

Títol del treball:

Genotipatge d'una població de melva (*Auxis rochei*): estudi de l'estabilitat temporal

Estudiant: Elisenda Delmenico Castellà

Grau en Biotecnologia

Correu electrònic: elisendadelmenico@gmail.com

Tutor: Jordi Viñas de Puig

Cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor)*:

Nom del tutor: Jordi Viñas de Puig

Nom del cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s): jordi.vinas@udg.edu

* Si hi ha cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 19/07/2018

Índex

Resum	2
Resumen	3
Abstract	4
Introducció	5
Objective	11
Materials i mètodes	12
Mostratge	12
Extracció del DNA i amplificació	12
Lectura dels microsatèl·lits i anàlisi de dades	14
Resultats	16
Diversitat genètica i estructura de la població	17
Diferenciació genètica	18
Discussió	19
Conclusions	22
Bibliografia	23

Resum

La melva (*Auxis rochei*) és una espècie de peix que habita mars i oceans d'arreu del món, que té un alt valor comercial i que, al ser explotada per l'home degut a les propietats de la seva carn, es troba en risc de sobrepesca, fet que pot afectar a la mida de les seves poblacions i pot portar-les cap a una reducció de la seva capacitat d'adaptació. Per evitar-ho, és necessari fer una sèrie d'estudis de genètica de poblacions de forma regular per a obtenir la informació necessària sobre la població explotada per la pesqueria, i així poder desenvolupar un pla de gestió sostenible per a tal recurs biològic. En aquest estudi es va analitzar genèticament una col·lecció de mostres d'*A. rochei* a través dels microsatèl·lits com a marcadors nuclears, una eina molt emprada en l'àmbit de la genètica de poblacions degut als avantatges que comporta. La col·lecció de mostres analitzada corresponia a individus de la localitat de La Azohía (Cartagena), pescats l'any 2014. Els resultats obtinguts es van comparar amb els corresponents a una col·lecció de mostres d'individus de la mateixa localitat, pescats l'any 2015, que ja havien sigut analitzats al Laboratori d'Ictiologia Genètica de la Universitat de Girona. Amb aquesta anàlisi es volia saber si *A. rochei* presentava estabilitat temporal i per tant, si la població havia patit pertorbacions o no, i aleshores donar les explicacions pertinents. Tant l'anàlisi a partir del test d'estabilitat de les freqüències al·lèliques de Fisher ($P < 0.001$) com l'índex de fixació ($F_{ST} = 0.024$) van mostrar diferenciació gènica. En canvi s'observà similitud en relació a la quantitat de diversitat genètica (H_s , 2014 = 0.876; H_s , 2015 = 0.897). Aquests resultats suggereixen que no hi va haver pèrdua de variabilitat genètica i per tant, com a mínim per aquest dos anys, la pesca no havia influenciat sobre aquest paràmetre. En canvi, sí que es va trobar diferenciació gènica entre les dues col·leccions de mostres, fet que potser indica que els individus de cada col·lecció tenen orígens diferents. Les conclusions extretes són que el més probable és que la causa de diferenciació gènica no sigui la pesca, ja que no es va observar canvi en la variabilitat genètica, sinó que sigui a causa que les diferents col·leccions de mostres provenen de cohorts o poblacions diferents, fet que pot ser degut a que La Azohía (Cartagena) sigui un pas migratori per *A. rochei*.

Paraules clau: *Auxis rochei*, diferenciació gènica, estabilitat temporal, melva, microsatèl·lits, variabilitat genètica.

Resumen

La melva (*Auxis rochei*) es una especie de pez que habita mares y océanos de todo el mundo, que tiene un alto valor comercial y que, al ser explotada por el hombre debido a las propiedades de su carne, se encuentra en riesgo de sobrepesca, hecho que puede afectar al tamaño de sus poblaciones y puede llevarlas a la reducción de su capacidad de adaptación. Para evitarlo, es necesario hacer una serie de estudios de genética de poblaciones regularmente para obtener la información necesaria sobre la población explotada por la pesquería con tal de desarrollar un plan de gestión sostenible para este recurso biológico. En este estudio se analizó genéticamente una colección de muestras de *A. rochei* a través de los microsatélites como marcadores nucleares, una herramienta muy utilizada en el ámbito de la genética de poblaciones por las ventajas que ofrece. La colección de muestras analizada correspondía a individuos de la localidad de La Azohía (Cartagena), pescados el año 2014. Los resultados extraídos se compararon con los correspondientes a una colección de muestras de individuos de la misma localidad, pescados el año 2015, que ya habían sido analizados en el Laboratori d'Ictiologia Genètica de la Universitat de Girona. Con este análisis se quería saber si *A. rochei* presentaba estabilidad temporal y, por lo tanto, si la población había sufrido perturbaciones o no, y entonces dar las explicaciones pertinentes. Tanto el análisis a partir del test de estabilidad de las frecuencias alélicas de Fisher ($P < 0.001$) como el índice de fijación ($F_{ST} = 0.024$) mostraron diferenciación genética ($H_s, 2014 = 0.876$; $H_s, 2015 = 0.897$). Estos resultados sugieren que no hubo pérdida de variabilidad genética y, por lo tanto, como mínimo por estos dos años, la pesca no influenció sobre este parámetro. En cambio, sí que se encontró diferenciación genética entre las dos colecciones de muestras, un hecho que puede que indique que los individuos de cada colección tengan un origen diferente. Las conclusiones extraídas son que lo más probable es que la causa de la diferenciación genética no sea la pesca, ya que no se observó ningún cambio en la variabilidad genética, sino que sea debido a que las diferentes colecciones de muestras provienen de cohortes o poblaciones diferentes, un hecho que puede ser debido a que La Azohía (Cartagena) sea un paso migratorio para *A. rochei*.

Palabras clave: *Auxis rochei*, diferenciación génica, estabilidad temporal, melva, microsatélites, variabilidad genética.

Abstract

The bullet tuna (*Auxis rochei*) is a fish species that can be found in seas and oceans all around the globe. It has a high commercial value, and it is exploited by the human for its meat properties. Therefore, it has a high overfishing risk, a factor that can influence the *A. rochei* population size, that can make the population reduce its capacity of adaptation. To avoid this, it is necessary to do a regular series of genetics of populations studies to obtain the key information of the exploited population by the fishery and therefore, be able to develop a sustainable management plan for such a biological resource. In this study, a collection of samples analyzed corresponded to individuals of the locality of La Azohía (Cartagena), fished in 2014. The given results were compared with the results corresponding to a collection of samples of individuals from the same locality, fished in 2015. The latter collection of samples was previously analyzed by the Laboratori d'Ictiologia Genètica from the Universitat de Girona. This analysis pursuit to know of *A. rochei* presented temporal stability and therefore, if its population had suffered perturbations or not, and consequently, give the pertinent explanations. Both the analysis made, using the Fisher's test for comparisons of allele frequencies ($P < 0.001$) and the fixation index ($F_{ST} = 0.024$) showed genetic differentiation, but the similarity in relation of the quantity of genetic diversity was observed ($H_s, 2014 = 0.876$; $H_s, 2015 = 0.897$). These results suggest that there was no genetic variability loss, ergo at least for this two years, the fishery did not influence in this parameter. However, it was found genic differentiation between the two sample collections, fact that might tell that the individuals of each collection have a different origin. The final conclusions are that most probably, the cause of the genic differentiation is not the fishing, as there was no change in the genetic variability, but it is that the different sample collections come from different cohorts or different population actually, mostly because La Azohía (Cartagena) is a migratory pass for *A. rochei*.

Key words: *Auxis rochei*, bullet tuna, genetic variability, genic differentiation, microsatellites, temporal stability.

Introducció

La melva (*Auxis rochei*) és una de les dues espècies del gènere *Auxis*, un gènere que pertany a la família dels Scombridae (Collette i Nauen, 1983), i es considera un petit túnid (ICCAT, 2012). És una espècie cosmopolita que va aparèixer al sud-est de Brasil (Collette i Aadland, 1996), i actualment es distribueix en aigües càlides dels Oceans Pacífic, Índic, Atlàntic i el Mar Mediterrani (Catanese et al., 2007). És l'espècie més abundant del gènere *Auxis* al Mediterrani (Collette i Aadland, 1996; Macías, Gómez-Vives i de la Serna, 2005). Viu en hàbitats epipelàgics – hàbitat format per aigües de 0 a 150 m de profunditat (Parsons, Takahashi i Hargrave, 1984) -, nerítics – hàbitat de la superfície de les aigües costals (Lutz, Musick i Wyneken, 1997) - i oceànics (Collette i Aadland, 1996) – hàbitat de la superfície de les aigües en oceà obert (Lutz et al., 1997).

A. rochei fa migracions per alimentació, reproducció i fresa (Sabatés i Recasens, 2001; Macías et al., 2005). S'alimenta de peixos més petits de la família dels Clupeidae i Engraulididae com per exemple, la anxova (*Engraulis encrasicolus*) (Grove i Lavenberg, 1997). Una d'aquestes migracions que fan els individus adults d'*A. rochei* es dona a l'estiu, des de l'Oceà Atlàntic cap a l'oest del Mar Mediterrani, incloent la costa de la Península Ibèrica, per pondre els seus ous (Sabatés i Recasens, 2001). Prop de La Azohía (Cartagena) (l'origen de les mostres d'aquest estudi), al sud-oest del Mediterrani, *A. rochei* té una àrea de reproducció i fresa (Macías et al., 2005). Els ous i les larves d'*A. rochei* apareixen al Mediterrani exclusivament a l'estiu, del mes de juliol al setembre, i hi són absents a la primavera, de l'abril al juny, i a la tardor, a l'octubre. El pic de reproducció d'*A. rochei* es dona just al juliol, un fenomen segurament relacionat amb la temperatura. La temperatura de la superfície del mar durant el juny i el setembre (20.3°C i 23.7°C, respectivament), és més baixa que al juliol (25.4°C) (Sabatés i Recasens, 2001). La temporada de fresa d'*A. rochei* varia segons el règim hidrogràfic. En zones com l'Estret de Gibraltar i el Mar Mediterrani, pon durant el maig i el setembre. En canvi, al Golf de Mèxic sol ser entre el març i abril, i a la costa que va des del Cap Hatteras fins a Cuba, i a l'estret de Florida, la fresa es dona al febrer. El nombre d'ous per fresa varia en funció de la mida de l'individu, amb un rang de 31000 a 103000 ous (Collette i Aadland, 1996).

Auxis és el gènere més petit dels túnids. L'espècie *A. rochei* té una mida màxima de 50 cm de longitud furcal (*fork length*, FL), tot i que la mida més habitual és propera als 35 cm (Grove i Lavenberg, 1997; Collette i Aadland, 1996) (Figura 1). És un peix robust i allargat, rodó per la secció transversal. Té dues aletes dorsals, la primera amb 10-12 espines, i la segona amb 12 radis. L'aleta anal té 10-11 radis. Les aletes pectoral són curtes, no arriben més enllà del marge anterior de la zona lliure d'escates de sota el *corselete* (Collette i Aadland, 1996) (Figura 1) – el *corselete* és la zona del cos del peix coberta d'escates (Eachran i Fechhelm, 1998) -. La mandíbula superior és de longitud mitja, i té unes dents petites, còniques, col·locades en una sola fila (Grove i Lavenberg, 1997). Té un *corselete* ample (de 5 o més escates d'amplitud, normalment de 7 a 15) que va des de darrere del cap fins al principi de la segona aleta dorsal (Collette i Aadland, 1996) (Figura 1). És un peix de color blau fosc amb el cap morat i negre i el ventre blanc. Té un patró de 15 o més ratlles ondulades, fosques (Grove i Lavenberg, 1997), prou amples i quasi verticals (Collette i Aadland, 1996), obliquament disposades a l'àrea sense escates, darrere de la primera aleta dorsal i sobre la línia lateral (Figura 1). Les seves aletes pectorals i pelvianes són morades per fora i negres per dintre (Grove i Lavenberg, 1997).

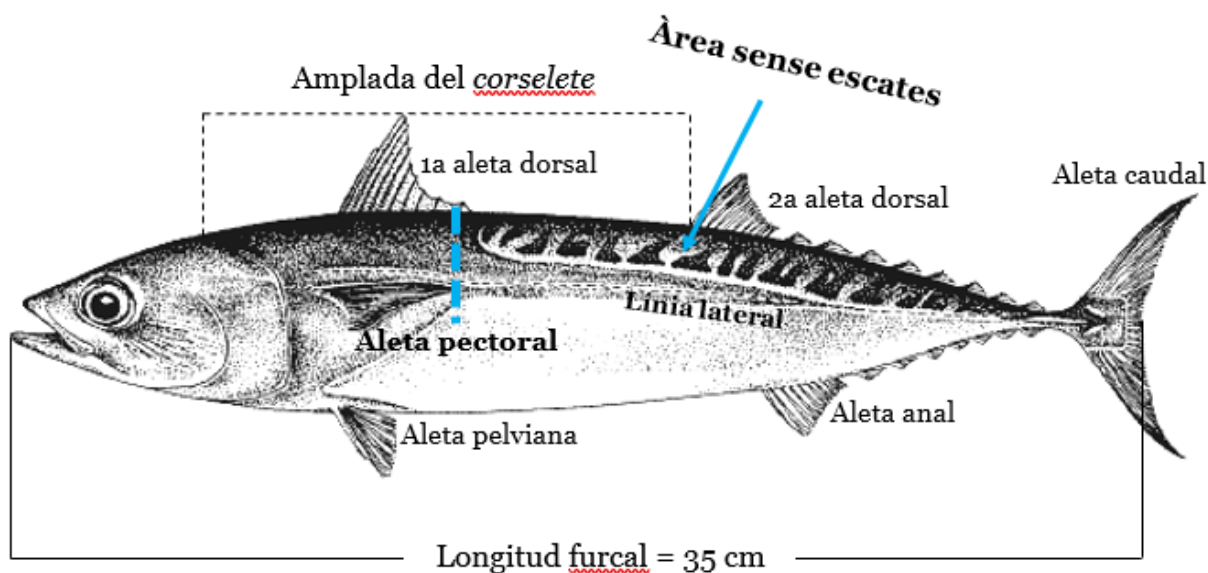


Figura 1 Representació de la morfologia d'*A. rochei*. La línia blava vertical mostra la distància entre les aletes pectorals i el marge anterior de l'àrea sense escates (fletxa blava) (Froese, R. i D. Pauly. Editors, 2018).

Avui en dia hi ha una forta preocupació sobre les espècies de peixos comercials que, en la majoria dels casos, estan en risc de patir el fenomen de la sobreexplotació (Hauser, Adcock, Smith, Ramírez i Carvalho, 2002), i segurament *A. rochei* podria incloure's en aquest grup (Infante, Catanese, Ponce i Manchado, 2004; Catanese et al., 2007). És una espècie que es consumeix arreu del món degut a les propietats de la seva carn, la qual té un gust suau i és baixa en colesterol (Catanese et al., 2007). La seva explotació ha anat augmentant al llarg dels últims anys (Figura 2).

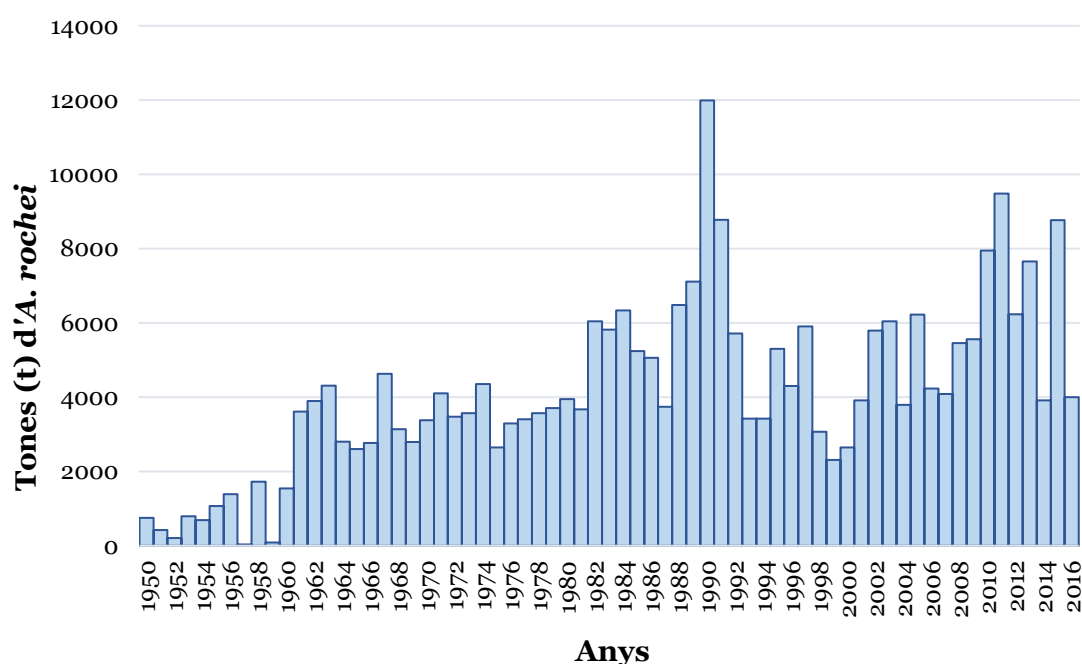


Figura 2 Gràfic que mostra les tones d'*Auxis rochei* que s'han pescat cada any a l'Oceà Atlàntic juntament amb el Mar mediterrani, des de l'any 1950 fins l'any 2016 (ICCAT, 2018).

Les dades d'ICCAT (2018) (International Commission of Conservation of Atlantic Tuna) (Figura 2) mostren com a mitjans del segle passat (anys 1950-1960) la quantitat d'individus capturats a l'Oceà Atlàntic juntament amb el Mar Mediterrani era més baixa que els valors dels anys posteriors. Al 1957 es van pescar 32 tones d'*A. rochei*, la quantitat més baixa enregistrada des de l'any 1950. A partir del 1961, els valors no van baixar de 2000 tones, i el valor més alt enregistrat va ser de 11994 (1990). Les dades dels darrers anys són de 3916 tones (2014), de 8766 tones (2015), i de 4003 tones (2016) d'*A. rochei* (ICCAT, 2016).

La variabilitat genètica és un paràmetre essencial per a determinar la viabilitat de les poblacions de peixos. Una bona manera de mesurar la variabilitat genètica és, per exemple, calcular el nombre d'al·lels diferents per un locus determinat. La variabilitat genètica ens permet determinar l'estructuració poblacional i la mida efectiva d'una població (Primack i Ros, 2002).

La falta de plans de gestió ben desenvolupats per a la pesqueria pot provocar sobreexplotació d'espècies marines, un fenomen que consisteix en la captura de quantitats massa elevades del recurs (Agardy, 2000). Aquest fet pot portar a la reducció de la mida de les poblacions a una mida menor a la seva mida efectiva (col·lapse poblacional), la qual cosa pot portar a la pèrdua de variabilitat genètica degut als efectes nocius de l'endogàmia i al fenomen de la deriva gènica (Hauser i Carvalho, 2008) i, com a conseqüència hi pot haver una reducció del potencial evolutiu, la capacitat d'adaptació (Pinsky i Palumbi, 2014; Frankham, 1995; Abdul-Muneer, 2014) i el temps de vida evolutiu (Frankham, 1995). Aquest fenomen cal evitar-lo ja que pot portar a la pèrdua de poblacions senceres d'una espècie (Abdul-Muneer, 2014). Garantir la sostenibilitat dels recursos biològics i evitar col·lapses poblacionals no és quelcom senzill, ja que les poblacions biològiques són altament canviants de forma natural en quan a espai i temps, i l'impacte addicional que té l'acció de l'home (la pesqueria) sobre cada població de peixos no sempre es pot arribar a conèixer del tot (Ward, 2000; Pinsky i Palumbi, 2014). Per això, és necessari tenir un coneixement precís de la dinàmica i l'estructura de les poblacions amb les que es treballa (Waples, Punt i Cope, 2008) i fer una gestió de la pesqueria específica per a cada població (un exemple seria prohibir la pesqueria durant l'època de reproducció) (Abdul-Muneer, 2014).

Per a gestionar qualsevol recurs biològic de forma viable cal identificar el nivell de variabilitat genètica que hi ha dintre d'una població i entre diferents poblacions de la mateixa espècie (O'connell i Wright, 1997). Els estudis genètics han suposat un pas important cap a una bona gestió de la pesqueria i la conservació de les espècies i les poblacions naturals (Abdul-Muneer, 2014). Aquests formen un tipus de metodologia que ofereix molta informació a la indústria pesquera (Ward, 2000; Waples et al. 2008; Abdul-Muneer, 2014) sobre el comportament, l'ecologia i l'estructura genètica d'una població (Ferguson i Danzmann, 1998; Abdul-Muneer, 2014), i sobre les variacions genètiques entre

poblacions i variacions genètiques temporals de les poblacions (Abdul-Muneer, 2014). L'estudi de les variacions genètiques temporals és important per saber si una població és genèticament estable, és a dir, que es manté amb uns nivells de variabilitat genètica constant al llarg dels anys, o el que és el mateix, a mesura que apareixen noves generacions. L'estudi de l'estabilitat temporal és quelcom fonamental per saber si les poblacions pateixen pertorbacions al llarg del temps (Begossi, 2006).

Els marcadors moleculars es poden classificar com a marcadors de DNA mitocondrial (mtDNA) i marcadors nuclears. Dintre de l'últim grup hi ha els microsatèl·lits, un tipus de locus de repetició en tàndem de nombre variable (*variable number tandem repeat loci*, VNTRs). També es coneixen com a repetició de seqüència simple (*simple sequence repeat*, SSR) (Tautz, 1989) o repetició curta en tàndem (*short tandem repeat*, STR) (Edwards, Civitello, Hammond i Caskey, 1991). Consisteixen en seqüències de DNA formades per repeticions curtes en tàndem, distribuïdes aleatòriament al llarg del genoma (O'connell i Wright, 1997), i són molt abundants en genomes eucariotes. Els diferents al·lels dintre un mateix locus es caracteritzen per tenir un nombre diferent de unitats de repetició: es classifiquen en dinucleòtids, trinucleòtids, tetranucleòtids i pentanucleòtids, i poden ser simples o compostos. Generalment són neutres (Abdul-Muneer, 2014), és a dir, no suposen cap avantatge selectiu per l'individu, i aquesta característica els permet proporcionar molta informació imparcial sobre fenòmens d'aïllament reproductiu i deriva gènica (Gebremedhin et al., 2009).

Els microsatèl·lits s'estan convertint en una de les eines més emprades en genètica de poblacions. A diferència d'altres marcadors, aquests permeten diferenciar varies poblacions molt properes genèticament (Ferguson i Danzmann, 1998). Permeten l'estudi de l'estructura de les poblacions i la conservació de moltes espècies de peixos (Abdul-Muneer, 2014), i també s'utilitzen per l'estudi dels patrons de migració que es donen en una ambient aquàtic (O'connell i Wright, 1997). Un dels majors avantatges que presenten és l'expressió codominant, que permet la distinció dels individus heterozigots i els homozigots. A més, són altament polimòrfics i molt variables. Concretament els

microsatèl·lits més polimòrfics són els marcadors que més s'utilitzen en aqüicultura i biologia marina (Abdul-Muneer, 2014).

No va ser fins al 1990 que els microsatèl·lits van convertir-se en una de les principals eines d'estudi genètic (Abdul-Muneer, 2014) i fins l'any 2007 no hi havia microsatèl·lits descrits per a l'espècie *A. rochei*, cosa que indica que fins fa poc, no hi havia massa informació sobre les característiques genètiques d'aquesta espècie (Catanese et al., 2007). A més, avui en dia manca informació sobre les característiques genètiques temporals d'algunes poblacions d'*A. rochei*, necessària per la correcta gestió de la seva explotació. Tot i que es coneix que l'escala temporal és un factor important a l'hora de prendre decisions sobre els plans de gestió de les pesqueries, sovint la informació sobre qüestions temporals és quelcom que manca en la literatura i poques vegades es té en compte en els estudis. Obtindre dades temporals comparables és difícil, i és complicat saber quan l'acció de l'home o de l'ambient ha influït en els canvis que s'observen. (Begossi, 2006). Aquest estudi va destinat al coneixement de l'estabilitat temporal d'*A. rochei*.

Objective

The objective of the present work is to consider a genetic analysis to assess the putative temporal stability of a population of *A. rochei*. Thus, we analyze a location of this species that we have the samples from two consecutive years (2014 & 2015). Therefore, the overall objective can be summarized as:

- ♦ To analyze the temporal stability of a location of *A. rochei*.

To accomplish this goal, a sample collection of *A. rochei* from the location of the Iberian Peninsula, La Azohía (Cartagena), from 2014 was analyzed and the levels of genetic variability were compared with a sample collection from the same location, fished the following year (2015). In this study, microsatellites have been used as molecular markers to assess the possible genetic differentiation between these two sample collections. This analysis would allow testing the hypothesis of lack of genetic differentiation.

Materials i mètodes

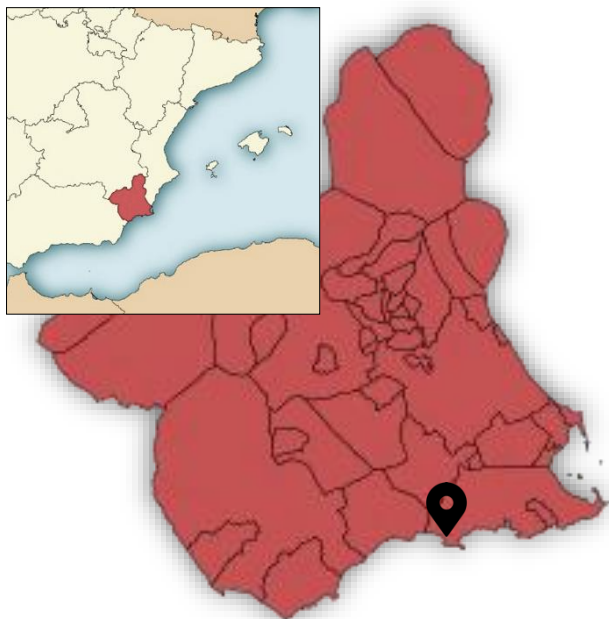


Figura 3 Localització de la zona de mostreig: La Azohía, Cartagena (Múrcia).

Mostratge

En aquest estudi es va treballar amb una col·lecció de mostres de teixit muscular de 54 individus d'*A. rochei*, pescats al sud-oest de la Península Ibèrica, a la costa de La Azohía, que es troba al municipi de Cartagena, a Múrcia (Figura 3). El mostreig es va fer el mes de maig de l'any 2014. Les mostres es van conservar en etanol 90%, a T^a ambient. Les dades obtingudes després de

l'anàlisi de la col·lecció de mostres preses l'any 2014 van ser comparades amb les d'una altra col·lecció de mostres, les quals s'havien pescat el mes d'abril de l'any 2015 i ja havien sigut analitzades al Laboratori d'Ictiologia Genètica (LIG) de la Universitat de Girona.

Extracció del DNA i amplificació

El DNA es va extreure amb el kit comercial Real Spin Kit (Durviz S.L.), que es basa en una digestió de les cèl·lules amb proteïnasa K.

Utilitzant la informació i dades del treball de Catanese et al. (2007) es va realitzar l'amplificació de dos microsatèl·lits dinucleòtids i dos de pentanucleòtids (Aro1-59, Aro2-40, Aro2-38 i Aro3-37) (Taula 1) mitjançant una PCR (Polimerase Chain Reaction) múltiplex, una metodologia que permet l'amplificació simultània de múltiples seqüències de DNA diferents (Chamberlain, Gibbs, Ranier, Nguyen i Caskey, 1988).

Taula 1 Caracterització dels microsatèl·lits d'*Auxis rochei*. Representa la identificació de cada locus, l'estructura de les unitats de repetició, el nombre total d'al·lels (k), el rang de la mida dels al·lels, el nombre d'accés a GenBank i el color del marcador, el qual indica el color de cada locus durant la reacció de la PCR multiplex (vegeu el text per a més detall).

Locus	Unitat de repetició	k	Rang de la mida dels al·lels	Num. d'accés a GenBank	Color del marcador
Aro1-59	(CA) ₁₂	26	110-170	AB284372	Vermell
Aro2-38	(TTCTC) ₉ (CTCTC)(TTCTC) ₉	25	116-256	AB247133	Verd
Aro2-40	(TC) ₂₂ (TT)(TC) ₇ (AC) ₅	16	154-196	AB247134	Groc
Aro3-37	(TTCTC) ₂₀	20	92-192	AB284383	Blau

Va caldre utilitzar els reactius estàndards d'una PCR i els primers corresponents a cada microsatèl·lit (taula 2), els quals tenen diferents mobilitats (taula 1). El primer *forward* de cada microsatèl·lit va ser marcat amb un marcador fluorescent d'un color diferent per poder distingir cada locus dels altres durant la lectura (taula 2). PET és el nom del marcador de color vermell, VIC és de color verd, NED és el de color groc i l'últim, 6-FAM, correspon al marcador de color blau (taula 1). El perfil del cicle tèrmic aplicat per l'amplificació incloïa 35 repeticions (45 segons a 95°C, 30 segons a 55°C i 30 segons a 72°C). Es va treballar sempre a una temperatura de hibridació de 55°C per als quatre microsatèl·lits. Els quatre loci van ser visualitzats mesurant la fluorescència dels marcadors amb el seqüenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Taula 2 Seqüències dels primers (5'-3') de cada microsatèl·lit (marcador fluorescent indicat: PET, VIC, NED, 6-FAM). El color del marcador està indicat a la llegenda de la taula 1 i al text.

Locus	Seqüències primers (5'-3')
Aro1-59	F: PET-CTACGTGCATGTCAGGTTGGATTCA R: CTACGTGCATGTCAGGTTGGATTCA
Aro2-38	F: VIC-CTGACCAACCAGTGCGAGGTGA R: GCAGTAATACATTAAAGGAATAAATCAGACCACA
Aro2-40	F: NED-TCGCAGTGCTAAAAACATCCTTGTAAGTG R: CATTCTCTTGAAGGCTGGGTTCTCTTTCT
Aro3-37	F: 6-FAM-CTTTATATTGGCAAGAGTATTGTTCACTCATTT R: TTGAGCCCACATGGTTGATAGCAGGAT

F, *forward*; R, *reverse*.

Lectura dels microsatèl·lits i anàlisi de dades

Per a la lectura dels diferents al·lels de cada microsatèl·lit es va utilitzar el programa Geneious 7.1.4 (Biomatters).

Al conèixer quins al·lels tenia la col·lecció de mostres analitzada, es va seguir amb el càlcul dels següents estadístics: nombre d'al·lels per locus (A), riquesa al·lèlica (RA), heterozigosi esperada (Hs), test exacte de Hardy-Weinberg, test exacte pel desequilibri de lligament, test de Fisher per a la comparació de les freqüències al·lèliques i índex de fixació (F_{st}). El nombre d'al·lels per locus va ser calculat a partir de FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001). La riquesa al·lèlica consisteix en una forma de quantificar el nombre d'al·lels per locus de forma que es puguin comparar grups de mostres amb mides (N) diferents (Kalinowski, 2004). Aquesta va ser calculada a partir de les dades obtingudes amb Genepop 4.2 (Raymond i Rousset, 1995).

L'heterozigositat o diversitat gènica és la quantificació d'individus heterozigots que hi ha en una població (Van Dyke, 2008) i va ser calculada mitjançant al programa FSTAT 2.9.3.

El test exacte de Hardy-Weinberg que posa a l'abast Genepop 4.2 va permetre l'anàlisi de les desviacions de l'equilibri de Hardy-Weinberg (HWE) de cada grup de mostres (Azohía2014 i Azohía2015). La llei de Hardy-Weinberg descriu que les freqüències genotípiques i al·lèliques de qualsevol locus dintre d'una població es mantenen constants generació rere generació, en absència de migració, mutacions, selecció natural i aparellament selectiu (Crow i Dove, 1988). Mitjançant també Genepop 4.2, es va aplicar el test exacte pel desequilibri de lligament per mesurar si hi havia l'associació d'al·lels de loci diferents (Rousset, 2000). El test de Fisher per a la comparació de les freqüències al·lèliques de Genepop 4.2 va mostrar si les dues col·leccions de mostres presentaven diferenciació gènica.

L'índex de fixació (F_{st}) va ser calculat mitjançant el programa FSTAT 2.9.3. Aquest estadístic és una mesura de variabilitat genètica dintre d'una població, per descriure l'estructura d'aquesta, i entre poblacions, per conèixer la diferenciació gènica entre aquestes (Holsinger i Weir, 2009).

Resultats

Al principi del procés experimental, la col·lecció de mostres estava formada per 54 individus, i degut a dues contaminacions que es van produir, l'anàlisi només es va poder fer a 52 d'ells. Per tant la mida de la mostra va ser finalment de 52 individus i la taxa d'èxit va ser de 96.3%. Es pot dir que, tot i els errors, el percentatge d'èxit en el genotipatge dels individus va ser molt elevat. Pel locus Aro2-38, a més, van fallar dos individus durant la lectura dels microsatèl·lits. La taxa d'èxit en aquest locus va ser de 92.6%. Tot i que és menor, es pot considerar que la taxa d'èxit en aquest cas també va ser elevada. Després de la lectura es va detectar que el rang de la mida dels al·lels del locus Aro3-37 no coincidia exactament amb les dades del treball de Catanese et al. (2007), el qual era de 92-210 (Catanese et al. (2007) marcava un rang de 92-192) (taula 1). El mateix va succeir amb el rang de la mida dels al·lels d'Aro2-38, que es va trobar que pujava a 116-276, mentre que el rang que descriu el treball de Catanese et al. (2007) era de 116-256.

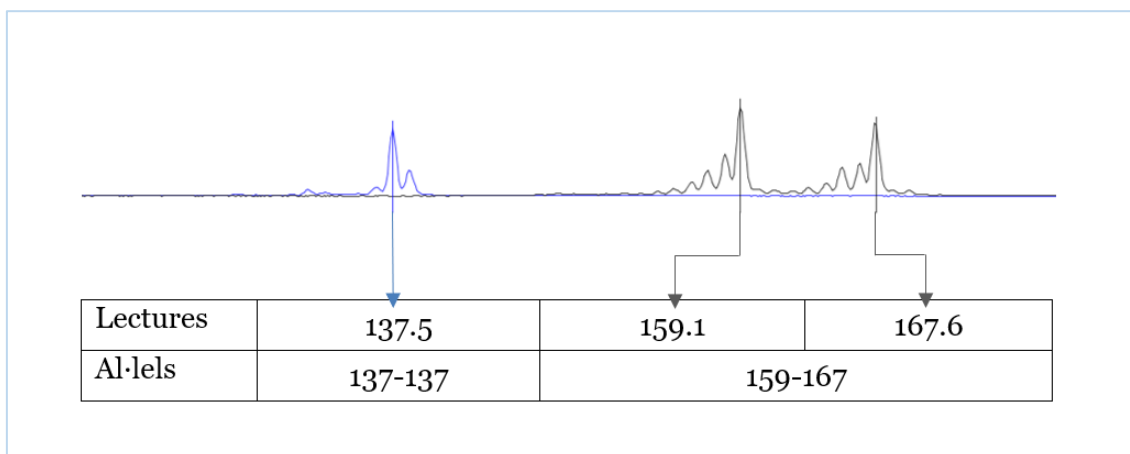


Figura 4 Genotipatge d'un individu d'*A. rochei* pels loci Aro3-37 (blau) i Aro2-40 (negre), homozigot per a l'al·lel 137 i heterozigot amb el genotip 159-167.

La figura 4 mostra un exemple del genotipatge d'un individu mitjançant el programa Geneious 7.1.4. Com es descriu a la taula 1, el locus Aro3-37 va ser marcat amb un marcador de fluorescència blava, i l'Aro2-40, de color groc (tot i que el programa el pot representar de color negre, com s'observa a la figura 4, per una més fàcil visualització). Les lectures eren el mitjà per aconseguir conèixer

quins al·lels tenia cada individu per cada locus. En aquest cas, per exemple, s'observa que l'individu és homozigot pel locus Aro3-37, per l'al·lel 137, i heterozigot pel locus Aro2-40, i té els al·lels 159 i 167 - el número que dona nom a cada al·lel és el número de parells de bases (bp) que el formen.

Taula 3 Descripció de la variabilitat genètica per cada loci.

Locus	Col·lecció de mostres							
	Azohía2014				Azohía2015			
	N	A	RA	Hs	N	A	RA	Hs
Aro1-59	52	22	21.77	0.930	51	22	21.86	0.925
Aro2-38	50	19	19	0.925	45	19	22	0.943
Aro2-40	52	16	15.76	0.733	51	15	14.84	0.797
Aro3-37	52	17	16.84	0.914	51	17	16.94	0.924

N, mida de la mostra; A, nombre d'al·lels per locus; RA, riquesa al·lèlica; Hs, diversitat genètica.

Diversitat genètica i estructura de la població

El nombre d'al·lels detectats per cada locus en el total de mostres varia dintre un rang de 15 (Aro2-40) a 22 (Aro1-59) al·lels. Tant la col·lecció Azohía2014 (la col·lecció de mostres analitzada en aquest estudi) com Azohía2015, que és la col·lecció analitzada prèviament per LIG, ronden uns valors molt similars per cada locus, en relació a la diversitat genètica, tant per Hs com per AR (Taula 3).

Després de realitzar el test que ofereix Genepop 4.2, es van trobar significants desviacions de l'equilibri de Hardy-Weinberg a les dues col·leccions de mostres, pel locus Aro2-38 en els dos casos ($P < 0.001$) i aquestes són associades a un dèficit d'heterozigots. El test de desequilibri de lligament no va

mostrar cap valor significatiu ($P > 0.05$), el que suggereix que cap de les col·leccions de mostres pateix desequilibri de lligament, és a dir, no hi ha cap parella al·lels de loci diferents que estiguin associats i es transmetin conjuntament.

Diferenciació gènica

L'anàlisi de la diferenciació mitjançant el test de Fisher per a la comparació de les freqüències al·lèliques va mostrar un valor significatiu que demostra que hi ha diferenciació gènica entre les dues col·leccions de mostres (Azohía2014 i Azohía2015) ($P < 0.001$), un fet que segurament indica inestabilitat temporal. El locus que va marcar amb més fortalesa aquesta diferenciació és l'Aro2-38, amb un $P < 0.001$. L'índex de fixació també va revelar diferenciació gènica, però menys significativa ($F_{st} = 0.024$, $P < 0.05$).

Discussió

Primerament cal destacar que l'èxit de genotipatge ha estat molt elevat i per tant, es pot concloure que s'han seguit els protocols de laboratori acuradament. Aquest fet també indica que els protocols utilitzats estan ben optimitzats i que s'han pogut seguir amb confiança.

Si es comparen els valors de diversitat genètica entre les dues col·leccions de mostres s'observa que són molt similars. El valor de H_s varia molt poc, quan es compara un mateix locus entre les dues col·leccions de mostres. Si es compara la riquesa al·lèlica de cada locus, s'observa que sempre ronden valors similars menys al locus Aro2-38, la RA del qual varia més altament que els altres entre les dues col·leccions, Azohía2014 ($RA = 19$) i Azohía2015 ($RA = 22$). El valor del nombre d'al·lells per locus només canvia entre les dues col·leccions pel locus Aro2-40, que puja a 15 (Azohía2015) i a 16 (Azohía2014), però és el mateix als altres tres loci (Taula 3). Les dues col·leccions es desvien de la llei de l'equilibri de Hardy-Weinberg per un dèficit d'heterozigots, i cap de les dues pateix un desequilibri de lligament.

Tot i les similituds a nivell de variabilitat genètica anteriorment comentades, els resultats d'aquest estudi revelen que la població d'*A. rochei* de La Azohía (Cartagena) no presenta una total estabilitat temporal, ja que tan els resultats del test de Fisher per a la comparació de les freqüències al·lèliques, com el valor de F_{st} demostren diferenciació genètica significativa, amb un nivell de significació més elevada pel test de Fisher. Les freqüències al·lèliques per tant, varien suficientment com perquè hi hagi diferenciació genètica i per tant, inestabilitat temporal. En conclusió, s'observa diferenciació genètica, però molta similitud en referència a la quantitat de diversitat genètica.

Quan es comparen els valors de referència del nombre d'al·lells de l'únic estudi que es té constància que hi ha publicat fins a l'actualitat, els valors obtinguts (taula 4, A) no varien massa dels esperats (taula 1, k). A més, els valors d'heterozigosi esperada (H_s) obtinguts són molt propers als publicats per Catanese et al. (2007). Aquesta comparació dona a entendre que no hi ha hagut pèrdua de variabilitat genètica des de l'estudi de l'any 2007, i a més dona la confiança que el procés experimental ha sortit correctament.

Haver trobat diferenciació gènica entre les dues col·leccions de mostres és quelcom que crida l'atenció, ja que les mostres d'*A. rochei* provenien de la mateixa localitat. Aquest resultat indica que segurament la població ha patit una pertorbació. Tenint en compte que hi ha estabilitat genètica, es dedueix que la població de La Azohía (Cartagena) no pateix un efecte de la sobrepesca i per tant, no està en risc de reducció de variabilitat genètica. Una possible explicació dels resultats és que els individus dels quals provenen les mostres, que van ser pescats amb un any de diferència, tenen un origen diferent. L'origen dels individus de l'any 2014 pot ser que sigui diferent del dels individus de l'any 2015, és a dir, poden pertànyer a poblacions diferents o a cohorts diferents. Això podria ser degut a que La Azohía (Cartagena) és un pas migratori per on cada any passen moles de peixos (Sabatés i Recasens, 2001) i que aquests tenen un origen genètic diferent. Aquest origen diferent pot ser per la diferenciació genètica entre cohorts o degut a que les seves poblacions d'origen siguin diferents.

Aquest fet comentat anteriorment s'hauria de confirmar amb altres dades temporals, i assegurar així que els resultats obtinguts i els raonaments fets seguidament són fiables i vàlids. Per a confirmar el que en aquest estudi s'ha identificat es podria ampliar el termini de treball, repetint aquest estudi varis anys, treballant amb mostres pescades uns anys que no coincideixin amb els que s'han tractat en aquest estudi. També caldria treballar amb un major nombre de marcadors diferents per acabar de confirmar l'estudi. Seria interessant, a més, ampliar les localitats d'origen de les mostres amb les que es treballa, mostrejant i analitzant les possibles poblacions d'origen dels individus que migren al sud-oest del Mar Mediterrani.

Caldria veure com evoluciona aquesta població i si és cada vegada més significatiu el valor de diferenciació gènica i, per tant, si hi ha risc de subdivisió de la població.

Una possible millora per aquest estudi hagués sigut un augment de la mida de les col·leccions de mostres, ja que quan moltes mostres fallen en qualsevol punt del procés experimental, i la mida de la col·lecció es redueix molt, encara que tan sols sigui per un locus, això pot posar en risc l'estudi i que aquest no sigui del tot fiable. Tot i així, aquest estudi pot significar l'inici del coneixement de l'estructura de la població d'*A. rochei* de La Azohía (Cartagena), una espècie de

peix comercial que requereix d'atenció per part de la ciència per evitar arribar a una situació crítica a causa de l'explotació de l'home.

No s'ha realitzat cap tipus d'experimentació animal en aquest estudi, ja que es treballa amb individus de pesca. Per tant no hi cap conflicte ètic amb el fet de treballar amb aquests animals, *A. rochei*. La investigació científica fa una gran feina per a la conservació de les espècies marines, ja que treballa per obtenir el màxim de coneixement sobre les poblacions de peixos per poder gestionar la pesqueria de forma sostenible. Els resultats obtinguts amb aquest estudi poden ser complementaris a altres estudis, que poden aportar finalment tota la informació que la indústria pesquera necessita per desenvolupar un pla de gestió més sostenible per a aquest recurs pesquer (*Auxis rochei*), i dur a terme la conservació de les poblacions per tal que facin front a la impacte de la pesqueria i a possibles canvis ambientals.

Conclusions

1.- We have not detected changes in the amount of genetic variability when we compare two samples from different year in the location of La Azohía (Cartagena) for *Auxis rochei*. Therefore, the possibility of a fishery effect influencing the studied population is discarded. Although, to totally confirm this result, a more thorough analysis is needed.

2.- Genetic differentiation observed between Azohía2014 and Azohía2015 populations is a steady evidence that *A. rochei* population from La Azohía (Cartagena) is temporarily unstable, at least for the studied years (2014 & 2015), probably because it's locality might be a possible migratory pass. In this passage, multiple schools of fishes with different genetic origin pass by seasonally. The different genetic origin might be due to the differentiation between cohorts or the different origin populations.

Bibliografia

- Abdul-Muneer, P. M. (2014). Application of Microsatellite Markers in Conservation Genetics and Fisheries Management: Recent Advances in Population Structure Analysis and Conservation Strategies. *Genetics Research International*, 2014 (691759), 1-12.
- Agardy, T. (2000). Effects of fisheries on marine ecosystems: a conservationist's perspective. *ICES Journal of Marine Science*, 57 (3), 761–765.
- ICCAT (2018). Report of the 2016 Small tuna species group intersessional meeting (Madrid, Spain, 2-6 April 2018)
- Begossi, A. (2006). Temporal stability in fishing spots: Conservation and co-management in Brazilian artisanal coastal fisheries. *Ecology and Society*, 11 (1), 5.
- Catanese, G., Infante, C., Crespo, A., Zuasti, E., Ponce, M., Funes, V., Pérez, L. i Manchado, M. (2007). Development and characterization of eight microsatellite markers in bullet tuna (*Auxis rochei*). *Molecular Ecology Notes*, 7 (5), 842–844.
- Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Ranier, J. E., Nguyen, P. N. i Caskey, C. T. (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 16 (23), 11141-11156.
- Collette, B. B. i Aadland, C. R. (1996). Revision of the frigate tunas (Scombridae, *Auxis*), with descriptions of two new subspecies from the eastern Pacific. *Fishery Bulletin*, 94 (3), 423–441.
- Collette, B.B. i Nauen, C. E. (1983) FAO species catalogue, Vol. 2. Scombrids of the world: an annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos, and related species known to date. *FAO Fisheries Synopsis*, 125, 1-137.
- Crow, J. F. I Dove, W. F. (1988). Eighty years ago: the beginnings of population genetics. *Genetics Society of America*, 119 (3), 473-476.
- Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H. A., i Caskey, C. T. (1991). DNA Typing and Genetic Mapping with Trimeric and Tetrameric Tandem Repeats. *The American Journal of Human Genetics*, 49 (4), 746–756.
- Ferguson, M. M. i Danzmann, R. G. (1998). Role of genetic markers in fisheries and aquaculture : useful tools or stamp collecting?. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55 (7), 1553–1563.

- Froese, R. i D. Pauly. Editors. (2018). FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (02/2018).
- Frankham, R. (1995). CONSERVATION GENETICS. *Annual Review of Genetics*, 29, 305-327.
- Gebremedhin, B., Ficetola, G. F., Naderi, S., Rezaei, H. R., Maudet, C., Rioux, D., Luikart, G., Flagstad, Ø., Thruiller, W. i Taberlet, P. (2009). Frontiers in identifying conservation units: from neutral markers to adaptative genetic variation. *Animal Conservation*, 12 (2), 107-109.
- Goudet, J. (2001). FSTAT: a computer program to stimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Recuperat de <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Grove, J. S. i Lavenberg, R. J. (1997). *The Fishes of the Galápagos Islands* (1^a edició). Stanford: Stanford University Press.
- Hauser, L., Adcock, G. J., Smith, P. J., Ramírez, J. H. B. i Carvalho, G. R. (2002). Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (18), 11742-11747.
- Hauser, L. i Carvalho, G. R. (2008). Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. *Fish and Fisheries*, 9 (4), 333-362.
- Holsinger, K. E. i Weir, B. S. (2009). Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{st} . *Nature Reviews Genetics*, 10 (9), 639-650.
- ICCAT (2012). A Proposal to Set Up an ICCAT Year Research Program or Small Tunas (SMTYP). p. 2: ICCAT.
- Infante, C., Catanese, G., Ponce, M. i Manchado, M. (2004). Novel Method for the Authentication of Frigate Tunas (*Auxis thazard* and *Auxis rochei*) in Commercial Canned Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (25), 7435-7443.
- Kalinowski, S. T. (2004). Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation Genetics*, 5 (4), 539-543.
- Lutz, P. L., Musick, J. A. i Wyneken, J. (1997). *The Biology of Sea Turtles, volume II* (1^a edició). Boca Ratón: CRC Press.

- Macías, D., Gómez-Vives, M. J. i de la Serna, J. M. (2005). Some reproductive aspects of bullet tuna (*Auxis rochei*) from the South Western Spanish Mediterranean. *Collective Volume of Scientific Papers ICCAT*, 58 (2), 484–495.
- Mc Eachran, J. D., Feckhelm, J. D. (1998). *Fishes of the Gulf of Mexico, Volume 2: Scorpaeniformes to Tetraodontiformes (1^a edició)*. Austin: University of Texas Press.
- O'connell, M. I Wright, J. M. (1997). Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7 (3), 331–363.
- Parsons, T. R., Takahashi, M. i Hargrave, B. (1984). *Biological oceanographic processes* (3a edició). Oxford: Elsevier.
- Pinsky, M. L. i Palumbi, S. R. (2014). Meta-analysis reveals lower genetic diversity in overfished populations. *Molecular Ecology*, 23 (1), 29–39.
- Primack, R. B. i Ros, J. (2002) *Introducción a la biología de la conservación*. Barcelona: Ariel.
- Raymond, M., i Rousset, F. (1995). Genepop: a population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86, 248–249.
- Rousset, F. (2000). Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology*, 13 (1), 58–62.
- Sabatés, A. i Recasens, L. (2001). Seasonal distribution and spawning of small tunas (*Auxis rochei* and *Sarda sarda*) in the northwestern Mediterranean*. *Scientia Marina*, 65 (2), 95–100.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research*, 17 (16), 6463–6471.
- Van Dyke, F. (2008). *Conservation Biology: Foundations, Concepts, Applications (2a edició)*. Berlín: Springer Science.
- Waples, R. S., Punt, A. E. i Cope, J. M. (2008). Integrating genetic data into management of marine resources: how can we do it better?. *Fish and Fisheries*, 9 (4), 423–449.
- Ward, R. D. (2000). Genetics in fisheries management. *Hidrobiologia*, 420 (1), 191–201.