to increase their reproductive success (Lihoreau *et al.* 2007). Contrarily, Loyau *et al.* (2012) observed in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*, a reduction of the viability of the offspring when mating took place between unrelated individuals. Such outbreeding depression resulted from breaking beneficial gene complexes or local genetic adaptations (Loyau *et al.* 2012).

Relatedness between individuals can be defined as the probability that a set of genes shared between individuals are identical by descent (reviewed in Weir *et al.* 2006). Measuring relatedness needs known pedigrees, but often pedigree information is not available in wild populations (Weir *et al.* 2006). Recent advances in molecular markers facilitate the estimation of the probability of shared ancestry from observed genotypes in a set of loci, and several moments estimators or maximum likelihood estimators have been developed (Taylor 2015). The ideal situation is when the allele frequencies are known from the ancestral population (Weir *et al.* 2006). However, this is again an unrealistic situation for most wild populations and biased estimates can be obtained (Weir *et al.* 2006; Wang 2016). At any case, methods inferring relatedness between individuals within and among populations have thoroughly facilitated our understanding of populations in the wild (Wang 2016). Relatedness estimates can help in addressing several important conservation questions like the mating behavior, the genetic structure or the dispersal dynamics (Weir *et al.* 2006). For instance, relatedness demonstrated isolation by distance and high degree of female philopatry to their natal nest in the bee *Exoneura nigrescens* (Stow *et al.* 2007). Relatedness analyses showed limited queen dispersal and free adult worker dispersal in a population of the ant *Formica exsecta* (Kümmerli and Keller 2007). In marine crustacean species there are few studies of mating preferences related to kinship that can contribute to the understanding of population dynamics (Duffy 1996), but no study in open thelyca shrimp species not amenable to laboratory conditions has been published.

The blue and red shrimp, *Aristeus antennatus*, is one of the most exploited demersal resources in the Western Mediterranean Sea (FAO 2015). However, information regarding the mating system and mate choice preferences are still largely unknown. The species inhabits the Mediterranean Sea at depths ranging from 80 to 2800 m (Fernández *et al.* 2011), with spatial

and temporal segregation by sex and size (Sardà *et al.* 1994). Females are mainly present at shallower depths between 400 and 1000 m year-round while males and juveniles inhabit deeper zones below 1000 m (Sardà *et al.* 2004a). In the Western Mediterranean Sea, reproduction takes place from late spring to summer when mature males and females form spawning aggregations on the middle slope at 700-800 m depth (Sardà *et al.* 2004a and references therein). The female biased sex ratio in these aggregations (females may reach up to 80% of catches; Sardà *et al.* 2004a), suggests some degree of polygyny in *A. antennatus*. During mating, males place spermatophores on the external genitalia of females (thelycum) with a specialized endopod of the first pleopods called petasma (Demestre and Fortuño 1992). Females possess no seminal receptacles; hence, spermatophores attached in the thelycum is the only way to store sperm (Demestre and Fortuño 1992). In other decapod species, spermatophores are lost at each molt (Treece and Fox 1993). The high molt activity observed in females of *A. antennatus* from May to September could be linked to reproduction, as a way to obtain optimum levels of fertilization by mating at each intermolt stage within the reproductive season (Demestre 1995). After mating, the shrimp shoal breaks up and males return to submarine canyons while females remain in shallower waters carrying one or more spermatophores in the thelycum (Sardà *et al.* 1997). More details on how fertilization occurs are not known, but undoubtedly it happens in open waters, and there is no parental care (Sardà *et al.* 1997), complicating the determination of the mating system.

In this study we used microsatellite loci diversity to examine for the first time the mating system of *A. antennatus*. Particularly, we assess the rate of multiple mating, the male origin of multiple spermatophores attached on females' thelyca and putative mate choice preferences. These data will provide the first insight into the mating system and the reproductive behavior of *A. antennatus* which is necessary to understand how exploitation influences the resistance of the species to catastrophic decline and their resilience thereafter.

MATERIALS AND METHODS

Sampling and DNA extraction

In August 2015, a total of 111 mature adults of *Aristeus antennatus* (59♂:52♀) were selected on board of "Nova Gasela" trawling vessel at the spawning ground (550 m depth) of Palamós, Spain (41° 53' N and 3° 23' E). Mature males were selected according to rostrum

shorter than 12 mm of length (Sardà and Demestre 1989) and the presence of petasma fusion (Demestre and Fortuño 1992). All females having a cephalothorax larger than 33 mm and presenting one or more spermatophores in the thelycum were considered as mature (Sardà and Demestre 1987). Samples were quickly transported to the laboratory on ice to remove spermatophores from females' thelyca (61 spermatophores were collected). Each spermatophore was stored separately in a 1.5 ml eppendorf at -20°C to extract DNA using the Planella *et al.* (2017) procedure to genotype males effectively mating with females. On the other hand, a piece of muscle tissue from each adult individual was preserved in 95% ethanol until DNA extraction using the genomic DNA extraction protocol outlined in Fernández *et al.* (2013a).

Microsatellite loci

Genetic diversity at thirteen polymorphic microsatellite loci described for *A. antennatus* (Heras *et al.* 2016) was analyzed using one singleplex and three multiplex PCR panels delineated to avoid primer-dimer and hairpin formation (assessed *in silico* with AUTODIMER v. 1.0 program; Vallone and Butler 2004). For each locus, the forward primer was labelled with one fluorescent dye (PET, 6-FAM, NED or VIC) keeping in mind that loci with overlapping allelic ranges were tagged with different dyes. Multiplex PCRs were done in 10 µl final volume containing 1X of GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega Corporation), primer multiplex mix at primer-specific concentration (Table 8), 0 or 1.5 mM of MgCl₂ solution (adults and spermatophores, respectively) and ~40 ng of template DNA. The locus Aa1255 was analyzed in a singleplex performed in 15 µl reaction mixture containing 1X NH₄ Reaction Buffer, 1.5 or 4.6 mM of MgCl₂ solution (adults and spermatophores, respectively), 1 mM of dNTP, 0.2 mM of each primer (forward and reverse), 0.375 U of BIOTAQ™ DNA Polymerase (Bioline) and ~40 ng of template DNA. All PCR reactions started with an initial denaturation step of 2 min at 94°C followed by 30 (multiplex) or 35 (singleplex) cycles of 30 s at 94°C, 1 min 30 s at 50°C or 60°C and 1 min 30 s at 72°C, with a final extension of 30 min at 60°C (Table 8). One µl of PCR product was mixed with 0.15 µl of GeneScan™ 500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems) and 10 µl of Hi-Di formamide (Applied Biosystems) and denatured during 3 min at 95°C. Resulting amplicons were run on an ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and the genotypes scored using GENEIOUS v. 7.1 software (Kearse *et al.* 2012).

Diversity within and between sexes

The amount of genetic diversity within each sex (mature females and males) was estimated as the number of alleles per locus (N_A) and the observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity. In addition, at each sex and locus, the conformance of genotypic proportions to Hardy-Weinberg expectations (HW) was calculated using the program FSTAT v. 2.9.3.2 (Goudet 2001), and summarized using the Wright's fixation index (F_{IS}). Loci showing significant positive F_{IS} values were evaluated for potential genotyping errors due to stuttering, allele dropout or null alleles using the MICRO-CHECKER v. 2.2.3 software (Van Oosterhout *et al.* 2004). The frequency of null alleles was estimated by the Dempster *et al.* (1977) algorithm with modifications implemented in the FREENA software (Chapuis and Estoup 2007). Differences in genetic diversity (N_A , H_O , H_E , F_{IS}) between sexes were statistically tested in SPSS v. 23 (IBM Corporation Released 2015) using the Wilcoxon signed rank test. Genetic differentiation between mature males and females was assessed by F_{ST} values using the program FSTAT v. 2.9.3.2 (Goudet 2001).

As spermatophores indicated mature males effectively mating with females, we also checked this group for conformance to HW expectations and amount of diversity as detailed above for adult males and females. Levels of diversity of the spermatophore group were compared with both adult males and females, and its genetic differentiation from these two groups estimated as F_{ST} values. Furthermore, discriminant analysis of principal components (DAPC) using the package ADEGENET v. 1.4-2 (Jombart 2008) was performed in R v. 3.3.2 (R Core Team 2015) to gain an overview of the differentiation among the three groups (males, females and spermatophores). This method does not entail a particular population structure model, and it is free of assumptions about Hardy-Weinberg or gametic equilibrium (Jombart *et al.* 2010).

Paternity and relatedness in the spawning ground

To assess the potential of our set of microsatellite loci for individual identification, the exclusion probability for identity (probability that 2 randomly selected individuals match their genotypes by chance) was conducted with the software GIMLET v. 1.3.3 (Valière 2002). The regrouping genotype option of this software was used to detect potentially multiple paternity

Table 8. Characteristics of the singleplex and the three multiplex PCR reactions to amplify 13 microsatellite loci in *Aristeus antennatus*. SP: Singleplex; MP1: Multiplex 1; MP2: Multiplex 2; MP3: Multiplex 3; GENBANK: Accession number of the sequenced allele; ^a: Primer concentration in the PCR final volume.

	Locus	Annealing temperature	Fluorescent dye 5'- forward	Allele Size Range	Primer concentration (μM)^a	GenBank
SP	Aa1255	50	VIC	115-163	0.2	KU195295
	Aa138	50	6-FAM	187-249	0.1	KU195272
	Aa496b	50	PET	412-418	0.05	KU195279
	Aa956	50	VIC	193-217	0.1	KU195289
MP 2	Aa123	60	6-FAM	425-435	0.1	KU195269
	Aa667	60	NED	241-265	0.1	KU195282
	Aa681	60	VIC	224-322	0.1	KU195283
	Aa751	60	PET	225-235	0.1	KU195285
	Aa1444	60	PET	180-202	0.4	KU195297
	Aa421	60	PET	169-241	0.1	KU195278
MP 3	Aa818	60	6-FAM	160-210	0.2	KU195287
	Aa1061	60	VIC	143-211	0.2	KU195290
	Aa1195	60	NED	189-204	0.2	KU195293

by comparing genotypes for all spermatophores to find males mating multiple times with either the same female or different females. Similar comparisons were used to see whether some spermatophores originated from adult males.

We used relatedness analyses to determine if all specimens (females, males and mating males inferred from spermatophores) in the spawning ground derived from the same population. We first checked the efficiency of seven relatedness estimators available in the COANCESTRY v. 1.0.1.7 software (Wang 2011) to distinguish between groups of low relatedness, which may be the case for this species (Coates *et al.* 2014), by simulating 1,000 dyads for each of the following relationships: first cousins (expected relatedness: $r_{xy} = 0.125$), second cousins ($r_{xy} = 0.031$) and unrelated ($r_{xy} = 0$). The best estimator was chosen to further relatedness comparisons. Thus, the distribution of observed pairwise relationship coefficients within each reproductive group (male, female and spermatophores) was compared using COANCESTRY v. 1.0.1.7 (Wang 2011) with that expected for a sample of 1,000 unrelated simulated offspring generated by mating 1,000 simulated males and 1,000 simulated females from our male and female genotypes. All simulated individuals were obtained using the HYBRIDLAB v. 1.0 software (Nielsen *et al.* 2006). In addition, comparisons of relatedness between all pairs of males, females and spermatophores allowed to determine whether all sampled individuals derivate from the same population. Finally, the average relatedness in the observed female-spermatophore pairs was compared to all other potential female-spermatophore pairs (not including the observed female-spermatophore pairs) and female-male pairs to determine whether there was mate choice associated with kinship. For each of the above comparisons, 1,000,000 replicate iterations were computed in COANCESTRY v. 1.0.1.7 (Wang 2011), and a genotyping error rate of 2% was allowed.

RESULTS

Diversity analysis

All loci were polymorphic at each studied reproductive group (females, males and spermatophores), with the number of alleles ranging from 2 to 19 (**Table 9**). Averaged observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.394 in the adult females to 0.467 in the mating males genotyped from spermatophores. In the three groups, larger average expected

Table 9. Summary statistics of genetic diversity in females, males and spermatophores of *Aristeus antennatus*. n: Number of amplified individuals; N_A : Number of alleles; H_o : Observed heterozygosity; H_E : Expected heterozygosity; HWE P : Conformance to Hardy-Weinberg equilibrium; F_{IS} : Inbreeding coefficient; P_I : Probability of identity; *: Significant departure from HWE; •: Null alleles detected.

Sample	Aa138	Aa1255	Aa956	Aa496b	Aa123	Aa681	Aa667	Aa1444	Aa751	Aa818	Aa1061	Aa1195	Aa421	All loci
Females														
n	52	45	52	52	51	51	52	49	52	51	51	52	45	
N_A	18	10	6	2	5	15	4	8	3	5	9	4	6	7.308
H_o	0.789	0.444	0.519	0.096	0.471	0.451	0.327	0.429	0.135	0.275	0.373	0.596	0.200	0.394
H_E	0.910	0.782	0.591	0.092	0.620	0.699	0.667	0.737	0.229	0.652	0.706	0.591	0.725	0.612
HWE P	0.016	0.000*	0.137	1.000	0.048	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.959	0.000*	0.000*
F_{IS}	0.133	0.432	0.121	-0.041	0.241	0.355	0.510	0.418	0.411	0.579	0.473	-0.008	0.724	0.356
P_I	0.822	0.915	0.783	0.171	0.790	0.881	0.810	0.887	0.386	0.826	0.859	0.765	0.878	0.999
Males														
n	59	54	59	59	59	59	59	57	59	58	59	59	45	
N_A	18	9	5	2	4	19	7	9	2	6	9	5	7	7.846
H_o	0.848	0.407	0.509	0.119	0.559	0.576	0.441	0.368	0.068	0.328	0.475	0.525	0.111	0.416
H_E	0.910	0.681	0.648	0.113	0.627	0.801	0.690	0.736	0.262	0.555	0.712	0.581	0.739	0.617
HWE P	0.012	0.000*	0.011	1.000	0.195	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.108	0.000*	0.000*
F_{IS}	0.068	0.401	0.215	-0.055	0.108	0.281	0.361	0.500	0.742	0.410	0.334	0.096	0.850	0.325
P_I	0.983	0.847	0.826	0.205	0.791	0.944	0.838	0.895	0.417	0.758	0.866	0.748	0.877	0.999
Spermatophores														
n	59	53	56	61	61	61	60	57	61	61	61	59	57	
N_A	19	9	5	2	6	19	6	9	2	7	11	5	7	8.231
H_o	0.848	0.472	0.589	0.049	0.771	0.623	0.617	0.439	0.197	0.361	0.459	0.407	0.246	0.467
H_E	0.898	0.678	0.650	0.048	0.643	0.822	0.711	0.651	0.358	0.634	0.717	0.587	0.675	0.619
HWE P	0.008	0.000*	0.378	1.000	0.093	0.000*	0.006	0.001*	0.001*	0.000*	0.000*	0.017	0.000*	0.000*
F_{IS}	0.056	0.304	0.094	-0.017	-0.198	0.242	0.133	0.326	0.450	0.431	0.359	0.307	0.636	0.246
P_I	0.979	0.860	0.822	0.093	0.802	0.953	0.856	0.808	0.520	0.812	0.886	0.748	0.846	0.999

heterozygosity than observed heterozygosity were detected, ranging from 0.612 in females to 0.619 in spermatophores. No significant differences at these three diversity measures were detected between adult males and females, but the Wilcoxon signed rank test indicated that the average N_A and H_O were larger in spermatophores than in females ($Z = 2.072$, $P = 0.038$ for N_A ; $Z = 2.132$, $P = 0.033$ for H_O). On the other hand, several loci for each reproductive group showed significant positive F_{IS} . After Bonferroni corrections, significant genotypic deviations from Hardy-Weinberg expectations were observed at eight loci in adult males and female groups, and at seven in spermatophores. MICRO-CHECKER revealed that these significances were due to the presence of null alleles. The allele frequency estimated for null alleles ranged from 0.102 at the Aa681 locus in the spermatophores group to 0.357 at the Aa421 locus in adult males. This latter locus (Aa421) was discarded from all subsequent analyses due to an estimated null allele frequency higher than 0.25 for the three groups.

No significant allele frequency differences were detected between males and females ($F_{ST} = -0.001$; $P = 0.500$) and males and spermatophores ($F_{ST} = 0.002$; $P = 0.550$). Nevertheless, significant differentiation was observed between females and spermatophores ($F_{ST} = 0.009$; $P = 0.017$). Bidimensional DAPC scatterplot obtained from the 25 principal components retained more than 80% of the total genetic variance (**Figure 18a**). The first component in the scatterplot depicted the distinction between females and their spermatophores. Adult males were located in a central position with overlapping distribution at the left side with a portion of the females and at the right with some spermatophores. Spermatophores showed a somewhat bimodal distribution for the first component (**Figure 18b**).

Paternity and mating system

Excluding the locus Aa421, a combined probability of identity exclusion higher of 0.999 was observed in all three groups, males, females and mating males represented by their spermatophores (**Table 9**). Therefore, the probability that 2 randomly selected individuals match their genotypes by chance was lower than 0.000. Multiple spermatophores were found in six out of fifty-two females (11.5%). Three females carried two spermatophores in theyca and other three carried three. In all cases, multiple spermatophores from the same female showed different genotypes. These results indicated multiple mating in females.

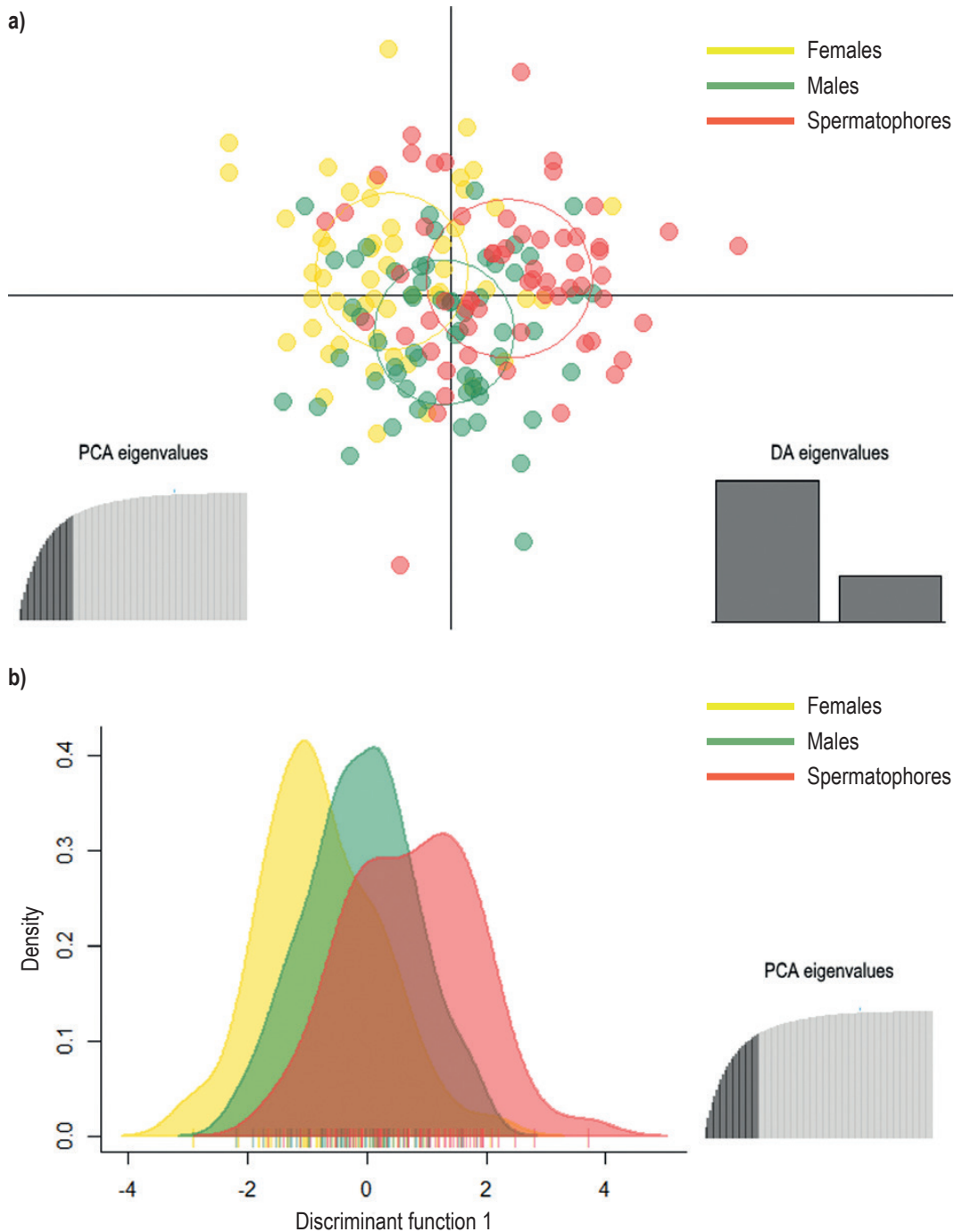


Figure 18. Discriminant analysis of principal components (DAPC) among females, males and spermatophores. a) Genetic differentiation between females, males and spermatophores by DAPC. Groups are displayed by different colours and inertia ellipses. Dots represent individuals. The relative portions of the variance that captured the first and second axis is illustrated in the DA eigenvalues plot (bottom right corner). The PCA eigenvalues plot in the bottom left corner shows the portion of variance retained when keeping 25 PCA axes. b) Density plot of individuals along the first discriminant function from the DAPC for females, males and spermatophores.

Identity analysis on 12 microsatellite loci resulted in identical genotypes only in a pair of spermatophores from different females, which, in accordance with the above estimated exclusion probability of identity, suggests multiple mating also in males. No genetic identity match was found between spermatophores and adult males.

All relatedness coefficients produced small and similar estimates between simulated first and second cousin pairs, and, more relevant, these values were not clearly differentiated from the one obtained between unrelated pairs in any case (**Table S2**). As there was not a better relatedness estimator from our data set, the Triadic likelihood estimator was selected for all further analyses because usually it performs better than other estimators in natural populations where most dyads are unrelated or only loosely related (Wang 2007). The pairwise relatedness in our groups ranged from 0.055 in males to 0.069 in spermatophores (**Table 10**). The average relatedness between females was not statistically different from that obtained for the 1,000 simulated unrelated individuals (0.058). Similar results were obtained for adult males, but the observed relatedness between spermatophores differ significantly from that of the simulated, indicating that spermatophores originated from males were more related than expected by chance (**Table 10**). The average relatedness between females (0.059) was not significantly higher than the average relatedness between males (**Table 10**), but relatedness between spermatophores (0.069) was higher than between all female pairs and male pairs ($P < 0.01$). In addition, the average relatedness between a female-its spermatophore pairs was similar to that of all other female-spermatophore pairs, but it was slightly differentiated from all possible pairs of a female and an adult male. This result suggests that mating often occurs with males genetically differentiated from those of the same ground ($P < 0.1$; **Table 10**).

DISCUSSION

The mean number of alleles per locus (9.38) was lower than the value of 13.5 reported in Italian *Aristeus antennatus* samples using another 8 different microsatellite loci (Cannas *et al.* 2012b). Nevertheless, our results were similar to the ones reported in other shrimp species such as the whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (mean: 8-8.6; Valles-Jimenez *et al.* 2004), or the deep-sea hydrothermal vent shrimp, *Rimicaris exoculata*

Table 10. Bootstrap test to compare the relatedness \pm standard error (SE) between groups using TrioML estimator. NS: Not significant.

Group 1	Mean group 1 \pm SE	Group 2	Mean group 2 \pm SE	P
Females	0.059 \pm 0.002	Unrelated	0.058 \pm 0.000	NS
Males	0.055 \pm 0.002	Unrelated	0.058 \pm 0.000	NS
Spermatophores	0.069 \pm 0.002	Unrelated	0.058 \pm 0.000	$P < 0.01$
Females	0.059 \pm 0.002	Males	0.055 \pm 0.002	NS
Females	0.059 \pm 0.002	Spermatophores	0.069 \pm 0.002	$P < 0.01$
Males	0.055 \pm 0.002	Spermatophores	0.069 \pm 0.002	$P < 0.01$
Females-its spermatophore	0.038 \pm 0.007	All other female-spermatophore pairs	0.055 \pm 0.002	NS
Females-its spermatophore	0.038 \pm 0.007	All female-male pairs	0.058 \pm 0.002	$0.05 < P < 0.1$

(mean: 8.73; Teixeira *et al.* 2012). Accordingly, with the higher number of alleles, Cannas *et al.* (2012b) reported higher mean observed heterozygosity (0.65) compared with our data (mean females: 0.394; mean males: 0.416). In both studies, deviations from HW genotype expectations often resulted from heterozygote deficits in several microsatellite loci, which is a common result for *Penaeoidea* species (Ball and Chapman 2003; Wang *et al.* 2009; Megarajan *et al.* 2014). Several explanations for that pattern have been proposed including stutter bands, null alleles, and biological factors such as mating tactics, recent population bottlenecks or subpopulation structure. The occurrence of null alleles in our sample is the most plausible hypothesis; however, the Wahlund effect resulting from subpopulation structure within sexes could not be rejected, as indicated by DAPC results on sampled spermatophores (Figure 18b).

Our results provide clear evidences that the genetic mating system of the *A. antennatus* involved multiple mating for both females and males, and therefore reproduction of this species involved polygynandry under natural conditions. To confirm female multiple mating, we undertook an extended genotyping of spermatophores from 20 additional females collected in the same spawning ground in 2016. Eighteen females carried two spermatophores in thelycum and the remaining ones carried three. In all cases, multiple spermatophores from the same female showed different genotypes. Multiple mating of females (polyandry) is common across crustacean species, especially when females have not corporal facilities to storage sperm (Jossart *et al.* 2014). Multiple mating allows retention genetic diversity and mean offspring fitness, prevents the risk of having an infertile partner for a mate, increases the probability of obtaining sufficient sperm to fertilize all clutch, and might prevent mate competition for the limiting sex (McLeod and Marshall 2009; Boulton and Shuker 2015). Nevertheless, multiple mating does not always translate into multiple paternity. For instance, females of some crustacean species show behavioral and physiological mechanisms to control male fertilization such as selective sperm passage or spermatophore removal (Eberhard 2000; Dennenmoser and Thiel 2015). In the caridean rock shrimp, *Rhynchocinetes typus*, females accept multiple mating to avoid injury by harassing males, but afterwards remove spermatophores from subordinate males to get sperm from the highest quality males (Díaz and Thiel 2004; Dennenmoser and

Thiel 2008). Thus, our findings on *A. antennatus* demonstrated multiple mating but do not ensure multiple paternity.

At our research location, adult males and females are not genetically differentiated, but mating males inferred from spermatophores are somewhat distinct from the adults. In fact, the DAPC scatterplots showed that a portion of the spermatophores do not overlap with the adult males (**Figure 18b**), and females are clearly differentiated from their spermatophores. Females apparently bias mating toward unrelated males, as suggested by the marginal statistical significance of the comparison of relatedness between female-its spermatophore pairs and all possible female-male pairs. Therefore, mating males inferred from spermatophores might include both mature males sympatric with females and males from other grounds. Evidence for mate choice in favor of genetically dissimilar partners has been found in some invertebrates as well as in other taxa, interpreted as a way for inbreeding avoidance which improves reproductive survival and individual fitness and increases genetic diversity of local populations (Mays and Hill 2004 and references therein). Liu *et al.* (2014) found that females of the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi*, prefer to mate with non-siblings rather than siblings, resulting in the avoidance of inbreeding depression. The same was observed by Simmons *et al.* (2006) with the Australian black field cricket, *Teleogryllus oceanicus*, where females fertilize their eggs with sperm from non-sibling males rather than full-siblings. Although there is increasing evidence to believe that invertebrates make genetic decisions about their mating partners, relatively little is known about the mechanisms by which recognition is performed (Gherardi *et al.* 2012), especially in those species that inhabit deep-water habitats and are not amenable to laboratory conditions, as is the case of *A. antennatus*. One possibility could be that species use waterborne chemical cues (olfactory) to obtain information about conspecifics and thus distinguish between kin and non-kin individuals (Ward *et al.* 2004). This mechanism of recognition is used by the big-clawed snapping shrimp, *Alpheus heterochaelis*, to differentiate between familiar and unfamiliar individuals (Ward *et al.* 2004). Another possibility could be that they use a combination of olfactory and contact chemoreception as happens with the eusocial coral-reef shrimp, *Synalpheus regalis*, where colony members discriminate between nestmates and foreign conspecifics (Duffy 1996; Duffy *et al.* 2002).

In general, when individuals of one sex do not disperse far from the natal group, they are expected to have higher relatedness, on average, than those of the dispersing sex (Prugnolle and de Meeus 2002), but in our analyses both adult males and females have low average relatedness consistent with unrelated individuals, and only results from spermatophores suggested a more related group. However, spermatophores were differentiated from adult males and females, implying male-biased dispersal for *A. antennatus* in the reproduction ground studied. In contrast, Cannas *et al.* (2012b) analyzed three Italian localities and found female-biased dispersal according to inbreeding coefficient (F_{IS}), relatedness and mean and variance of corrected assignment indices values (mA_{lc} , vA_{lc}). Their different sampling design (depth and sex ratio) could account for this different result. Cannas *et al.* (2012b) estimated sex-biased dispersal in one fishing ground (Sant' Antioco: depth < 800 m, n = 26) and two virgin grounds [Pesca profonda-sperimentale North (PSP North): depth = 1464 m, n = 24; Pesca profonda-sperimentale South (PSP South): depth = 1113 m, n = 55], while our sample set from a single fishing ground (depth = 600 m) was higher (n = 111) than that reported in the aforementioned study. On the other hand, the sex ratio obtained in PSP North (1464 m, sex ratio = 1:4) was different from that in the North-Western Mediterranean Sea (Sardà *et al.* 1997, 2003b, 2004a), which suggests that PSP North have a particular population dynamic situation. Another possible reason could be, as is increasingly recognized, that sex-biased dispersal is not fixed in a species or population but can vary in time and space both in terms of which sex disperses and the distance of the dispersion due to ecological variations that affect mating success, resource availability and population density (Kobler *et al.* 2012).

Our research demonstrates a polygynandrous mating system in *A. antennatus*. Additional research in different natural populations is fundamental to complete our knowledge of the mating system of *A. antennatus*. Mating tactics can vary among populations depending on population density, mate quality, availability of mates or variation of the environmental conditions as has been demonstrated in other marine invertebrate species (Gosselin *et al.* 2005). The apparent ability of *A. antennatus* to select mating partners based on genetic dissimilarity opens up new research avenues to explore the possible factors influencing mate choice in this species.

Discussió

DISCUSSIÓ

L'escalada d'extincions que s'estan produint en els darrers anys evidencien la creixent pressió de la humanitat sobre el planeta (IUCN 2011). Actualment, la reducció de la biodiversitat es produeix amb una rapidesa 1.000 vegades superior a la taxa natural (IUCN 2011). Els oceans, malgrat la seva capacitat de mitigar les modificacions antropogèniques, han experimentat també la pèrdua de biodiversitat (Awise 1998). La sobreexplotació (55%) és la principal causa de les extincions, seguida de la pèrdua i la degradació de l'hàbitat (37%), la introducció d'espècies invasores (2%) i els factors derivats del canvi climàtic i la pol·lució (6%) (Dulvy *et al.* 2003). No només les poblacions de grans vertebrats s'han vist afectades per l'impacte de l'home sobre els oceans, sinó que nombroses espècies de peixos i invertebrats han experimentat davallades poblacionals sense precedents en els darrers 50 anys (Malakoff 1997; Hutchings *et al.* 2010; IUCN 2011). L'any 2016, el 17% de les proteïnes totals ingerides per la població humana provenia dels recursos pesquers i aquesta xifra sobrepassava el 50% en països en vies de desenvolupament (FAO 2016).

Algunes davallades continuades de la població en espècies d'interès comercial han fet palès que l'aplicació de mesures correctores tradicionals per a recuperar els estocs de pesca són insuficients per assegurar la sostenibilitat del recurs a llarg termini (Spalinger i Jackson 1994; COSEWIC 2003; Hjelset 2014). Un exemple emblemàtic per la seva importància econòmica és la del bacallà de l'Atlàntic, *Gadus morhua*, la població del qual ha disminuït un 90% des dels anys 1970s al nord de l'Atlàntic i més del 99% a la costa de Terranova (Canadà), tot i les vedes de pesca implementades i els importants esforços per mantenir el recurs (COSEWIC 2003; ICES 2003). Un altre cas paradigmàtic és el del cranc gegant vermell, *Paralithodes camtschaticus*, el qual va ser intensament pescat durant

la dècada dels 60s i 70s a Alaska fins que l'estoc es va col·lapsar totalment (Spalinger i Jackson 1994; Hjelset 2014). Diverses accions de maneig es van posar en pràctica a partir d'aleshores incloent una dècada de veda de pesca, àrees prohibides de pesca o canvis en les talles mínimes; però malgrat tot, l'estoc no es va recuperar (Bechtol i Kruse 2009). Erròniament, s'ha tendit a pensar que la recuperació dels estocs és conseqüència directa del cessament immediat de la pesca. No obstant, cada vegada és més palès que l'explotació és només un dels factors determinants del col·lapse (Hutchings 2001). Aquest fet ha incidit en la necessitat de no només reduir la mortalitat de pesca, sinó d'incorporar trets bàsics de l'ecologia i l'evolució de les espècies marines així com de l'ecosistema on habiten en el desenvolupament de plans de conservació i maneig, per tal d'augmentar l'efectivitat dels programes i la capacitat de recuperació dels estocs (Rowe i Hutchings 2003; Waples *et al.* 2008; Ishida *et al.* 2009; Worm *et al.* 2009; Keith i Hutchings 2012).

A dia d'avui, els estudis del sistema d'aparellament han rebut poca atenció tot i el seu impacte indirecte però significatiu sobre la dinàmica poblacional i la biologia de la conservació (Møller i Legendre 2001). Els processos relacionats amb la dinàmica reproductiva tenen una clara influència en la resiliència de les poblacions després d'una forta pertorbació (Reynolds i Jennings 2000; Reynolds *et al.* 2001; Côté 2003). En aquest context, determinats sistemes d'aparellament generen susceptibilitats particulars en les poblacions alhora de respondre a canvis ambientals i a pressions de selecció com la pesca (Rowe i Hutchings 2003). Les espècies marines amb agregats reproductors d'alta abundància són susceptibles a patir greus col·lapses dels estocs, a causa d'una sobrepesca reiterada durant l'època reproductora (de Mitcheson 2016). Com es detalla a la Introducció General (p. 48-49), la gamba rosada, *Aristeus antennatus*, és la base d'un important entramat socioeconòmic a la costa catalana i, en general, a la Mediterrània occidental. Per tant, la conservació d'aquest recurs no és només important pel propi manteniment de l'espècie sinó per la continuïtat del sector econòmic i social que se'n deriva a les localitats costeres (Lleonart i Maynou 2003).

L'estudi de la dinàmica reproductiva de les espècies marines en llibertat és complex a causa de les dificultats associades a l'observació *in situ* (Baillie *et al.* 2011; Jorquera *et al.* 2016). En la majoria de crustacis, les observacions del comportament són rares o inexistents (Yue i

Chang 2010; Bauer i Thiel 2011), a excepció d'algunes espècies cultivades on estudis de laboratori han facilitat la comprensió del comportament reproductor en captivitat (Urbani *et al.* 1998; Thiel i Hinojosa 2003). Durant les últimes dècades, les eines genètiques moleculars han estat determinants per a l'estudi de paràmetres biològics i ecològics en absència de dades observacionals (Avisé 1998; Selkoe i Toonen 2006), gràcies a la capacitat d'establir relacions genètiques a múltiples nivells evolutius (identitat > paternitat > parentiu > diferenciació poblacional > diferenciació entre espècies; Avisé 2004). Com s'ha detallat a la secció dels Introducció General (p. 26), en la present tesi, es va optar per desenvolupar marcadors microsatèl·lits (Capítol 1 dels resultats); decisió que s'ajusta a la presa per la majoria d'autors que estudien espècies de crustacis en àmbits de recerca similars, segons la literatura publicada a la base de dades *ISI Web of Knowledge* (**Figura 19**). La seqüenciació de DNA és actualment la segona opció més escollida per estudiar la diversitat i en molt menor mesura els SNPs, les alozimes i els RAPD (**Figura 19**).

El desenvolupament de marcadors microsatèl·lits en crustacis s'inicià l'any 1996 en espècies d'elevat interès comercial com la llagosta *Homarus americanus*, la gamba *Litopenaeus vannamei* o el cranc de riu *Cherax tenuimanus* (Tam i Kornfield 1996; Bagshaw i Buckholt 1997; Imgrund *et al.* 1997, respectivament). Des d'aleshores i fins l'any 2012, la majoria dels treballs publicats a la base de dades *ISI Web of Knowledge* utilitzaven protocols d'hibridació selectiva (41,3%), protocols tradicionals (26%), FIASCO (17,4%), PIMA (6,5%), protocols d'extensió dels *primers* (4,4%) o basats en els ESTs (4,4%) per aïllar microsatèl·lits putatius (**Taula 11**; classificació dels protocols segons Zane *et al.* 2002). L'any 2012, es publicà el primer estudi d'identificació de loci microsatèl·lits utilitzant plataformes de seqüenciació massiva. Fins l'actualitat, 454 de Roche ha esdevingut la metodologia escollida per una àmplia majoria de treballs publicats (75%) en crustacis (**Taula 11**). Aquesta plataforma té la capacitat de produir *reads* molt llargs que permeten un fàcil assemblatge sense genoma de referència i un correcte disseny dels *primers* a les regions flanquejants dels loci microsatèl·lits detectats. Per això també va ser la plataforma escollida per a seqüenciar el genoma parcial d'un individu d'*A. antennatus* (Capítol 1 dels resultats). En contraposició, 454 de Roche té un baix recobriment del genoma respecte a d'altres plataformes com Illumina o SOLID (Liu *et al.* 2012).

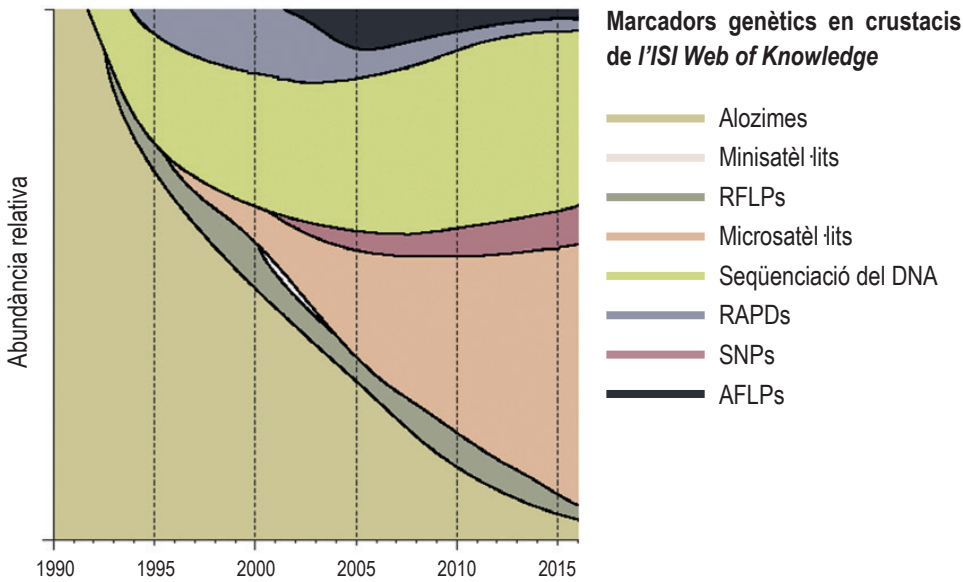


Figura 19. Evolució de l'ús dels marcadors genètics moleculars en crustacis a partir de la cerca d'articles científics referenciats a la base de dades *ISI Web of Knowledge*. A l'eix horitzontal es representen els anys de publicació dels articles i en el vertical l'abundància relativa de cada marcador genètic respecte al total de marcadors genètics utilitzats. AFLP: *amplified fragment length polymorphism*; RAPD: *randomly amplified polymorphic DNA*; RFLP: *restriction fragment length polymorphism*; SNP: *single nucleotide polymorphism*. Els tòpics i booleans utilitzats inclouen (*allozyme or allozymes or alloenzyme or alloenzymes or "allelic variants of enzymes" AND crustacea**), (*RFLP or RFLPs or "restriction fragment length polymorphism"*), (*minisatellite or minisatellites AND crustacea**), (*"DNA" or "DNA sequencing" not "Next generation sequencing" AND crustacea**), (*microsatellite or microsatellites or SSR or SSRs or STR or STRs AND crustacea**), (*RAPD or RAPDs or "randomly amplified polymorphic DNA" AND crustacea**), (*AFLP or AFLPs or "amplified fragment length polymorphism" AND crustacea**) i (*SNP or SNPs or "single nucleotide polymorphism" AND crustacea**). Totes les cerques es van realitzar el 12 d'octubre de 2017.

Realitzant una comparativa amb treballs previs, els resultats obtinguts al Capítol 1 respecte al nombre de *reads* (165.507), la mida mitjana d'aquests (343 pb) i la mida total del genoma seqüenciat (56.772.861 pb) són similars als obtinguts en d'altres decàpodes com *Nematocarcinus lanceopes* (168.267, 250,3 pb i 43.343.686 pb, respectivament), *Hyas araneus* (175.098, 244,8 pb i 44.890.134 pb, respectivament) o *Metapaulias depressus* (186.890, 365,5 pb i 55.152.741 pb, respectivament) (Leese *et al.* 2012). També s'observa una clara analogia en la freqüència de loci polimòrfics respecte al total d'aïllats (*A. antennatus* 36%; *Panulirus homarus* 28%; *Scyllarides latus* 43%; **Taula 11**) i en la freqüència de mida dels motius de repetició [*A. antennatus*: 37,5% di-, 34,4% tri-, 18,7% tetra- i 9,4% pentanucleòtids; *P. homarus*: 42,9% di-, 35,7% tri-, 21,4% tetra- i 0% pentanucleòtids (Delghandi *et al.* 2016); *Rimicaris hybisae*: 53,8% di-, 23,1% tri-, 23,1% tetra- i 0% pentanucleòtids (Jacobson *et al.* 2013)].

L'elevada abundància de dinucleòtids en decàpodes (**Taula 11**) no és un fet aïllat, sinó que succeeix en pràcticament tots els taxons estudiats. Segurament, aquest patró és conseqüència de com s'originen els loci microsatèl·lits que pot ser o bé per formació espontània de seqüències úniques (p.ex. $GACGCACG \rightarrow GACACACG$) o per generació de seqüències repetides per elements transposables (Ellegren 2004; Buschiazzi i Gemmell 2006); en ambdós processos de gènesis, existeix una major probabilitat de formar motius de repetició curts que llargs (Megléczi *et al.* 2012).

Per altra banda, el resultat final de l'aplicació de la plataforma 454 de Roche en *A. antennatus* (Capítol 1 dels resultats) ha permès identificar un panell de 35 loci polimòrfics, que permeten estudiar la connectivitat poblacional de l'espècie a baixa escala geogràfica, els patrons de dispersió segons sexes, el grau de parentiu entre individus o l'estructura poblacional. Aquestes informacions seran de gran ajuda per delimitar estocs genètics de pesca i aplicar mesures de gestió que tinguin en compte paràmetres genètics per garantir la sostenibilitat de les pesqueries d'*A. antennatus* a llarg termini. Un d'aquests paràmetres és la diversitat genètica que és la base del potencial evolutiu de les espècies en front als canvis ambientals. Per això, des de la dècada dels 90s, la Unió Internacional per a la Conservació de la Natura (IUCN) recomana la seva avaluació com a component fonamental de la conservació i els plans de maneig (McNeely *et al.* 1990). La diversitat genètica es mesura a partir de la freqüència dels genotips i els al·lels, la proporció de loci polimòrfics, l'heterozigositat observada i esperada o la diversitat al·lèlica (Toro i Caballero 2005). Concretament, *A. antennatus* presenta una moderada diversitat genètica a la costa catalana ($\bar{H}_O = 0,350$ i $0,445$; $\bar{H}_E = 0,521$ i $0,612$; Capítols 1 i 3 dels resultats, respectivament) que s'aproxima als valors obtinguts per Cannas *et al.* 2008 i Cannas *et al.* 2012b a la costa italiana ($\bar{H}_O = 0,525$ i $0,650$; $\bar{H}_E = 0,708$ i $0,800$, respectivament). No obstant, altres decàpodes com *Litopenaeus schmitti* ($H_O = 0,850$; $H_E = 0,863$) o *Caridina ensifera* ($H_O = 0,785$; $H_E = 0,900$) mostren valors d'heterozigositat superiors (Maggioni *et al.* 2003; Yue i Chang 2010, respectivament). Resultats similars s'han detectat en altres espècies com *L. vannamei* ($H_O = 0,359$; $H_E = 0,487$) i *Penaeus monodon* ($H_O = 0,425$; $H_E = 0,890$), dues espècies d'elevat interès comercial i fortament explotades (de Freitas *et al.* 2007; Benzie 2000, respectivament). La pèrdua de diversitat genètica pot conduir a una reducció

Taula 11. Identificació i desenvolupament de loci microsatèl·lits en crustacis. NLP: nombre de loci polimòrfics; H_0 : heterozigositat observada; H_E : heterozigositat esperada; HWE*: nombre de loci que no mantenen les proporcions esperades per Hardy-Weinberg; EEP: protocol d'enriquiment per extensió dels primers; ESTs de NCBI: expressed sequence tag databases descarregades del National Center for Biotechnology Information; ESTs de GENBANK: expressed sequence tag databases descarregades del GENBANK; FIASCO: fast isolation by AFLP of sequences containing repeats; PIMA: PCR isolation of microsatellite arrays; PCR-ISSR: inter-simple-sequence repeat PCR; ND: no disponible.

Espècie	Protocol d'identificació	NLP	% segons període de repetició						H_0	H_E	HWE*	Referència
			Mono-	di-	tri-	tetra-	pent-	hexa-				
Ordre Diplostroaca												
<i>Daphnia atkinsoni</i>	FIASCO	6	0	83,3	0	0	16,7	0	0,350	0,398	4	Ortells et al. 2009
Classe Branchiopoda												
<i>Eulimnadia texana</i>	Hibridació selectiva	13	0	58,4	33,3	8,3	0	0	0,164	ND	ND	Duff et al. 2004
<i>Leptestheria dahalacensis</i>	FIASCO	3	0	100	0	0	0	0	0,432	0,408	1	Cesari et al. 2007
<i>Triops newberryi</i>	454 NGS	11	0	36,4	27,3	36,3	0	0	0,170	0,621	10	Stoeckle et al. 2013
<i>Triops longicaudatus "short"</i>	454 NGS	10	0	30	40	30	0	0	0,009	0,513	10	Stoeckle et al. 2013
<i>Triops longicaudatus "long"</i>	454 NGS	12	0	36,4	36,4	27,2	0	0	0,247	0,399	5	Stoeckle et al. 2013
<i>Triops cancriformis</i>	454 NGS	1	0	0	100	0	0	0	0,100	0,100	0	Stoeckle et al. 2013
<i>Triops cancriformis</i>	FIASCO	7	0	40	40	20	0	0	0,122	0,271	6	Velonà et al. 2009
Infraclasse Cirripedia												
<i>Chthamalus montagui</i>	PIMA	7	0	100	0	0	0	0	0,394	0,720	6	Pannacciulli et al. 2005
<i>Megabalanus coccopoma</i>	Hibridació selectiva	9	0	55,6	44,4	0	0	0	0,497	0,865	9	Abreu et al. 2016
<i>Megabalanus coccopoma</i>	Ilumina	13	0	0	0	100	0	0	0,670	0,930	10	Reigel et al. 2015
<i>Pollicipes elegans</i>	454 NGS	15	0	60	20	13,3	0	6,7	0,500	0,597	4	Plough i Marko 2014
Ordre Amphipoda												
<i>Dikerogammarus villosus</i>	454 NGS	8	0	62,5	25	0	12,5	0	0,439	0,468	0	Rewicz et al. 2015
<i>Gammarus fossarum</i>	EEP	8	0	42,8	42,8	14,4	0	0	0,647	0,575	0	Danancher et al. 2009
<i>Gammarus roesei</i>	454 NGS	12	0	33,3	66,7	0	0	0	0,404	0,426	2	Gemmer i Gergs 2013
Ordre Euphausiacea												
<i>Meganyctiphanes norvegica</i>	Tradicional	5	0	50	50	0	0	0	0,736	0,886	4	Ostellari et al. 2000
Ordre Isopoda												
<i>Armadillidium nasatum</i>	454 NGS	6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,567	4	Masson et al. 2014
<i>Armadillidium vulgare</i>	454 NGS	33	0	51,5	42,5	3	0	3	0,410	0,467	3	Giraud et al. 2013
<i>Armadillidium vulgare</i>	Hibridació selectiva	9	0	100	0	0	0	0	0,704	0,748	0	Verne et al. 2006
<i>Septemserolis septemcarinata</i>	Variació Híbrid.	8	0	87,5	12,5	0	0	0	0,529	0,620	1	Leese et al. 2008

<i>Serolis paradoxa</i>	Variació Híbrid.	13	0	75	0	25	0	0	0	0,564	0,715	6	Leese et al. 2008
<i>Sphaeroma terebrans</i>	FIASCO	9	0	100	0	0	0	0	0	0,711	0,746	1	Baratti et al. 2009
<i>Porcellio dilatatus</i>	454 NGS	10	0	50	40	10	0	0	0	0,600	0,370	1	Michaud et al. 2016
<i>Porcellionides pruinosus</i>	tradicional	6	0	66,7	33,3	0	0	0	0	0,770	0,540	1	Grandjean et al. 2005
Ordre Decapoda													
<i>Acanthephyra pelagica</i>	454 NGS	12	0	25	0	75	0	0	0	0,473	0,562	2	Jorquera et al. 2014
<i>Aegla araucaniensis</i>	PIMA/ISSR-PCR	9	14,3	57,1	14,3	14,3	0	0	0	0,456	0,451	0	Gouin et al. 2012
<i>Aegla pewencheae</i>	PIMA/ISSR-PCR	9	14,3	71,4	0	14,3	0	0	0	0,442	0,511	0	Gouin et al. 2012
<i>Aristaeomorpha foliacea</i>	FIASCO	9	0	100	0	0	0	0	0	0,707	0,651	2	Cannas et al. 2012a
<i>Aristeus antennatus</i>	454 NGS	32	0	37,5	34,4	18,7	9,4	0	0	0,350	0,521	7	Heras et al. 2016
<i>Aristeus antennatus</i>	Hibridació selectiva	12	0	100	0	0	0	0	0	0,612	0,879	5	Cannas et al. 2008
<i>Austropotamobius pallipes</i>	Tradicional	4	0	100	0	0	0	0	0	0,277	0,417	ND	Gouin et al. 2000
<i>Birgus latro</i>	Tradicional	10	0	90	10	0	0	0	0	0,549	0,888	5	Gan et al. 2008
<i>Callinectes islagrande</i>	Tradicional	7	0	57,1	42,9	0	0	0	0	ND	ND	ND	Bilodeau et al. 2005
<i>Callinectes bellicosus</i>	Hibridació selectiva	11	0	60	30	10	0	0	0	0,603	0,596	1	Munguia-Vega et al. 2010
<i>Cancer pagurus</i>	Hibridació selectiva	12	0	8,3	41,7	41,7	0	8,3	0	0,518	0,563	1	McKeown i Shaw 2008
<i>Cardina ensifera</i>	Hibridació selectiva	4	0	25	25	50	0	0	0	0,785	0,900	0	Yue i Chang 2010
<i>Carcinus maenas</i>	Hibridació selectiva	9	0	33,3	44,5	22,2	0	0	0	0,843	0,835	2	Pascoal et al. 2009
<i>Chasmagnathus convexus</i>	Hibridació selectiva	9	0	44,4	55,6	0	0	0	0	0,669	0,778	2	Kang et al. 2009
<i>Cherax quadricarinatus</i>	Hibridació selectiva	13	0	92,3	7,7	0	0	0	0	0,726	0,590	2	Xie et al. 2010
<i>Cherax tenuimanus</i>	Tradicional	2	0	100	0	0	0	0	0	0,791	ND	2	Imgrund et al. 1997
<i>Chionoecetes opilio</i>	454 NGS	10	0	100	0	0	0	0	0	0,635	0,695	1	Kang et al. 2013
<i>Chionoecetes opilio</i>	Hibridació selectiva	5	0	100	0	0	0	0	0	0,700	0,802	2	Puebla et al. 2003
<i>Chorocaris sp.</i>	Hibridació selectiva	9	0	22,2	0	77,8	0	0	0	0,453	0,547	3	Zelino et al. 2010
<i>Eriocheir japonica</i>	Hibridació selectiva	20	0	88,2	11,8	0	0	0	0	0,596	0,755	4	Cheng et al. 2010
<i>Eriocheir sinensis</i>	Hibridació selectiva	5	0	80	20	0	0	0	0	0,780	0,880	2	Zhu et al. 2006
<i>Eriocheir sinensis</i>	Tradicional	12	0	100	0	0	0	0	0	0,818	0,897	4	Hänfling i Weetman 2003
<i>Farfantepenaeus notialis</i>	Tradicional	5	0	100	0	0	0	0	0	0,666	0,766	5	Robainas et al. 2002
<i>Georchax gracilis</i>	454 NGS	24	0	50	0	33,3	12,5	4,2	0	0,451	0,636	3	Sherman et al. 2012
<i>Homarus americanus</i>	ESTs de NCBI	9	0	55,6	44,4	0	0	0	0	0,526	0,507	2	Hodgins-Davis et al. 2007
<i>Homarus gammarus</i>	Hibridació selectiva	3	0	0	0	100	0	0	0	0,690	0,700	0	Ellis et al. 2015
<i>Litopenaeus schmitti</i>	Hibridació selectiva	6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,850	0,863	0	Maggioli et al. 2003

Espècie	Protocol d'identificació	NLP	% segons període de repetició						H ₀	H _E	HWE*	Referència
			Mono-	di-	tri-	tetra-	pen- ta-	hexa-				
<i>Litopenaeus vannamei</i>	PIMA	8	0	25	50	25	0	0	0,359	0,487	2	de Freitas et al. 2007
<i>Litopenaeus vannamei</i>	tradicional	1	0	0	0	100	0	0	ND	ND	ND	Bagshaw i Buckholt 1997
<i>Macrobrachium nipponense</i>	FIASCO	40	0	97,3	0	2,7	0	0	0,528	0,650	3	Qiao et al. 2011
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	ESTs de GENBANK	13	0	77	23	0	0	0	0,711	0,789	0	Zhao i Li 2007
<i>Melicertus kerathurus</i>	Hibridació selectiva	4	0	75	0	25	0	0	0,509	0,506	3	Arculeo et al. 2010
<i>Munidopsis laevis</i>	454 NGS	10	0	0	70	30	0	0	0,497	0,519	2	Boyle et al. 2013
<i>Nephrops norvegicus</i>	ND	5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Streiff et al. 2001
<i>Palaemon paucidens</i>	tradicional	11	0	91	9	0	0	0	0,621	0,814	6	Song et al. 2009
<i>Palinurus elephas</i>	FIASCO	15	0	42,8	28,6	28,6	0	0	0,789	0,828	2	Palero i Pascual 2008
<i>Panulirus homarus</i>	454 NGS	14	0	42,9	35,7	21,4	0	0	0,159	0,358	13	Delghandi et al. 2016
<i>Panulirus interruptus</i>	Tradicional/ Hibridació selectiva	8	0	85,7	14,3	0	0	0	0,825	0,901	5	Ben-Horin et al. 2009
<i>Panulirus ornatus</i>	454 NGS	15	0	0	13,3	86,7	0	0	0,627	0,657	0	Dao et al. 2013
<i>Penaeus monodon</i>	tradicional	23	0	100	0	0	0	0	0,504	0,936	20	Pan et al. 2004
<i>Penaeus monodon</i>	EEP	3	0	100	0	0	0	0	0,939	0,944	0	Brooker et al. 2000
<i>Portunus pelagicus</i>	ND	8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Yap et al. 2002
<i>Portunus trituberculatus</i>	Hibridació selectiva	20	0	85	15	0	0	0	0,827	0,940	6	Lee et al. 2013
<i>Rimicaris hybisae</i>	454 NGS	13	0	53,8	23,1	23,1	0	0	0,525	0,581	4	Jacobson et al. 2013
<i>Scyllarides latus</i>	454 NGS	10	0	40	60	0	0	0	0,539	0,552	2	Faria et al. 2013
<i>Scylla paramamosain</i>	PIMA	12	0	85,7	0	0	14,3	0	0,760	0,720	3	Ma et al. 2010
<i>Sinopotamon yangtsekiense</i>	FIASCO	20	0	50	5	40	0	0	0,570	0,785	15	Yufang et al. 2009
<i>Zuzalpheus brooksi</i>	Hibridació selectiva	25	0	50	31,8	18,2	0	0	0,569	0,710	ND	Rubenstein et al. 2008
Ordre Mysida												
<i>Mesopodopsis orientalis</i>	EEP	18	0	94,4	0	5,4	0	0	0,472	0,564	4	Koizumi et al. 2015
<i>Mesopodopsis tenuipes</i>	Hibridació selectiva	32	0	100	0	0	0	0	0,476	0,497	0	Koizumi et al. 2012
<i>Paramysis lacustris</i>	454 NGS	10	0	90	0	10	0	0	ND	ND	0	Audzijonyte et al. 2014
Ordre Stomatopoda												
<i>Oratosquilla oratoria</i>	Hibridació selectiva	11	0	100	0	0	0	0	0,614	0,698	1	Zhang et al. 2012

de la *fitness* i el potencial adaptatiu en front a noves perturbacions (Allentoft i O'Brien 2010) i en conseqüència, a una major probabilitat d'extinció (Markert *et al.* 2010). *A. antennatus* ha estat intensament pescada i sobreexplotada durant més de 70 anys (Sardà *et al.* 2004b) amb un increment progressiu de l'esforç de pesca que s'ha traduït en importants reduccions de la població efectiva i el nombre de captures (Relini i Orsi Relini 1987). Tot i que no hi ha informació temporal de l'evolució de la diversitat genètica de l'espècie en el mar català, els moderats nivells detectats en el present treball mereixen especial atenció perquè poden ser indicatiu de la sobreexplotació del recurs, tal i com han conclòs les diferents avaluacions realitzades per la GFCM a la GSA 6 (secció La gamba rosada *Aristeus antennatus* p. 48); malgrat tot, l'estoc mai s'ha col·lapsat totalment (Fiorentino *et al.* 1998). D'entre les possibles causes de la seva resiliència destaquen la ràpida taxa de creixement i la curta longevitat de vida, l'elevat nombre d'individus que habiten fora de la zona explotada, i l'efecte mitigant de les cascades submarines (Company *et al.* 2008; Gorelli *et al.* 2016). Aquests fenòmens oceanogràfics, que tenen una recurrència aproximada d'entre 6 i 11 anys (Canals *et al.* 2006; Company *et al.* 2008) s'originen quan la massa d'aigua superficial costera de la plataforma continental és més densa que les aigües adjacents, provocant que aquesta massa d'aigua freda s'enfonsi cap als canyons submarins fins a equilibrar-se amb les aigües del voltant (Canals *et al.* 2006). En hiverns secs, ventosos i freds, les cascades submarines són excepcionalment intenses i poden enfonsar-se fins a > 2000 m de profunditat, provocant alteracions de la temperatura, la salinitat i la turbulència de les aigües profundes del nord-oest de la Mediterrània (Company *et al.* 2008). Aquestes anomalies en el medi físic coincideixen en temps i espai amb la desaparició del recurs pesquer de la zona explotada, probablement per un desplaçament dels individus cap a zones més profundes, provocant així el col·lapse temporal (d'entre 1 i 5 mesos) de la pesqueria monoespècífica (Company *et al.* 2008). Contràriament, les cascades submarines fan augmentar la quantitat de nutrients de les capes profundes, afavorint el reclutament de juvenils i preadults durant el segon i tercer any després de la perturbació, cosa que incrementa les captures d'adults de 3 a 5 anys després (Company *et al.* 2008; Gorelli *et al.* 2016).

La comparació de les diversitats observades i esperades de les localitats estudiades a la costa catalana posa de manifest l'elevat nombre de loci amb dèficit d'heterozigots ($F_{IS} > 0$). En conseqüència, això genera fortes desviacions de l'equilibri de Hardy-Weinberg a bona part dels loci microsatèl·lits estudiats tant a la localitat de Blanes (7 dels 28 loci; Capítol 1 de resultats) com a la de Palamós (7 dels 13 loci; Capítol 3 dels resultats). Aquest fenomen no és particular d'*A. antennatus* sinó que s'ha observat reiteradament en altres decàpodes com *P. monodon* (Xu *et al.* 2001; You *et al.* 2008) o *L. vannamei* (Valles-Jimenez *et al.* 2004). Diverses raons poden originar aquest dèficit d'heterozigots, d'entre les quals destaquen l'aparellament entre parents propers (consanguinitat), els al·lèls nuls, els artefactes tècnics, la barreja de poblacions (efecte Wahlund) o la barreja de cohorts ("family" Wahlund effect) (Gaffney *et al.* 1990; Castric *et al.* 2002). La presència d'al·lèls nuls, al·lèls que per diverses raons no amplifiquen per PCR (Dakin i Avise 2004) s'ha suggerit en *P. monodon* (Xu *et al.* 2001) o *Litopenaeus setiferus* (Ball *et al.* 1998). En el present treball, tots els loci amb desviacions de Hardy-Weinberg mostren signes evidents d'al·lèls nuls, utilitzant estimadors de màxima probabilitat combinada basats en l'heterozigositat observada i esperada (Van Oosterhout *et al.* 2004). En general, els al·lèls nuls són presents en un o pocs loci que es mantenen a totes les poblacions analitzades. Així, aquesta podria ser la causa de les desviacions de Hardy-Weinberg dels loci observats als Capítols 1 i 3 dels resultats. La presència d'artefactes com *stuttering bands*, pot produir que erròniament no s'identifiqui un heterozigot que té els dos al·lèls consecutius o propers i sigui considerat homozigot. Aquest fet es dona freqüentment en dinucleòtids a causa del malaparellament de les cadenes durant la PCR. La majoria dels loci microsatèl·lits utilitzats en aquesta tesi tenen aquest període de repetició però el seu patró habitual és d'un sol pic amb baix soroll de fons i no comporta dificultats de lectura (Figura 15). L'efecte Wahlund es refereix a la reducció de l'heterozigositat a causa de la subdivisió poblacional. Aquest efecte es produeix al mostrejar una població subdividida, sempre i quan les freqüències al·lèliques de les subpoblacions siguin diferents. Els individus d'*A. antennatus* analitzats provenen d'un arrossegament de pesca i són seleccionats a l'atzar del total pescat. Es desconeix si l'abundància d'individus al llarg del canyó és homogènia o si existeixen agrupaments puntuals que podrien generar microestructura poblacional. En presència de microestructura poblacional, s'estarien barrejant en un mateix arrossegament de pesca, individus provinents de diferents *pools* gènics, generant així efecte Wahlund.

També existeix la possibilitat que s'estiguin mostrejant cohorts de mascles solapades. Tal i com s'ha descrit a la Introducció General (p. 42), les femelles assoleixen una major mida que els mascles al final del seu cicle vital. De fet, s'hipotetitza que cada classe de mida de les femelles es podria atribuir a una classe d'edat (petites, mitjanes, grans i extra-grans; Sardà i Demestre 1987). Per contra, els mascles romanen a mida petita durant tota l'etapa adulta (Sardà i Demestre 1987) i això pot ocasionar, que dins el total de mascles capturats, trobem individus de diverses edats o cohorts. Finalment, tampoc es pot descartar la possibilitat que les desviacions de l'equilibri de Hardy-Weinberg puguin ser causades per *sweepstakes reproductive success* (SRS), fenomen que succeeix quan només una part de la població contribueix als adults de la següent generació (Hedgcock 1994), com s'ha suggerit a *P. monodon* (Supungul *et al.* 2000) o *L. vannamei* (Valles-Jimenez *et al.* 2004). Les espècies d'invertebrats són especialment sensibles a patir SRS a causa de l'elevada fecunditat dels adults (milions d'ous per posta) i l'elevada mortalitat dels individus en els primers estadis de vida (Hedgcock 1994). A més, *A. antennatus* és pescada intensament durant l'estiu coincidint amb els agregats reproductors a la zona explotada. L'activitat pesquera estival consisteix bàsicament en la captura de femelles de talla gran, les quals tenen alta fecunditat i presenten espermatòfor al telicle. Aquestes femelles, que encara no han alliberat els ous fecundats, no contribuiran al *pool* gènic de la següent generació sinó que només ho faran les no pescades restants. Això podria ocasionar una desviació de les freqüències al·lèliques respecte l'esperat per Hardy-Weinberg.

Pel que fa referència al cicle reproductor dels crustacis, aquest inclou una successió d'esdeveniments que comencen per: 1) la proliferació de les cèl·lules gonadals; 2) la diferenciació i el creixement dels gàmetes; 3) el comportament reproductor associat a l'aparellament; 4) l'alliberament dels gàmetes i la transferència d'esperma en mascles o l'ovulació i l'ovoposició en femelles, i 5) la incubació dels embrions en cambres o enganxats als pèls dels pleopodis (Subramoniam 2016). Aquesta seqüència d'esdeveniments és comuna a tots els crustacis, a excepció d'algunes espècies de gambes de la superfamília Penaeoidea (Omori 1975) com *A. antennatus* i de la família Euphausiidae (Mauchline i Fisher 1969) on els ous fecundats són alliberats directament al medi sense necessitat d'incubació. Generalment, el sistema d'aparellament en crustacis és inferit via marcadors

genètics moleculars mitjançant l'assignació parental de les postes o de la descendència (Yue i Chang 2010; Bailie *et al.* 2011; Jorquera *et al.* 2016). Estudis de laboratori en espècies amb la mateixa biologia reproductiva que *A. antennatus* han permès determinar el seu sistema d'aparellament utilitzant l'assignació parental (*L. vannamei*; Perez-Enriquez i Max-Aguilar 2016). No obstant, els requeriments biològics particulars d'*A. antennatus* han impedit l'obtenció de la descendència dels progenitors capturats, per la impossibilitat de mantenir l'espècie en condicions de captiveri, malgrat alguns intents realitzats al laboratori (comunicació personal de Marina Roldán). Aquesta situació porta a un atzucac on l'única via per estudiar el sistema d'aparellament d'*A. antennatus* és l'anàlisi genètica dels espermatòfors units al telicle de les femelles assumint diverses premisses: a) els resultats faran referència al sistema d'aparellament social de l'espècie ja que el sistema d'aparellament genètic no el podem inferir per manca de descendència, i b) l'estima de la taxa d'aparellaments en mascles estarà esbiaixada a la baixa per la mida mostral. El sistema d'aparellament d'una espècie es pot descriure en termes de comportament social (sistema d'aparellament social) i en termes de contribució genètica (sistema d'aparellament genètic) on el primer fa referència al nombre de còpules entre individus i el segon al nombre de progenitors biològics que originen una posta (Bailie *et al.* 2014). Generalment, l'aparellament genètic i social condueixen a la mateixa conclusió (Mathews 2007; Yue i Chang 2010; Bailie *et al.* 2014), però en algunes espècies la selecció críptica de les femelles després de la còpula ha generat discrepàncies entre els dos enfocaments descrits (Pardo *et al.* 2017).

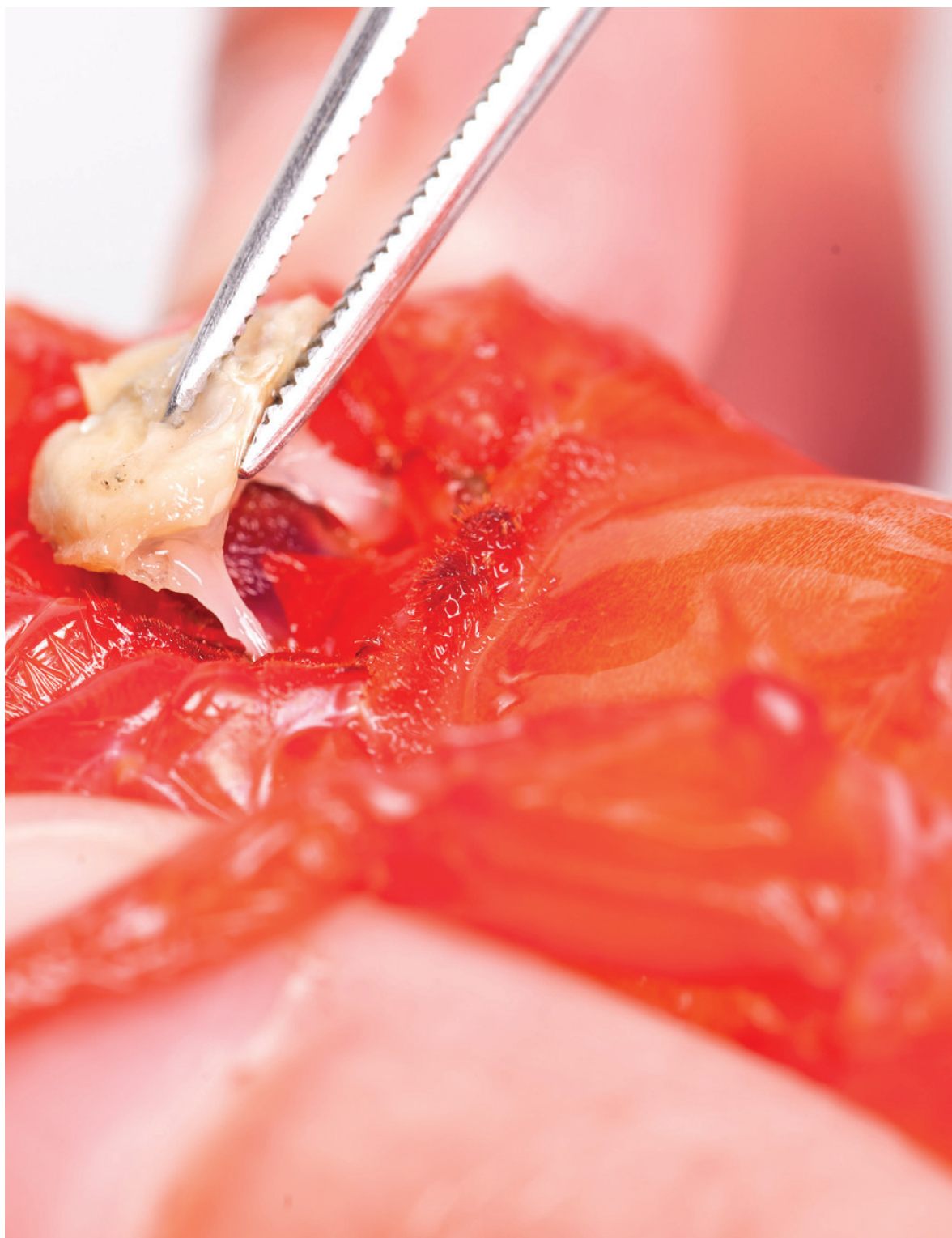
Dins la superfamília Penaeoidea s'observa una elevada diversitat morfològica dels espermatòfors associada a la naturalesa del telicle. Les espècies amb telicle obert com *A. antennatus*, dipositen l'espermatòfor a la zona adjacent al gonòpor femení. L'espermatòfor, format per dos hemiespermatòfors que s'uneixen per una làmina adhesiva en el moment de la deposició en el telicle, són estructures formades per una massa espermàtica envoltada d'una veïna de material gelatinós (capes I, II i III) que s'endureix en contacte amb l'aigua (**Figura 9**). Aquesta veïna, alhora, està envoltada dorsalment per una estructura alar (capa IV) i lateroventralment per una substància enganxosa (capa V), ambdues amb funció fixadora (**Figura 9**; Perez-Farfante 1975; Orsi Relini i Tunesi 1987). La **Figura 20**, mostra com la massa espermàtica de cada hemiespermatòfor embolcallada per les capes I, II

i V (Figura 9) s'insereix dins un dels gonòpors femenins en el moment de la deposició de l'espermatoïfor al telicle. Derivat d'aquest contacte femella-espermatoïfor, cèl·lules de la femella s'adhereixen a la massa espermàtica i són arrossegades quan s'intenta retirar l'espermatoïfor del telicle per al seu posterior estudi. Aquesta barreja de cèl·lules ocasiona que els protocols rutinaris d'extracció de DNA en individus adults (Sambrook *et al.* 1989 amb modificacions) no permetin obtenir un pellet de DNA pur de l'espermatoïfor. Això es tradueix en la presència de més de dos al·lels per locus en una espècie diploide, símptoma inequívoc de la contaminació de DNA (Capítol 2 dels resultats). Aquest fenomen és habitual en casos d'assetjament sexual en humans, on l'enorme quantitat de cèl·lules de la femella emmascaren la detecció del DNA del mascle. Així, durant la PCR, els primers s'uneixen més freqüentment al DNA majoritari i això genera un biaix en el nombre final de còpies entre el DNA de la femella i el DNA del mascle. Com a conseqüència, durant el procés d'electroforesi capil·lar, la forta intensitat del senyal del DNA de la femella oculta el senyal del DNA del mascle (Cerri *et al.* 2003). L'única solució consisteix en realitzar una extracció de DNA diferencial, procés que permet separar les cèl·lules masculines de les femenines per millorar el rendiment de la PCR i obtenir el perfil genètic exclusiu del mascle (Vuichard *et al.* 2011). Existeixen diverses tècniques de separació cel·lular (lisi diferencial, microdissecció amb làser, filtració per membranes i citometria de flux) però la més utilitzada és la lisi diferencial perquè no requereix equipaments específics de laboratori i els resultats són pràcticament immediats (Vuichard *et al.* 2011). Aquesta tècnica inclou un primer pas de lisi moderada que permet descartar la fracció de cèl·lules epitelials enriquides amb DNA de la femella. Posteriorment, es realitza un segon pas de lisi brusca que permet trencar la membrana de les cèl·lules dels espermatozoides i recollir el DNA de l'esperma (Gill *et al.* 1985).

El protocol desenvolupat al Capítol 2 de resultats es basa en aquesta tècnica, però incorpora alguns passos previs a l'extracció de DNA per disgregar eficientment el teixit de l'espermatoïfor amb l'objectiu d'aconseguir un millor aprofitament del DNA de l'esperma. Aquesta metodologia permet aïllar exclusivament el DNA del mascle amb una quantitat suficient per ser amplificada satisfactòriament per PCR i poder, d'aquesta manera, estimar l'estructura poblacional de mascles, l'estratègia reproductiva de l'espècie i el flux gènic. L'aplicació d'aquest protocol d'extracció no és exclusiu només d'*A. antennatus*, sinó que és



Figura 20. Detall de la col·locació de l'espermatòfor al telicle de la femella. A la cara interna de l'espermatòfor s'observa com la massa espermàtica de cada hemiespermatòfor s'insereix dins un gonòpor femení. Fotografia de Francesc Rabat 2017.



aplicable a totes les espècies de la família Penaeoidea amb telicle obert com *L. vannamei*, *Aristaeomorpha foliacea* o *Penaeus setiferus*, gràcies a la similitud morfològica i estructural dels espermatòfors. A més, aquest protocol és també aplicable a alguns gèneres de l'ordre Euphausiacea per analitzar el contingut espermàtic dels espermatòfors o de l'espermateca. L'ordre Euphausiacea, conegut popularment com a krill, constitueix entre el 5 i el 10% del total de la biomassa del plàncton marí (Mauchline i Fisher 1969) i és una peça fonamental per al manteniment de la transferència d'energia entre els nivells tròfics dels ecosistemes marins; per una part, els individus s'alimenten de fitoplàncton i per l'altra, són depredats per una immensa diversitat d'organismes, incloent grans invertebrats, peixos, aus marines, foques o balenes (Azofeifa-Solano *et al.* 2016 i referències incloses). Els gèneres de krill *Thysanopoda*, *Euphausia* i *Meganyctiphanes* alliberen els ous fecundats directament a l'exterior, sense necessitat d'incubació prèvia; fet que també impedeix la captura de la descendència (Guglielmo *et al.* 2015). En aquests crustacis, les cèl·lules de la femella s'adhereixen també a l'espermatòfor o a l'espermateca i són arrossegades al retirar o extirpar les estructures esmentades. El protocol desenvolupat al Capítol 2 de resultats, permet doncs obtenir un DNA pur de cèl·lules espermàtiques sense contaminació amb DNA de la femella, fet que permetria resoldre grans incògnites sobre la biologia reproductiva dels membres de l'ordre Euphausiacea.

El sistema d'aparellament genètic afecta directament la diversitat genètica global d'una població, el biaix en la *ratio* de sexes i la variància en l'èxit reproductor dels individus (Frankham 1995; Frankham *et al.* 2002). A més, també influeix sobre la mortalitat i la taxa de creixement (Anthony i Blumstein 2000) així com la capacitat de recuperació dels estocs en front a l'explotació (Greene *et al.* 1998). La determinació de quina és la millor estratègia reproductiva en una espècie o població està influenciada per tres factors: a) restriccions històriques que fan referència als costos de reproducció i d'aparellament; b) condicions ecològiques que modifiquen els costos i beneficis de la *fitness* dins els límits genètics (pressió de depredació, qualitat i quantitat d'aliment o nombre d'aparellaments disponibles), i c) qualitats individuals que fan variar l'estratègia d'aparellament d'un individu respecte a la d'un altre tenint en compte el seu perfil genètic i el seu desenvolupament (Reyer 1994; Gowaty 2012). En el Capítol 3 dels resultats d'aquesta tesi, s'han utilitzat loci microsatèl·lits

per a descriure el sistema d'aparellament social d'*A. antennatus* a la localitat de Palamós. Els resultats obtinguts indiquen que l'espècie estudiada presenta un sistema d'aparellament basat en la poliginàndria on les femelles s'aparellen amb múltiples mascles i viceversa.

La poliginàndria es dona en espècies de crustacis sense reserva d'esperma, baixa o nul·la cura parental i moderats o alts esforços d'aparellament (Reyer 1994; Jossart *et al.* 2014). En alguns casos, aquesta esdevé promiscuïtat; sobretot en espècies que presenten elevada densitat d'individus a la població i reiteració de postes (Subramoniam 2016). Partint de la idea clàssica de la teoria de la selecció sexual, els mascles maximitzen el seu èxit reproductor incrementant el nombre de còpules (Andersson 1994). Contràriament, l'aparellament múltiple de les femelles pot significar costos en la *fitness* a causa del contagi de malalties o de l'increment del risc de predació entre d'altres (Arnqvist i Nilsson 2000; Rolff i Siva-Jothy 2002; Campbell 2005). Estudis recents contradiuen aquesta hipòtesi per l'elevada freqüència de femelles amb aparellaments múltiples (Jennions i Petrie 2000). Sembla doncs que les femelles també obtenen beneficis directes o indirectes sobre la *fitness* acceptant esperma de múltiples mascles. D'entre els beneficis directes descrits trobem la cura parental, la protecció en front als depredadors, la disminució de lesions físiques i l'adquisició d'espermatòfors rics en nutrients (Zeh i Smith 1985; Davies 1992; Alcock 2002). Tanmateix, en alguns taxons no s'han observat beneficis directes sobre les femelles, suggerint que aquestes podrien rebre beneficis indirectes o genètics sobre la *fitness* de la descendència. Aquests beneficis genètics poden incloure: a) una major probabilitat d'obtenir al·lèls específics relacionats amb l'augment de la *fitness*; b) una major probabilitat d'aconseguir esperma genèticament molt compatible amb el DNA dels oòcits, i c) assegurar la fertilització del 100% de la posta (Plough *et al.* 2014). En espècies de crustacis amb marcat dimorfisme sexual on els mascles són més grans i robustos que les femelles, aquestes utilitzen la poliàndria com a mecanisme per evitar ser lesionades (Subramoniam 2016). Un clar exemple és el de les femelles de la gamba caridea *Rhynchocinetes typus* que per evitar ser sotmeses a l'ús de la força, accepten esperma de múltiples mascles (subordinats i robustos) però posteriorment seleccionen els espermatòfors dels mascles robustos per a fertilitzar els oòcits (Baillie *et al.* 2014). Aparentment, aquesta no sembla ser la raó que explica l'aparellament múltiple de les femelles d'*A. antennatus*, perquè la mida d'aquestes

és igual o superior a la dels mascles reproductors i, per tant, fa difícil entreveure que els mascles puguin danyar físicament les femelles per aconseguir una còpula. L'explicació més plausible, es basa doncs, en els beneficis genètics que aporta a la descendència, incrementant la supervivència i l'èxit reproductor de la mateixa gràcies a l'augment de l'heterozigositat (Kokko *et al.* 2003; Neff i Pitcher 2005). En diverses espècies de crustacis amb transferència d'esperma via espermatòfors, s'ha observat que els mascles que realitzen còpules successives en poc espai de temps, presenten espermatòfors buits o amb poca quantitat d'esperma a partir de la segona còpula. Això promou l'aparellament múltiple de les femelles per assegurar la fertilització de tots els oòcits (Van Son i Thiel 2006). La freqüència observada d'aparellaments múltiples en femelles d'*A. antennatus* és de l'11,5%, similar a l'observada en altres decàpodes com *H. americanus* (13%; Gosselin *et al.* 2005) i no hi ha cap dada que indiqui un possible biaix com a conseqüència de la pèrdua d'espermatòfors dobles o triples durant l'arrossegament de pesca. Les dificultats observades al laboratori per separar els múltiples espermatòfors entre ells descarten aquesta hipòtesi. Matissar però, que s'han observat alguns espermatòfors desenganxar-se de les femelles durant la classificació dels exemplars a bord, però és equiprobable que aquest fet succeeixi en espermatòfors simples o múltiples.

Estudis genètics en la gamba fantasma, *Callichirus islagrande*, han confirmat aportacions genètiques de diversos mascles a les postes tot i l'absència de receptacle seminal (Bilodeau *et al.* 2005). En conseqüència, les femelles d'*A. antennatus* amb múltiples espermatòfors al telicle podrien també tenir paternitat múltiple de les postes. En alguns casos però, la disposició en tàndem i la forta adherència de les capes mucilaginoses del segon espermatòfor respecte al primer o del tercer respecte al segon, fan difícil d'imaginar l'alliberament de la massa espermàtica d'aquests espermatòfors alhora de fecundar els oòcits. Contràriament, alguns espermatòfors dobles comparteixen el telicle a parts iguals, és a dir, cadascun dels espermatòfors fixa un hemiespermatòfor a la zona adjacent al gonòpor femení i l'altre hemiespermatòfor fora d'aquesta zona. El resultat és doncs que cada mascle insereix la massa espermàtica d'un hemiespermatòfor dins un dels dos gonòpors femenins, lloc on aparentment sembla que es fecundarien els oòcits, fent plausible l'existència de paternitat múltiple en *A. antennatus*.

El resultat de l'anàlisi genètica ha permès detectar el mateix material genètic en diversos espermatòfors de diferents femelles, identificant així que un mascle s'ha aparellament amb múltiples femelles. Malgrat l'elevat potencial d'identitat del panell de loci microsatèl·lits utilitzats, detectar la poliginia mitjançant marcadors moleculars en una espècie marina d'aquestes característiques és molt complex, ja que es requereix una mostra de femelles molt gran per localitzar dos o més espermatòfors provinents d'un mateix mascle. En conseqüència, la taxa d'aparellaments múltiples estimada pot estar dràsticament esbiaixada a causa de la mida mostral i del tipus de mostreig. Com es detalla a la Introducció General (p. 15-16), existeixen diversos tipus de poliginia que difereixen en si els mascles ofereixen territori o recursos alimentaris a les femelles o bé si aquests només competeixen entre ells per la màxima rapidesa en la cerca de noves còpules (*pure searching*) (Subramoniam 2016). En espècies on la femella està receptiva durant un curt període de temps i la *ratio* de sexes està esbiaixada cap als mascles, és freqüent que els mascles desenvolupin comportaments de guarda de les femelles i els ofereixin contraprestacions per assegurar la còpula. En aquests casos, els mascles són de mida igual o superior al de les femelles reproductores, presenten quelícers ben desenvolupats per defensar-se d'altres mascles i mostren un comportament agressiu en front als conespecífics (Bauer i Abdalla 2001 i referències incloses). Aquest comportament de guarda no s'ha observat mai en gambes de la superfamília Penaeoidea (Bauer 1996). De fet, en la majoria d'espècies d'aquesta superfamília, els mascles no estan adaptats als comportaments de guarda, a conseqüència de la mida reduïda en comparació a la de les femelles, la manca d'agressivitat en front als conespecífics i la inexistència de quelícers desenvolupats (Bauer i Abdalla 2001 i referències incloses). En espècies on és freqüent trobar-se amb conespecífics, l'estratègia del *pure searching*, amb mascles molt mòbils i que constantment busquen femelles és una de les més abundants. Si la femella trobada pel mascle està receptiva, es produeix l'aparellament; per contra, si no ho està, el mascle immediatament marxa i va a buscar altres femelles (Bauer i Abdalla 2001). Els nostres resultats semblen indicar una estratègia de *pure searching* en els mascles. Aquesta hipòtesi es fonamenta, per una banda, en l'elevada freqüència de femelles en els agregats reproductors i, per l'altra banda, en la morfologia dels mascles. Aquesta estratègia d'aparellament en mascles, s'ha detectat en altres gambes de la superfamília Penaeoidea com *Sicyonia dorsalis* (Bauer 1996) o *Palaemonetes pugio* (Bauer i Abdalla 2001),

dues espècies amb una biologia poblacional similar a la d'*A. antennatus*. Els mascles de *S. dorsalis*, un cop localitzada una femella, la persegueixen fins a tocar-la per darrera, col·locant una antena a cada costat del seu abdomen. Seguidament neden en tàndem durant pocs segons fins al moment de la còpula quan el mascle es mou per davant de la femella i inclina l'abdomen d'aquesta cap a dalt, de manera que els genitals del mascle s'oposen als de la femella i així li transfereix l'esperma. Després el mascle marxa en busca de noves oportunitats (Bauer 1996).

El sistema d'aparellament d'una espècie pot variar espacial i temporalment ja que els canvis en el comportament dels individus són la primera manifestació observable de les condicions canviants del medi (Sainte-Marie *et al.* 2002; Gosselin *et al.* 2005; Neff *et al.* 2008; Diaz Pauli i Sih 2017). Per això, ciències com l'ecologia, l'evolució o la conservació consideren un aspecte clau la comprensió de les respostes de les poblacions en front als canvis en el medi (Diaz Pauli i Sih 2017). Aquests canvis poden ser deguts a múltiples factors com el canvi climàtic, la presència d'espècies invasores, la pressió de depredació o la pesca selectiva (Diaz Pauli i Sih 2017). Hi ha escassos estudis publicats en crustacis sobre la variació del sistema d'aparellament dels estocs a conseqüència de perturbacions ambientals o antropogèniques. Un d'ells és el realitzat per Gosselin *et al.* (2005) que van observar diferències significatives entre localitats en les taxes de paternitat múltiple d'*H. americanus*, com a conseqüència de la pesca selectiva dels mascles de talla gran en algunes zones. La pesca selectiva pot fer variar la *ratio* de sexes i interferir en el sistema d'aparellament, les oportunitats de trobar parella i la selecció de parella (Smith i Jamieson 1991; Chapman *et al.* 2004). En base al descrit anteriorment, cal estudiar el sistema d'aparellament d'*A. antennatus* en altres localitats de l'àrea de distribució de l'espècie per identificar quins són els possibles factors que influeixen sobre la dinàmica reproductiva de l'espècie i com poden afectar a la sostenibilitat del recurs pesquer a llarg termini.

La selecció sexual ocorre quan no hi ha aparellament o fecundació a l'atzar i és a conseqüència de la selecció de parella o de la competència entre sexes per l'aparellament (Andersson 1994). Existeix una certa tendència a creure que els mascles competeixen per l'atenció de les femelles i aquestes escullen (Bateman 1948). Tanmateix, cada vegada és més

evident que els rols de sexes poden ser dinàmics i variables. De fet, la selecció de parella per part dels mascles s'ha observat fins i tot en espècies on aquests no realitzen cura parental de la descendència (Bonduriansky 2001). Els resultats descrits en el Capítol 3 suggereixen que hi podria haver selecció sexual precòpula o postcòpula a favor de l'aparellament entre individus genèticament dissimilars. Aquesta estratègia aporta beneficis perquè augmenta la diversitat genètica i redueix el risc de consanguinitat alhora que assegura uns genotips de la descendència que permeten fer front a perturbacions ambientals (Yasui 1998; Jennions i Petrie 2000). El condicionament de la paternitat de les postes en funció de la *relatedness* s'ha detectat en diverses espècies de crustacis, com per exemple el percebe *Pollicipes elegans*, on s'ha observat una selecció sexual postcopulatòria de les femelles en funció del major grau de parentiu (Plough *et al.* 2014). El control de la fecundació per part de les femelles engloba múltiples estratègies precopulatòries i postcopulatòries incloent la còpula fallida, el desplaçament d'espermatozòs, la selecció d'esperma, l'ajust de la durada del període fèrtil, la copulació retardada o la inversió reproductora diferencial a favor dels mascles preferits (Dennenmoser i Thiel 2015). Aquest últim aspecte, des d'un punt de vista genètic, origina una contribució desigual dels mascles a la descendència (Dennenmoser i Thiel 2015). Per altra part, els mascles també poden exercir control precopulatori o postcopulatori de la fecundació, acceptant o rebutjant l'aparellament amb determinades femelles, aplicant una distribució d'esperma desigual segons els trets distintius de la femella o realitzant una cura parental desigual de les postes (Edward i Chapman 2011). Tenint en compte que *A. antennatus* presenta fecundació externa, la selecció críptica de les femelles postcòpula es podria donar pel desplaçament d'espermatozòs del telicle tal i com s'ha descrit en la gamba *R. typus*, una espècie amb una biologia molt similar a la d'*A. antennatus* (Dennenmoser i Thiel 2008). Els mascles, per la seva part, i tenint en compte l'esmentat anteriorment sobre la hipòtesi del *pure searching mating system* podrien realitzar una selecció críptica precopulatòria regulant la quantitat d'esperma transferit segons cada femella.

La presència de selecció de parella obre la porta a noves preguntes sobre quin o quins mecanismes permeten a *A. antennatus* discriminar entre individus genèticament propers i llunyans. L'ordre Decapoda utilitza tres tipus bàsics de sistemes de comunicació intraespecífica i interespecífica: a) a través de missatgers químics (p.ex. feromones); b) per

contacte o senyals visuals, i c) per combinació dels dos sistemes anteriors. Aquests senyals són captats per les antenes, antènules, els tercers maxil·lípedes i els pleopodis anteriors abans de ser processats (Bauer 2011). Els missatgers químics són utilitzats per moltes espècies de l'ordre Decapoda per obtenir informacions variades sobre altres individus i discriminar, per exemple, si un individu és o no la parella, si una femella està en premuda o postmuda o si l'individu és familiar o no familiar (Ward *et al.* 2004; Zhang i Lin 2006; Vickery *et al.* 2012). Tot i que no es coneix on es produeixen aquests missatgers químics és probable que se secretin via l'orina a través dels nefròporus (Bauer 2011). Algunes espècies que emeten aquests missatgers poden generar corrents d'aigua per tal d'emetre o rebre aquestes substàncies amb més eficiència i rapidesa. El reconeixement per feromones de contacte és molt utilitzat en espècies amb aparellament per *pure searching* (Wickler i Seibt 1981; Bauer 2004, 2011) on els mascles reconeixen les parelles potencials a través de glúcids de membrana reconeguts per lectines (Lonsdale *et al.* 1998; Caskey *et al.* 2009). Finalment, algunes espècies de l'ordre Decapoda amb ulls compostos ben desenvolupats com *Atya innocuous*, utilitzen senyals visuals per identificar la parella entre la resta d'individus de la població (Felgenhauer i Abele 1982). Tot i que actualment es coneixen els trets bàsics de la comunicació social en aquest ordre, queda molt per investigar. De fet, fins a dia d'avui no s'han estudiat els mecanismes concrets que permeten el reconeixement de parents o no parents en gambes de l'ordre Decapoda, tot i que s'han descrit espècies que discriminen en funció d'aquesta característica (Chak *et al.* 2015). La gamba *Synalpheus regalis*, per exemple, identifica els membres de la colònia (familiars) i d'aquesta forma, els residents de la colònia foragiten als forasters amb l'ús de la força (Duffy *et al.* 2002).

Els patrons de dispersió dels individus adults d'*A. antennatus* són pràcticament desconeguts i les conclusions que es poden extreure del present treball són limitades en base a la informació disponible (Capítol 3 dels resultats). Els mètodes genètics ofereixen una aproximació de com la dispersió dels individus es tradueix en flux gènic. Diferències en la dispersió de sexes a curt termini poden ser indirectament testades utilitzant loci microsatèl·lits; tanmateix aquesta senyal genètica desapareix quan l'individu dispersant s'aparella a conseqüència de la segregació mendeliana dels marcadors biparentals (Goudet *et al.* 2002). Quan un sexe és dispersant, els individus d'aquest sexe capturats

en un punt de mostreig són una combinació de residents i immigrants, la qual cosa genera un dèficit d'heterozigots (F_{IS} més elevada que el sexe filopàtric) per efecte Wahlund (Goudet *et al.* 2002). També s'espera una freqüència elevada de genotips rars que es detecten per valors negatius de l'índex mA/c (Prugnolle i de Meeus 2002) i valors elevats de la variància vA/c (Favre *et al.* 1997). Per aquesta mateixa raó, la dispersió d'un dels sexes comporta baixa *relatedness* (r) i diferenciació intrapoblacional (F_{ST}) (Goudet *et al.* 2002; Prugnolle i de Meeus 2002).

En el nostre estudi, la mesura de la F_{ST} intrapoblacional conjuntament amb el DAPC van indicar que hi ha diferències evidents entre les femelles i els mascles copuladors inferits via espermatòfors. Això sumat a l'absència de diferenciació genètica entre les femelles i els mascles adults residents mostrejats, indicà una possible major dispersió dels mascles copuladors que englobaria tant mascles residents com immigrants (Capítol 3 dels resultats). Destacar, però, que els resultats obtinguts són preliminars ja que cal ampliar l'estudi a diverses localitats de la costa catalana per poder estimar amb garanties la dispersió desigual de sexes, a partir dels índex d'assignació i dels descriptors globals d'estructura poblacional.

Remarcar finalment, la necessitat d'incorporar coneixements sobre l'ecologia i l'evolució de les espècies a la conservació de les mateixes, perquè l'absència d'aquests elements bàsics ha estat la principal causa de la inefectivitat en els plans de maneig i la recuperació d'estocs explotats (Rowe i Hutchings 2003; Ishida *et al.* 2009). La manca de coneixements sobre els patrons i processos relacionats amb els sistemes d'aparellament dificulta la comprensió de com les activitats antropogèniques influeixen sobre la resistència i la resiliència de les espècies comercialment explotades en front a una forta davallada de la població. Cal insistir doncs, en incorporar el sistema d'aparellament a l'avaluació dels recursos pesquers tal i com s'està fent amb les dades ambientals. Aquest coneixement pot ser utilitzat per avaluar els riscos d'aplicar unes o altres opcions de maneig en els programes de conservació i assegurar que la pesca no està incidint sobre la *ratio* de sexes operacional ni reduint la variabilitat genètica i fenotípica de les espècies de forma significativa (Rowe i Hutchings 2003).

CONCLUSIONS GENERALS

CONCLUSIONS GENERALS

En el present treball s'han desenvolupat i aplicat loci microsatèl·lits en la gamba rosada, *Aristeus antennatus*, per a l'estudi de la dinàmica reproductiva de l'espècie. Dels resultats obtinguts se n'extreuen les següents conclusions:

1. La seqüenciació massiva del genoma d'*A. antennatus* mitjançant la plataforma de piroseqüenciació 454 de Roche ha permès desenvolupar, validar i caracteritzar 35 nous loci microsatèl·lits polimòrfics d'un total de 97 loci putatius inicials (36% d'èxit).

2. Els 35 loci polimòrfics descrits no mostren desequilibri de lligament, presenten una variabilitat mitjana de 4,8 al·lels per locus i una heterozigositat mitjana observada i esperada de 0,350 i 0,521, respectivament, a la localitat de referència caracteritzada (Mediterrani occidental). Pel que fa al potencial d'aquests loci, la probabilitat d'exclusió combinada en l'assignació parental és del 0,979 i la probabilitat d'identitat és del 0,999.

3. Aquests loci són un grup d'eines genètiques útils per a: a) realitzar estudis de parentiu; b) examinar els patrons de connectivitat horitzontal i vertical, i c) determinar l'estructura poblacional de l'espècie a diferents escales geogràfiques i batimètriques. Aquesta contribució ajudarà a la gestió responsable i sostenible d'aquest recurs marí explotat, mitjançant una estratègia viable de vigilància genètica temporal.

4. S'ha desenvolupat un mètode d'extracció de DNA diferencial fiable i no invasiu, per tal d'aïllar el DNA masculí contingut en els espermatòfors d'*A. antennatus* units al telicle de les femelles. Aquest protocol proporciona un pellet de DNA pur, de suficient qualitat i quantitat per ser amplificat per PCR i poder garantir un correcte genotipatge dels mascles.

5. Aquest protocol d'extracció, que permet obtenir indirectament el genotip dels mascles reproductors d'*A. antennatus* a través de l'espermatòfor, es pot utilitzar per estimar l'estructura genètica de la població de mascles, l'estratègia reproductiva de l'espècie i el flux gènic en poblacions naturals per tal de garantir mesures adequades per a la conservació sostenible del recurs pesquer.

6. La similitud morfològica i fisicoquímica dels espermatòfors de gambes amb telicle obert de l'ordre Decapoda suggereix que el protocol d'extracció de DNA diferencial desenvolupat en la present tesi podria aplicar-se també a poblacions naturals d'altres espècies d'aquest ordre. Alhora que també pot ser utilitzat per seleccionar mascles reproductors amb patrons genètics rellevants per a programes de reproducció selectiva. Finalment, aquesta metodologia pot servir per a estudis sobre la biologia reproductiva d'espècies de l'ordre Euphausiacea on alguns gèneres presenten transferència d'esperma via espermatòfors i receptacle seminal.

7. Els resultats obtinguts de l'aplicació dels 13 loci microsatèl·lits a la localitat model d'estudi, proporcionen clares evidències de l'existència de poliginàndria en *A. antennatus*, fruit dels aparellaments múltiples detectats tant en mascles com en femelles. Aquesta troballa és la primera notícia del sistema d'aparellament de l'espècie.

8. Les anàlisis de *relatedness*, juntament amb la F_{ST} i la DAPC suggereixen que l'aparellament no és a l'atzar, sinó que hi podria haver selecció sexual a favor d'aparellaments entre individus genèticament dissimilars. Aquesta aparent capacitat

d'*A. antennatus* per seleccionar parella, obre noves vies de recerca per explorar els possibles mecanismes que permeten a les espècies discriminar entre individus genèticament propers i llunyans.

9. Els resultats obtinguts sobre la dinàmica reproductiva d'*A. antennatus* proporcionen informació rellevant de la biologia de l'espècie, que pot ser fonamental per a la correcta redacció d'estratègies de conservació i gestió del recurs pesquer. Tanmateix, la dinàmica reproductiva d'una espècie pot variar entre poblacions a causa de factors com el canvi climàtic, la presència d'espècies invasores, la pressió de depredació o la pesca selectiva, els quals incideixen directament sobre la fecunditat, la supervivència dels individus, la *ratio* de sexes, la disponibilitat d'aparellaments o la selecció de parella. Per això, cal una recerca addicional en altres poblacions naturals de l'espècie per descriure variacions en el seu sistema d'aparellament, amb l'objectiu d'identificar quins són els factors causants d'aquestes variacions i com poden afectar a la sostenibilitat del recurs pesquer a llarg termini.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abdelkrim J, Robertson BC, Stanton JAL, Gemell NJ (2009) Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *BioTechniques* 46: 185-192.
- Abdul-Aziz MA, Schöfl G, Mrotzek G, Haryanti H, Sugama K, Saluz HP (2015) Population structure of the Indonesian giant tiger shrimp *Penaeus monodon*: A window into evolutionary similarities between paralogous mitochondrial DNA sequences and their genomes. *Ecology and Evolution* 5: 3570-3584.
- Abreu NMN, Marçal I, Duarte AB, Pitombo FB, Vilasboa A, Gusmão J (2016) Microsatellite markers for barnacle studies: Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the invasive barnacle *Megabalanus coccopoma* (Darwin, 1854) and its cross-amplification in the Southern Atlantic endemic species *Megabalanus vesiculosus* (Darwin, 1854). *Biochemical Systematics and Ecology* 66: 224-228.
- Adams JU (2008) DNA sequencing technologies. *Nature Education* 1: 193.
- Alcock J (1980) Natural selection and mating systems of solitary bees. *American Scientist* 68:146-153.
- Alcock J (2002) *Animal Behavior: An Evolutionary Approach*, 7th edn. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692-4693.
- Allentoft ME, O'Brien J (2010) Global amphibian declines, loss of genetic diversity and fitness: A review. *Diversity* 2: 47-71.
- Anand S, Mangano E, Barizzone N, Bordoni R, Sorosina M, Clarelli F, Corrado L, Boneschi FM, D'Alfonso S, De Bellis G (2016) Next generation sequencing of pooled samples: Guideline for variants' filtering. *Scientific Reports* 6: 33735.
- Anderson AD, Weir BS (2007) A maximum-likelihood method for estimation of pairwise relatedness in structured populations. *Genetics* 176: 421-440.
- Andersson MB (1994) *Sexual Selection*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Andrés JA, Bogdanowicz SM (2012) Isolating microsatellite loci: Looking back, looking ahead. In: Orgogozo V, Rockman M, eds. *Molecular Methods for Evolutionary Genetics: Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, volume 772. Humana Press, Clifton, pp. 211-232.
- Anthony LL, Blumstein DT (2000) Integrating behaviour into wildlife conservation: the multiple ways that behaviour can reduce N_e . *Biological Conservation* 95: 303-315.

- Arce SM, Moss SM, Argue BJ (2000) Artificial insemination and spawning of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Implications for a selective breeding program. Spawning and maturation of aquaculture species. UJNR Technical Report 28: 5-8.
- Arcot SS, Wang Z, Weber JL, Deininger PL, Batzer MA (1995) Alu repeats: A source for the genesis of primate microsatellites. *Genomics* 29: 136-144.
- Arculeo M, Pellerito R, Bonhomme F (2010) Isolation and use of microsatellite loci in *Melicertus kerathurus* (Crustacea, Penaeidae). *Aquatic Living Resources* 23: 103-107.
- Armour JAL, Povey S, Jeremiah S, Jeffreys AJ (1990) Systematic cloning of human minisatellites from ordered array charomid libraries. *Genomics* 8: 501-512.
- Arnqvist G, Nilsson T (2000) The evolution of polyandry: Multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behaviour* 60: 145-164.
- Arrobas I, Ribeiro-Cascalho A (1987) On the biology and fishery of *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) in the South Portuguese coast. *Investigación Pesquera* 51: 233-243.
- Asakura A (2009) The evolution of mating systems in decapod crustaceans. In: Martin JW, Crandall KA, Felder DL, eds. *Decapod Crustacean Phylogenetics*. CRC Press, New York, pp. 121-182.
- Audzijonyte A, Haugstetter J, Arbačiauskas K (2014) Characterization of ten polymorphic microsatellite markers in an invasive Ponto-Caspian mysid crustacean *Paramysis lacustris*. *Conservation Genetic Resources* 6: 309-311.
- Avery OT, MacLeod CM, McCarty M (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *Journal of Experimental Medicine* 79: 137-157.
- Avise JC (1998) Conservation genetics in the marine realm. *Journal of Heredity* 89: 377-382.
- Avise JC (2004) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, 2nd edn. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Azofeifa-Solano JC, Corrales-Ugalde M, Castellanos-Osorio I, Morales-Ramírez A (2016) Euphausiids (Crustacea: Euphausiacea) from a hotspot of marine biodiversity, Isla de Coco, Costa Rica, Eastern Tropical Pacific. *Revista de Biología Tropical* 64: 221-230.
- Bagshaw JC, Buckholt MA (1997) A novel satellite/microsatellite combination in the genome of the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. *Gene* 184: 211-214.
- Baillie DA, Hynes R, Prodöhl PA (2011) Genetic parentage in the squat lobsters *Munida rugosa* and *M. sarsi* (Crustacea, Anomura, Galatheididae). *Marine Ecology Progress Series* 421: 173-182.
- Baillie DA, Fitzpatrick S, Connolly M, Thiel M, Hynes R, Prodöhl PA (2014) Genetic assessment of parentage in the caridean rock shrimp *Rhynchocinetes typus* based on microsatellite markers. *Journal of Crustacean Biology* 34: 658-662.
- Ball AO, Leonard S, Chapman RW (1998) Characterization of (GT)_n microsatellites from native white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Molecular Ecology* 7: 1251-1253.
- Ball AO, Chapman RW (2003) Population genetic analysis of white shrimp, *Litopenaeus setiferus*, using microsatellite genetic markers. *Molecular Ecology* 12: 2319-2330.
- Balloux F, Brünnner H, Lugon-Moulin N, Hausser J, Goudet J (2000) Microsatellites can be misleading: An empirical and simulation study. *Evolution* 54: 1414-1422.

- Baranski M, Gopikrishna G, Robinson NA, Katneni VK, Shekhar MS, Shanmugakarthish J, Jothivel S, Gopal C, Ravichandran P, Kent M, Arnyasi M, Ponniah AG (2014) The development of a high density linkage map for black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) based on cSNPs. *Public Library of Science One* 9: e85413.
- Baratti M, Filippelli M, Messana G, Papetti C, Patarello T, Zane L (2009) Characterization of polymorphic microsatellite loci in the marine isopod *Sphaeroma terebrans* (Crustacea, Isopoda). *Molecular Ecology Resources* 9: 1229-1231.
- Barbosa M, Connolly SR, Hisano M, Dornelas M, Magurran AE (2012) Fitness consequences of female multiple mating: A direct test of indirect benefits. *BioMed Central Evolutionary Biology* 12: 185.
- Bateman AJ (1948) Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* 2: 349-368.
- Bateson W (1902) *Mendel's Principles of Heredity; a Defence*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Bauer RT (1986a) Sex change and life history pattern in the shrimp *Thor manningi* (Decapoda: Caridea): A novel case of partial protandric hermaphroditism. *The Biological Bulletin* 170: 11-31.
- Bauer RT (1986b) Phylogenetic trends in sperm transfer and storage complexity in decapod crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* 6: 313-325.
- Bauer RT (1996) A test of hypotheses on male mating systems and female molting in decapod shrimp, using *Sicyonia dorsalis* (Decapoda: Penaeoidea). *Journal of Crustacean Biology* 16: 429-436.
- Bauer RT (2004) *Remarkable Shrimp: Adaptations and Natural History of the Carideans*. University of Oklahoma Press, Norman, Oklahoma, USA.
- Bauer RT (2011) Chemical communication in decapod shrimps: the influence of mating and social systems on the relative importance of olfactory and contact pheromones. In: Breithaupt T, Thiel M, eds. *Chemical Communication in Crustaceans*. Springer, New York, pp. 277-296.
- Bauer RT, Abdalla JH (2001) Male mating tactics in the shrimp *Palaemonetes pugio* (Decapoda, Caridea): Precopulatory mate guarding vs. pure searching. *Ethology* 107: 185-199.
- Bauer RT, Thiel M (2011) First description of pure-searching mating system and protandry in the shrimp *Rhynchocinetes uritai* (Decapoda: Caridea). *Journal of Crustacean Biology* 31: 286-295.
- Bechtol WR, Kruse G (2009) Analysis of a stock-recruit relationship for red king crab off Kodiak Island, Alaska. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management and Ecosystem Science* 1: 29-44.
- Belk D (1991) Anostracan mating behaviour: A case of scramble-competition polygyny. In: Bauer RT, Martin JW, eds. *Crustacean Sexual Biology*. Columbia University Press, New York, pp. 111-125.
- Ben-Horin T, Iacchi M, Selkoe KA, Mai TT, Toonen RJ (2009) Characterization of eight polymorphic microsatellite loci for the California spiny lobster, *Panulirus interruptus* and cross-amplification in other achelate lobsters. *Conservation Genetics Resources* 1: 193-197.
- Bensch A, Gianni M, Gréboval D, Sanders J, Hjort A (2009) Worldwide review of bottom fisheries in the high seas. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper* 522: 1-145.
- Benson G (1999) Tandem repeats finder: A program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 27:573-580.
- Benzie JAH (2000) Population genetic structure of penaeid prawns. *Aquaculture Research* 31: 95-119.
- Bilodeau AL, Felder DL, Neigel JE (2005) Multiple paternity in the thalassinidean ghost shrimp, *Callinectes islagrande* (Crustacea: Decapoda: Callinassidae). *Marine Biology* 146: 381-385.

- BOE - Boletín Oficial del Estado (2001) Orden A-201-23093, de 7 de diciembre, por la que se regula el registro de marcas en España. Sección I. 294, 45579-45603 [Electronic Version]. Cited 4 June 2017. Available from: <https://www.boe.es/boe/dias/2001/12/08/pdfs/A45579-45603.pdf>
- BOE - Boletín Oficial del Estado (2013) Orden AAA/923/2013, de 16 de mayo, por la que se regula la pesca de gamba rosada (*Aristeus antennatus*) con arte de arrastre de fondo en determinadas zonas marítimas próximas a Palamós. Sección III. 126, 40016-40022 [Electronic Version]. Cited 4 June 2017. Available from: <https://www.boe.es/boe/dias/2013/05/27/pdfs/BOE-A-2013-5555.pdf>
- Bonduriansky R (2001) The evolution of male mate choice in insects: A synthesis of ideas and evidence. *Biological Reviews* 76: 305-339.
- Boulton R, Shuker DM (2015) The costs and benefits of multiple mating in a mostly monandrous wasp. *Evolution* 69: 939-949.
- Boyle EA, Thaler AD, Jacobson A, Plouviez S, Van Dover CL (2013) Characterization of 10 polymorphic microsatellite loci in *Munidopsis lauensis*, a squat-lobster from the Southwestern Pacific. *Conservation Genetics Resources* 5: 647-649.
- Brooker AL, Benzie JAH, Blair D, Versini JJ (2000) Population structure of the giant tiger prawn *Penaeus monodon* in Australian waters, determined using microsatellite markers. *Marine Biology* 136: 149-157.
- Brusca RC, Brusca GJ (2003) *Invertebrates*, 2nd edn. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Burton RS (2009) Molecular markers, natural history, and conservation of marine animals. *BioScience* 59: 831-840.
- Buschiazzo E, Gemmell NJ (2006) The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *BioEssays* 28: 1040-1050.
- Butler JM, Ruitberg CM, Vallone PM (2001) Capillary electrophoresis as a tool for optimization of multiplex PCR reactions. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 369: 200-205.
- Campbell JF (2005) Fitness consequences of multiple mating on female *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology* 34: 833-843.
- Canals M, Puig P, de Madron XD, Heussner S, Palanques A, Fabres J (2006) Flushing submarine canyons. *Nature* 444: 354-357.
- Cannas R, Buccoli S, Sacco F, Marcias S, Salvadori S, Cau A, Deiana A (2008) Isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite markers for the blue and red shrimp, *Aristeus antennatus* (Crustacea, Decapoda). *Molecular Ecology Resources* 8: 1420-1422.
- Cannas R, Marcias S, Sacco F, Cau A, Deiana AM (2012a) First isolation and characterization of genomic SSR markers for the giant red shrimp *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1827). *Genetics and Molecular Research* 11: 2745-2748.
- Cannas R, Sacco F, Follesa MC, Sabatini A, Arculeo M, Lo Brutto S, Maggio T, Deiana AM, Cau A (2012b) Genetic variability of the blue and red shrimp *Aristeus antennatus* in the Western Mediterranean Sea inferred by DNA microsatellite loci. *Marine Ecology* 33: 350-363.
- Carbonell A, Grau A, Lauronce V, Gómez C (2006) Ovary development of the red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) from the Northwestern Mediterranean Sea. *Crustaceana* 79: 727-743.

- Carbonell A, Dos Santos A, Alemany F, Vélez-Belchi P (2010) Larvae of the red shrimp *Aristeus antennatus* (Decapoda: Dendrobranchiata: Aristeidae) in the Balearic Sea: New occurrences fifty years later. *Marine Biodiversity Records* 3: 1-4.
- Carson C, Garvin A, Gorman K (2012) Automated processing of sexual assault cases using selective degradation [Electronic Version]: Final Technical Report. Cited 13 January 2016. Available from: <https://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/grants/241332.pdf>
- Cartes JE, Sardà F (1989) Feeding ecology of the deep-water aristeid crustacean *Aristeus antennatus*. *Marine Ecology Progress Series* 54: 229-238.
- Cartes JE, Demestre M (2003) Estimating secondary production in the deep-water shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) in the Catalano-Balearic Basin (Western Mediterranean). *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* 31: 355-361.
- Caskey JL, Hasenstein KH, Bauer RT (2009) Studies on contact sex pheromones of the caridean shrimp *Palaemonetes pugio*: I. Cuticular hydrocarbons associated with mate recognition. *Invertebrate Reproduction and Development* 53: 93-103.
- Castaño CM (2016) MSC Pre-assessment for Palamós red shrimp otter trawl fishery [Electronic Version]: Project Medfish-Spain Final Report. Cited 25 June 2017. Available from: <https://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/grants/241332.pdf>
- Castric V, Bernatchez L, Belkhir K, Bonhomme F (2002) Heterozygote deficiencies in small lacustrine populations of brook charr *Salvelinus fontinalis* Mitchell (Pisces, Salmonidae): A test of alternative hypotheses. *Heredity* 89: 27-35.
- Cau A, Carbonell A, Follesa MC, Mannini A, Norrito G, Orsi-Relini L, Politou CY, Ragonese S, Rinelli P (2002) MEDITS-based information on the deep-water red shrimps *Aristaeomorpha foliacea* and *Aristeus antennatus* (Crustacea: Decapoda: Aristeidae). *Scientia Marina* 66: 103-124.
- Cerri N, Ricci U, Sani I, Verzeletti A, de Ferrari F (2003) Mixed stains from sexual assault cases: Autosomal or Y-chromosome short tandem repeats? *Croatian Medical Journal* 44: 289-292.
- Cesari M, Luchetti A, Scanabissi F, Mantovani B (2007) Genetic variability in European *Leptostheria dahalacensis* (Rüppel, 1837) (Crustacea, Branchiopoda, Spinicaudata). *Hydrobiologia* 586: 249-260.
- Chak STC, Bauer R, Thiel M (2015) Social behaviour and recognition in decapod shrimps with emphasis on the Caridea. In: Aquiloni L, Tricarico E, eds. *Social Recognition in Invertebrates: The Knowns and the Unknowns*. Springer, Cham, pp. 57-84.
- Chamberlain GW, Johnson SK, Lewis DH (1983) Swelling and melanization of the male reproductive system of captive adult penaeid shrimp. *Journal of the World Aquaculture Society* 14: 135-136.
- Chapman DD, Prodöhl PA, Gelsleichter J, Manire CA, Shivji MS (2004) Predominance of genetic monogamy by females in a hammerhead shark, *Sphyrna tiburo*: Implications for shark conservation. *Molecular Ecology* 13: 1965-1974.
- Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24: 621-631.
- Charniaux-Cotton H, Payen G (1985) Sexual differentiation. In: Bliss DE, Mantel LH, eds. *The Biology of Crustacea*, volume 9: Integument, Pigments and Hormonal Processes. Academic Press, New York, pp. 217-299.

- Charnov EL (1993) Life History Invariants: Some Explorations of Symmetry in Evolutionary Ecology. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Cheng Q, Yuan C, Wang J, Xu J, Lee TH, Wang C (2010) Development of 20 microsatellite loci in the Japanese mitten crab *Eriocheir japonica* and cross-amplification in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Conservation Genetics Resources 2: 47-50.
- Chenuil A (2006) Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: From molecular evolution to practical aspects. Genetica 127: 101-120.
- Chesser RK, Baker RJ (1996) Effective sizes and dynamics of uniparentally and diparentally inherited genes. Genetics 144: 1225-1235.
- Clark WC (1978) Hermaphroditism as a reproductive strategy for metazoans; some correlated benefits. New Zealand Journal of Zoology 5: 769-780.
- Clarke FM, Faulkes CG (1999) Kin discrimination and female mate choice in the naked mole-rat *Heterocephalus glaber*. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 266: 1995-2002.
- Clutton-Brock TH, Parker GA (1992) Potential reproductive rates and the operation of sexual selection. The Quarterly Review of Biology 67: 437-456.
- Coates JH, Hovel KA, Butler JL, Bohonak AJ (2014) Recruitment and recovery of pink abalone (*Haliotis corrugata*) in a historically overexploited kelp forest: Are local populations self-sustaining? Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 460: 184-192.
- Company JB, Puig P, Sardà F, Palanques A, Latasa M, Scharek R (2008) Climate influence on deep sea populations. Public Library of Science One 3: e1431.
- COSEWIC (2003) COSEWIC assessment and status report on the Atlantic cod *Gadus morhua* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada, Ottawa, Canada.
- Côté IM (2003) Knowledge of reproductive behaviour contributes to conservation programs. In: Festa-Bianchet M, Apollonio M, eds. Animal Behavior and Wildlife Conservation. Island Press, Washington, pp. 77-92.
- Crick F (1970) Central dogma of molecular biology. Nature 227: 561-563.
- Cutler DJ, Jensen JD (2010) To pool, or not to pool? Genetics 186: 41-43.
- D'Onghia G, Capezzuto F, Mytilineou Ch, Maiorano P, Kapiris K, Carlucci R, Sion L, Tursi A (2005) Comparison of the population structure and dynamics of *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) between exploited and unexploited areas in the Mediterranean Sea. Fisheries Research 76: 22-38.
- Dakin EE, Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. Heredity 93: 504-509.
- Dambach J, Raupach MJ, Mayer C, Schwarzer J, Leese F (2013) Isolation and characterization of nine polymorphic microsatellite markers for the deep-sea shrimp *Nematocarcinus lanceopes* (Crustacea: Decapoda: Caridea). BioMed Central Research Notes 6: 75.
- Danancher D, Cellot B, Dolédec S, Reynaud D (2009) Isolation and characterization of the first eight microsatellite loci in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda) and cross-amplification in *Gammarus pulex* and *Gammarus orinos*. Molecular Ecology Resources 9: 1418-1421.
- Dao HT, Todd EV, Jerry DR (2013) Characterization of polymorphic microsatellite loci for the spiny lobster *Panulirus* spp. and their utility to be applied to other *Panulirus* lobsters. Conservation Genetics Resources 5: 43-46.

- Darwin C (1871) *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex*. John Murray, London, UK.
- Davies NB (1992) *Dunnock Behavior and Social Evolution*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Davis GP, Hetzel DJS (2000) Integrating molecular genetic technology with traditional approaches for genetic improvement in aquaculture species. *Aquaculture Research* 31: 3-10.
- de Freitas AJ (1985) The Penaeoidea of Southeast Africa. II- The Families Aristeidae and Solenoceridae. Investigational Report 57. The Oceanographic Research Institute, Durban, South Africa.
- de Freitas P, Jesus CM, Galetti PM (2007) Isolation and characterization of new microsatellite loci in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and cross-species amplification in other penaeid species. *Molecular Ecology Notes* 7: 324-326.
- de Grave S, Franssen CHJM (2011) Carideorum catalogus: The recent species of the Dendrobranchiata, Stenopodidean, Procarididean and Caridean shrimps (Crustacea: Decapoda). *Zoologische Mededelingen* 85: 195-588.
- de Mitcheson YS (2016) Mainstreaming fish spawning aggregations into fishery management calls for a precautionary approach. *BioScience* 66: 295-306.
- Delghandi M, Goddard S, Jerry DR, Dao HT, Al Hinai MS, Al-Amry W, Al-Marzouqi A (2016) Novel genomic microsatellite markers for genetic population and diversity studies of tropical scalloped spiny lobster (*Panulirus homarus*) and their potential application in related *Panulirus* species. *Genetics and Molecular Research* 15: gmr.15027846.
- Demestre M (1990) *Biología pesquera de la gamba, Aristeus antennatus* (Risso, 1816) en el mar Catalán. PhD Thesis, University of Barcelona, Barcelona, Spain. 443pp. +34pl.
- Demestre M (1995) Moulting activity-related spawning success in the Mediterranean deep-water shrimp *Aristeus antennatus* (Decapoda: Dendrobranchiata). *Marine Ecology Progress Series* 127: 57-64.
- Demestre M, Fortuño JM (1992) Reproduction of the deep-water shrimp *Aristeus antennatus* (Decapoda: Dendrobranchiata). *Marine Ecology Progress Series* 84: 41-51.
- Demestre M, Lleó J (1993) Population dynamics of *Aristeus antennatus* (Decapoda: Dendrobranchiata) in the Northwestern Mediterranean. *Scientia Marina* 57: 183-189.
- Demestre M, Cortadellas N, Durfort M (1997) Ultrastructure of the sperm of the deep-sea decapod *Aristeus antennatus*. *Journal of Morphology* 234: 79-87.
- Dempster AP, Laird NM, Rubin DB (1977) Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B* 39: 1-38.
- Dennenmoser S, Thiel M (2008) Effects of social structure on the behaviour and performance of alternative reproductive phenotypes in male rock shrimp, *Rhynchocinetes typus*. *Ethology* 114: 327-339.
- Dennenmoser S, Thiel M (2015) Cryptic female choice in crustaceans. In: Peretti AV, Aisenberg A, eds. *Cryptic Female Choice in Arthropods: Patterns, Mechanisms and Prospects*. Springer, Cham, pp. 203-237.
- Deval MC, Özgen G, Özbilgin H (2015) Selectivity of 50 mm T0 and T90 codends for commercial shrimp species in the Turkish deepwater trawl fishery, Eastern Mediterranean. *Journal of Applied Ichthyology* 32: 1041-1057.
- Deval MC, Kapiris K (2016) A review of biological patterns of the blue-red shrimp *Aristeus antennatus* in the Mediterranean Sea: A case study of the population of Antalya Bay, Eastern Mediterranean Sea. *Scientia Marina* 80: 339-348.

- Diaz Pauli B, Sih A (2017) Behavioural responses to human-induced change: Why fishing should not be ignored. *Evolutionary Applications* 10: 231-240.
- Díaz ER, Thiel M (2004) Chemical and visual communication during mate searching in rock shrimp. *The Biological Bulletin* 206: 134-143.
- Dierens L, Henshall J, Sellars M (2014) An industry friendly, inexpensive DNA extraction method for penaeid shrimp that is compatible with Sequenom®iPLEX Platinum SNP pedigree genotyping platforms. *Aquaculture* 433: 102-104.
- Diesel R, Schubart CD (2007) The social breeding system of the Jamaican bromeliad crab *Metopaulias depressus*. In: Duffy JE, Thiel M, eds. *Evolutionary Ecology of Social and Sexual Systems*. Oxford University Press, New York, pp. 365-386.
- Dobson FS (1982) Competition for mates and predominant juvenile male dispersal in mammals. *Animal Behaviour* 30: 1183-1192.
- Dobzhansky T (1937) *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press, New York, USA.
- Dos Santos A (1998) On the occurrence of larvae of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea: Decapoda: Penaeoidea) off the Portuguese coast. *Journal of Natural History* 32: 1519-1523.
- Du ZQ, Ciobanu DC, Onteru SK, Gorbach D, Mileham AJ, Jaramillo G, Rothschild MF (2010) A gene-based SNP linkage map for pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Animal Genetics* 41: 286-294.
- Duff RJ, Hoeh WR, Cook D, Weeks SC (2004) Isolation and characterization of 13 polymorphic microsatellite loci from the clam shrimp *Eulimnadia texana* (Crustacea: Spinicaudata). *Molecular Ecology Notes* 4: 397-399.
- Duffy JE (1996) Eusociality in a coral-reef shrimp. *Nature* 381: 512-514.
- Duffy JE, Morrison CL, Macdonald KS (2002) Colony defense and behavioral differentiation in the eusocial shrimp *Synalpheus regalis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 51: 488-495.
- Duffy JE, Thiel M (2007) *Evolutionary Ecology of Social and Sexual Systems: Crustaceans as Model Organisms*. Oxford University Press, New York, USA.
- Dulvy NK, Sadovy Y, Reynolds JD (2003) Extinction vulnerability in marine populations. *Fish and Fisheries* 4: 25-64.
- Eberhard WG (2000) Criteria for demonstrating postcopulatory female choice. *Evolution* 54: 1047-1050.
- EC - European Commission (2004) *European Union Mediterranean Fisheries and Exploited Resources*. Report of the Subgroup on the Mediterranean Sea (SGMED) of the Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries (STECF). SEC (2004) 772, Brussels, Belgium.
- Edward DA, Chapman T (2011) The evolution and significance of male mate choice. *Trends in Ecology and Evolution* 26: 647-654.
- El-Metwally S, Hamza T, Zakaria M, Helmy M (2013) Next-generation sequence assembly: Four stages of data processing and computational challenges. *Public Library of Science Computational Biology* 9: e1003345.
- Ellegren H (2004) Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5: 435-445.
- Ellis CD, Hodgson DJ, André C, Sørtdalen TK, Knutsen H, Griffiths AGF (2015) Genotype reconstruction of paternity in European lobster (*Homarus gammarus*). *Public Library of Science One* 10: e0139585.

- Epperson BK (2005) Estimating dispersal from short distance spatial autocorrelation. *Heredity* 95: 7-15.
- Estadística Oficial de Pesca de la Generalitat de Catalunya (2016) Estadístiques de pesca per llotges i espècies del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació de la Generalitat de Catalunya [Electronic Version]. Consulted 28 September 2017. Available from: http://agricultura.gencat.cat/ca/ambits/pesca/dar_estadistiques_pesca_subhastada/dar_captures_llotges/
- Estoup A, Jarne P, Cornuet JM (2002) Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11: 1591-1604.
- FAO - Food and Agriculture Organization (1993) Report of the expert consultation on utilization and conservation of aquatic genetic resources. FAO Fisheries Report 491, Rome, Italy.
- FAO - Food and Agriculture Organization (2006) General Fisheries Commission for the Mediterranean; report of the ninth session of the Scientific Advisory Committee. FAO Fisheries Report 814, Rome, Italy.
- FAO - Food and Agriculture Organization (2015) Species Fact Sheets [Electronic Version]. Cited 7 June 2017. Available from: <http://www.fao.org/fishery/species/3422/en>
- FAO - Food and Agriculture Organization (2016) The state of world fisheries and aquaculture. Contributing to food security and nutrition for all. FAO, Rome, Italy.
- Faria J, Froufe E, Tuya F, Alexandrino P, Pérez-Losada M (2013) Panmixia in the endangered slipper lobster *Scyllarides latus* from the Northeastern Atlantic and Western Mediterranean. *Journal of Crustacean Biology* 33: 557-566.
- Farmer AS (1972) A bilateral gynandromorph of *Nephrops norvegicus* (Decapoda: Nephropidae). *Marine Biology* 15: 344-349.
- Farrag MMS (2016) Deep-sea ichthyofauna from Eastern Mediterranean Sea, Egypt: Update and new records. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 42: 479-489.
- Favre L, Ballaoux F, Goudet J, Perrin N (1997) Female-biased dispersal in the monogamous mammal *Crocodyrus russula*: Evidence from field data and microsatellite patterns. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 264: 127-132.
- Felgenhauer BE, Abele LG (1982) Aspects of mating behavior in the tropical freshwater shrimp *Atya innocous* (Herbst). *Biotropica* 14: 296-300.
- Felgenhauer BE, Abele LG (1991) Morphological diversity of decapod spermatozoa. In: Bauer RT, Martin JW, eds. *Crustacean Sexual Biology*. Columbia University Press, New York, pp. 322-341.
- Fernández MV (2012) Phylogeographical analyses of two aristeid shrimps, *Aristeus antennatus* and *Aristaeomorpha foliacea* (Crustacea, Aristeidae), with implications for resource conservation. PhD Thesis, University of Girona, Girona, Spain. 172pp.
- Fernández MV, Heras S, Maltagliati F, Turco A, Roldán MI (2011) Genetic structure in the blue and red shrimp *Aristeus antennatus* and the role played by hydrographical and oceanographical barriers. *Marine Ecology Progress Series* 421: 163-171.
- Fernández MV, Heras S, Maltagliati F, Roldán MI (2013a) Deep genetic divergence in giant red shrimp *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1827) across a wide distributional range. *Journal of Sea Research* 76: 146-153.

- Fernández MV, Heras S, Viñas J, Maltagliati F, Roldán MI (2013b) Multilocus comparative phylogeography of two aristeid shrimps of high commercial interest (*Aristeus antennatus* and *Aristaeomorpha foliacea*) reveals different responses to past environmental changes. *Public Library of Science One* 8: e59033.
- Figueiredo MJ, Figueiredo I, Machado PB (2001) Deep-water penaeid shrimps (Crustacea: Decapoda) from off the Portuguese continental slope: An alternative future resource? *Fisheries Research* 51: 321-326.
- Fiorentino F (2000) A compilation of information on stock assessment in the GFCM areas presented in standard forms. ED/TN/FF/4/0600/REL.1. FAO-COPEMED, Rome, Italy.
- Fiorentino F, Orsi Relini L, Zamboni A, Relini G (1998) Remarks about the optimal harvest strategy for red shrimps (*Aristeus antennatus*, Risso 1816) on the basis of the Ligurian experience. In: Leonart J, ed. *Dynamique des populations marines*. CIHEAM-IAMZ, Zaragoza, pp. 323-333.
- Fischer W, Bianchi G, Scott WB (1981) FAO species identification sheets for fishery purposes: Eastern Central Atlantic fishing area 34, 47 (in part). Shrimps and prawns; true crabs; stomatopods; bivalves; gastropods; cephalopods; sea turtles. Department of Fisheries and Oceans Canada, by arrangement with the Food and Agriculture Organization of the United Nations, volume 6. FAO, Rome, Italy.
- Fisher RAS (1930) *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Frankham R (1995) Conservation genetics. *Annual Review of Genetics* 29: 305-327.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Gaffney PM, Scott TM, Koehn RK, Diehl WJ (1990) Interrelationships of heterozygosity, growth rate and heterozygote deficiencies in the coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics* 124: 687-699.
- Gan CH, Tee SM, Tang PC, Yang JMC, Freire F, McGowan A, Narriman J, Mohammed MS, Hsieh HL, Chen CP, Sheppard C, Chen CA (2008) Isolation and characteristics of 10 microsatellite markers from the endangered coconut crab (*Birgus latro*). *Molecular Ecology Resources* 8: 1448-1450.
- García-Rodríguez M, Esteban A (1999) On the biology and fishery of *Aristeus antennatus* (Risso, 1816), (Decapoda, Dendrobranchiata) in the Ibiza Channel (Balearic Island, Spain). *Scientia Marina* 63: 27-37.
- Gayon J (2016) From Mendel to epigenetics: History of genetics. *Comptes Rendus Biologies* 339: 225-230.
- Gemmer I, Gergs R (2013) Characterization of the first twelve microsatellite loci for the amphipod *Gammarus roeselii* (Crustacea: Amphipoda). *Conservation Genetics Resources* 5: 955-957.
- GFCM (2016) Report of the eighteenth session of the Scientific Advisory Committee on Fisheries; Nicosia, Cyprus, 21-23 March 2016. FAO Fisheries Report 1154, Rome, Italy.
- GFCM Recommendation (2015) On the establishment of a set of minimum standards for bottom trawling fisheries of demersal stocks in the Strait of Sicily, pending the development and adoption of a multiannual management plan (Rec.GFCM/39/2015/2) [Electronic Version]: Binding GFCM recommendations and resolutions. Cited 30 June 2017. Available from: <http://www.fao.org/gfcm/decisions/en/>
- GFCM Resolution (2009) On the establishment of geographical subareas in the GFCM area of application (Res. GFCM/33/2009/2), amending Resolution GFCM/31/2007/2 [Electronic Version]: Binding GFCM recommendations and resolutions. Cited 30 June 2017. Available from: <http://www.fao.org/gfcm/decisions/en/>

GFCM SAF (2007) Assessment of red shrimp *Aristeus antennatus* from the trawl fishery off the geographical sub-area Northern Spain GSA-6 [Electronic Version]: Validated stock assessment forms (GFCM SAF). Cited 3 July 2017. Available from: <http://www.fao.org/gfcm/data/safs/en/>

GFCM SAF (2008) Assessment of red shrimp *Aristeus antennatus* from the trawl fishery off the geographical sub-area Balearic Island GSA-5 [Electronic Version]: Validated stock assessment forms (GFCM SAF). Cited 3 July 2017. Available from: <http://www.fao.org/gfcm/data/safs/en/>

GFCM SAF (2009) Assessment of red shrimp *Aristeus antennatus* from the trawl fishery off the geographical sub-area Balearic Island GSA-5 [Electronic Version]: Validated stock assessment forms (GFCM SAF). Cited 3 July 2017. Available from: <http://www.fao.org/gfcm/data/safs/en/>

GFCM SAF (2010) Assessment of red shrimp *Aristeus antennatus* from the trawl fishery off the geographical sub-area Balearic Island GSA-5 [Electronic Version]: Validated stock assessment forms (GFCM SAF). Cited 3 July 2017. Available from: <http://www.fao.org/gfcm/data/safs/en/>

GFCM SAF (2011a) Assessment of red shrimp *Aristeus antennatus* from the trawl fishery off the geographical sub-area Balearic Island GSA-5 [Electronic Version]: Validated stock assessment forms (GFCM SAF). Cited 3 July 2017. Available from: <http://www.fao.org/gfcm/data/safs/en/>

GFCM SAF (2011b) Assessment of red shrimp *Aristeus antennatus* from the trawl fishery off the geographical sub-area Northern Spain GSA-6 [Electronic Version]: Validated stock assessment forms (GFCM SAF). Cited 3 July 2017. Available from: <http://www.fao.org/gfcm/data/safs/en/>

GFCM SAF (2011c) Assessment of red shrimp *Aristeus antennatus* from the trawl fishery off the geographical sub-area Ligurian and Northern Tyrrhenian Sea GSA-9 [Electronic Version]: Validated stock assessment forms (GFCM SAF). Cited 3 July 2017. Available from: <http://www.fao.org/gfcm/data/safs/en/>

GFCM SAF (2012a) Assessment of red shrimp *Aristeus antennatus* from the trawl fishery off the geographical sub-area Balearic Island GSA-5 [Electronic Version]: Validated stock assessment forms (GFCM SAF). Cited 3 July 2017. Available from: <http://www.fao.org/gfcm/data/safs/en/>

GFCM SAF (2012b) Assessment of red shrimp *Aristeus antennatus* from the trawl fishery off the geographical sub-area Northern Spain GSA-6 [Electronic Version]: Validated stock assessment forms (GFCM SAF). Cited 3 July 2017. Available from: <http://www.fao.org/gfcm/data/safs/en/>

GFCM SAF (2014a) Assessment of red shrimp *Aristeus antennatus* from the trawl fishery off the geographical sub-area Northern Alboran Sea GSA-1 [Electronic Version]: Validated stock assessment forms (GFCM SAF). Cited 3 July 2017. Available from: <http://www.fao.org/gfcm/data/safs/en/>

GFCM SAF (2014b) Assessment of red shrimp *Aristeus antennatus* from the trawl fishery off the geographical sub-area Balearic Island GSA-5 [Electronic Version]: Validated stock assessment forms (GFCM SAF). Cited 3 July 2017. Available from: <http://www.fao.org/gfcm/data/safs/en/>

GFCM SAF (2014c) Assessment of red shrimp *Aristeus antennatus* from the trawl fishery off the geographical sub-area Northern Spain GSA-6 [Electronic Version]: Validated stock assessment forms (GFCM SAF). Cited 3 July 2017. Available from: <http://www.fao.org/gfcm/data/safs/en/>

GFCM SAF (2014d) Assessment of red shrimp *Aristeus antennatus* from the trawl fishery off the geographical sub-area Balearic Island GSA-5 [Electronic Version]: Validated stock assessment forms (GFCM SAF). Cited 3 July 2017. Available from: <http://www.fao.org/gfcm/data/safs/en/>

GFCM SAF (2016a) Assessment of red shrimp *Aristeus antennatus* from the trawl fishery off the geographical sub-area Northern Alboran Sea GSA-1 [Electronic Version]: Validated stock assessment forms (GFCM SAF). Cited 3 July 2017. Available from: <http://www.fao.org/gfcm/data/safs/en/>

GFCM SAF (2016b) Assessment of red shrimp *Aristeus antennatus* from the trawl fishery off the geographical sub-area Balearic Island GSA-5 [Electronic Version]: Validated stock assessment forms (GFCM SAF). Cited 3 July 2017. Available from: <http://www.fao.org/gfcm/data/safs/en/>

GFCM SAF (2016c) Assessment of red shrimp *Aristeus antennatus* from the trawl fishery off the geographical sub-area Northern Spain GSA-6 [Electronic Version]: Validated stock assessment forms (GFCM SAF). Cited 3 July 2017. Available from: <http://www.fao.org/gfcm/data/safs/en/>

GFCM SAF (2016d) Assessment of red shrimp *Aristeus antennatus* from the trawl fishery off the geographical sub-area Ligurian and Northern Tyrrhenian Sea GSA-9 [Electronic Version]: Validated stock assessment forms (GFCM SAF). Cited 3 July 2017. Available from: <http://www.fao.org/gfcm/data/safs/en/>

Gherardi F, Aquiloni L, Tricarico E (2012) Revisiting social recognition systems in invertebrates. *Animal Cognition* 15: 745-762.

Gilbert W, Maxam A (1973) The nucleotide sequence of the *lac* operator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3581-3584.

Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ (1985) Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature* 318: 577-579.

Giraud I, Valette V, Bech N, Grandjean F, Cordaux R (2013) Isolation and characterization of microsatellite loci for the isopod crustacean *Armadillidium vulgare* and transferability in terrestrial isopods. *Public Library of Science One* 8: e76639.

Gjedrem T, Robinson N, Rye M (2012) The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. *Aquaculture* 350-353: 117-129.

Goldstein DB, Schlotterer C (1999) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford, USA.

Gonzalez EB, Taniguchi N, Umino T (2010) Can ordinary single-day egg collection increase the effective population size in broodstock management programs? Breeder-offspring assignment in black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) through two-hourly intervals. *Aquaculture* 308: 12-19.

Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR (2016) Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews* 17: 333-351.

Gorelli G, Company JB, Sardà F (2014) Management strategies for the fishery of the red shrimp *Aristeus antennatus* in Catalonia (NE Spain). *Marine Stewardship Council Science Series* 2: 116-127.

Gorelli G, Sarda F, Company JB (2016) Fishing effort increase and resource status of the deep-sea red shrimp *Aristeus antennatus* (Risso 1816) in the Northwest Mediterranean Sea since the 1950s. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture* 24: 192-202.

Gosselin T, Sainte-Marie B, Bernatchez L (2005) Geographic variation of multiple paternity in the American lobster, *Homarus americanus*. *Molecular Ecology* 15: 1517-1525.

Goudet J (2001) FSTAT, version 2.9.3: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices [Electronic Version]. Cited 10 January 2016. Available from: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>

- Goudet J, Perrin N, Waser P (2002) Tests for sex-biased dispersal using bi-parentally inherited genetic markers. *Molecular Ecology* 11: 1103-1114.
- Gouin N, Grandjean F, Souty-Grosset C (2000) Characterization of microsatellite loci in the endangered freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Astacidae) and their potential use in other decapods. *Molecular Ecology* 9: 636-638.
- Gouin N, Bórquez J, Samollow PB, Douglas KC, Jasti M, Bertin A (2012) Isolation of microsatellite markers for two Chilean freshwater anomuran species (*Aegla araucaniensis* and *Aegla pewenchaе*) using PCR-based methods. *Conservation Genetics Resources* 4: 93-96.
- Gowaty PA (2012) The evolution of multiple mating: Costs and benefits of polyandry to females and of polygyny to males. *Fly(Austin)* 6: 3-11.
- Goyard E, Goarant C, Ansquer D, Brun P, de Decker S, Dufour R, Galinié C, Peignon JM, Pham D, Vourey E, Harache Y, Patrois J (2008) Cross breeding of different domesticated lines as a simple way for genetic improvement in small aquaculture industries: Heterosis and inbreeding effects on growth and survival rates of the Pacific blue shrimp *Penaeus (Litopenaeus) stylirostris*. *Aquaculture* 278: 43-50.
- Grafen A, Ridley M (1983) A model of mate guarding. *Journal of Theoretical Biology* 102: 549-567.
- Grandjean F, Gouin N, Verne S, Delaunay C, Patri S (2005) Characterization of polymorphic microsatellite loci in the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus*. *Molecular Ecology Notes* 5: 507-509.
- Greene C, Umbanhowar J, Mangel M, Caro T (1998) Animal breeding systems, hunter selectivity, and consumptive use in wildlife conservation. In: Caro T, ed. *Behavioral Ecology and Conservation Biology*. Oxford University Press, New York, pp. 271-305.
- Greenwood PJ (1980) Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal Behaviour* 28: 1140-1162.
- Griffith F (1928) The significance of pneumococcal types. *The Journal of Hygiene* 27: 113-159.
- Guglielmo L, Granata A, Guglielmo R (2015) Class Malacostraca; Order Euphausiacea. *Ibero Diversidad Entomológica* 86B: 1-20.
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Léger P, Lepais O, Lepoittevin C, Malausa T, Revardel E, Salin F, Petit RJ (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11: 591-611.
- Guillen J, Maynou F (2015) Characterisation of fish species based on ex-vessel prices and its management implications: An application to the Spanish Mediterranean. *Fisheries Research* 167: 22-29.
- Hallerman EM (2003) *Population genetics: Principles and applications for fisheries scientists*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA.
- Hänfling B, Weetman D (2003) Characterization of microsatellite loci for the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Molecular Ecology Notes* 3: 15-17.
- Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB (1992) The evolution of tandemly repetitive DNA: Recombination rules. *Genetics* 132: 847-859.
- Hartl DL, Clark AG (1989) *Principles of Population Genetics*, 2nd edn. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Heather JM, Chain B (2016) The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* 107: 1-8.

- Hedgecock D (1994) Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? In: Beaumont AR, ed. *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Chapman and Hall, London, pp. 122-134.
- Hedrick PW (2005) *Genetics of Populations*, 3th edn. Jones and Bartlett publishers, Sudbury, Massachusetts, USA.
- Hedrick PW, Garcia-Dorado A (2016) Understanding inbreeding depression, purging, and genetic rescue. *Trends in Ecology and Evolution* 31: 940-952.
- Heldt JH (1938) La production chez les crustacés décapodes de la famille des pénéidés. *Annales de l'Institut Océanographique (Monaco)* 18: 31-206.
- Heldt JH (1954) Stades larvaires d'*Aristeomorpha foliacea* (Risso) et *Aristeus antennatus* (Risso), décapodes pénéides. *Comptes Rendus Académie de Sciences* 239: 1080-1082.
- Heldt JH (1955) Contribution à l'étude de la biologie des crevettes pénéides *Aristaeomorpha foliacea* (Risso) et *Aristeus antennatus* (Risso) (Formes larvaires). *Bulletin de la Société des Sciences Naturelles de Tunisie* VIII 1-2: 1-29.
- Helyar SJ, Hemmer-Hansen J, Bekkevold D, Taylor MI, Ogden R, Limborg MT, Cariani A, Maes GE, Diopere E, Carvalho GR, Nielsen EE (2011) Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: New opportunities and challenges. *Molecular Ecology Resources* 11: 123-136.
- Heras S, Planella L, Caldarazzo I, Vera M, García-Marín JL, Roldán MI (2016) Development and characterization of novel microsatellite markers by next generation sequencing for the blue and red shrimp *Aristeus antennatus*. *PeerJ* 4: e2200.
- Hillis DM, Moritz C, Mable BK (1996) *Molecular Systematics*, 2nd edn. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hjelset AM (2014) Fishery-induced changes in Norwegian red king crab (*Paralithodes camtschaticus*) reproductive potential. *ICES Journal of Marine Science* 71: 365-373.
- Hodgins-Davis A, Roberts S, Cowan DF, Atema J, Bennie M, Avolio C, Defaveri J, Gerlach G (2007) Characterization of SSRs from the American lobster, *Homarus americanus*. *Molecular Ecology Notes* 7: 330-332.
- Holsinger KE, Weir BS (2009) Genetics in geographically structured populations: Defining, estimating and interpreting F_{ST} . *Nature Reviews Genetics* 10: 639-650.
- Holthuis LB (1980) *FAO species catalogue, volume 1. Shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest for fisheries*. FAO Fisheries Synopsis 125, Rome, Italy.
- Hudson RR, Bailey K, Skarecky D, Kwiatowski J, Ayala FJ (1994) Evidence for positive selection in the superoxide dismutase (*Sod*) region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 136: 1329-1340.
- Hutchings JA (2001) Influence of population decline, fishing, and spawner variability on the recovery of marine fishes. *Journal of Fish Biology* 59: 306-322.
- Hutchings JA, Minto C, Ricard D, Baum JK, Jensen OP (2010) Trends in the abundance of marine fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 67: 1205-1210.
- Iacchei M, Ben-Horin T, Selkoe KA, Bird CE, García-Rodríguez FJ, Toonen RJ (2013) Combined analyses of kinship and F_{ST} suggest potential drivers of chaotic genetic patchiness in high gene-flow populations. *Molecular Ecology* 22: 3476-3494.

- IBM Corporation Released (2015) IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. IBM Corp, New York, USA.
- ICES (2003) Cod in subarea IV (North Sea), division VIId (Eastern English Channel) and division IIIa (Skagerrak). In: ICES Cooperative Research Report. The Report of the ICES Advisory Committee on Fishery Management 261, Copenhagen, pp. 234-245.
- Imgrund J, Groth D, Wetherall J (1997) Genetic analysis of the freshwater crayfish *Cherax tenuimanus*. Electrophoresis 18: 1660-1665.
- Ishida Y, Funamoto T, Honda S, Yabuki K, Nishida H, Watanabe C (2009) Management of declining Japanese sardine, chub mackerel and walleye pollock fisheries in Japan. Fisheries Research 100: 68-77.
- IUCN (2011) IUCN Red List of Threatened Species, version 2011.2 [Electronic Version]. Cited 20 September 2017. Available from: [http://iucnredlist.org/\(2011\)](http://iucnredlist.org/(2011))
- Jacobson A, Plouviez S, Thaler AD, Van Dover CL (2013) Characterization of 13 polymorphic microsatellite loci in *Rimicaris hybisae*, a shrimp from deep-sea hydrothermal vents. Conservation Genetics Resources 5: 449-451.
- Jennions MD, Petrie M (2000) Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. Biological Reviews 75: 21-64.
- Jivoff P, Hines AH (1998) Female behaviour, sexual competition and mate guarding in the blue crab, *Callinectes sapidus*. Animal Behaviour 55: 589-603.
- Johannsen W (1903) Om arvelighed i samfund og i rene linier. Oversigt over det Kongelige Danske Videnskabernes Selskabs forhandlinger 3: 247-270.
- Jombart T (2008) Adegenet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. Bioinformatics 24: 1403-1405.
- Jombart T, Devillard S, Balloux F (2010) Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. BioMed Central Genetics 11: 94.
- Jorquera E, Anstey L, Paterson I, Kenchington E, Ruzzante DE (2014) Isolation and characterization of 26 novel microsatellite loci in the deep-sea shrimp *Acantheephyra pelagica*. Conservation Genetics Resources 6: 731-733.
- Jorquera E, Kenchington E, Ruzzante DE (2016) High prevalence of multiple paternity in the deep-sea shrimp *Acantheephyra pelagica*. Marine Biology 163: 89.
- Jossart Q, Wattier RA, Kastally C, Aron S, David B, de Ridder C, Rigaud T (2014) Genetic evidence confirms polygamous mating system in a crustacean parasite with multiple host. Public Library of Science One 9: e90680.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Molecular Ecology 16: 1099-1106.
- Kang S, Jung J, Kim W (2009) Isolation of polymorphic microsatellite loci from the endangered mudflat crab *Chasmagnathus convexus* (Crustacea: Decapoda: Varunidae). Conservation Genetics 10: 1807-1810.
- Kang JH, Park JY, Kim EM, Ko HS (2013) Population genetic analysis and origin discrimination of snow crab (*Chionoecetes opilio*) using microsatellite markers. Molecular Biology Reports 40: 5563-5571.
- Kapiris K, Thessalou-Legaki M (2006) Comparative fecundity and oocyte size of *Aristaeomorpha foliacea* and *Aristeus antennatus* in the Greek Ionian Sea (E. Mediterranean) (Decapoda: Aristeidae). Acta Zoologica 87: 239-245.

- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A (2012) Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647-1649.
- Keith DM, Hutchings JA (2012) Population dynamics of marine fishes at low abundance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 69: 1150-1163.
- Khorana HG, Büchi H, Ghosh H, Gupta N, Jacob TM, Kössel H, Morgan R, Narang SA, Ohtsuka E, Wells RD (1966) Polynucleotide synthesis and the genetic code. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 31: 39-49.
- Kimura M (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217: 624-626.
- Kimura M (1991) Recent development of the neutral theory viewed from the Wrightian tradition of theoretical population genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 5969-5973.
- Kindsvater HK, Mangel M, Reynolds JD, Dulvy NK (2016) Ten principles from evolutionary ecology essential for effective marine conservation. *Ecology and Evolution* 6: 2125-2138.
- Klug H (2011) Animal mating systems. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley and Sons, Chichester, pp. 1-7.
- Kobler A, Humblet Y, Geudens K, Eens M (2012) Period-dependent sex-biased movement in a polygamous stream fish (*Cottus perifretum* Freyhof, Kottelat & Nolte, 2005 - Actinopterygii, Cottidae) with male parental care. *Hydrobiologia* 693: 195-204.
- Koizumi N, Hanamura Y, Quinn TW, Nishida K, Takemura T, Watabe K, Mori A, Man A (2012) Thirty-two polymorphic microsatellite loci of the mysid crustacean *Mesopodopsis tenuipes*. *Conservation Genetics Resources* 4: 55-58.
- Koizumi N, Hanamura Y, Nishida K, Mori A, Watabe K, Takemura T, Man A, Kassim FM, Morioka S (2015) Development of 18 novel polymorphic microsatellite markers for the mysid crustacean *Mesopodopsis orientalis*. *Conservation Genetics Resources* 7: 133-135.
- Kokko H, Brooks R, Jennions MD, Morley J (2003) The evolution of mate choice and mating biases. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 653-664.
- Kulski JK (2016) Next-generation sequencing: An overview of the history, tools, and “omic” applications [Electronic Version]. In: Kulski JK, ed. *Next Generation Sequencing: Advances, Applications and Challenges*. InTech. Cited 10 July 2017. Available from: <https://www.intechopen.com/books/next-generation-sequencing-advances-applications-and-challenges/next-generation-sequencing-an-overview-of-the-history-tools-and-omic-applications>
- Kümmerli R, Keller L (2007) Contrasting population genetic structure for workers and queens in the putatively uniclonal ant *Formica exsecta*. *Molecular Ecology* 16: 4493-4503.
- Lawson Handley LJ, Perrin N (2007) Advances in our understanding of mammalian sex-biased dispersal. *Molecular Ecology* 16: 1559-1578.
- Lee HJ, Lee DH, Yoon SJ, Kim DH, Kim SG, Hyun YS, Min GS, Chung KW (2013) Characterization of 20 microsatellite loci by multiplex PCR in swimming crab, *Portunus trituberculatus*. *Genes and Genomics* 35: 77-85.
- Leese F, Kop A, Agrawal S, Held C (2008) Isolation and characterization of microsatellite markers from the marine isopods *Serolis paradoxa* and *Septemserolis septemcarinata* (Crustacea: Peracarida). *Molecular Ecology Resources* 8: 818-821.

- Leese F, Brand P, Rozenberg A, Mayer C, Agrawal S, Dambach J, Dietz L, Doemel JS, Goodall-Copstake WP, Held C, Jackson JA, Lampert KP, Linse K, Macher JN, Nolzen J, Raupach MJ, Rivera NT, Schubart DC, Striewski S, Tollrian R, Sands CJ (2012) Exploring Pandora's Box: Potential and pitfalls of low coverage genome surveys for evolutionary biology. *Public Library of Science One* 7: e49202.
- Levinson G, Gutman GA (1987) Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* 4: 203-221.
- Li R (2015). *Forensic Biology*, 2nd edn. CRC Press, New York, USA.
- Li CC, Weeks DE, Chakravarti A (1993) Similarity of DNA fingerprints due to chance and relatedness. *Human Heredity* 43: 45-52.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) Microsatellites: Genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: A review. *Molecular Ecology* 11: 2453-2465.
- Lihoreau M, Zimmer C, Rivault C (2007) Kin recognition and incest avoidance in a group-living insect. *Behavioral Ecology* 18: 880-887.
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M (2012) Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012: 251364.
- Liu X, Tu X, He H, Chen C, Xue F (2014) Evidence for inbreeding depression and pre-copulatory, but not post copulatory inbreeding avoidance in the cabbage beetle *Colaphellus bowringi*. *Public Library of Science One* 9: e94389.
- Lleonart J, Maynou F (2003) Fish stock assessments in the Mediterranean: State of the art. *Scientia Marina* 67: 37-49.
- Lo Brutto S, Maggio T, Deiana AM, Cannas R, Arculeo M (2012) Further investigations on populations of the deep-water blue and red shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) (Decapoda, Dendrobranchiata), as inferred from amplified fragment length polymorphism (AFLP) and mtDNA analyses. *Crustaceana* 85: 1393-1408.
- Lonsdale DJ, Frey MA, Snell TW (1998) The role of chemical signals in copepod reproduction. *Journal of Marine Systems* 15: 1-12.
- López-Martínez J, Rábago-Quiroz C, Nevárez-Martínez MO, García-Juárez AR, Rivera-Parra G, Chávez-Villalba J (2005) Growth, reproduction, and size at first maturity of blue shrimp, *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874) along the east coast of the Gulf of California, Mexico. *Fisheries Research* 71: 93-102.
- Loyau A, Comuau JH, Clobert J, Danchin É (2012) Incestuous sisters: Mate preference for brothers over unrelated males in *Drosophila melanogaster*. *Public Library of Science One* 7: e51293.
- Luikart G, England PR (1999) Statistical analysis of microsatellite DNA data. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 253-256.
- Lynch M, Ritland K (1999) Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics* 152: 1753-1766.
- Ma H, Ma C, Ma L, Cui H (2010) Novel polymorphic microsatellite markers in *Scylla paramamosain* and cross-species amplification in related crab species. *Journal of Crustacean Biology* 30: 441-444.
- Maggio T, Lo Brutto S, Cannas R, Deiana AM, Arculeo M (2009) Environmental features of deep-sea habitats linked to the genetic population structure of a crustacean species in the Mediterranean Sea. *Marine Ecology* 30: 354-365.

- Maggioni R, Rogers AD, Maclean N (2003) Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda: Penaeidae) from the Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. *Molecular Ecology* 12: 3213-3217.
- Malakoff D (1997) Extinction on the high seas. *Science* 277: 486-488.
- Mardis ER (2008) Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9: 387-402.
- Markert JA, Champlin DM, Gutjahr-Gobell R, Gear JS, Kuhn A, McGreevy TJ Jr, Roth A, Bagley MJ, Nacci DE (2010) Population genetic diversity and fitness in multiple environments. *BioMed Central Evolutionary Biology* 10: 205.
- Marra A, Mona S, Sà RM, D'Onghia G, Maiorano P (2015) Population genetic history of *Aristeus antennatus* (Crustacea: Decapoda) in the Western and Central Mediterranean Sea. *Public Library of Science One* 10: e0117272.
- Martin JW, Davis GE (2001) An updated classification of the recent Crustacea. *Science Series 39*. Natural History Museum of Los Angeles County, Los Angeles, California, USA.
- Masson S, Faivre C, Giraud I, Souty-Grosset C, Cordaux R, Delaunay C, Bouchon D, Bech N (2014) Development of a microsatellite primer set to investigate the genetic population structure of *Armadillidium nasatum* (Crustacea, Oniscidea). *Journal of Genetics* 93: 545-549.
- Massutí E, Reñones O (2005) Demersal resource assemblages in the trawl fishing grounds off the Balearic Islands (Western Mediterranean). *Scientia Marina* 69: 167-181.
- Mathews LM (2007) Evidence for high rates of in-pair paternity in the socially monogamous snapping shrimp *Alpheus angulosus*. *Aquatic Biology* 1: 55-62.
- Mauchline J, Fisher LR (1969) The biology of euphausiids. *Advances in Marine Biology* 7: 1-454.
- May B (1992) Starch gel electrophoresis of allozymes. In: Hoelzel AR, ed. *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, pp. 1-27.
- Mays HL Jr, Hill GE (2004) Choosing mates: Good genes versus genes that are a good fit. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 554-559.
- McKeown NJ, Shaw PW (2008) Polymorphic nuclear microsatellite loci for studies of brown crab, *Cancer pagurus* L. *Molecular Ecology Resources* 8: 653-655.
- McLeod L, Marshall DJ (2009) Do genetic diversity effects drive the benefits associated with multiple mating? A test in a marine invertebrate. *Public Library of Science One* 4: e6347.
- McNeely JA, Miller KR, Reid WV, Mittermeier RA, Werner TB (1990) *Conserving the World's Biological Diversity*. IUCN, World Resources Institute, Conservation International, WWF-US and the World Bank, Washington DC, USA.
- Meehan D, Xu Z, Zuniga G, Alcivar-Warren A (2003) High frequency and large number of polymorphic microsatellites in cultured shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [Crustacea: Decapoda]. *Marine Biotechnology* 5: 311-330.
- Megarajan S, Absar A, Easwaran S, Srinivasa RP, Kathirvelpandian A, Chaudhari A, Krishna G (2014) Genetic diversity among three Indian populations of black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius, 1798) using microsatellite DNA markers. *Indian Journal of Fisheries* 61: 45-51.
- Meglécz E, Nève G, Biffin E, Gardner MG (2012) Breakdown of phylogenetic signal: A survey of microsatellite densities in 454 shotgun sequences from 154 non model eukaryote species. *Public Library of Science One* 7: e40861.

- Mendel G (1866) Versuche über Pflanzenhybriden [Electronic Version]. Verhandlungen des Naturforschenden Vereines in Brünn Bd. IV Für Das Jahr 1865, Abhandlungen: 3-47. Cited 7 August 2017. Available from: <http://www.esp.org/foundations/genetics/classical/gm-65.pdf>
- Meselson M, Stahl FW (1958) The replication of DNA in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 44: 671-682.
- Metzker ML (2010) Sequencing technologies - the next generation. Nature Reviews Genetics 11: 31-46.
- Michaud C, Chupeau C, Bech N, Thierry M, Sicard M, Greve P, Beltran-Bech S (2016) Isolation, characterization and PCR multiplexing of microsatellite loci for two sub-species of terrestrial isopod *Porcellio dilatatus* (Crustacea, Oniscidea). Genetica 144: 223-228.
- Miller JR, Koren S, Sutton G (2010) Assembly algorithms for next-generation sequencing data. Genomics 95: 315-327.
- Miller AD, Van Rooyen A, Sweeney OF, Whiterod NS, Weeks AR (2013) The development of 10 novel polymorphic microsatellite markers through next generation sequencing and a preliminary population genetic analysis for the endangered glenelg spiny crayfish, *Euastacus bispinosus*. Molecular Biology Reports 40: 4415-4419.
- Mittwoch U (1996) Sex-determining mechanisms in animals. Trends in Ecology and Evolution 11: 63-67.
- Moen T, Hayes B, Nilsen F, Delghandi M, Fjalestad KT, Fevolden SE, Berg PR, Lien S (2008) Identification and characterisation of novel SNP markers in Atlantic cod: Evidence for directional selection. BioMed Central Genetics 9: 18.
- Møller AP, Legendre S (2001) Allee effect, sexual selection and demographic stochasticity. Oikos 92: 27-34.
- Moritz C, Hillis DM (1996) Molecular systematic: Context and controversies. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK, eds. Molecular Systematics. Sinauer Associates, Sunderland, pp. 1-13.
- Mossman CA, Waser PM (1999) Genetic detection of sex-biased dispersal. Molecular Ecology 8: 1063-1067.
- Munguia-Vega A, Torre J, Castillo-Lopez A, Pfister T, Cudney-Bueno R (2010) Microsatellite loci for the blue swimming crab (*Callinectes bellicosus*) (Crustacea: Portunidae) from the Gulf of California, Mexico. Conservation Genetics Resources 2: 135-137.
- Murai M, Koga T, Yong HS (2002) The assessment of female reproductive state during courtship and scramble competition in the fiddler crab, *Uca paradussumieri*. Behavioral Ecology and Sociobiology 52: 137-142.
- Neff BD, Pitcher TE (2005) Genetic quality and sexual selection: An integrated framework for good genes and compatible genes. Molecular Ecology 14: 19-38.
- Neff BD, Pitcher TE, Ramnarine IW (2008) Inter-population variation in multiple paternity and reproductive skew in the guppy. Molecular Ecology 17: 2975-2984.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 70: 3321-3323.
- Nielsen EE, Bach LA, Kotlicki P (2006) Hybridlab (version 1.0): A program for generating simulated hybrids from population samples. Molecular Ecology Notes 6: 971-973.
- Nirenberg M, Caskey T, Marshall R, Brimacombe R, Kellogg D, Doctor B, Hatfield D, Levin J, Rottman F, Pestka S, Wilcox M, Anderson F (1966) The RNA code and protein synthesis. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 31: 11-24.

- Nori DV, McCord BR (2015) The application of alkaline lysis and pressure cycling technology in the differential extraction of DNA from sperm and epithelial cells recovered from cotton swabs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407: 6975-6984.
- Nouar A (2001) Bio-écologie de *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) et de *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) des côtes Algériennes. Rapport et proces-verbaux des réunions/Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée 36: 304.
- Oliehoek PA, Windig JJ, Van Arendonk JAM, Bijma P (2006) Estimating relatedness between individuals in general populations with a focus on their use in conservation programs. *Genetics* 173: 483-496.
- Ombretta M, Cesari M, Eder E, Scanabissi F, Mantovani B (2005) Chromosomes in sexual populations of Notostracan and Conchostracan taxa (Crustacea, Branchiopoda). *Caryologia* 58: 164-170.
- Omori M (1975) The biology of pelagic shrimps in the ocean. *Advances in Marine Biology* 12: 233-324.
- Orsi Relini L, Tunesi L (1987) The structure of the spermatophore in *Aristeus antennatus* (Risso, 1816). *Investigación Pesquera* 51: 461-470.
- Ortells R, Van Houdt JKJ, Geldof S, de Meester L, Mergeay J (2009) Development and characterization of eight polymorphic microsatellite markers for *Daphnia atkinsoni* (Crustacea: Ctenodaphnia). *Molecular Ecology Resources* 9: 326-329.
- Ostellari L, Zane L, Maccatrozzo L, Bargelloni L, Patarnello T (2000) Novel microsatellite loci isolated from the northern krill, *Meganyctiphanes norvegica* (Crustacea, Euphausiacea). *Molecular Ecology* 9: 377-379.
- Özcan T, Irmak E, Ates AS, Katağan T (2009) First record of the red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) (Decapoda: Aristeidae) from the Aegean Sea coast of Turkey. *Mediterranean Marine Science* 10: 121-124.
- Palero F, Pascual M (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Palinurus elephas*. *Molecular Ecology Resources* 8: 1477-1479.
- Palmas F, Addis P, Cabiddu S, Cuccu D, Follesa MC, Mura M, Olita A, Pesci P, Sabatini A (2015) Distribution of spawning and nursery grounds for deep-water red shrimp in the Central Western Mediterranean Sea. *Mediterranean Marine Science* 16: 117-127.
- Pan YW, Chou HH, You EM, Yu HT (2004) Isolation and characterization of 23 polymorphic microsatellite markers for diversity and stock analysis in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Molecular Ecology Notes* 4: 345-347.
- Pannacciulli FG, Piyapattanakorn S, Bishop JDD, Hawkins SJ, Maclean N (2005) Isolation of highly polymorphic microsatellite markers from the intertidal barnacle *Chthamalus montagui* Southward. *Molecular Ecology Notes* 5: 641-643.
- Papaconstantinou C, Kaporis K (2001) Distribution and population structure of the red shrimp (*Aristeus antennatus*) on an unexploited fishing ground in the Greek Ionian Sea. *Aquatic Living Resources* 14: 303-312.
- Pardo BG, Vera M, Pino-Querido A, Alvarez-Dios JA, Martínez P (2011) Development of microsatellite loci in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Molecular Ecology Resources* 11: 586-589.
- Pardo LM, Riveros MP, Fuentes JP, Pinochet R, Cárdenas C, Sainte-Marie B (2017) High fishing intensity reduces females' sperm reserve and brood fecundity in a eubranchyuran crab subject to sex- and size-biased harvest. *ICES Journal of Marine Science* 74: 2459-2469.

- Pascoal S, Creer S, Taylor MI, Queiroga H, Carvalho G, Mendo S (2009) Development and application of microsatellites in *Carcinus maenas*: Genetic differentiation between Northern and Central Portuguese populations. *Public Library of Science One* 4: e7268.
- Perez-Enriquez R, Max-Aguilar A (2016) Rastreabilidad del pedigrí en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) mediante marcadores genéticos: una comparación entre microsatélites y SNPs. *Ciencias Marinas* 42: 227-235.
- Perez-Farfante I (1975) Spermatophores and thelyca of the American white shrimp, genus *Penaeus* subgenus *Litopenaeus*. *Fishery Bulletin* 73: 463-486.
- Petit E, Balloux F, Goudet J (2001) Sex-biased dispersal in a migratory bat: A characterization using sex-specific demographic parameters. *Evolution* 55: 635-640.
- Planella L, Heras S, Vera M, García-Marín JL, Roldán MI (2017) An optimized high quality male DNA extraction from spermatophores in open thelycum shrimp species. *Integrative Zoology* 12: 421-427.
- Plough LV, Marko PB (2014) Characterization of microsatellite loci and repeat density in the gooseneck barnacle, *Pollicipes elegans*, using next generation sequencing. *Journal of Heredity* 105: 136-142.
- Plough LV, Moran A, Marko PB (2014) Density drives polyandry and relatedness influences paternal success in the Pacific gooseneck barnacle, *Pollicipes elegans*. *BioMed Central Evolutionary Biology* 14: 81.
- Pray LA (2008) Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. *Nature Education* 1: 100.
- Prugnolle F, de Meeus T (2002) Inferring sex-biased dispersal from population genetic tools: A review. *Heredity* 88: 161-165.
- Puebla O, Parent É, Sévigny JM (2003) New microsatellite markers for the snow crab *Chionoecetes opilio* (Brachyura: Majidae). *Molecular Ecology Notes* 3: 644-646.
- Pusey AT (1987) Sex-biased dispersal and inbreeding avoidance in birds and mammals. *Trends in Ecology and Evolution* 2: 295-299.
- Qiao H, Li F, Fu H, Wu Y, Gong Y, Jiang S, Xiong Y, Wang N (2011) Isolation and characterization of 40 microsatellite loci for oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) and cross-species utility. *Conservation Genetics Resources* 3: 319-322.
- Queller DC, Goodnight KF (1989) Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43: 258-275.
- Quick J, Loman NJ, Duraffour S, Simpson JT, Severi E, Cowley L, Bore JA, Koundouno R, Dudas G, Mikhail A, Ouédraogo N, Afrough B, Bah A, Baum JH, Becker-Ziaja B, Boettcher JP, Cabeza-Cabrerizo M, Camino-Sanchez A, Carter LL, Doerrbecker J, Enkirch T, Dorival IGG, *et al.* (2016) Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature* 530: 228-232.
- R Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing [Electronic Version]: R Foundation for Statistical Computing. Cited 2 February 2017. Available from: <https://www.r-project.org/>
- Ra'Anan Z, Sagi A (1985) Alternative mating strategies in male morphotypes of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *The Biological Bulletin* 169: 592-601.
- Ragonese S, Bianchini ML (1996) Growth, mortality and yield-per-recruit of the deep-water shrimp *Aristeus antennatus* (Crustacea-Aristeidae) of the Strait of Sicily (Mediterranean Sea). *Fisheries Research* 26: 125-137.
- Rasmussen DA, Noor MAF (2009) What can you do with a 1x genome coverage? A case study based on a genome survey of the scuttle fly *Megaselia scalaris* (Phoridae). *BioMed Central Genomics* 10: 382.

- Reigel AM, Harrison JS, Gleason DF (2015) Tetranucleotide microsatellites for the barnacle *Megabalanus coccopoma* (Darwin, 1854). *Biochemical Systematics and Ecology* 62: 159-163.
- Relini G, Orsi Relini L (1987) The decline of red shrimps stocks in the gulf of Genoa. *Investigación Pesquera* 51: 245-260.
- Rewicz T, Wattier RA, Rigaud T, Bacela-Spychalska K, Grabowski M (2015) Isolation and characterization of 8 microsatellite loci for the “ killer shrimp “, an invasive Ponto-Caspian amphipod *Dikerogammarus villosus* (Crustacea: Amphipoda). *Molecular Biology Reports* 42: 13-17.
- Reyer HU (1994) Ecology and evolution of mating systems. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft* 87.2: 97-113.
- Reynolds JD, Jennings S (2000) The role of animal behaviour in marine conservation. In: Gosling LM, Sutherland WJ, eds. *Behaviour and Conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 238-257.
- Reynolds JD, Jennings S, Dulvy NK (2001) Life histories of fish and population responses to exploitation. In: Reynolds JD, Mace GM, Redford KH, Robinson JG, eds. *Conservation of Exploited Species*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 148-168.
- Ribolli J, Miño CI, Zaniboni-Filho E, de Souza Guerreiro TC, Reynalte-Tataje DA, Dominguez de Freitas P, Galetti PM Jr (2015) Preliminary insights into the genetic mating system of neotropical *Salminus brasiliensis*: Kinship assignment and parental reconstruction reveal polygynandry. *Ichthyological Research* 63: 187-191.
- Ritland K (1996) Estimators for pairwise relatedness and inbreeding coefficients. *Genetics Research* 67: 175-186.
- Robainas A, Monnerot M, Solignac M, Dennebouy N, Espinosa G, García-Machado E (2002) Microsatellite loci from the pink shrimp *Farfantenaues notialis* (Crustacea, Decapoda). *Molecular Ecology Notes* 2: 344-345.
- Robainas A, Espinosa G, García-Machado E (2003) Characterization of the pink shrimp *Farfantenaues notialis* (Crustacea, Decapoda) microsatellite DNA. *Revista de Investigaciones Marítimas* 24: 161-164.
- Roldán MI, Heras S, Patellani R, Maltagliati F (2009) Analysis of genetic structure of the red shrimp *Aristeus antennatus* from the Western Mediterranean employing two mitochondrial regions. *Genetica* 136: 1-4.
- Rolf J, Siva-Jothy MT (2002) Copulation corrupts immunity: A mechanism for a cost of mating in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 9916-9918.
- Rousset F (2008) Genepop'007: A complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106.
- Rousset F, Raymond M (1995) Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* 140: 1413-1419.
- Rowe S, Hutchings JA (2003) Mating systems and the conservation of commercially exploited marine fish. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 567-572.
- Rubenstein DR, McCleery BV, Duffy JE (2008) Microsatellite development suggests evidence of polyploidy in the social sponge-dwelling snapping shrimp *Zuzalpheus brooksi*. *Molecular Ecology Resources* 8: 890-894.
- Russo T, Bitetto I, Carbonara P, Carlucci R, D'Andrea L, Facchini MT, Lembo G, Maiorano P, Sion L, Spedicato MT, Tursi A, Cataudella S (2017) A holistic approach to fishery management: evidence and insights from a Central Mediterranean case study (Western Ionian Sea). *Frontiers in Marine Science* 4: 193.
- Rye M (2012) Current status and prospects for the application of genetic improvement in aquaculture species. 9th Biennial Symposium of the Brazilian Society of Animal Breeding; 20-22 June 2012, João Pessoa, Brazil.

- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic Amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *science* 230: 1350-1354.
- Sainte-Marie B (2007) Sperm demand and allocation in decapod crustaceans. In: Duffy JE, Thiel M, eds. *Evolutionary Ecology of Social and Sexual Systems: Crustaceans as Model Organisms*. Oxford University Press, New York, pp. 191-210.
- Sainte-Marie B, Sévigny JM, Carpentier M (2002) Interannual variability of sperm reserves and fecundity of primiparous females of the snow crab (*Chionoecetes opilio*) in relation to sex ratio. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59: 1932-1940.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Samy-Kamal M, Forcada A, Sánchez Lizaso JL (2015) Short-term effect of selectivity change in a trawling fishery in the Western Mediterranean. *Applied Ichthyology* 31: 265-275.
- Sandifer PA, Lawrence AL, Harris SG, Chamberlain GW, Stokes AD, Bray WA (1984) Electrical stimulation of spermatophore expulsion in marine shrimp, *Penaeus* spp. *Aquaculture* 41: 181-187.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467.
- Santana QC, Coetzee MPA, Steenkamp ET, Mlonyeni OX, Hammond GNA, Wingfield MJ, Wingfield BD (2009) Microsatellite discovery by deep sequencing of enriched genomic libraries. *BioTechniques* 46: 217-223.
- Sardà F (2000) Analysis of the Mediterranean (including North Africa) deep-sea shrimps fishery: Catches, effort and economics [Electronic Version]: DG XIV/97/0018 Final report. Cited 6 April 2017. Available from: http://webco.faocopemed.org/old_copemed/vldocs/0000191/deepseashrimps.pdf
- Sardà F, Demestre M (1987) Estudio biológico de la gamba *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) en el Mar Catalán (NE de España). III Colloquium: Crustacea Decapoda Mediterranea. *Investigación Pesquera* 51: 213-232.
- Sardà F, Demestre M (1989) Shortening of the rostrum and rostral variability in *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) (Decapoda: Aristeidae). *Journal of Crustacean Biology* 9: 570-577.
- Sardà F, Cartes JE, Norbis W (1994) Spatio-temporal structure of the deep-water shrimp *Aristeus antennatus* (Decapoda: Aristeidae) population in the Western Mediterranean. *Fishery Bulletin* 92: 599-607.
- Sardà F, Cartes JE (1997) Morphological features and ecological aspects of early juvenile specimens of the aristeid shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816). *Marine and Freshwater Research* 48: 73-77.
- Sardà F, Maynou F, Talló L (1997) Seasonal and spatial mobility patterns of rose shrimp *Aristeus antennatus* in the Western Mediterranean: Results of a long-term study. *Marine Ecology Progress Series* 159: 133-141.
- Sardà F, Bas C, Roldán MI, Pla C, Lleó J (1998) Enzymatic and morphometric analyses in Mediterranean populations of the rose shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 221: 131-144.
- Sardà F, Company JB, Castellón A (2003a) Intraspecific aggregation structure of a shoal of a Western Mediterranean (Catalan coast) deep-sea shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) during the reproductive period. *Journal of Shellfish Research* 22: 569-579.
- Sardà F, Company JB, Maynou F (2003b) Deep-sea shrimp *Aristeus antennatus* Risso 1816 in the Catalan Sea, a review and perspectives. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* 31: 127-136.

- Sardà F, D'Onghia G, Politou CY, Company JB, Maiorano P, Kapiris K (2004a) Deep-sea distribution, biological and ecological aspects of *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) in the Western and Central Mediterranean Sea. *Scientia Marina* 68: 117-127.
- Sardà F, Calafat A, Flexas MM, Tselepides A, Canals M, Espino M, Tursi A (2004b) An introduction to Mediterranean deep-sea biology. *Scientia Marina* 68: 7-38.
- Sardà F, Roldán MI, Heras S, Maltagliati F (2010) Influence of the genetic structure of the red and blue shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816), on the sustainability of a deep-sea population along a depth gradient in the Western Mediterranean. *Scientia Marina* 74: 569-575.
- Sardà F, Company JB (2012) The deep-sea recruitment of *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) (Crustacea: Decapoda) in the Mediterranean Sea. *Journal of Marine Systems* 105-108: 145-151.
- Sassaman C, Weeks SC (1993) The genetic mechanism of sex determination in the conchostracan shrimp *Eulimnadia texana*. *The American Naturalist* 141: 314-328.
- Scarborough JR, Cowles DL, Carter RL (2002) Microsatellites in shrimp species. In: Escobar-Briones E, Alvarez F, eds. *Modern Approaches to the Study of Crustacea*. Kluwer Academic and Plenum Publishers, New York, pp. 291-299.
- Schierwater B, Ender A (1993) Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucleic Acids Research* 21: 4647-4648.
- Schlötterer C (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365-371.
- Schlötterer C (2004) The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* 5: 63-69.
- Schlötterer C, Tautz D (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* 20: 211-215.
- Schoebel CN, Brodbeck S, Buehler D, Cornejo C, Gajurel J, Hartikainen H, Keller D, Leys M, Říčanová Š, Segelbacher G, Werth S, Csencsics D (2013) Lessons learned from microsatellite development for nonmodel organisms using 454 pyrosequencing. *Journal of Evolutionary Biology* 26: 600-611.
- Schram FR (2013) Comments on crustacean biodiversity and disparity of body plans. In: Watling L, Thiel M, eds. *Functional Morphology and Diversity. The Natural History of the Crustacea Series*, 1. Oxford University Press, New York, pp. 1-33.
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.
- Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.
- Serejo CS, Young PS, Cardoso IC, Tavares C, Rodrigues C, Almeida TC (2007) Abundância, diversidade e zonação dos crustáceos no talude da costa central do Brasil (11°-22° S) coletados pelo Programa REVIZEE/Score Central: Prospecção pesqueira. In: Costa PAS, Olavo G, Martins AS, eds. *Biodiversidade da Fauna Marinha Profunda na Costa Central Brasileira*. Museu Nacional, Rio de Janeiro, pp. 133-162.
- Seward AC (1909) Darwin and Modern Science. Essays in Commemoration of the Centenary of the Birth of Charles Darwin and of the Fiftieth Anniversary of the Publication of 'The Origin of Species'. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Sherman CDH, Ierodiaconou D, Stanley AM, Weston K, Gardner MG, Schultz MB (2012) Development of twenty-four novel microsatellite markers for the freshwater crayfish, *Geocharax gracilis*, using next generation sequencing. *Conservation Genetics Resources* 4: 555-558.
- Shuster SM, Wade MJ (1991) Female copying and sexual selection in a marine isopod crustacean, *Paracerceis sculpta*. *Animal Behaviour* 41: 1071-1078.
- Silva C, Mendes H, Rangel M, Wise L, Erzini K, Borges MdF, Ballesteros M, Santiago JL, Campos A, Vidarsson J, Nielsen KN (2015) Development of a responsive fisheries management system for the Portuguese crustacean bottom trawl fishery: Lessons learnt. *Marine Policy* 52: 19-25.
- Simmons LW, Beveridge M, Wedell N, Tregenza T (2006) Postcopulatory inbreeding avoidance by female crickets only revealed by molecular markers. *Molecular Ecology* 15: 3817-3824.
- Smith BD, Jamieson GS (1991) Notes: Possible consequences of intensive fishing for males on the mating opportunities of dungeness crabs. *Transactions of the American Fisheries Society* 120: 650-653.
- Snedden WA (1990) Determinants of male mating success in the temperate crayfish *Orconectes rusticus*: Chela size and sperm competition. *Behaviour* 115: 100-113.
- Song KH, Jung J, Kim W (2009) Polymorphic microsatellite markers of freshwater prawn *Palaemon paucidens* (De Haan, 1844) (Crustacea: Palaemonidae). *Molecular Ecology Resources* 9: 418-420.
- Sousa-Santos C, Fonseca PJ, Amorim MCP (2015) Development and characterization of novel microsatellite loci for Lusitanian toadfish, *Halobatrachus didactylus*. *PeerJ* 3: e731.
- Spalinger JA, Jackson DR (1994) Annual management report for the shellfish fisheries of the Kodiak area, 1993. Annual management report for the shellfish fisheries of the Westward Region, 1993. Alaska Department of Fish and Game, Commercial Fisheries Management and Development Division. Regional Information Report 4K94-29, Kodiak, Alaska, USA.
- Sparkes TC, Keogh DP, Haskins KE (2000) Female resistance and male preference in a stream-dwelling isopod: Effects of female molt characteristics. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 47: 145-155.
- Speed D, Balding DJ (2015) Relatedness in the post-genomic era: Is it still useful? *Nature Reviews Genetics* 16: 33-44.
- Steinman RM, Moberg CL (1994) A triple tribute to the experiment that transformed biology. *Journal of Experimental Medicine* 179: 379-384.
- Stern C (1943) The Hardy-Weinberg law. *Science* 97: 137-138.
- Stoeckle BC, Cowley DE, Schaack Y, Macdonald III KS, Sallenave R, Kuehn R (2013) Microsatellites for North American species of *Triops* (Branchiopoda: Notostraca). *Journal of Crustacean Biology* 33: 48-55.
- Stow A, Silberbauer L, Beattie AJ, Briscoe DA (2007) Fine-scale genetic structure and fine-created habitat patchiness in the Australian allodapine bee, *Exoneura nigrescens* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Heredity* 98: 60-66.
- Streiff R, Guillemaud T, Alberto F, Magalhães J, Castro M, Cancela ML (2001) Isolation and characterization of microsatellite loci in the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*). *Molecular Ecology Notes* 1: 71-72.
- Subramoniam T (1993) Spermatozoa and sperm transfer in marine crustaceans. *Advances in Marine Biology* 29: 129-214.

- Subramoniam T (2013) Origin and occurrence of sexual and mating systems in Crustacea: A progression towards communal living and eusociality. *Journal of Biosciences* 38: 951-969.
- Subramoniam T (2016) *Sexual Biology and Reproduction in Crustaceans*. Academic Press, London, UK.
- Supungul P, Sootanan P, Klinbunga S, Kamonrat W, Jarayabhand P, Tassanakajon A (2000) Microsatellite polymorphism and the population structure of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Marine Biotechnology* 2: 339-347.
- Tachida H, Iizuka M (1992) Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. *Genetics* 131: 471-478.
- Tam YK, Kornfield I (1996) Characterization of microsatellite markers in *Homarus* (Crustacea, Decapoda). *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5: 230-238.
- Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17: 6463-6471.
- Tavares C, Martin JW (2010) Suborder Dendrobranchiata Bate, 1888. In: Schram FR, Von Vaupel Klein JC, eds. *Treatise on Zoology-Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea*, volume 9 part A. Brill Academic Publishers, Leiden, pp. 99-164.
- Taylor HR (2015) The use and abuse of genetic marker-based estimates of relatedness and inbreeding. *Ecology and Evolution* 5: 3140-3150.
- Teixeira S, Serrão EA, Arnaud-Haond S (2012) Panmixia in a fragmented and unstable environment: The hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* disperses extensively along the Mid-Atlantic Ridge. *Public Library of Science One* 7: e38521.
- Temple HJ, Hoffman JI, Amos W (2006) Dispersal, philopatry and intergroup relatedness: Fine-scale genetic structure in the white-breasted thrasher, *Ramphocinclus brachyurus*. *Molecular Ecology* 15: 3449-3458.
- Thiel M, Hinojosa IA (2003) Mating behavior of female rock shrimp *Rhynchocinetes typus* (Decapoda: Caridea) - indication for convenience polyandry and cryptic female choice. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 55: 113-121.
- Thomas JD, Barnard JL (1983) Transformation of the *Leucothoides* Morph to the *Anamixis* Morph (Amphipoda). *Journal of Crustacean Biology* 3: 154-157.
- Thorne MJ, Fielder DR (1991) The red cuticle on the claw of male *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Memoirs of the Queensland Museum* 31: 277.
- Tobar R, Sardà F (1987) Análisis de las capturas de gamba rosada *Aristeus antennatus* (Risso 1816) en los últimos decenios en Cataluña. *Informes Técnicos de Investigación Pesquera* 142: 3-20.
- Toro MA, Caballero A (2005) Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360: 1367-1378.
- Torres AP, Dos Santos A, Alemany F, Massutí E (2013) Larval stages of crustacean species of interest for conservation and fishing exploitation in the Western Mediterranean. *Scientia Marina* 70: 149-160.
- Treece GD, Fox JM (1993) Maturation and Hatching. In: Treece GD, Fox JM, eds. *Design, Operation and Training Manual for an Intensive Culture Shrimp Hatchery*. Texas A and M University Sea Grant College Program, Texas, pp. 51-82.

- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40: e115.
- Urbani N, Sainte-Marie B, Sévigny JM, Zadworny D, Kuhnlein U (1998) Sperm competition and paternity assurance during the first breeding period of female snow crab (*Chionoecetes opilio*) (Brachyura: Majidae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55: 1104-1113.
- Valière N (2002) GIMLET: A computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* 2: 377-379.
- Valles-Jimenez R, Cruz P, Perez-Enriquez R (2004) Population genetic structure of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: Microsatellite DNA variation. *Marine Biotechnology* 6: 475-484.
- Vallone RM, Butler JM (2004) AutoDimer: A screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *BioTechniques* 37: 226-231.
- Van der Elst R, Everett B (2015) Offshore Fisheries of the Southwest Indian Ocean: Their Status and the Impact on Vulnerable Species. Oceanographic Research Institute, Durban, KwaZulu-Natal, South Africa.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-Checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- Van Son TC, Thiel M (2006) Mating behaviour of male rock shrimp, *Rhynchocinetes typus* (Decapoda: Caridea): Effect of recent mating history and predation risk. *Animal behaviour* 71: 61-70.
- Velonà A, Luchetti A, Scanabissi F, Mantovani B (2009) Genetic variability and reproductive modalities in European populations of *Triops cancriformis* (Crustacea, Branchiopoda, Notostraca). *Italian Journal of Zoology* 76: 366-375.
- Vergnaud G, Denoëud F (2000) Minisatellites: Mutability and genome architecture. *Genome Research* 10: 899-907.
- Verne S, Puillandre N, Brunet G, Gouin N, Samollow PB, Anderson JD, Grandjean F (2006) Characterization of polymorphic microsatellite loci in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Molecular Ecology Notes* 6: 328-330.
- Vickery R, Hollowell K, Hughes M (2012) Why have long antennae? Exploring the function of antennal contact in snapping shrimp. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 45: 161-176.
- Vogt G (2016) Structural specialities, curiosities, and record-breaking features of crustacean reproduction. *Journal of Morphology* 277: 1399-1422.
- Vogt G (2013) Abbreviation of larval development and extension of brood care as key features of the evolution of freshwater Decapoda. *Biological Reviews* 88: 81-116.
- Vuichard S, Borer U, Bottinelli M, Cossu C, Malik N, Meier V, Gehrig C, Sulzer A, Morerod ML, Castella V (2011) Differential DNA extraction of challenging simulated sexual-assault samples: A Swiss collaborative study. *Investigative Genetics* 2: 11.
- Wang J (2002) An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* 160: 1203-1215.
- Wang J (2007) Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness. *Genetics Research* 89: 135-153.
- Wang J (2011) COANCESTRY: A program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources* 11: 141-145.

- Wang J (2016) Pedigrees or markers: Which are better in estimating relatedness and inbreeding coefficient? *Theoretical Population Biology* 107: 4-13.
- Wang X, Guo X, Zhang Y, Meng X, Qiu X, Liu S, Zhang T (2009) Development of polymorphic EST-derived SSR markers for the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Conservation Genetics* 10: 1455-1457.
- Waples RS (1989) A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics* 121: 379-391.
- Waples RS, Punt AE, Cope JM (2008) Integrating genetic data into management of marine resources: How can we do it better? *Fish and Fisheries* 9: 423-449.
- Waqairatu SS, Dierens L, Cowley JA, Dixon TJ, Johnson KN, Barnes AC, Li Y (2012) Genetic analysis of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) across its natural distribution range reveals more recent colonization of Fiji and other South Pacific islands. *Ecology and Evolution* 2: 2057-2071.
- Ward RD (2000) Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia* 420: 191-201.
- Ward J, Saleh N, Dunham DW, Rahman N (2004) Individual discrimination in the big-clawed snapping shrimp, *Alpheus heterochelis*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 37: 35-42.
- Waser PM, Strobeck C (1998) Genetic signatures of interpopulation dispersal. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 43-44.
- Watson JD, Crick FHC (1953) Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737-738.
- Weir BS, Anderson AD, Hepler AB (2006) Genetic relatedness analysis: Modern data and new challenges. *Nature Reviews Genetics* 7: 771-780.
- Wickler W, Seibt U (1981) Monogamy in Crustacea and man. *Zeitschrift für Tierpsychologie* 57: 215-234.
- Williams SM, Pepperell JG, Corley SW, Ovenden JR (2015) Isolation and characterisation of 18 polymorphic microsatellite loci for black marlin (*Istiompax indica*) and their utility for Pacific billfish species. *Fisheries Research* 166: 29-32.
- Worm B, Hilborn R, Baum JK, Branch TA, Collie JS, Costello C, Fogarty MJ, Fulton EA, Hutchings JA, Jennings S, Jensen OP, Lotze HK, Mace PM, McClanahan TR, Minto C, Palumbi SR, Parma AM, Ricard D, Rosenberg AA, Watson R, Zeller D (2009) Rebuilding global fisheries. *Science* 325: 578-585.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Wright S (1969) *Evolution and the Genetics of Populations, volume II. The Theory of Gene Frequencies*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- Xie Y, He L, Sun J, Chen L, Zhao Y, Wang Y, Wang Q (2010) Isolation and characterization of fifteen microsatellite loci from the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Aquatic Living Resources* 23: 231-234.
- Xu Z, Primavera JH, de la Pena LD, Pettit P, Belak J, Alcivar-Warren A (2001) Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture* 199: 13-40.
- Yap ES, Sezmis E, Chaplin JA, Potter IC, Spencer PBS (2002) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Portunus pelagicus* (Crustacea: Portunidae). *Molecular Ecology Notes* 2: 30-32.
- Yasui Y (1998) The 'genetic benefit' of female multiple mating reconsidered. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 246-250.

- Yoshida K, Sekiguchi K, Mizuno N, Kasai K, Sakai I, Sato H, Seta S (1995) The modified method of two-step differential extraction of sperm and vaginal epithelial cell DNA from vaginal fluid mixed with semen. *Forensic Science International* 72: 25-33.
- You EM, Chiu TS, Liu KF, Tassanakajon A, Klinbunga S, Triwitayakorn K, de la Peña LD, Li Y, Yu HT (2008) Microsatellite and mitochondrial haplotype diversity reveals population differentiation in the tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Indo-Pacific region. *Animal Genetics* 39: 267-277.
- Yu Y, Zhang X, Yuan J, Li F, Chen X, Zhao Y, Huang L, Zheng H, Xiang J (2015) Genome survey and high-density genetic map construction provide genomic and genetic resources for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Scientific Reports* 5: 15612.
- Yue GH, Chang A (2010) Molecular evidence for high frequency of multiple paternity in a freshwater shrimp species *Caridina ensifera*. *Public Library of Science One* 5: e12721.
- Yufang S, Hongying S, Yue Z, Guanghui Q, Qiang Z, Naifa L (2009) Isolation and characterization of microsatellite loci in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense* and cross-species amplification in related taxa (Decapoda: Brachyura). *Journal of Crustacean Biology* 29: 413-418.
- Zabeau M, Vos P (1993) Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting. *European Patent* 0534858 A1.
- Zalapa JE, Cuevas H, Zhu H, Steffan S, Senalik D, Zeldin E, McCown B, Harbut R, Simon P (2012) Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. *American Journal of Botany* 99: 193-208.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: A review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.
- Zeh DW, Smith RL (1985) Paternal investment by terrestrial arthropods. *American Zoologist* 25: 785-805.
- Zelnio KA, Thaler AD, Jones RE, Saleu W, Schultz TF, Van Dover CL, Carlsson J (2010) Characterization of nine polymorphic microsatellite loci in *Chorocaris* sp. (Crustacea, Caridea, Alvinocarididae) from deep-sea hydrothermal vents. *Conservation Genetics Resources* 2: 223-226.
- Zeng D, Chen X, Xie D, Zhao Y, Yang C, Li Y, Ma N, Peng M, Yang Q, Liao Z, Wang H, Chen X (2013) Transcriptome analysis of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas in response to Taura Syndrome Virus (TSV) experimental infection. *Public Library of Science One* 8: e57515.
- Zhang D, Lin J (2006) Mate recognition in a simultaneous hermaphroditic shrimp, *Lysmata wurdemanni* (Caridea: Hippolytidae). *Animal Behaviour* 71: 1191-1196.
- Zhang D, Ding G, Ge B, Zhang H, Tang B (2012) Development and characterization of microsatellite loci of *Oratosquilla oratoria* (Crustacea: Squillidae). *Conservation Genetics Resources* 4: 147-150.
- Zhao Y, Li Q (2007) Characterization of expressed sequence tag-derived microsatellites from the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Molecular Ecology Notes* 7: 1248-1250.
- Zhu ZY, Shi YH, Le GW (2006) Isolation and characterization of polymorphic microsatellites from Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Molecular Ecology Notes* 6: 838-839.

MATERIAL SUPPLEMENTARI

GATATGCATTGCTGCTGTTGCATCCTCCGAAACCTGCTTGACATTTGCACGGGCCTCGCGCCGGCCGGC
CCGTCCTTTTCGCTCGCAAACCCAACCCTTTCCATCTCTTGTCTTTTCCCAGGAGTATACGGTCACTC
CGCCAGGTCTTAACCTGAACTATCACAGCACAAAGCCCGCGGGCTCGCACCGGGCATGGATGAGTCACC
CACAATAGCGGTGTTTCTCCTCTCCTCTAGCAGGGAGAGAAGAATATACCCCTCTCTGCATCCATGCTCG
GTCTTGCTCTTCAGATGCGGGATACCACTAGTTTTCTTAGTTTGACGCCGGATGTATTCCGACCCAAACCC
TGAACCGCGGATCATCCCTTTGAGATCCTCCAGGCTCCTTTGCCCCACGAGCTAACTCTCGACAGGAT
GCGCGACGGGTCTCGGGCAAACCTTAGATAAGGTCTGCGGACCTTCAGAGAAATAAAGAAAGACAGAGA
ATTGCAAAAAGAAGAATTCTAGATGGCACTTTACATCCGCCCTACACCGTCTCGTGTACAGCACAGGGG
GAGAATTCAGTAGGATTCTCCTCTCCTCTTAGGCATTTGCGCGTCAGAGAGCGCCAGGCGGGTCTCTCG
TACCCCGCGGGCGTCCCTGCCGCTGCTGTACACACTGGACTGGGGGAAGGCCATGCATGGTGCCATG
CATAAAATATATAAAGGAAGGAAGGGCAGACGGAATACGCTCTCAGTTGGCAAGTCATGATGATGATGAT
CCTCCTGTGTAGTGTGCTCGGGACCTCCTCCAGAAGAATCCTACTTGGCATTCTTCTGAATTTCTGAATT
TCTGAATGAATGAAAGAAATAGTATTATGTCTTTAGACATAAAACCAAGAAGGGAACCGCGGAGTAGTACAC
ACACACTCCTGCGTCCGTCCTCAAGCaacagacaaagcaagaacaacaacaAGCAGTCGTCACCAGAGAGAT
TGAGAGAGGAGAATATGATGATCCTCTTGTTGCTGTTCTTGTTTTTCTGTTTTTGTTTTACAGGGAGGT
AGGGGATCTTTGCGGGTGTCTGCCACACGCCGCTGTGCCCATCCCCCGCCAAAAGAAAAGAAAATT
ACCTACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTACA
GGCCGATCTACGGCGAAACCGCGGACGGCTCATTAAATCAGATATAATTCATTGGATCTGTACAACCCACT
TACTTGGATAACTGTGGTAATCTAGAGCTAATACATGCCTTTAGAGACTCTGACAGCAATGGAAGAGCG
CTTTTATTAGTTCAAACCCCTTCGGACCTTGGGCCAAGAGATTTGGTGAATCTAAATAACTTTTGCTGAGC
GCACGTTCTCGAATCGGCGCCGCATCTTGCAAGTGTCTGCCTTATCAGCTCTCGATTGTAGGTTAAAC
GCCTACAATGGCTATAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGG
CTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGGCGCGCAAATTACCCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGACGA
AAAATACTGTTGCGGAGACTCCATCGAGGCTTCGCAATTGGAATGAGTACACTTTAAATCCTTGTACGAGG
ATCAAGTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATTCCAGCTCCATTAGCGTATATTAAGTT
GTTGCGGTTAAAACGCTCGTAGTTGGCTCTCTGTTCTGGACTGGCGGTTACCTTAGCGGTGCTTACTG
TACAGCTCCGAGCTATATCCCGCGGGCTCGCCTGGGGTGTCTTTACCGAGTGTCCCTCGTGGCCGG
CACGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGCTCAGAGCAGGCTATACTAACAGCCTGAATGGTGGTGCATGGA
ATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTCGGAACCCGAGGTAATGATTAAGAGAAGCAGA
CGGGGGCATTCTACTGCGACGATAGAGGTGAAATTTAGACCGTCGCATGACGAGCTACTGCCAAAG
CATTGCCAAGGATGTTTTCTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGTTGAAAGGCATCAGATACCGCCCT
AGTTCTAACATAAAGATGCTGACTAGCGATCCGCCGAGTTATCCCATGACCCGGCGGGGAGCTTC
CGGGAAACCAAAGTATTTGAGTTCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACG
GAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTCAATTTGACTCAACACGGGAATCTTACCAGGCCCA
GACACTGGAAGGATTGACAGATTGAAAGCTCTTCTCGATTGGTGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCT
TAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAAGTAGTCGACG
GATCTTACACTCCGTTGTTTTATATATATAAATGAAAATGGTGTCCAGCTCGCAGCTTCTTCTTAGAGGGA
TAAGCGGCAGCAAAAAAATACTAGCCGCACGAGAGATTGAGCCATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGAT
GTTCTGGGCCGCACGCGCTACAATGGAGAGTTCAGCAAGCTCTCCCTGCTCCGACAGGAGTGGGTA
ACCTTATCAAAGCTGTCTTAAAGGGGATTGGGGCTTGCAAATGTGCCATGAACGAGGAATCCCAG
TAGGCGCAATTCACCAGATTGCACCGATTTAGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCTACTACCG
ATTGAATGGTCTAGTGAGGGCATCGGACTGGCGCTCTTGGAGTGGTCTCTCACCTCGCTATGAAATCCT
CCTCGTGGGGACGAGAGGGGGGAGCCGCTCGGGTCTGACGGAAGATGTCCGAGCTGGGTCAATTAG
AGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGTTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGTATTATATGTATT
ACACACAGAAATACATGATGATAAATAAAGGGTCCGACGGGACCTGCACATCATCGTGTATCCTCC
CCCTCCTCTGTAGGACGACGACGACGACGCTCCGAAGGCAGGTCTGGCGCACACCCACCCCAAT
TATTGACATACCAATCATCAATCAATCGTGACTTCGATGACAGCTCCAAGGCAGGCAGATAGAGACAGTTA

TGTGATTTGCAGACAGAAAAAGCCATCCATCCATTCCCAAAAGGAGGAGGTGATGATGCTTATGCTGCT
 GCTGCTACTACTGTGCTACTACTACTACTCCTTCTCTGTGCTGCTGCTGCTGCTTTGATGATGATATCCTAG
 GAGGCTTTAGAGGCTGCCTCCTTTGCCGCGCTGTTGCCTGGCGCGGAAGAACAACAGACTGCTCTC
 TCGCCTGCCTCTTGAGGCAGAACTCTCCTTTGAGGGTCTCCAGACTTCTTCTCTCCTTTAATGTTGT
 CTAGAAGAAAGAAGGAACCTTTATTCCATATCAAACCCTTTATTGGCTTCCCCGGACACAAGCGGGGAT
 GATCATGATTGTGACTTCTGTCATAAACCCAAAGCACAACTCTTAACGGGGGATCACTTGGCTCGTGGGT
 CGAGGAAGACCGTGGTAAAAGCGAGGTTTGTGGCTATCGCAATTTTACGTGACTCCATCGACACGT
 CGAACGCACATGGCGGCGGCTGCCGTAAAGGCCTAGTACACTACTAATATATAGGCTGGCGGTGCCAC
 CTTCACTCGAGAGTCGTTCCGCCCTTTGCACAGACAATGGGTGTGGATTATTCTTTAAGAGTAAGATTA
 TCGCCGTGACGCCGACAAGGCTCACCAAGGCCTCGTGCCTGCCGTTGCCCTGCAACGCCCTGGGA
 GATCGCTGGCAAATAAGTTCGGAGCGTGCCAAAGACAAATTTCCGCCAGCGTTCCCTTAAACAAATC
 ACATGCACGTGCACCTCCGACGACACAAGTTCCCGGCCGAGGGGGGAGCGCACAGCACTGGCACTCA
 CTCAGAGAGAGAGACGGATAGAGTGAGTGCTTCTTGGGAGGCAACAGCCCCAAAAAGAGCCCTGTGA
 GGCTGCGACGACGACTGGGACGACGACTGATGACGACGACGAAAGACTTGTCTCTTTTGTGCTGCTG
 CCGTGGCGGGCAGCTCCCTTGTCTTCTCCCTTGCATCTCACTCTCACACTGCCCGCTGGAGTGGGA
 GACGCAGTGAAGGGGGGAATGGAAGAGGGAGGCGTTTTCGGCGTTTCAAATGGATGCATGCTTCTCT
 TTGTCAATTCAGTAGGAGTCATCACTGATCCAGTCAGTCAAAGCCTTGGCTTGTGTGCGTCACT
 CTCCTCGTGGTTTCTTGCACGAAATATGAAGGAAGGAAGGCAGACGGACCACCGACTGTACTGTACA
 GTTACAGACAGACCTAGACAAAGTGCTGGCACAGAGAGAGACCAGACTGGTTTTGCTAGGAGCCT
 GGCTGGCTCGGGGGGCCGGAAGGAAGGAAGTAAGGAGGAAATCTTGCTTACCAGGCCATCCCCT
 CATGCCACGGCAGTGTCTGTCACTGAGTCAAGTCTTGACTTATCCTCAGTCCGAGAAAC
 GAGGGAGGAAGCGACATTATATGTCTTTCGCTCTGTGCCCTCGACGACGTTAAACTAATTTTTTGTAG
 TAACCCACCAACTATTTTTGAAGCGACCTCGAGTTGAGGGAGATCACCCGCCAAATTTAAGCATATTAATA
 AGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTCCCTTAGTAAGGGCGACTGAAACGGGAGTAGCCAGCGCA
 AAGCCTCGTGCTTCTAACGGGGCACGAGGGTGTGCGTTTGGGAGAGGTCTTGCACGCGTCCCG
 CGCCGCTAAGTTGTACATGAATGACTCTAATGCCAAGGAGGGTGTGAGCCCGTGTGGCGGTAAGG
 ACCCCGAAGGGGGGAAGGTACGGGACTGCGGAAAGGGCCTCTCCTTAGAGTCCGGTTGCCGAAACC
 GCAACCTAAAGTAGGTGTTAACTCCATCTAAGGCTAAATACGACCACGAGACCGATAGCGAACAAAGTAC
 CGTGAGGGAAAGTTGAAACAGAACCCTGTAGAGAGAGTTCAAGAGAACGTGAAACCGTTAAGAGGCTAA
 ACGGGTGGAGATTGAAAGATCGAACTGGGGGATTGAGTTCGTTCCGTTAGTCCGGAGGGGGTTTTCGG
 GACCACAACAGCGACCCCGAGCGTGCGGCTCTAACGTGCGAGTCCGCTCTAGGGGGCGCGGCCCG
 TCCCTGCCCGGCGCCGGCGGGCGATTTTCCCCCGCAGTAGGTCGCCGCGATGCGTTGGGAGGGCG
 TCTGAGGCCCGGGCTTTGGCAGGAACCGACGTGCTGCTGCTGCTAAAGGCTGCCCCCGTGGTAGTCT
 GACAGAAGCGGCGTCTGGGGATCCCCGGTGAACCTCATCGTTGCATTAGTAGCGATGATCCTTGTCTT
 GCTCTCCCGACGGTGCCTCCTTGGGGCGGCGTCTGCTGCTGTTGCGAGCAGCGGCGCTCGCCTTCG
 CGGTGTGCAAAGAGTCGAGGCTCTACCCGACCCGCTTGAACACGGACCAAGGAGTCCAACATGTATG
 CGAGTCATTGGGCTACTAAACCCACAGGCGCAATGAAAGTAAAAGTGCTTTGCCCTGTCATAGCTAC
 AGGGCCGATCCCTCGGTCCGACGACCTCTTGTCTCCCTGGACGGAGTGACAAAACAATGCCTTCCTC
 CCCGGGAGCTACAGCTCTGTAGTACTCGGGCTAGGGGACTCGTCCGGTGCCGAAGCCTCTCCTCCT
 GCCTCCGGTAGGAGGAAGGGGGGCGCAGGTCCGGGACTCGCCATGACGAACAGCTGTCTCTGGCT
 GGCTGCCTCAACAGTGGCTAGCTTGCAGGCTTCTGGATGTGTCGGCGAGTACCTAGAGCATAAATGTT
 GGTACCCGAAAGATAGTAACTATGCCTGGCCAGGATGAAGCCAGGGGAAACCCTGGTGGAGGTCCGT
 AGCGATTCTGACGTGAAATCGATCGTCAGAGCTGGGTATAGGGGGCAAAGACCAATCGAACTATCTAGT
 AGCTGGTTCCCTCCGAAGTTCCCTCAGGATAGCTGGCACTCGTCAATAACGAGTTTCATCCGGTAAAGC
 GAATGATTAGGGGTGTTGGGGACGAAATGCTCTCAGCCTATTCTCAAACCTTAAATGGGTGAGGTGCCGG
 GCTTGCTTTATGTGCCCTCACGGGCTTGAAGCCCCGGACACGAATCGGAGTGCTTAGTGGGCCAATTT
 TGGTAAGCAGAAGTGGCGCTGTGGGATGAACCAAACGTCGAGTTAAGGGGCCTAAATGGATGCTAATCC

GATACCATGGAAGGGAGTTGCTTGCTATAGACAGCAGGACGGTGGCCATGGAAGTTGGAATCCGCTAAG
 GAGTGTGTAACAACCTCACCTGCCGAAGCAAGTAACCCTGAAAATGGCATGGCGCTCAAGCATCTCCCG
 ATACTCGACCCGCCGGCGCACTATTGGCTGCAACAAGGAGGTCTCGAGGCCCGGTGAGTAGGAGGAG
 CGCGGTGGTGAAGGATTGCGCGTGAGCCGGTCTGGAGCCGCCACTGGTGC GGATCTTGGT
 GGTAGTAGCAATATTCGAGCGAGACCACCCTCGTTGACCGACGCGGAGAAGGGTTCCACGCCAACATC
 GCTTGGTCGTGGGTAGTCGTACCTAAGCCCGGGATAGCATCCCGATTTACTAGGTGTGCTGGCTTTCC
 TGTCCCAAGTCATAATTATGCACCACCCTGGTAATGAATGATATAGTCTCCCTCGCGCTCGCAAGAGTA
 TTCCCGCATCTCCCTCTCTTTTTTTCTCGAAAAGAAAGTAAGGGTGTTGAAGGAGAGTGCCTGCATTCT
 CCGTTGTACCTTGCCTGGCGGAGGTGGACTGGCCCGCCAGCCAGGCGGAGCTTTGAAAGAGCTT
 GATTTATCCCTGTCCAAATGTCATGCTCTAAGAAGACAGACAACAACCTACTGTAATAGGCAGACGGACA
 GACTTTCTTTCTTTCATTAGTCAGTTGGTCGGTCCGGTCCGGTTCAGTTTCGTTGCTGTTGCTATC
 CATAGCATCATAGCGATACGCTGCTGCTGCTACTAGTTTTGAGAAGAGAGAGAGATTGTCTCATAACAC
 ACAGCCAGCCAGCCGGCGATCGCTTGCTTGCTTCCCAAACGGTCTGTTTAAAGTCCAGATCAGTGGC
 GAAAGGGAATACGGTCAATATTCGTAACCTGGCCCGGTACCACCCGCCTCCCTCCAGCTGCTCATATC
 CCATGACCCCTTATCCCAACAGCATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATT
 GGGTCTAGAGAGTAGCCTGGGAGGCGGGTTAAACTTTTAAACAATAACAAGTTATTGTCGATGCCGAAG
 GCATGGGAGTTAGTCACTTCCCTGCGCATCTAAGGACCGGTCTGGCGACCTGTGTCGCTAGATGATTAT
 CCTCTTCCAAAAGAAGAACTGCTTTGATAGTACTTACTGCAGCTGCTTGGTAGTACTACTACGACGACT
 GCTATTGCTGCTGCTGCAGCTGATACTGCTATTTCAAAGCAGCTTGTGTGCCCCCGTTCTCCTAAGATG
 GCGTGTGTTTTTTTTGGGTGCCGTCCGAGACCGTGTGCCTGAATGTTGAAGACACGGCTCGGCCGCA
 GGCTCCCCATTTGTGGTTGGCACTAGTTCGACTGGCACCCCGGTAACGGGAACCTGTTGCTGACG
 CCGGCGGTGGTCCGGGAAAGAGTTTTCTTCTCCCTTTTAGGCAGCCGGAGACCCCTTAAAGTTTTCACTT
 GGCGAGGGGGTCTGTTGGTAGTAACAATATGATTGGAGAGGCAATGCATAATGCCCGGTGTTCCGCGTA
 GAGCGCCACGCAATTAAGCGTAGGTGTCCCGTGCCTGCGCGCCGCCCTTAAAAGGCGATGCGGGTT
 ACCACTCGAGCAAACCACTGCCACACCACTCAATGAAAAGAGCCCTTCAATGCCCTGACCATACTCTGG
 GGACGGAGAGAGAGAAAGGCACACACACATACTGGCTGGTAGTATTATTATTAGCTGTAGCAAGCGAG
 AGAGAGAGCAGAGTAGTATGGTAGTAGCCGTAGTACTATGACAACAACGCAGTTTCTGTCTCCTTCTTTG
 GTTGATTGCTGTTGCTGGACGGACGCCACAGCGTCTGTCTTCACTCTTCTGAAGTGATCTGGCTTAG
 TCGGCCGACCTCCCATCCTCCGGGCTTGGGTTGGTCGTGCCTTCTTGAGTCTGTGTCCAACTTTTAAA
 AGAAGCGGACAGCCAGCCATCAGATGGAGTGTGAGAGAGAGAGATAGCGCAGCCGCTCACCAGAGGA
 GGCAGAGGAGACAGGAGGAAAGGATCATAGAGGTCCCTTGGCATCGGGTCCAGCACGTACCGAATCCGC
 AGCAGGTCTCCGAGGTGTGGAGCCTCTGGTCGATAGATTAATGTAGGTAAGGGAAGTCGGCAAGTTAGAT
 CCGTAACCTCGGAAAAGGATTGGCTCTGAGGGTCCGGTCCAGTCCGGCCTGCGCGGGAAGCGGCTC
 CTTCTGACGTGGGCATCCTTGGTGCCTGTCTAAAGGAGAAAACGGACTGGGCGAGGGGCCGATCGTCG
 CTTAGGCTTCCATTCCCTCCTCTGGCTTTCATGCATCTTCTCGTGTTCCTGCCGCTGCTGCGGCGGTCTCC
 GGTGCTTCTGGGGCCCGGGGTGCTTGTGTTGGTGGTGTGGGGCCGGGAGCTCTTGTGTTGTTCTA
 GGGGTCCAGGGGTGGCGGTTGAGGTGGCGTGGCGCACCGAGCTCGGACCCAATCTGTTACGGCAG
 CATAACGGGGCCCTATCCATTAGGACCGTGAATGCGTTTGGCAAAGGTGGGCTTTGTTGTCCCGTCCG
 CTAACACCCTGTTGTGCGGCCGAAGGGGAATCATCATGGCCTTTGGTCGTCCATAAGAGTTTTATTAA
 CTAAGCATTGCGCCAATGGCATAACATGTCCCCGAGGCTCATGCACTGGGGTGGATGGGACGACCC
 CAACCGCGGCTGGCGGCTAACGGCCGTCTCAGAAGTGGCACGGACAGGGGAATCCGACTGTTTAAATTA
 AAACAAAGCAATGCGATGGTCAGTGAGTGATGTTGACGCATTGTGATTTCTGCCAGTGCTCTGAATGTC
 AAAGTGAAGAGATTCAACCAAGCGCGGGTAAACGGCGGGAGTAACATGACTCTCTTAAAGGTAGCCAAA
 TGCCTCGTATCTAATTAGTGACGCGCATGAATGGATTAACGAGATTCCTACTGTCCCTATCTACTATCTAG
 CGAACCCACAGGCAGGGGAACGGGCTGCAGTAAACAGCGGGGAAAGAAGACCCTGTTGAGCTTGACT
 CTAGTTTGATTTGTAGAGAGGCATCAGAGGTGTAGCATAAGTGGGAGGCTTCGGCCGACAGTGAAATAC
 CACTACTCTGATCGTTTCTTACTTACTCGGTTATACGGGGACGGGAGCTTCTCGCGAGGGGAATGCCT

CCTGATTTTAGTTCAAAGCGGCAATGGTCGTTCCGCGACCCGCCGGCGACCCGTACCGAGGACAGAATCAG
 ATGGGGAGTTTACTGGGGCGGTACATCTGTCAAATGATAACGCAGATGTCCCAAGGTCAGCTCAGCGT
 GGACAGAAACCACGTGTAGAGCCTAAGGGCAAATGCTGGCTTGATCCTGATTTTCAGTACGAATACGGAC
 TGCGAAAGCAAGGCCAGCGATCCTTTTACTTTTACGAGTTTTAAGCAAGAGGTGTCAGAAAAGTTACC
 ACAGGGATAACTGGCTTGTGGCGCCAAGCGTTCATAGCGACGTCGCTTTTTGATCCTTCGATGTCGGC
 TCTTCTATCATTGTGACGCAGTTTTACCAAGCGTGGGATTGTTACCCTTTAATAGGGAACGTGAGCTG
 GGTTTAGACCGTCGTGAGACAGTTAGTTTTACCCTACTGTTTACTCGAAGCACGTTGCGACAGTAGCCC
 CGCCCAGTACGAGAGGAACGGTGGGTCCGGACCAATGGTCAACCTCTTGGCCGAGCGGCCAGTGAGAG
 CGCAGCTACGTCCGGAGGGTTTACCCTGAAAGCCTCTCAAGGGTGAACCCATACTGAGCGTTAGCAAC
 TTGACGTCGTGCGACCCAACGGATCGGCGAAAAAGTTTTACGCGTGCCCCCTTTCCTTCGGGTCGGGG
 GGTGGCGGACTCTGCCATGCAAGGGGAACCGGGGGCGGCATAAGAAAACGAGGCCGCTTCCCTTC
 CCGAATACAGAGCCATCCAGATCCGGAGTGTGCTACCGAACCGTCTGCATACGACTTACGTATCGGCCG
 GGGTGTGCTGATACCTAGAGCAGGTAACCTCTGCGATTGGTTAAGACTCGTCCCATTAAGGTCGGAA
 GGTTTTGTCTGTCCCAGAGACGGACACTAGGAGGTTACGCCCTTCTCTTCTCTTAAGAATTAAGAAG
 AAGGGAAAAACAAAAACAAAAACATAAAGGAGAAGAAGGCCAGCGATCCTTTTACTTAACAGAGA
 TCTCTGAGAGACAGAGGAAAAAGATTGGAAGAAAAACCAAAAAACAAAAATTACCTGGTTTTATCATAA
 TAACCTTCTTCTAATAAGAGAGAATGAATAAACAGGCGATGGGCATAATAAGCACCAACGTCCTCTTTGG
 AGCCAGGGGAGCAGCAGCAGCTGCCTCTTTTGCCTCTGCCAGCTTCTAGTACTAAAAGTAAGTAGTAC
 TGGTTGAGCTTTCATTTTGTATAGAGAGGCATCAGAGG

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig00060; microsatellite Aa60 sequence

AAGTACGGGGTAGAAAAGAAACGTATGATGAGCACTAACAAGAATCGTCTGCAGTGATGGATCAG
 CAGGCTAGACCACGACGGTGGCGTTTGCCTTGCGATTTTTACCCTCTAGAACCAATTAACCATTTTC
 CATTGGTTTTAATAGTAATACTTTTGCGAAAATTAATTTACAAGCTTTTTTLAGAACCTATTACACGCGAAA
 GTACAGGTTCCACCGtatatatatatatacacagtatatagtatatatgtatatatattatatacagtatatacagtatatatatatatg
 tataaatgtgttaaatatgtatatatatataCAGTACATATCCTTTTATCCGAAATTTCTGGAAACCGAAAAGCTCCGAAAAC
 CGAACATTTTGCACAAGAATATTTGTTATTTTTTGGTGAACACATGTAACAACCTCCCACCCTGGCT
 CAGACTTTTCTCCTATTTTTCCCAAAACTGACCTTTAAAGGCAAGTTACATACAGTGTTGTTTCATCT
 CAGCTGTTTACGCTCTTGTCTATAAGCTCTCTAATAACGCCTATTGTCATGTGTTTATATCTTTAAATTGT
 TATATATTTAGTTCCAAAAGCCCATTTAACGAGAAAAGTGGCCACCCACTTGTTTAAACGATATTTTATGG
 GGAAGCGAAAACCTTCTCTCTGTCTCTACAAAATAATAACAATCACCTAGACAAAGAGTAGAATAAC
 TACAAGACCCACAGACCCATCGAAAGAACTGAATAATTTTACCTTCGACATCCAGATCGGCTTGCG
 GAATACCTGAATAATAGTAGTTTTGTTTCATTGTCTCTTCTCCCTCTCTCTTATGCGACTTTTTCAA
 CAGTATACTAATGCTTCTTTAGACTGTAATTAACCTTATTATGCATAAATAACAATAAAAATGAATACG
 TATCTAAAAAATTACATTAACATGGAATGTGTCAGTGAGGGGGGAAACTTTTTATGATGCAAACGGGAATT
 GAGTCTTGGAGCGCTATGACATACGGTTCACCTAATTCACCTTTGGAGAACATCAAGCCTCTTGTTGAAG
 GTTATTCGATAAGAAATTACTTCGATATAGTTATAAACGTTCAAAATTTAAAAATCCTCTGCAAGAAG
 TATTATTGAATAGATGAATGATATACGAGAGTGAAAGTTTACGACGGGAAACAAACGCGCGCGCGT
 TACACCGATCGCGAACGCTACGTGTCCAGCTGGCATGAAAGGGAATCATTTCGATGAACGCTATTCTT
 TCATTTATAATGTTTATTTGATAAGAAATTACTTCTATATTGTTACAATAATGTTCAAATACTGTTTCAGTA
 CATCTGAAACCCCTCTGCTAGAAGTATTAGTGAAGAAGTAATAATATATATGAGAGTG

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig00060; microsatellite Aa60 sequence

AAGTACGGGGTAGAAAAGAAACGTATGATGAGCACTAACAAGAATCGTCTGCAGTGATGGATCAG

CAGGCTAGACCACGACGGTGGCGTTTGCCTTGCGATTTTTACCCTCCTAGAACCAATTAACCATTTTC
 CATTGGTTTTAATAGTAATACTTTTGCGAAAATTAATTTACACAAGCTTTTTTAGGAACCTATTACACGCGAAA
 GTACAGGTCCCACCGtatatatatatatacacagtatatagtatatgtatatgtatatatatatacagtatatacagtatgtatatatatatg
 tataaatgtgttaaatatgtatatatatataCAGTACATATCCTTTTATCCGAAATTCTGGAAACCGAAAAGCTCCGAAAAC
 CGAACATTTTTGCACAAGAATATTTTGTATTTTTTGGTGAACACATGTAACAACCTCCCACCCTGGCT
 CAGACTTTTCTCCTATTTTTCCCAAAACTGACCTTTAAAGGCAAGTTACATACAGTGTTGTTTCATCT
 CAGCTGTTTCAGCTCTTGTCTATAAGCTCTCTAATAACGCCTATTGTCATGTGTTTATATCTTTAAATTGT
 TATATATTTAGTTCCAAAGGCCATTTAACGAGAAAAGTGGCCCACCCACTTGTTAACGATATTTTATGG
 GGAAGCGAAAACCTCTTCTCTGTCTCTACAAAAATAATAACAATCACCTAGACAAAGAGTAGAATAAC
 TACAAGACCCACAGACCCATCGAAAGAAAAGTGAATAATTTTACCTTCGACATCCAGATCGGCTTGGC
 GAATACCTGAATAATAGTAGTTTTGTTTCATTGTCTCTTTCTCCCTCTCTCTTATGCGACTTTTTCAA
 CAGTATACTAATGCTTCTTTAGACTGTAATAAACCTTATTATGCATAAATAACAATACAAAATGAATACG
 TATCTAAAAAATTACATTAACATGGAATGTGTGAGTGGGGGGAAAACTTTTTATGATGCAAACCGAATT
 GAGTCTTGGAGCGCTATGACATACGGTTCACCTACTTTGAGAACATCAAGCCTCTTGTGGAAG
 GTTATTCGATAAGAAATTACTTCGATATAGTTATAATAACGTTCAAATAATTTAAAAATCCTCTGCAAGAAG
 TATTATTGAATAGATGTAATGATATACAGAGAGTGAAGTTTACGACGGGAAAACAAACGCGCGCGCGT
 TACACCGATCGCGAACGCTACGTGTCCAGCTGGCATGAAAGGGAATCATTGATGAACGTCTATTTCT
 TCATTATAATGTTTATTTGATAAGAAATTACTTCTATATTGTTACAATAATGTTCAAATACTGTTGAGTA
 CATCTGAAACCCCTCTGCTAGAAGTATTAGTGAAAAGAAGTAATAATATATATGAGAGTG

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig00123; microsatellite Aa123 sequence

CAGGCACTTGCCTCTCTGTTTCAGAACAGTGCCGTGTACATCTCTGAAGTGTAGGACGTCTGTCTCGT
 GAGCGACGCAGGGTATACTACGAACTTGCTCTAACAACATTTCCATTGATGTCCAGTAAGTGTGTTGTG
 CAAAGTGATTTTGTGTGAGATTGGCGATAGATATGTAAATTGCATTTGTTTAAAGCGTAAATGTTTGT
 GTTTATGTAAGTATATACATGCGTTGGGAACGATAAGGAGAAATGGATATAGAGATATAAATATGTTTAT
 GTTGATGATTTTTAGGATTTCAAGGGATTTGCGGCTTTATATATTAATATCAATATGTCGGAACCTACCTAA
 GTCTTTTCGAAAGACAACGTAATGTCTCTACCTATTTGGGAGGGCTAGATGTCCATGCTTTGCCCTGAG
 GAAAAACACTGCAGTCTTGAAATGCGCTTTTAGTGAAAGTGTCTAAGAATCGAATATTTGAAAC
 TATATATTATATACCATTGCGTAGGCatatatatatatatatGAGTATCTATGTATATCTAGGAATATGTGTAGGT
 TTTATATATATTAATTTGTTTTATCTGTCTATCTTGATGTATGTTGGTTAGTTAGTTAGGTTAGTCAGAATCAT
 GGAGCAAACCACACAGGCCATGTGGGGCCCGTGAACCTTTTTGATCTATGTATCTATATATCTAG
 GTATCTAGTTATCTGCAGGTGGTAACAGCTTTGGCCAGAATAGGTAATAAAGGCTTGTGGAGTTGAT
 GAGATTCAAACGGGATTTCCAAAGGCAATAAATGATTGTGAACGGAAGAAATGGTTTAACTAAAATGCT
 TAACTCGGTGAAGACAATTCACCTGATGATTCCAAAAAATATCAATATTTATGCTACTAGCCTAAAAAGTTTG
 GACAATCACTTTGAGAAGTCATGAGTGTTTCGATTTTGTAACTGCAGTTATAGATATAATGTAAAGTATAG
 TAGAAAGCGAGTTGTCGAATGTTTCAGACCGGTTTTTAAAAAGGTAGAGGAAGGTAGGAGGGAGATTAT
 TATTGTTGTGCTCAAGAATTCTAATTAGAAGTGCAAG

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig00125; microsatellite Aa125 sequence

CATGTATGACGTCATAAACTTCCGGACTTCAATCACACTACCTGTTACTTAAAGGTGACTCATTATTCC
 TAAAAATAGCGAAAATCTTTGCAACGAGAAGGATCAACATGCCCCCTCCACGACTCGCTCGCACACA
 TAAAGTACCATAAAGAACATCAATGTtatatatatatataATGGTTTAAATAATTATGATAAAGACCCACGAGCG
 CATACCGCCCATTTAGATGGGCGCAAATTTGTCAACTTTCATTGTCCTCATTAAAGCACAATTTGCCATC
 TAAATTAGTTTTCTATAAATCATATTACAGAGAAAGCGTTCAAGTTTGACCTTGCACACCCAGATTTTAA

TACCGAGTGAAATACCGGCTGGTGGAGAGGTGGAAAAAGCCACTCTGAGGAATTTCTCCAAAATG
 GCTCGCAATGATTACGTTTTATATAATTGTAGATATACACATGCATTCATTTTCATGTAATAGAGGGTTG
 TATAAGACACAAGGCCTTACACTCATATATAAATGTGTTAGCTAAACTTTTCATTCTTATATTATAGTAGC
 TGTTTTGAATTTGAAAATTGATGCCATTCAAATGGGCATCATGGAGCCTGTGGGGAAAGGTGACCAC
 CAGAGATGAGTTTTAGACAAGGCAGAATTAGCATTAGTGATACTTTGTGGTACATACTCATGTTT
 TATGATACCTTGAGTCGAGTTCTGCAAATTTAAGGGTTAACACTAATCATGAAGTATATTGGTTAGAT
 TTTTAAATTTAATTTTGTCTTTCTTGGTAGGTTTCTGAAGAATGTTGAGGAAGCAGTTGACTATTTGTTTT
 CATTACCTGAAAAGGAAGGTGCCACAGTTAGCGACATATCACTATAGCCTCCTGATGATGGGGCT
 GAGTCGGATGCTGATGACCCAAGTGAGGCTATTGTTGATGTTGGGGAAGAAAATGTGAATCTACCGG
 GAGCCAGACTTTTAGAAAACCCATGATGTAGGTCTATTTTTCCGTTTCTTTTGGTGGCTGAGTT
 CATCCTTCAGTTTGCTTAGGTGTAGTATGCTGTGGCTCTTCAGGAATAATTACAGGCATAG

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig; microsatellite Aa127 sequence

ACACACACGTCCATCATCAGGAGTTATCTGAATCAGGAAAAAGAAGTATAAACAGGACCGAG
 TAATGAGTTTTCGATACTAAAACAGTTACATTTTAAAACGACTAAAAAGGTCCGGATCAAGTAAAATAT
 TATCGTACAAGAATGTAAAAAGTTAAACAAATCATGCAAAGTTAAATGTAAAGGAGTATACAGATTAAG
 GAGACCGTCGGGTTTGGGGTATCGGGAGCGGTATATGGTCTCGCATAATTGAGCATAAAAAGAAAAC
 TATATGAGATATCGAGATGATTTTTTGCATATGGAAGAGCATGAAATTGCGCTTATTTTACT
 TATGTTTTATTGAACAGAACTATACGGGGGCTTAGCCAGCTCCCCGAAAGTCAAATGTTGAGAT
 TTTGTGAAAATGAAAAGAAAGGTTTGCCTGTATGACCCCCGTCATAACCGCTCATCAAAAATACATGG
 GACAAATATCATGAATAGTTGAATCGTATACCTCGAATGTGTCGTAGGAGAATTTTTGAATTTGCTTTAC
 TTTTTGTGAAAATCAGTTTTAAAAAAGGGCATTTTTTGGGTAAAAAGTGAGATTTGAAAAGGAATAAC
 TCTTATTTTTTGAATATAAAAATATCTCTACGACACATTTGAGCCATTTTATAGTACTTTCCAACAAAA
 CAATCAGATTTCAAATCGGACAAGCCGTTTTGACGGTGGATCAGACAGAAGACGAAAAAAAACGAAAC
 CGAGAAAATGAAGTTTGTATTTGTGTCAATTTTCATTGCTAATTTTTTTTCAATTTATATTGTATACTATATAAT
 TGAAATGTATATATAAAAAACGGGCAAATTATATACTTTTGAATGCAATTTATTACAATACTCAATAAGCAA
 TATTTTTCTTATTATGATTTTTTGAAAAACACTTGGTTGGCAATGCGACTTTTTTCTTGATTTTCTTGAA
 TAAATAGCGCCCTATGCAAACAATGCTACTAAACAGCAACAGAAAacacacacacacacacacacacacacac
 CGAGAGTTGCGCACACACACACACACACACACA

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig00138; microsatellite Aa138 sequence

CCTACAAAACCAGCCTAAAACCATTGATTACTGCTCAAAGAGAGTTATACGCACGATAGCTGGAT
 TGAAAAAGTACGACCACACGCATCAAAGCTTTAATAATCTAAAACACTCAATCTTAATTATATCAA
 CATCCATTGCTGTGATTATTTGTCTACAAATCAATAATCTATATGAAAATAGTTTCTTTAGCTTTAGA
 TATAATCAAAGGTATCAGCTGAGATACAGTAACCTGTTAAAACGCAATTTATAGGGTCCACTCAG
 GACGCAATCATGTATACTATACCATGGAGCAAAAATCTGGAACAATCTTCTAACAGCGTTAGGAA
 TAAATCAACAATAGGTTCTTTCAAACATGCACTTAAAGAACATCTATGCTCCTCATTGAACTAATCAAC
 CAAAAGCAATCGAAAATTGCATTCGCCATCTACTCTACTTCTCTATGTTTCATGTTACCTCATAT
 TGTTGCATTATAAATATTACTAATTTGTGTTCCGACTCTATCTAATGTTACCATATACTGGGTCAACTGC
 CACATGTTTCTGTACATTGATTTTATTTTTCTATTACCACATATAATGTTAATTTACTATTTAACTGTCT
 TATCTTACCGCCATTTGTTCTCGATCACTACATGTTAGTTCTGCCTCGACCTAAGCCTTATTTCTTCT
 TCTGTTTAAATGTTGCATTATCTGTTACATATTTTATTTTTGTTTATTTAACCATAAATACATGTTCAATC
 TGTAACATAAGAATTAAGGTGCCTTCTCAAGAGAGCACCAGCTCTCAGAAGGCTCAGCCATATCA
 TAATATGTACTGACTGTACTTGTATATAACAGCTTTGTAATACCTTGGCTAAATAAATTTTATCAATAT

CAATATCAATATCAATATCAATACCACACCACACCACACCACCCagagagagagatagagagatagaaagagag
cgagagagagagagagaTCGAGGTTGCCACACTCAGAAACAAACGCTATAACGTCCTGGTTCAACAG
CGAGAGAATGCGGCCATGTCAGTGATATGGCGGCACCGACGTG

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig00173; microsatellite Aa173 sequence

GGGGACCTCGATGGAATTATATATGTGAGGGGCCCTAAGAGAATTTTCCATGGTCCTCTGGCCTCCGA
TAAAGGGTCCCCAATGGAATTATATATATATGAGGGGCCCTAAGCGAATTTGCGAAGTGGCCCAAC
CGTAAGGGGGGGCCCCAAAGCTCTAGCAACGTCCCTGAGTAGAGTGGAACAAATTTCTTCAAACT
TACACAACACACCTAAAAGAAGAGGATATAAAAACTGTTCAAACCAAGATACAATGGTAATATTAGAG
GAATTTATTTTTCAGCCAAAAAATAATTA AAAACAAGAATAAGATAAGATAAAAAACAAGTTAAATCATTGC
CTGCGTTTAAAACTCTTTAGACAGGTACTGAAAAAGCATttgtttgtttgtttgTTGGGGCTTTAGACCTAT
CAACTGCCATGGTCATTAAGGTCAAAACACGGTCAACTCACGCACAACCGACAGACCGATCTCCTC
TCACGGGAGATCAAAGTCCGTCTCAAACATAATTATGGTCTCACACCATAACTAGCCCATGAAAAAA
TAGCTGAGTGTTCCACCGTCCGTATAAGGTCCGCCAGAACGTACCGCAGGCGACCACGCAT
CAGAAGGATCACTTACCCGAGTCAGCCAAGCATCGCTTTTGGTTACTCCCAGTTACCACTCCGGAG
CTAAAATCCATCATCCATGGTTCCGAATTCATCATCTCCAGGCCACGACGACGTGTCATAGAGGGTCAT
CAAGGACTGCGCACCGGAAATAGCCTCATTCTTGAGTTTATCATTAAACAGATGATTTAAACCGGAAC
TTTCCCCGCCACCTTCAAGTCGCTCACGCGGCGCCGCCCCATAATAAGGGCGACGAGTCCCGGCC
TGACAACCTACCGGCCATCATCAATCCTCCACAGTTTAAAGCAGGATATTTGAGAAGAGCGGTGGTGGG
TAATAGGTTGA

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig00243; microsatellite Aa243 sequence

ACCAACACTATTACCTACTATAACCGCCACCTACCACCTTCAACAGCACACACCAACTACATCTCA
TAATATCATATCTACACAACATCACACAAATCATCTCACACCCTTCCAAGTCAAAGCACATCATGAAG
CTCGCCACTGAGAGAGCAATCTCACACATCAGAACATACGAACACGACTGGAAGATACAGACAAA
CAGACATAAATTAACATAATAAACGTGGCCCCACAGCCTCCCACCTGCCCACTCTACACATGGC
TACGACGACCCCTGGCCCCCGACCTGGACCACTCTAAatacatatacatatacTCTTTAGTTTGTGTTG
GGACTTTACACCTACCAACTGCCAAGGTCAAGGTCAACACTCACAACCTAAGAACAACCAAAACAAC
CGATCTCCTCTCACGGGAGACCAAAAGTCTATCTAAAAGTATTTATGCTCTCACACCATAAATATGCC
CATGTATATAGTGATATGTACGCTATTTATTTATAGCTACACTGTACCTCCCACACCATTCAACCCATCTCTAC
CAAACCTCCTCATCCCTTCCGCCACCCCTTAGCCGCACCTGACATCCAAAATCAAATCAAACAAA
CAACCAACGGCTTCCCGCCACCCCAACCCACCGAATTATCTACGGTGACCCCTTATCAAAGCCGTAAAT
CATGCCTCCACCCCTCTTCTCTTATCTCCTCTCACCTCTCACCTCCCACCCCGTACCAGCGACC
TAAGGCCAACCCTGAACATGTATATATCTATATTTTTTTTCTTACATCTCTCCCTATGCATTTGTCTATATGTG
TATATAAA

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig00268; microsatellite Aa268 sequence

TATTTCTTTTGTGACAAGGTTGATAAGCTTGCCAAATCAGCTCTCCTACTAGAAGACCCT
CATTATGTTGTACCGCTGTCTCTTATGCAGATGAAGCAACGCATTGTGAATTCCTGTAGAGAT
TATGAAGAACAGGCTTGGATTATAGAGAAATAAAAGGCTCTGGCACCATCAGGCACTATGAGG
GTGTTGTTGGGACATCAGATAGATAAACGCTTTAGGGTTTATAACGGTCTGTCCCGGAGGCAA
CAGGTCACATTAAGGCTTCGCATTGGATATCAGTACACTACTTCTATGTACAGGATGCAGTAT
TGGATGCCAAACCAATTCATATCATTGTTGTAGACTCTGCAGATCACCTAGGTCTCATGATCTCAAT

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig00681; microsatellite Aa681 sequence

CGTTAACATCAAGTTTCTCGTCAAATTGAAGAAATCCGCGACGGAACTTTTCAGTTATTGACTGAGG
 CTTACCTATAAAAATTGCGAACTTCCGACACGAACAGAGTCATATTACTTTTTACTATATGcacacacataca
 catacacacacacacacacacacgcacataCTCTGATGGCAGAGTGGGTTACATCGGCCAGATCGTAGATCAG
 CAGTATTATAGTGAAGTCTTGTCTGTAGAGTTTTTAGCCAACCAAAGGACACTGTGCTTGAGCACA
 CACCTTATCGCCAGACCTTCCCTGCGTCTTTACCTCTTCCCAAAGATCAAATCCATGCTCAAAGGAAA
 CAGTTTTTTATCGGTAGAAGTTGTGAAAGCAAACACGACGCAGCTTCTCATCAGCCTTACAGAACATGA
 TAACAAAGTTACAGTCTGTCTCGTTTTTTCTTTTGCTGTTGTATATAGGTGTGTGTGTGTGATCTTAGC
 TAAAC

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig00691; microsatellite Aa691 sequence

GTAAAGGGCAAAAAAGAAATCATATATATCATATTATGATACGATTTCAATTATCTGTGTTACCATGGT
 TACCCTGTCAAAAACAACCGCTATTACACAACGATTTCCAACACGTCGCAGCCTGCTTCCCTTAT
 CAGGCACTAAGTCCAACATGTTTCGATCATGAATCTCTCTACCCCTATGCTATATTTTTGGATCTAAGG
 GTGTGATTATCGACAACATTTTTTTCCAAATTTGAAATTTAAACCTCCAAACTGATCATAAGTGATGT
 TATTTTGTCAATTAGTGAGCATACAATTTGTAATTAGAATAATATAGACATTCCTTCCCTTGAATCG
 GACGCAATGATGACGGGTAGGTTGCCAGAGCACGATAATCACACCCAGATCCGAAAAAATAATGTA
 TAGctctctctctctctctctCATCTCTCACGAAGATATCCGCATACTATCTCCATCCGTGCAAGAGAATGCC
 GATGTCGAAA

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig00751; microsatellite Aa751 sequence

GATCCGCGACGGAATGGAGACGTGAGATAGTGTGAATCGACCGAATCTTTTAGACTCCaattaaattaaat
 taaattaaattaATTGATTCTATACAATGTTGCTTACTCAAAGTACATTTGAAAAAGGTCATTTGTATTTACTAA
 CAGAAAAAGGTCATTTGTATTTACTAACATTTCTGTGTTATCCTAATCAGAAATTAGATCTATATCATGAAAA
 TAAGAAAATCAAATAGTAATTGGTCATCACTTTTGTGCGGTAGGTAACTTTATCAAGCGCCAGTTGA
 CACTTCCCTTACTTGAGAGAATGTGGTTATAATGTTATAAACTTTTAATGCATAGCTAACGACTACTAAGA
 TATGGTAGGTTAACAATTATGATCCCTTCTTCCACTAGGTTAAGTGGACCGTCCCGCAAAATATGCAG
 GAAAATCACTATAAACGCAATAAAACAGATCCGGTCTTACA

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig00785; microsatellite Aa785 sequence

AGTTGCCTTATATTTTTCCCTGGCTTGCACAGTCATTTTAGTAAGATTAACCTTGGTTTTAATTAAGAT
 TGTAGAGGCTCCTCATACTTATTTGGAATATAGCTATATGGCAAGAGGAACATAATAATATAAAT
 TACGTGAGAAATAACCAAGAAATAATGAGGATCTCGTCTCCTGAAACATTACCGTGTGTTATTTTCAG
 CTGTTTCAGCTGTTGTTTATAAACTTTGTAATAACATCTATTTTCATGTGTTTATCTCTTTAACCTTTTC
 CATGAGTCTTTTTTTTCGATGGTGTCTGGGAGGCGCAAGAAATAAAAAaagaaaaagaagaagaaaaTCATAG
 CATGCATTGCACAATGAAAGAAAACCAAGTTAACTCTCAGAGCTCGCCGAATAAGGAAGTCCAGGCCG
 CGAAACAATATTTACATAGACTGGCTGCCTGGTGCCTATGTGTC

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig00818; microsatellite Aa818 sequence

GCAACCTCCGTACCCGACCTCACTCGCAGGTAAGTCTCGTTACCACGTAACAACCATCCTACAACCTCC
 TCTAATGCCACCTTTCGATCACTGAACAGGAATGATGAATGCACGCGTCCAGTCCGAATAACACACaat

tcaattcaattcaattcaattCTTTATTTATTAAGTGTCACGATACATCTTTATGAAAAATAAAATACAATATTTAAAA
 CATCGAGTAAAGTTATGTACCCAGTCCATTAGGACTTACCCAGACACTATACATAGTGCAACATTTACATAT
 CACCACATATACAGTATTATAATATAATTAAGCACCAAATAAAACAATTGCAATATAATATTTAAACAGAA
 CAAAACGCATTTTACGTATGTTACAGTGAATATAGAACATAGTACGACATATATTGATAATAGGAAGAGG
 TATGATATATT

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig00867; microsatellite Aa867 sequence

TATTTTAAACACAAGAGAGTAGGCATTCTGCTTTTACATGAAAATAAGAGCCAATGGTGTG
 GTTTGTGAAAATAAACTTTAAATAATCTGGGGTAGGCCTAATGTTCTTGTAAATAAGTTAGTTCATCA
 CACTGTGCTCACTGTCAGGGGATAAAATAAACTGAGTTTATCTATTTTTTAAACAACCATTAATTCCTAT
 TTAAGGCTTTGATTGATGTTGGTTGTGTGATGCTTTATGTTCTTGCCATTGACCTGTCACCTTTGG
 CAGCTGATAGGCCTCAaacaacaataacaacaacaacAGTTAGTTCATCACACTCAGGGGCTAGATAAAC
 TGCGAGTTTATCTATTTTTAGACTAATATTGAATTACTTTTTAAGGATTCAGTAAATGTCGGTTGTG
 TACGTTTGTG

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig00956; microsatellite Aa956 sequence

ACGCGTTTTCGTGCTCGTATGTGACAATATGTTTCATGACTGTGTTATTGTTATCTAGCTATTCCTCC
 CACACTATCTAAAACACATATATTCATTCTCTCTCATCTATCATTATCTCTCTCCTTAGTCACGTACG
 GAGAACACTTGACATAACGCAGGTGTTACagatagataaatagatagatagatCTTTATTGACCACAAATTA
 CAATGTTAAAATACACGTAAAGATATTAGATATATCATACTTCAATTTAAATGATGAGCTAGCTAGACAT
 TTATGGTCCAAATATCACAATGCATGAATTATACAGAGTTACCGAAATTATCACAACGAAATCAACACAA
 CATGCGTTAAACCTTAAA

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig01061; microsatellite Aa1061 sequence

CCCCTGACGCCAACCCCTCCCATTTACCCGGGCTCGGGACCGGCACTAGGTTGGACTAGATTGTCC
 TCCCCAGTGGCTGGGTGAAagagagagagagagAAATTTGTGTCTGTGTCATCCATATTACCGGAGTCGCA
 CATTTTGTGGGTGCGCCCTGGAAGGTAATCCAGACACACATCTCATGTACACATAATTTATTGACTAAC
 TTCAATAATTTGAAAGCTCATGGTCCGATGACCATTAACACTTCTGTTTCTGTTTCTATTCTGCCTT
 TATTTCCGCTCGGAATCATTGCTAAAACCTATTTTCGTCAGCTAAGGGCGCTCTCAT

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig01129; microsatellite Aa1129 sequence

GGGGTATGTTGTATGTCCCAAGTATCAACTCGACTTATGCTACTGTAGAGTCGTGGCCTCAGGTGCAC
 CAAGGCTGCCCCTGAACACACTTGTGAGGTGTGAGAGCAGGTTGTCAACCTTGTCTTCCGGTCC
 TGTGGCTGTGGTGGTTGTTGGAGTGTTCGTATCTCTTGGCTGCTCcatcatcaatctcatcatccaatcatcatCA
 CAATCGGTGATTTAGTTTGTGTTGTTGGATTTATGGCTATCAACCGTTGGCACAAGCCATGGTCAT
 TAAGCCAAATCCTATTTATTCTGACTATCACAT

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig01169; microsatellite Aa1169 sequence

AATGTCACGTTCCCAACACTAACGCTTATATAAACTTCTCCCTTATTACGCTTTTCTATGATTGGACCCC
 CAGCAGCTCTAACACCAACACATCCTACAGCTCCAGCTCCACCAGCGACTTCTTcagcagcagcagcag
 CGACGACACCCGAGTTGACCACCCCAGGCTGTACATTGTACTTGTACTTTGTACACTGGGGCAAC

TGCGGGTGTACTGTACTTAATACAGCTGCAGGAGGCAGAGCTGATCCAAAGGCCTAAAATAGGCCAG
GACGGAGCACCTTCAGGTGCATACGC

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig01195; microsatellite Aa1195 sequence

CACCGGACATGTCGCGGGGCACAGCCTTCAGGGACACCGGGTGGAGGGGCAGGGCTGGGGAGGG
GGAGGAGCAGAGACAGTAGAAGCCAGAACCAGGATGGTTAGATACGGATGagcagcagcagcagcagaag
catcgaagcagcagcagcagcagtagtagtagtagtagcagcagcagcaacagcaggcagcaccagcaccagcagcagcGTGGG
TATTGATCTAAGGTTTGGTCCTTAAAGCCGAGGTAACAGCGTGAATAGCTTGGTGGTGGTGCGGGGG
GGGAGGAGAG

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig01222; microsatellite Aa1222 sequence

TTAATTATTTTATATTACGTTATTTCGCTTATCTTCCTGCACTAGTTTTTGTACGTCATACTGATGCTAC
TCCGCTTGTATTTCGCTATTTCACTTTGCGACTTTTGTTCGTTTCGTCCTTTCTTTCCACCATTTTC
TTTCTATTTACCCTCTCttcattcatcattcattcttcaCTTTCGACCAAGACTGTGTAACCTCACTTTACAT
CAATATAGCAACTGCCTATAACACTAGCAACATAGGAAGAGCAGACAAATAGTTAATGTCATATATA
TAATGAATG

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig01255; microsatellite Aa1255 sequence

TAATTAGGCAGCTGGTGTCTCAGTCTGCTAAGTGTACGTTTTGGGTTTCTGATACatatatatatata
tatatatacagtatatatatGCTCTGGGGGGTGCGGGGAGGGAGTCATGGATGACGGGTGGGGTGGCGG
GTGTATCATGATAAATTCCACCACGGCCGAACCAAGATGAGTTAAGAATTTAAATCTATTTCTGAATC
CAGTTTGATGTGCTCTTTCATTTTGCAAGATATAAATTGGATTGGATCATTTTGAAAATTCTG

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig01408; microsatellite Aa1408 sequence

CCAGCCATACTCTGTACCATCGACCTCCGCTCGCCGCTAAAGTGTCCATTTATTTATTTATTTTAC
TTTGTGTACGGCCCCAGGGAGAGTCGAAAGGGGATGTGACCTTTGTTTTGGTCTCGATGCAGGAGAG
GGTCGCGAATGACTTCCCGCTCAAAACCTGTGCGtctctctctctctcACACACACACACACACACACA
CACACACACACACACACAC

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig01444; microsatellite Aa1444 sequence

AATTTGGAGAGTGGTTTGTCACTTACCTAACTCCACAACTCTTACTTTTTAGCCTAAATGAGTGAGC
TTTGGCTAATGTAGCACAAcattatatatatatatGAATGATTATATATATCTTTCCCTCTCTTTTCTCACTCT
CAACAGTTGTTGCTGTTGTTGTTGGTGTGGCTGTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGTCTGTAGTGGTAGTG
GTGG

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig01450; microsatellite Aa1450 sequence

AGCAGTCGGGAAGACGCTTCTTTTAACTTTTAGGAACTTCGTAGTGCCTTCCATCATCAGTGAGTGAT
TAGTTGATTAAGTTGGCCATTGGAACCAAGATAATTGAATTCagagagagagagATTTAGTGAAAACC
TTATTGACAGTGCAGTTATTACATTAATATGTAAGGGCAGGGTGTCTACATCTGATCCAATAAAGGGTTC
TTGGTAGG

>*Aristeus antennatus* voucher LIGUDG Aa872; contig01690; microsatellite Aa1690 sequence

GTACAGAACTATCTACAGTTCGTAAATATAGGACGACACTGTGTGTGGATGAAGGTGAAGACAGTGTGCC
TATGAGTGATGGTttgattgattaattgattgaATTTTATAGCCAGAAGTGTACATAAATACTAAAGAATACAGATGTTT
CAACTTGGCAGATTAG

MATERIAL SUPLEMENTARI CAPÍTOL 3

Table S2. Mean relatedness \pm variance per 7 relatedness estimators for simulated population consisting of 1,000 pairs of unrelated, second cousin and first cousin pairs with allele frequencies taken from field data. r_{xy} : expected relatedness value.

Relationship	r_{xy}	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRD	Ritland	QuellerGt	DyadML
Unrelated	0	0.0528 \pm 0.0073	-0.0070 \pm 0.0362	-0.0052 \pm 0.0414	-0.0006 \pm 0.0118	-0.0006 \pm 0.0204	-0.0006 \pm 0.0349	0.0712 \pm 0.0111
Second Cousins	0.0312	0.0527 \pm 0.0073	-0.0084 \pm 0.0364	-0.0057 \pm 0.0415	-0.0006 \pm 0.0119	-0.0006 \pm 0.0209	-0.0006 \pm 0.0343	0.0711 \pm 0.0111
First cousins	0.1250	0.0522 \pm 0.0072	-0.0100 \pm 0.0354	-0.0077 \pm 0.0403	-0.0006 \pm 0.0118	-0.0006 \pm 0.0207	-0.0006 \pm 0.0341	0.0704 \pm 0.0109



