

ESTRUCTURA POBLACIONAL Y CONECTIVIDAD GENÉTICA DE LA GAMBA ROJA, *Aristeus antennatus*, EN EL MAR MEDITERRÁNEO NOROCCIDENTAL

Melania Agulló Chazarra

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/10803/687594>

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.

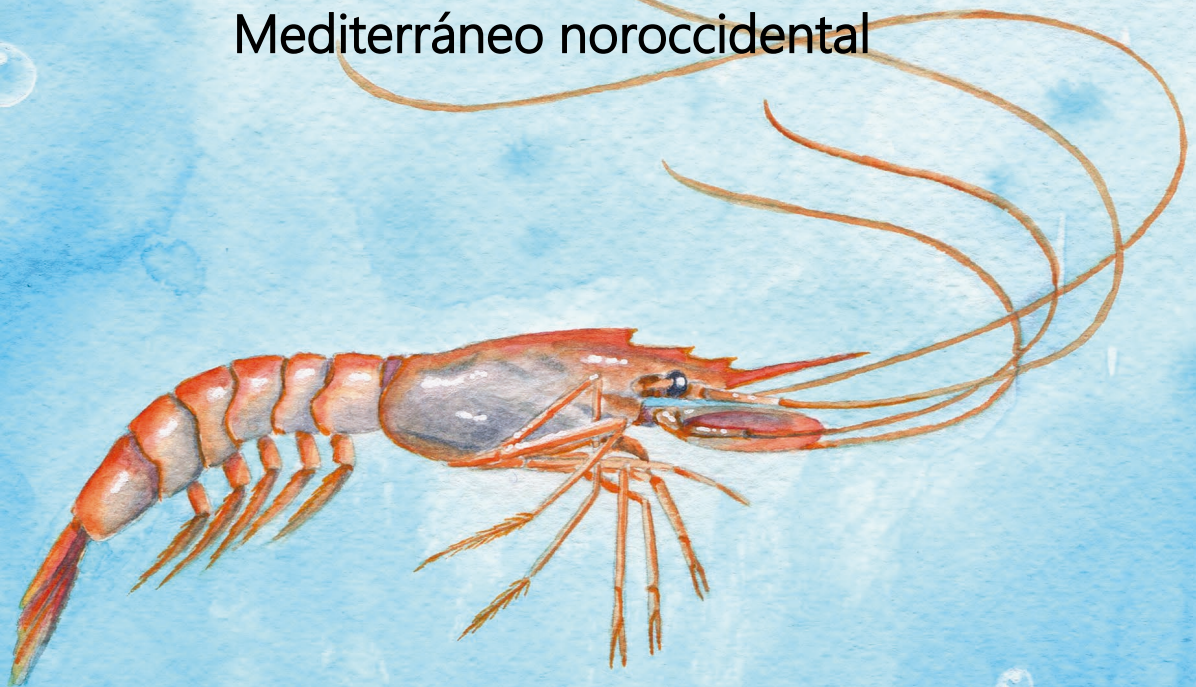
ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto 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.



TESIS DOCTORAL

Estructura poblacional y conectividad genética
de la gamba roja, *Aristeus antennatus*, en el Mar
Mediterráneo noroccidental



Melania Agulló Chazarra

2022

Revisada
8/2021



TESIS DOCTORAL

Estructura poblacional y conectividad genética de la gamba roja, *Aristeus antennatus*, en el Mar Mediterráneo noroccidental

Melania Agulló Chazarra

2022

Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología del Agua

Dirigida por:

Dra. Maria Inés Roldán Borassi

Dra. Sandra Heras Mena

Tutora:

Dra. Maria Inés Roldán Borassi

Memoria presentada para optar al título de doctora por la Universidad de Girona



La Dra. María Inés Roldán Borassi, Catedrática de Universidad y la Dra. Sandra Heras Mena, Profesora Agregada, ambas del Área de Genética del *Departament de Biologia* de la *Universitat de Girona*,

DECLARAMOS

que este trabajo, titulado **Estructura poblacional y conectividad genética de la gamba roja, *Aristeus antennatus*, en el Mar Mediterráneo noroccidental**, que presenta Melania Agulló Chazarra para la obtención del título de doctora, ha sido realizado bajo nuestra dirección.

Y, para que conste y tenga los efectos oportunos, firmamos este documento.

María Inés Roldán Borassi

Sandra Heras Mena

Girona, 21 de septiembre de 2022

Agradecimientos

El desarrollo de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a:

- Ministerio de Economía y Competitividad por el soporte financiero al proyecto CONECTividad 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) dirigido por la Dra. M. I. Roldán.
- *Universitat de Girona* por la beca predoctoral (*Investigadors en Formació*, IFUdG2018) a Melania Agulló Chazarra.
- *Universitat de Girona* por la ayuda económica para la asistencia a congresos de investigación para estudiantes de máster y doctorado para el año 2017, gracias al cual se asistió al VI Congreso de la Sociedad Española de Biología Evolutiva (SESBE18) realizado desde el 17 al 19 de enero de 2018 en Palma de Mallorca, España.

Agradecimientos personales

Realizar una tesis doctoral es un proyecto que requiere mucho tiempo y esfuerzo, pero que genera una gran recompensa. A mí me ha dado la oportunidad de vivir durante un tiempo en una ciudad tan bella como es Girona. Todas sus zonas verdes, sus fiestas tradicionales, como mi favorita, el *Temps de flors*, donde la ciudad aumenta aún más su belleza.

Dentro de la propia tesis, he podido disfrutar del trabajo de laboratorio, algo que siempre amaré hacer, pero también he utilizado programas bioinformáticos de análisis de datos genéticos, algo que no había aprendido en profundidad previamente y que me ha gustado hacer. De forma adicional, y especialmente en mis primeros años, tuve la oportunidad de dar clases en la universidad, y puedo afirmar sin lugar a dudas que es algo que me alegra haber podido hacer, especialmente cuando trabajas en tan buena compañía y en asignaturas tan interesantes como las que se dan en la carrera de Biología y afines. Sí, el amor a la Biología me puede.

Para llevar a cabo esta tesis doctoral ha sido imprescindible el apoyo y la ayuda de mucha gente. En primer lugar, la persona que confió en mí y me dio la oportunidad de empezar la tesis fue Marina. Desde el primer día que hablamos a través de Skype, cuando yo tenía la boca medio dormida por haberme quitado la muela del juicio un par de horas antes, me ha demostrado un enorme apoyo. Siempre me ha defendido y ofrecido su ayuda o incluso su casa para lo que hiciera falta. Además, hemos trabajado juntas en los artículos y en la memoria, gracias a lo cual todo ha quedado mucho mejor de lo que inicialmente era. Por todo ello, le doy las gracias de todo corazón.

En segundo lugar, Sandra, mi codirectora de tesis. Junto con Laia, ha sido la persona que me ha enseñado todo lo relativo al trabajo de laboratorio, pero además también me enseñó a usar los programas informáticos. La mayoría son muy complejos de entender sin alguien que te resuelva las dudas, y ella siempre ha respondido mis infinitas preguntas, a pesar de estar liadísima. Asimismo, me ha ayudado enormemente en la redacción de artículos y memoria. En lo personal, estoy muy agradecida por haberla podido conocer, así como de haber trabajado junto a ella, tanto en investigación como en las clases.

A la hora de empezar en el laboratorio, Laia fue la encargada de enseñarme los protocolos y la forma correcta de trabajar, de corregirme cuando me equivocaba y a la que podía preguntar cuando necesitaba algo. Siempre la he visto como una gran profesional, una persona a imitar en la forma de trabajar y desenvolverse. Me alegra mucho que consiguiera una plaza de profesora, tal y como quería, y estoy convencida de que sus alumnos estarán encantadísimos con ella.

Otra fuente principal de apoyo dentro de la universidad ha sido Alba. Aunque más tarde trabajamos en investigación juntas, inicialmente empezamos coordinándonos en la docencia, donde nada más llegar a la universidad me prestó toda su ayuda y experiencia en las clases, especialmente las de teoría. No puedo ni imaginarme lo diferente que habría sido todo sin su ayuda. Hemos compartido muchísimos momentos, y la considero una gran amiga. Gracias por haber estado aquí conmigo.

José Luis y Manel, no podía olvidar su participación en los artículos, tanto en la propia investigación como en la corrección de los manuscritos. José Luis siempre ha demostrado ser la voz de la experiencia, la persona más fiable a la que acudir cuando algo no nos

funcionaba como debía. Muchas gracias por ayudarme cuando nos encontrábamos con algún error o problema, hasta que conseguíamos encontrar qué era lo que estaba fallando y así solucionarlo.

Gracias al resto de miembros del Área de Genética de la UdG por haberme acogido allí como una más. Rosa, Oriol, Jordi, Núria Sanz, Carles, Judith y Núria Pérez. Aunque por desgracia desde el confinamiento nos hemos visto menos, guardo buenos recuerdos de todos ellos, tanto de docencia con los que la he podido compartir, como en las comidas o momentos compartidos.

También quería mencionar a Conrad, el patrón de la embarcación *Nova Gasela* de Palamós, donde pude conocer de primera mano cómo funciona la pesca de gamba roja en dos ocasiones. A pesar de los mareos, la larga espera y el trabajo duro, tanto él como el resto de pescadores nos demostraron a todas las que nos embarcamos que su generosidad es infinita, y convirtieron la experiencia en algo muy positivo. Además, creo que es difícil estar más concienciado con la importancia de la investigación que ellos, junto con otros pescadores de la cofradía de Palamós. Son el mejor ejemplo a seguir, y esto convencida de que, si hubiera mucha más gente como ellos, las cosas podrían ser distintas.

Gracias a Rebeca Díez Feijóo voy a tener una cubierta y contraportada con unas ilustraciones tan maravillosas. No creo que nunca se le hubiera ocurrido dibujar algo tan "extraño" como una gamba, y aun así no titubeó en aceptar el reto. Los dibujos no podían haber quedado mejor, y la tesis va a ser mucho más bonita gracias a ellos.

En el ámbito personal, he tenido la suerte de contar con el apoyo de muchas personas. Para empezar, de amigos que he conocido en la propia ciudad de Girona, quería mencionar a Josep, Albert y a Isa, con los que he podido pasar muy buenos momentos. Les echaré de menos, aunque tengo claro que cuando vaya a Girona les visitaré. En el caso de Federica, tenemos pendiente quedar cuando vaya a Italia algún día, estoy deseando que me enseñe de primera mano alguna de las grandes ciudades del país.

José Ruiz, Edu, Saray, José Payá, Raquel, Yaiza, Imanol y Jesús, ellos son la prueba de que no importa la distancia, los amigos de verdad siguen siéndolo aun cuando no pueden quedar tanto como antes. José Ruiz además hizo el esfuerzo de venir a visitarnos todas las veces que pudo a Girona, aunque fuera solamente para dar paseos y comer un yogur helado en La Lleteria.

Miriam, Borja, Ana Moreno, Sandra, Marta y Ana Baeza, hace una eternidad que no les puedo ver, principalmente por la pandemia que lo trastocó todo un poco. Aun así, tener su apoyo y saber que les puedo contar cualquier cosa que necesite es algo que valoro mucho. Siempre tendrán mi amistad incondicional, al igual que yo cuento con la de ellos.

Un apoyo fundamental para mí con el que he podido contar a lo largo de toda mi vida ha sido mi familia. Me siento muy agradecida por tener a cada uno de ellos, y obviamente tenerles tan lejos este tiempo ha sido una de las pocas desventajas de haber hecho la tesis doctoral en Girona. Abuela Teresa, Tere, Carmen, Pepe, José, Saray, Maite, Francisco, gracias a la tecnología hemos podido seguir hablando, aunque no sea lo mismo que cuando nos vemos en persona. Con Adam y Sofía ha sido más duro, porque al ser tan pequeñitos, estar tan lejos durante tanto tiempo significa, en parte, no verlos crecer. No obstante, ambos me han demostrado su cariño cada vez que me han visto, incluso la pequeña Sofía, probando que el miedo que yo pudiera tener a que no supiera reconocermé

y saber quién soy era totalmente infundado. Tengo claro que ha sido gracias a mi familia, que le ha hablado de mí en repetidas ocasiones, lo cual ha significado mucho para mí. Adam, en cambio, no ha tenido problemas en recordarme por sí mismo, pero es que con lo cariñoso que es no tenía ninguna duda. Es un niño muy especial, y espero que no cambie nunca. Juanita, Antonio, Carlos, Mariángeles, Juan Antonio, Vicente, Daniel y Alberto, tampoco a ellos he podido verlos tanto como antes. No obstante, he podido estar informada de las novedades, y me he alegrado de las buenas noticias, de igual manera que deseo que las malas hayan sido lo más leves posible, y cambie pronto a algo mejor. Juan Antonio siempre ha sido el "científico pionero" de la familia, el primo más estudioso y un modelo a seguir. Espero que hoy se pueda sentir tan orgulloso de mí como yo lo estuve el día que obtuvo el doctorado, a pesar de que no pude ir a ver su defensa. Siendo sincera, al ser de química, en inglés y yo una adolescente, no creo que me hubiera enterado de la mitad, pero me habría encantado verlo en persona. Durante unos meses estuvimos toda la familia con el alma en vilo, cuando la Abuela Teresa se puso enferma varias veces seguidas y no parecía mejorar, aunque por suerte finalmente consiguieron dar con el tratamiento adecuado. Poder terminar de escribir la tesis cerca de ella me ha quitado un gran peso de encima, pudiendo evitar la gran impotencia que sentía sabiendo que no podía hacer nada desde Girona. Desde aquí he podido verla y ayudar, aunque sea en cuestiones nimias, las cuales he agradecido poder hacer para pasar más tiempo con ella. Te quiero Abuela, siempre has sido como una segunda madre para todos tus nietos, desbordando amor y cuidándonos en todo lo que hiciera falta y más.

También considero muy importantes para mí a María Teresa, Joaquín, Bea, Víctor, Mario y Hugo. Nos conocemos desde hace bastantes años, a Mario y Hugo desde que nacieron. No podía haber sido mejor recibida, y de hecho desde que salgo con Dani me he sentido parte de su familia. No podría haber imaginado una familia política mejor.

Cristian, gracias por ser mi hermano mayor. Siempre he respetado su determinación, lo buena persona que es, su paciencia infinita y su apoyo. Ha conseguido todo lo que se ha propuesto simple y llanamente porque ha luchado como nadie para ello. Desde muy niño siempre fue aquel hermano que ayudaba a sus padres a cuidar de sus dos hermanas pequeñas, al que no le importaba quedarse vigilándolas para que no les pasara nada malo. Y aunque una vez más crecidas nos supiéramos defender solas, de haberlo necesitado sabemos que habría estado allí sin dudarle. Aquí quiero incluir a mi cuñada, Miriam. Me alegro muchísimo de que sea la esposa de mi hermano, hacen una pareja maravillosa y creo que se complementan estupendamente. Aunque ya hace años que la considero parte de mi familia, ahora es más oficial. En la lucha por conseguir sus sueños es exactamente igual que mi hermano. Si hay un claro ejemplo de enfermera de vocación, esa es ella. Luchó duramente hasta conseguirlo y a día de hoy deja claro a todo el que la conoce que le entusiasma su profesión.

A mis padres les debo todo. Son los principales responsables de que hoy yo pueda escribir estas palabras. Puedo decir muchas cosas buenas de ellos, pero una de las más importantes para mí es el apoyo que nos habéis dado desde siempre a los tres. Hemos podido estudiar lo que hemos querido, a pesar de lo duro que es tener a tres hijos haciendo una carrera a la vez, cada uno con su horario e incluso en universidades diferentes. También me apoyaron cuando decidí realizar la tesis doctoral en Girona, y siempre que han podido han venido a verme allí, a pesar de la distancia y de lo complejo que es organizarse teniendo solo un fin de semana para ir. Ha sido un placer poder haber visitado varios sitios de la comarca con

ellos, a pesar de lo cansados que llegaban del viaje. He tardado varios años, pero finalmente aquí estamos, en el final de una etapa. No diré que espero que estéis orgullosos de mí, porque sé que lo estáis de vuestros tres hijos.

Por último, he querido dejar a tres personas que me costaba situar en un único campo.

Antonio es al mismo tiempo mi cuñado y uno de mis mejores amigos. Me gusta mucho cómo es, poder bromear con ese humor suyo que tiene y hacer cosas juntos, aunque sea por pasar el tiempo. Además, siempre me ha ayudado cuando se lo he pedido, así que le incluyo entre las personas que han hecho esta tesis posible.

Luz María...dicen que todos tenemos un alma gemela, y que tenemos que pasar toda la vida buscándola. Por suerte, yo la conozco desde antes de nacer, aunque me guste llamarla melliza. Es la persona responsable de que yo jamás haya conocido lo que es la soledad, la mejor amiga incondicional, con la que puedes contar pase lo que pase. A ninguna otra persona se le habría ocurrido la idea de hacer una estancia tan lejos de casa, solo para poder estar unos meses con su hermana, ¡y con tan mala suerte de pillar el confinamiento a mitad y haberse tenido que quedar encerrada con ella durante más tiempo! Pero es que, además, me ha ayudado más que nadie con esta tesis doctoral. Se atrevió incluso a leerse el primer borrador de la introducción, e incluso me ayudó a mejorarlo a pesar de no entender la mayoría de tecnicismos. Es la responsable de que varias de las figuras de la tesis hayan quedado, en mi opinión, tan bonitas. Eso sí...dentro de poco dejará de ser la única Dra. Agulló de la familia, ¡he llegado para igualarla!

Dani, si de mis padres he tenido un apoyo incondicional, de él puedo decir que he tenido la mejor compañía posible. Tomó la difícil decisión de dejarlo todo para acompañarme a Girona y poder estar juntos, y no pude ser más feliz al poder vivir con él durante aquel tiempo. Es un pilar fundamental en mi vida, representando muchas de las cosas que cualquiera podría aspirar a ser. Es de las personas más nobles y buenas que conozco, dos cualidades entre las muchas que tiene que me hicieron enamorarme de él cuando le conocí. Ha conseguido que sea feliz durante todo este tiempo, y en los días malos me ha ayudado a que lo fueran un poquito menos. Hay momentos en los que la tesis doctoral se puede hacer un poco cuesta arriba, y en esos momentos estaba él para apoyarme, a pesar de que no ha debido ser nada fácil. Además, por casualidades de la vida me he puesto enferma en varias ocasiones, y detectar lo que me pasaba fue un proceso largo, donde él me acompañó en todo momento. Renunciar a comer un montón de cosas solo porque la otra persona no puede, o llevar tantísimo cuidado con que no me diera la luz debido a mi fotosensibilidad, son dos entre mil ejemplos de los detalles que tiene conmigo. Pero es que también me ha ayudado con la tesis doctoral, buscando lo que hiciera falta para poder avanzar en lo que estuviera haciendo. Te quiero.

Aunque ya no estén, hay personas que siempre me acompañarán, no importa el tiempo que pase. Pienso en ellos constantemente, y siento ese huequito en mí que ya nunca volverá.

A todos vosotros, gracias de todo corazón.

Listado de publicaciones derivadas de la tesis

Esta tesis doctoral se presenta como un compendio de 3 publicaciones científicas, cuyo factor de impacto y posición en el área de estudio se detallan de acuerdo con la última actualización (julio de 2022) del *Journal Citation Reports*™.

Melania Agulló, Laia Planella, Manuel Vera, Sandra Heras, José-Luis García-Marín, María Inés Roldán (2020) *Genetic analyses reveal temporal stability and connectivity pattern in blue and red shrimp *Aristeus antennatus* populations*. *Scientific Reports*, 10: 21505. doi.org/10.1038/s41598-020-78634-2.

Factor de Impacto de la revista *Scientific Reports* en 2020: 4.380. Factor de Impacto de la revista durante los últimos cinco años: 5.134. Esta revista se encuentra en la posición 17/72 (Q1) del área de estudio *Multidisciplinary Sciences*.

Alba Abras, Jose-Luis García-Marín, Sandra Heras, Manuel Vera, Melania Agulló, Laia Planella, María Inés Roldán (2021) *Male deep-sea shrimps *Aristeus antennatus* at fishing grounds: Growth and first evaluation of recruitment by multilocus genotyping*. *Life*, 11: 116. doi.org/10.3390/life11020116.

Factor de Impacto de la revista *Life-Basel* en 2021: 3.251. Factor de Impacto de la revista durante los últimos cinco años: n/a. Esta revista se encuentra en la posición 39/94 (Q2) del área de estudio *Biology*.

Melania Agulló, Sandra Heras, José-Luis García-Marín, Manuel Vera, Alba Abras, Laia Planella, María Inés Roldán (2022) *An evaluation of the genetic connectivity and temporal stability of the blue and red shrimp *Aristeus antennatus*: a case study of spawning female's grounds in the Western Mediterranean Sea*. *Hydrobiologia*, 849: 2043–2055. doi.org/10.1007/s10750-022-04847-3.

Factor de Impacto de la revista *Hydrobiologia* en 2021: 2.822. Factor de Impacto de la revista durante los últimos cinco años: 2.92. Esta revista se encuentra en la posición 36/113 (Q2) del área de estudio *Marine & Freshwater biology*.

LISTADO DE ABREVIACIONES

♀ – Hembra

♂ – Macho

€ – Euro

μl – Microlitro

% – Porcentaje

° – Grado

°C – Grado centígrado

6-FAM – 6-carboxifluoresceína

A – Adenina

Aa – *Aristeus antennatus*

A. antennatus – *Aristeus antennatus*

A. foliacea – *Aristaeomorpha foliacea*

AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism*

AMOVA – Análisis de la Varianza Molecular

ANOVA – Análisis de la Varianza

A_R – Riqueza alélica

BC – *Balearic Current*

BOE – Boletín Oficial del Estado

C – Citosina

Cat – Catalán

CL – Longitud del cefalotórax

COI – Citocromo oxidasa subunidad I

col. – Colaboradores

CSIC – Consejo Superior de Investigaciones Científicas

ddNTP – Didesoxinucleótido trifosfato

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – Desoxinucleótido trifosfato

E – Espermátóforo

EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético

En – Inglés

Es – Español

FAO – *Food and Agriculture Organization*

F_{IS} – Índice de endogamia

F_{IT} – índice de endogamia total de un individuo
Fr – Francés
 F_{ST} – Índice de fijación
G – Guanina
GFCM – *General Fisheries Commission for the Mediterranean*
GSA – *Geographical Sub-Areas*
 H_2O_{dd} – Agua purificada doble desionizada
 H_o – Heterocigosidad observada
 H_E – Heterocigosidad esperada
 H_l – Heterocigosidad observada promedio de las subpoblaciones
 H_i – Heterocigosidad de la subpoblación
 H_s – Heterocigosidad esperada promedio de la subpoblación asumiendo apareamiento aleatorio
 H_T – Heterocigosidad esperada para la población total asumiendo apareamiento aleatorio
IUCN – *International Union for Conservation of Nature*
Kg – Kilogramo
Km – Kilómetro
 Km^2 – Kilómetro cuadrado
LIW – *Levantine Intermediate Water*
MAW – *Modified Atlantic Water*
 $MgCl_2$ – Cloruro de magnesio
m – Metro
mg – Miligramo
min – Minuto
mm – Milímetro
mM – Milimolar
MOCNESS – *Multiple Opening and Closing Net with Environmental Sensor System*
MSC – *Marine Stewardship Council*
mtDNA – DNA mitocondrial
MUs – *Management Units*
 N_A – Número de alelos por *locus*
NaK – Sodio–potasio ATPasa subunidad alfa
 $NaCl_2$ – Cloruro de sodio
NC – *Northern Current*
 N_e – Tamaño efectivo de la población
ng – Nanogramo

NGS – *Next-generation sequencing*
N_m – Número efectivo de migrantes
pág. – Página
Pb – Pares de bases
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
PEPCK – Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PZI – Protozoa I
RAPD – *Randomly Amplified Polymorphic DNA*
rDNA – DNA ribosómico
RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*
ROMS – *Regional Ocean Modeling System*
rpm – Revoluciones por minuto
SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*
Sp. – Especie
SSR – *Simple Sequence Repeats*
STR – *Short Tandem Repeats*
TENS – Tris, EDTA, NaCl₂ y dodecilsulfato sódico
TipoArt – Tipologías de artes de pesca como medida de gestión
Tris – 2-amino-2-(hidroximetilo)-1,3-propanediol
U – Unidad
UdG – *Universitat de Girona*
VNTR – *Variable Number of Tandem Repeats*
WIW – *Winter Intermediate Water*
WMDW – *Western Mediterranean Deep Water*
WWF – *World Wild Foundation*

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema de la secuenciación automática de genes. Entre otros reactivos, requiere el uso de ddNTPs (didesoxinucleótidos), carentes del grupo hidroxilo en el extremo 3', por lo que no permiten la extensión de la hebra de DNA. Cada ddNTP se encuentra marcado con un fluorocromo distinto, que será detectado durante la electroforesis capilar. Finalmente, el electroferograma mostrará la secuencia del fragmento de interés. Adaptado de Shendure *et al.* (2017). _____ 11
- Figura 2.** Esquema de un ciclo de PCR que permite el aumento del número de copias de un fragmento de DNA. Las temperaturas indicadas en cada paso son las más habituales. Fuente: Propia. _____ 12
- Figura 3.** Esquema de la migración siguiendo el *Island model* (A) y el *Stepping stone model* lineal (B) y bidimensional (C). Fuente: Propia. _____ 18
- Figura 4.** Variación en la abundancia relativa de publicaciones de cada tipo de marcador genético molecular a lo largo de los años según la base de datos *ISI Web of Knowledge*. Todas las búsquedas fueron realizadas el 21 de septiembre de 2021. Fuente: Propia. ____ 22
- Figura 5.** Principales características morfológicas en un ejemplar hembra de *Aristeus antennatus*. Fuente: Propia. _____ 28
- Figura 6.** Vista ventral de la morfología de los caracteres sexuales secundarios de *Aristeus antennatus*. (A) *Thelycum* de las hembras; (B) *Petasma* masculino. Adaptado de Pérez-Farfante y Kensley (1997). _____ 29
- Figura 7.** Representación del ciclo de vida de *Aristeus antennatus*, con los principales estadios larvarios según la descripción de Heldt (1955). Adaptado de Pérez-Farfante y Kensley (1997) y de Anger (2006). _____ 33
- Figura 8.** Distribución global de *Aristeus antennatus*, según los registros existentes hasta la actualidad. Fuente: Propia. _____ 35
- Figura 9.** Mar Mediterráneo con sus principales subdivisiones. Las líneas rojas discontinuas indican las principales barreras oceanográficas de la cuenca occidental. Fuente: Propia. 36

Figura 10. Principales corrientes a nivel superficial del Mar Mediterráneo occidental (según Millot, 1999; Balbín <i>et al.</i> , 2014): Agua Atlántica Modificada (MAW), Corriente del Norte (NC) y Corriente Balear (BC). Las líneas continuas indican un flujo permanente, mientras que la línea de puntos señala fenómenos temporales. Fuente: Propia.	38
Figura 11. (A) Partes en las que se subdivide el margen continental, incluyendo un cañón submarino dentro del talud continental. Fuente: Propia. (B) Mapa batimétrico del Mar Mediterráneo noroccidental. Fuente: <i>Institut Cartogràfic i Geològic de Catalunya</i> (2010).	39
Figura 12. Esquema de la pesquería de arrastre de fondo utilizada en la gamba roja. Fuente: Propia.	42
Figura 13. Captura anual de gamba roja global (en toneladas). Los valores de capturas recogen la pesca del Mar Mediterráneo, del Norte de África y del Sur de Europa desde 1955 hasta el año 2019. Fuente: FAO (2021).	43
Figura 14. Sub-Áreas Geográficas (GSAs) en las que se divide el Mar Mediterráneo según la GFCM. Fuente: FAO (2009b).	44
Figura 15. Esquema de las tres PCRs <i>multiplex</i> más la <i>singleplex</i> para el <i>locus Aa1255</i> utilizadas para amplificar el set de doce <i>loci</i> microsatélite. Se indica el rango de tamaño de los alelos en pares de bases con el color correspondiente al fluorocromo asignado en cada <i>locus</i> (6-FAM, NET, PET o VIC).	59
Figura 16. Condiciones de las PCRs utilizadas para amplificar los <i>loci</i> microsatélite. (A) Condiciones de la <i>multiplex</i> 1. (B) Condiciones de las <i>multiplex</i> 2 y 3. (C) Condiciones de la amplificación del <i>locus Aa1255</i> .	60
Figura 17. Distribución de la asignación genética en (A) machos (Artículo 2) y (B) hembras en la localidad de Palamós durante el año 2016 (Abras <i>et al.</i> , 2022).	117
Figura 18. Origen de los individuos capturados en Palamós en verano de 2016, a partir de los resultados de los test de asignación genética. En Palamós, los porcentajes incluyen la asignación a juveniles y adultos capturados en Palamós en invierno 2016 (Figura 17). No se incluyen los porcentajes correspondientes a "Otras fuentes".	120

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Clasificación biológica de *Aristeus antennatus* (según de Grave y Fransen, 2011). 27
- Tabla 2.** Estadios del desarrollo gonadal en *Aristeus antennatus*. Fuente: Demestre y Fortuño (1992). _____ 31
- Tabla 3.** Directrices principales descritas en la Orden AAA/923/2013, de 16 de mayo (BOE, 2013), para la gestión de la gamba roja en Palamós y modificaciones aplicadas en 2018, Orden APM/532/2018, de 25 de mayo (BOE, 2018). _____ 47
- Tabla 4.** Resumen de los estudios genéticos en la gamba roja *Aristeus antennatus* publicados hasta la actualidad. COI: Citocromo c oxidasa subunidad I; AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism*; PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; NaK: sodio-potasio ATPasa subunidad alfa; SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*. _____ 48

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIACIONES _____	I
ÍNDICE DE FIGURAS _____	V
ÍNDICE DE TABLAS _____	VII
RESUM _____	1
RESUMEN _____	3
SUMMARY _____	5
INTRODUCCIÓN GENERAL _____	7
Avances en el campo de la Genética _____	8
Conceptos básicos del análisis de la Genética de poblaciones _____	13
Marcadores genéticos moleculares _____	21
La gamba roja <i>Aristeus antennatus</i> (Risso, 1816) _____	26
OBJETIVOS _____	53
MATERIAL Y MÉTODOS _____	55
Material biológico _____	55
Extracción de DNA _____	57
Loci microsatélite _____	58
Análisis de datos _____	60
RESULTADOS _____	63
Artículo 1 _____	65
Artículo 2 _____	77
Artículo 3 _____	93
DISCUSIÓN GENERAL _____	109
CONCLUSIONES _____	127
BIBLIOGRAFÍA _____	129
MATERIAL SUPLEMENTARIO _____	157
Artículo 1 _____	157
Artículo 3 _____	185

RESUM

La conservació d'una espècie explotada comercialment és fonamental per a garantir la sostenibilitat del recurs a llarg termini. Per això, la informació genètica és primordial per a la identificació d'unitats reproductivament aïllades i genèticament diferenciades.

La gamba vermella *Aristeus antennatus* (Crustacea, Decapoda), és un important recurs pesquer en la Sub Àrea Geogràfica 6 (GSA6) del Mar Mediterrani occidental. A aquesta tesi s'han analitzat, mitjançant marcadors genètics hipervariables, els set caladors més importants de la GSA6, des del *Golfo de León* fins a *Cabo de Palos*, per a conèixer la diversitat genètica, l'estructura poblacional i l'estabilitat temporal de la connectivitat genètica de la gamba vermella. Els mostrejos es van realitzar al llarg de dos anys consecutius, 2016 i 2017, a l'hivern i l'estiu.

A l'hivern, l'espècie forma agregacions d'aparellament compostes per mascles i femelles, les quals van presentar un alt nivell de connectivitat genètica, la qual cosa indica una absència de barreres geogràfiques o oceanogràfiques al flux gènic a la zona d'estudi. No obstant això, es va detectar una inestabilitat temporal significativa entre 2016 i 2017, fet que podria ser causat per un factor oceanogràfic temporal local a Blanes.

A l'estiu, la gamba vermella forma agregacions de femelles desovadores entre els 600-800 metres de profunditat. Aquestes agrupacions van presentar un elevat nivell de connectivitat genètica al llarg de la GSA6 i una estabilitat genètica temporal, que podria ser causada per una dispersió diferencial per sexes, on les femelles migrarien a més distància que els mascles, els quals ho farien als caladors més propers.

El patró de dispersió dels mascles juvenils i adults de *A. antennatus* capturats a l'hivern i estiu de 2016 en el calador de Palamós, mostra que entre el 54% i el 75% dels mascles s'originarien a Palamós, mentre que una fracció d'ells tindria el seu origen als caladors propers.

L'absència de diferenciació genètica obtinguda entre les diverses poblacions de gamba vermella al llarg de la GSA6 dona suport a considerar-la com a una única unitat de gestió de les pesqueries. Els resultats genètics obtinguts en la present tesi doctoral, tant a nivell de GSA6 com local en el calador de Palamós, s'haurien d'incorporar a qualsevol acció de millora en la gestió de la pesca de la gamba vermella.

RESUMEN

La conservación de una especie explotada comercialmente es fundamental para garantizar la sostenibilidad del recurso a largo plazo. Por ello, la información genética es primordial para la identificación de unidades reproductivamente aisladas y genéticamente diferenciadas.

La gamba roja *Aristeus antennatus* (Crustacea, Decapoda) es un importante recurso pesquero en la Sub Área Geográfica 6 (GSA6) del Mar Mediterráneo occidental. En esta tesis se han analizado mediante marcadores genéticos hipervariables, los siete caladeros más importantes de la GSA6, desde el Golfo de León hasta Cabo de Palos, para conocer la diversidad genética, la estructura poblacional y la estabilidad temporal de la conectividad genética de la gamba roja. Los muestreos se realizaron a lo largo de dos años consecutivos, 2016 y 2017, durante invierno y verano.

En invierno, la gamba roja forma agregaciones de apareamiento compuestas por machos y hembras, las cuales presentaron un alto nivel de conectividad genética, lo que indica una ausencia de barreras geográficas u oceanográficas al flujo génico en la zona de estudio. No obstante, se detectó una inestabilidad temporal significativa entre 2016 y 2017, lo que podría deberse a un factor oceanográfico temporal local en Blanes.

Durante el verano, la gamba roja forma agregaciones de hembras desovadoras entre los 600-800 metros de profundidad. Estas agrupaciones presentaron un elevado nivel de conectividad genética a lo largo de la GSA6 y una estabilidad genética temporal, lo que podría deberse a una dispersión diferencial por sexos, donde las hembras migrarían a mayor distancia que los machos, que lo harían a los caladeros más cercanos.

El patrón de dispersión de los machos juveniles y adultos de *A. antennatus* capturados en invierno y verano de 2016 en el caladero de Palamós, muestra que entre el 54% y el 75% de los machos se originarían en Palamós, mientras que una fracción de ellos tendrían su origen en caladeros cercanos.

La ausencia de diferenciación genética obtenida entre las distintas poblaciones de *A. antennatus* a lo largo de la GSA6 respalda considerarla como una única unidad de gestión de las pesquerías. Los resultados genéticos obtenidos en la presente tesis doctoral, tanto a nivel de GSA6 como local en el caladero de Palamós, deberían incorporarse en cualquier acción de mejora de la gestión de la pesca de la gamba roja.

SUMMARY

The conservation of a commercially exploited species is fundamental to ensure the long-term sustainability of the resource. Thus, genetic information is essential for the identification of reproductively isolated and genetically differentiated units.

The blue and red shrimp *Aristeus antennatus* (Crustacea, Decapoda) is an important fishery resource in the Geographical Sub-Area 6 (GSA6) of the western Mediterranean Sea. In this thesis the seven most important fishing grounds of the GSA6, from *Golfo de León* to *Cabo de Palos*, have been analysed using hypervariable genetic markers to know the genetic diversity, the population structure and the temporal stability of the blue and red shrimp genetic connectivity. Samplings were performed within two consecutive years, 2016 and 2017, during winter and summer.

In winter, the blue and red shrimp constitutes mating aggregations made up of males and females, which displayed a high level of genetic connectivity, indicating a lack of geographic or oceanographic barriers to gene flow in the studied area. Nevertheless, it was detected a significant temporal instability between 2016 and 2017, which could be due to a local temporal oceanographic factor in Blanes.

During summer, the blue and red shrimp constitutes spawning females' aggregations between 600-800 metres depth. These aggregations showed a high level of genetic connectivity along the GSA6 and a temporal genetic stability, which could be due to a sex-biased dispersal, where females would migrate further than males, which would migrate to the closest fishing grounds.

The dispersal pattern of juvenile and adult males of *A. antennatus* captured in winter and summer of 2016 at Palamós fishing ground, showed that between 54% and 75% of males would originate in Palamós, whereas part of them originated from nearby grounds.

The lack of genetic differentiation obtained between *A. antennatus* populations along the GSA6 supports considering it as a single fishery management unit. The genetic results obtained in this doctoral thesis, both at the GSA6 level and locally in the Palamós fishing ground, should be incorporated into any action carried out to improve management of the blue and red shrimp fishery.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El objetivo de esta Introducción General es proporcionar al lector un conocimiento básico de la Genética de poblaciones, incluyendo los marcadores moleculares más utilizados en el campo, así como de la especie de interés, la gamba roja *Aristeus antennatus* y la gestión de su pesquería, lo cual es necesario para la correcta comprensión de esta memoria de tesis doctoral.

La explotación de poblaciones naturales de una especie puede provocar cambios genéticos que podrían ser responsables de variaciones poblacionales, por ejemplo, produciendo un aumento de la mortalidad, variando el tamaño en el que los individuos alcanzan la madurez sexual, alterando la ratio de sexos o modificando la estructura de edades, lo que suele conllevar una disminución de la variación genética, la pérdida de adaptaciones locales, y por tanto, de la habilidad de las

poblaciones para evolucionar (Allendorf *et al.*, 2008). De hecho, la sobreexplotación de un recurso puede llegar incluso a provocar la extinción de la población explotada o de la especie en su totalidad (Allendorf *et al.*, 2008). Por ese motivo, los planes de gestión deberían incluir entre sus objetivos minimizar al máximo los cambios genéticos producidos por la pesca de la especie y, por tanto, es de gran importancia conocer el estado de salud genética de las poblaciones que sufren presión pesquera, para poder alcanzar una explotación sostenible a largo plazo (Waples y Naish, 2009). Para ello, es necesario estudiar los niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones, así como el grado de divergencia genética entre ellas (Waples y Naish, 2009).

Avances en el campo de la Genética

La aplicación de la genética en diferentes campos ha acompañado al ser humano a lo largo de su historia. Hace más de 10000 años los seres humanos primitivos aplicaban los principios de la herencia en la agricultura y en la domesticación de los animales (Zeder y Hess, 2000). No obstante, no fue hasta el siglo XIX cuando J.G. Mendel (1822-1884) estableció los principios básicos de la herencia. Siendo monje del monasterio de Brno, realizó trabajos experimentales con la planta del guisante de jardín, *Pisum sativum*, donde cruzó diferentes variedades y analizó el patrón de transmisión de los rasgos en la descendencia durante varias generaciones (Mendel, 1866). La importancia de su trabajo se reconoció 35 años más tarde, cuando H. de Bries, E. von Tschermak y K. Correns de forma independiente realizaron experimentos con otras plantas y llegaron a conclusiones similares a las obtenidas por Mendel (Sandler y Sandler, 1986).

La primera ley de Mendel es conocida como el **Principio de segregación**, y establece que en los organismos diploides los dos alelos que codifican para un carácter en concreto, controlado por un *locus*, segregan en diferentes gametos

durante la meiosis (Gayon, 2016). La segunda ley de Mendel o **Principio de la transmisión independiente** establece que los alelos de diferentes *loci* se distribuyen de forma independiente en los gametos durante la meiosis (Gayon, 2016).

De forma contemporánea a Mendel, C. Darwin y A. Wallace publicaron un artículo donde señalaban la presión ambiental como el mecanismo que actúa sobre las especies para originar nuevas especies (Darwin y Wallace, 1858). En el año 1859, Darwin publicó el libro *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*, formulando la teoría de la evolución a través de la **selección natural**, y además indicó la importancia de la herencia en la evolución de las especies (Darwin, 1859).

En el año 1902, W. Bateson conectó las leyes de Mendel con el concepto de herencia en su libro *A defence of Mendel's principles of heredity* (Bateson, 1902) y además, propuso el término **Genética** como la disciplina que estudia la herencia basada en las leyes de Mendel (Gayon, 2016).

En el año 1908, G.H. Hardy y W. Weinberg establecieron de forma independiente la relación entre las frecuencias alélicas y las frecuencias genotípicas en poblaciones, modelo conocido como el **Equilibrio de Hardy-Weinberg** (Hardy, 1908; Weinberg, 1908), el cual se convirtió en un pilar de la teoría evolutiva y de la **Genética de poblaciones**, la cual estudia la composición genética y la evolución de las poblaciones (Hallerman, 2003). En el 1915, T.H. Morgan y colaboradores publicaron el libro *The mechanism of Mendelian heredity*, donde se proporcionó una explicación al funcionamiento de las leyes de Mendel y sobre la causa de las excepciones a las mismas, gracias a relacionar la Genética Mendeliana con la teoría cromosómica (Morgan *et al.*, 1915). A principios de 1930, R.A. Fisher, S. Wright y J.B.S. Haldane unificaron matemáticamente la teoría evolutiva con la Genética Mendeliana basándose en la **selección natural**, lo que llegó a conocerse como neo-Darwinismo o síntesis moderna (Fisher, 1930; Wright, 1931, 1932; Haldane, 1932; Mayr, 1993).

Los años 1940 son considerados como el inicio de la **Genética molecular**, ya que comenzó el estudio de la organización y estructura de los propios genes, lo que finalmente dio lugar al descubrimiento de la estructura de la molécula de DNA en 1953 por J.D. Watson y F.H.C. Crick (Watson y Crick, 1953). En 1954 G. Gamow propuso el primer modelo del código genético (Gamow, 1954), el cual fue reformulado por varios autores y finalmente completado una década más tarde por R.W. Holley, H.G. Khorana, M. Nirenberg y sus colaboradores, motivo por el cual obtuvieron el premio Nobel en el año 1968 (Singer, 1968).

En el año 1968, M. Kimura estableció la **teoría neutralista de la evolución molecular** (Kimura, 1968). La teoría define la evolución neutral como un proceso en el que los alelos selectivamente neutrales se sustituyen unos por otros debido al efecto de la deriva genética bajo una presión continua de mutación, lo que explica por qué existen niveles tan altos de variación genética dentro de una especie, algo que no explicaba la selección natural (Kimura, 1983). Así, la mayoría de los cambios de bases del DNA son debido a procesos neutrales y no debido a la evolución adaptativa Darwiniana (Kimura, 1983). Por tanto, el número de alelos alternativos que se mantienen en una población a lo largo del tiempo serán determinados por el equilibrio entre la aparición de nuevas variantes por mutación y la pérdida de alelos aleatoria por deriva genética (Kimura, 1983).

Una nueva revolución científica se produjo en el año 1977 gracias al desarrollo de dos técnicas de **secuenciación de DNA**: el método químico de A.M. Maxam y W. Gilbert, y el método de didesoxi de F. Sanger. No obstante, gracias a ciertas mejoras, tales como el desarrollo del secuenciador automático de genes o el desarrollo de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), actualmente la más utilizada es la técnica de Sanger con modificaciones (**Figura 1**) (Heather y Chain, 2016; Shendure *et al.*, 2017).

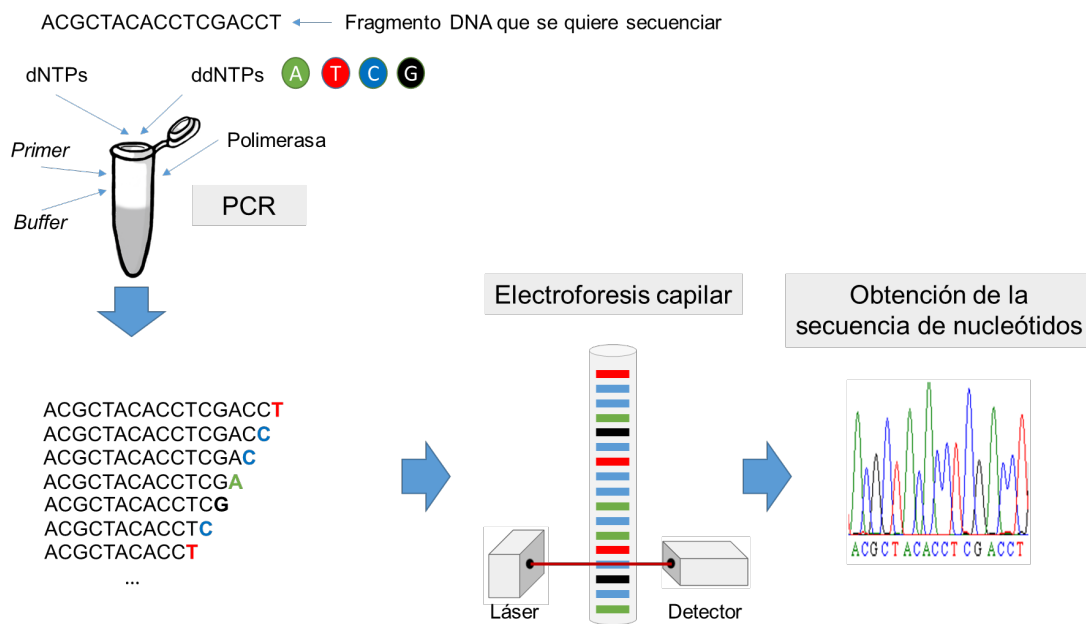


Figura 1. Esquema de la secuenciación automática de genes. Entre otros reactivos, requiere el uso de ddNTPs (didesoxinucleótidos), carentes del grupo hidroxilo en el extremo 3', por lo que no permiten la extensión de la hebra de DNA. Cada ddNTP se encuentra marcado con un fluorocromo distinto, que será detectado durante la electroforesis capilar. Finalmente, el electroferograma mostrará la secuencia del fragmento de interés. Adaptado de Shendure *et al.* (2017).

La **PCR** o reacción en cadena de la polimerasa fue desarrollada por K.B. Mullis en el 1983 y publicada dos años más tarde (Saiki *et al.*, 1985). Este descubrimiento fue de gran importancia, ya que permite amplificar exponencialmente un fragmento de DNA. El primer paso de la PCR es desnaturalizar las hebras de DNA aumentando la temperatura a unos 94-96 °C (**Figura 2**). A continuación, se disminuye la temperatura a la óptima para la hibridación de los *primers* o cebadores, que suelen tener unos 20 nucleótidos aproximadamente, a la hebra de DNA. Como los *primers* son complementarios a la zona que flanquea la región a amplificar, hibridan específicamente en esa zona. La temperatura de hibridación suele encontrarse entre los 50 a 65 °C. Finalmente, la enzima polimerasa agrega nucleótidos, el correspondiente dNTP (desoxinucleótido), a partir del extremo 3' del *primer*, complementario al DNA molde. Actualmente se dispone de distintas polimerasas, que varían según la casa comercial, por lo que la temperatura de elongación puede

cambiar, aunque suele estar en torno a los 72 °C. Durante la reacción se repite cada ciclo de desnaturalización, hibridación y elongación un número determinado de veces, de forma que en cada ciclo aumenta de forma exponencial el número de copias del fragmento de interés. Además, la polimerasa requiere como cofactor el cloruro de magnesio (MgCl₂), así como un *buffer*, que mantiene las condiciones óptimas de pH para la realización de la reacción. La PCR se lleva a cabo en un termociclador o amplificador automático de genes, que permite seleccionar la temperatura deseada en cada paso, el tiempo requerido en cada uno, y el número de ciclos (Ramesh *et al.*, 1992; Markoulatos *et al.*, 2002; Green y Sambrook, 2019).

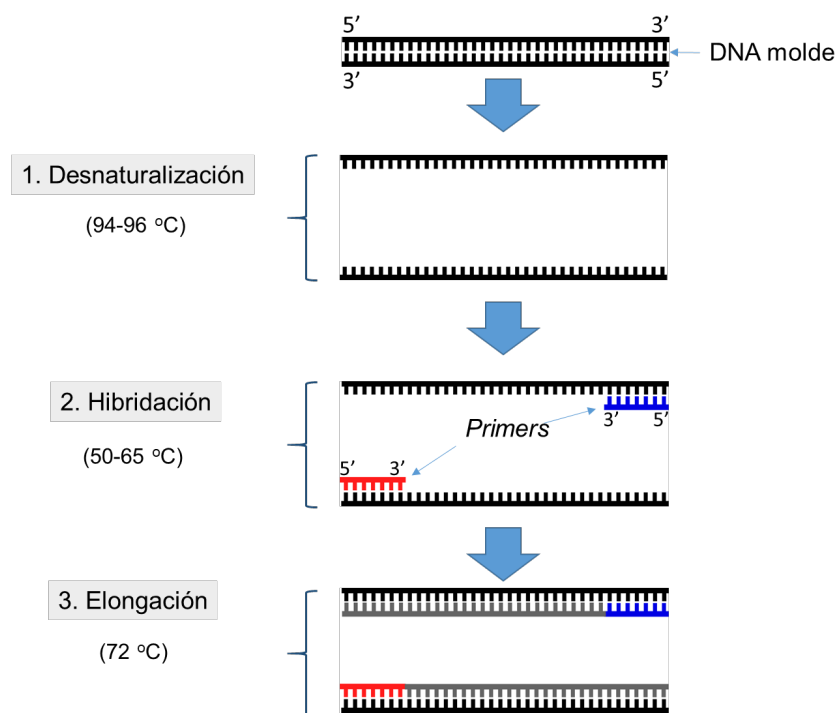


Figura 2. Esquema de un ciclo de PCR que permite el aumento del número de copias de un fragmento de DNA. Las temperaturas indicadas en cada paso son las más habituales. Fuente: Propia.

A partir del año 1990 y en el marco del Proyecto Genoma Humano se desarrollaron los equipos analizadores de genes, los ordenadores y programas de análisis de datos (Shendure *et al.*, 2017). Así, en el año 2005 se desarrolló la **secuenciación masiva**, conocida como *Next-Generation Sequencing* (NGS). La

secuenciación masiva, tal y como su nombre indica, se caracteriza por permitir la secuenciación en paralelo de múltiples fragmentos de DNA. El primer método de NGS desarrollado comercialmente fue la pirosecuenciación de 454 *Life Sciences* (adquirida posteriormente por *Roche*), pero rápidamente se añadieron otras compañías con métodos de secuenciación propios, tales como *Solexa* (adquirida por *Illumina*), *Agencourt* (adquirida por *Applied Biosystems*), *Helicos*, *Complete Genomics* o *Ion Torrent*. La gran competencia empresarial en el campo de la NGS provocó una disminución drástica del coste de la secuenciación y un gran interés en continuar mejorando estas técnicas (Shendure *et al.*, 2017). La secuenciación masiva ha permitido que la secuenciación de genomas completos aumente de forma exponencial durante los últimos años, tanto en organismos vegetales, animales, microorganismos o en el campo de la medicina (Heather y Chain, 2016; Shendure *et al.*, 2017).

Conceptos básicos del análisis de la Genética de poblaciones

Equilibrio de Hardy-Weinberg

Este modelo asume que la población debe tener un tamaño infinito y constante entre generaciones, el apareamiento de los individuos tiene que ser aleatorio, por lo que la población debe ser panmítica, y los organismos deben ser diploides y presentar reproducción sexual, sin solapamiento entre generaciones (Waples, 2015). Si una población cumple esas condiciones, y además no actúa sobre ella ninguna fuerza evolutiva, tal como la selección, la migración, la deriva genética o la mutación, se encontrará bajo el **equilibrio de Hardy-Weinberg**, lo que implica que las frecuencias genotípicas y alélicas serán constantes a lo largo de las generaciones. Una desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg será causada por la violación de una o más de estas premisas (Waples, 2015).

Si la población modelo presenta dos alelos para un único *locus*, el modelo de Hardy-Weinberg se expresa de la siguiente forma:

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

Siendo p la frecuencia del alelo más frecuente, A , y q la frecuencia del alelo menos común, a . La suma de la frecuencia de ambos alelos debe sumar 1. Por tanto, en la población se dan tres posibles genotipos: AA , Aa y aa . La frecuencia del homocigoto AA en el equilibrio de Hardy-Weinberg es p^2 , mientras que la frecuencia del homocigoto aa es q^2 , y consecuentemente la frecuencia del heterocigoto Aa es $2pq$. En cualquier caso, el modelo se puede aplicar también en *loci* con múltiples alelos, adaptando la ecuación (Waples, 2015).

Así, a partir de las frecuencias alélicas, se pueden calcular las frecuencias genotípicas esperadas bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg y mediante un test de Chi-cuadrado (χ^2) se puede conocer si una población se desvía significativamente del equilibrio (Waples, 2015).

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{Frecuencia observada} - \text{Frecuencia esperada})^2}{\text{Frecuencia esperada}}$$

Principales causas de la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg

La **selección natural** actúa cuando un rasgo adaptativo con base genética provoca que los individuos que lo presentan produzcan mayor descendencia que otros dentro de la misma población, de forma que la descendencia heredará el rasgo adaptativo (Lewens, 2010). Por tanto, los alelos asociados a una mayor eficacia biológica o *fitness* aumentarán su frecuencia alélica, pudiendo incluso alcanzar la fijación, mientras que, por el contrario, los alelos asociados con una menor eficacia disminuirán su frecuencia, pudiendo desaparecer de la población (Charlesworth, 2009).

La **deriva genética** es la variación aleatoria de las frecuencias alélicas a lo largo de las generaciones debido a eventos aleatorios en poblaciones finitas, tales como errores de muestreo (Charlesworth, 2009; Holsinger y Weir, 2009). El efecto de la fluctuación de las frecuencias alélicas conlleva la pérdida de variación genética (Kingman, 1982). Al ser una fuerza estocástica, el efecto de la deriva genética es mayor cuanto menor es el tamaño de población, mientras que en las poblaciones con un elevado número de individuos las frecuencias alélicas se mantendrán más estables (Charlesworth, 2009).

La **mutación** es la fuente de la variación genética, es el proceso a través del cual un organismo o especie adquiere cambios genéticos heredables. Es la vía de aparición de nuevos alelos y se caracteriza por ser un proceso aleatorio, normalmente causado por un error en la replicación del DNA (Lande, 1995). La mayor parte de las mutaciones son neutras, es decir, no determinísticas o, por otro lado, pueden ser perjudiciales (Charlesworth, 2009). No obstante, se debe tener en cuenta que la tasa de mutación suele ser muy pequeña y, por tanto, en estudios de poblaciones es importante desde una perspectiva a largo plazo, de cientos o miles de generaciones (Lande, 1995; Waples, 2015).

La **migración** en términos generales indica movimientos geográficos de grupos o individuos, mientras que la migración genética, en el sentido de **flujo génico**, hace referencia a movimientos de individuos de una población reproductora a otra, pero donde los individuos migrantes deben contribuir con material genético en la población receptora (Hellberg *et al.*, 2002). La principal consecuencia del flujo génico unidireccional, donde una población actúa como población fuente y la otra como población receptora, es la variación en las frecuencias alélicas de la población receptora, ya que tenderán a igualarse con las frecuencias de la población fuente por los individuos migrantes (Hallerman, 2003; Allendorf y Luikart, 2007). Al cabo de un tiempo, si no hubiera ninguna otra fuerza evolutiva actuando que contrarrestara el efecto del flujo génico, las dos poblaciones igualarán sus

frecuencias alélicas. Por tanto, el flujo génico entre poblaciones tiende a homogeneizar las frecuencias alélicas y genotípicas entre ellas (Allendorf y Luikart, 2007).

El **efecto Wahlund** se da cuando en una misma unidad de muestreo se estudia una mezcla de individuos provenientes de dos o más poblaciones genéticamente distintas entre sí, lo que provoca un aumento de la homocigosidad (Waples, 2015; Okazaki, 2021). La **endogamia**, una forma de apareamiento no aleatorio donde se aparean individuos relacionados entre sí, también se caracteriza por causar un exceso de homocigosidad (Mayo, 2008; Okazaki *et al.*, 2021). El índice de endogamia F_{IS} se puede utilizar para cuantificar un déficit o exceso de heterocigotos en una población, lo que a su vez permite conocer si la población cumple con las proporciones esperadas bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg (Waples, 2015).

Por otra parte, la deriva genética o la migración pueden provocar un desequilibrio gamético, más ampliamente conocido como **desequilibrio de ligamiento**. En una población en equilibrio gamético, los alelos en los diferentes *loci* se distribuyen de forma independiente en el conjunto de gametos producidos por la población. En cambio, cuando no se distribuyen de forma independiente, se genera un desequilibrio de ligamiento (Barton, 2000).

Principales modelos de flujo génico

A diferencia de lo que asume el Equilibrio de Hardy-Weinberg, las poblaciones reales no son infinitas, y por tanto la deriva genética puede provocar desviaciones aleatorias de las frecuencias alélicas de generación en generación. La magnitud de la variación es inversamente proporcional al **tamaño efectivo de la población**, N_e . Mientras que el flujo génico tiende a homogeneizar poblaciones, la deriva genética aumenta la diferenciación entre poblaciones (Waples, 1989).

En el **modelo panmítico** o *Panmictic model* todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse con otros miembros de la población. Este modelo asume que la especie no muestra ni preferencias ni impedimentos genéticos o de comportamiento en el apareamiento. Sin embargo, a menudo las especies en la naturaleza muestran algún grado de interacción social o medioambiental que repercute en el apareamiento. Los estudios genéticos de poblaciones naturales ayudan a conocer el grado de panmixia que presentan (Dawson y Belkhir, 2001; Allendorf y Luikart, 2007).

El **modelo de insularidad** o *Island model of populations* define a las poblaciones como unidades discretas, como si fueran islas entre las cuales se da un intercambio de individuos (**Figura 3A**). Este modelo asume que todas las poblaciones tienen el mismo tamaño poblacional, y que el flujo génico es equiprobable entre todos los pares de poblaciones. Es decir, existe la misma probabilidad de que un individuo migre de la isla A a la isla B que a cualquier otra isla. Al cabo del tiempo, la cantidad de divergencia entre poblaciones alcanzará un equilibrio si el flujo génico es elevado, por lo que las poblaciones tendrán unas frecuencias alélicas similares. Por el contrario, con una ratio baja de flujo génico, habrá una mayor diferencia en la composición genética de las diferentes poblaciones (Wright, 1931, 1943). En cualquier caso, un nivel mínimo de flujo génico, de incluso un único migrante efectivo por generación, sería suficiente para mantener las poblaciones genéticamente conectadas (Allendorf y Luikart, 2007).

En el **modelo de pasaderas** o *Stepping stone model*, las poblaciones tienen una estructura tal que la mayor parte de los inmigrantes de una población provienen de las poblaciones adyacentes, siendo la migración proveniente de poblaciones lejanas mucho menos frecuente. El modelo puede ser lineal (**Figura 3B**), bidimensional (**Figura 3C**) o tridimensional, y no asume el mismo tamaño poblacional para todas las poblaciones. Un ejemplo común del modelo lineal es la migración que se produce a lo largo de un río o la costa. En los modelos bi- y tridimensionales la

relación entre el flujo génico y la deriva genética es comparable al modelo de insularidad (Kimura, 1953; Kimura y Weiss, 1964; Slatkin, 1993). Este modelo se encuentra incluido dentro del **modelo de Aislamiento por distancia** o *Isolation-by-distance model*, el cual asume que las poblaciones se encuentran uniformemente repartidas de forma contigua, y donde la diferenciación genética entre las poblaciones aumenta con la distancia geográfica entre ellas (Slatkin, 1993).

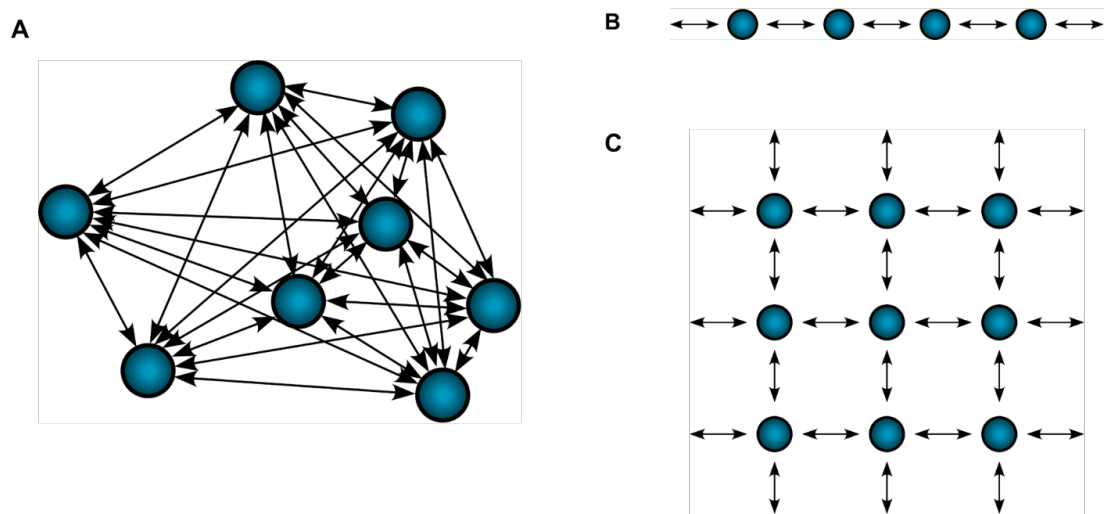


Figura 3. Esquema de la migración siguiendo el *Island model* (A) y el *Stepping stone model* lineal (B) y bidimensional (C). Fuente: Propia.

Estadísticos *F* de Wright

Estudiar la subdivisión en distintas unidades o poblaciones genéticamente diferentes entre sí es importante, tanto para la gestión de los recursos naturales como para la conservación de las especies (Ryman y Utter, 1987). Existen diferentes métodos a la hora de cuantificar la variación genética de poblaciones subdivididas, siendo uno de los más comunes los **estadísticos *F* de Wright** (Ryman y Utter, 1987).

S. Wright desarrolló los estadísticos *F* como una herramienta que permitía describir los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y entre poblaciones, basándose en la variación de las frecuencias alélicas, así como en los

niveles de heterocigosidad esperados. Se desarrollaron para un *locus* con dos alelos (Wright, 1951, 1969, 1978). Así, una población se puede dividir en 3 niveles jerárquicos: individuos (I), subpoblaciones (S) y la población total (T). Una subpoblación se puede definir como un grupo de individuos que constituyen una unidad reproductiva, esto es, un grupo de individuos con apareamiento aleatorio (Ryman y Utter, 1987). M. Nei (1973) estableció una fórmula para múltiples alelos, donde H_I representa la heterocigosidad observada promedio de las subpoblaciones, mientras que H_i hace referencia a la heterocigosidad de la subpoblación i . En este caso, para k subpoblaciones se da que:

$$H_I = \sum_{i=1}^k H_i/k$$

Se puede calcular la heterocigosidad esperada bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg, H_S , en la subpoblación s , teniendo en cuenta que p_i es la frecuencia del alelo i en la subpoblación s :

$$H_S = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

También se puede calcular la heterocigosidad esperada si la población total en conjunto estuviera bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg, H_T , siendo \bar{p}_i el promedio de la frecuencia del alelo i a lo largo de las subpoblaciones:

$$H_T = 1 - \sum_{i=1}^K \bar{p}_i^2$$

El índice de endogamia F_{IS} permite calcular la reducción en la heterocigosidad de un individuo debido a la presencia de apareamiento no aleatorio dentro de la subpoblación. Es decir, calcula la endogamia de un individuo (I) en relación a subpoblación a la que pertenece (S), siendo \bar{H}_S el promedio H_S :

$$F_{IS} = \frac{\bar{H}_S - H_I}{\bar{H}_S}$$

El índice de fijación, F_{ST} , mide los efectos de la subdivisión de una población, representando la pérdida de heterocigosidad de una subpoblación debido a la deriva genética. Es decir, calcula la endogamia de las subpoblaciones (S) en relación con la población total (T), siendo:

$$F_{ST} = \frac{H_T - \bar{H}_S}{H_T}$$

Cabe mencionar que en una población donde todas las subpoblaciones presentan las mismas frecuencias alélicas y se encuentran bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg, $F_{ST} = 0$.

El índice de endogamia total de un individuo, F_{IT} , estima la reducción de heterocigosidad de un individuo, esto es, la endogamia del individuo I en relación a la población total (T) (Hartl y Clark, 1989):

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T}$$

La relación matemática entre los estadísticos F es la siguiente (Holsinger y Weir, 2009):

$$(1 - F_{IS})(1 - F_{ST}) = (1 - F_{IT})$$

Los estadísticos F_{IS} , F_{ST} y F_{IT} son equivalentes a los parámetros previamente definidos por Weir y Cockerham (1984) F , θ y f , respectivamente.

Marcadores genéticos moleculares

Durante las últimas décadas, la aparición de nuevas técnicas moleculares, métodos estadísticos y programas de ordenador ha permitido que la utilidad de las herramientas genéticas se haya incrementado notablemente (Allendorf y Luikart, 2007; Al-Samarai y Al-Kazaz, 2015). Los **marcadores moleculares** se definen como secuencias de DNA o proteínas polimórficas que se pueden utilizar como indicadores de variación genética (Al-Samarai y Al-Kazaz, 2015). Dentro de las posibles aplicaciones de los marcadores moleculares en la Biología de la conservación, destaca su uso en estudios forenses sobre fauna salvaje y especies en peligro de extinción, estudios filogeográficos de organismos marinos, estimaciones del tamaño de las poblaciones o incluso estudios de la base genética de las adaptaciones a los cambios ambientales (Allendorf y Luikart, 2007). Actualmente existe una amplia variedad de marcadores moleculares, cada uno con diferentes ventajas y desventajas. La **Figura 4** muestra la abundancia relativa de publicaciones en la base de datos *ISI Web of Knowledge*, de cada tipo de marcador molecular a lo largo de los años. Los tópicos de búsqueda han sido: (*allozyme or allozymes or alloenzyme or alloenzymes or "allelic variants of enzymes"*); (*RFLP or RFLPs or "restriction fragment length polymorphism"*); (*minisatellite or minisatellites*); (*microsatellite or microsatellites or "simple sequence repeat" or "simple sequence repeats" or "short tandem repeat" or "short tandem repeats"*); (*DNA sequencing not "next generation sequencing" not "second generation sequencing" not "third generation sequencing"*); (*RAPD or RAPDs or "randomly amplified polymorphic DNA"*); (*AFLPs or "amplified fragment length polymorphism" or "amplified fragment length polymorphisms"*) y (*"single nucleotide polymorphism" or "single nucleotide polymorphisms"*).

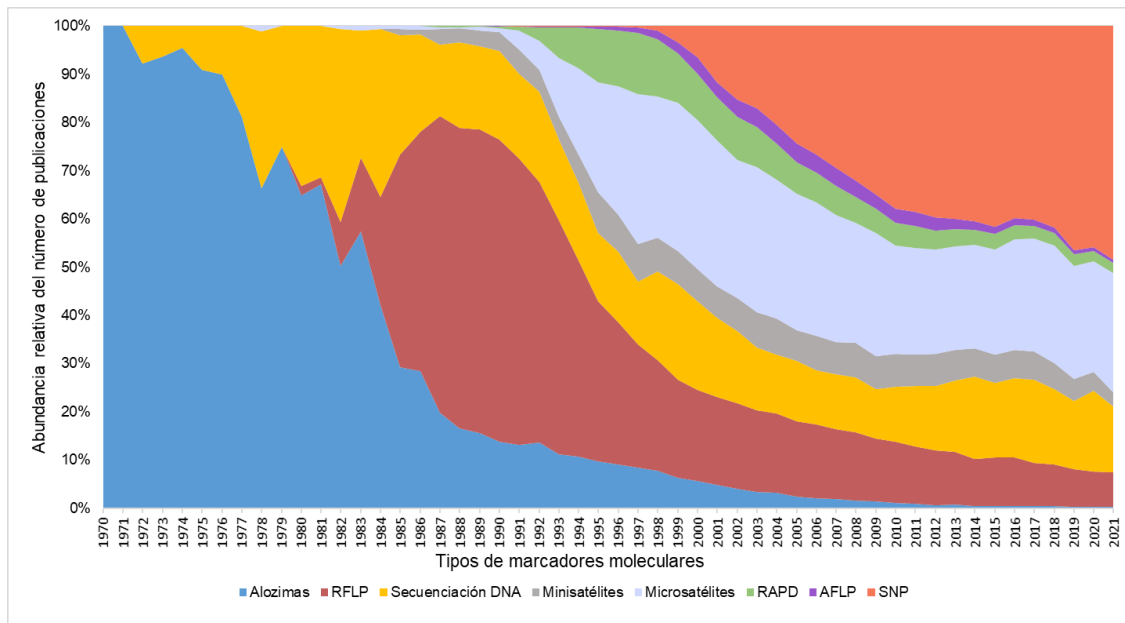


Figura 4. Variación en la abundancia relativa de publicaciones de cada tipo de marcador genético molecular a lo largo de los años según la base de datos *ISI Web of Knowledge*. Todas las búsquedas fueron realizadas el 21 de septiembre de 2021. Fuente: Propia.

El primer tipo de marcador molecular ampliamente utilizado en los estudios de genética de poblaciones fueron las **alozimas**, desarrolladas en el año 1966 (Harris 1966; Hubby y Lewontin 1966; Lewontin y Hubby, 1966; Parker *et al.*, 1998) (**Figura 4**). El término alozimas hace referencia a las diferentes formas genéticas de una enzima que se codifican en el mismo *locus* (Buth, 1984; Parker *et al.*, 1998). Entre las ventajas de las alozimas se puede destacar que son codominantes, es decir, en individuos heterocigotos se expresan ambos alelos, y además es una técnica relativamente sencilla y económica, en la que la lectura de genotipos se obtiene de forma rápida (Shaklee y Bentzen, 1998; Parker *et al.*, 1998; Al-Samarai y Al-Kazaz, 2015). Por otra parte, presentan algunas desventajas, como que se analiza el genoma indirectamente, ya que se estudia el producto del gen y no el gen, por lo que, debido a la redundancia del código genético, las sustituciones de nucleótidos que den lugar al mismo aminoácido no aportan variabilidad (Shaklee y Bentzen, 1998). Asimismo, los genes que codifican proteínas representan una pequeña proporción del genoma total de un organismo y muchas enzimas se expresan en

un único o unos pocos tejidos del organismo (Shaklee y Bentzen, 1998). Por último, la heterocigosidad observada promedio para los *loci* polimórficos es bastante baja, ya que no suele sobrepasar un valor de 0.1 (Buth, 1984; Shaklee y Bentzen, 1998; Parker *et al.*, 1998; Al-Samarai y Al-Kazaz, 2015). Entre sus aplicaciones, destaca su uso para el análisis de estructura de poblaciones o estudios forenses de identificación de especies (Shaklee y Bentzen, 1998; Al-Samarai y Al-Kazaz, 2015).

Los **RFLPs** (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) son fragmentos de restricción de diferente longitud producidos por una endonucleasa de restricción específica, como por ejemplo la *EcoRI* (**Figura 4**) (Narayanan, 1991; Shaklee y Bentzen, 1998). El polimorfismo puede ser causado por la pérdida o ganancia de un sitio de restricción o como resultado de una inserción o delección de un fragmento de DNA entre dos sitios de restricción conservados (Al-Samarai y Al-Kazaz, 2015). Una desventaja de estudiar la variabilidad mediante los RFLPs es que los fragmentos de restricción de tamaño muy pequeño no son detectables, por lo que se pierde variabilidad (Parker *et al.*, 1998). Son utilizados principalmente en estudios de DNA mitocondrial, pero también se pueden aplicar en DNA nuclear (Moritz *et al.*, 1987; Parker *et al.*, 1998; Shaklee y Bentzen, 1998).

La **secuenciación de DNA** es una técnica utilizada tanto en DNA nuclear como mitocondrial (**Figura 4**). El DNA mitocondrial o mtDNA es aquel DNA presente en las mitocondrias de células eucariotas, utilizado como marcador a partir de los años 1970 (Awise *et al.*, 1979a, 1979b; Brown, 1979). Suele presentar herencia materna y es considerado selectivamente neutro ya que no hay recombinación (Awise *et al.*, 1988; Al-Samarai y Al-Kazaz, 2015). Así, los marcadores mitocondriales son especialmente útiles en estudios filogenéticos, filogeográficos y en estudios de genética de poblaciones (Shaklee y Bentzen, 1998).

Los **VNTRs** (*Variable Number of Tandem Repeats*) son unidades de una secuencia de DNA que se repite en tándem y se encuentran dispersas a lo largo del genoma de un organismo. Dentro de los VNTRs se encuentran los minisatélites y los

microsatélites. La principal diferencia entre ambos tipos de marcadores radica en el motivo de repetición, ya que en los minisatélites es de entre 9 y 65 pb, mientras que en los microsatélites es de entre 2 a 6 pb (Parker *et al.*, 1998; Guichoux *et al.*, 2011). Los **minisatélites** fueron descubiertos por A. Jeffreys *et al.* (1985), al observar repeticiones en tándem dispersas por el genoma humano. La variación alélica en el número de repeticiones permitió su uso como marcadores moleculares (**Figura 4**) (Guichoux *et al.*, 2011). Además, son útiles en estudios forenses de DNA (Shaklee y Bentzen, 1998). Los marcadores **microsatélite**, descubiertos en la década de los 80, prácticamente han reemplazado al uso de minisatélites (**Figura 4**) (Shaklee y Bentzen, 1998). Los distintos alelos de un *locus* microsatélite dependen de la variación en el número de repeticiones en tándem de su motivo de repetición. Por ejemplo, un alelo con la siguiente secuencia de nucleótidos: AGCAGCAGC, tendría el motivo de repetición AGC repetido tres veces. Por ese motivo, son conocidos como **SSRs** por las siglas en inglés (*simple sequence repeats*) o como **STRs**, *short tandem repeats*. Entre sus características, destaca el hecho de que son codominantes y, debido a su alta tasa de mutación, son marcadores altamente polimórficos (Squirell *et al.*, 2003). La desventaja que presentan es el elevado coste de desarrollo. Sin embargo, la amplificación de varios *loci* microsatélite en la misma reacción PCR mediante una PCR *multiplex* ha supuesto una notable mejora en el uso de estos marcadores, ya que ha reducido el tiempo y coste económico necesario para desarrollarlos (Guichoux *et al.*, 2011). El uso de los marcadores microsatélite ha ido en aumento desde la década de los 80, siendo ampliamente utilizados en estudios forenses, análisis de parentesco, mapeo genético, ecología molecular, análisis de estructura poblacional o estudios de conservación (Guichoux *et al.*, 2011).

Los **RAPDs** (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) se empezaron a utilizar en 1990 (**Figura 4**) (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). La técnica consiste en utilizar cebadores de unos 10 nucleótidos con secuencia aleatoria durante una PCR y los fragmentos amplificados se analizan mediante electroforesis en gel de

agarosa. La ventaja con respecto a otras técnicas es que no requiere conocer la secuencia de DNA a la hora de diseñar los cebadores. No obstante, presentan varios problemas, como la generación de artefactos durante la reacción de PCR o la baja reproducibilidad de los resultados. Han sido utilizados en estudios de identificación de especies, filogenéticos y análisis de paternidad (Parker *et al.*, 1998).

En 1995 se desarrollaron los **AFLPs** (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) (Figura 4). Estos marcadores usan enzimas de restricción y unos adaptadores que permiten la amplificación de los fragmentos. Tienen la ventaja de no necesitar un conocimiento previo del DNA de la especie de estudio y sus resultados son más reproducibles que los obtenidos con los RAPDs. Sin embargo, al ser marcadores dominantes no permiten diferenciar entre heterocigotos y homocigotos. Se han utilizado especialmente en estudios de estructura poblacional y análisis de parentesco (Vos *et al.*, 1995; Mueller y Wolfenbarger, 1999).

Por último, los **SNPs** (*Single Nucleotide Polymorphisms*) o sustituciones de un único nucleótido (Figura 4) se pueden identificar mediante una amplia variedad de métodos tales como la pirosecuenciación, *real-time* PCR y *microarrays*, descritos en Kwok y Chen (2003). Con una gran disponibilidad de bases de datos de secuencias y de secuencias genómicas, el desarrollo de los SNPs puede ser relativamente rápido. Además, entre sus ventajas destaca la elevada diversidad alélica que presentan, así como su elevada abundancia en el genoma, ya que se ha estimado que existe un SNP cada 100-300 pb (Guichoux *et al.*, 2011). Entre otras aplicaciones, destaca su uso en estudios poblacionales o estudios de mapeo genómico (Helyar *et al.*, 2011).

La gamba roja *Aristeus antennatus* (Risso, 1816)

Clasificación biológica

La especie objetivo de la presente tesis doctoral es *Aristeus antennatus*, conocida comúnmente como gamba roja (Es), *gamba vermella* o *gamba rosada* (Cat), *blue and red shrimp* (En), *crevette rouge* (Fr) (Holthuis, 1980) debido a su característico color rosado nacarado, que se intercala con un tono violáceo en el caparazón y alrededor de las articulaciones de los segmentos abdominales (Fischer *et al.*, 1981). Fue descrita en el año 1816 por A. Risso en el Mar Ligur (Risso, 1816) y es un crustáceo decápodo marino perteneciente a la Superfamilia Penaeoidea y a la familia Aristaeidae (**Tabla 1**) (de Grave y Fransen, 2011). La gamba roja es uno de los principales recursos pesqueros del Mar Mediterráneo occidental y central, especialmente en las costas españolas e italianas, donde es muy apreciada por sus características culinarias (Gorelli *et al.*, 2014).

La gamba roja tiene el cuerpo comprimido lateralmente y un abdomen de mayor longitud que el cefalotórax, el cual es liso y sin espina hepática (**Figura 5**). Presenta seis segmentos abdominales, con la parte posterior acabada en un diente, más afilado en los tres últimos segmentos. Una característica propia de la especie es que el rostro tiene tres dientes o espinas en su parte dorsal, mientras que no tiene ninguno en la parte ventral del mismo. El telson se encuentra comprimido lateralmente, siendo largo, fino y acabado en punta (Fischer *et al.*, 1981).

Tabla 1. Clasificación biológica de *Aristeus antennatus* (según de Grave y Fransen, 2011).

Filum Arthropoda

Subfilum Crustacea

Clase Malacostraca

Subclase Eumalacostraca

Superorden Eucarida (Calman 1904)

Orden Decapoda

Suborden Dendrobranchiata (Bate, 1888)

Superfamilia Sergestoidea (Dana, 1852)

Superfamilia Penaeoidea (Rafinesque, 1815)

Familia Aristeidae (Wood-Mason y Alcock, 1891)

Género *Aristaeomorpha* (Wood-Mason y Alcock, 1891)

Género *Aristaeopsis* (Wood-Mason y Alcock, 1891)

Género *Aristeus* (Duvernoy, 1840)

Aristeus alcocki (Ramadan, 1938)

***Aristeus antennatus* (Risso, 1816)**

Aristeus antillensis (Milne-Edwards y Bouvier, 1909)

Aristeus mabahissae (Ramadan, 1938)

Aristeus pallidicauda (Komai, 1993)

Aristeus semidentatus (Bate, 1881)

Aristeus varidens (Holthuis, 1952)

Aristeus virilis (Bate, 1881)

Género *Austropenaeus* (Pérez Farfante y Kensley, 1997)

Género *Hemipenaeus* (Bate, 1881)

Género *Hepomadus* (Bate, 1881)

Género *Parahepomadus* (Crosnier, 1978)

Género *Plesiopenaeus* (Bate, 1881)

Género *Pseudaristeus* (Crosnier, 1978)

Familia Benthescymidae (Wood-Mason y Alcock, 1891)

Familia Penaeidae (Rafinesque, 1815)

Familia Sicyoniidae (Ortmann, 1898)

Familia Solenoceridae (Wood-Mason y Alcock, 1891)

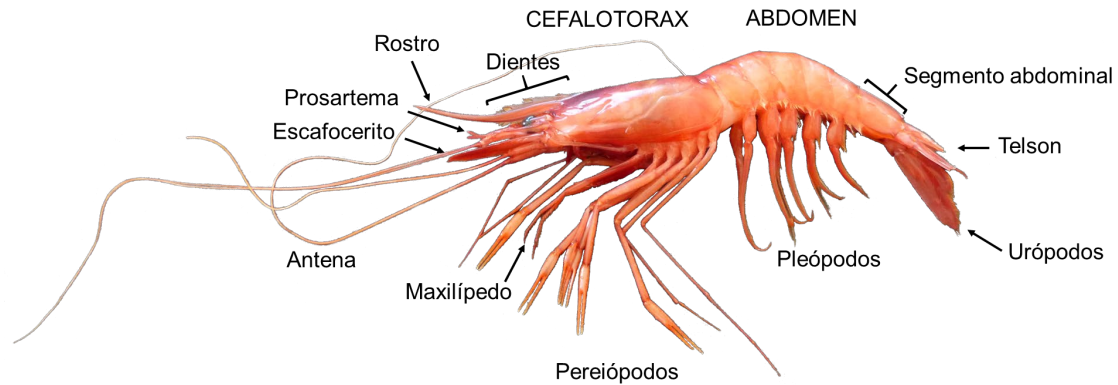


Figura 5. Principales características morfológicas en un ejemplar hembra de *Aristeus antennatus*.
Fuente: Propia.

Características biológicas de la gamba roja

La gamba roja presenta un claro **dimorfismo sexual**, donde los machos se caracterizan por tener un menor tamaño que las hembras (Deval y Kapiris, 2016). Así, el largo de cefalotórax (CL) de los machos va desde 15 hasta 37 mm, mientras que las hembras presentan un rango de entre 15 a 63 mm CL. El rostro es largo y con forma de estilete en hembras y juveniles, mientras que los machos sufren una reducción del rostro al llegar a la madurez sexual, sin sobrepasar el escafocerito antenal (Demestre y Fortuño, 1992). No hay certeza sobre el tiempo de vida máximo que alcanza la gamba roja, pero se cree que las hembras viven de cuatro o cinco años y los machos entre tres y cuatro años (Demestre, 1990; Demestre y Lleonart, 1993).

Mediante la observación de los caracteres sexuales secundarios y la posición y morfología de las gónadas, se puede **determinar el sexo** en la gamba roja (Demestre y Fortuño, 1992). *A. antennatus* presenta una reproducción externa, donde las hembras se caracterizan por tener un *thelycum* abierto, sin receptáculo seminal (**Figura 6A**). Por ese motivo, la morfología del *thelycum* se encuentra adaptada para permitir el anclaje del espermatóforo, que es el saco de semen que el macho

deposita en la hembra y en cuyo interior se encuentran los espermatozoides (Demestre y Fortuño, 1992).

Los machos presentan una modificación laminar en cada endópodo del primer par de pleópodos, un repliegue laminar que forma el hemipetasma. En individuos inmaduros o juveniles, los dos hemipetasma se encuentran separados. En cambio, los machos son maduros sexualmente cuando presentan el petasma, que se obtiene de la fusión de los dos hemipetasma (**Figura 6B**). Asimismo, el apéndice masculino se localiza en el segundo par de pleópodos, donde la base del *flagellum* del endópodo se encuentra modificado, formando un lóbulo triangular en los machos sexualmente maduros. En cuanto al gonoporo, en hembras se encuentra en el *coxae* del tercer par de pereiópodos y en machos en el quinto par de pereiópodos (Demestre y Fortuño, 1992).

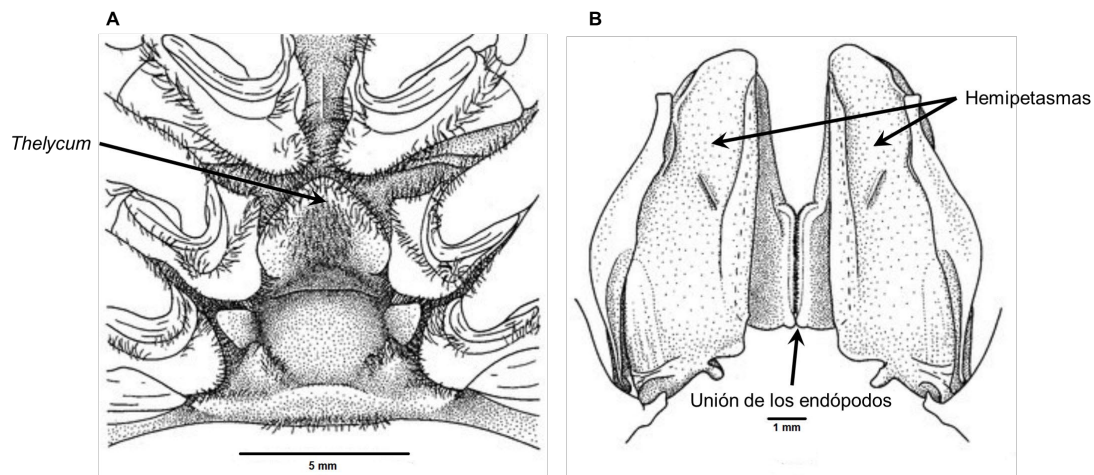


Figura 6. Vista ventral de la morfología de los caracteres sexuales secundarios de *Aristeus antennatus*. **(A)** *Thelycum* de las hembras; **(B)** Petasma masculino. Adaptado de Pérez-Farfante y Kensley (1997).

El número de mudas anuales varía en función del tamaño del individuo. Los individuos de menor tamaño (CL menor a 23 mm) mudan cuatro veces al año, los de tamaño mediano mudan tres veces al año (24-43 mm CL) y los de tamaño grande (CL mayor de 43 mm) únicamente dos veces (Sardà y Demestre, 1987).

La gamba roja habita desde los 80 hasta cerca de los 3000 metros de profundidad, lo que la hace la especie más euribática del Mar Mediterráneo (Campillo, 1994; Sardà *et al.*, 2004a). Se han descrito tres **franjas de profundidad** en las que la abundancia total y la proporción de sexos varía perceptiblemente: i) profundidades menores a 1000 metros, ii) entre 1000 y 1500 metros y iii) a partir de 1500 metros. La mayor abundancia de individuos se da en profundidades menores a 1000 metros, superándose los 1000 individuos/km². En este rango de profundidades, de 80 a 1000 metros, donde la gamba roja es explotada comercialmente, la distribución de individuos y la ratio de sexos varían a lo largo del año, aunque las hembras adultas son predominantes durante la mayor parte del año (componen en torno al 70% de individuos) (Sardà *et al.*, 2003). En profundidades entre 1000 y 1500 metros, las poblaciones de gamba roja son estables a lo largo del año, con una ratio de sexos de aproximadamente 1:1, abundancia de juveniles y una densidad que va disminuyendo con la profundidad hasta los 300 individuos/km² (Sardà *et al.*, 1994; Sardà *et al.*, 2004a). Por último, la menor abundancia de gamba roja se encuentra a partir de los 1500 m con un valor inferior a 50 individuos/km², predominando machos y juveniles (Sardà *et al.*, 2004a).

La gamba roja presenta **reproducción sexual** y la talla de la primera madurez oscila en torno a los 23 y 25 mm CL. Los machos mantienen el estado de madurez durante todo el año, mientras que las hembras presentan una actividad funcional del ovario desde mayo hasta septiembre (Sardà y Demestre, 1987; Deval y Kapiris, 2016). A principios de mayo comienza la fase de previtelogénesis, correspondiente al estadio III (**Tabla 2**) (Demestre y Fortuño, 1992) en las hembras de mayor tamaño, mientras que las de menor tamaño inician su maduración durante el mes de junio (Sardà y Demestre, 1987). Algunos autores consideran que las hembras de talla mediana y grande realizan varias puestas en un mismo periodo reproductivo, mientras que las de menor tamaño realizarían únicamente una puesta, por lo que las de mayor tamaño liberarían una mayor cantidad de huevos (Sardà y Demestre, 1987; Kapiris y Thessalou-Legaki, 2009).

Tabla 2. Estadios del desarrollo gonadal en *Aristeus antennatus*. Fuente: Demestre y Fortuño (1992).

Estadios sexuales	Machos	Hembras
Estadio I	Inmaduro (juvenil). Testes translúcidos, extremadamente finos, vasos deferentes blanquecinos y translúcidos, apariencia filiforme.	Inmaduro (juvenil). Ovario translúcido y fino.
Estadio II	Inmaduro (juvenil). Testes blancos y opacos, vasos deferentes blanquecinos con apariencia tubular, sin hemiespermatóforo en la ampolla terminal. Hemipetasma separados.	Inmaduro (juvenil) o en reposo (adulto). Ovario blanquecino y opaco, con apariencia tubular.
Estadio III	Maduro (adulto). Misma apariencia que en el estadio II, pero con ampolla terminal. Hemipetasma unidos.	Inicio de maduración (adulto). Ovario rosado-anaranjado.
Estadio IV	-	Maduración (adulto). Ovario lila claro, turgente y con apariencia protuberante.
Estadio V	-	Maduración avanzada (adulto). Ovario lila, muy turgente, ocupando una gran parte del cefalotórax.
Estadio VI	-	Puesta (adulto). Ovario púrpura, muy turgente, ocupando por completo la zona dorsal del cefalotórax.
Estadio VII	-	Post-puesta (adulto). Ovario blanquecino con trazas lilas, disminución rápida del volumen, muy flácido.

Durante el apareamiento, los machos maduros liberan el hemiespermatóforo de cada ampolla terminal a través del gonoporo mediante contracciones musculares (Demestre y Fortuño, 1992). Los hemiespermatóforos se fusionan para formar el espermatóforo en el *thelycum* de la hembra (Demestre y Fortuño, 1992).

A. antennatus realiza **desplazamientos** considerables a lo largo de la columna de agua, principalmente relacionados con el periodo reproductivo (Sardà *et al.*, 2003). La gamba roja presenta una reproducción estacional, ya que su periodo reproductivo abarca desde mayo hasta septiembre (Deval y Kapiris, 2016). El apareamiento o cópula, momento en el cual los machos colocan el espermatóforo en el *thelycum* de las hembras, se produce desde finales de invierno hasta la primavera, principalmente en los meses de marzo y abril (Kapiris y Thessalou-Legaki, 2009). No obstante, el mes de marzo es el único en el que la ratio de hembras y machos es de 1:1 en el talud continental medio (Carbonell *et al.*, 1999). Tras el apareamiento, los machos vuelven a mayores profundidades. Cabe destacar que, a pesar de que el apareamiento se produzca en ese momento, las hembras no son maduras sexualmente, sino que llevan el espermatóforo durante unos dos meses, hasta que alcanzan la madurez sexual y pueden iniciar la puesta aún en ausencia de machos (Kapiris y Thessalou-Legaki, 2009). De hecho, se ha indicado que el apareamiento induce la vitelogénesis de las hembras (Kapiris y Thessalou-Legaki, 2009). Durante el pico reproductivo de la especie, desde junio hasta agosto, se forman agregaciones de hembras desovadoras entre los 600 y 800 metros de profundidad (Kapiris y Thessalou-Legaki, 2009).

Una aproximación al **ciclo de vida** de *A. antennatus* fue descrito por J.H. Heldt en el año 1955, a partir de ejemplares obtenidos al sur de Mallorca, en el Mar Mediterráneo noroccidental (Heldt, 1955). *A. antennatus* presenta un ciclo de vida complejo, con diversos estadios larvarios antes de alcanzar el estadio adulto (**Figura 7**). En decápodos, los principales estadios larvarios se conocen como naupli, zoea (que incluye los estadios protozoea y mysis) y finalmente la post larva, conocida

también como *decapodid*. Los juveniles se asemejan a los adultos, ya que suelen tener las mismas características morfológicas y fisiológicas que estos, aunque poco desarrolladas. Durante el crecimiento y maduración finaliza su desarrollo (Anger, 2006). En *A. antennatus* el ciclo de vida propuesto por J.H. Heldt (1955) incluye la fase de huevo, naupli, tres estadios de protozoa, tres estadios mysis y los post larva. Actualmente, en *A. antennatus* solamente se han encontrado los estadios protozoa I, II y III y los mysis I y II (Seridji, 1971; Dos Santos, 1998; Carbonell *et al.*, 2010, Landeira, 2010; Torres *et al.*, 2013; Carreton *et al.*, 2019; Carreton *et al.*, 2021). En todos los estudios, las formas larvarias de vida pelágica fueron encontradas en las aguas superficiales, sin embargo, Carreton *et al.* (2021) además encontraron individuos en estadio protozoa I (PZI) a lo largo de la columna del agua, hasta una profundidad de 755 metros.

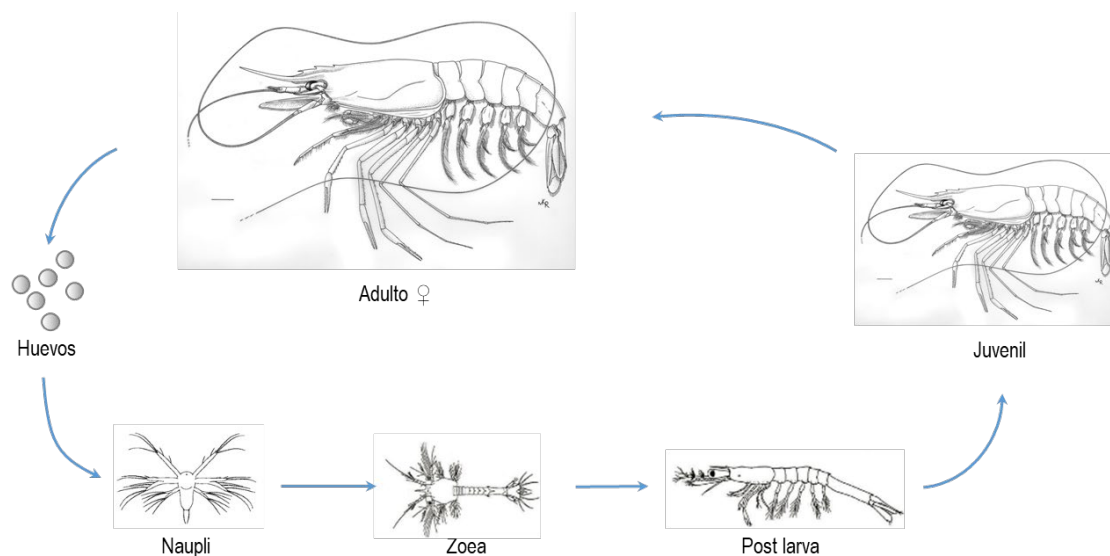


Figura 7. Representación del ciclo de vida de *Aristeus antennatus*, con los principales estadios larvarios según la descripción de Heldt (1955). Adaptado de Pérez-Farfante y Kensley (1997) y de Anger (2006).

Las hembras realizan la puesta entre los 600 y 800 metros de profundidad, y dado que todas las larvas se han encontrado cerca de la superficie, se estableció la

hipótesis de que los primeros estadios larvarios realizan una migración hasta las aguas superficiales y es allí donde se desarrollan (Carbonell *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta los últimos estudios, la migración hacia la superficie podría realizarse durante el estadio protozoa I, lo que explicaría por qué es el único estadio que se encontró a diferentes profundidades de la columna de agua (Carreton *et al.*, 2021). Por otra parte, una vez alcanzan el estadio post larva o juvenil, migran hacia aguas profundas, ya que los juveniles se encuentran principalmente a partir de 1000 metros de profundidad (Sardà *et al.*, 2004a). Finalmente, al alcanzar el estadio adulto, los machos permanecen principalmente a esa profundidad, mientras que las hembras migran hacia profundidades menores (Sardà *et al.*, 2004b; Sardà y Company, 2012).

La **distribución geográfica** de la gamba roja *Aristeus antennatus* incluye el Mar Mediterráneo, el Océano Índico y el Océano Atlántico (**Figura 8**). Principalmente se encuentra en el Mar Mediterráneo, con una mayor abundancia en la cuenca occidental que en la oriental (Holthuis, 1980; FAO, 2020). En el Océano Índico se localiza en el canal de Mozambique desde Zanzíbar, en Tanzania, hasta Natal en Sudáfrica (de Freitas, 1985). En el Océano Atlántico oriental se encuentra desde Lisboa hasta el estrecho de Gibraltar, además de algunas localizaciones puntuales en las Islas Canarias y de Cabo Verde (Holthuis, 1980). En el Océano Atlántico occidental se indicó su presencia en las provincias de Bahia y Espírito Santo de Brasil (Serejo *et al.*, 2007). No obstante, su presencia se ha puesto en duda recientemente en un estudio que analizó la pesquería de arrastre de fondo de gambas aristeideas en Brasil, entre 2002 y 2007, donde *Aristeus antennatus* no se encontraba entre las especies capturadas (Dallagnolo *et al.*, 2009).

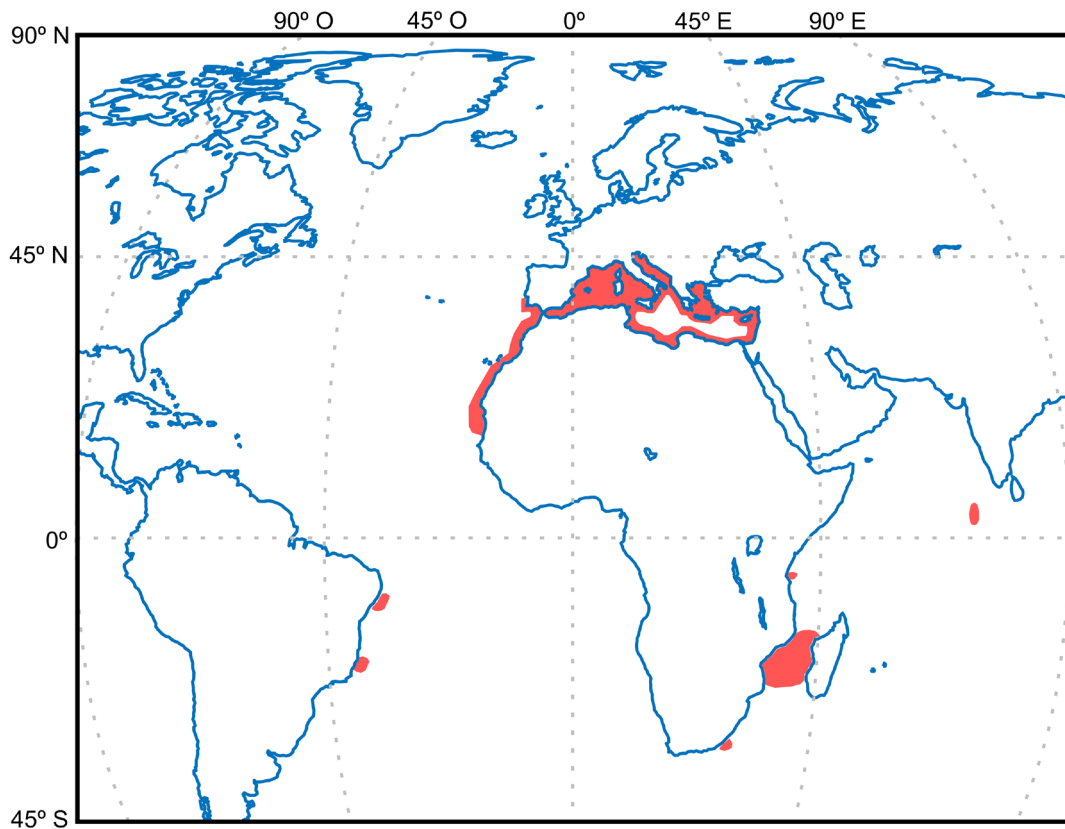


Figura 8. Distribución global de *Aristeus antennatus*, según los registros existentes hasta la actualidad. Fuente: Propia.

Características del Mar Mediterráneo

La gamba roja se distribuye principalmente en el **Mar Mediterráneo** occidental donde es intensamente explotada. A continuación, se describen las principales características geográficas incluyendo las corrientes oceanográficas, los cañones submarinos, así como la importancia de las potenciales barreras al flujo génico entre las poblaciones de gamba roja.

El Mar Mediterráneo se caracteriza por encontrarse casi completamente cerrado (**Figura 9**). Conecta con el Océano Atlántico a través del estrecho de Gibraltar (con 15 km de ancho y una profundidad máxima de 350 m) (Griffiths *et al.*, 2007; Bensch *et al.*, 2009). La profundidad máxima supera los 5000 metros y se encuentra al sur de Grecia (Bensch *et al.*, 2009). El Estrecho de Sicilia separa la cuenca occidental del

Mar Mediterráneo de la cuenca oriental, en la zona entre la isla de Sicilia y Túnez, donde la profundidad alcanza los 316 metros (Millot, 1999). Las principales barreras oceanográficas en la cuenca occidental al flujo génico entre poblaciones, ya sea debido a la estructura geológica, a las corrientes oceanográficas o ambas, son el Canal de Ibiza y el Frente Almería-Orán (**Figura 9**) (Millot, 1999; Balbín *et al.*, 2014).

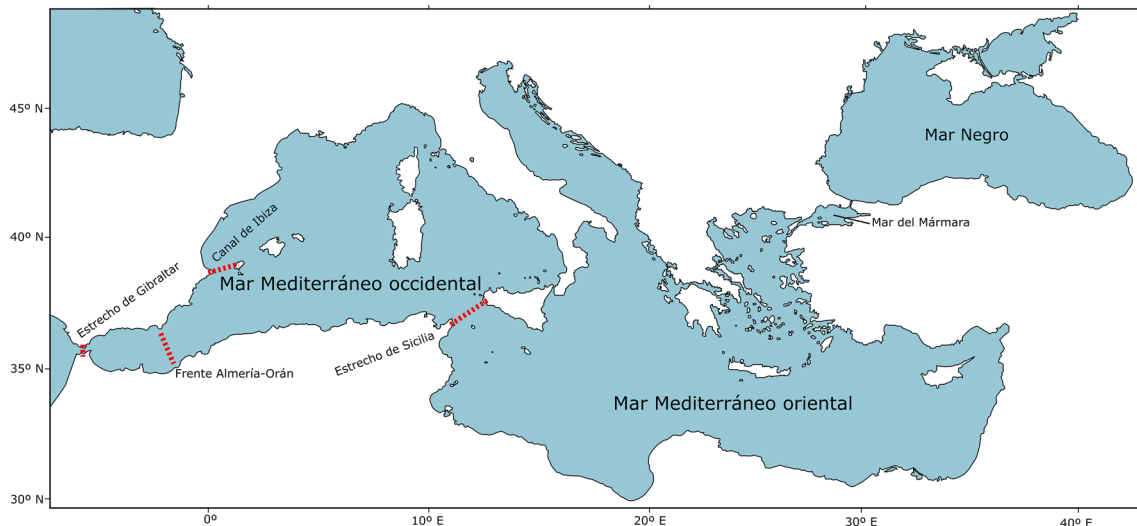


Figura 9. Mar Mediterráneo con sus principales subdivisiones. Las líneas rojas discontinuas indican las principales barreras oceanográficas de la cuenca occidental. Fuente: Propia.

La principal entrada de agua en el Mar Mediterráneo se produce a través del Estrecho de Gibraltar, donde ocurre un intercambio entre la entrada de Agua Atlántica, más superficial, y la salida de agua procedente del Mediterráneo, más profunda, con mayor salinidad y por tanto densidad (Fernández *et al.*, 2005). En su entrada al Mar Mediterráneo, el Agua Atlántica sufre un progresivo aumento de la salinidad debido a la evaporación y a su mezcla con las otras capas a lo largo de su recorrido. Por ese motivo pasa a llamarse **Agua Atlántica Modificada** (*Modified Atlantic Water, MAW*), que alcanza en torno a 100 y 200 metros de profundidad (**Figura 10**). Tras atravesar el Mar de Alborán y la Cuenca Argelina, donde crea vórtices anticiclónicos casi permanentes, parte de la corriente continúa su desplazamiento hacia la cuenca oriental del Mediterráneo, mientras que otra parte

se dirige hacia el norte, atravesando los canales que separan las Islas Baleares del continente y entre sí (Millot, 1999). Allí, forma lo que se conoce como **Corriente Balear** (*Balearic Current, BC*), un flujo de agua que discurre desde el norte de las Islas Baleares con dirección noreste (Balbín *et al.*, 2014; Fernández *et al.*, 2005).

Por otra parte, la **Corriente del Norte** (*Northern Current, NC*) se genera a través de la unión del flujo de MAW proveniente del este y del oeste de la isla de Córcega. La Corriente del Norte discurre a lo largo del talud continental con dirección sudoeste, hasta alcanzar el Canal de Ibiza (**Figura 10**) (López García *et al.*, 1994; Millot, 1999). Allí, parte de la corriente continúa su desplazamiento hacia el sur, atravesando el canal, mientras que el resto sufre una recircularización hacia el norte, formando parte de la Corriente Balear (Pinot *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2005). Se ha destacado que su estructura cambia estacionalmente, ya que en verano la NC es especialmente amplia y superficial, con una variabilidad mesoescala reducida, mientras que en invierno es un flujo más estrecho y próximo al talud continental, con eventos temporales frecuentes, tales como meandros, que le confieren una elevada variabilidad al flujo (Font *et al.*, 1995; Millot, 1999; Fernández *et al.*, 2005).

Durante inviernos relativamente fríos, MAW puede sufrir un enfriamiento sin mezclarse con las capas inferiores, lo que lleva a la formación de una capa de agua intermedia llamada **Agua Intermedia Occidental** (*Winter Intermediate Water, WIW*) en la plataforma continental del Golfo de León y el Mar Balear. No suele durar más de un ciclo anual, y se sitúa por debajo de MAW. Su profundidad máxima suele ser de unos 250 metros, exceptuando en las zonas donde no se encuentran otras capas de agua intermedias, donde alcanza más de 400 metros (López-Jurado *et al.*, 1995; Millot, 1999; Pinot *et al.*, 2002).

La principal corriente de profundidad en el Mar Mediterráneo occidental se conoce como *Western Mediterranean Deep Water* o **WMDW**. Se caracteriza por ser un flujo de agua denso, que alcanza profundidades superiores a 2000 metros, y se genera principalmente en el Golfo de León. Para su formación se requieren fuertes

pérdidas consecutivas de calor latente, donde la evaporación provoca una mezcla de agua superficial y aguas intermedias. En ocasiones se debilita la estratificación de la columna de agua y la diferencia de densidades, lo que puede causar un hundimiento violento del agua superficial (Millot, 1999).

En el Mar Mediterráneo oriental, entre las islas de Rodas y Chipre se forma una masa de agua a partir de MAW, conocida como **Agua Intermedia Oriental** (*Levantine Intermediate Water, LIW*). Llega al Mar Mediterráneo occidental a través del canal de Sicilia (Pinot *et al.*, 2002). Se desplaza en dirección noroeste y, a medida que se mezcla con las aguas adyacentes, disminuyen tanto su temperatura como la salinidad (López-Jurado *et al.*, 1995; Millot, 1999). Se localiza entre WIW y WMDW, o debajo de MAW en ausencia de WIW (López-Jurado *et al.*, 1995; Millot, 1999).

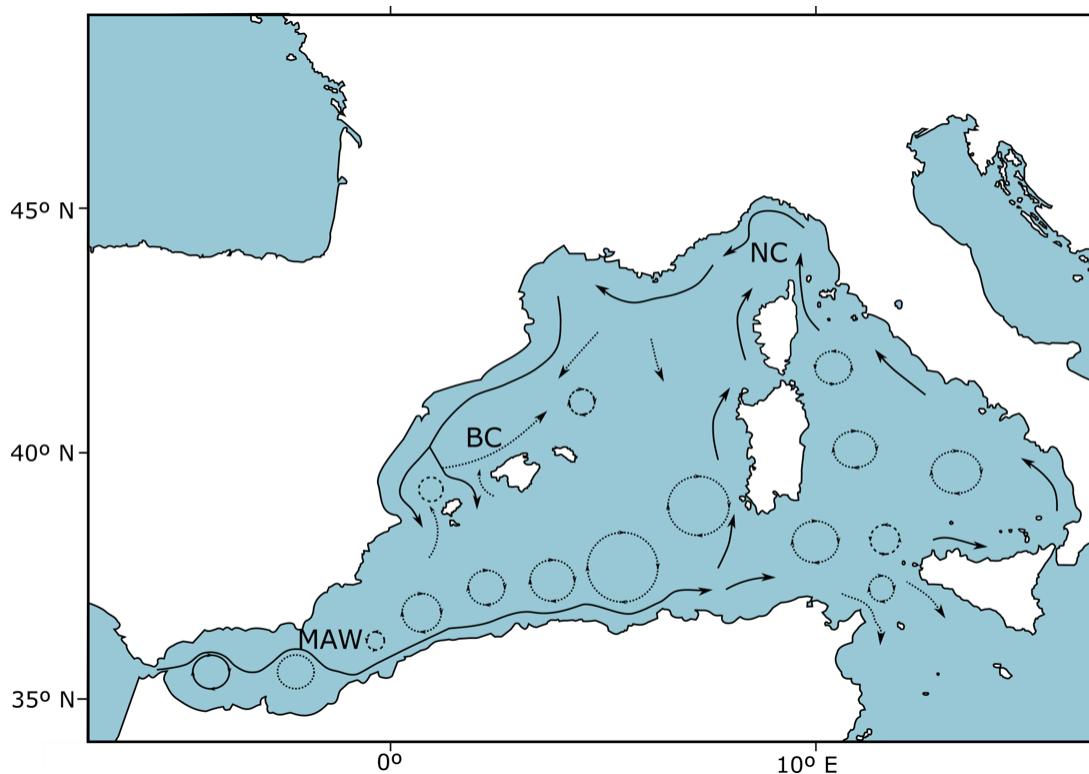


Figura 10. Principales corrientes a nivel superficial del Mar Mediterráneo occidental (según Millot, 1999; Balbín *et al.*, 2014): Agua Atlántica Modificada (MAW), Corriente del Norte (NC) y Corriente Balear (BC). Las líneas continuas indican un flujo permanente, mientras que la línea de puntos señala fenómenos temporales. Fuente: Propia.

El margen continental consta principalmente de la plataforma continental, el talud continental, y el glacis continental (**Figura 11A**). La plataforma continental es una superficie con una pendiente inferior a cinco grados de inclinación, que abarca desde la línea de costa hasta el borde de la plataforma, donde ocurre la ruptura de pendiente entre la plataforma y el talud continental (Pratson *et al.*, 2007). En el borde de la plataforma, la profundidad no suele superar los 200 metros de profundidad. Por otra parte, el talud continental tiene una pendiente en torno a cuatro grados de inclinación (Pratson *et al.*, 2007). Además, es la principal zona del margen continental donde se localizan los valles submarinos, entre los cuales se encuentran los **cañones submarinos**. En último lugar, el glacis continental separa el talud continental de la plana abisal, siendo la zona del margen continental con mayor profundidad (Pratson *et al.*, 2007).

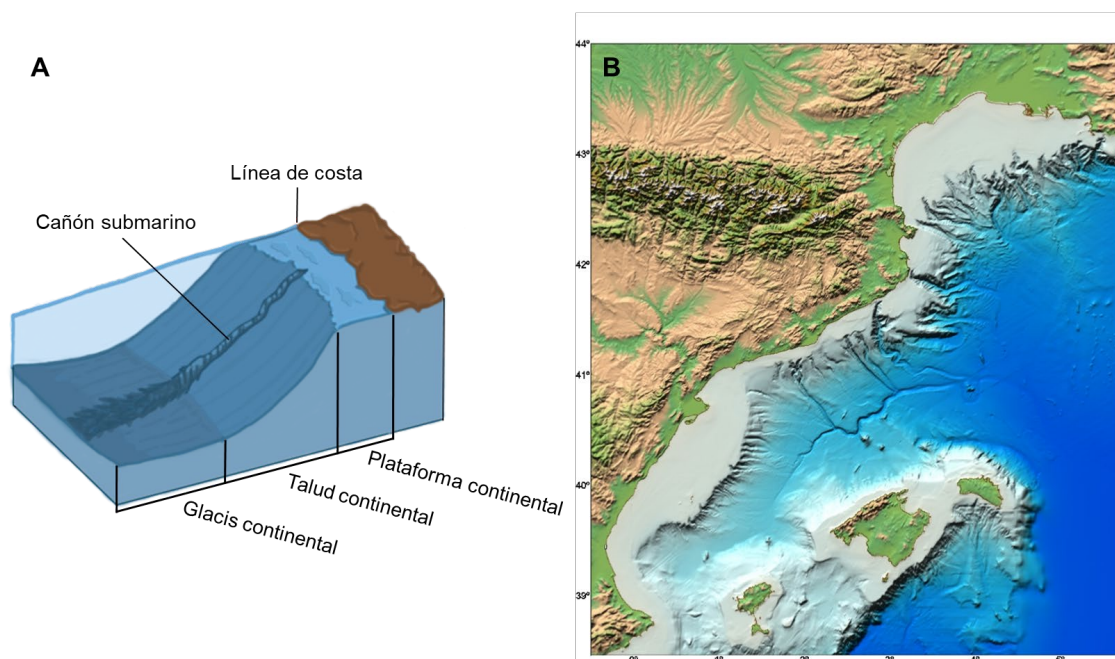


Figura 11. (A) Partes en las que se subdivide el margen continental, incluyendo un cañón submarino dentro del talud continental. Fuente: Propia. (B) Mapa batimétrico del Mar Mediterráneo noroccidental. Fuente: *Institut Cartogràfic i Geològic de Catalunya* (2010).

El Mar Mediterráneo es la segunda zona con mayor número de cañones submarinos (518) en la Tierra (**Figura 11B**), por detrás del sudeste asiático (918) (Harris y Whiteway, 2011). Dentro del Mar Mediterráneo, los cañones son muy abruptos, ya que, a pesar de presentar una longitud moderada, con una media de 26.5 km, la pendiente es considerable, con una media de 6.5 ° de inclinación (Harris y Whiteway, 2011). Son la principal estructura geomórfica de los márgenes continentales y se definen como valles submarinos y sinuosos de paredes empinadas, con secciones transversales en forma de V y ejes inclinados hacia afuera (Shephard, 1981; Sardà *et al.*, 2004b). Presentan una topografía compleja, desde paredes y salientes rocosos a sedimentos blandos, lo que influye en los patrones de corrientes marinas, permitiéndoles tener un papel en el sistema de drenaje de los márgenes continentales y proporcionar un set de hábitats muy heterogéneo (Sardà *et al.*, 2004b; Fernandez-Arcaya *et al.*, 2017).

En el Mar Mediterráneo, la gamba roja habita principalmente la ladera superior y media de los cañones submarinos (Sardà *et al.*, 2004b). Realiza movimientos estacionales entre el mar abierto y los cañones, por lo que es considerada una especie nektobentónica, con una moderada capacidad natatoria (Cartes *et al.*, 1993; Sardà *et al.*, 1994). De hecho, los desplazamientos que realiza la gamba roja en relación a los cañones submarinos indica que *A. antennatus* ha adaptado su ciclo de vida a la estructura de los propios cañones (Tudela *et al.*, 2003). Como tienen una mayor productividad y flujo de materia orgánica que el mar abierto, así como una considerable abundancia de detritívoros, una posible explicación de la segregación por sexos y tamaño de *A. antennatus* a lo largo de la columna de agua es la diferencia de alimentos accesibles entre el mar abierto y los cañones submarinos (Cartes *et al.*, 1993). Los individuos que se encuentran dentro de los cañones, juveniles y adultos, se alimentan principalmente de detritívoros endobentónicos (Cartes *et al.*, 1993; Sardà *et al.*, 1997). En cambio, los individuos de mayor tamaño se alimentan principalmente de bentopelágicos, más accesibles en mar abierto (Cartes *et al.*, 1993; Sardà *et al.*, 1997).

Otro claro ejemplo de la importancia de los cañones submarinos se puede apreciar en los eventos de *cascading*, la formación de agua continental densa que ocurre de forma periódica en el Golfo de León (Fernandez-Arcaya *et al.*, 2017). Estos fenómenos oceanográficos se originan especialmente en inviernos secos, fríos y ventosos, cuando las aguas superficiales costeras son más densas que las adyacentes, lo que provoca que se hundan hacia los cañones submarinos, alcanzando incluso más de 2000 metros de profundidad (Canals *et al.*, 2006; Company *et al.*, 2008). En el Golfo de León se producen periódicamente, cada 6-11 años (Company *et al.*, 2008). Durante el evento se produce una desaparición temporal de la gamba roja de la zona, debido a que produce un desplazamiento de los individuos hacia zonas más profundas (Company *et al.*, 2008). Sin embargo, el *cascading* proporciona una gran cantidad de materia orgánica en zonas de elevada profundidad dentro de los cañones submarinos, lo que promueve el reclutamiento de *A. antennatus* en los años siguientes al evento (Fernandez-Arcaya *et al.*, 2017).

Pesquería de la gamba roja

La pesquería de la gamba roja se realiza en los fondos fangosos y en los márgenes de los cañones submarinos, siguiendo la modalidad conocida como pesca de arrastre de fondo (**Figura 12**) (Bensch *et al.*, 2009; FAO, 2009a). Se realiza con una red con un copo en el extremo, donde se acumulan las gambas. En la boca de la red se utilizan dos puertas deflectoras para mantener la red abierta, ya que tienden a separarse por efecto del choque con el agua (Moreno-Reyes y Díaz-García, 2017). En la zona de la boca también se localizan las relingas de plomos y de flotación, donde van colocados el lastre y los flotadores respectivamente, y ayudan a sostener la red en el agua (Moreno-Reyes y Díaz-García, 2017).

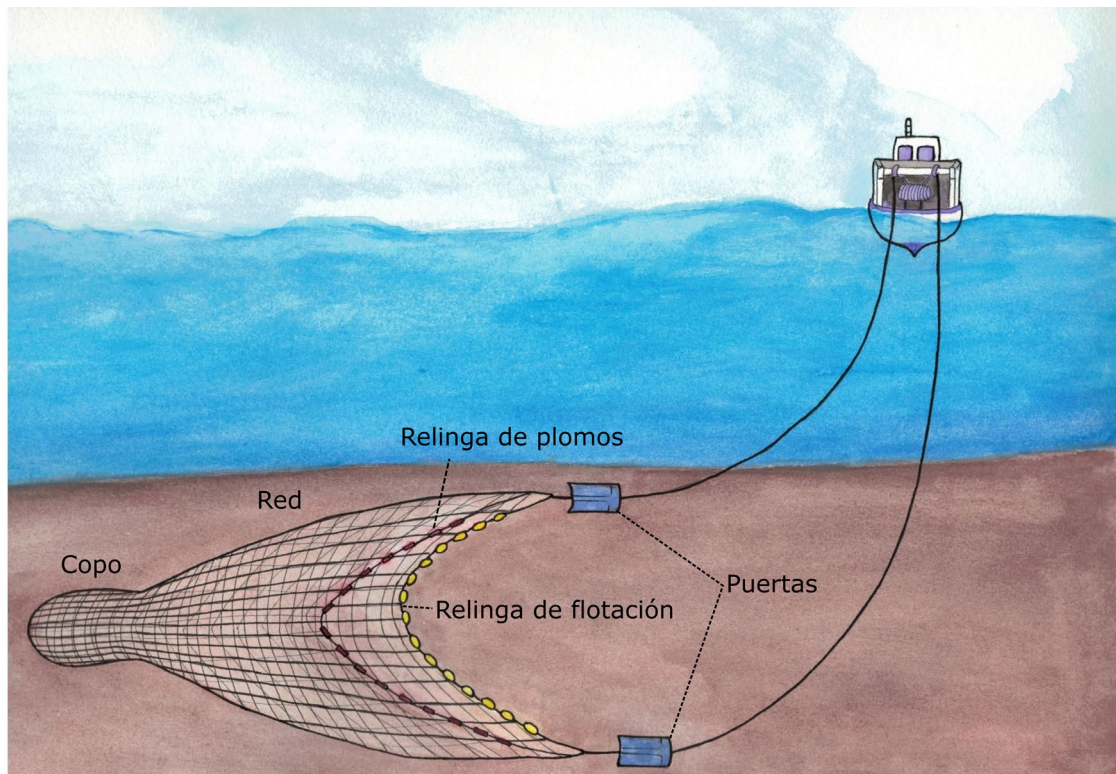


Figura 12. Esquema de la pesquería de arrastre de fondo utilizada en la gamba roja. Fuente: Propia.

La pesquería de la gamba roja comenzó en la década de 1930 en el Mar Ligur a 400 metros de profundidad (Sardà *et al.*, 2004b). Una década más tarde se extendió su explotación comercial en la costa del Mar Mediterráneo español, en Baleares y Cataluña, a profundidades de hasta 700 metros (Sardà *et al.*, 2004b). En los siguientes años se amplió a otros países ribereños, realizándose la pesca principalmente en el Mar Mediterráneo occidental, más específicamente en España, Italia, Francia, Argelia y Túnez (Bensch *et al.*, 2009). Además, en el Mar Mediterráneo oriental se ha pescado en menor medida en Israel (Holthuis, 1980; Bensch *et al.*, 2009). En la **Figura 13** se muestra la captura anual en toneladas de gamba roja a partir de que comenzaron los registros de la pesca de *Aristeus antennatus*, en el año 1954 (FAO, *Food and Agriculture Organization* de las Naciones Unidas). Los registros actuales de la FAO no incluyen Israel o Mozambique, lugares en los que se conoce que existe la pesca de gamba roja. Dentro de las 3274 toneladas pescadas en el año

2019, la mayor parte se capturó en Europa (2432 toneladas), de las cuales en Italia 1212 toneladas y en España 986 toneladas (FAO, 2021).

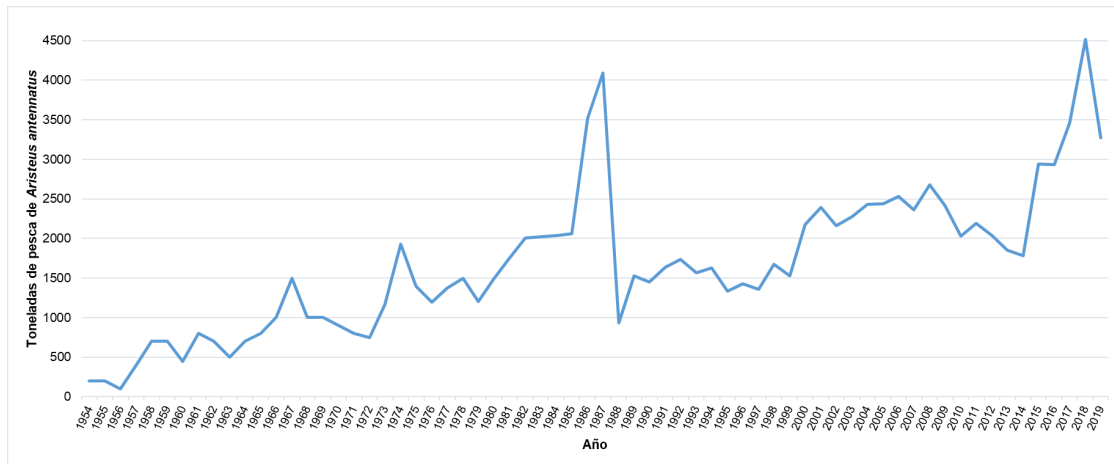


Figura 13. Captura anual de gamba roja global (en toneladas). Los valores de capturas recogen la pesca del Mar Mediterráneo, del Norte de África y del Sur de Europa desde 1955 hasta el año 2019. Fuente: FAO (2021).

En el año 1949, la FAO aprobó la creación de la *General Fisheries Commission for the Mediterranean* (GFCM), con el propósito de promover el desarrollo, conservación, gestión y utilización de los recursos marinos, así como el desarrollo sostenible de la acuicultura en el Mar Mediterráneo, el Mar Negro y aguas adyacentes (Bensch *et al.*, 2009). Para facilitar la gestión, se dividió el Mar Mediterráneo en diferentes sub áreas, las GSAs (*Geographical Sub-Areas*) (Figura 14) (FAO, 2009b; Bensch *et al.*, 2009).

A finales de la década 1970, se detectó un colapso en la pesquería de *A. antennatus* en el Mar Mediterráneo central, y no fue hasta 1985 cuando mostró el primer indicio de recuperación (Bensch *et al.*, 2009). En el 2002, los *stocks* pesqueros del norte del Mar de Alborán, las Islas Baleares y el norte de España se encontraban completamente explotados y se mantuvieron en esas condiciones varios años (Bensch *et al.*, 2009). En el año 2007 se indicó que los *stocks* pesqueros del noreste de España, correspondiente a la GSA6, se encontraban sobreexplotados. Por ese

motivo, se recomendó reducir el esfuerzo pesquero un 10%, así como implementar una malla cuadrada de 40 mm (Bensch *et al.*, 2009).

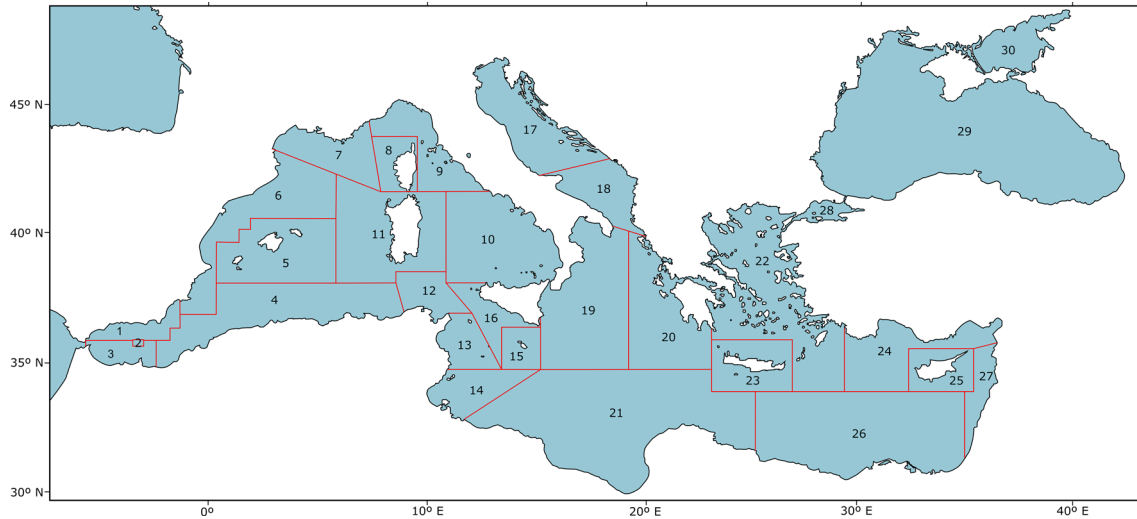


Figura 14. Sub-Áreas Geográficas (GSAs) en las que se divide el Mar Mediterráneo según la GFCM. Fuente: FAO (2009b).

En la costa del Mediterráneo español la pesca se lleva a cabo entre 400 y 800 metros de profundidad, siendo uno de los principales recursos pesqueros (Carbonell *et al.*, 1999; Gorelli *et al.*, 2014; Clavel-Henry *et al.*, 2020a). En esa zona la pesca se considera monoespecífica, ya que las capturas están constituidas principalmente por gamba roja al realizarse la pesca a profundidades donde la abundancia de otras especies comerciales es muy baja (Demestre y Martín, 1993). En el año 2000 se calculó que las capturas anuales promedio de gambas rojas, lo que incluye a *A. antennatus* y a *Aristaeomorpha foliacea*, esta última ya prácticamente desaparecida de la zona, eran alrededor de 114 toneladas en la GSA6 (Bensch *et al.*, 2009).

La GSA6 incluye Cataluña, la Comunidad Valenciana y la zona norte de la Región de Murcia. En Cataluña, *Aristeus antennatus* presentó una captura anual en 2017, 2018 y 2019 de 438.9, 443.8 y 380.5 toneladas respectivamente (Institut d'Estadística de Catalunya, 2019) y fue la primera especie en facturación, habiendo

proporcionado 17.4 y 16.2 millones de euros en 2017 y 2018 respectivamente (*Dades bàsiques de l'agroalimentació a Catalunya*, 2018, 2019). De hecho, el precio de venta de la gamba roja llega a 200 €/kg, especialmente en las de mayor talla (Gorelli *et al.*, 2014, 2016). En cuanto a la Comunidad Valenciana, la gamba roja se encuentra entre los recursos pesqueros más importantes y ha aumentado la facturación durante los últimos años. Así, en 2017 fue la sexta especie, con 6.1 millones de euros (Pesca marítima y acuicultura, 2017), mientras que en 2018 fue la quinta, con 7.3 millones de euros (Pesca marítima y acuicultura, 2018) y en 2019 ascendió hasta el segundo puesto con 7.5 millones de euros (Pesca marítima y acuicultura, 2019). Cabe destacar que la pesquería no se reparte de forma uniforme en toda la Comunidad Valenciana, sino que en la provincia de Alicante se concentra la mayor parte de volumen de capturas y la mayor facturación de pesca (Pesca marítima y acuicultura, 2017, 2018, 2019). Por último, la facturación obtenida por la pesca de gamba roja en la Región de Murcia entre los años 2017 y 2019 ha sido de 1.65 millones de euros anuales (Portal Estadístico de la Región de Murcia, 2022).

La gamba roja en España se legislaba por la Orden AAA/2808/2012, de 21 de diciembre, por la que se establece un **Plan de Gestión** Integral para la conservación de los recursos pesqueros en el Mediterráneo afectados por las pesquerías realizadas con redes de cerco, redes de arrastre y artes fijos y menores, para el período 2013-2017. El objetivo del plan era conseguir que las especies mencionadas en el mismo, entre las cuales se encuentra *A. antennatus*, pudieran alcanzar un límite biológico seguro, así como una explotación sostenible. De forma específica para la pesca de arrastre, la Orden prohíbe usar artes con mecanismos o artefactos añadidos a la relinga inferior o burlón que pudieran provocar que sobrepase los 65 mm de diámetro o los 220 mm de circunferencia. Además, indica que la mortalidad de pesca para la gamba roja no debe ser superior a 0.33 en la zona GSA5, correspondiente a las Islas Baleares (**Figura 14**), y 0.24 en la GSA6 (BOE, 2012). La Orden se prorrogó durante varios años, hasta que en el año 2019 el Parlamento Europeo estableció un Plan plurianual para la pesca demersal en el Mediterráneo

occidental (Consejo de la Unión Europea, 2019). Siguiendo las directrices de ese Plan plurianual, se publicó una nueva Orden APA/423/2020, de 18 de mayo, por la que se establece un plan de gestión para la conservación de los recursos pesqueros demersales en el Mar Mediterráneo (BOE, 2020).

Por otra parte, en el año 2013 se propuso un plan de gestión específico para la pesca de gamba roja en el caladero de Palamós, la Orden AAA/923/2013, de 16 de mayo, por la que se regula la pesca de gamba roja (*Aristeus antennatus*) con arte de arrastre de fondo en determinadas zonas marítimas próximas a Palamós (**Tabla 3**). En ese Plan se describen las directrices a seguir, tales como la abertura mínima de los copos de malla de la red, el tiempo de permanencia máximo en el mar o un período de veda de 60 días al año (BOE, 2013). Tras obtener un resultado positivo, se decidió modificar el plan de gestión en el año 2018, en el que se cambiaron algunas de las directrices descritas en la Orden anterior (**Tabla 3**) (BOE, 2018).

Por otra parte, la cofradía de Palamós solicitó ser evaluada dentro del Proyecto Medfish, un proyecto coordinado por la *World Wild Foundation* (WWF) y por el *Marine Stewardship Council* (MSC), con una duración de dos años. El objetivo de Medfish era realizar análisis rigurosos de las pesquerías mediterráneas españolas y francesas utilizando el Estándar y los criterios del MSC como referencia de sostenibilidad, y así poder promover una mejora en las prácticas de las pesquerías (Castaño, 2016). Las preevaluaciones realizan un diagnóstico detallado en el que se estudia la pesquería, identificando sus puntos fuertes y débiles. En el caso de la pesquería de gamba roja en Palamós, la preevaluación indicó que no superaría el proceso de evaluación completa de MSC, pero apuntó a una mejora potencial en todos los aspectos en los que no consiguió una puntuación suficiente (Castaño, 2016). Por ejemplo, entre las áreas clave de mejora se incluyeron el estado del *stock* pesquero, las herramientas y reglas de control de captura, los impactos en el hábitat y el efecto sobre ecosistemas vulnerables, así como la propia gestión (Castaño, 2016). No obstante, también se destacaron dos aspectos positivos, la disminución

de la mortalidad por pesca durante los últimos años y el compromiso de la Cofradía de pescadores de cambiar, a partir de 2017, las puertas de arrastre a unas semi-pelágicas que no entren en contacto directo con el fondo, lo que permitiría reducir el impacto en el hábitat (Castaño, 2016).

Tabla 3. Directrices principales descritas en la Orden AAA/923/2013, de 16 de mayo (BOE, 2013), para la gestión de la gamba roja en Palamós y modificaciones aplicadas en 2018, Orden APM/532/2018, de 25 de mayo (BOE, 2018).

Orden AAA/923/2013	Orden APM/532/2018
Uso de arte de arrastre armado con copos de malla de forma cuadrada con abertura mínima de 40 mm.	Uso de arte de arrastre armado con copos de malla de forma cuadrada con abertura mínima de 45 mm.
El torzal no puede superar los 3 mm de diámetro.	-
Prohibido usar elementos o artilugios que reduzcan la luz de la malla o faciliten la superación de obstáculos rocosos.	-
Tiempo máximo de permanencia diaria en el mar de 11 horas y 30 minutos.	Tiempo máximo de permanencia diaria en el mar de 11 horas.
Período de actividad semanal máximo de 5 días.	-
Número máximo de lances por buque y día entre 2 y 3 dependiendo de la zona.	-
Período de veda de 60 días al año.	-

Estudios genéticos previos en *Aristeus antennatus*

Hasta la redacción de esta memoria, un total de 16 artículos científicos publicados han tenido como objetivo la gamba roja mediante diversos análisis genéticos, de los cuales diez han sido realizados en el *Laboratori d' Ictiologia Genètica* de la UdG (Tabla 4).

El primer estudio genético en *A. antennatus* fue realizado por Sardà *et al.* (1998), simultáneamente con un análisis morfológico de la gamba roja. Identificaron la variabilidad genética de once localidades del Mar Mediterráneo y las aguas adyacentes del Océano Atlántico utilizando marcadores enzimáticos, las alozimas. El hecho de que solo dos de los 15 *loci* estudiados tuvieran un polimorfismo mayor al 95% indicó que la gamba roja presenta una baja variabilidad genética en alozimas. Además, no se detectó una divergencia genética significativa entre las localidades estudiadas. Sin embargo, se detectaron diferencias morfológicas entre muestras, indicando una plasticidad fenotípica en función de las características hidrológicas y ecológicas de las cuencas estudiadas (Sardà *et al.*, 1998).

Tabla 4. Resumen de los estudios genéticos en la gamba roja *Aristeus antennatus* publicados hasta la actualidad. COI: Citocromo c oxidasa subunidad I; AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism*; PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; NaK: sodio–potasio ATPasa subunidad alfa; SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*.

Objetivo	Publicación	Marcador molecular	Regiones analizadas	Número de localidades
Estructura poblacional geográfica	Sardà <i>et al.</i> , 1998	15 <i>loci</i> enzimáticos	Mediterráneo occidental	6
			Mediterráneo central	2
			Mediterráneo oriental	1
			Océano Atlántico	2
	Roldán <i>et al.</i> , 2009	COI (514 pb) 16S rDNA (547 pb)	Mediterráneo occidental	3
	Maggio <i>et al.</i> , 2009	Región control (369 pb)	Mediterráneo occidental	5
Mediterráneo central			3	
	Fernández <i>et al.</i> , 2011	COI (514 pb) 16S rDNA (546 pb)	Mediterráneo occidental	7
			Mediterráneo central	1
			Mediterráneo oriental	1
			Océano Atlántico	1
			Canal de Mozambique	1
	Cannas <i>et al.</i> , 2012	8 <i>loci</i> microsatélite	Mediterráneo occidental	9
	Lo Brutto <i>et al.</i> , 2012	145 <i>loci</i> AFLPs Región control (369 pb)	Mediterráneo occidental	6
			Mediterráneo central	2
			Océano Atlántico	1

	Marra <i>et al.</i> , 2015	COI (500 pb) 16S rDNA (447 pb)	Mediterráneo central	10
	Heras <i>et al.</i> , 2019	12 <i>loci</i> microsatélite	Mediterráneo occidental Mediterráneo central Mediterráneo oriental Océano Atlántico Canal de Mozambique	7 1 1 1 1
Estructura poblacional batimétrica	Sardà <i>et al.</i> , 2010	16S rDNA (547 pb)	Mediterráneo noroccidental, Barcelona (350, 700, 1100, 1500 m de profundidad)	1
Filogeografía	Fernández <i>et al.</i> , 2013	COI (514 pb), PEPCK (536 pb), NaK (498 pb)	Mediterráneo occidental Mediterráneo oriental Océano Atlántico Canal de Mozambique	1 1 1 1
DNA de espermatóforos	Planella <i>et al.</i> , 2017	2 <i>loci</i> microsatélite	Mediterráneo noroccidental, Palamós.	1
Comportamiento reproductivo	Planella <i>et al.</i> , 2019	13 <i>loci</i> microsatélite	Mediterráneo noroccidental, Palamós.	1
Identificación genética de larvas	Carreton <i>et al.</i> , 2019	COI (617 pb) 16S rDNA (300 pb)	Mediterráneo occidental	
Desarrollo de marcadores moleculares	Cannas <i>et al.</i> , 2008	14 <i>loci</i> microsatélite	Mediterráneo occidental	1
	Heras <i>et al.</i> , 2016	35 <i>loci</i> microsatélite	Mediterráneo noroccidental, Palamós.	1
	Catanese <i>et al.</i> , 2021	80 SNPs	Mediterráneo occidental Océano Atlántico	3 1

Roldán *et al.* (2009) utilizaron los marcadores mitocondriales COI (citocromo oxidasa subunidad I) (514 pb) y 16S rDNA (subunidad ribosómica 16S) (547 pb) en muestras provenientes de tres caladeros del Mar Mediterráneo: Palamós en el Mar Catalán, Génova en el Mar Ligur y Palermo en el Mar Tirreno. La variabilidad genética detectada en la especie resultó elevada y en consonancia con los valores obtenidos en otras especies de crustáceos marinos, mientras que no se observó un patrón geográfico de divergencia genética entre las muestras (Roldán *et al.*, 2009). En el mismo año, Maggio *et al.* (2009) estudiaron la estructura poblacional en seis localidades del Mar Mediterráneo occidental y dos del Estrecho de Sicilia utilizando

la región control del mtDNA (369 pb), observando una ausencia de diferenciación poblacional en la gamba roja.

Por otra parte, Sardà y colaboradores evaluaron la existencia de diferenciación genética en la gamba roja entre profundidades explotadas y profundidades mayores de 1000 metros que no se encuentran bajo presión pesquera. Se analizaron muestras del Mar Catalán a cuatro profundidades (350 m, 700 m, 1100 m y 1500 m) mediante el marcador mitocondrial 16S rDNA. Los resultados revelaron una elevada homogeneidad genética entre las distintas profundidades, indicando que los *stocks* vírgenes podrían ser la fuente de los *stocks* explotados (Sardà *et al.*, 2010).

El primer trabajo genético que detectó diferenciación genética entre poblaciones de gamba roja fue publicado por Fernández *et al.* (2011), utilizando los marcadores COI (546 pb) y 16S rDNA (514 pb). Se analizaron localidades pertenecientes a todo el rango de distribución de la gamba roja en los principales caladeros de la cuenca oriental y occidental del Mar Mediterráneo, en la zona del Océano Atlántico adyacente al Estrecho de Gibraltar y en el Canal de Mozambique, dentro del Océano Índico. Se prestó especial atención a las potenciales barreras al flujo génico dentro del Mar Mediterráneo, tales como frentes oceanográficos o barreras geográficas. Los resultados obtenidos con ambos marcadores indicaron una variabilidad genética elevada para la especie y se identificaron cuatro *stocks* genéticos, correspondientes al Océano Atlántico, el Mar Mediterráneo occidental, el Mar Mediterráneo oriental y el Océano Índico (Fernández *et al.*, 2011).

En el año 2012 investigadores italianos aplicaron 145 AFLP polimórficos en siete poblaciones del Mar Mediterráneo occidental y central y una del Océano Atlántico, pero a diferencia del artículo de Fernández *et al.* (2011), no detectaron una diferenciación genética significativa entre el Mar Mediterráneo y el Océano Atlántico, debido a que el tipo de marcador utilizado no es suficientemente sensible como para detectar bajos niveles de diferenciación genética (Lo Brutto *et al.*, 2012). Por otra parte, Marra *et al.* (2015) utilizando los marcadores mitocondriales COI (500

pb) y 16S rDNA (447 pb) estudiaron diez localidades italianas del Mar Mediterráneo central: dos en el Mar Tirreno, seis en el Mar Jónico y dos en el Mar Adriático. No se encontró un patrón geográfico claro, indicando la ausencia de barreras al flujo génico en la gamba roja en la zona estudiada, como podría ser el Estrecho de Mesina (Marra *et al.*, 2015).

La filogeografía comparada de las dos especies de gambas rojas mediterráneas *A. antennatus* y *Aristaeomorpha foliacea* fue realizada por Fernández *et al.* (2013). Se utilizaron dos tipos de marcadores moleculares, el mitocondrial COI (514 pb) y dos genes nucleares, el PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa) (536 pb) y el NaK (sodio–potasio ATPasa subunidad alfa) (498 pb). En *A. foliacea* se detectaron dos linajes muy diferenciados, un único linaje para el Mar Mediterráneo y el canal de Mozambique y otro en el Noroeste de Australia constituyendo una nueva especie genética. En *A. antennatus* se detectó un único linaje filogenético a lo largo de su rango global de distribución, el Mar Mediterráneo, el Océano Atlántico y el Canal de Mozambique en el Océano Índico (Fernández *et al.*, 2013).

En el año 2012 Cannas y colaboradores usaron 8 *loci* microsatélite en el estudio de nueve localidades de gamba roja del Mar Mediterráneo occidental y central (Cannas *et al.*, 2008, 2012). Los resultados indicaron ausencia de diferenciación genética entre las distintas muestras analizadas, mientras que la comparativa entre machos y hembras señaló que las hembras podrían migrar más que los machos, término conocido como *female-biased dispersal* (Cannas *et al.*, 2012).

Con el objetivo de obtener marcadores moleculares útiles en estudios poblacionales de gamba roja capaces de detectar pequeñas variaciones genéticas, se desarrollaron nuevos marcadores microsatélite específicos para la gamba roja mediante NGS, con el pirosecuenciador *454 GS Junior* de Roche (Heras *et al.*, 2016). Dos de estos *loci* microsatélite fueron utilizados para comprobar la eficacia de un nuevo método de extracción de DNA desarrollado para extraer DNA de gran calidad de los espermátóforos de la gamba roja, diferenciando así el DNA del

espermatóforo del DNA de la hembra portadora del espermatóforo (Planella *et al.* 2017). Además, un set de trece de estos *loci* microsatélite se aplicaron en el primer estudio genético del comportamiento reproductivo de *A. antennatus*, donde se detectó un claro indicio de poliginandria, es decir, que tanto machos como hembras se aparean con más de un individuo y que una parte de los machos reproductores del caladero provenían de otro caladero (Planella *et al.*, 2019). Por otra parte, el mismo set de *loci* microsatélite confirmó los cuatro *stocks* genéticos detectados con genes mitocondriales en Fernández *et al.* (2011) y una diferenciación en el Mar de Alborán, que podría considerarse un quinto *stock*, aunque próximo genéticamente al Mar Mediterráneo occidental (Heras *et al.*, 2019).

Otra aplicación de los marcadores moleculares ha sido la identificación taxonómica de estadios larvarios, en los cuales la identificación morfológica es difícil o dudosa. Con este objetivo, Carreton *et al.* (2019) utilizaron los marcadores COI (617 pb) y 16S rDNA (300 pb) para confirmar o no estadios larvarios morfológicamente similares y asignados a dos géneros diferentes, *Aristeus antennatus* y *Gennadas sp.* De esta manera, se identificaron genéticamente los estadios larvarios de *A. antennatus* protozoa I, II y III y mysis I y II (Carreton *et al.*, 2019).

Por último, recientemente se ha identificado un set de 80 SNPs en *A. antennatus* que, aplicados a tres localidades del Mar Mediterráneo occidental y una del Océano Atlántico, indicaron ser potencialmente útiles en estudios poblacionales entre cuencas oceánicas (Catanese *et al.*, 2021).

OBJETIVOS

Los estudios genéticos previos realizados en la gamba roja *Aristeus antennatus* se han centrado en determinar la divergencia entre las cuencas mediterráneas o a escala global. A pesar de su importancia económica en el Mar Mediterráneo noroccidental, el conocimiento de la estructura poblacional a pequeña escala es escaso o inexistente. Por este motivo, el objetivo de este trabajo es profundizar en el conocimiento genético para entender el grado de conectividad entre las poblaciones y el patrón de dispersión de la especie. En consecuencia, marcadores nucleares altamente polimórficos se han aplicado para alcanzar los siguientes objetivos:

1. Estimar la diversidad genética y la divergencia genética en *A. antennatus* durante el período de apareamiento desde el Golfo de León hasta el Cabo de Palos.
 - a- identificar barreras al flujo génico.
 - b- determinar el grado de conectividad genética entre las poblaciones.
 - c- examinar el nivel de estabilidad temporal del patrón de conectividad genética.

2. Identificar el patrón de dispersión de los machos de *A. antennatus* en una localidad modelo, el caladero de Palamós.
 - a- identificar el origen geográfico de los individuos que se incorporan a la pesquería.
 - b- calcular el aporte de individuos desde caladeros cercanos.

3. Estimar la diversidad genética y la divergencia genética en *A. antennatus* en las hembras desovadoras desde el Golfo de León hasta Cabo de Palos.
 - a- identificar barreras al flujo génico.
 - b- determinar el grado de conectividad genética entre las poblaciones.
 - c- examinar el nivel de estabilidad temporal del patrón de conectividad genética.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado se describen los procedimientos realizados en los distintos artículos de forma general ya que, en el apartado de Resultados de la presente memoria de tesis doctoral, cada artículo contiene una sección detallada de la metodología utilizada.

Material biológico

Los muestreos realizados se enmarcan dentro del Proyecto CONECTA-GEN (CTM2014-54648-C2-1-R), titulado CONECTividad poblacional en la gamba rosada, *Aristeus antennatus*, en el Mediterráneo noroccidental entre el Golfo de León y el

Golfo de Valencia – Flujo GÉNico. El total de 3380 individuos de gamba roja *Aristeus antennatus* proceden de la cuenca occidental del Mar Mediterráneo, más concretamente de la sub área geográfica GSA6 (Tabla 5, Figura 14). Todos los individuos son adultos, con la excepción de 203 juveniles del año 2016 y 61 espermatóforos, ambos grupos procedentes de Palamós.

Tabla 5. Muestreo de *Aristeus antennatus* indicando la localidad de procedencia de las muestras, el año de muestreo, la talla comercial a la cual pertenecen y el número de individuos, diferenciando entre ejemplares hembras (♀), machos (♂) y espermatóforos (E).

Artículo	Localidad	Año	Fecha muestreo	Número individuos
1	Port de la Selva	2016/2017	11 mayo/3 mayo	67♀: 33♂/96♀: 2♂
	Roses	2016/2017	4 marzo/9 marzo	45♀: 55♂/50♀: 50♂
	Palamós	2016/2017	3 marzo/25 abril	51♀: 52♂/50♀: 50♂
	Blanes	2016/2017	10 marzo/10 marzo	44♀: 56♂/39♀: 61♂
	Vilanova i la Geltrú	2016/2017	8 marzo/17 marzo	45♀: 55♂/50♀: 50♂
	Dénia	2016/2017	25 febrero/27 marzo	86♀: 16♂/69♀: 31♂
	Santa Pola	2016/2017	26 febrero/27 marzo	46♀: 54♂/82♀: 18♂
2	Palamós	2015	10 agosto	52♀: 59♂: 61E
	Palamós	2016	3 marzo, 7 julio	404♂
	Roses	2016	9 marzo	55♂
	Blanes	2016	10 marzo	54♂
3	Port de la Selva	2016/2017	12 julio/5 julio	100♀/100♀
	Roses	2016/2017	7 julio/3 julio	100♀/100♀
	Palamós	2016/2017	6 julio/10 julio	100♀/100♀
	Blanes	2016/2017	11 julio/12 julio	100♀/100♀
	Vilanova i la Geltrú	2016/2017	13 julio/6 julio	100♀/100♀
	Dénia	2016/2017	19 julio/17 julio	100♀/100♀
	Santa Pola	2016/2017	19 julio/17 julio	100♀/100♀

En cada muestreo, los individuos se sexaron siguiendo el criterio morfológico descrito en Demestre y Fortuño (1992), observando los caracteres sexuales secundarios y la posición y morfología de las gónadas. Las hembras se identificaron

por la presencia del *thelycum*, así como por la presencia de uno o varios espermatóforos en las muestras de verano, mientras que los machos se identificaron gracias a la presencia de los hemipetasmas en los juveniles, o del petasma en los machos adultos. Asimismo, la longitud del cefalotórax de cada individuo se determinó midiendo desde el margen orbital hasta el borde posterior medio del caparazón mediante un pie de rey digital.

Para la obtención de los ejemplares se ha contado con la colaboración de los siguientes patrones y barcos de las siete localidades estudiadas: Francisco Torné (*Eli-Hermi II*), Manel Noguera (*Port de Roses*), Conrad Maseguer (*Nova Gasela*), Pere Pérez (*Peret II*), Marc Pons (*Avi Salvador*), Rafael Montoya (*Avi Pau*), Juan Antonio Sepulcre (*La androna*) y Jorge Castejón (*Isabel y Andrés*). La selección de los patrones es fundamental en estudios de genética de poblaciones, para asegurar la localización exacta de los lances de pesca.

Todas las muestras se trasladaron en hielo al laboratorio y una vez allí, se extrajo de cada individuo una porción de tejido muscular que se preservó en etanol 70% para su conservación hasta la extracción del DNA. Todas las muestras se encuentran almacenadas en el banco de tejidos del *Laboratori d'Ictiologia Genètica* de la *Universitat de Girona*.

Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó siguiendo el método conocido como fenol: cloroformo: alcohol isoamílico descrito por Sambrook *et al.* (1989) con pequeñas modificaciones. El primer paso de la extracción de DNA consistió en incubar unos 10 mg del tejido muscular del individuo durante 2 horas en un VorTemp 56 de *Labnet International, Inc.* a 1200 rpm con 600 µl de tampón de lisis TENS (constituido por 50 mM de Tris a pH 8, 100 mM de EDTA a pH 8, 100 mM de NaCl₂ y 2% de dodecilsulfato sódico) para lisar las células, y 40 µl de proteinasa K a 37 °C para

digerir las proteínas y evitar el efecto de las DNAsas. A continuación, se dispensaron 650 µl de fenol y se centrifugó 4 min a 13000 rpm. A continuación, se recogió el sobrenadante y, tras pasarlo a un nuevo *ependorf*, se le añadieron 325 µl de fenol y 325 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), para después repetir la centrifugación y recogida del sobrenadante. El siguiente paso consistió en precipitar el DNA, para lo cual se añadió el doble de volumen de etanol absoluto a -20 °C, y se centrifugó durante 15 min a 13000 rpm. Tras decantar el etanol, se repitió en dos ocasiones más el proceso, pero añadiendo 500 µl de etanol 70% a -20 °C. Para finalizar, se secó el etanol restante a 40 °C, y se dispensaron 75 µl de H₂O_{dd} (agua purificada doble desionizada) para resuspender el DNA.

Una vez extraído el DNA genómico, se realizó una medición en el espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific)* para cuantificar y evaluar su pureza. Además, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa con *GelRed Nucleic Acid Stain (VWR International)* para comprobar su integridad. Por último, se realizó una dilución de las muestras para conseguir alícuotas con una concentración de DNA de 40 ng/µl, la óptima para la realización de las PCRs.

Locí microsatélite

Un set de doce *loci* microsatélite desarrollados en Heras *et al.* (2016) mediante secuenciación masiva con el pirosecuenciador 454 *GS Junior de Roche* se utilizaron como marcadores moleculares en todas las muestras estudiadas. Los doce *loci* microsatélite son seis dinucleótidos (*Aa138*, *Aa1255*, *Aa123*, *Aa681*, *Aa1444* y *Aa1061*), tres trinucleótidos (*Aa496b*, *Aa667* y *Aa1195*), un tetranucleótido (*Aa956*) y dos pentanucleótidos (*Aa751* y *Aa818*).

A la hora de amplificar mediante PCR los *loci* microsatélite, el extremo 5' de los *primers forward* se marcó con un fluorocromo, el cual se detectó durante la electroforesis capilar. Se utilizaron cuatro fluorocromos distintos, 6-FAM (de color

azul), NET (de color amarillo), PET (de color rojo) y VIC (de color verde), lo que permitió desarrollar PCRs *multiplex*, que permiten amplificar más de un marcador microsatélite en la misma reacción. Los doce *loci* se dividieron en tres reacciones PCR *multiplex*, más el *locus* *Aa1255*, amplificado mediante una PCR *singleplex*, en función de la temperatura de hibridación de los *primers* (Figura 15) (Planella *et al.*, 2019).

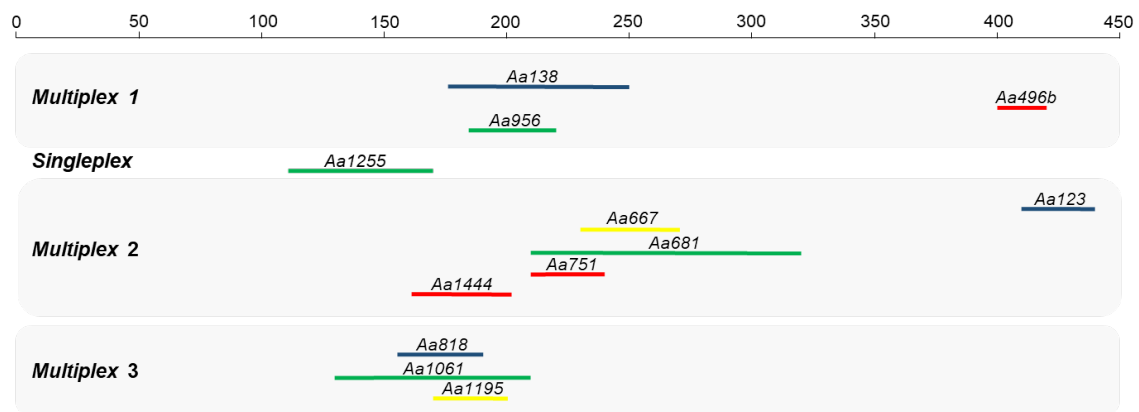


Figura 15. Esquema de las tres PCRs *multiplex* más la *singleplex* para el *locus* *Aa1255* utilizadas para amplificar el set de doce *loci* microsatélite. Se indica el rango de tamaño de los alelos en pares de bases con el color correspondiente al fluorocromo asignado en cada *locus* (6-FAM, NET, PET o VIC).

Cada PCR *multiplex* se realizó en un volumen final de 10 μ l, que contenía 2X de la *Master Mix GoTaq G2 Hot Start Colorless* (Promega Corporation), 10X del *Mix* de los *primers* (que contiene los *primers forward*, marcados con el correspondiente fluorocromo, y los *primers reverse*), y 40 ng de la muestra de DNA. La PCR *singleplex* desarrollada para el *locus* *Aa1255* se realizó en un volumen final de 14 μ l, conteniendo 1X *NH₄ Reaction Buffer*, 1.5 mM de la solución de *MgCl₂*, 1 mM de dNTPs, 0.2 mM del *primer forward* (marcado con el fluorocromo VIC), 0.2 mM del *primer reverse*, 0.375 U de la DNA polimerasa BIOTAQ™ (Bioline) y 40 ng de la muestra de DNA. En la Figura 16 se detallan las condiciones de PCR para cada sistema *multiplex*, así como para la PCR *singleplex* del *locus* *Aa1255*.

A		}		B		}		C		}	
94° C	2'			94° C	2'			94° C	2'		
94° C	30"	x 30 ciclos		94° C	30"	x 30 ciclos		94° C	30"	x 35 ciclos	
50° C	1'30"			60° C	1'30"			50° C	1'30"		
72° C	1'30"			72° C	1'30"			72° C	1'30"		
60° C	30'			60° C	30'			60° C	30'		

Figura 16. Condiciones de las PCRs utilizadas para amplificar los *loci* microsatélite. **(A)** Condiciones de la PCR *multiplex* 1. **(B)** Condiciones de las PCR *multiplex* 2 y 3. **(C)** Condiciones de la amplificación del *locus Aa1255*.

El análisis de los fragmentos se realizó mediante electroforesis capilar en el secuenciador automático *ABI PRISM 3730xl DNA analyser* (*Applied Biosystems*). Cabe mencionar que la *multiplex* 1 y la *singleplex* se analizaron conjuntamente en el secuenciador para ahorrar tiempo y recursos económicos. Finalmente, la lectura del tamaño de los alelos correspondientes se realizó mediante el programa *GeneMapper* versión 4.0 (*Applied Biosystems*).

Análisis de datos

Para alcanzar los objetivos propuestos en esta tesis doctoral, se realizaron los diferentes análisis estadísticos utilizando varios programas informáticos.

Los **análisis morfométricos** realizados, tales como comparar los tamaños de cefalotórax (CL) de las distintas muestras, incluyeron análisis de la varianza (ANOVA), tests post-hoc de Tukey o de Scheffe y *t* de *Student* mediante el programa *GraphPad Prism* versión 8.4.1 (*GraphPad Software*) y el paquete de datos IBM versión 25 de *SPSS* (Armonk, NY, USA).

El poder estadístico del set de los 12 *loci* microsatélite para detectar diferenciación genética se estimó tanto por el método del Chi-cuadrado de Pearson como por el test de Fisher, ambos realizados con el software *POWSIM* versión 4.1 (Ryman y Palm, 2006). La presencia de alelos nulos en cada *locus* se estimó

mediante el programa *Micro-Checker* (Van Oosterhout *et al.*, 2004), aplicando la ecuación Brookfield 1, la cual considera que las muestras no amplificadas pueden ser homocigotos para alelos nulos, DNA degradado o problemas técnicos en la PCR. Además, con el software *Freena* (Chapuis y Estoup, 2007) se calculó la frecuencia de alelos nulos y los valores de F_{ST} sin corregir y corrigiendo por la presencia de alelos nulos.

Los análisis realizados para evaluar los niveles de **diversidad genética** se llevaron a cabo utilizando los programas *Genepop* (Rousset, 2008) y *Fstat* (Goudet, 2001). Se calculó el número de alelos por *locus* (N_A), la riqueza alélica (A_R), la heterocigosidad observada (H_O) y esperada (H_E) y el desequilibrio de ligamiento entre los distintos *loci* microsatélite. Además, también se realizó el cálculo de la desviación de las frecuencias alélicas esperadas bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg y el índice de endogamia (F_{IS}). El tamaño efectivo de la población, N_e , se estimó mediante *NeEstimator* versión 2.1 (Do *et al.*, 2014), utilizando el método basado en el desequilibrio de ligamiento.

En cuanto a los análisis relativos a la **diferenciación genética** entre las poblaciones, se llevaron a cabo mediante un análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) y mediante el cálculo de la diferenciación genética entre pares de muestras mediante F_{ST} , ambos con el programa *Arlequin* versión 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). También se realizó un análisis bayesiano de *clusters* o agrupaciones según el modelo *admixture* de *STRUCTURE* versión 2.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Mediante el test de Mantel, realizado con el software *NTSYSpc* versión 2.1 (Rohlf, 1993) se evaluó la existencia del aislamiento por distancia. Asimismo, se estimó el flujo génico relativo entre las distintas muestras a través del número efectivo de migrantes, N_m , calculado según Alcalá *et al.* (2014) en *div-Migrate online* (Sundqvist *et al.*, 2016).

Para los **análisis de parentesco** se llevó a cabo una simulación de la descendencia que obtendrían los machos y las hembras del año anterior al muestreo, utilizando

para ello el programa *Hybridlab* versión 1.0 (Nielsen *et al.*, 2006). La descendencia simulada se asignó como la base o referencia para los **análisis de asignación**, realizados siguiendo el método bayesiano de Rannala y Mountain, en el programa *GeneClass* versión 2 (Piry *et al.*, 2004).

En todos aquellos análisis en los que se realizó una comparación múltiple se aplicó la corrección de Bonferroni (Bonferroni, 1936).

RESULTADOS

Los principales resultados de este trabajo se presentan en forma de tres artículos científicos publicados y de acuerdo a los objetivos propuestos. Los artículos siguen el orden cronológico de publicación.

En el primer artículo, la estructura genética poblacional de la gamba roja, *Aristeus antennatus*, se examina a escala fina en el Mar Mediterráneo noroccidental durante el período de apareamiento. *Loci* microsatélite se aplicaron para estudiar los siete principales caladeros que corresponden a la GSA6, desde el Golfo de León hasta el Cabo de Palos. Este trabajo es el primero en detectar una alta conectividad genética entre las poblaciones estudiadas y descarta el Canal de Ibiza como posible barrera al flujo génico.

En el segundo artículo, se estudia mediante análisis genético la dispersión de los machos de la gamba roja, *A. antennatus*, en la localidad modelo Palamós. Este trabajo es el primero en cuantificar el reclutamiento a la pesquería y el aporte de otros caladeros cercanos, proporcionando datos útiles para la gestión de la pesquería en Palamós. El mayor porcentaje de los machos de Palamós han nacido en el caladero, mientras que un porcentaje menor proviene de caladeros próximos.

Dados los resultados genéticos obtenidos para la gamba roja, *A. antennatus*, en la época reproductiva (Artículo 1) y la falta de divergencia genética detectada, se decide extender el análisis de la diversidad y divergencia genética a la época estival, cuando se forman agregados de hembras desovadoras. Así, en el tercer artículo se describe una alta estabilidad temporal del patrón genético de conectividad explicado por la migración pasiva y activa de individuos.

Artículo 1

Genetic analyses reveal temporal stability and connectivity pattern in blue and red shrimp *Aristeus antennatus* populations.

Agulló M., Planella L., Vera M., Heras S., García-Marín J. L., Roldán M. I. (2020) *Scientific Reports*, 10: 21505. doi.org/10.1038/s41598-020-78634-2.



OPEN

Genetic analyses reveal temporal stability and connectivity pattern in blue and red shrimp *Aristeus antennatus* populations

Melania Agulló¹, Sandra Heras¹✉, José-Luis García-Marín¹, Manuel Vera², Laia Planella¹ & María Inés Roldán¹

Temporal variability of the genetic structure and connectivity patterns of the blue and red shrimp *Aristeus antennatus* in the seven most important fishing grounds of the Western Mediterranean Sea, were assessed using twelve microsatellite loci during 2 consecutive years (2016 and 2017), in a total of 1403 adult individuals. A high level of geographical connectivity among groups was observed in the two studied years. In fact, no significant geographical differentiation was found in 2016 ($F_{ST}=0.0018$, $p>0.05$), whereas it was indicated in 2017 ($F_{ST}=0.0025$, $p<0.05$). This small divergence in 2017 was not attributed to the distance among locations nor to the effect of the Ibiza Channel. Significant allele frequency changes were found at local level between the 2 years ($F_{CT}=0.0006$, $p<0.05$), mainly due to Blanes' fishing ground. Larval dispersal from the North to the South through the main superficial current supports the high level of connectivity pattern found. The temporal genetic instability detected in the Blanes' fishing ground could be explained by oceanographic temporary features. Our findings evidence only one biological unit in the study region and establish the baseline for an inter-federal management plan of *A. antennatus*.

The blue and red shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) has a wide distribution in the Western basin of the Mediterranean Sea¹, where it is the most eurybathic species, with a depth range from 80 to nearly 3000 m and a peak of abundance between 400 and 800 m^{2,3}. *Aristeus antennatus* mainly inhabits the muddy bottoms of the upper and middle slope where it is commercially exploited, but it is found also at the lower slope, non-exploited by fishery⁴. This species has temporal movements between the open slope and the margins of submarine canyons^{3,4}. Mature males and females form mating aggregations on the middle slope during the reproductive period⁴, which takes place in late spring and summer⁵. On the other hand, even though pelagic larval duration is still unknown in *A. antennatus*, all larval stages found in a few number of studies were in the upper layers of the water column [6 and references therein].

In the Western Mediterranean coast, the species has been intensively exploited by trawling fishery between depths of 400–800 m^{7,8} in the Catalan-Levantine coast, the Balearic Islands and Alborán Sea (Mediterranean Subareas GSA6, GSA5 and GSA1 respectively), being considered as one of the most important marine resources^{3,9} included in the priority species list for action by General Fisheries Commission for the Mediterranean Sea¹⁰. Nevertheless, the lack of an integral management plan for the species along the North-western Mediterranean coast¹¹ has implied that the management of *A. antennatus* has been applied locally^{12,13} without taking into account the genetic diversity and connectivity among populations and without identifying the conservation units, which should be required for a sustainable management of the species¹⁴.

Different molecular markers (allozymes, AFLP and mtDNA) have been used to identify population substructure of *A. antennatus* in the Mediterranean Sea, but they pointed out the Western Mediterranean Sea as a single genetic unit^{1,15–17}. Thus, in a fine-scale study, where the differentiation could be relatively small, more highly polymorphic molecular markers are required, such as microsatellites¹⁸. Although a set of eight microsatellite loci failed to establish any population structure in the blue and red shrimp in the Central Mediterranean Sea¹⁹, microsatellites have successfully been used to identify genetic stock in other marine penaeoid species, such as *Penaeus monodon*²⁰ and *Farfantepenaeus notialis*²¹. The presence of oceanographic discontinuities has been

ampus Lugo, 27002 Lugo, Spain. ✉email: sandra.heras@udg.edu

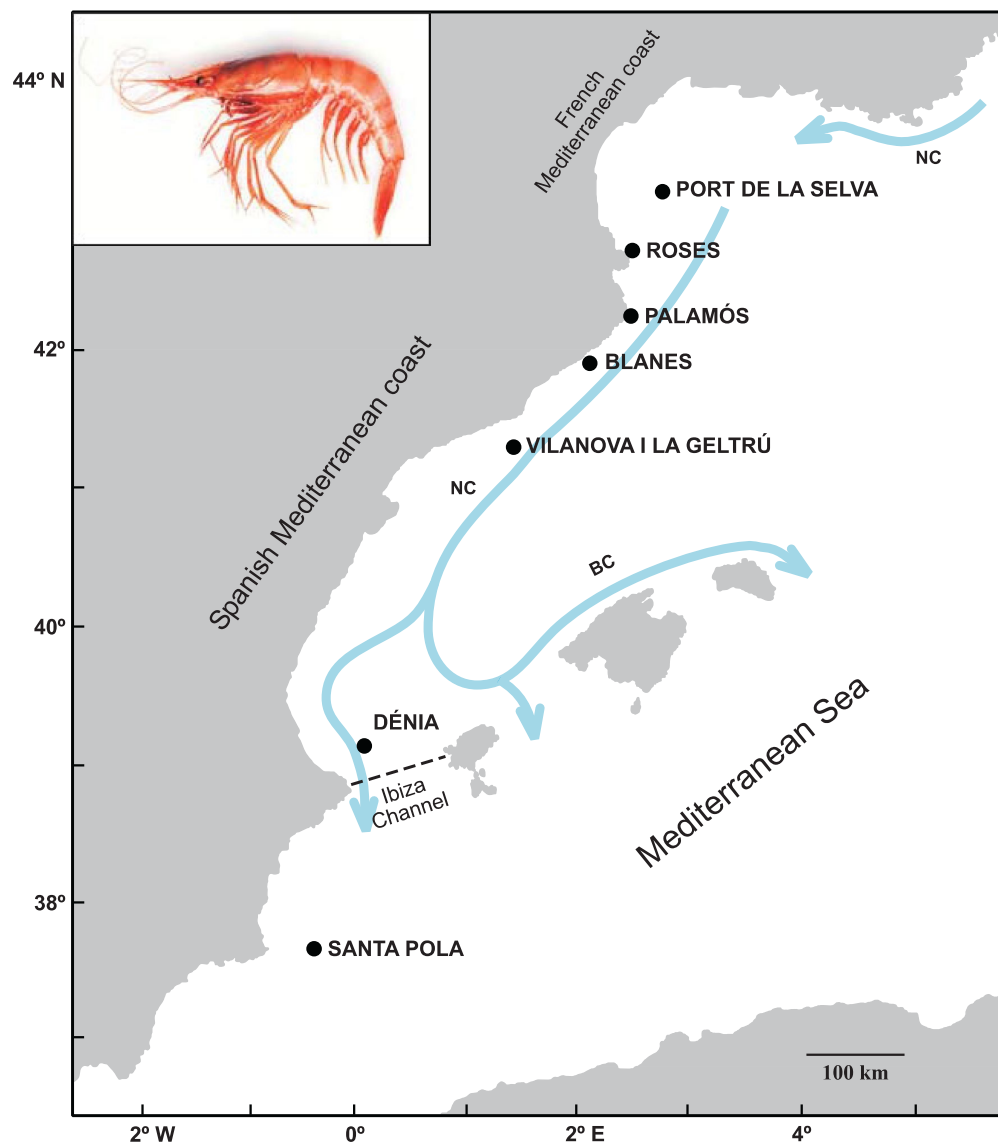


Figure 1. Sampling locations for *Aristeus antennatus* in the Mediterranean Sea used in this study. The dashed line represents the Ibiza Channel oceanographic barrier. Northern and Balearic currents (NC, BC) are shown as blue arrows. For further detail, see Table 1. This map was created from open IGN database (<http://www.ign.es/iberpix2/visor/>), using FreeHand MX 11.0 version.

identified as one of the main factors determining the genetic differentiation among populations in marine species, but dispersal by oceanic currents promotes connectivity among them^{22–24}. Along the Mediterranean coast of the Iberian Peninsula, the main surface current is the Northern Current, which flows south-westward to at least the Ibiza Channel²⁵, where a part of the flow crosses this channel towards the Alborán Sea, whereas most recirculates north-eastward to the Balearic Islands, forming the Balearic current²⁶. The Ibiza Channel (Fig. 1) is a passage between Ibiza island and the mainland at Cape La Nao, which due to its narrowness (80 km width and 800 m depth)²⁷ has been considered an oceanographic barrier limiting the dispersal of marine species and the genetic connectivity^{23,28}.

Temporal changes in the distribution along the water column, in the diet and the food consumption rates, in the abundance and fishery landings of *A. antennatus* at regional scale have been reported^{3,4,29,30}. It is particularly interesting to determine whether these changes are related to spatial and temporal variation on the genetic structure of *A. antennatus* populations, because a federal interest of integral management has been recently stated³¹ following the Food and Agriculture Organization recommendations³².

The main aim of this study was to describe the temporal stability of the genetic structure and connectivity patterns of *A. antennatus* among the most important fishing grounds in the North-western Mediterranean Sea, from the Gulf of Lions (France) to Cabo de Palos (Spain), using twelve microsatellite loci. We also analysed the influence of the Ibiza Channel as oceanographic barrier to the dispersion of individuals.

Results

Genetic diversity within samples. After the quality filtering, where individuals with less than eight genotyped loci were eliminated, 1386 out of 1403 individuals were used for further analysis (Table 2).

In all analysed samples, the twelve microsatellite loci were polymorphic, where the number of alleles per locus (N_A) ranged from 2 (locus *Aa496b* in all samples, and locus *Aa751* in ROS17) to 23 (locus *Aa138* in BLA16 and locus *Aa681* in VIG17) (Supplementary Table S1) with a mean of 9.1 alleles per locus per sample. Average allelic richness (A_R) ranged from 8.5 (ROS16) to 9.0 (SPO16) in 2016, and from 8.8 (DEN17) to 9.3 (PDS17 and PAL17) in 2017 (Table 2).

Observed heterozygosity (H_O) ranged from 0.440 (VIG16) to 0.486 (PAL16) among samples collected in 2016, and from 0.431 (DEN17) to 0.498 (VIG17) among those in 2017. The expected heterozygosity (H_E) was higher than H_O and ranged from 0.629 (DEN16) to 0.639 (PAL16 and SPO16) in 2016, and from 0.620 (VIG17) to 0.643 (PAL17) in 2017 (Table 2). Significant linkage disequilibrium was only detected in the pair of loci *Aa1255* and *Aa1061* in PAL16 after Bonferroni correction ($p < 0.0001$) but not in other locations. Therefore, all loci were included in further analyses.

Significant deviation from the Hardy Weinberg Equilibrium (HWE) occurred at 10 out of 12 loci at least in one sample, related to deficiency of heterozygote individuals (positive F_{IS} values, see Supplementary Table S1). Null alleles were detected in the samples with significant HWE deviations. However, estimated allele frequencies for null alleles were low, only the *Aa1255*, *Aa1444*, and *Aa818* loci had null allele frequencies higher than 0.2 in four, one and two samples, respectively (Supplementary Table S1). Nevertheless, given the lack of consistency among samples in the presence of null alleles, all loci were included in further analyses.

Geographical and temporal variation. There were no substantial differences in estimated F_{ST} values correcting, or not correcting, for the presence of null alleles. In fact, none of the pairwise F_{ST} comparisons between samples was significant after Bonferroni correction in year 2016. Among the 2017 samples, pairwise F_{ST} values including BLA17 were the highest and significant ones, although only the BLA17 and DEN17 comparison remained significant after Bonferroni correction (Table 3). Genetic and geographical distances were not correlated among 2016 samples ($r = -0.403$, $p = 0.057$) nor among the 2017 ones ($r = 0.056$, $p = 0.581$), indicating no signal of isolation by distance. For the two temporal collections, migration rates among samples suggested a high level of connectivity, but not related to the geographical proximity among locations (Fig. 2).

Using the Evanno's approach, the Bayesian clustering analysis revealed the most likely model to be $K = 4$ for 2016 and $K = 3$ for 2017. However, the distribution of the clusters across individuals did not show any geographical pattern in both collections (2016 and 2017) (Supplementary Fig. S1). An evaluation of the statistical power estimated a high probability (99.9–100% for chi-square and 99.6–100% for Fisher exact test) of detecting structure for a F_{ST} value of 0.0010–0.0025. This result suggests that our test would detect a real population structure if true estimates of F_{ST} were at this level. AMOVA results among the 2016 samples (unstructured 2016, Table 4) indicated that more than 99% of genetic diversity was shared among samples and only a small and not significant proportion was allocated to divergence among samples ($F_{ST} = 0.0018$, $p > 0.05$). Thus, no oceanographic groupings were tested further for 2016 collection. Otherwise, in the 2017 collection a small but significant divergence was detected among samples ($F_{ST} = 0.0025$, $p < 0.05$). Nevertheless, hierarchical analyses did not give support to the Ibiza Channel as a barrier to *A. antennatus* dispersal (2017 two regions, Table 4).

The AMOVA analysis for temporal variation (Table 4) assigned a significant percentage of variation to the temporal component ($F_{CT} = 0.0006$, $p < 0.05$). However, at the local level, significant differentiation between 2016 and 2017 was restricted to the Blanes' fishing ground ($F_{ST} = 0.0048$, $p < 0.05$) (Supplementary Table S2).

Discussion

Our mean observed and expected heterozygosities ($H_O = 0.468$, $H_E = 0.633$) were in accordance with recent studies using the same set of microsatellite loci ($H_O = 0.443$, $H_E = 0.611$ recalculated excluding *Aa421*³³; $H_O = 0.458$, $H_E = 0.628$ ³⁴). The mean number of alleles per locus and sample ($N_A = 9.1$, Table 2) was slightly higher than reported previously with the same microsatellite loci ($N_A = 7.9$ recalculated excluding *Aa421*³³; $N_A = 7.8$ ³⁴), probably due to the sample size in our study almost doubling the one in those previous studies. Higher diversity levels were observed in Italian and Algerian *A. antennatus* samples using eight distinct loci ($H_O = 0.650$, $H_E = 0.800$ ¹⁹). Nevertheless, our results were similar to those reported in other shrimp species, such as *AcanthePHYRA pelagica* from the Atlantic coast of Canada ($N_A = 9.3$, $H_O = 0.473$, $H_E = 0.562$ ³⁵), the deep-sea shrimp *Rimicaris hybisae* from the Caribbean Sea ($N_A = 8.2$, $H_O = 0.525$, $H_E = 0.582$ ³⁶) and *Melicertus kerathurus* from the Mediterranean Sea and the North-eastern Atlantic Ocean ($N_A = 16.0$, $H_O = 0.455$, $H_E = 0.572$ ³⁷).

A common feature of studies on penaeids is a significant deficit of observed heterozygosity³⁸. In the present study the fourteen samples showed a general heterozygote deficit, resulting in the high positive F_{IS} values (Table 2). There are some factors that could be responsible for these deviations from HWE genotypic proportions, such as inbreeding, null alleles or subpopulation structure. According to a recent study about the mating structure of *A. antennatus*, most of the mating individuals of the spawning groups are not related³³, so we did not consider inbreeding to be the cause of the HWE disequilibrium found in our results. Null alleles could explain the heterozygote deficiency, according to our results showed by Micro-checker (Supplementary Table S1). The Wahlund effect cannot be ruled out as one reason for heterozygote deficiency, due to the possibility of having

sampled genetically differentiated subpopulations or cohorts simultaneously, as it was pointed out previously for *A. antennatus*³³. Overall, our results from pairwise F_{ST} , Isolation by distance, relative migration networks, Bayesian analysis and AMOVAs, showed a high connectivity pattern of *A. antennatus* fishing grounds (Tables 3, 4, Fig. 2 and Supplementary Fig. S1). A result in accordance with the genetic homogeneity previously reported among the Western Mediterranean Basin red and blue shrimp populations from allozyme¹⁵, mitochondrial (16S rDNA, COI and control region^{1,16,39}) and microsatellites diversity¹⁹. In a recent study using the same set of microsatellite loci, genetic differentiation between the Alborán Sea and the remainder Western Mediterranean Basin was detected³⁴. However, their results did not point out any significant differentiation among the only three samples of the Spanish Mediterranean coast, whereas our results indicated some degree of differentiation in the 2017 temporal collection (Tables 3, 4). The pelagic life stages are considered the main dispersal mechanism in many marine species including crustaceans^{40,41}. To date, the pelagic larval duration of *A. antennatus* is still unknown, but extrapolating from other closely related species such as *Aristaeomorpha foliacea* whose pelagic larval duration could last between 3 and 6 weeks⁴², *A. antennatus* may have a long pelagic larval duration, and therefore, high dispersal potential⁴¹. The larvae dispersal could be mainly driven by the Northern Current, which flows throughout the North-western Mediterranean coast (Fig. 1) from the Ligurian Sea and continues south of the Ibiza Channel. The Ibiza Channel is considered a seasonal oceanographic barrier because it is thought to have more force in reducing gene flow between populations during spring and early summer^{25,27}. The seasonality is due to the presence of the Western Intermediate Water, which forms an anticyclonic gyre in the northern part of the Ibiza Channel. The gyre reduces or even blocks the southward progression of the Northern Current through this channel, and instead enhances the north-eastward recirculation to the Balearic current^{25,27}. Hence, the Ibiza Channel may restrict the southward dispersal of those species with reproductive time and larval pelagic stages during that period, as it has been observed for the comber fish *Serranus cabrilla*²³, the red gorgonian *Paramuricea clavata*⁴³ and the swimming crab *Liocarcinus depurator*²⁸. Instead, for species whose reproductive period is during late summer such as the dusky grouper fish, *Epinephelus marginatus*, the Ibiza Channel does not seem to prevent gene flow⁴⁴. Usually, the reproduction of *A. antennatus* takes place from May until October, being maximum from June to September⁵, which means that during the last months of the *A. antennatus* reproductive season, the Ibiza Channel is not acting as a barrier preventing the southward larval transport.

Several factors may explain the temporal genetic instability detected in Blanes' fishing ground between 2016 and 2017 collections (Table 4 and Supplementary Table S2). One feasible reason could be a variation in the age composition of the samples between years. *Aristeus antennatus*' age is inferred by the cephalothorax length (CL), where each modal size class is related to an age class^{7,45}. Our samples are mainly composed of 2-year-old individuals as showed by their mean CL (Supplementary Fig. S2). Besides, unpaired two-sided Student's *t*-tests performed at each location to compare the individuals' CL indicated a widespread variation between temporal collections (Supplementary Table S3), where the CLs variation found in Palamós' fishing ground had a similar pattern to the variation in Blanes, however in Palamós the results indicated genetic stability. Therefore, the temporal variation found in Blanes is most likely due to a hydro-biological matter.

Special attention should be given to the role of submarine canyons, taking into account the fact that they are considered to serve as nursery, refuge and recruitment grounds for *A. antennatus*^{46,47}. Furthermore, it has been indicated that submarine canyons provide habitat heterogeneity because hydrodynamics differs between them^{47,48}, so Blanes canyon may have specific physical features which combined with micro-oceanographic characteristics may causing a temporal decrease in gene flow with the surrounding areas. In fact, unlike other nearby submarine canyons such as La Fonera canyon (Palamós) and Cap de Creus canyon (Roses) where water flow has cyclonic vorticity, in Blanes canyon an anticyclonic eddy has been detected, which can cause a northward direction against the main southward water circulation^{49,50}. Indeed, Clavel-Henry et al.⁴⁸ applying different biophysical models in order to estimate potential connections between North-western Mediterranean fishing grounds of *A. antennatus*, confirmed that singular features in submarine canyons could have an important role in the species dispersal. For instance, in the open slope at the south of Blanes canyon a northward circulation of particles was detected due to the anticyclonic eddy in Blanes area⁴⁸. Another explanation could be the cascading event, an intense dense shelf water mass formed in the Gulf of Lions and the subsequent downslope cascade, which occurs periodically during dry and cold winters³⁰. Cascading events have been related to an increase in *A. antennatus* recruitment inside the North-western Mediterranean submarine canyons in the following years after a cascading event³¹, including Blanes canyon³². Nevertheless, this could be ruled out not only because the last cascading event (2012–2013) was some years before our collections^{53,54}, but also because it did not have a significant effect in the Blanes canyon⁵⁵. Additionally, the anthropogenic effects on submarine canyons have been deeply discussed. The bottom trawling activities have a direct effect on the ecological dynamics of the submarine canyons, causing physical disturbances which are variable over time and changes in density and composition of different meiofaunal species, as noticed in Blanes canyon^{47,55}.

In conclusion, despite the temporal differentiation found in Blanes' fishing ground, in the present study we identified a high level of genetic connectivity of *A. antennatus* from the Gulf of Lions (France) to Cabo de Palos (Spain). From a fisheries perspective, we advise considering *A. antennatus* in the North-western Mediterranean coast as one biological unit for stock assessment, and promoting coordinated fishery management plans. Taking the genetic information into account for future management advice would be of significant help to design an effective inter-federal management policy, and therefore a long term sustainability of the fishery resource would be ensured^{14,22}.

Location	Sample code	Fishing ground	Geographical coordinates	Sampled year	Depth (m)	N
Port de la Selva	PDS16	Avión	42° 44' 59" N 3° 41' 20" E	2016	575	100
	PDS17			2017	575	98
Roses	ROS16	Cap de Creus	42° 21' 17" N 3° 24' 22" E	2016	600	100
	ROS17			2017	600	100
Palamós	PAL16	Sant Sebastià	41° 54' 04" N 3° 16' 08" E	2016	500	103
	PAL17			2017	530	100
Blanes	BLA16	La Rocassa	41° 35' 85" N 2° 50' 56" E	2016	550	100
	BLA17			2017	550	100
Vilanova i la Geltrú	VIG16	Can Pere Negre	41° 03' 18" N 2° 03' 10" E	2016	700	100
	VIG17			2017	600	100
Dénia	DEN16	Dénia's fishing ground	39° 02' 54" N 0° 24' 19" E	2016	611	102
	DEN17			2017	630	100
Santa Pola	SPO16	Playa Nueva	37° 37' 05" N 0° 14' 06" W	2016	-	100
	SPO17			2017	550	100

Table 1. Description of the analysed *A. antennatus* samples, including geographical coordinates, sampled year, depth and sample size (N).

Location	Sample code	n	N_A	A_R	H_O	H_E	F_{IS}
Port de la Selva	PDS16	98	8.8	8.7	0.446	0.638	0.303
	PDS17	97	9.5	9.3	0.476	0.632	0.247
Roses	ROS16	99	8.7	8.5	0.477	0.630	0.243
	ROS17	99	9.2	9.0	0.494	0.631	0.216
Palamós	PAL16	101	8.9	8.7	0.486	0.639	0.240
	PAL17	100	9.5	9.3	0.454	0.643	0.295
Blanes	BLA16	98	9.1	8.9	0.474	0.634	0.252
	BLA17	100	9.2	9.0	0.473	0.634	0.254
Vilanova i la Geltrú	VIG16	97	8.9	8.7	0.440	0.631	0.302
	VIG17	100	9.2	9.0	0.498	0.620	0.197
Dénia	DEN16	100	9.0	8.8	0.447	0.629	0.290
	DEN17	99	8.9	8.8	0.431	0.629	0.315
Santa Pola	SPO16	98	9.2	9.0	0.476	0.639	0.256
	SPO17	100	9.3	9.1	0.483	0.632	0.236

Table 2. Genetic diversity within samples. Number of genotyped individuals (n); mean number of alleles detected (N_A); mean allelic richness (A_R); mean observed heterozygosity (H_O); mean expected heterozygosity (H_E); inbreeding coefficient (F_{IS}).

Material and methods

Sampling collection and DNA extraction. Sampling was coordinated by the CONECTA-GEN project (Roldán 2014). Locations were chosen because of the large quantity of historical *A. antennatus* fisheries information and the interest of the Spanish Government to start an integrated management plan^{11–13,31}. A total of 1403 adults were collected at seven Mediterranean locations (fishing grounds): Port de la Selva, Roses, Palamós, Blanes, Vilanova i la Geltrú, Dénia, and Santa Pola (Table 1). A sample of 100 adult individuals (~50♀; 50♂) was obtained from local fishermen at each location during winter season in 2016 and 2017 years (Table 1; Fig. 1). A portion of about 10 mg of muscle tissue from each individual was preserved in 70% ethanol until DNA extraction was performed using the modified phenol–chloroform protocol outlined in Fernández et al.³⁶

Molecular markers. A set of twelve polymorphic microsatellite loci split into three multiplex PCRs and one singleplex PCR were used: *Aa138*, *Aa1255*, *Aa956*, *Aa496b*, *Aa123*, *Aa681*, *Aa667*, *Aa1444*, *Aa751*, *Aa818*, *Aa1061*, and *Aa1195*^{33,37}. Microsatellite loci were amplified using approximately 30 ng of template DNA in 10 µl final volume, following the methodology described in Planella et al.³³. PCR products were analysed in an ABI PRISM 3730xl automatic sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) at the sequencing unit of the University of Santiago de Compostela (Campus Lugo). Allele scoring was performed with GeneMapper 4.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA), using the LIZ 500 (Applied Biosystems) as size standard.

2016		PDS16	ROS16	PAL16	BLA16	VIG16	DEN16	SPO16
	PDS16	–	0.447	0.379	0.653	0.017	0.579	0.663
	ROS16	0.0014	–	0.123	0.212	0.785	0.506	0.982
	PAL16	0.0016	0.0030	–	0.166	0.006	0.297	0.167
	BLA16	0.0006	0.0024	0.0026	–	0.076	0.773	0.809
	VIG16	0.0054	0.0000	0.0062	0.0038	–	0.391	0.729
	DEN16	0.0010	0.0011	0.0020	0.0001	0.0017	–	0.913
	SPO16	0.0006	0.0000	0.0026	0.0000	0.0003	0.0000	–
2017		PDS17	ROS17	PAL17	BLA17	VIG17	DEN17	SPO17
	PDS17	–	0.985	0.600	0.113	0.874	0.688	0.926
	ROS17	0.0000	–	0.667	0.015	0.983	0.423	0.372
	PAL17	0.0008	0.0005	–	0.014	0.909	0.017	0.187
	BLA17	0.0030	0.0050	0.0052	–	0.017	0.000	0.031
	VIG17	0.0000	0.0000	0.0000	0.0047	–	0.068	0.622
	DEN17	0.0005	0.0014	0.0052	0.0095	0.0036	–	0.216
	SPO17	0.0000	0.0014	0.0025	0.0043	0.0005	0.0025	–

Table 3. Pairwise F_{ST} values between the seven samples (below the diagonal) and p values (above the diagonal) for the two temporal collections. Sample codes are given in Table 1. Significance after Bonferroni correction indicated in bold ($p < 0.0024$).

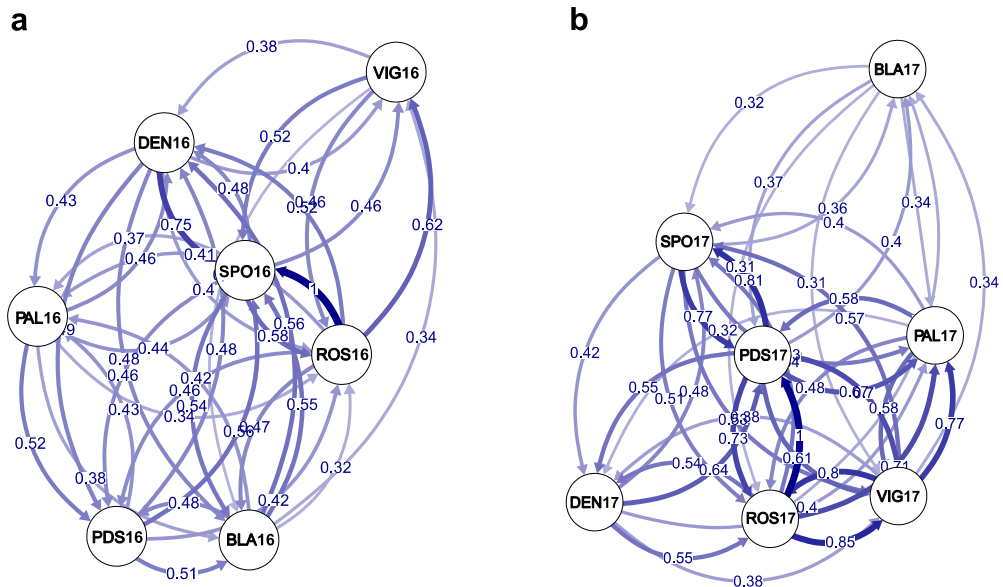


Figure 2. Relative migration networks estimated by divMigrate-online. Filter threshold was set to 0.3. Circles represent samples, while arrows indicate the direction and magnitude of relative migration levels using Nm estimator. Thicker arrows indicate stronger migration. Sample codes as in Table 1. (a) Illustrates 2016 collection, (b) illustrates 2017 collection.

Genetic analysis. Genetic diversity within each sample was described by the mean number of alleles per locus (N_A) and the allelic richness (A_R) calculated using FSTAT v. 2.9.3⁵⁸, and the average among loci of the observed and expected heterozygosity (H_O , H_E) using Genepop v. 4.6⁵⁹. Deviations of observed genotype proportions from expected under HWE were summarized using the inbreeding coefficient F_{IS} ⁶⁰ and its significance was statistically checked using the exact probability test of Guo and Thompson⁶¹ implemented in Genepop v. 4.6⁵⁹. Genotypic linkage disequilibrium between all pairs of loci was tested with Genepop v. 4.6⁵⁹, using a Fisher's exact test with 10,000 dememorizations and 5000 iterations per batch. The Bonferroni correction was used to adjust significance levels for multiple simultaneous comparisons. The presence of null alleles was assessed with the software Micro-Checker v. 2.2.3⁶² by performing 1000 randomizations.

Hypothesis	Source of variation	Sum of squares	Variance components	% variation	F-statistic	p value
2016 unstructured	Among samples	30.47	0.007	0.177	$F_{ST} = 0.0018$	0.270
	Within samples	5115.67	3.793	99.823		
2017 unstructured	Among samples	33.34	0.009	0.249	$F_{ST} = 0.0025$	0.035
	Within samples	5138.82	3.782	99.751		
I—Oceanographic groupings						
2017 Two regions ^a	Between regions	7.17	0.003	0.090	$F_{CT} = 0.0009$	0.135
(PDS17, ROS17, PAL17, BLA17, VIG17) (DEN17, SPO17)	Among samples within regions	26.18	0.008	0.206	$F_{SC} = 0.0021$	0.134
	Within samples	5138.82	3.782	99.704	$F_{ST} = 0.0030$	0.035
2017 Two regions ^b	Between regions	4.92	-0.003	-0.066	$F_{CT} = 0.0000$	0.514
(PDS17, ROS17, PAL17, BLA17, VIG17, DEN17) (SPO17)	Among samples within regions	28.43	0.010	0.269	$F_{SC} = 0.0027$	0.031
	Within samples	5138.82	3.782	99.797	$F_{ST} = 0.0020$	0.034
II—Temporal variation						
2016 versus 2017	Between temporal collections	8.12	0.002	0.056	$F_{CT} = 0.0006$	0.027
	Among samples within temporal collections	63.81	0.008	0.211	$F_{SC} = 0.0021$	0.054
	Within samples	10,254.49	3.785	99.733	$F_{ST} = 0.0027$	0.009

Table 4. Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) with different grouping criteria. Sample codes as in Table 1. Hypothesis I variation within and among different oceanographic groupings and hypothesis II between temporal collections. In bold, significant p values (< 0.05). ^aDénia included in the southward region of the Ibiza Channel. ^bDénia included in the northward region of the Ibiza Channel.

Pairwise genetic differentiation between samples (F_{ST}) were calculated using the software Arlequin v. 3.5⁶³ with 10,000 permutations to test significance. We applied the Bonferroni correction for multiple comparisons. F_{ST} values corrected for the presence of null alleles and its significance were estimated using the FreeNA software⁶⁴. Hierarchical analyses of molecular variance (AMOVA⁶⁵) as implemented in Arlequin v.3.5⁶³ were performed to assess oceanographic and temporal divergence among samples. The oceanographic grouping considers the Ibiza Channel as an oceanographic barrier isolating fishing areas located northward and southward (Fig. 1). As the Dénia's fishing ground is the closest location to the Ibiza Channel, we performed two hierarchical oceanographic groupings, the first one included Dénia in the southward region of the channel, and the second grouping included Dénia in the northward region. The hierarchical temporal grouping was used to check whether geographical structure was maintained over time. The significance of the tests was assessed by permutation with 10,000 replicates. A Bayesian clustering analysis was performed applying the admixture model implemented in STRUCTURE v. 2.3.4⁶⁶ to infer the underlying population structure. Ten independent runs were made for each number of genetic clusters ($K = 1-8$) where each run consisted of a burn-in period length of 50,000 iterations followed by 200,000 Markov chain Monte Carlo iterations. The most likely number of K was selected according to the Evanno's method⁶⁷ implemented in STRUCTURE HARVESTER⁶⁸.

The software POWSIM v. 4.1⁶⁹ was used to assess the statistical power of our set of loci to detect significant genetic differentiation for the present sample sizes, number of loci and their allele frequencies, by both Pearson's chi-square and Fisher exact tests (1000 dememorizations, 100 batches, and 1000 iterations) and 1000 replicates. We explored a range of different values for F_{ST} by varying the number of generation of drift (t). The percentage of significant outcomes was interpreted as the power of the tests for detecting the defined level of genetic divergence. The effective population size (N_e) was estimated for each sample using the bias-corrected version of the method based on linkage disequilibrium^{70,71} as implemented in NeEstimator v. 2.1⁷². Ten out of the fourteen samples had an infinite N_e , so the selected N_e to assess the statistical power of our loci to detect genetic differentiation was 10,000.

Isolation by distance (IBD) among fishing grounds was assessed from the correlation between genetic and geographical distance matrices among studied locations. Pairwise genetic differentiation was linearized as $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ ⁷³. The geographical distances were measured as the shortest coastline between locations in kilometres. The statistical significance was assessed by Mantel tests with 10,000 permutations using the software NTSYSpc v. 2.1⁷⁴.

Using divMigrate-online⁷⁵, the relative direction and magnitude of migration between samples for each temporal collection were summarized as a network from the estimated effective number of migrants (Nm).

Data availability

All data are included in the article.

Received: 14 June 2020; Accepted: 24 November 2020

Published online: 09 December 2020

References

1. Fernández, M. V., Heras, S., Maltagliati, E., Turco, A. & Roldán, M. I. Genetic structure in the blue and red shrimp *Aristeus antennatus* and the role played by hydrographical and oceanographical barriers. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **421**, 163–171 (2011).

2. Campillo, A. Bio-ecology of *Aristeus antennatus* in the French Mediterranean. in *Proceedings of the International Workshop on Life Cycles and Fisheries of the Deep-water Red Shrimps *Aristaeomorpha foliacea* and *Aristeus antennatus** (ed. Bianchini, M. L. & Ragonese, S.) 25–26 (I.T.P.P. Spec. Publ., Mazara del Vallo, Italy, 1994).
3. Sardà, F. *et al.* An introduction to Mediterranean deep-sea biology. *Sci. Mar.* **68**, 7–38 (2004).
4. Sardà, F., Company, J. B. & Castellón, A. Intraspecific aggregation structure of a shoal of a Western Mediterranean (Catalan coast) deep-sea shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816), during the reproductive period. *J. Shellfish Res.* **22**, 569–579 (2003).
5. García-Rodríguez, M. & Esteban, A. On the biology and fishery of *Aristeus antennatus* (Risso, 1816), (Decapoda, Dendrobranchiata) in the Ibiza Channel (Balearic Islands, Spain). *Sci. Mar.* **63**, 27–37 (1999).
6. Carreton, M. *et al.* Morphological identification and molecular confirmation of the deep-sea blue and red shrimp *Aristeus antennatus* larvae. *PeerJ* **7**, e6063 (2019).
7. Carbonell, A., Carbonell, M., Demestre, M., Grau, A. & Monserrat, S. The red shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) fishery and biology in the Balearic Islands, Western Mediterranean. *Fish. Res.* **44**, 1–13 (1999).
8. Maynou, F. Environmental causes of the fluctuations of red shrimp (*Aristeus antennatus*) landings in the Catalan Sea. *J. Mar. Syst.* **71**, 294–302 (2008).
9. Massutí, E. *et al.* The influence of oceanographic scenarios on the population dynamics of demersal resources in the western Mediterranean; hypothesis for hake and red shrimp off Balearic Islands. *J. Mar. Syst.* **71**, 421–438 (2008).
10. Food and Agriculture Organization. General Fisheries Commission for the Mediterranean; Report of the ninth session of the Scientific Advisory Committee. *FAO Fish. Rep.* **814**, 1–106 (2006).
11. Boletín Oficial del Estado. Orden AAA/2808/2012, de 21 de diciembre, por la que se establece un Plan de Gestión Integral para la conservación de los recursos pesqueros en el Mediterráneo afectados por las pesquerías realizadas con redes de cerco, redes de arrastre y artes fijos y menores, para el período 2013–2017. *BOE* **313**, 89468–89475 (2012).
12. Boletín Oficial del Estado. 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. *BOE* **126**, 40016–40022 (2013).
13. Boletín Oficial del Estado. Orden APM/532/2018, de 25 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. *BOE* **128**, 55045–55051 (2018).
14. Waples, R. S., Punt, A. E. & Cope, J. M. Integrating genetic data into management of marine resources: how can we do it better?. *Fish. Fish.* **9**, 423–449 (2008).
15. Sardà, F., Bas, C., Roldán, M. I., Pla, C. & Leonart, J. Enzymatic and morphometric analyses in mediterranean populations of the rose shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **221**, 131–144 (1998).
16. Roldán, M. I., Heras, S., Patellani, R. & Maltagliati, F. Analysis of genetic structure of the red shrimp *Aristeus antennatus* from the Western Mediterranean employing two mitochondrial regions. *Genetica* **136**, 1–4 (2009).
17. Lo Brutto, S., Maggio, T., Delana, A. M., Cannas, R. & Arculeo, M. 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 (2012).
18. Wright, J. M. & Bentzen, P. Microsatellites: genetic markers for the future. *Rev. Fish. Biol. Fish.* **4**, 384–388 (1994).
19. Cannas, R. *et al.* Genetic variability of the blue and red shrimp *Aristeus antennatus* in the Western Mediterranean Sea inferred by DNA microsatellite loci. *Mar. Ecol.* **33**, 350–363 (2012).
20. You, E.-M. *et al.* Microsatellite and mitochondrial haplotype diversity reveals population differentiation in the tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Indo-Pacific region. *Anim. Genet.* **39**, 267–277 (2008).
21. Robainas-Barcia, A. *et al.* Spatiotemporal genetic differentiation of Cuban natural populations of the pink shrimp *Farfantepenaeus notialis*. *Genetica* **133**, 283–294 (2008).
22. Hauser, L. & Carvalho, G. R. Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. *Fish. Fish.* **9**, 333–362 (2008).
23. Schunter, C. *et al.* Matching genetics with oceanography: directional gene flow in a Mediterranean fish species. *Mol. Ecol.* **20**, 5167–5181 (2011).
24. Vera, M. *et al.* Current genetic status, temporal stability and structure of the remnant wild European flat oyster populations: conservation and restoring implications. *Mar. Biol.* **163**, 239 (2016).
25. García-Ladona, E. Currents in the Western Mediterranean basin. In *Atlas of Bedforms in the Western Mediterranean* (eds Guillén, J. *et al.*) 41–47 (Springer, Cham, 2017).
26. Fernández, V., Dietrich, D. E., Haney, R. L. & Tintoré, J. Mesoscale, seasonal and interannual variability in the Mediterranean Sea using a numerical ocean model. *Prog. Oceanogr.* **66**, 321–340 (2005).
27. Pinot, J.-M., López-Jurado, J. L. & Riera, M. The Canales experiment (1996–1998). Interannual, seasonal and mesoscale variability of the circulation in the Balearic Channels. *Prog. Oceanogr.* **55**, 335–370 (2002).
28. García-Merchán, V. H. *et al.* Phylogeographic patterns of decapod crustaceans at the Atlantic-Mediterranean transition. *Mol. Phylogenet. Evol.* **62**, 664–672 (2012).
29. Cartes, J. E., Madurell, T., Fanelli, E. & López-Jurado, J. L. Dynamics of suprabenthos-zooplankton communities around the Balearic Islands (western Mediterranean): influence of environmental variables and effects on the biological cycle of *Aristeus antennatus*. *J. Mar. Syst.* **71**, 316–335 (2008).
30. Company, J. B. *et al.* Climate influence on deep sea populations. *PLoS ONE* **3**, e1431 (2008).
31. Direcció General d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació. *Programa d'Acció Marítima. Estratègia marítima de Catalunya 2030—Pla Estratègic 2018–2021* (2018).
32. Food and Agriculture Organization. General Fisheries Commission for the Mediterranean; Report of the nineteenth session of the Scientific Advisory Committee on Fisheries. *FAO Fish. Rep.* **1209**, 1–174 (2017).
33. Planella, L., Vera, M., García-Marin, J.-L., Heras, S. & Roldán, M. I. Mating structure of the blue and red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) characterized by relatedness analysis. *Sci. Rep.* **9**, 7227 (2019).
34. Heras, S., Planella, L., García-Marin, J.-L., Vera, M. & Roldán, M. I. Genetic structure and population connectivity of the blue and red shrimp *Aristeus antennatus*. *Sci. Rep.* **9**, 13531 (2019).
35. Jorquera, E., Anstey, L., Paterson, I., Kenchington, E. & Ruzzante, D. E. Isolation and characterization of 26 novel microsatellite loci in the deep-sea shrimp *Acanthephyra pelagica*. *Conserv. Genet. Resour.* **6**, 731–733 (2014).
36. Jacobson, A., Plouviez, S., Thaler, A. D. & Van Dover, C. L. Characterization of 13 polymorphic microsatellite loci in *Rimicaris hybisae*, a shrimp from deep-sea hydrothermal vents. *Conserv. Genet. Resour.* **5**, 449–451 (2013).
37. Arculeo, M., Pellerito, R. & Bonhomme, F. Isolation and use of microsatellite loci in *Melicertus kerathurus* (Crustacea, Penaeidae). *Aquat. Living Resour.* **23**, 103–107 (2010).
38. Benzie, J. A. H. Population genetic structure in penaeid prawns. *Aquac. Res.* **31**, 95–119 (2000).
39. Maggio, T., Lo Brutto, S., Cannas, R., Deiana, A. M. & Arculeo, M. Environmental features of deep-sea habitats linked to the genetic population structure of a crustacean species in the Mediterranean Sea. *Mar. Ecol.* **30**, 354–365 (2009).
40. Palumbi, S. R. Marine reserves and ocean neighbourhoods: the spatial scale of marine populations and their management. *Annu. Rev. Environ. Resour.* **29**, 31–68 (2004).
41. Anger, K. Contributions of larval biology to crustacean research: a review. *Invertebr. Reprod. Dev.* **49**, 175–205 (2006).
42. Palmas, F., Olita, A., Addis, P., Sorgente, R. & Sabatini, A. Modelling giant red shrimp larval dispersal in the Sardinian seas: density and connectivity scenarios. *Fish. Oceanogr.* **26**, 364–378 (2017).

43. Mokhtar-Jamaï, K. *et al.* From global to local genetic structuring in the red gorgonian *Paramuricea clavata*: the interplay between oceanographic conditions and limited larval dispersal. *Mol. Ecol.* **20**, 3291–3305 (2011).
44. Schunter, C. *et al.* Genetic connectivity patterns in an endangered species: The dusky grouper (*Epinephelus marginatus*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **401**, 126–133 (2011).
45. Carbonell, A. Evaluación de la gamba rosada, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816), en el Mar Balear. (University of the Balearic Islands, Mallorca, Spain, 2005).
46. Sardà, F., Company, J. B., Rotllant, G. & Coll, M. Biological patterns and ecological indicators for Mediterranean fish and crustaceans below 1,000 m: a review. *Rev. Fish. Biol. Fish.* **19**, 329–347 (2009).
47. Paradis, S. *et al.* Spatial distribution of sedimentation-rate increases in Blanes Canyon caused by technification of bottom trawling fleet. *Prog. Oceanogr.* **169**, 241–252 (2018).
48. Clavel-Henry, M. *et al.* Influence of the summer deep-sea circulations on passive drifts among the submarine canyons in the northwestern Mediterranean Sea. *Ocean. Sci.* **15**, 1745–1759 (2019).
49. Masó, M. & Tintoré, J. Variability of the shelf water off the northeast Spanish coast. *J. Mar. Syst.* **1**, 441–450 (1991).
50. Ahumada-Sempol, M.-A., Flexas, M. M., Bernardello, R., Bahamon, N. & Cruzado, A. Northern Current variability and its impact on the Blanes Canyon circulation: a numerical study. *Prog. Oceanogr.* **118**, 61–70 (2013).
51. Fernandez-Arcaya, U. *et al.* Ecological role of submarine canyons and need for canyon conservation: a review. *Front. Mar. Sci.* **4**, 1–26 (2017).
52. Zúñiga, D. *et al.* Particle fluxes dynamics in Blanes submarine canyon (Northwestern Mediterranean). *Prog. Oceanogr.* **82**, 239–251 (2009).
53. Durrieu de Madron, X. *et al.* Interaction of dense shelf water cascading and open-sea convection in the northwestern Mediterranean during winter 2012. *Geophys. Res. Lett.* **40**, 1379–1385 (2013).
54. Cisneros, M. *et al.* Deep-water formation variability in the north-western Mediterranean Sea during the last 2500 yr: a proxy validation with present-day data. *Glob. Planet. Change* **177**, 56–68 (2019).
55. Román, S. *et al.* High spatiotemporal variability in meiofaunal assemblages in Blanes Canyon (NW Mediterranean) subject to anthropogenic and natural disturbances. *Deep. Sea Res Part I Oceanogr. Res. Pap.* **117**, 70–83 (2016).
56. Fernández, M. V., Heras, S., Maltagliati, F. & Roldán, M. I. Deep genetic divergence in giant red shrimp *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1827) across a wide distributional range. *J. Sea. Res.* **76**, 146–153 (2013).
57. Heras, S. *et al.* Development and characterization of novel microsatellite markers by Next Generation Sequencing for the blue and red shrimp *Aristeus antennatus*. *PeerJ* **4**, e2200 (2016).
58. Goudet, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Accessed 20 Nov 2019; <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> (2001).
59. Rousset, F. GENEPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* **8**, 103–106 (2008).
60. Weir, B. S. & Cockerham, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358–1370 (1984).
61. Guo, S. W. & Thompson, E. A. Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* **48**, 361–372 (1992).
62. Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M. & Shipley, P. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* **4**, 535–538 (2004).
63. Excoffier, L. & Lischer, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* **10**, 564–567 (2010).
64. Chapuis, M.-P. & Estoup, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 621–631 (2007).
65. Excoffier, L., Smouse, P. E. & Quattro, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**, 479–491 (1992).
66. Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945–959 (2000).
67. Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* **14**, 2611–2620 (2005).
68. Earl, D. A. & vonHoldt, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* **4**, 359–361 (2012).
69. Ryman, N. & Palm, S. POWSIM: a computer program for assessing statistical power when testing for genetic differentiation. *Mol. Ecol. Notes* **6**, 600–602 (2006).
70. Hill, W. G. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genet. Res.* **38**, 209–216 (1981).
71. Waples, R. S. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conserv. Genet.* **7**, 167–184 (2006).
72. Do, C. *et al.* NeEstimator V2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (*N_e*) from genetic data. *Mol. Ecol. Resour.* **14**, 209–214 (2014).
73. Rousset, F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**, 1219–1228 (1997).
74. Rohlf, F. J. *NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*, Version 2.1. Setauket, New York (1993).
75. Sundqvist, L., Keenan, K., Zackrisson, M., Prödöhl, P. & Kleinhans, D. Directional genetic differentiation and relative migration. *Ecol. Evol.* **6**, 3461–3475 (2016).

Acknowledgements

We gratefully thank the ship-owners Francisco Torné (Eli-Hermi II), Manel Noguera (Port de Roses), Conrad Massequer (Nova Gasela), Pere Pérez (Peret II), Marc Pons (Avi Salvador), Rafael Montoya (Avi Pau), Juan Antonio Sepulcre (La androna) and Jorge Castejón (Isabel y Andrés) for assistance in sampling collection. This work was supported by a grant from Spanish *Ministerio de Economía y Competitividad* (CTM2014-54648-C2-2-R) to MIR. LP and MA benefited from predoctoral fellowship from the *Universitat de Girona* (BR2014 and IFUDG2018, respectively). *A. antennatus* image in Fig. 1 was taken by Francesc Rabat.

Author contributions

All authors conceived the ideas and designed the study. M.A. Collected the data, analysed the data and wrote the original manuscript draft. All authors revised the manuscript for significant intellectual content and approved the final version.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Artículo 2

Male deep-sea shrimps *Aristeus antennatus* at fishing grounds: Growth and first evaluation of recruitment by multilocus genotyping.

Abras A., García-Marín J. L., Heras S., Vera M., Agulló M., Planella L., Roldán M. I. (2021) *Life*, 11: 116. doi.org/10.3390/life11020116.



Article

Male Deep-Sea Shrimps *Aristeus antennatus* at Fishing Grounds: Growth and First Evaluation of Recruitment by Multilocus Genotyping

Alba Abras ¹, Jose-Luis García-Marín ^{1,*}, Sandra Heras ¹, Manuel Vera ², Melania Agulló ¹, Laia Planella ¹ and María Inés Roldán ¹

¹ Laboratori d'Ictiologia Genètica, Campus Montilivi, Universitat de Girona, 17003 Girona, Spain; alba.abras@udg.edu (A.A.); sandra.heras@udg.edu (S.H.); melania.agullo@udg.edu (M.A.); laia.planella@udg.edu (L.P.); marina.rolدان@udg.edu (M.I.R.)

² Departamento de Zooloxía, Xenética e Antropoloxía Física, Campus Lugo, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain; manuel.vera@usc.es

* Correspondence: joseluis.garcia@udg.edu; Tel.: +34-616-603-335

Abstract: The population biology of the deep-sea shrimp *Aristeus antennatus*, as with other exploited demersal species, is usually studied using data from fishery statistics. Such statistical analyses have shown female-biased sex ratios during the spawning season in this species. Because the abundance of males increases at greater depths that are not exploited by fisheries (virgin grounds), knowledge on their recruitment is limited. Here, the growth and recruitment of *A. antennatus* males at fishing grounds was evaluated. This was achieved by integrating information on previously identified breeding behaviours and by tracing the young-of-year cohort through genotyping at 10 microsatellite loci. Using a codend and a codend cover with distinct meshed windows, four groups of males were collected in winter and in a subsequent spawning summer season. Summer collections were mostly composed of pre-adult males, reaching sizes that are to be expected from the growth of winter juveniles; however, many specimens also originated from nearby grounds. This result indicates the horizontal dispersal of male juveniles via intermediate and deep oceanographic currents. Such dispersal complements passive larval dispersal in surface waters, and contributes to the weak genetic divergence among regional fishing grounds. These features could be shared by other deep-sea crustacean and fish species, and should be considered for the sustainable exploitation of demersal fisheries.

Keywords: *Aristeus antennatus*; microsatellite loci; male recruitment; fishing grounds; deep-sea species



Citation: Abras, A.; García-Marín, J.-L.; Heras, S.; Vera, M.; Agulló, M.; Planella, L.; Roldán, M.I. Male Deep-Sea Shrimps *Aristeus antennatus* at Fishing Grounds: Growth and First Evaluation of Recruitment by Multilocus Genotyping. *Life* **2021**, *11*, 116. <https://doi.org/10.3390/life11020116>

Academic Editor: Daria Sanna
Received: 28 December 2020
Accepted: 1 February 2021
Published: 4 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Demersal fisheries target many species of fish and crustaceans. While not representing the largest proportion of landings in Mediterranean countries, demersal species are highly sought after by fishermen, due to their high commercial value [1]. For instance, in the western Mediterranean, demersal stocks are subjected to high capture rates that are often above sustainable levels [2]. The blue and red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) (Crustacea, Decapoda), is a typical target fish species of the demersal fisheries of northern Spain [3,4]. The commercial fishing of this species takes place by bottom trawling in submarine canyons, and near shallower waters, at depths of between 400 and 800 m [5]. However, in the western Mediterranean, this species is widely and heterogeneously distributed in the water column at depths ranging from 80 to 3300 m [6]. Peaks in abundance occur between 600 and 1000 m depth and then noticeably decline below 1500 m in depth [7]. Mature females are highly abundant at depths of less than 1000 m, whereas males and juveniles are more abundant in deeper layers (below the 1000 m) [7,8]. During the spawning season, from late spring to summer, aggregations of adult males and females occur at depths

between 400 and 900 m [9]. Nevertheless, the genetic identification of spermatophores indicates that many mating males during the spawning season are not captured with females at these depths [10]. Males are more abundant at greater depths, where currently deep-sea fisheries are prohibited (below 1000 m; virgin areas) [7,11]. Consequently, as for other demersal exploited species, knowledge remains limited in terms of the growth and recruitment (either for reproduction or fishing) of male *A. antennatus*, as research on the population biology is primarily focused on specimens captured in fishing grounds [9,12–15].

The reproduction of *A. antennatus* was first described by Demestre and Fortuño in the fishing grounds of the western Mediterranean [16], with similar results being reported in other Mediterranean regions [13,17]. In brief, this species is sexually dimorphic, with an external mating system in which a sperm mass (spermatophore) attaches to the female's open thelycum via the petasma of the male. Males are considered adults when they have fused hemipetasma, and the rostrum measures less than 12 mm, otherwise they are classified as juveniles [16,18]. The carapace length (CL) of females has a wider range (CL = 18–68 mm) compared to males (CL = 18–36 mm). Females also have slightly greater longevity compared to males, reaching 5 and 4 years old, respectively [5]. The main reproductive period in the Catalan Sea, Spain (north-west Mediterranean) is highly seasonal, extending from late spring to summer, and peaking during summer [12]. A similar mating pattern was documented in the Balearic Islands (western Mediterranean) [19]. In comparison, longer periods were reported in the eastern Mediterranean, lasting almost seven months around Greece [17]. During the spawning season, the larvae of *A. antennatus* appear in surface waters (0.5 to 1 m depth) at areas where mature adults are fished at deeper layers [20]. After hatching on the bottom substrate, the first larval stages perform an ontogenic migration through the water column to the surface to optimize feeding and enhance development of the late larval stages [21]. Surface currents disperse these protozoa and zoea larval stages [22]. Finally, the decapodid stage organisms exhibit a downward vertical migration to deep waters, where they settle [7,23]. Small juveniles of 6–7 mm CL have been detected at 1300–1500 m depths after the spawning season [24]. A few months later, during winter, deep-sea *A. antennatus* juveniles recruit to wider depth ranges below 1000 m in the Catalan, Balearic, and Ionian Seas [11,24]. An abundance of juveniles of up to 15 mm CL has been reported at 2800 m depth [8]. In the north-western Mediterranean, juvenile numbers peak at the end of winter, in March [25,26]. Similar results were obtained in the eastern Mediterranean Sea, with juvenile shrimps mainly being reported from January to April [27].

The present study investigated the growth and recruitment of the juvenile and adult male *A. antennatus*, after the spawning season. This was accomplished by using multilocus genotype data to trace the young-of-year male cohort in the fishing ground of Palamós (Spain) as a case study, because of the available description of the breeding behaviour of the species during the spawning season in this area reported by Planella et al. [10]. This study aims to fill the knowledge gaps related to the growth and recruitment of *A. antennatus* males to fishing grounds and spawning aggregations. The present work is expected to provide baseline of information facilitating the sustainable exploitation of this marine resource, with potential application to other demersal species.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling and Biological Material

Planella et al. [10] delineated the mating structure of *A. antennatus* in the fishing ground of Palamós Canyon (hereafter “Palamós fishing ground”), Spain, in the summer of 2015. In the present study, *A. antennatus* males were captured on board the same trawling vessel (Nova Gasela) at Palamós fishing ground (500 m depth, 41°54′04″ N, 3°16′08″ E) during March (winter) and July (summer) of 2016 to determine the growth and recruitment of males in the area. The winter sampling period (3 March) corresponded to the period when peak numbers of juveniles are detected in the coastal areas of the western Mediterranean [26]. The summer sampling period (7 July) corresponded to the peak of

the spawning season, when almost all captured females have at least one spermatophore adhering to the thelycum [10]. The codend had square meshed windows with an aperture of 40 mm (minimum commercial mesh size allowed at the time of this study), and was surrounded by a smaller meshed cover (hereafter “codend cover”), with an aperture of 12 mm usually intended for smaller individuals. Thus, the codend cover captures organisms escaping from the codend (Figure 1). The codend cover was directly attached to the funnel end of the net which was 1.5 m wider and longer than the codend to maintain a good flow of water and avoid masking the codend mesh (see [3]). The codend in this study is commonly used for commercial purposes in the Palamós fishing ground, whereas the codend cover was legally authorised for this scientific sampling procedure. Winter and summer samplings were conducted in the same way. A single haul with the same fishing gear was conducted per sampling period (winter and summer). The towing speed was around two knots and the effective tows duration was two hours. Specimens from the codend and codend cover were independently sexed on board, and a random sample of around 100 males of each group (codend and codend cover) were kept for this study. Each male was classified as juvenile or adult based on the criteria established by Demestre and Fortuño [16] and Sardà and Demestre [18]. All males captured in the codend during March had a fused petasma, and were considered adults. In total, 101 individuals were retained for genotype analyses. Despite some specimens in the codend cover having adult petasma morphology (fused hemipetasma), most males had two separate hemipetasma, and were considered as juveniles. In total, 105 of these juveniles were retained for the analysis. In July, all males collected in the codend were adults, and 100 were retained for the analysis. In contrast to the winter collection, all males (except one) captured in the codend cover had fused petasma, and were not considered as juveniles. Ninety-eight of these males were genotyped. All captured specimens were stored on ice on board, and were quickly transported to our laboratory on landing. At the laboratory CL was measured using a digital vernier calliper. A piece of muscle tissue was preserved in 95% ethanol and stored at room temperature until subsequent DNA extraction.

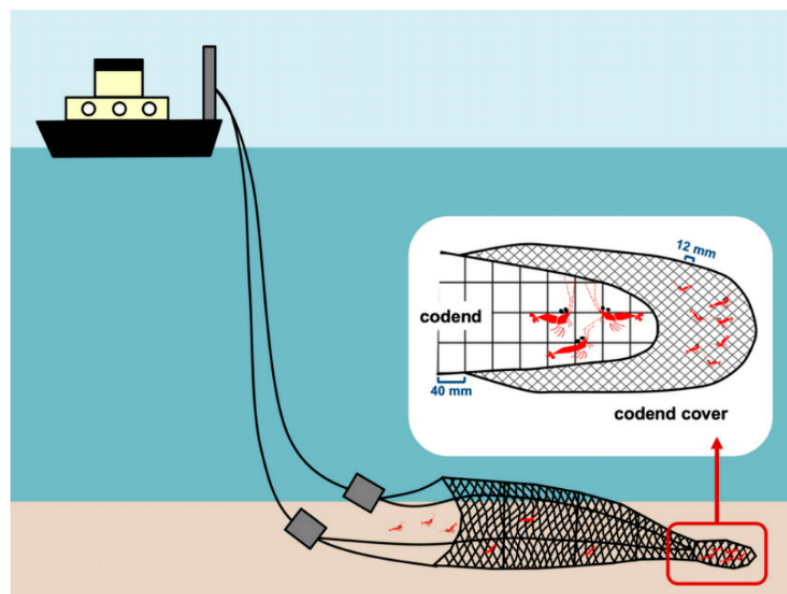


Figure 1. Sampling scheme to collect large and small specimens of *A. antennatus*.

2.2. DNA Extraction and Microsatellite Loci Genotyping

From each specimen, DNA was extracted from the muscle tissue using the adjusted phenol-chloroform method proposed by Fernández et al. [28]. Genetic diversity was

analysed at 10 microsatellite loci previously described for *A. antennatus* (Aa123, Aa138, Aa1444, Aa667, Aa681, Aa751, Aa956, Aa1061, Aa1195, and Aa818) [29], and amplified with three multiplex PCRs [10]. Resulting amplicons were analysed in an ABI PRISM 3730xl DNA analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at the Sequencing Unit of the University of Santiago de Compostela (Campus Lugo, Lugo, Spain), and were genotyped using GeneMapper software version 4.0 with GeneScan 500LIZ dye Size Standard (Applied Biosystems) as the internal standard. Genotype data will be available on request.

2.3. Statistical and Genetic Analysis

One-way analysis of variance (one-way ANOVA) included in the IBM SPSS statistics version 25 package (Armonk, NY, USA) was used to compare average CL among the four groups of males: (i) adult males captured during winter, (ii) juvenile males captured during winter, (iii) adult males captured in the codend during summer, and (iv) males captured in the codend cover during summer. Subsequently, a post-hoc Scheffe test implemented in the same software was used to identify groups that differed significantly.

Levels of genetic diversity for each of the four male groups were estimated at the 10 loci based on the number of alleles per locus (N_A), allelic richness (A_R), and observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities. Calculations were performed using FSTAT 2.9.3 [30]. Conformance of the observed genotype distributions to their expectations under Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) was tested for each sample using the exact probability test of Guo and Thompson [31], which was included in the GENEPOP 4.7.0 software [32]. Deviations from HWE genotype proportions were summarised using the inbreeding coefficient F_{IS} [33]. Significance levels were adjusted using Bonferroni correction. Null alleles are commonly observed in decapods [29,34], including the *A. antennatus* loci used in this study [35]. For each locus and each male group, null allele frequency was estimated using the Brookfield 1 equation [36], as implemented in Micro-Checker 2.2.3 software [37]. Genetic distinctions between male groups were evaluated by pairwise F_{ST} estimates using the Weir and Cockerham method [33] in GENEPOP 4.7.0 and their significance from contingency tables of male-group \times allele as implemented in the genic differentiation option in GENEPOP 4.7.0 software.

To study the parental contribution of the 2015 local spawners reported by Planella et al. [10] to the male groups analysed here, we simulated several independent F1 offsprings using HYBRIDLAB 1.0 program [38] from the genotypes of these 2015 adults. We first generated 10 independent simulated sets of paired baselines. Each set included a baseline of 100 specimens from the admixture of the adult females (average CL = 38.27 ± 3.76 mm) captured in 2015 and the spermatophores on their thelycum (hereafter “F \times S F1”) and another simulated offspring baseline of 100 specimens from females and males (average CL = 22.78 ± 2.59 mm) that were simultaneously caught in 2015 (hereafter “F \times M F1”). We used these paired sets of F \times M F1 baselines because of the genetic distinction observed between these males and the female spermatophores [10]. Then, we assigned 25 sets of 100 specimens of F \times S F1 obtained from independent HYBRIDLAB simulations to each of the 10 baselines sets to obtain 250 replicates (25×10) to estimate the accuracy of the assignment of the expected offspring from putative local mates (F \times S) in 2015. The size of each set (100 simulated individuals) was comparable to the roughly 100 males in each of the four samples collected in 2016. The Bayesian Rannala and Mountain method [39], as implemented in GENECLASS 2 [40], was used in all performed assignments. Individuals with an assignment probability to each of the two baselines <0.01 were considered as having another source. Similarly, we assigned 25 sets of F \times M F1 simulated offspring to the 10 sets of baselines to estimate the accuracy of assignment of the expected offspring from local adults (F \times M) caught during the 2015 spawning season. Finally, we assigned our 2016 samples (winter codend cover, winter codend, summer codend cover, and summer codend) to each of the 10 baseline sets to compare outcomes with those obtained above for the expected offspring from local 2015 shrimps. These comparisons were done using ANOVA and post-hoc Scheffe test as indicated for CL analysis.

Assignment tests were also used to determine the relationships between the males collected in summer versus winter. This approach was addressed to detect the most likely origin of summer males using the winter males as a baseline. Two additional sets of samples of adult male *A. antennatus* captured during the winter of 2016 at nearby grounds were incorporated as a potential source of migratory specimens. One set was from Cap de Creus Canyon (Roses fishing ground, 42°21'17" N, 3°24'22" E) ($n = 55$), and the other set was from Blanes Canyon (Blanes fishing ground, 41°35'85" N, 2°50'56" E) ($n = 54$), which were situated at approximately 60 km northward and southward of the Palamós fishing ground, respectively. Exact probability tests were used to compare the assignment pattern of the summer collections to the results obtained from the Palamós winter baselines.

3. Results

3.1. Comparison of Carapace Length among Male Groups

The *A. antennatus* juveniles captured in the codend cover during winter had the lowest mean CL (16.79 ± 1.15 mm), which significantly differed to all other analysed groups (Figure 2). Males captured in the codend cover during summer were significantly larger than winter juveniles, with a mean CL of 19.82 ± 1.10 mm; however, these males were smaller than adults collected in the codend during winter or summer. Adult males captured in the codend during summer had a mean CL of 21.43 ± 2.06 mm, which was not significantly different to the mean size of winter adults (22.39 ± 3.34 mm). The largest adult male specimens were among those captured in winter.

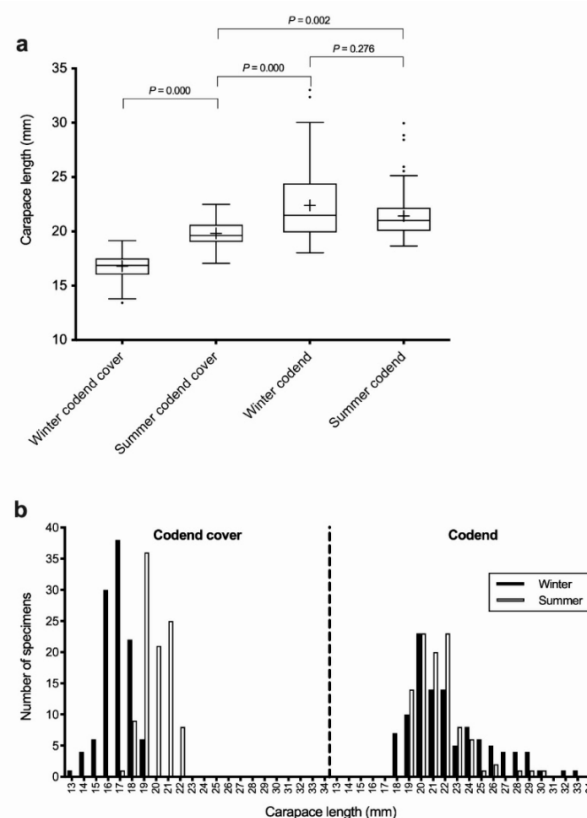


Figure 2. Carapace length (CL) of male *Aristeus antennatus* groups captured at Palamós fishing ground, Spain. (a) Box and whisker plot, the median is shown by the line that cuts through the box, the mean is represented by a cross, P values were obtained from Post-hoc Scheffe test; (b) Size-frequency distributions.

3.2. Genetic Diversity

The 10 loci were polymorphic in all analysed male groups, with the number of alleles per locus (N_A) ranging from three (locus Aa751 in all groups) to 25 (locus Aa138 in the summer codend group) (Table 1). The mean allelic richness (A_R) ranged from 8.8 (summer codend cover group) to 9.7 (summer codend group). The average observed heterozygosity (H_O) among loci in the male groups reached 0.495 in winter juveniles to 0.517 in summer adults from the codend, and was consistently below the average expected heterozygosity (H_E). After Bonferroni correction, analysis of locus by locus deviations from genotype HWE expectations showed significant departures in five loci of the winter codend cover group (Aa1444, Aa667, Aa751, Aa1061, and Aa818), six loci of the winter codend group (Aa1444, Aa667, Aa681, Aa751, Aa1061, and Aa818), six loci in the summer codend cover group (Aa123, Aa1444, Aa667, Aa681, Aa1061, and Aa818), and five loci in summer codend group (Aa1444, Aa681, Aa751, Aa1061, and Aa818). Positive F_{IS} indicated that a heterozygote deficit was obtained in all groups. However, after Bonferroni correction, only males captured in the codend cover during summer showed an overall significant departure from HWE. A maximum null allele frequency of 0.195 was estimated by Micro-Checker software at locus Aa818 in the summer codend cover male group.

Table 1. Genetic diversity within male *Aristeus antennatus* groups captured at Palamós fishing ground, Spain.

Cohort		Aa123	Aa138	Aa1444	Aa667	Aa681	Aa751	Aa956	Aa1061	Aa1195	Aa818	Average
Winter codend cover	N_A	4	19	13	9	20	3	6	8	4	4	9.0
	A_R	3.913	18.777	12.752	8.842	19.567	3.000	5.988	7.884	3.895	4.000	8.862
	H_O	0.485	0.829	0.490	0.392	0.637	0.144	0.571	0.429	0.591	0.352	0.495
	H_E	0.614	0.880	0.754	0.702	0.795	0.302	0.666	0.682	0.608	0.582	0.660
	F_{IS}	0.210	0.059	0.350 *	0.442 *	0.199	0.521 *	0.142	0.371 *	0.028	0.394 *	0.251
	Nu	0.091	0.043	0.155	0.181	0.071	0.122	0.054	0.173		0.147	
Winter codend	N_A	5	20	12	7	22	3	6	8	5	6	9.4
	A_R	4.930	19.904	11.937	6.918	21.436	3.000	6.000	7.792	4.991	5.995	9.290
	H_O	0.485	0.812	0.490	0.449	0.545	0.126	0.644	0.475	0.654	0.356	0.506
	H_E	0.610	0.896	0.715	0.699	0.856	0.271	0.665	0.697	0.596	0.625	0.665
	F_{IS}	0.205	0.094	0.316 *	0.358 *	0.364 *	0.534 *	0.032	0.318 *	-0.097	0.430 *	0.239
	Nu	0.075	0.048	0.135	0.152	0.186	0.128		0.129		0.153	
Summer codend cover	N_A	5	19	13	6	19	3	6	6	5	6	8.8
	A_R	4.959	18.915	12.937	5.979	18.875	3.000	5.999	6.000	4.918	5.998	8.758
	H_O	0.418	0.837	0.500	0.479	0.541	0.188	0.561	0.459	0.622	0.347	0.496
	H_E	0.625	0.911	0.762	0.694	0.828	0.287	0.682	0.696	0.628	0.689	0.681
	F_{IS}	0.330 *	0.082	0.344 *	0.310 *	0.347 *	0.347	0.177	0.340 *	0.008	0.497 *	0.272 *
	Nu	0.116	0.040	0.152	0.131	0.166	0.080	0.057	0.136		0.195	
Summer codend	N_A	6	25	12	7	20	3	6	7	6	6	9.8
	A_R	5.933	24.513	11.955	6.958	19.806	3.000	6.000	6.998	5.877	5.999	9.704
	H_O	0.520	0.800	0.531	0.542	0.640	0.096	0.610	0.485	0.610	0.306	0.517
	H_E	0.647	0.910	0.735	0.690	0.809	0.281	0.684	0.747	0.612	0.618	0.675
	F_{IS}	0.196	0.120	0.278 *	0.215	0.209 *	0.660 *	0.108	0.351 *	0.004	0.504 *	0.235
	Nu	0.069	0.060	0.120	0.083	0.091	0.155		0.151		0.185	

N_A , Number of alleles; A_R , allelic richness; H_O , observed heterozygosity; H_E , expected heterozygosity; F_{IS} , inbreeding coefficient; Nu , null allele frequency; *, Significant departure from Hardy–Weinberg equilibrium after Bonferroni correction.

3.3. Genetic Divergence

Pairwise F_{ST} values were low among all male groups (range: 0.0000–0.0010) (Table 2). After Bonferroni correction, significant differences were documented between juvenile and adult males collected during winter ($F_{ST} = 0.0010$, $P = 0.0004$), and also between winter and summer groups in the codend cover ($F_{ST} = 0.0008$, $P = 0.0003$).

Table 2. Genetic divergence (F_{ST}) between male *Aristeus antennatus* groups.

	Winter Codend Cover	Summer Codend Cover	Winter Codend
Summer codend cover	0.0008 ¹		
Winter codend	0.0010 ¹	0.0000	
Summer codend	0.0004	0.0004	0.0000

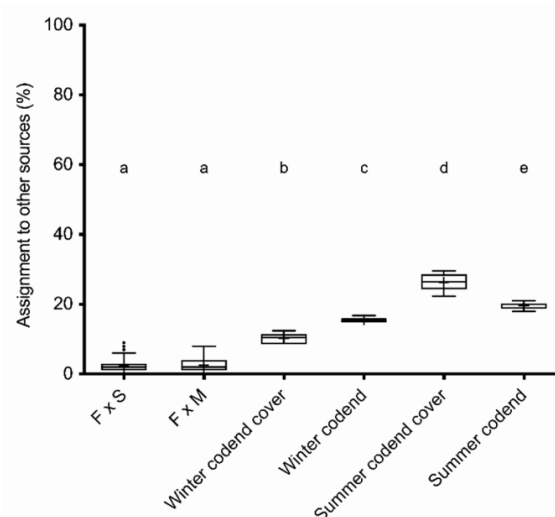
¹ Significant F_{ST} values after Bonferroni correction.

A limited accuracy of the baselines was indicated in the assignment of the simulated datasets (Table 3). In particular, a large portion of simulated $F \times M$ F1 individuals were assigned to $F \times S$ F1 baselines, likely reflecting the genetic similarity between the males and spermatophores sampled in 2015 and a limited contribution of the males to the spermatophores reported by Planella et al. [10]. Nevertheless, the assignment of all groups of males captured in 2016 significantly differed from simulated individuals. In all cases, the largest assignment was at the $F \times S$ F1 baseline. In addition, all male groups in 2016 significantly incorporated specimens from other sources (from 10.19 to 26.33%, Table 3), when compared to the reference simulated F1 individuals from local spawners. The largest assignment to other sources was detected for small sized males collected in the codend cover during the 2016 summer. The assignment pattern of this group also differed to that of winter juveniles (Figure 3).

Table 3. Assignment distribution (%) of male *Aristeus antennatus* groups to simulated offspring from 2015 spawner genotypes (see text).

	Replicates	$F \times S$ F1 Baseline ¹	$F \times M$ F1 Baseline ¹	Other Sources
$F \times S$ F1	250	69.7 (16.3)	28.1 (15.9)	2.2 (1.8)
$F \times M$ F1	250	47.2 (16.9)	50.2 (16.8)	2.6 (1.8)
Winter codend cover	10	56.6 (16.4)	33.2 (15.7)	10.2 (1.3)
Summer codend cover	10	44.4 (13.9)	29.3 (13.4)	26.3 (2.2)
Winter codend	10	54.5 (13.3)	30.0 (13.3)	15.5 (0.6)
Summer codend	10	49.10 (12.5)	31.3 (12.3)	19.6 (1.0)

¹ F, females; S, spermatophores; M, males.

**Figure 3.** Distribution of the proportion (%) of assignment to other sources of the simulated offspring sets ($F \times S$ and $F \times M$, see text) and the 2016 samples. Letters (a, b, c, d and e) indicate groups identified by post-hoc Scheffe test.

The geographical assignment of captured males (Table 4) showed that the winter codend and codend cover group from the Palamós fishing ground were weakly assigned to the origin (67.3 and 43.8%, respectively). The assignment of these two groups confirmed that recruitment from other grounds occurs. This recruitment was mostly from Blanes Canyon, based on juveniles from the codend cover group and adults from the codend group. The assignment pattern of the two summer groups statistically differed to that recorded for the winter group ($P < 0.01$ in all comparisons). The summer codend and codend cover groups were more closely correlated to winter adults collected in the codend compared to winter juveniles collected in the codend cover. Only 18.4% of summer codend cover males were assigned to winter juveniles, with this percentage being slightly lower in the summer codend specimens (13.0%). In fact, the two summer groups had similar assignment patterns (exact test $P = 0.1686$), with more than 40% of specimens originating from outside of the Palamós ground.

Table 4. Assignment results (%) of male *Aristeus antennatus* groups captured during the summer at Palamós fishing ground, Spain.

	Baselines				
	Palamós Winter Codend	Palamós Winter Codend Cover	Roses Winter Codend	Blanes Winter Codend	Other Sources
Palamós winter codend	67.3	7.9	4.0	13.9	6.9
Palamós winter codend cover	21.9	43.8	10.5	20.0	3.8
Palamós summer codend	41.0	13.0	14.0	25.0	7.0
Palamós summer codend cover	39.8	18.4	5.1	24.5	12.2

4. Discussion

4.1. Growth and Recruitment of *A. antennatus* in Submarine Canyons

The males captured at a depth of 500 m in the codend cover during winter were classified as juveniles because they lacked fused petasma. The average CL (16.79 mm) of these males supports observations of juvenile sizes from other Mediterranean grounds [8,11,24]. The winter juvenile group from Palamós was composed of smaller specimens compared to the adult males captured in the codend. This latter group had an average CL of 22.39 mm, with this size exceeding that of males at first maturity (20.81 mm) reported by Carbonell et al. [14]. In fact, the average CL of the winter adult male group captured in the codend was similar to that of adult males captured during the 2015 spawning season (22.78 mm). Thus, these winter adults could be related to, or be the same as, the adult male group analysed by Planella et al. [10], as no significant genetic differentiation ($F_{ST} = -0.00022$, $P = 0.4899$) was recorded between these two male groups. Greater genetic divergence of these winter males from males that released spermatophores into the female thelycum during the spawning season was recorded ($F_{ST} = 0.00318$, $P = 0.0812$). However, analysis of the parental contribution of 2015 summer local spawners based on simulated offspring showed that the greatest assignment was to F × S F1 out of all male groups captured in 2016. The estimated contribution of F × M F1 was lower (Table 3). Therefore, the winter adult codend group might have included both adult males related to the 2015 summer local males and offspring that hatched early during the spawning season. These latter individuals had more time to grow compared to specimens captured in the codend cover. The admixture of these two groups also might explain the large variance observed in CL in this sample.

The males captured in the codend cover during summer were larger compared to those captured during winter. Despite these summer codend cover males having adult morphology (fused petasma), their average size (CL = 19.82 mm) was lower than that reported for first maturity. Certainly, this group could be composed of winter juveniles that had grown since the last spring. A growth rate of 2 mm per month was estimated for juvenile *A. antennatus* cohorts in June–July at the fishing grounds of the Catalan Sea [41]. Sardà and Company showed that juveniles of <16 mm CL were abundant in the bottom sea areas of submarine canyons, where they remained for 6–9 months [8]. Later, the ontogenic migration of pre-adults to depths of less than 900 m occurred, with these individuals becoming incorporated into the *A. antennatus* fishery at 400–800 m depth. Despite already showing the adult petasma fused phenotype, pre-adult shrimps were considered to be 20–28 mm CL. Thus, all males (except a few individuals >28 mm CL) captured during summer in the current study could be pre-adult specimens, despite the mean CL (21.43 mm) of those captured in the codend exceeding that described for males at first maturity. Sex determination in *A. antennatus* is not known; however, a ZZ/ZW sex chromosome mechanism has been documented in Penaeid shrimps [42]. This mechanism should produce a balanced sex ratio (1:1) in offspring. In blue and red shrimp, balanced (1:1) sex ratios in fishing grounds are only detected in autumn and winter, after the spawning season. In contrast, during the spawning season, and especially in summer, there is strong female bias both in biomass and numbers [5,11], suggesting a spatial sexual segregation at that time. Planella et al. [10] observed that males captured at fishing grounds during the spawning season had a limited contribution to the spermatophores attached to the thelycum of females. Unlike females, *A. antennatus* males have a clear size limit, being small-sized throughout their entire adult life, which complicates attempts to distinguish the cohorts of older specimens [43]. However, our genetic analyses correlated most males captured in summer to the offspring of 2015 spawners (Table 3). Therefore, the upward migration to shallower waters in summer mostly involves females of all sizes and pre-adult males.

4.2. Geographical Origin of Males Recruited into the Fishery

The blue and red shrimp is a deep-sea benthic crustacean that has a widespread dispersal potential [44], contributing to high gene flow and low levels of spatial genetic heterogeneity across the fishing grounds of the Mediterranean Sea [6,34,35,45–49]. The horizontal displacement of *A. antennatus* might occur by passive and active dispersal mechanisms. Orsi-Relini et al. [50] suggested that, after the major passive horizontal displacement of *A. antennatus* larvae by surface currents, juveniles and adults might initiate an active, but slow, return migration against weak deep-sea currents. Scant evidence has been reported on adult migration, with just a single tagging study in the Ionian Sea (Mediterranean). This study showed that most recaptured specimens (21 out of 693 tagged shrimps) were collected in the same area shortly after release; however, two specimens were recaptured at one and nine months after release in deeper areas several nautical miles (6 to 10 nautical miles) from the release site [51].

Aristeus antennatus eggs and larvae do, however, disperse passively, based on their presence in the upper water layers [20,23]. In our study region, the general oceanic circulation is part of a cyclonic circuit called the Northern Current (NC). This is a well-defined western Mediterranean current that extends to 300–400 m depth, with a general southwest flow that follows the continental slope from Italy to Spain [52,53]. Using hydrodynamic models to predict connectivity among *A. antennatus* populations by passive egg and larval drift among submarine canyons in our study region, Clavel-Henry et al. predicted a global pattern of southward dispersal, according to the Northern Current [22]; however, the authors also predicted high average retention rates in submarine canyons in some models (reaching up to 60%). Our genetic analyses support these predictions, showing assignation rates of 50–70% for all juveniles and pre-adult males captured in 2016 at the Palamós fishing ground to the simulated F1 between females and their spermatophores sampled in 2015 (Table 3), as well as the contribution of migrants from northern grounds (Table 4).

The limited contribution of winter juveniles to the summer pre-adult groups indicates that juvenile dispersal is a continuous process through the year that contributes to recruitment at the fishing grounds. The Levantine Intermediate Water (LIW) and the Western Mediterranean Deep Water (WMDW) flow below the NC and in the same direction [54]. The abundance of adult females appeared to be correlated to LIW; however, *A. antennatus* juveniles were more abundant in the fishing grounds of the study region when WMDW was present [15,55]. Anticyclonic eddies that extend their effects to deeper waters produce inversions of the general southwest flow, and recur along the coasts of the northwest Mediterranean [53]. Such eddies are singularly frequent in the Blanes Canyon area [56]. Thus, an anticyclonic eddy in the Blanes Canyon area might also explain the higher estimated contribution of *A. antennatus* specimens from this region to the Palamós fishing ground, rather than the Roses Canyon.

Larval and juvenile migration from other grounds, rather than null alleles, could explain the observed departures from Hardy–Weinberg genotypic expectations in our groups [57]. This phenomenon contributed towards maintaining high local diversity and weak genetic divergence at a regional scale, similar to that observed in *A. antennatus* fishing grounds elsewhere [34,35]. Certainly, very little is known about how deep-sea oceanographic processes influence demersal fisheries. Despite this, Puig et al. [58] highlighted the importance of considering how the environment and species interact to exploit deep-water resources sustainably. The features documented in the current study could be applied by fisheries for other deep-sea crustacean and fish species. In particular, how the juveniles of these various groups disperse among and replenish regional grounds should be incorporated in the management of potential targets by future regional demersal fisheries [54]. Currently, output management measures (quotas) are not implemented in the Mediterranean demersal fisheries and ongoing programs involving reductions in fishing time are insufficient to restore and maintain fish stocks below fishing mortality levels capable of producing maximum sustainable yields [4].

5. Conclusions

This study provides new evidence on the growth, recruitment, and geographical origin of male *A. antennatus* in fishing grounds. This information could be applied to facilitate the sustainable exploitation of this marine resource. Our results showed that males frequenting the fishing ground were mostly recruited from local spawners, but with contributions from other sources. Our findings indicate: (i) upward summer vertical movement towards the fishing grounds of pre-adult males that hatched the preceding year, and (ii) horizontal displacement of juvenile males from adjacent fishing grounds by deep currents, complementing larval dispersal through surface waters that occurs shortly after spawning. However, it was not possible to resolve which males were recruited for spawning and made a major contribution to spermatophores. Certainly, a small number of large and mature males are captured with females during the spawning season (Figure 2a and [5]). However, male-biased sex ratios of 2:1 are detected in summer at depths below 1000 m, in unexploited regions [7,11], with such individuals being in the best biological condition for mating and spawning [24].

Author Contributions: Conceptualization, J.-L.G.-M. and M.I.R.; Formal analysis, A.A.; Funding acquisition, M.I.R.; Investigation, A.A., J.-L.G.-M., S.H., M.V., M.A., L.P. and M.I.R.; Methodology, A.A. and J.-L.G.-M.; Supervision, J.-L.G.-M. and M.I.R.; Writing—original draft, A.A. and J.-L.G.-M.; Writing—review and editing, A.A., J.-L.G.-M., S.H., M.V., M.A., L.P. and M.I.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a grant from Spanish *Ministerio de Economía y Competitividad* (CTM2014-54648-C2-2-R) to M.I.R. L.P. and M.A. benefited from predoctoral fellowship from the *Universitat de Girona* (BR2014 and IFUdG2018, respectively).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: We thank Conrad Masseguer, the ship-owner of the *Nova Gasela*, for assistance in sampling collection.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Moranta, J.; Quetglas, A.; Massutí, E.; Guijarro, B.; Ordines, F.; Valls, M. Research trends on demersal fisheries oceanography in the Mediterranean. In *Biological Oceanography Research Trends*; Mertens, L.P., Ed.; Nova Science Publishers: New York, NY, USA, 2008; pp. 9–65.
- European Parliament and The Council of the European Union Regulation (EU) 2019/1022 of the European Parliament and of the Council of 20 June 2019 establishing a multiannual plan for the fisheries exploiting demersal stocks in the western Mediterranean Sea and amending Regulation (EU) No 508/2014. *Off. J. Eur. Union* **2019**, *L172*, 1–17.
- Gorelli, G.; Company, J.B.; Bahamón, N.; Sardà, F. Improving demersal selectivity in the fishery of the deep-sea shrimp *Aristeus antennatus* in the northwestern Mediterranean Sea. *Sci. Mar.* **2017**, *81*, 381–386. [[CrossRef](#)]
- Sola, I.; Maynou, F.; Sánchez-Lizaso, J.L. Bioeconomic analysis of the EU multiannual management plan for demersal fisheries in the western Mediterranean. Spanish fisheries as a case study. *Front. Mar. Sci.* **2020**, *7*, 459. [[CrossRef](#)]
- Demestre, M.; Lleó, J. Population dynamics of *Aristeus antennatus* (Decapoda: Dendrobranchiata) in the northwestern Mediterranean. *Sci. Mar.* **1993**, *57*, 183–189.
- Sardà, F.; Roldán, M.I.; Heras, S.; Maltagliati, F. 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. *Sci. Mar.* **2010**, *74*, 569–575. [[CrossRef](#)]
- Sardà, F.; D’Onghia, G.; Politou, C.Y.; Company, J.B.; Maiorano, P.; Kaporis, K. Deep-sea distribution, biological and ecological aspects of *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) in the Western and Central Mediterranean Sea. *Sci. Mar.* **2004**, *68*, 117–127. [[CrossRef](#)]
- Sardà, F.; Company, J.B. The deep-sea recruitment of *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) (Crustacea: Decapoda) in the Mediterranean Sea. *J. Mar. Syst.* **2012**, *105–108*, 145–151. [[CrossRef](#)]
- Sardà, F.; Company, J.B.; Castellón, A. Intraspecific aggregation structure of a shoal of a Western Mediterranean (Catalan coast) deep-sea shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816), during the reproductive period. *J. Shellfish Res.* **2003**, *22*, 569–579.
- Planella, L.; Vera, M.; García-Marín, J.L.; Heras, S.; Roldán, M.I. Mating structure of the blue and red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816), revealed by relatedness analysis. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 7227. [[CrossRef](#)]
- D’Onghia, G.; Maiorano, P.; Capezzuto, F.; Carlucci, R.; Battista, D.; Giove, A.; Sion, L.; Tursi, A. Further evidences of deep-sea recruitment of *Aristeus antennatus* (Crustacea: Decapoda) and its role in the population renewal on the exploited bottoms of the Mediterranean. *Fish. Res.* **2008**, *95*, 236–245. [[CrossRef](#)]
- Demestre, M. Moulting activity-related spawning success in the Mediterranean deep-water shrimp *Aristeus antennatus* (Decapoda: Dendrobranchiata). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1995**, *127*, 57–64. [[CrossRef](#)]
- D’Onghia, G.; Capezzuto, F.; Mytilineou, C.; Maiorano, P.; Kaporis, K.; Carlucci, R.; Sion, L.; Tursi, A. Comparison of the population structure and dynamics of *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) between exploited and unexploited areas in the Mediterranean Sea. *Fish. Res.* **2005**, *76*, 22–38. [[CrossRef](#)]
- Carbonell, A.; Lloret, J.; Demestre, M. Relationship between condition and recruitment success of red shrimp (*Aristeus antennatus*) in the Balearic Sea (Northwestern Mediterranean). *J. Mar. Syst.* **2008**, *71*, 403–412. [[CrossRef](#)]
- Guijarro, B.; Massutí, E.; Moranta, J.; Díaz, P. Population dynamics of the red shrimp *Aristeus antennatus* in the Balearic Islands (western Mediterranean): Short spatio-temporal differences and influence of environmental factors. *J. Mar. Syst.* **2008**, *71*, 385–402. [[CrossRef](#)]
- Demestre, M.; Fortuño, J.M. Reproduction of the deep-water shrimp *Aristeus antennatus* (Decapoda: Dendrobranchiata). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1992**, *84*, 41–51. [[CrossRef](#)]
- Kaporis, K.; Thessalou-Legaki, M. Comparative reproduction aspects of the deep-water shrimps *Aristaeomorpha foliacea* and *Aristeus antennatus* (Decapoda, Aristeidae) in the Greek Ionian Sea (Eastern Mediterranean). *Int. J. Zool.* **2009**, *2009*, 979512. [[CrossRef](#)]
- Sardà, F.; Demestre, M. Shortening of the rostrum and rostral variability in *Aristeus antennatus* (Risso, 1816). *J. Crust. Biol.* **1989**, *9*, 570–577. [[CrossRef](#)]
- García-Rodríguez, M.; Esteban, A. On the biology and fishery of *Aristeus antennatus* (Risso, 1816), (Decapoda, Dendrobranchiata) in the Ibiza Channel (Balearic Islands, Spain). *Sci. Mar.* **1999**, *63*, 27–37. [[CrossRef](#)]
- Carretón, M.; Company, J.B.; Planella, L.; Heras, S.; García-Marina, J.L.; Agulló, M.; Clavel-Henry, M.; Rotllant, G.; Dos Santos, A.; Roldán, M.I. Morphological identification and molecular confirmation of the deep-sea blue and red shrimp *Aristeus antennatus* larvae. *PeerJ* **2019**, *7*, e6063. [[CrossRef](#)]
- Torres, A.P.; Dos Santos, A.; Alemany, F.; Massutí, E. Larval stages of crustacean species of interest for conservation and fishing exploitation in the western Mediterranean. *Sci. Mar.* **2013**, *77*, 149–160. [[CrossRef](#)]

22. Clavel-Henry, M.; Solé, J.; Ahumada-Sempoal, M.A.; Bahamon, N.; Briton, F.; Rotllant, G.; Company, J.B. Influence of the summer deep-sea circulations on passive drifts among the submarine canyons in the northwestern Mediterranean Sea. *Ocean Sci.* **2019**, *15*, 1745–1759. [[CrossRef](#)]
23. Carbonell, A.; Dos Santos, A.; Alemany, F.; Vélez-Belchi, P. Larvae of the red shrimp *Aristeus antennatus* (Decapoda: Dendrobranchiata: Aristeidae) in the Balearic Sea: New occurrences fifty years later. *Mar. Biodivers. Rec.* **2010**, *3*, e103. [[CrossRef](#)]
24. Cartes, J.E.; López-Pérez, C.; Carbonell, A. Condition and recruitment of *Aristeus antennatus* at great depths (to 2,300) in the Mediterranean: Relationship with environmental factors. *Fish. Oceanogr.* **2016**, *27*, 114–126. [[CrossRef](#)]
25. Sardà, F.; Cartes, J.E. Morphological features and ecological aspects of early juvenile specimens of the aristeid shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816). *Mar. Freshw. Res.* **1997**, *48*, 73–77. [[CrossRef](#)]
26. Company, J.B.; Sardà, F.; Puig, P.; Cartes, J.E.; Palanques, A. Duration and timing of reproduction in decapod crustaceans of the NW Mediterranean continental margin: Is there a general pattern? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2003**, *261*, 201–216. [[CrossRef](#)]
27. Deval, M.C.; Kapiris, K. 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. *Sci. Mar.* **2016**, *80*, 339–348. [[CrossRef](#)]
28. Fernández, M.V.; Heras, S.; Viñas, J.; Maltagliati, F.; Roldán, M.I. Multilocus comparative phylogeography of two Aristeid shrimps of high commercial interest (*Aristeus antennatus* and *Aristaeomorpha foliacea*) reveals different responses to past environmental changes. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e59033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Heras, S.; Planella, L.; Caldarazzo, I.; Vera, M.; García-Marín, J.L.; Roldán, M.I. Development and characterization of novel microsatellite markers by Next Generation Sequencing for the blue and red shrimp *Aristeus Antennatus*. *PeerJ* **2016**, *4*, e2200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Goudet, J. FSTAT, A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices (Version 2.9.3). 2001. Available online: <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> (accessed on 19 December 2020).
31. Guo, S.W.; Thompson, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* **1992**, *48*, 361–372. [[CrossRef](#)]
32. Rousset, F. Genepop'007: A complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Res.* **2008**, *8*, 103–106. [[CrossRef](#)]
33. Weir, B.S.; Cockerham, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **1984**, *38*, 1358–1370.
34. Cannas, R.; Sacco, F.; Follesa, M.C.; Sabatini, A.; Arculeo, M.; Lo Brutto, S.; Maggio, T.; Deianam, A.M.; Cau, A. Genetic variability of the blue and red shrimp *Aristeus antennatus* in the Western Mediterranean Sea inferred by DNA microsatellite loci. *Mar. Ecol.* **2012**, *33*, 350–363. [[CrossRef](#)]
35. Heras, S.; Planella, L.; García-Marín, J.L.; Vera, M.; Roldán, M.I. Genetic structure and population connectivity of the blue and red shrimp *Aristeus antennatus*. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13531. [[CrossRef](#)]
36. Brookfield, J.F.Y. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol. Ecol.* **1996**, *5*, 453–455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Van Oosterhout, C.; Hutchinson, W.F.D.; Willis, D.P.; Shipley, P. Micro-checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* **2004**, *4*, 535–538. [[CrossRef](#)]
38. Nielsen, E.E.; Bach, L.A.; Kotlicki, P. HYBRIDLAB (version 1.0): A program for generating simulated hybrids from population samples. *Mol. Ecol. Notes* **2006**, *6*, 971–973. [[CrossRef](#)]
39. Rannala, B.; Mountain, J.L. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 9197–9201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Piry, S.; Alapetite, A.; Cornuet, J.M.; Paetkau, D.; Baudouin, L.; Estoup, A. GeneClass2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *J. Hered.* **2004**, *95*, 536–539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Cartes, J.E.; Demestre, M. Estimating secondary production in the deep-water shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) in the Catalano-Balearic basin (Western Mediterranean). *J. Northw. Atl. Fish. Sci.* **2003**, *31*, 355–361. [[CrossRef](#)]
42. Chandler, J.C.; Elizur, A.; Ventura, T. The decapod researcher's guide to the galaxy of sex determination. *Hydrobiologia* **2017**, *825*, 61–80. [[CrossRef](#)]
43. Sardà, F.; Demestre, M. Estudio biológico de la gamba *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) en el Mar Catalán (NE de España). *Inv. Pesq.* **1987**, *51* (Suppl. S1), 213–232.
44. Sardà, F.; Maynou, F.; Talló, L. Seasonal and spatial mobility patterns of rose shrimp *Aristeus antennatus* in the Western Mediterranean: Results of a long-term study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1997**, *159*, 133–141. [[CrossRef](#)]
45. Maggio, T.; Lo Brutto, S.; Cannas, R.; Deiana, A.M.; Arculeo, M. Environmental features of deep-sea habitats linked to the genetic population structure of a crustacean species in the Mediterranean Sea. *Mar. Ecol.* **2009**, *30*, 354–365. [[CrossRef](#)]
46. Roldán, M.I.; Heras, S.; Patellani, R.; Maltagliati, F. Analysis of genetic structure of the red shrimp *Aristeus antennatus* from the Western Mediterranean employing two mitochondrial regions. *Genetica* **2009**, *136*, 1–4. [[CrossRef](#)]
47. Fernández, M.V.; Heras, S.; Maltagliati, F.; Turco, A.; Roldán, M.I. Genetic structure in the blue and red shrimp *Aristeus antennatus* and the role played by hydrographical and oceanographical barriers. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2011**, *421*, 163–171. [[CrossRef](#)]
48. Marra, A.; Mona, S.; Sà, R.M.; D'Onghia, G.; Maiorano, P. Population genetic history of *Aristeus antennatus* (Crustacea: Decapoda) in the Western and Central Mediterranean Sea. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0117272. [[CrossRef](#)]
49. Agulló, M.; Heras, S.; García-Marín, J.L.; Vera, M.; Planella, L.; Roldán, M.I. Genetic analyses reveal temporal stability and connectivity pattern in blue and red shrimp *Aristeus antennatus* populations. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 21505. [[CrossRef](#)]

50. Orsi Relini, L.; Mannini, A.; Relini, G. Updating knowledge on growth, population dynamics, and ecology of the blue and red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816), on the basis of the study of its instars. *Mar. Ecol.* **2013**, *34*, 90–102. [[CrossRef](#)]
51. Relini, M.; Maiorano, P.; D'Onghia, G.; Orsi Relini, L.; Tursi, A.; Panza, M. Recaptures of tagged deep-sea shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) in the Mediterranean. *Rap. Com. Int. Mer. Médit.* **2004**, *37*, 424.
52. Millot, C. Circulation in the Western Mediterranean Sea. *J. Mar. Syst.* **1999**, *20*, 423–442. [[CrossRef](#)]
53. Rubio, A.; Arnau, P.A.; Espino, M.; Flexas, M.M.; Jordà, G.; Salat, J.; Puigdefàbregas, J.; Arcilla, A.S. A field study of the behaviour of an anticyclonic eddy on the Catalan continental shelf (NW Mediterranean). *Prog. Oceanogr.* **2005**, *66*, 142–156. [[CrossRef](#)]
54. Sardà, F.; Company, J.B.; Bahamón, N.; Rotllant, G.; Flexas, M.M.; Sánchez, J.D.; Zúñiga, D.; Coenjaerts, J.; Orellana, D.; Jordà, G.; et al. Relationship between environment and the occurrence of the deep-water rose shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) in the Blanes submarine canyon (NW Mediterranean). *Prog. Oceanogr.* **2009**, *82*, 227–238. [[CrossRef](#)]
55. Demestre, M.; Martín, P. Optimum exploitation of a demersal resource in the western Mediterranean: The fishery of the deep-water shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816). *Sci. Mar.* **1993**, *57*, 175–182.
56. Ahumada-Sempoal, M.A.; Flexas, M.M.; Bernardello, R.; Bahamon, N.; Cruzado, A. Northern Current variability and its impact on the Blanes Canyon circulation: A numerical study. *Prog. Oceanogr.* **2013**, *118*, 61–70. [[CrossRef](#)]
57. Dharmarajan, G.; Beatty, W.S.; Rhodes, O.E. Heterozygote deficiencies caused by a Wahlund effect: Dispelling unfounded expectations. *J. Wildl. Manag.* **2013**, *77*, 226–234. [[CrossRef](#)]
58. Puig, P.; Company, J.B.; Sardà, F.; Palanques, A. Responses of deep-water shrimp populations to intermediate nepheloid layer detachments on the Northwestern Mediterranean continental margin. *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* **2001**, *48*, 2195–2207. [[CrossRef](#)]

Artículo 3

An evaluation of the genetic connectivity and temporal stability of the blue and red shrimp *Aristeus antennatus*: a case study of spawning female's grounds in the Western Mediterranean Sea.

Agulló M., Heras S., García-Marín J. L., Vera M., Abras A., Planella L., Roldán M. I. (2022) *Hydrobiologia*, 849: 2043–2055. doi.org/10.1007/s10750-022-04847-3.



An evaluation of the genetic connectivity and temporal stability of the blue and red shrimp *Aristeus antennatus*: a case study of spawning females' grounds in the Western Mediterranean Sea

Melania Agulló · Sandra Heras · José-Luis García-Marín ·
Manuel Vera · Alba Abras · Laia Planella · María Inés Roldán

Received: 30 March 2021 / Revised: 23 February 2022 / Accepted: 2 March 2022 / Published online: 6 April 2022
© The Author(s) 2022

Abstract The blue and red shrimp *Aristeus antennatus* has been intensively exploited by trawling fishery in the Western Mediterranean Sea. Implementation of an adequate management plan needs complete genetic data of the non-spawning and spawning grounds of the species. During the reproductive period, the species forms spawning aggregations in the middle slope, mainly constituted of mature females carrying spermatophores. Seven spawning females' grounds in the Western Mediterranean Sea from Gulf of Lions (France) to Cabo de Palos (Spain) were sampled during two consecutive years, 2016 and 2017. This study assessed for the first time the levels of genetic diversity within spawning grounds, the genetic divergence among them and estimated the degree of temporal genetic stability using multilocus

genotyping. Our results showed a high connectivity of the spawning females' grounds that remains stable during the two analysed years, explained by passive larval dispersal, together with juveniles and adults' migration. We advise that a future management plan for *A. antennatus* fishery should consider the Mediterranean Subarea GSA6 as a single unit, but it should be combined with local monitoring in order to ensure the sustainable exploitation of the populations.

Keywords *Aristeus antennatus* · Deep-sea shrimp · Gene flow · Microsatellite loci · Geo-temporal genetic analysis · Spawning females · Mediterranean Sea

Introduction

In 2002, the Council of the European Union emphasized the need of conducting a sustainable exploitation of fishery resources in order to ensure their long-term viability (European Council, 2002). The inclusion of genetic results in management advice is crucial to achieve that goal, especially when it is combined with life-traits and ecological information (Allendorf et al., 2008; Waples et al., 2008; Waples & Naish, 2009). Indeed, the exploitation of a fishery resource can generate, among others, a loss of genetic diversity within subpopulations, and a modification of fine-scale genetic structure and gene flow. Those genetic changes could lead to a reduction in the recovery of the population or increase extinction risks,

Física, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Lugo, 27002 Lugo, Spain

produce a decrease in biomass and a reduction of the sizes at first maturity (Allendorf et al., 2008). Genetic markers assist in identifying the species' conservation units, in other words the populations, and to estimate their structure, connectivity and genetic diversity (Hauser & Carvalho, 2008). In addition, genetic studies allow to improve the assessment or development of management strategies to ensure the sustainability of exploited marine resources (Ward, 2000).

Furthermore, the population structure of a marine species could be temporally unstable due to several factors, such as processes that modify the ecosystem, sweepstake reproductive success or the individuals' behaviour (Pilling et al., 2008; Waples & Naish, 2009). Hence, an accurate research about the identification of the genetic structure in marine species should include temporal replicates (Waples & Naish, 2009). In addition to molecular data, it is also important to collect other biological data, such as life-history traits (e.g. the size), in order to obtain integrative information on the species (Carvalho & Hauser, 1994). It has been pointed out that a fishery should not show a tendency in the annual variation in size composition of catches so that it could be considered sustainable, since a reduction of individuals' size over time has been indicated as a possible consequence of overfishing (Leitão, 2019).

Aristeus antennatus (Risso, 1816) (Crustacea, Aristeidae) (En—Blue and red shrimp; Fr—Crevette rouge; Sp—Gamba roja) is distributed across the whole Mediterranean Sea, although it increases westwards (Sardà et al., 2004; Fernández et al., 2011). In response to the overexploitation of *A. antennatus* in the Western Mediterranean, the General Fisheries Commission for the Mediterranean Sea decided to include this species into the priority list for action (FAO, 2006), urging to a reduction of the fishing effort in the Balearic Islands and the Eastern coast of Spain (Mediterranean Subareas GSA5 and GSA6, respectively). In fact, even though *A. antennatus* in these areas has been considered one of the main marine resources where it has been intensively exploited by trawling fishery (Massutí et al., 2008), a management plan specific for the species which integrates genetic information with traditional methods has not been developed yet. Nowadays, the fishery of the species is carried out following general guidelines for trawling fisheries (European Council, 2019). To implement an adequate management plan for *A.*

antennatus, it is necessary to identify the population structure with appropriate spatial and temporal replicates (Hauser & Carvalho, 2008; Waples & Naish, 2009), thus ensuring that genetic patterns are stable over time and not caused by sampling artefacts (Waples, 1998).

The blue and red shrimp is the most eurybathic species in the Mediterranean Sea, inhabiting the muddy bottoms from 80 m to nearly 3000 m of depth (Sardà et al., 2004). In the GSA6, the highest abundances have been found in Palamós, Blanes, Dénia and Santa Pola (Esteban, 2018). Adult females are more abundant at depths shallower than 1000 m, whereas the proportion of adult males and juveniles increase in deeper layers (below 1000 m) (Sardà et al., 2003, 2004). The spawning period takes place from late May to late September, with maximum values between June and August (Demestre, 1995). Spawning aggregations are formed in the middle slope (600–800 m depth) during that period, mainly composed of spawning females carrying one or more spermatophores (Sardà et al., 1997; Gorelli et al., 2014; Planella et al., 2019). Since fishery is performed between depths of 400 and 800 m (Carbonell et al., 1999; Maynou, 2008), catches are essentially constituted of females (Gorelli et al., 2014). *A. antennatus* presents sex dimorphism, where females show higher size than males, estimated by the cephalothorax length (CL) (Sardà et al., 2004; Deval & Kapiris, 2016). Sexual maturity in females is indicated according to the stage of gonad maturity, and 26 mm CL is the size at first maturity, which corresponds to age-1 individuals (Demestre & Martín, 1993; Carbonell et al., 2008).

A recent study using microsatellite markers in *A. antennatus* indicated a high level of genetic connectivity among fishing grounds along the Mediterranean Subarea GSA6 (from Gulf of Lions, France, to Cabo de Palos, Spain), supported mainly by the low level of population differentiation (i.e. low F_{ST} values) and the high migration rates (Agulló et al., 2020). In that study, seven fishing grounds (Port de la Selva, Roses, Palamós, Blanes, Vilanova i la Geltrú, Dénia and Santa Pola) were sampled during winter seasons of 2016 and 2017, when captures are mostly composed of small-sized specimens (16–34 mm CL, cohorts 1+ and 2+) and the sex ratio is 1:1 (Carbonell et al., 1999; Agulló et al., 2020). A small but significant regional structure was suggested among 2017

samples, and also local temporal genetic fluctuations between 2016 and 2017, mainly due to the oceanographic singularity at the Blanes fishing ground.

Performing studies during spawning season in addition to non-breeding season is critical because the maximum integrity of the stocks appears during the reproductive period (Reiss et al., 2009). During the spawning period, stocks are likely to present higher genetic differences among them than during non-spawning period, even over short geographical distances (Hauser & Carvalho, 2008 and references therein). Several marine species have been analysed during the spawning period, such as the short-finned squid *Illex argentinus* (Castellanos, 1960) (Roldán et al., 2014), the white-streaked grouper *Epinephelus ongus* (Bloch, 1790) (Nanami et al., 2017) and the deep-water velvet shrimp *Metapenaeopsis sibogae* (De Man, 1907) (Rahman & Ohtomi, 2017). In *A. antennatus*, spawning aggregations are formed during summer, involving females from 1+ to older than 5+ cohorts (Carbonell, 2005) so it would be relevant to evaluate the population genetics during that season.

Here, we expand our former study focussing our attention on summer spawning females. The genetic diversity and divergence of the spawning grounds of the blue and red shrimp were assessed using multilocus genotyping. The studied area covered the Mediterranean Subarea GSA6 by sampling two consecutive years, 2016 and 2017. A multilocus study sampling spawning females would allow to test the population structure and the stability of the genetic pattern in the same years as Agulló et al. (2020). If the genetic pattern was not maintained, it could be due to several reasons, such as sex-biased dispersal and mesoscale features. Finally, the integration of our outcomes into future management plans could improve the species' fishery, making it more sustainable, especially in the medium and long term.

Materials and methods

Sampling

A total of 1400 adult females of *A. antennatus* were obtained from 7 Western Mediterranean locations (GSA6: Port de la Selva, Roses, Palamós, Blanes, Vilanova i la Geltrú, Dénia and Santa Pola), with a North–South distance of 719 km (Fig. 1) in two

consecutive years (2016 and 2017). All samples were captured by commercial trawling vessels during July, and were provided by local fishermen on the date of capture (Table 1). For each individual, CL was measured from the orbital margin to the mid-posterior edge of the carapace, using a digital vernier calliper. Spermatophores were recorded on the thelycum of almost every captured female, which were also sexually mature according to the macroscopic external coloration of the ovary (Demestre & Fortuño, 1992). Analysis of variance (ANOVA) and Tukey post hoc tests were performed to compare the individuals' CL among samples using the GraphPad Prism version 8.4.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Besides, an unpaired two-sided Student's *t* test was performed to compare all the individuals' CL between the two temporal collections.

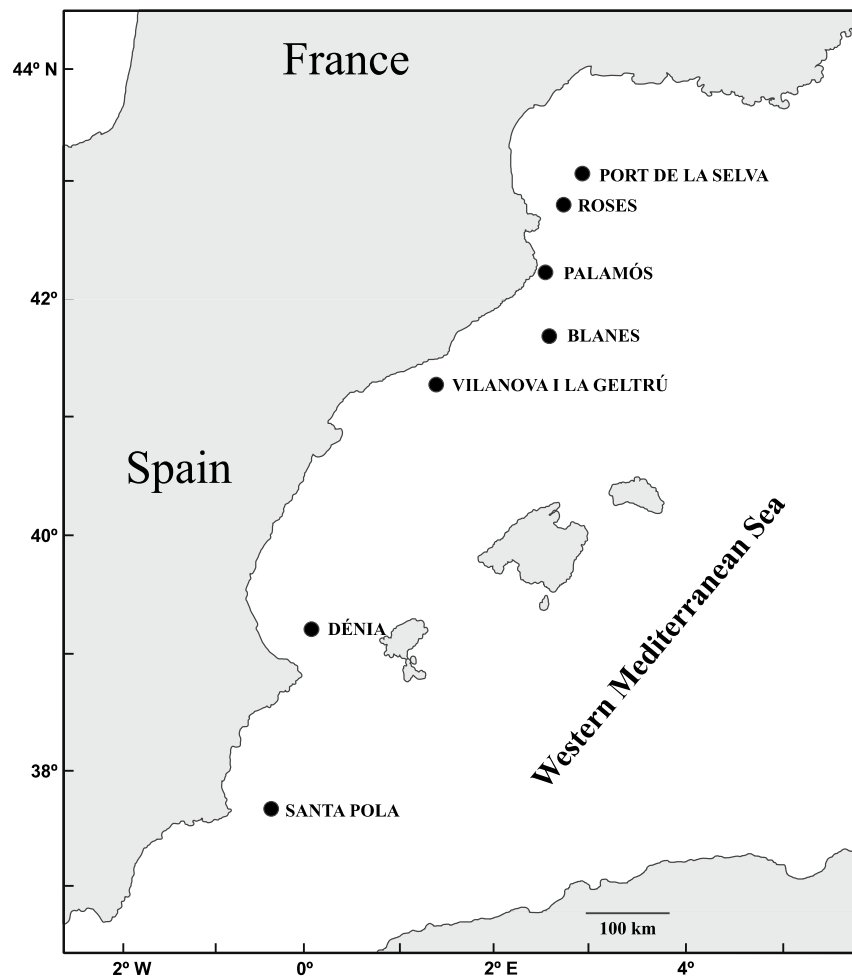
DNA extraction, microsatellite amplification and genotyping

A portion of muscle tissue from each specimen was stored in 70% ethanol. Total genomic DNA extraction was performed according to the phenol: chloroform procedure outlined in Fernández et al. (2013). After isolation, DNA extractions were resuspended in ddH₂O and stored at –20 °C. Twelve previously reported microsatellite loci (*Aa123*, *Aa1255*, *Aa138*, *Aa1444*, *Aa496b*, *Aa667*, *Aa681*, *Aa751*, *Aa956*, *Aa1061*, *Aa1195* and *Aa818*; Heras et al., 2016) were amplified with three PCR multiplex and one PCR singleplex, following the conditions published in Planella et al. (2019). PCR products were visualized in an automatic sequencer (ABI PRISM 3730xl, Applied Biosystems, Foster City, CA) at the sequencing unit of the University of Santiago de Compostela (Campus Lugo, Spain). All genotypes were obtained by allele scoring with GeneMapper 4.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA). GeneScan 500 LIZ Dye Size Standard (Applied Biosystems) was used as internal standard. Individuals genotyped for < 8 loci were excluded from further consideration, leaving a total of 1343 individuals (95.9% of sampled specimens) suitable for genetic statistical analyses.

Genetic data analysis

The software Genepop v. 4.6 (Rousset, 2008) was used to estimate allele frequencies, observed (H_o) and

Fig. 1 Sampling locations of *Aristeus antennatus* in the Western Mediterranean Sea. Further details are given in Table 1



expected (H_e) heterozygosities, inbreeding coefficient (F_{IS}) (Weir & Cockerham, 1984), to test for deviations from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE), and for linkage disequilibrium between pairs of loci. The last two tests were performed with 10,000 dememorizations, 100 batches and 5000 iterations per batch, and P values were adjusted for multiple comparisons using the Bonferroni correction (Rice, 1989). Number of alleles per locus (N_A) and allelic richness (A_R) were computed using FSTAT v. 2.9.3 (Goudet, 2001). Micro-Checker v. 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) was performed to evaluate the frequency of possible null alleles with 1000 randomizations.

Pairwise F_{ST} values among all locations and hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier et al., 1992) were performed using Arlequin

v. 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). The significance of F -statistics was assessed by permutation tests with 10,000 replicates. FreeNA (Chapuis & Estoup, 2007) was carried out to correct pairwise F_{ST} values for null alleles. Hierarchical models of AMOVA were used to assess the partitioning of genetic diversity within and among spawning grounds in 2016 and 2017, as well as the temporal component (2016 vs 2017). Additionally, we calculated pairwise F_{ST} between sampling campaigns (winter 2016, summer 2016, winter 2017 and summer 2017) for each fishing ground to assess the seasonal component using winter female data from Agulló et al. (2020).

The effective population size (N_e) was calculated for the fourteen samples using the bias-corrected version of the method based on linkage disequilibrium

Table 1 Details of the fourteen analysed *Aristeus antennatus* samples, with geographical coordinates, sampled year, depth and sample size (*N*)

Location	Sample code	Sampled year	<i>N</i>	Fishing ground	Geographical coordinates	Depth (metres)
Port de la Selva	PDS16	2016	100	Avión	42°35'32''N 3°46'04''E	555
	PDS17	2017	100			
Roses	ROS16	2016	100	La Trencada	42°23'40''N 3°32'11''E	600
	ROS17	2017	100			
Palamós	PAL16	2016	100	Sant Sebastià	41°53'06''N 3°16'08''E	545
	PAL17	2017	100			
Blanes	BLA16	2016	100	La Barana	41°24'04''N 3°19'05''E	534
	BLA17	2017	100			
Vilanova i la Geltrú	VIG16	2016	100	Can Pere Negre	41°03'71''N 2°01'87''E	750
	VIG17	2017	100			
Dénia	DEN16	2016	100	Dénia's fishing ground	39°04'N 0°22'E	666
	DEN17	2017	100			
Santa Pola	SPO16	2016	100	Playa Nueva	37°35'07''N 0°13'01''W	658
	SPO17	2017	100			

(Hill, 1981; Waples, 2006) as implemented in *NeEstimator* v. 2.1 (Do et al., 2014), and 95% confidence intervals were determined using the non-parametric Jack-knife method. Given the minimum sample size of 77 (VIG16 in Table 2), a critical allele frequency (P_{crit}) of 0.01 was applied to ensure that $P_{crit} > 1/2 N$, where N represents the total sample size, in order to avoid single copy alleles in the analysis.

Pearson's chi-square and Fisher exact tests were carried out in the software POWSIM v. 4.1 (Ryman &

Palm, 2006) to assess the statistical power of our set of loci to detect significant genetic differentiation for the number of loci, the allele frequencies, and sample sizes (1000 dememorizations, 100 batches and 1000 iterations) and 1000 replicates. The power of the tests for detecting the defined level of genetic divergence was interpreted by the percentage of significant outcomes. Different values for F_{ST} were explored by changing the number of generations of drift (t).

Table 2 Estimates of genetic variability for 12 microsatellite loci

Number of genotyped individuals (≥ 8 genotyped loci) (n); mean number of alleles detected (N_A); mean allele richness (A_R); mean observed heterozygosity (H_o); mean expected heterozygosity (H_e); inbreeding coefficient (F_{IS}); effective population size (N_e); confidence interval (Jack-knife method) (CI). Sample codes as in Table 1

Sample code	<i>n</i>	N_A	A_R	H_o	H_e	F_{IS}	N_e	CI for N_e
PDS16	89	8.8	8.3	0.465	0.613	0.241*	6007.0	224.6-infinite
PDS17	100	8.8	8.6	0.464	0.632	0.266*	Infinite	348.6-infinite
ROS16	96	8.3	7.7	0.427	0.635	0.327*	386.9	161.7-infinite
ROS17	100	8.8	8.5	0.475	0.628	0.244*	2848.0	348.2-infinite
PAL16	99	9.1	8.5	0.473	0.623	0.241*	1142.3	213.9-infinite
PAL17	99	8.4	8.2	0.479	0.628	0.237*	631.6	211.8-infinite
BLA16	96	9.7	8.9	0.491	0.623	0.211*	2109.8	220.6-infinite
BLA17	100	9.8	9.4	0.479	0.633	0.243*	481.9	169.7-infinite
VIG16	77	8.5	8.2	0.434	0.643	0.325*	Infinite	388.3-infinite
VIG17	100	9.8	9.4	0.489	0.644	0.240*	Infinite	299.2-infinite
DEN16	93	8.4	7.8	0.447	0.631	0.292*	Infinite	427.6-infinite
DEN17	94	8.9	8.8	0.492	0.642	0.234*	Infinite	425.3-infinite
SPO16	100	9.0	8.3	0.487	0.629	0.225*	4858.2	243.6-infinite
SPO17	100	9.3	9.1	0.477	0.637	0.251*	928.7	200.6-infinite
Average		9.0	8.6	0.470	0.632	0.256		

*Significant deviation from Hardy–Weinberg equilibrium after Bonferroni correction

Isolation by distance (IBD) among samples within temporal collection was evaluated testing the correlation between genetic (linearized as $F_{ST}/(1-F_{ST})$; Rousset, 1997) and geographical distances (measured as the shortest coastline between two locations in kilometres using Google Earth) with a Mantel test with 1000 permutations by NTSYSpc v. 2.1 (Rohlf, 1993).

We investigated the direction and magnitude of relative migration between samples within temporal collections with div-Migrate online (Sundqvist et al., 2016). For each temporal collection, a relative migration network was generated using the effective number of migrants (N_m) estimator. A filter threshold was set to 0.4 in both 2016 and 2017.

Results

Statistical analysis of the cephalothorax length

Despite all individuals were considered to belong to the medium-sized commercial category by the fishermen, the total CL's range varied from 24.63 mm (in SPO16) to 47.18 mm (in PAL17) (Fig. 2). The Tukey's post hoc test indicated significant differentiation in 71 out of 91 pairwise comparisons (Supplementary Table S1). Furthermore, the unpaired t test performed

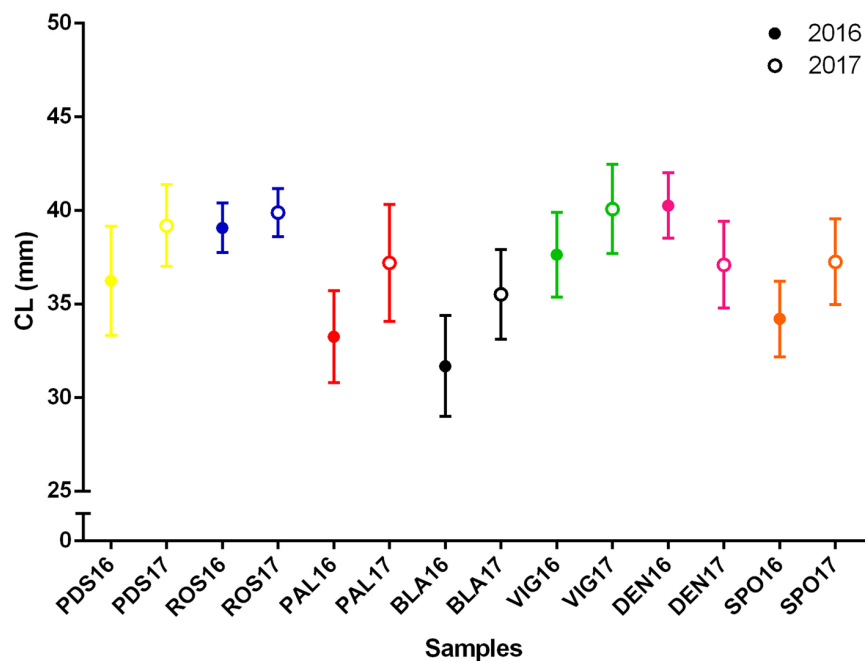
between the two temporal 2016 and 2017 collections showed a significant differentiation ($t=11.29$, degree of freedom = 1398, P value < 0.0001).

Diversity within locations

The number of alleles per locus (N_A) ranged between 2 and 23 in 2016 samples and from 2 to 24 in 2017 ones (Supplementary Table S2). The average N_A was 8.8 in 2016 and 9.1 in 2017 (Table 2). The mean allelic richness (A_R) was 8.2 in 2016 and 8.9 in 2017. The mean observed heterozygosity (H_o) was 0.461 in 2016, whereas in 2017 it was 0.479. The mean expected heterozygosity (H_e) was 0.628 in 2016 and 0.635 in 2017 (Table 2). Significant linkage disequilibrium was detected in the pair of loci *Aa1444* and *Aa681* in SPO17 after Bonferroni correction ($P < 0.0001$), but not in the other 13 samples.

Only three out of twelve loci (*Aa138*, *Aa496b* and *Aa1195*) showed no departure from the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) in any sample (Supplementary Table S2). The fourteen samples presented a significant deviation from HWE after the Bonferroni correction due to heterozygote deficit, as indicated by the observed positive F_{IS} values (Table 2). This fact could be a consequence of null alleles. Estimated allele frequencies for null alleles were generally low

Fig. 2 Mean cephalothorax length (CL) per sample, with standard deviation. Each colour represents a location. Sample codes as in Table 1



and they were not consistent in all loci and across samples (Supplementary Table S2). Only the locus *Aa818* was discarded from all subsequent analyses because it showed null alleles frequency higher than 0.2 in four samples. Additionally, significant departures from HWE might result from pooling specimens from distinct cohorts.

Geographical and temporal variation

Five out of the fourteen samples had an estimated infinite N_e , whereas in three it was close to 500 (Table 2), so $N_e = 500$ and $N_e = 10,000$ were selected to assess the statistical power of our loci to detect

genetic differentiation. The evaluation of the statistical power estimated a high probability (>99%) of detecting structure for 0.001–0.003 F_{ST} values, suggesting that our test would detect a real population structure if true estimates of F_{ST} were at this level. Nevertheless, AMOVA results did not detect significant genetic divergence either in the 2016 or in 2017 ($F_{ST} = 0.0013$, $P > 0.05$ and $F_{ST} = 0.0003$, $P > 0.05$, respectively) (Table 3). Likewise, analyses of pairwise genetic differentiation between each pair of samples within each temporal collection showed no significant F_{ST} values ranging from 0.0000 to 0.0028 in both collections (Table 4). In addition, there were

Table 3 Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) with P values (P)

Hypothesis	Source of variation	Sum of squares	Variance components	% Variation	F -statistic	P
2016 Unstructured	Among fishing grounds	25.25	0.004	0.128	$F_{ST} = 0.0013$	0.535
	Within samples	4287.30	3.432	99.872		
2017 Unstructured	Among fishing grounds	22.18	0.001	0.033	$F_{ST} = 0.0003$	0.920
	Within samples	4723.37	3.477	99.967		
2016 vs 2017	Between years	4.85	0.001	0.020	$F_{CT} = 0.0002$	0.164
	Among fishing grounds within year	47.43	0.003	0.078	$F_{SC} = 0.0008$	0.855
	Within samples	9010.67	3.456	99.902	$F_{ST} = 0.0010$	0.806

Table 4 Pairwise F_{ST} values between the seven samples (below the diagonal) and P values (above the diagonal) for the two temporal collections. Sample codes are given in Table 1

2016	PDS16	ROS16	PAL16	BLA16	VIG16	DEN16	SPO16
PDS16	–	0.194	0.828	0.986	0.984	0.992	0.996
ROS16	0.0028	–	0.326	0.239	0.505	0.551	0.382
PAL16	0.0000	0.0018	–	0.163	0.995	0.263	0.427
BLA16	0.0000	0.0022	0.0024	–	0.738	0.971	0.860
VIG16	0.0000	0.0013	0.0000	0.0000	–	0.874	0.953
DEN16	0.0000	0.0010	0.0021	0.0000	0.0000	–	0.988
SPO16	0.0000	0.0015	0.0011	0.0000	0.0000	0.0000	–
2017	PDS17	ROS17	PAL17	BLA17	VIG17	DEN17	SPO17
PDS17	–	0.692	0.417	0.787	0.979	0.962	0.630
ROS17	0.0002	–	0.218	0.133	0.548	0.507	0.467
PAL17	0.0013	0.0022	–	0.663	0.835	0.955	0.757
BLA17	0.0000	0.0028	0.0003	–	0.685	0.948	0.784
VIG17	0.0000	0.0008	0.0000	0.0003	–	0.999	0.695
DEN17	0.0000	0.0008	0.0000	0.0000	0.0000	–	0.775
SPO17	0.0000	0.0011	0.0000	0.0000	0.0002	0.0000	–

Table 5 Pairwise F_{ST} and P values between sampling campaigns (winter 2016, summer 2016, winter 2017 and summer 2017) at each fishing ground

	Port de la Selva	Roses	Palamós	Blanes	Vilanova i la Geltrú	Dènia	Santa Pola
2016 W vs S	F_{ST} value	0.0030	0.0039	-0.0020	-0.0005	-0.0007	-0.0005
	P	0.354	0.147	0.938	0.808	0.904	0.814
2016 S vs 2017 W	F_{ST} value	0.0007	0.0028	0.0032	-0.0012	0.0053	-0.0017
	P	0.648	0.298	0.252	0.873	0.053	0.981
2017 W vs S	F_{ST} value	0.0006	0.0015	0.0067	-0.0012	-0.0009	0.0002
	P	0.595	0.504	0.060	0.895	0.893	0.722
2016 W vs 2017 S (whole studied period)	F_{ST} value	-0.0009	0.0026	-0.0014	-0.0007	-0.0006	0.0005
	P	0.905	0.294	0.916	0.839	0.874	0.684

Winter females from Agulló et al. (2020). Winter (W), Summer (S)

no substantial differences in estimated F_{ST} values correcting, or not, for the presence of null alleles.

The AMOVA performed to compare the two temporal collections revealed no significant variation between them ($F_{CT}=0.0002, P>0.05$) (Table 3). Furthermore, no pairwise F_{ST} differed significantly from zero when comparing the two temporal samples of each location ($P>0.05$) (Supplementary Table S3). On the other hand, none of the F_{ST} between consecutive sampling campaigns (winter 2016, summer 2016, winter 2017 and summer 2017) at each of the seven fishing grounds was significant (Table 5) and no significant genetic differences were observed throughout the entire study period (winter 2016 vs. summer 2017).

No association between genetic differentiation and geographical distance was detected either in 2016 ($r=-0.1925, P=0.228$) or in 2017 samples ($r=-0.2861, P=0.138$). Results of migration indicated a high level of genetic connectivity among all samples at the two summer seasons, without a pattern relating the level of connectivity with geographical proximity (Fig. 3).

Discussion

Diversity within locations

The mean observed and expected heterozygosities are in accordance with the previous studies using the same set of microsatellite loci and the same species ($H_o=0.470, H_e=0.632$, Table 2) ($H_o=0.458, H_e=0.628$, Heras et al., 2019; $H_o=0.443, H_e=0.611$ recalculated excluding *Aa42I*, Planella et al., 2019; $H_o=0.468, H_e=0.633$, Agulló et al., 2020). The mean number of alleles per locus ($N_A=9.0$, Table 2) was slightly higher than the values obtained in Heras et al. (2019) ($N_A=7.8$) and Planella et al. (2019) ($N_A=7.9$ recalculated excluding *Aa42I*) due to the higher sample size of the present study ($N=494$ in Heras et al., 2019; $N=111$ in Planella et al., 2019). Indeed, the mean N_A was almost the same when analysing similar sample size in winter season ($N=1386, N_A=9.1$, Agulló et al., 2020).

The heterozygote deficit (i.e. F_{IS} positive values), which is responsible for the deviations from HWE found across the fourteen samples, is a common feature on penaeids (Heras et al., 2016 and references

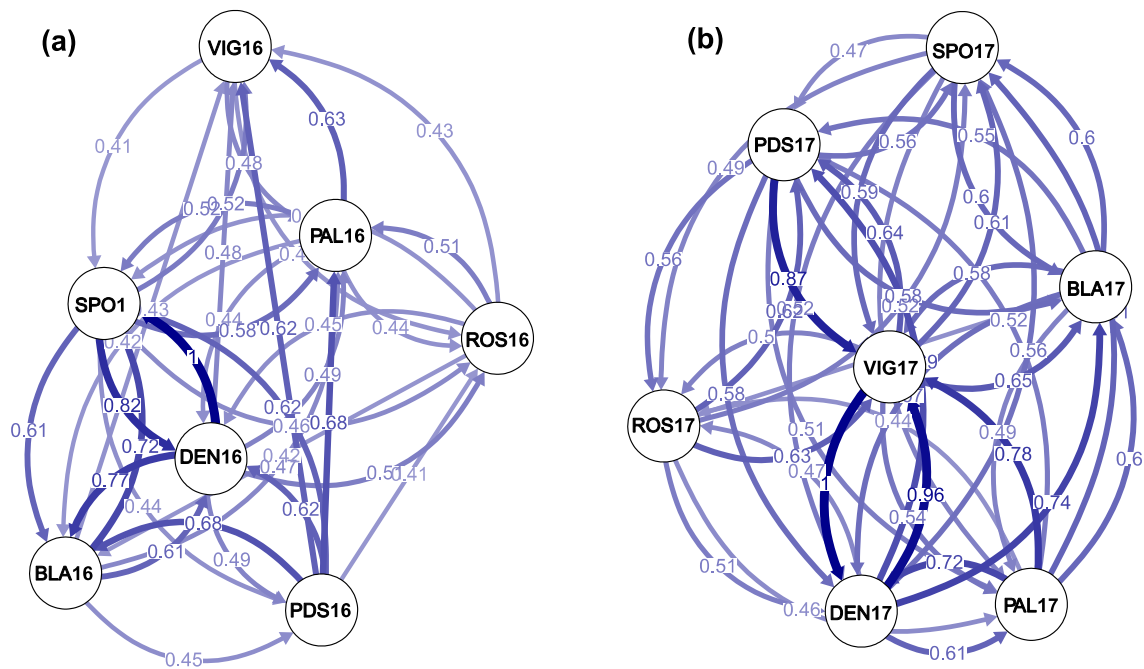


Fig. 3 Relative migration networks estimated by div-Migrate-online. Circles represent samples, while arrows indicate the direction and magnitude of relative migration levels using Nm

estimator. Thicker arrows indicate stronger migration. Sample codes as in Table 1. Networks are shown for the two temporal collections, **a** 2016 and **b** 2017

therein). One possible explanation for the F_{IS} positive values is the presence of null alleles (Supplementary Table S2). On the other hand, heterozygote deficits can reflect Wahlund effects resulting from the collection of differentiated subpopulations or cohorts in the same sample (Addison & Hart, 2005). Studied individuals were classified by the vessels' crew on board according to a commercial category (medium-sized shrimp), instead of according to a modal size class related to a specific cohort. Furthermore, the mean size of individuals in the medium-sized category was slightly different among vessels' crew. In fact, the mean CL was also significantly different among several samples (Supplementary Table S1), even between the two year collections at some locations (Fig. 2 and Supplementary Table S1). Females CL at modal sizes and cohorts were reviewed by Carbonell (2005), who suggested that females of around 30 mm CL would be classified as cohort 2+, whereas females between 38 and 40 mm CL would be classified as 3+. In this study, the mean CL among all

samples was 37.04 ± 3.42 , which confirms the pooling of different cohorts in our samples.

Genetic connectivity pattern and temporal stability

The main objective of this study was to assess for the first time the divergence of the spawning females' grounds of *A. antennatus* during the reproductive period in the Mediterranean Subarea GSA6. Our results showed an overall regional genetic homogeneity confirming a high genetic connectivity among females between spawning aggregations (Fig. 3, Tables 3 and 4), as recently observed from samples captured during the winter season at the same fishing grounds, when smaller males and females contributed to the fishery (Agulló et al., 2020, but see below for local divergences). Our findings also agree with the previous studies indicating high genetic homogeneity among *A. antennatus* populations in the Western and Central Mediterranean Sea applying different genetic markers such as allozymes (Sardà et al., 1998), mitochondrial DNA (Maggio et al., 2009; Roldán et al.,

2009; Sardà et al., 2010; Fernández et al., 2011; Marra et al., 2015) and microsatellites (Cannas et al., 2012; Heras et al., 2019).

The high level of genetic connectivity that it has been reported in the species is probably due to passive dispersal by oceanographic currents and active migration. In the Northwestern Mediterranean Sea, the Northern Current (Fernández et al., 2005) could be considered as a dispersal mechanism for *A. antennatus*. Thus, blue and red shrimp larval stages have been found in the upper water layers (Carreton et al., 2019 and references therein), which means that they are likely dispersed by this surface current. Furthermore, juvenile and/or adult migration may contribute to genetic connectivity. Indeed, it has been proven that adults have the capability of movement, as they do seasonal displacements between the open slope and submarine canyons, mainly related to the spawning period (Sardà et al., 1997, 2004). Females and males could present a different degree of dispersal, as several genetic studies using microsatellite loci have indicated. Planella et al. (2019) found that Palamós' females mated with both males from the same location and males from other fishing grounds, suggesting a migration of *A. antennatus*' adult males from one location to another. Recently, Abras et al. (2021) detected significant juvenile males' incomes at the Palamós' fishing ground from neighbouring ones.

On the other hand, the temporal analyses showed that the regional patterns of population genetic structure remain stable for females not only between years (Table 3 and Supplementary Table S3) but also between seasons within years (Table 5) despite changes in the relative abundance of cohorts during winter and summer collections (Carbonell et al., 1999). By contrast, a small but significant differentiation was found between 2016 and 2017 winter collections, when sex ratios were close to 1:1 (Agulló et al., 2020). Thus, specific patterns of males' migration beyond passive larval dispersal could be the main reason for the temporal differentiation found in Agulló et al. (2020) at some of the studied fishing grounds. Cannas et al. (2012) had already pointed out a sex-biased dispersal favouring of *A. antennatus* females in the Central Mediterranean Sea.

Management implications

Fisheries management must take into account the conservation of genetic diversity to ensure the perpetuation of natural populations, avoiding their over-exploitation (Waples & Naish, 2009). Since variations in the genetic population structure, including a decrease in genetic variability, can occur in a short period of time, a temporal monitoring is recommended; both at levels of genetic diversity within the population and at the levels of connectivity, to study long-term changes (Carvalho & Hauser, 1994; Allendorf et al., 2008).

The effective population size (N_e) is a crucial parameter to draw inferences on the adaptive potential of the population and its value should not be lower than 1000 to ensure population sustainability and evolutionary potential, thus minimizing extinction risk (Frankham et al., 2014). *A. antennatus* fishing grounds in the GSA6 displayed moderate and high N_e values (Table 2), which means that the blue and red shrimp fishery would maintain the genetic variability in the long term.

On the other hand, even though our temporal analysis includes four sampling campaigns in two years, 2016 and 2017, more than 2000 female individuals were genotyped. The genetic information obtained is a forceful estimation of the genetic connectivity and the temporal stability of the blue and red shrimp populations in the GSA6.

The low and non-significant differentiation detected among females from distant *A. antennatus* fishing grounds indicates a high gene flow that would limit local adaptation (Hauser & Carvalho, 2008). Therefore, we advise considering *A. antennatus* in the GSA6 as a single management unit, although the boundaries could be expanded beyond the limits of GSA6 if genetic homogeneity was detected in adjacent Mediterranean Subareas. Nevertheless, because of genetic instability indicated at some fishing grounds between consecutive winter samples by Agulló et al. (2020), when males are present (Carbonell et al., 1999), and females show increased dispersal (Cannas et al., 2012), keeping each fishing ground under local monitoring is needed for a sustainable exploitation of *A. antennatus*. Thus, the establishment of a fishery closure for the blue and red shrimp during winter in the GSA6 as declared for this and other Spanish demersal fisheries (Boletín Oficial

del Estado, 2020) is likely to improve male recruitment and reproduction in the next spawning season. Finally, a future management plan of the blue and red shrimp fishery integrating genetic data, biological information and hydrodynamic modelling would allow the sustainable exploitation of the fishing grounds (Ward, 2000; Reiss et al., 2009).

Acknowledgements We gratefully thank the ship-owners Francisco Torné (Eli-Hermi II), Manel Noguera (Port de Roses), Conrad Maseguer (Nova Gasela), Pere Pérez (Peret II), Marc Pons (Avi Salvador), Rafael Montoya (Avi Pau), Juan Antonio Sepulcre (La androna) and Jorge Castejón (Isabel y Andrés) for assistance in sampling collection. This paper was considerably improved by suggestions from two anonymous reviewers and the Associate Editor.

Funding Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature. This work was supported by a grant from Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (CTM2014-54648-C2-2-R) to MIR. LP and MA benefited from predoctoral fellowship from the Universitat de Girona (BR2014 and IFUdG2018, respectively).

Data and material availability The datasets generated and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Code availability Not applicable.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

Ethical approval Not applicable.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Abras, A., J. L. García-Marín, S. Heras, M. Vera, M. Agulló, L. Planella & M. I. Roldán, 2021. Male deep-sea shrimps *Aristeus antennatus* at fishing grounds: growth and first evaluation of recruitment by multilocus genotyping. *Life* 11: 116.
- Addison, J. A. & M. W. Hart, 2005. Spawning, copulation and inbreeding coefficients in marine invertebrates. *Biology Letters* 1: 450–453.
- Agulló, M., S. Heras, J. L. García-Marín, M. Vera, L. Planella & M. I. Roldán, 2020. Genetic analyses reveal temporal stability and connectivity pattern in blue and red shrimp *Aristeus antennatus* populations. *Scientific Reports* 10: 21505.
- Allendorf, F. W., P. R. England, G. Luikart, P. A. Ritchie & N. Ryman, 2008. Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends in Ecology & Evolution* 23: 327–337.
- Boletín Oficial del Estado, 2020. Orden APA/1212/2020, de 16 de diciembre, por la que se establecen zonas de veda espacio-temporal para la modalidad de arrastre de fondo y cerco en determinadas zonas del litoral mediterráneo para el periodo 2021–2022. BOE 331: 117341–117346.
- Cannas, R., F. Sacco, M. C. Follesa, A. Sabatini, M. Arculeo, S. Lo Brutto, T. Maggio, A. M. Deiana & A. Cau, 2012. 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., M. Carbonell, M. Demestre, A. Grau & S. Monserrat, 1999. The red shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) fishery and biology in the Balearic Islands, Western Mediterranean. *Fisheries Research* 44: 1–13.
- Carbonell, A., 2005. Evaluación de la gamba rosada, *Aristeus antennatus* (Risso 1816), en el Mar Balear. PhD dissertation, University of the Balearic Islands, Mallorca, Spain: 212 pp.
- Carbonell, A., J. Lloret & M. Demestre, 2008. Relationship between condition and recruitment success of red shrimp (*Aristeus antennatus*) in the Balearic Sea (Northwestern Mediterranean). *Journal of Marine Systems* 71: 403–412.
- Carretón, M., J. B. Company, L. Planella, S. Heras, J. L. García-Marín, M. Agulló, M. Clavel-Henry, G. Rotllant, A. Dos Santos & M. I. Roldán, 2019. Morphological identification and molecular confirmation of the deep-sea blue and red shrimp *Aristeus antennatus* larvae. *PeerJ* 7: e6063.
- Carvalho, G. R. & L. Hauser, 1994. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4: 326–350.
- Chapuis, M. P. & A. Estoup, 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24: 621–631.
- Demestre, M. & J. M. Fortuño, 1992. Reproduction of the deep-water shrimp *Aristeus antennatus* (Decapoda: Dendrobranchiata). *Marine Ecology Progress Series* 84: 41–51.
- Demestre, M. & P. Martín, 1993. Optimum exploitation of a demersal resource in the western Mediterranean: the fishery of the deep-water shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816). *Scientia Marina* 57: 175–182.

- Demestre, M., 1995. Moults activity-related spawning success in the Mediterranean deep-water shrimp *Aristeus antennatus* (Decapoda: Dendrobranchiata). *Marine Ecology Progress Series* 127: 57–64.
- Deval, M. C. & K. Kaporis, 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.
- Do, C., R. S. Waples, D. Peel, G. M. Macbeth, B. J. Tillett & J. R. Ovenden, 2014. *NeEstimator V2*: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (*Ne*) from genetic data. *Molecular Ecology Resources* 14: 209–214.
- Esteban, A., 2018. Stock Assessment Form Demersal species Reference year 2017. Reporting year 2018, FAO, Rome: 32.
- European Council, 2002. Council Regulation (EC) No 2371/2002 of 20 December 2002 on the conservation and sustainable exploitation of fisheries resources under the Common Fisheries Policy. Official Journal of the European Communities L 358: 59–80.
- European Council, 2019. Regulation (EU) 2019/1022 of the European Parliament and of the Council of 20 June 2019 establishing a multiannual plan for the fisheries exploiting demersal stocks in the western Mediterranean Sea and amending Regulation (EU) No 508/2014. Official Journal of the European Union L 172: 1–17.
- Excoffier, L., P. E. Smouse & J. M. Quattro, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- Excoffier, L. & H. E. L. Lischer, 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564–567.
- FAO, 2006. General Fisheries Commission for the Mediterranean. Report of the ninth session of the Scientific Advisory Committee. FAO Fisheries Report 814, Rome, Italy: 106 pp.
- Fernández, M. V., S. Heras, F. Maltagliati, A. Turco & M. I. Roldán, 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, M. V., S. Heras, F. Maltagliati & M. I. Roldán, 2013. Deep genetic divergence in giant red shrimp *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1827) across a wide distributional range. *Journal of Sea Research* 76: 146–153.
- Fernández, V., D. E. Dietrich, R. L. Haney & J. Tintoré, 2005. Mesoscale, seasonal and interannual variability in the Mediterranean Sea using a numerical ocean model. *Progress in Oceanography* 66: 321–340.
- Frankham, R., C. J. A. Bradshaw & B. W. Brook, 2014. Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, red list criteria and population viability analyses. *Biological Conservation* 170: 56–63.
- Gorelli, G., J. B. Company & F. Sardà, 2014. Management strategies for the fishery of the red shrimp *Aristeus antennatus* in Catalonia (NE Spain). *Marine Stewardship Council Science Series* 2: 116–127.
- Goudet, J., 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Accessed 15 Sep 2020. <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Hauser, L. & G. R. Carvalho, 2008. Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. *Fish and Fisheries* 9: 333–362.
- Heras, S., L. Planella, I. Caldarazzo, M. Vera, J. L. García-Marín & M. I. Roldán, 2016. Development and characterization of novel microsatellite markers by next generation sequencing for the blue and red shrimp *Aristeus antennatus*. *PeerJ* 4: e2200.
- Heras, S., L. Planella, J. L. García-Marín, M. Vera & M. I. Roldán, 2019. Genetic structure and population connectivity of the blue and red shrimp *Aristeus antennatus*. *Scientific Reports* 9: 13531.
- Hill, W. G., 1981. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetics Research* 38: 209–216.
- Leitão, F., 2019. Mean size of the landed catch: a fishery community index for trend assessment in exploited marine ecosystems. *Frontiers in Marine Science* 6: 302.
- Maggio, T., S. Lo Brutto, R. Cannas, A. M. Deiana & M. Arculeo, 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.
- Marra, A., S. Mona, R. M. Sà, G. D’Onghia & P. Maiorano, 2015. Population genetic history of *Aristeus antennatus* (Crustacea: Decapoda) in the Western and Central Mediterranean Sea. *PLoS ONE* 10: e0117272.
- Massutí, E., S. Monserrat, P. Oliver, J. Moranta, J. L. López-Jurado, M. Marcos, M. Hidalgo, B. Guijarro, A. Carbonell & P. Pereda, 2008. The influence of oceanographic scenarios on the population dynamics of demersal resources in the western Mediterranean; Hypothesis for hake and red shrimp off Balearic Islands. *Journal of Marine Systems* 71: 421–438.
- Maynou, F., 2008. Environmental causes of the fluctuations of red shrimp (*Aristeus antennatus*) landings in the Catalan Sea. *Journal of Marine Systems* 71: 294–302.
- Nanami, A., T. Sato, Y. Kawabata & J. Okuyama, 2017. Spawning aggregation of white-streaked grouper *Epinephelus ongus*: spatial distribution and annual variation in the fish density within a spawning ground. *PeerJ* 5: e3000.
- Pilling, G. M., L. T. Kell, T. Hutton, P. J. Bromley, A. N. Tidd & L. J. Bolle, 2008. Can economic and biological management objectives be achieved by the use of MSY-based reference points? A North Sea plaice (*Pleuronectes platessa*) and sole (*Solea solea*) case study. *ICES Journal of Marine Science* 65: 1069–1080.
- Planella, L., M. Vera, J. L. García-Marín, S. Heras & M. I. Roldán, 2019. Mating structure of the blue and red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) characterized by relatedness analysis. *Scientific Reports* 9: 7227.
- Rahman, M. M. & J. Ohtomi, 2017. Reproductive biology of the deep-water velvet shrimp *Metapenaeopsis sibogae* (De Man, 1907) (Decapoda: Penaeidae). *Journal of Crustacean Biology* 37: 743–752.

- Reiss, H., G. Hoarau, M. Dickey-Collas & W. J. Wolff, 2009. Genetic population structure of marine fish: mismatch between biological and fisheries management units. *Fish and Fisheries* 10: 361–395.
- Rice, W. R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223–225.
- Rohlf, F. J., 1993. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1, Setauket, New York: 43 pp.
- Roldán, M. I., S. Heras, R. Patellani & F. Maltagliati, 2009. Analysis of genetic structure of the red shrimp *Aristeus antennatus* from the Western Mediterranean employing two mitochondrial regions. *Genetica* 136: 1–4.
- Roldán, M. I., L. Planella, S. Heras & M. V. Fernández, 2014. Genetic analyses of two spawning stocks of the short-finned squid (*Illex argentinus*) using nuclear and mitochondrial data. *Comptes Rendus Biologies* 337: 503–512.
- Rousset, F., 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145: 1219–1228.
- Rousset, F., 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103–106.
- Ryman, N. & S. Palm, 2006. POWSIM: a computer program for assessing statistical power when testing for genetic differentiation. *Molecular Ecology Notes* 6: 600–602.
- Sardà, F., F. Maynou & L. Talló, 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., C. Bas, M. I. Roldán, C. Pla & J. Leonart, 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., J. B. Company & F. Maynou, 2003. 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., G. D'Onghia, C. Y. Politou, J. B. Company, P. Maiorano & K. Kapiris, 2004. 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., M. I. Roldán, S. Heras & F. Maltagliati, 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.
- Sundqvist, L., K. Keenan, M. Zackrisson, P. Prodöhl & D. Kleinhans, 2016. Directional genetic differentiation and relative migration. *Ecology and Evolution* 6: 3461–3475.
- Van Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills & P. Shipley, 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535–538.
- Waples, R. S., 1998. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity* 89: 438–450.
- Waples, R. S., 2006. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conservation Genetics* 7: 167–184.
- Waples, R. S., A. E. Punt & J. M. Cope, 2008. Integrating genetic data into management of marine resources: how can we do it better? *Fish and Fisheries* 9: 423–449.
- Waples, R. S. & K. A. Naish, 2009. Genetic and evolutionary considerations in fishery management: research needs for the future. In Beamish, R. J. & B. J. Rothschild (eds), *The Future of Fisheries Science in North America*, Fish & Fisheries Series Springer, Dordrecht: 427–451.
- Ward, R. D., 2000. Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia* 420: 191–201.
- Weir, B. S. & C. C. Cockerham, 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

DISCUSIÓN GENERAL

Durante los últimos diez años, la IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) ha estimado que alrededor del 23% de las especies de crustáceos se encuentran amenazadas, ya sean especies vulnerables, en peligro de extinción o en peligro crítico de extinción (IUCN, 2022). Los factores que llevan a la extinción de una especie se dividen en dos tipos, determinísticos y estocásticos. Los relacionados con destrucción de hábitats, sobreexplotación, contaminación o cambio climático se agrupan dentro de los determinísticos, provocados por el ser humano (Caughley, 1994). En cambio, los factores estocásticos o cambios aleatorios están relacionados con componentes demográficos, medioambientales o genéticos, los cuales pueden producir una pérdida de variación genética (Shaffer, 1981; Frankham, 2005). En particular, la pérdida de diversidad genética en poblaciones de pequeño tamaño

afecta a la habilidad de dichas poblaciones de adaptarse a los cambios ambientales, es decir, al potencial evolutivo, y por tanto aumenta el riesgo de extinción de esa población (Frankham *et al.*, 2014). Los cambios ambientales pueden deberse a multitud de causas, tales como ciclos climáticos, calentamiento global, enfermedades o aparición de nuevos depredadores, competidores o parásitos (Frankham, 2005).

La IUCN recomienda tres formas de biodiversidad que deberían ser conservadas: la diversidad de los ecosistemas, la diversidad de especies y la diversidad genética poblacional (Frankham, 2005). Una especie con un alto potencial evolutivo es aquella que posee muchas poblaciones diferentes, por lo que es primordial centrar la conservación en un nivel poblacional, y así poder mantener la especie con un bajo riesgo de extinción a largo plazo (Frankham, 2005; Frankham *et al.*, 2014). Si la diversidad genética, y por tanto la variabilidad de los organismos a nivel poblacional, no se conoce y conserva correctamente, las estrategias de recuperación de una especie y los planes de gestión en general podrían ser inadecuados y el riesgo de extinción podría ser subestimado (Frankham, 2005). Los estudios genéticos también proporcionan información fundamental en cuanto a la estructura demográfica y la historia evolutiva de una población (Allendorf y Luikart, 2007). Un estudio que evalúe la variación genética a lo largo de la distribución de una especie permitirá identificar qué zonas geográficas deberían considerarse como unidades independientes, lo cual debería tenerse en consideración, por ejemplo, a la hora de establecer las unidades de gestión de un recurso pesquero (Allendorf y Luikart, 2007).

A la hora de gestionar poblaciones naturales, así como analizar los efectos de la actividad humana en esas poblaciones, es necesario identificar las unidades de gestión o MUs (*Management Units*) (Palsbøl *et al.*, 2006). Moritz (1994) definió las MUs como poblaciones con una divergencia significativa de las frecuencias alélicas en *loci* nucleares o mitocondriales, sin tener en cuenta la variación filogenética de

los alelos. Así, las MUs son aquellas poblaciones de individuos con un nivel de flujo génico entre ellas tan bajo que son funcionalmente independientes, por lo que tendrían que ser monitoreadas y gestionadas de forma independiente (Moritz, 1994; Palsbøl *et al.*, 2006). Por tanto, es fundamental conocer los límites de las MUs y estimar la dispersión de individuos entre poblaciones (Palsbøl *et al.*, 2006). En las últimas décadas el número de estudios poblacionales que utilizan los marcadores moleculares para inferir si las poblaciones de interés forman parte de la misma MU ha aumentado considerablemente (Palsbøl *et al.*, 2006; Hauser y Carvalho, 2008). En una especie explotada como *Aristeus antennatus*, sometida a presión pesquera desde los años 1930 y que posee una gran importancia económica en varios países mediterráneos (detallado en la Introducción General, págs. 41-44), desarrollar un plan de gestión que garantice la conservación de las poblaciones cobra vital importancia, no solo para garantizar la explotación del recurso a largo plazo, sino también para el mantenimiento de la red socioeconómica del cual depende.

La ausencia de barreras al flujo génico combinada con ciertas características que presentan las especies marinas, tales como un tamaño de población elevado, alta fecundidad y la presencia de una fase larvaria pelágica y/o migratoria, suele dar como resultado una ausencia de estructura poblacional (Jørgensen *et al.*, 2005). Una gran variedad de especies marinas tiene la capacidad de dispersarse a lo largo de grandes distancias geográficas, ya sea pasivamente por huevos o deriva larvaria arrastrados por las corrientes marinas, o por migración activa en el caso de los juveniles y adultos (Gilbert-Horvath *et al.*, 2006; Walther *et al.*, 2015). La dispersión de individuos promueve el flujo génico y la conectividad entre las poblaciones, por lo que previene la diferenciación genética entre estas (Gilbert-Horvath *et al.*, 2006; Walther *et al.*, 2015). A mayor duración del periodo de vida pelágica, se presupone que una especie presenta una mayor capacidad de dispersión larvaria y por tanto se asociará a mayores niveles de flujo génico (Pascual *et al.*, 2017).

No obstante, se ha comprobado que existe una estructura poblacional en varias especies marinas en distancias geográficas relativamente pequeñas, de incluso decenas de kilómetros (Hedgecock, 1994). Las causas pueden ser diversas, ya que además de la dispersión larvaria, la oceanografía y las barreras al flujo génico, se deben añadir otros procesos locales que pueden afectar a la estructura poblacional en una escala muy pequeña, tanto temporal como espacial, provocando una inestabilidad en las frecuencias alélicas y la variación de la estructura poblacional (Gilbert-Horvath *et al.*, 2006). Así, la presente tesis doctoral se centra en estudiar los caladeros de *Aristeus antennatus* más importantes de la GSA6 del Mar Mediterráneo (Artículos 1 y 3 de Resultados), con dos réplicas temporales en cada caso, pudiendo así no solamente realizar un estudio de la conectividad genética geográfica a lo largo de la GSA6, sino también el análisis temporal, que permite detectar posibles cambios temporales a corto plazo en las poblaciones de gamba roja. Los resultados de los Artículos 1 y 3 indican que la gamba roja presenta un elevado nivel de conectividad genética a lo largo de la GSA6, es decir, los caladeros de la costa catalana y valenciana del Mar Mediterráneo.

Un alto nivel de conectividad genética dentro del Mar Mediterráneo occidental se ha detectado en otros organismos marinos como el camarón *Palaemon elegans* (Reuschel *et al.*, 2010), el cangrejo *Carcinus aestuarii* (Ragionieri y Schubart, 2013) y los erizos de mar *Paracentrotus lividus* y *Arbacia lixula* (Maltagliati *et al.*, 2010; Pérez-Portela *et al.*, 2019). No obstante, de igual forma que sucede con *A. antennatus* (Fernández *et al.*, 2011; Heras *et al.*, 2019), en esas especies también se ha detectado diferenciación genética entre la cuenca occidental y oriental del Mar Mediterráneo (Ragionieri y Schubart, 2013; Pérez-Portela *et al.*, 2019), o entre el Mar de Alborán y el resto de la cuenca occidental (Reuschel *et al.*, 2010; Pérez-Portela *et al.*, 2019) debido al frente Almería-Orán (**Figura 9**) (Tintoré *et al.*, 1988). Por el contrario, en las especies de cangrejo *Liocarcinus depurator* y *Macropipus tuberculatus* el frente Almería-Orán no actúa como barrera al flujo génico, mientras que el Canal de Ibiza (**Figura 9**) sí tendría un efecto en *Liocarcinus depurator* (García-Merchán *et al.*, 2012).

Las diferencias en la estructura poblacional de las distintas especies mencionadas que habitan el Mar Mediterráneo occidental pueden ser varias, entre las cuales destacan la distribución batimétrica de la especie, la capacidad de dispersión pasiva de las larvas, la duración de vida pelágica, la migración activa de los individuos con capacidad de desplazamiento, como pueden ser los juveniles y adultos, y la reproducción de la especie, donde tendría importancia tanto el periodo reproductivo como el tipo de reproducción (Weersing y Toonen, 2009; García-Merchán *et al.*, 2012).

En *A. antennatus*, el alto nivel de conectividad genética obtenido a lo largo de la GSA6 probablemente se deba a varios factores, como el efecto de la Corriente del Norte (**Figura 10**, detallado en la Introducción General, pág. 37), junto con un largo periodo de vida pelágica estimado de entre tres y seis semanas (Millot, 1999; García-Ladona, 2017; Clavel-Henry *et al.*, 2019). De hecho, los resultados indican una ausencia del efecto de las barreras oceanográficas presentes en la GSA6 al flujo génico (detallado en el Artículo 1). Asimismo, en la zona de estudio se ha detectado un fenómeno oceanográfico particular conocido como *cascading*, el cual se produce cada 6-11 años y que afecta directamente a las poblaciones de gamba roja (Company *et al.*, 2008). Por un lado, el *cascading* favorece la conectividad entre distintas localidades al provocar el desplazamiento de los individuos hacia profundidades elevadas (Company *et al.*, 2008) pero, además, favorece el reclutamiento en los cañones submarinos afectados por el *cascading* (Fernandez-Arcaya *et al.*, 2017).

Por otra parte, en algunos organismos marinos, especialmente invertebrados o peces con un periodo de vida pelágica, puede suceder que, a pesar de que en una región geográfica de gran tamaño no haya una diferenciación genética significativa, surja una inestabilidad genética a pequeña escala, ya sea temporal o geográfica (Hedgecock, 1986; Johnson y Wernham, 1999; Kusumo y Druehl, 2000, Nielsen *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2018; Ianucci *et al.*, 2020). Por ese motivo, realizar un estudio

temporal por primera vez en la gamba roja, durante dos años consecutivos, permite conocer con mayor precisión su estructura poblacional en la GSA6. Así, se han podido observar diferencias genéticas significativas (resultados de AMOVA y *pairwise F_{ST}*) entre 2016 y 2017, tal y como se han descrito en el Artículo 1.

Los estudios genéticos temporales en organismos marinos son escasos. En el cangrejo del Pacífico *Cancer magister* se analizaron 33 localidades, desde *Destruction Island* en el Estado de Washington hasta *Half Moon Bay* en el Estado de California, durante 2012 y 2014, y se obtuvo una diferenciación genética temporal que podría deberse a variaciones interanuales de las condiciones oceanográficas de la zona de estudio, lo que habría afectado al reclutamiento y por tanto al flujo génico entre las poblaciones (Jackson *et al.*, 2018). En el cangrejo marmolado *Pachygrapsus marmoratus* se ha indicado que la diferenciación genética temporal detectada entre poblaciones del Mar Ligur estaría causada por variaciones en el auto-reclutamiento de las larvas, ya sea por patrones de circulación oceanográfica temporalmente inestables que favorezcan la retención de larvas de la localidad natal, o por el propio comportamiento de las larvas que activamente se asentarían en la población de nacimiento (Iannucci *et al.*, 2020). Por otro lado, en un estudio temporal de dos años realizado en el rodaballo *Scophthalmus maximus* se analizaron siete muestras, desde las Islas Åland en el Mar Báltico hasta el Mar del Norte, y se detectó una variación genética temporal dentro de las localidades analizadas, justificada por características propias de la especie, como una elevada variabilidad en el tamaño y la fecundidad de los individuos (Nielsen *et al.*, 2004).

La diferenciación temporal obtenida en *A. antennatus* entre los años 2016 y 2017 durante invierno y descrita en el Artículo 1 podría deberse a varias causas, como haber muestreado individuos provenientes de dos o más cohortes o las características propias de los distintos cañones de la zona de estudio, tales como la forma, profundidad, la distancia a la costa o los fenómenos oceanográficos locales (detallado en el Artículo 1). Un ejemplo sería el giro anticiclónico del área adyacente

al cañón de Blanes, el cual se puede considerar un evento semipermanente y que circula en contra del desplazamiento hacia el sur de la Corriente del Norte (Ahumada-Sempoal *et al.*, 2013). Además, el efecto de la pesquería en las poblaciones naturales también podría originar una diferenciación genética temporal, ya que causa un efecto directo y perjudicial en la ladera del cañón, mientras que en el eje del mismo provoca un efecto beneficioso para los organismos que viven allí, debido a la resuspensión de sedimentos causada por la pesca (Román *et al.*, 2016).

No obstante, en el Artículo 3 se ha descrito una ausencia de diferenciación genética, tanto entre localidades dentro de cada año de muestreo, como una ausencia de diferenciación temporal entre los años 2016 y 2017. En el Artículo 1 los muestreos se realizaron durante invierno, momento en el cual la gamba roja forma agregaciones de apareamiento, compuestas tanto por machos como por hembras de la categoría comercial pequeña, la más abundante en esa época del año (Tudela *et al.*, 2003). Consecuentemente, en el muestreo se obtuvieron y posteriormente se analizaron tanto machos como hembras. En cambio, en el Artículo 3, los muestreos fueron realizados durante el verano, en el pico reproductivo de la especie, donde se forman agregaciones de hembras desovadoras (detallado en la Introducción General, pág. 32). Así, todas las muestras estaban compuestas por hembras de la categoría comercial mediana, la más importante en ese periodo del año.

La dispersión de adultos de *Aristeus antennatus* por sexos y los posibles patrones de reclutamiento a la población natal y de migración entre caladeros próximos son desconocidos. Por ello, el Artículo 2 de la presente tesis doctoral se centró en un único caladero, Palamós, como localidad modelo para el estudio de los machos de gamba roja. La selección del caladero de Palamós se puede resumir de la siguiente manera: i) por ser una de las principales zonas de pesca de gamba roja en la GSA6 (Gorelli *et al.*, 2016) y ii) la abundante información biológica publicada en los últimos años sobre la gamba roja del caladero de Palamós (Gorelli *et al.*, 2014, 2016, 2017;

Planella *et al.*, 2017, 2019; Clavel-Henry *et al.*, 2021a). En nuestro estudio se integraron datos genéticos y morfométricos para estudiar el crecimiento a lo largo de un año y el origen geográfico de los machos que habitan en el caladero de Palamós. Los resultados indicaron que un elevado porcentaje de los machos juveniles y machos adultos de Palamós, en torno al 54% y el 75%, provenían del propio caladero, por lo que la ratio de retención larvaria en la localidad natal es elevada (**Figura 17a**, equivalente a la Tabla 4 del Artículo 2). Por otra parte, el porcentaje restante provendría de otros caladeros cercanos. Así, al disponer de datos genéticos de los caladeros de Roses y Blanes, ambos próximos a Palamós, se obtuvo que entre un 24.8% y un 46% de los individuos se asignaron a otras localidades, ya sea Roses, Blanes u otras fuentes (**Figura 17a**). Adicionalmente, nuestro equipo de investigación ha realizado un estudio en hembras de Palamós de todas las cohortes (juveniles, pequeñas, medianas, grandes y extra-grandes), y se han llevado a cabo test de asignación genética en hembras juveniles y adultas de tamaño pequeño, donde también se han incorporado hembras de Roses y Blanes para evaluar la procedencia de las hembras de Palamós (Abrás *et al.*, 2022). Los resultados indican que, de forma similar a lo observado en los machos, un porcentaje nada despreciable de las hembras de Palamós provienen de otros caladeros, incluidos Roses y Blanes, entre un 19.1% y un 35% (**Figura 17b**).

Como perspectiva de futuro, sería necesario realizar la demografía genética de machos y hembras en los principales caladeros de la GSA6, tal y como se llevó a cabo para el caladero de Palamós (Artículo 2 y Abrás *et al.*, 2022), ya que es una información desconocida hasta la fecha. Por otro lado, sería conveniente realizar periódicamente un monitoreo genético del patrón de conectividad genética y de la estabilidad genética temporal dentro la GSA6, utilizando los doce marcadores microsatélite aplicados en la presente tesis doctoral. Los resultados correspondientes, tanto de la demografía genética como del monitoreo genético propuesto, proporcionarían una información valiosa a las distintas cofradías de pescadores y ayudarían a una mejora en la gestión de las pesquerías en esos

caladeros. Asimismo, teniendo en cuenta que el desarrollo de nuevas técnicas moleculares continúa, no se descarta la utilidad de otros potenciales marcadores moleculares que permitan estudios genómicos, como por ejemplo marcadores moleculares derivados de la NGS, para observar alguna diferenciación genética a muy pequeña escala dentro de la GSA6, oculta hasta el momento.

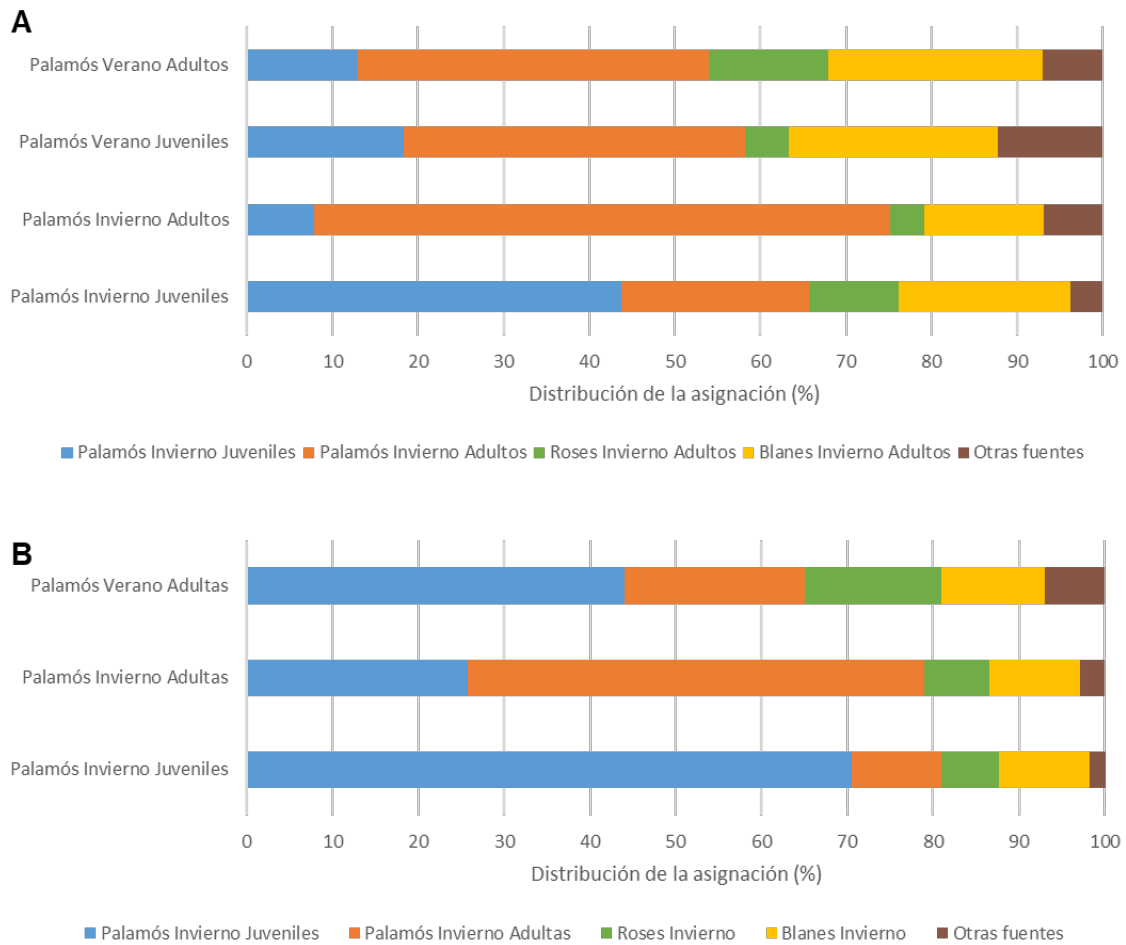


Figura 17. Distribución de la asignación genética en **(A)** machos (Artículo 2) y **(B)** hembras en la localidad de Palamós durante el año 2016 (Abrás *et al.*, 2022).

Recientemente, nuestros resultados han sido confirmados por varios estudios de simulación de dispersión de partículas mediante la aplicación de modelos hidrodinámicos. En primer lugar, Clavel-Henry *et al.* (2019) usando dos versiones del modelo hidrodinámico ROMS (*Regional Ocean Modeling System*), ROMS-Rutgers y

ROMS-Agrif, simularon la dispersión de huevos y larvas de *A. antennatus* nacidas de Palamós y obtuvieron una retención en la localidad natal de entre el 10% y el 44% con ROMS-Agrif y ROMS-Rutgers, respectivamente. Además, entre un 27% y un 45% de las partículas liberadas en *Cap de Creus* (equivalente a nuestra localidad Roses), según ROMS-Rutgers y ROMS-Agrif respectivamente, se dispersaron hasta Palamós, lo que indica que un alto porcentaje de individuos de Palamós tendrían su origen a 52 km de distancia (Clavel-Henry *et al.*, 2019). Además, Clavel-Henry *et al.* (2020b) realizaron una simulación climatológica de las características hidrodinámicas e hidrográficas del Mar Mediterráneo noroccidental mediante el modelo ROMS, y varias simulaciones de la deriva larvaria en prácticamente la totalidad de la GSA5 y la GSA6 mediante el modelo *Individual-Based Model* (IBM). Los resultados sugirieron una conectividad aún mayor que en el estudio anterior, donde el cañón de Palamós y los caladeros situados más al sur del Canal de Ibiza estarían conectados con los de la Isla de Mallorca (Clavel-Henry *et al.*, 2020b). Sin embargo, utilizando ROMS junto con un modelo Lagrangiano para simular el transporte de larvas de *A. antennatus* durante los años 2006-2016, la retención en Palamós resultó entre un 48.3% y un 99.8%, con un promedio de 85.9% (Clavel-Henry *et al.*, 2021a). Los autores indicaron que la variación en la retención de partículas simuladas en el cañón de Palamós se debió principalmente a fenómenos con marcada variabilidad temporal, como la posición de las picnoclinas 1024.5 y 1026 kg m⁻³, la Corriente del Norte, así como los eventos mesoescala asociados (Clavel-Henry *et al.*, 2021a). Asimismo, entre el 56% y el 81.3% de las partículas liberadas en Roses y entre un 0.6% y el 24.8% de las liberadas en Blanes se dispersaron hasta Palamós (Clavel-Henry *et al.*, 2021a), lo que confirma la dispersión norte-sur desde Roses a Palamós, pero también indica una dispersión sur-norte desde Blanes a Palamós. Por otra parte, Clavel-Henry *et al.* (2021b) realizaron una simulación inversa mediante ROMS para conocer el origen de las larvas PZ1 capturadas durante la campaña oceanográfica del B/O *García del Cid* (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC) realizada específicamente para la

búsqueda y obtención de larvas de *A. antennatus*. La campaña oceanográfica se llevó a cabo desde el 20 de julio hasta el 31 de agosto de 2016 a lo largo de toda la GSA6, comenzando el muestreo al sur de la GSA6 en Cartagena (Murcia) con derrotero hacia el norte hasta Roses (Cataluña) (Carreton *et al.*, 2021). La simulación inversa indicó que entre el 76.5% y el 78% de las larvas de Palamós y entre el 55% y el 100% de las larvas capturadas en Blanes habrían nacido en sus respectivos caladeros (Clavel-Henry *et al.*, 2021b). Además, en 15 de las 42 estaciones de muestreo de larvas analizadas, al menos una larva provendría de un caladero cercano y no del propio caladero donde se pescaron (Clavel-Henry *et al.*, 2021b).

Teniendo en cuenta lo descrito en el párrafo anterior, los resultados de retención y dispersión larvaria varían ampliamente en función del modelo de simulación o versiones del mismo utilizadas, así como de los parámetros hidrodinámicos, hidrográficos y físico-químicos aplicados en cada simulación, tales como, entre otros, la dirección e intensidad de las corrientes, fenómenos oceanográficos temporales, temperatura y densidad del agua, turbulencia de las partículas simuladas y el rango de profundidades de la simulación. Los resultados genéticos obtenidos en la presente tesis doctoral indican que, además de la elevada retención en Palamós, tanto en machos como en hembras (**Figura 18**), los caladeros de Roses y Blanes aportan a Palamós entre 5.1-16% y 12-15% de individuos, respectivamente. No obstante, a diferencia de las simulaciones de deriva de partículas realizadas por Clavel-Henry y colaboradores, las cuales representaban huevos y larvas de gamba roja, nosotros analizamos genéticamente la migración de individuos juveniles y adultos, que además se pueden desplazar activamente, y no solamente ser arrastrados o dejándose llevar por las corrientes marinas. Asimismo, cabe mencionar que las simulaciones no tuvieron en cuenta el movimiento activo de las larvas, como la migración ontogenética hacia la superficie del estadio PZI indicada por Carreton *et al.* (2021).

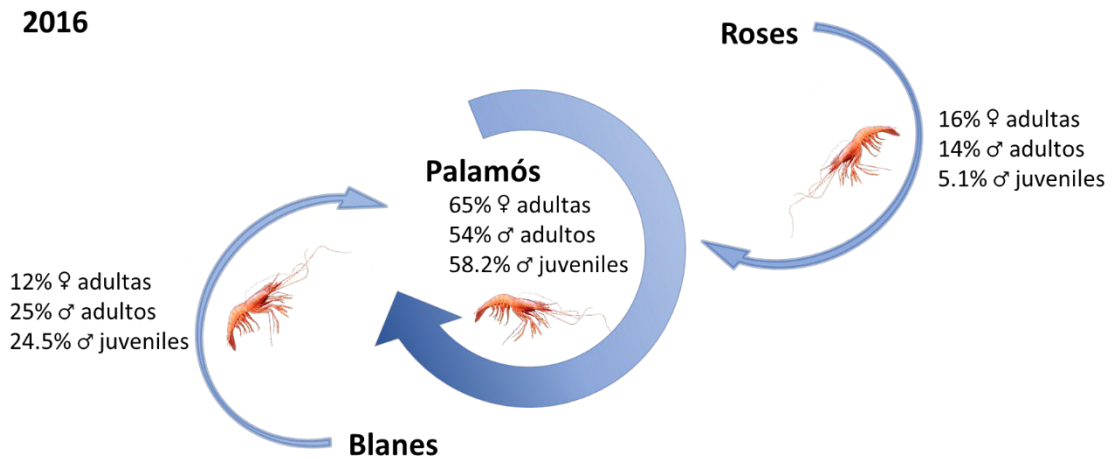


Figura 18. Origen de los individuos capturados en Palamós en verano de 2016, a partir de los resultados de los test de asignación genética. En Palamós, los porcentajes incluyen la asignación a juveniles y adultos capturados en Palamós en invierno 2016 (Figura 17). No se incluyen los porcentajes correspondientes a "Otras fuentes".

Los resultados obtenidos en el Artículo 2, así como los resultados obtenidos en hembras (Abrás *et al.*, 2022), indican mediante análisis genéticos el desplazamiento geográfico, de una localidad a otra, de individuos juveniles y adultos, tanto en machos como en hembras. Teniendo en cuenta las diferencias temporales significativas detalladas en el Artículo 1 (Tablas 3, 4 y S2 del Artículo 1) no detectadas en el Artículo 3 (Tablas 3, 4 y 5 del Artículo 3), se estableció la hipótesis de que la diferenciación temporal encontrada podría deberse a una dispersión diferencial de machos y de hembras de *A. antennatus* (detallado en el Artículo 3), lo que se conoce como *sex-biased dispersal* o dispersión diferencial por sexos, tal y como indicaron Cannas *et al.* (2012). En este caso, el sexo con mayor dispersión horizontal serían las hembras, mientras que los machos migrarían menos distancia, de un caladero a los más cercanos.

En especies marinas, la *sex-biased dispersal* se ha detectado en diferentes grupos de organismos, tales como cetáceos, pinnípedos, tortugas marinas y elasmobranquios (Phillips *et al.*, 2021), siendo relativamente habitual en este último grupo (Schwanck *et al.*, 2020; Phillips *et al.*, 2021). La dispersión diferencial por sexos

es un mecanismo que ayuda a minimizar la endogamia, junto con la dispersión larvaria en aquellas especies que poseen una fase de vida pelágica, o la migración de juveniles a otras poblaciones (Schwanck *et al.*, 2020; Phillips *et al.*, 2021). En la mayoría de especies, los machos migran más que las hembras, siendo estas más residentes (Phillips *et al.*, 2021). No obstante, la *female-biased dispersal* de *A. antennatus* podría deberse a la diferente distribución de machos y hembras a lo largo de la columna del agua (detallado en la Introducción General, pág. 30). Las hembras, al encontrarse principalmente a profundidades menores a 1000 metros (Sardà *et al.*, 2004a), verían facilitada su migración por corrientes intermedias, es decir, por las corrientes LIW y WIW, que recorren la GSA6 con sentido norte-sur (Milot, 1999; Pinot *et al.*, 2002). En cambio, los machos son predominantes a mayores profundidades (Sardà *et al.*, 2004a), lo que implica que la corriente que podría tener mayor efecto en su migración sería la WMDW, con una velocidad mucho menor a las corrientes de profundidad intermedia (Milot, 1999). Por tanto, las hembras tendrían una mayor facilidad para desplazarse a mayores distancias, mientras que los machos lo harían de forma más lenta, de ahí ese posible desplazamiento a menores distancias que indican nuestros resultados. Sin embargo, se debe tener en cuenta que, a pesar de que las corrientes puedan tener una gran influencia en la dispersión, los individuos con capacidad de movimiento activo pueden desplazarse contracorriente, de forma que es lógico pensar que al menos algunos individuos se desplazarían de forma independiente a las corrientes marinas, aunque la velocidad de desplazamiento probablemente sea mucho menor.

Sería importante que estos hallazgos se tuvieran en cuenta a la hora de establecer nuevos planes de gestión para *A. antennatus*. Actualmente, los datos genéticos obtenidos en estudios anteriores consideran que, a lo largo de todo su rango de distribución global, la especie se divide en 5 *stocks* genéticos: i) el Mar Mediterráneo occidental donde se localiza la GSA6, ii) el Mar de Alborán, iii) el Mar Mediterráneo oriental, iv) el Océano Atlántico y v) Mozambique (Fernández *et al.*, 2011; Heras *et al.*, 2019).

Los resultados genéticos de la presente tesis doctoral indican que la GSA6 debería considerarse una única MU en su totalidad. Esta recomendación contrasta en parte con la recomendación propuesta por Clavel-Henry *et al.* (2020b) y Carreton *et al.* (2021), que sugieren tres zonas de gestión para la pesca de gamba roja en la GSA6 asociadas a eventos oceanográficos: i) la zona situada más al Norte, donde se incluirían los cañones submarinos de Roses, Palamós y Blanes y con influencia de la Corriente del Norte en la distribución larvaria de *A. antennatus*, ii) zona donde se localizaría el Golfo de Valencia y con presencia de giros oceanográficos, que también afectarían a la deriva larvaria y iii) la zona adyacente al Canal de Ibiza, donde los giros situados al norte del canal tendrían cierta importancia en la dispersión larvaria a los dos lados del canal. Así, dependiendo de la presencia o no de giros de mesoescala en corrientes oceanográficas en la tercera región y de otros parámetros temporales, el intercambio de individuos a los dos lados del Canal de Ibiza podría ser bidireccional, unidireccional o variar en número (Clavel-Henry *et al.*, 2020b). No obstante, cabe mencionar que no se capturó ninguna larva en los primeros lances realizados en la campaña oceanográfica diseñada para la obtención de larvas de gamba roja y descrita previamente (Carreton *et al.*, 2021). De hecho, de un total de 23 lances realizados al sur del Canal de Ibiza, únicamente se obtuvieron larvas en tres de ellos y en poca cantidad, siendo además los tres lances muy próximos al canal (Carreton *et al.*, 2021). Teniendo en cuenta que hay varios caladeros de gamba roja situados al sur del Canal de Ibiza, como por ejemplo Santa Pola, donde la pesca de gamba roja es notable, no hay duda de que en esa zona debe haber abundancia de larvas, y hace pensar por qué no se obtuvieron larvas durante la campaña diseñada para tal fin. Una explicación plausible es que, al iniciar la campaña el día 20 de julio en el extremo sur de la GSA6, en ese momento aún no había una cantidad suficiente de larvas en la zona como para haberlas capturado con facilidad, ya que julio y agosto es el pico de puesta en la zona del Golfo de Vera (Murcia), el Golfo de Alicante y el Canal de Ibiza (García-Rodríguez, 2003). Durante la campaña oceanográfica se utilizaron dos redes, la *neuston sledge* entre 0.5-1

metros de profundidad en 101 estaciones a lo largo de la GSA6, y la MOCNESS (*Multiple Opening and Closing Net with Environmental Sensor System*) para capturar larvas a distintos rangos de profundidad (mediante la apertura y cierre de las redes que la componen) con un máximo de 1200 metros de profundidad, solo en siete estaciones en la zona de Palamós, Blanes y Roses. El 95% de las larvas obtenidas en la campaña, tanto con la *neuston sledge* como con la MOCNESS, corresponden al estadio PZI (Carreton *et al.*, 2021). La mayor densidad larvaria obtenida con la MOCNESS fue entre los 25 y los 50 metros de profundidad y no en el primer metro de profundidad, donde se realizó el muestreo con la *neuston sledge*, lo que podría ser la causa de haber encontrado larvas únicamente en el 55.45% de las estaciones muestreadas con esa red (Carreton *et al.*, 2021). Por otro lado, de haber iniciado la campaña oceanográfica días más tarde, cuando el periodo reproductivo estuviera más avanzado, habría habido una mayor abundancia de larvas, pudiendo haberlas obtenido desde los primeros lances realizados al sur del Canal de Ibiza y también se podría haber obtenido un mayor número de ejemplares de los estadios posteriores a la PZI y así completar la descripción de los estadios larvarios de la especie. Sería fundamental que esta información se tuviera en cuenta en futuras búsquedas de larvas de gamba roja, especialmente en la zona situada al sur del Canal de Ibiza y en otras zonas del Mar Mediterráneo donde abunda la gamba roja.

En cualquier caso, como la dispersión activa de individuos juveniles y adultos también favorece la conectividad genética, a pesar de que a través del Canal de Ibiza no se detectara un gran número de larvas, la migración podría ser suficiente para haber causado ese gran nivel de conectividad genética obtenida en los Artículos 1 y 3. Carreton *et al.* (2021) consideran que dividir la GSA6 en tres zonas de gestión pesquera facilitaría la monitorización de la pesquería por estar fraccionada en áreas más pequeñas. Somos conscientes de la dificultad de gestionar un recurso pesquero conjuntamente con otras cofradías o incluso entre varias provincias de diferentes comunidades autónomas, como es el caso de la GSA6. No obstante, desarrollar un plan de gestión específico para la gamba roja que incluyera

toda la región sería beneficioso a medio y largo plazo, ya que respetaría la estructura poblacional de la especie. Asimismo, debido a la inestabilidad temporal obtenida en el Artículo 1, sería de gran importancia realizar una monitorización genética local de forma periódica en cada caladero que permitiera evaluar la variabilidad genética del recurso pesquero. Así se podría conocer la extensión de la inestabilidad genética temporal detectada durante el invierno, época del año en la cual los machos son abundantes en las profundidades de pesca, ya que se forman las agregaciones de apareamiento (detallado en la Introducción General, pág. 32).

Por otra parte, es necesario puntualizar que, así como nuestros resultados indican que toda la GSA6 se debería considerar como una única unidad de gestión, los límites de esa MU se desconocen. Cabe recordar que las Sub-Áreas geográficas de la FAO (**Figura 14**) se delimitan más por motivos políticos o administrativos que por motivos biológicos y que no se asocian necesariamente con las potenciales barreras geográficas u oceanográficas presentes en el Mar Mediterráneo. Por tanto, la unidad de gestión de la GSA6 podría tener que ampliarse hacia otras GSAs limítrofes, como son la GSA5 o la GSA7 (**Figura 14**) donde existen poblaciones de gamba roja (Campillo, 1994; Carbonell *et al.*, 1999).

En relación a acciones de gestión que se están realizando en el caladero de Palamós, recientemente el MSC ha destacado muy positivamente las iniciativas que ha llevado a cabo la Cofradía de Palamós para intentar solventar las deficiencias detectadas en la preevaluación de la pesquería de gamba roja (Castaño, 2016; Agujetas, 2021). En primer lugar, se ha indicado positivamente la actualización del Plan de gestión en 2018 (BOE, 2018), donde se aplicaron medidas más restrictivas en la pesca de la gamba roja (indicadas en la **Tabla 3**), así como la identificación de las embarcaciones autorizadas y de cada lance de pesca realizado (Agujetas, 2021). También se destaca de forma positiva la implementación de puertas semipelágicas para el arrastre, las cuales la Cofradía de Palamós se comprometió a aplicar en 2017 (Castaño, 2016), y que reducen el impacto perjudicial de la pesca de arrastre sobre

el lecho marino. Otra de las mejoras alcanzadas es el aumento del tamaño de la malla del copo de 45 mm a 50 mm (Agujetas, 2021). Asimismo, otros aspectos positivos destacados han sido por un lado el seguimiento científico realizado por investigadores del Instituto de Ciencias del Mar de Barcelona (CSIC) de las modificaciones aplicadas y, por otro, el desarrollo del proyecto TipoArt (Agujetas, 2021). El proyecto TipoArt (Tipologías de artes de pesca como medida de gestión) fue coordinado y liderado por la Cofradía de Pescadores de Palamós, y en el cual participaron científicos del Instituto de Ciencias del Mar de Barcelona (CSIC), del Centro Oceanográfico de las Islas Baleares y del Instituto Español de Oceanografía. Su objetivo principal fue el desarrollo de un prototipo de arte de pesca más sostenible para la flota de arrastre de gamba roja que minimice el efecto dañino de la pesca de arrastre en el talud, incremente la selectividad y mejore la eficiencia energética de la pesca, así como la potencial transferencia de la tecnología a otras cofradías (TipoArt, 2018).

Desarrollar un plan de gestión de la pesca de gamba roja en toda la GSA6 necesitaría la coordinación entre las diferentes instituciones encargadas de gestionar los recursos pesqueros dentro de la misma, como la *Direcció General de Política Marítima i Pesca Sostenible* de Cataluña, la *Conselleria* de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica de la *Generalitat Valenciana* y la Consejería de Agua, Agricultura, Ganadería, Pesca, Medio Ambiente y Emergencias de la Región de Murcia. Incluir la información genética en los futuros planes de gestión, tal y como se ha argumentado a lo largo de la presente memoria, podría garantizar la conservación a medio y largo plazo de la pesca de gamba roja, y por tanto cumpliría con las actuales directrices europeas del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea (Consejo de la Unión Europea, 2019).

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha utilizado el análisis genético mediante marcadores microsatélite para describir la estructura poblacional de la gamba roja, *Aristeus antennatus*, en la GSA6, desde el Golfo de León hasta Cabo de Palos. De los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La gamba roja presenta una diversidad genética de moderada a alta en todas las muestras analizadas, lo que indica una explotación sostenible, al menos desde el punto de vista genético.
2. No se ha identificado ninguna barrera geográfica ni oceanográfica al flujo génico entre las muestras analizadas de *A. antennatus* a lo largo de toda la GSA6. El Canal de Ibiza no tiene un efecto significativo en la estructura poblacional de la gamba roja.

3. La gamba roja presenta durante el período de apareamiento (invierno) un elevado nivel de conectividad genética a lo largo de la GSA6. La conectividad genética de la gamba roja entre las muestras de invierno 2016 y 2017 ha mostrado una inestabilidad temporal significativa debida principalmente a la muestra de Blanes y se relacionaría con un fenómeno oceanográfico temporal local.

4. En nuestro estudio se ha determinado por primera vez, mediante genotipos *multilocus*, el reclutamiento y el origen geográfico de los machos juveniles y adultos de gamba roja en el caladero de Palamós. Los resultados genéticos indican que entre el 54% y el 75% de los machos se originan en el propio caladero de Palamós, pero una fracción de ellos provendría de otros caladeros.

5. Los resultados genéticos indican un aporte considerable de individuos machos en el caladero de Palamós desde los caladeros cercanos de Roses y Blanes, con una media de 8.4% y 20.9% respectivamente, lo que sugiere que los machos juveniles y adultos realizan tanto desplazamientos norte-sur como sur-norte con dirección a Palamós.

6. Las hembras desovadoras de gamba roja presentan un elevado nivel de conectividad genética durante el periodo de puesta (verano) a lo largo de la GSA6. La conectividad genética entre las muestras de verano 2016 y 2017 es estable temporalmente, lo que podría deberse a una dispersión diferencial por sexos, donde las hembras migrarían a una mayor distancia que los machos, que lo harían a los caladeros más cercanos.

7. La ausencia de diferenciación genética entre las poblaciones de gamba roja a lo largo de la GSA6 respalda considerarla como una única unidad de gestión. La gestión de las pesquerías de gamba roja en una única unidad sería compleja, ya que implicaría la coordinación entre las diversas administraciones responsables. No obstante, los resultados genéticos obtenidos en la presente tesis doctoral, tanto a nivel de GSA6 como local en el caladero de Palamós, deberían incorporarse en cualquier acción de mejora de la gestión de la pesca de gamba roja.

BIBLIOGRAFÍA

- Abras A., García-Marín J.L., Heras S., Agulló M., Vera M., Planella L., Roldán M.I. (2022) Genetic demography of the blue and red shrimp, *Aristeus antennatus*: A female-based case study integrating multilocus genotyping and morphometric data. *Genes*, 13: 1186.
- Agujetas J. (2021) Mejoras alcanzadas por pesquerías del proyecto Medfish. [Versión Electrónica]. Marine Stewardship Council. Consultado 10 mayo 2022. Disponible en: <https://www.msc.org/es/sala-de-prensa/blog/2021/08/25/mejoras-proyecto-medfish>.
- Ahumada-Sempoal M.A., Flexas M.M., Bernardello R., Bahamon N., Cruzado A. (2013) Northern Current variability and its impact on the Blanes Canyon circulation: a numerical study. *Progress in Oceanography*, 118: 61–70.
- Al-Samarai F.R., Al-Kazaz A.A. (2015) Molecular markers: an introduction and applications. *European Journal of Molecular Biotechnology*, 9: 118–130.
- Alcala N., Goudeta J., Vuilleumier S. (2014) On the transition of genetic differentiation from isolation to panmixia: What we can learn from G_{ST} and D . *Theoretical Population Biology*, 93: 75–84.
- Allendorf F.W., Luikart G. (2007) Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Allendorf F.W., England P.R., Luikart G., Ritchie P.A., Ryman N. (2008) Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 23: 327–337.
- Anger K. (2006). Contributions of larval biology to crustacean research: a review. *Invertebrate Reproduction and Development*, 49: 175–205.

- Avise J.C., Giblin-Davidson C., Laerm J., Patton J.C., Lansman R.A. (1979a) Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys oinetis*. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA*, 76: 6694–6698.
- Avise J.C., Lansman R.A., Shade R.O (1979b) The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I. Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. *Genetics*, 92: 279–295.
- Avise J.C., Ball R.M., Arnold J. (1988) Current versus historical population sizes in vertebrate species with high gene flow: a comparison based on mitochondrial DNA lineages and inbreeding theory for neutral mutations. *Molecular Biology and Evolution*, 5: 331–344.
- Balbín R., López-Jurado J.L., Flexas M.M., Reglero P., Vélez-Velchí P., González-Pola C., Rodríguez J.M., García A., Alemany F. (2014) Interannual variability of the early summer circulation around the Balearic Islands: Driving factors and potential effects on the marine ecosystem. *Journal of Marine Systems*, 138: 70–81.
- Barton N.H. (2000) Estimating multilocus linkage disequilibria. *Heredity*, 84: 373–389.
- Bateson W. (1902) *A Defence of Mendel's Principles of Heredity*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- 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.
- BOE - Boletín Oficial del Estado (2012) Orden AAA/2808/2012, de 21 de diciembre, por la que se establece un Plan de Gestión Integral para la conservación de los recursos pesqueros en el Mediterráneo afectados por las pesquerías realizadas con redes de cerco, redes de arrastre y artes fijos y menores, para el período

- 2013-2017. Sección III No. 313, 89468–89475 [Versión Electrónica]. Consultado 10 julio 2021. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2012/12/29/pdfs/BOE-A-2012-15740.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 No. 126, 40016–40022 [Versión Electrónica]. Consultado 10 julio 2021. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2013/05/27/pdfs/BOE-A-2013-5555.pdf>.
- BOE - Boletín Oficial del Estado (2018) APM/532/2018, de 25 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 No. 128, 55045–55051 [Versión Electrónica]. Consultado 10 julio 2021. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2018/05/26/pdfs/BOE-A-2018-7015.pdf>.
- BOE - Boletín Oficial del Estado (2020) Orden APA/423/2020, de 18 de mayo, por la que se establece un plan de gestión para la conservación de los recursos pesqueros demersales en el mar Mediterráneo. Sección III No. 142, 33637–33654 [Versión Electrónica]. Consultado 15 marzo 2022. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2020/05/20/pdfs/BOE-A-2020-5163.pdf>.
- Bonferroni C.E. (1936) Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità. *Pubblicazioni del R. Istituto superiore di scienze economiche e commerciali di Firenze*, 8: 62 pp.
- Brown A.H.D. (1979) Enzyme polymorphisms in plant populations. *Theoretical Population Biology*, 15: 1–42.
- Buth D.G. (1984) The application of electrophoretic data in systematic studies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15: 501–522.

- Campillo A. (1994) Bio-ecology of *Aristeus antennatus* in the French Mediterranean. En: Bianchini M.L., Ragonese S. (Eds.) Proceedings of the International Workshop on Life Cycles and Fisheries of the Deep-water Red Shrimps *Aristaeomorpha foliacea* and *Aristeus antennatus*. I.T.P.P. Special Publication No. 3, Mazara del Vallo, Italy, 25–26.
- Canals M., Puig P., de Madron X.D., 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., Sacco F., Follesa M.C., Sabatini A., Arculeo M., Lo Brutto S., Maggio T., Deiana A.M., Cau A. (2012) 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., Carbonell M., Demestre M., Grau A., Montserrat S. (1999) The red shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) fishery and biology in the Balearic Islands, Western Mediterranean. *Fisheries Research*, 44: 1–13.
- 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.
- Carreton M., Company J.B., Planella L., Heras S., García-Marín J.L., Agulló M., Clavel-Henry M., Rotllant G., Dos Santos A., Roldán M.I. (2019) Morphological identification and molecular confirmation of the deep-sea blue and red shrimp *Aristeus antennatus* larvae. *PeerJ*, 7: e6063.

- Carreton M., Rotllant G., Clavel-Henry M., Bahamón N., Sardà F., Company J.B. (2021) Abundance and distribution of the deep-sea shrimp *Aristeus antennatus* larvae along the eastern Spanish Mediterranean coast (GSA 6). *Journal of Marine Systems*, 223: 103611.
- Cartes J.E., Sardà F., Company J.B., Leonart J. (1993) Day-night migrations by deep-sea decapod crustaceans in experimental samplings in the Western Mediterranean sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 171: 63–73.
- Castaño C.M. (2016) MSC Pre-assessment for Palamós red shrimp otter trawl fishery [Versión Electrónica]: Project Medfish-Spain Final Report. Consultado 30 agosto 2021. Disponible en: <http://www.project-medfish.com/es/pesqueras-en-accion/pesqueria-de-gamba-roja-de-arrastre-de-palamos/>.
- Catanese G., Trotta J.R., Iriondo M., Grau A.M., Estonba A. (2021) Discovery of SNP markers of red shrimp *Aristeus antennatus* for population structure in Western Mediterranean Sea. *Conservation Genetics Resources*, 13: 21–25.
- Caughley G. (1994) Directions in conservation biology. *Journal of Animal Ecology*, 63: 215–244.
- Chapuis M.P., Estoup A. (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 621–631.
- Charlesworth B. (2009) Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nature Reviews Genetics*, 10: 195–205.
- Clavel-Henry M., Solé J., Ahumada-Sempoal M.A., Bahamon N., Briton F., Rotllant G., Company J.B. (2019) Influence of the summer deep-sea circulations on passive drifts among the submarine canyons in the northwestern Mediterranean Sea. *Ocean Science*, 15: 1745–1759.

- Clavel-Henry M., Bahamon N., Solé J., Gorelli G., García del Arcoa J.A., Carreton M., Rotllant G., Company J.B. (2020a) Modeling the spatiotemporal distribution of the deep-sea shrimp *Aristeus antennatus* (Crustacea: Decapoda) on the northwestern Mediterranean continental margin crossed by submarine canyons. *Journal of Marine Systems*, 209: 103372.
- Clavel-Henry M., Solé J., Kristiansen T., Bahamon N., Rotllant G., Company J.B. (2020b) Modeled buoyancy of eggs and larvae of the deep-sea shrimp *Aristeus antennatus* (Crustacea: Decapoda) in the northwestern Mediterranean Sea. *PLoS ONE*, 15: e0223396.
- Clavel-Henry M., Solé J., Bahamon N., Carretón M., Company J.B. (2021a) Larval transport of *Aristeus antennatus* shrimp (Crustacea: Decapoda: Dendrobranchiata: Aristeidae) near the Palamós submarine canyon (NW Mediterranean Sea) linked to the North Balearic Front. *Progress in Oceanography*, 192: 102515.
- Clavel-Henry M., North E.W., Solé J., Bahamon N., Carretón M., Company J.B. (2021b) Estimating the spawning locations of the deep-sea red and blue shrimp *Aristeus antennatus* (Crustacea: Decapoda) in the northwestern Mediterranean Sea with a backtracking larval transport model. *Deep-Sea Research I*, 174: 103558.
- Company J.B., Puig P., Sardà F., Palanques A., Latasa M., Scharek R. (2008) Climate influence on deep sea populations. *PLoS One*, 3: e1431.
- Consejo de la Unión Europea (2019) Reglamento (UE) 2019/1022 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de junio de 2019 por el que se establece un plan plurianual para la pesca demersal en el Mediterráneo occidental y por el que se modifica el Reglamento (UE) no. 508/2014. Diario Oficial de la Unión Europea, L 172: 1–17. [Versión Electrónica] Consultado 15 marzo 2022. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2019/172/L00001-00017.pdf>.

Dades bàsiques de l'agroalimentació a Catalunya (2018) Generalitat de Catalunya, Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació [Versión Electrónica]. Consultado 15 agosto 2021. Disponible en: http://agricultura.gencat.cat/web/.content/de_departament/de02_estadistiques_observatoris/13_publicacions_estadistica_del_dar/04_dades_basiques_arp/quadriptic_anual_de_dades_basiques/arxius_estatics/dades-B-2017-v3-1642018.pdf.

Dades bàsiques de l'agroalimentació a Catalunya (2019) Generalitat de Catalunya, Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació [Versión Electrónica]. Consultado 15 agosto 2021. Disponible en: http://agricultura.gencat.cat/web/.content/de_departament/de02_estadistiques_observatoris/13_publicacions_estadistica_del_dar/04_dades_basiques_arp/quadriptic_anual_de_dades_basiques/arxius_estatics/dades-B-10feb2020pr.pdf.

Dallagnolo R., Alvarez Perez J.A., Pezzuto P.R., Wahrlich R. (2009) The deep-sea shrimp fishery off Brazil (Decapoda: Aristeidae): development and present status. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 37: 327–346.

Darwin C., Wallace A. (1858) On the tendency of species to form varieties; and on the perpetuation of varieties and species by natural means of selection. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 3: 45–62.

Darwin C. (1859) *The Origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. John Murray, London, UK.

Dawson K.J., Belkhir K. (2001) A Bayesian approach to the identification of panmictic populations and the assignment of individuals. *Genetics Research*, 78: 59–77.

de Freitas A.J. (1985) *The Penaeoidea of Southeast Africa. II- The Families Aristeidae and Solenoceridae*. Investigational Report No. 57. Oceanographic Research Institute, Durban, South Africa, 67 pp.

- de Grave S., Fransen C.H.J.M. (2011) Carideorum catalogus: The recent species of the Dendrobranchiate, Stenopodidean, Procarididean and Caridean shrimps (Crustacea: Decapoda). *Zoologische Mededelingen*, 85: 195–588.
- Demestre M. (1990) Biología pesquera de la gamba, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) en el mar catalán. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, Barcelona, España, 443 pp.
- Demestre M., Fortuño J.M. (1992) Reproduction of the deep-water shrimp *Aristeus antennatus* (Decapoda: Dendrobranchiata). *Marine Ecology Progress Series*, 84: 41–51.
- Demestre M., Leonart J. (1993) Population dynamics of *Aristeus antennatus* (Decapoda: Dendrobranchiata) in the Northwestern Mediterranean. *Scientia Marina* 57: 183–189.
- Demestre M., Martín P. (1993) Optimum exploitation of a demersal resource in the western Mediterranean: the fishery of the deep-water shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816). *Scientia Marina*, 57: 175–182.
- Deval M.C., Kipiris 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.
- Do C., Waples R.S., Peel D., Macbeth G.M., Tillett B.J., Ovenden J.R. (2014) NeEstimator V2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*, 14: 209–2014.
- 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.

Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479–491.

Excoffier L., Lischer H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564–567.

FAO – Food and Agriculture Organization (2009a) International guidelines for the management of deep-sea fisheries in the high seas. FAO, Rome, Italy.

FAO – Food and Agriculture Organization (2009b) Resolution GFCM/33/2009/2 on the establishment of geographical subareas in the GFCM area of application, amending Resolution GFCM/31/2007/2. FAO, Rome, Italy.

FAO – Food and Agriculture Organization (2020) Worldwide review of bottom fisheries in the high seas in 2016. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 657, Rome, Italy.

FAO – Food and Agriculture Organization (2021) Fisheries and Aquaculture. Global capture production Quantity (1950-2019) [Versión Electrónica] Consultado 10 marzo 2021. Disponible en: https://www.fao.org/fishery/statistics-query/en/capture/capture_quantity.

Fernandez-Arcaya U., Ramirez-Llodra E., Aguzzi J., Allcock A.L., Davies J.S., Dissanayake A., Harris P., Howell K., Huvenne V.A.I., Macmillan-Lawler M., Martín J., Menot L., Nizinski M., Puig P., Rowden A.A., Sanchez F., Van den Beld I.M.J. (2017) Ecological role of submarine canyons and need for canyon conservation: A review. *Frontiers in Marine Science*, 4: 1–26.

Fernández M.V., Heras S., Maltagliati F., Turco A., Roldán M.I. (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., Viñas J., Maltagliati F., Roldán M.I. (2013) Multilocus comparative phylogeography of two aristeid shrimps of high commercial interest (*Aristeus antennatus* and *Aristaeomorpha foliacea*) reveals different responses to past environmental changes. *PLoS One*, 8: e59033.
- Fernández V., Dietrich D.E., Haney R.L., Tintoré J. (2005) Mesoscale, seasonal and interannual variability in the Mediterranean Sea using a numerical ocean model. *Progress in Oceanography*, 66: 321–340.
- Fischer W., Bianchini G., Scott W.B. (1981) FAO species identification sheets for fishery purposes. Eastern Central Atlantic, fishing areas 34 and 47 (in part). Canada Funds-in-Trust. Ottawa, Department of Fisheries and Oceans Canada, by arrangement with the FAO, Rome, Italy, Vol 6.
- Fisher R.A. (1930) *The Genetical Theory of Natural Selection*, First Edition. Clarendon, Oxford, UK.
- Font J., García-Ladona E., Gorriz E.G. (1995) The seasonality of mesoscale motion in the Northern Current of the Western Mediterranean: several years of evidence. *Oceanologica Acta*, 18: 207–219.
- Frankham R. (2005) Genetics and extinction. *Biological Conservation*, 126: 131–140.
- Frankham R., Bradshaw C.J.A., Brook B.W. (2014) Genetics in conservation management: Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation*, 170: 56–63.
- Gamow G. (1954) Possible relation between deoxyribonucleic acid and protein structures. *Nature*, 173: 318.

- García-Ladona E. (2017) Currents in the Western Mediterranean Basin. En: Guillén J., Acosta J., Chiocci F., Palanques A. (Eds.) Atlas of Bedforms in the Western Mediterranean. *Springer, Cham*, 41–47.
- García-Merchán V.H., Robainas-Barcia A., Abelló P., Macpherson E., Palero F., García-Rodríguez M., de Sola L.G., Pascual M. (2012) Phylogeographic patterns of decapod crustaceans at the Atlantic–Mediterranean transition. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62: 664–672.
- García Rodríguez M. (2003) La gamba roja "*Aristeus antennatus*" (Risso, 1816) (Crustacea, Decapoda): Distribución, demografía, crecimiento, reproducción y explotación en el Golfo de Alicante, Canal de Ibiza y Golfo de Vera. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España, 302 pp.
- Gayon J. (2016) From Mendel to epigenetics: History of genetics. *Comptes Rendus Biologies*, 339: 225–230.
- Gilbert-Horvath E.A., Larson R.J., Garza J.C. (2006) Temporal recruitment patterns and gene flow in kelp rockfish (*Sebastes atrovirens*). *Molecular Ecology*, 15: 3801–3815.
- Gorelli G., Company J.B., 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., Blanco M., Sardà F., Carretón M., Company J.B. (2016) Spatio-temporal variability of discards in the fishery of the deep-sea red shrimp *Aristeus antennatus* in the northwestern Mediterranean Sea: implications for management. *Scientia Marina*, 80: 79–88.
- Gorelli G., Company J.B., Bahamón N., Sardà F. (2017) Improving codend selectivity in the fishery of the deep-sea red shrimp *Aristeus antennatus* in the northwestern Mediterranean Sea. *Scientia Marina*, 81: 381–386.

- Goudet J. (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Consultado 20 mayo 2021. Disponible en: <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Green M.R., Sambrook J. (2019) Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, 6: 436–456.
- Griffiths R.C., Robles R., Coppola S.R., Camiñas J.A. (2007) Is there a future for artisanal fisheries in the Western Mediterranean? FAO, Rome, Italy, 106 pp.
- Guichoux E., Lagache L., Wagner S., Chaumeil P., Léger P., Lepais O., Lepoittevin C., Malausa T., Revardel E., Salin F., Petit R.J. (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 11: 591–611.
- Haldane J.B.S. (1932) The causes of evolution. Longman, London, UK.
- Hallerman E.M. (2003) Population genetics: Principles and applications for fisheries scientists. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA.
- Hardy G.H. (1908) Mendelian proportions in a mixed population. *Science*, 28: 49–50.
- Hartl D.L., Clark A.G. (1989) Principles of populations genetics, Second edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
- Harris H. (1966) Enzyme polymorphisms in man. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 164: 298–310.
- Harris P.T., Whiteway T. (2011) Global distribution of large submarine canyons: Geomorphic differences between active and passive continental margins. *Marine Geology*, 285: 69–86.
- Hauser L., Carvalho G.R. (2008) Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. *Fish and Fisheries*, 9: 333–362.

- Heather J.M., Chain B. (2016) The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107: 1–8.
- Hedgecock D. (1986) Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates? *Bulletin of Marine Science*, 39: 550–564.
- Hedgecock D. (1994) Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? En: Beaumont A.R. (Ed.) Genetics and evolution of aquatic organisms. Chapman & Hall, London, UK, 122–134 pp.
- Heldt J.H. (1955) Contribution à l'étude de la biologie des crevettes pénelides *Aristaeomorpha foliacea* (Risso) et *Aristeus antennatus* (Risso) (Formes larvaires). *Bulletin de la Société des Sciences Naturelles de Tunisie VIII*, 1-2: 1–29.
- Hellberg M.E., Burton R.S., Neigel J.E., Palumbi S.R. (2002) Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science*, 70: 273–290.
- Helyar S.J., Hemmer-Hansen J., Bekkevold D., Taylor M.I., Ogden R., Limborg M.T., Cariani A., Maes G.E., Diopere E., Carvalho G.R., Nielsen E.E. (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 J.L., Roldán M.I. (2016) Development and characterization of novel microsatellite markers by next generation sequencing for the blue and red shrimp *Aristeus antennatus*. *PeerJ*, 4: e2200.
- Heras S., Planella L., García-Marín J.L., Vera M., Roldán M.I. (2019) Genetic structure and population connectivity of the blue and red shrimp *Aristeus antennatus*. *Scientific Reports*, 9: 13531.

- Holsinger K.E., Weir B.S. (2009) Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . *Nature reviews. Genetics*, 10: 639–650.
- Holthuis L.B. (1980) FAO species catalogue. Vol 1. Shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. FAO Fisheries Synopsis No. 125, 1: 271 pp.
- Hubby J.L., Lewontin R.C. (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54: 577–594.
- Ianucci A., Cannicci S., Caliani I., Baratti M., Pretti C., Fratini S. (2020) Investigation of mechanisms underlying chaotic genetic patchiness in the intertidal marbled crab *Pachygrapsus marmoratus* (Brachyura: Grapsidae) across the Ligurian Sea. *BMC Evolutionary Biology*, 20: 108.
- Institut Cartogràfic i Geològic de Catalunya (2010) Mapa topogràfic de Catalunya Escala 1:450 000 en relleu. ICGC, España.
- Institut d'Estadística de Catalunya (2019) Anuari estadístic de Catalunya de pesca marítima (2015-2019). Captures per espècies del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació de la Generalitat de Catalunya [Versión Electrónica]. Consultado 20 agosto 2021. Disponible en: <https://www.idescat.cat/pub/?id=aec&n=466>.
- IUCN - International Union for Conservation of Nature (2022) The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-3 Summary Statistics [Versión Electrónica]. IUCN Red List. Consultado 20 abril 2022. Disponible en: <https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics>.
- Jackson T.M., Roegner G.C., O'Malley K.G. (2018) Evidence for interannual variation in genetic structure of Dungeness crab (*Cancer magister*) along the California Current System. *Molecular Ecology*, 27: 352–368.

- Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. (1985) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314: 67–73.
- Johnson M.S., Wernham J. (1999) Temporal variation of recruits as a basis of ephemeral genetic heterogeneity in the western rock lobster *Panulirus cygnus*. *Marine Biology*, 135: 133–139.
- Jørgensen H.B.H., Hansen M.M., Bekkevold D., Ruzzante D.E., Loeschcke V. (2005). Marine landscapes and population genetic structure of herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea. *Molecular Ecology*, 14: 3219–3234.
- Kapiris K., Thessalou-Legaki M. (2009) Comparative reproduction aspects of the deep-water shrimps *Aristaeomorpha foliacea* and *Aristeus antennatus* (Decapoda, Aristeidae) in the Greek Ionian Sea (Eastern Mediterranean). *International Journal of Zoology*, 979512: 1–9.
- Kimura M. (1953) "Stepping stone" model of population. *Annual Report of the National Institute of Genetics, Japan*, 3: 62–63.
- Kimura M., Weiss G.H. (1964) The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, 49: 561–576.
- Kimura M. (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217: 624–626.
- Kimura M. (1983) *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, New York, UK.
- Kingman J.F.C. (1982) On the genealogy of large populations. *Journal of Applied Probability*, 19: 27–43.
- Kusumo H.T., Druehl L.D. (2000) Variability over space and time in the genetic structure of the winged kelp *Alaria marginata*. *Marine Biology*, 136: 397–409.

- Kwok P.Y., Chen X. (2003) Detection of Single Nucleotide Polymorphisms. *Current Issues in Molecular Biology*, 5: 43–60.
- Lande R. (1995) Mutation and Conservation. *Conservation Biology*, 9: 782–791.
- Landeira J.M. (2010) Larvas planctónicas de crustáceos decápodos en las Islas Canarias. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, España, 135 pp.
- Lewens T. (2010) Natural selection then and now. *Biological Reviews*, 85: 829–835.
- Lewontin R.C., Hubby J.L. (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54: 595–609.
- Lo Brutto S., Maggio T., Deiana A.M., 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.
- López García M.J., Millot C., Font J., García-Ladona E. (1994) Surface circulation variability in the Balearic Basin. *Journal of Geophysical Research*, 99: 3285–3296.
- López-Jurado J.L., LaFuente J.M.G., Lucaya N.C. (1995) Hydrographic conditions of the Ibiza Channel during November 1990, March 1991 and July 1992. *Oceanologica Acta*, 18: 235–243.
- Maggio T., Lo Brutto S., Cannas R., Deiana A.M., 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.

- Maltagliati F., Di Giuseppe G., Barbieri M., Castelli A., Dini F. (2010) Phylogeography and genetic structure of the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) inferred from the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Biological Journal of the Linnean Society*, 100: 910–923.
- Markoulatos P., Siafakas N., Moncany M. (2002) Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16: 47–51.
- Marra A., Mona S., Sà R.M., D’Onghia G., Maiorano P. (2015) Population genetic history of *Aristeus antennatus* (Crustacea: Decapoda) in the Western and Central Mediterranean Sea. *PLoS ONE*, 10: e0117272.
- Mayo O. (2008) A Century of Hardy-Weinberg Equilibrium. *Twin Research and Human Genetics*, 11: 249–256.
- Mayr E. (1993) What was the evolutionary synthesis? *Trends in Ecology & Evolution*, 8: 31–34.
- Mendel G. (1866) Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verhandlungen des Naturforschenden Vereines in Brünn*, 4: 3–47.
- Millot C. (1999) Circulation in the Western Mediterranean Sea. *Journal of Marine Systems*, 20: 423–442.
- Moreno-Reyes F.J., Díaz-García J. (2017) Pesca de arrastre (I): identificación de riesgos. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. *Notas Técnicas de Prevención*, 1078: 6 pp.
- Morgan T.H., Sturtevant A.H., Muller H.J., Bridges C.B. (1915) The mechanism of Mendelian heredity. Henry Holt and company, New York, USA.
- Moritz C., Dowling T.E., Brown W.M. (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 269–292.

- Moritz C. (1994) Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 9: 373–375.
- Mueller U.G., Wolfenbarger L.L. (1999) AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution*, 14: 389–394.
- Narayanan S. (1991) Applications of Restriction Fragment Length Polymorphism. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 21: 291–296.
- 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.
- Nei M. (2005) Selectionism and Neutralism in Molecular Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 22: 2318–2342.
- Nielsen E.E., Nielsen P.H., Meldrup D., Hansen M.M. (2004) Genetic population structure of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) supports the presence of multiple hybrid zones for marine fishes in the transition zone between the Baltic Sea and the North Sea. *Molecular Ecology*, 13: 585–595.
- Nielsen E.E., Bach L.A., Kotlicki P. (2006) HYBRIDLAB (version 1.0): A program for generating simulated hybrids from population samples. *Molecular Ecology Notes*, 6: 971–973.
- Okazaki A., Yamazaki S., Inoue I., Ott J. (2021) Population genetics: past, present, and future. *Human Genetics*, 140: 231–240.
- Palsbøll, P.J., Bérubé M., Allendorf, F.W. (2006) Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology and Evolution*, 22: 11–16.
- Parker P.G., Snow A.A., Schug M.D., Booton G.C., Fuerst P.A. (1998) What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79: 361–382.

- Pascual M., Rives B., Schunter C., Macpherson E. (2017) Impact of life history traits on gene flow: A multispecies systematic review across oceanographic barriers in the Mediterranean Sea. *PLoS ONE*, 12: e0176419.
- Pérez-Farfante I., Kensley B. (1997) Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. *Mémoires du Muséum national d'Historie naturelle, Tome 175 Zoologie*, Paris, France.
- Pérez-Portela R., Wangensteen O.S., Garcia-Cisneros A., Valero-Jiménez C. (2019) Spatio-temporal patterns of genetic variation in *Arbacia lixula*, a thermophilous sea urchin in expansion in the Mediterranean. *Heredity*, 122: 244-259.
- Pesca marítima y acuicultura (2017) Pesca marítima desembarcada en los puertos de la Comunitat Valenciana. Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica [Versión Electrónica] Consultado 25 agosto 2021. Disponible en: https://agroambient.gva.es/documents/162218839/165930934/Cap14-02_2017.pdf/7843b483-6c80-4222-8cf8-58e603db539c.
- Pesca marítima y acuicultura (2018) Pesca marítima desembarcada en los puertos de la Comunitat Valenciana. Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica [Versión Electrónica] Consultado 25 agosto 2021. Disponible en: https://agroambient.gva.es/documents/162218839/168382896/Cap14-02_2018.pdf/96c5a2c4-5fc0-4cf4-9fba-63823e909303.
- Pesca marítima y acuicultura (2019) Pesca marítima desembarcada en los puertos de la Comunitat Valenciana. Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica [Versión Electrónica] Consultado 26 agosto 2021. Disponible en: https://agroambient.gva.es/documents/162218839/169704507/Cap14-02_2019.pdf/20518c7f-8f32-466c-9324-85a090a0a92f.

- Phillips N.M., Devloo-Delva F., McCall C., Daly-Engel T.S. (2021) Reviewing the genetic evidence for sex-biased dispersal in elasmobranchs. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 31: 821–841.
- Pinot J.M., López-Jurado J.L., Riera M. (2002) The CANALES experiment (1996-1998). Interannual, seasonal, and mesoscale variability of the circulation in the Balearic Channels. *Progress in Oceanography*, 55: 335–370.
- Piry S., Alapetite A., Cornuet J.M., Paetkau D., Baudouin L., Estoup A. (2004) GeneClass2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *The Journal of heredity*, 95: 536–539.
- Planella L., Heras S., Vera M., García-Marín J.L., Roldán M.I. (2017) An optimized high quality male DNA extraction from spermatophores in open thelycum shrimp species. *Integrative Zoology*, 12: 421–427.
- Planella L., Vera M., García-Marín J.L., Heras S., Roldán M.I. (2019) Mating structure of the blue and red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) characterized by relatedness analysis. *Scientific Reports*, 9: 7227.
- Portal Estadístico de la Región de Murcia (2022) 6. Evolución de la pesca marítima desembarcada según especie (clasificación CEIUAPA). Volumen e importe de las capturas [Versión Electrónica]. Centro Regional de Estadística de Murcia. Consultado el 12 junio 2022. Disponible en: https://econet.carm.es/web/crem/inicio/-/crem/sicrem/PU_datosBasicos/sec52.html.
- Pratson L.F., Nittrouer C.A., Wiberg P.L., Steckler M.S., Swenson J.B., Cacchione D.A., Karson J.A., Murray A.B., Wolinsky M.A., Gerber T.P., Mullenbach B.L., Spinelli G.A., Fulthorpe C.S., O’Grady D.B., Parker G., Driscoll N.W., Burger R.L., Paola C., Orange D.L., Field M.E., Friedrichs C.T., Fedele J.J. (2007) Seascape evolution on clastic continental shelves and slopes. En: Nittrouer C.A., Austin J.A., Field M.E.,

- Kravitz J.H., Syvitski J.P.M., Wiberg P.L. (Eds.) Continental margin sedimentation: From sediment transport to sequence stratigraphy. Special Publication No. 37, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 339–380.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- Ragionieri L., Schubart C.D. (2013) Population genetics, gene flow, and biogeographical boundaries of *Carcinus aestuarii* (Crustacea: Brachyura: Carcinidae) along the European Mediterranean coast. *Biological Journal of the Linnean Society*, 109: 771–790.
- Ramesh R., Munshi A., Panda S.K. (1992) Polymerase chain reaction. *The National Medical Journal of India*, 5: 115–119.
- Reuschel S., Cuesta J.A., Schubart C.D. (2010) Marine biogeographic boundaries and human introduction along the European coast revealed by phylogeography of the prawn *Palaemon elegans*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55: 765–775.
- Risso A. (1816) Histoire naturelle des crustacés des Environs de Nice. Paris: Librairie Grecque-Latine-Allemande, Paris, France, No. 14: 175 pp.
- Rohlf F.J. (1993) NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1. Setauket, New York, USA.
- Roldán M.I., 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.
- Román S., Vanreusel A., Romano C., Ingels J., Puig P., Company J.B., Martin D. (2016) High spatiotemporal variability in meiofaunal assemblages in Blanes Canyon (NW Mediterranean) subject to anthropogenic and natural disturbances. *Deep Sea Research Part I*, 117: 70–83.

- Rousset F. (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103–106.
- Ryman N., Utter F. (1987) Population genetics and fishery management. University of Washington, USA.
- Ryman N., Palm S. (2006) POWSIM: a computer program for assessing statistical power when testing for genetic differentiation. *Molecular Ecology Notes*, 6: 600–602.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350–1354.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sandler I., Sandler L. (1986) On the origin of Mendelian Genetics. *American Zoologist*, 26: 753–768.
- Sardà F., Demestre M. (1987) Estudio biológico de la gamba *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) en el Mar Catalán (NE de España). *Investigación Pesquera*, 51: 213–232.
- Sardà F., Cartes J.E., 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., 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 M.I., Pla C., Lleonart 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 J.B., Maynou F. (2003) 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 C.Y., Company J.B., 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 M.M., Tselepides A., Canals M., Espino M., Tursi A. (2004b) An introduction to Mediterranean deep-sea biology. *Scientia Marina*, 68: 7–38.
- Sardà F., Roldán M.I., 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 J.B. (2012) The deep-sea recruitment of *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) (Crustacea: Decapoda) in the Mediterranean Sea. *Journal of Marine Systems*, 105–108: 145–151.
- Schwanck T.N., Schweinsberg M., Lampert K.P., Guttridge T.L., Tollrian R., O’Shea O. (2020) Linking local movement and molecular analysis to explore philopatry and population connectivity of the southern stingray *Hypanus americanus*. *Journal of Fish Biology*, 96: 1475–1488.
- Serejo C.S., Young P.S., Cardoso I.C., Tavares C., Rodrigues C., Almeida T.C. (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. En: Costa P.A.S., Olavo G., Martins A.S., (Eds.) Biodiversidade da fauna marinha profunda na costa central brasileira. Museu Nacional, Rio de Janeiro, No. 24, 133–162.
- Seridji R. (1971) Contribution à l'étude des larves de crustacés décapodes en baie d'Alger. *Pelagos*, 3: 4–41.
- Shaffer, M.L. (1981) Minimum population sizes for species conservation. *BioScience*, 31: 131–134.
- Shaklee J.B., Bentzen P. (1998) Genetic identification of stocks of marine fish and shellfish. *Bulletin of Marine Science*, 62: 589–621.
- Shendure J., Balasubramanian S., Church G.M., Gilbert W., Rogers J., Schloss J.A., Waterston R.H. (2017) DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*, 550: 345–353.
- Shephard F.P. (1981) Submarine canyons: Multiple causes and long-time persistence. *The American Association of Petroleum Geologists Bulletin*, 1062–1077.
- Singer M.F. (1968) 1968 Nobel Laureate in Medicine or Physiology. *Science*, 162: 433–436.
- Slatkin M. (1993) Isolation by Distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*, 47: 264–279.
- Squirrell J., Hollingsworth P.M., Woodhead M., Russell J., Lowe A.J., Gibby M., Powell W. (2003) How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Molecular Ecology*, 12: 1591–1604.
- Sundqvist L., Keenan K., Zackrisson M., Prodöhl P., Kleinhans D. (2016) Directional genetic differentiation and relative migration. *Ecology and Evolution*, 6: 3461–3475.

- Tintoré J., Violette P.E., Blade I., Cruzado A. (1988) A study of an intense density front in the eastern Alboran Sea: The Almeria-Oran front. *Journal of Physical Oceanography*, 18: 1384–1397.
- TipoArt (2018) Tipologías de artes de pesca como medida de gestión, desarrollo de un arte tipo y más sostenible para la flota de arrastre de gamba roja de Palamós. [Versión Electrónica]. Programa Pleamar. Consultado el 10 mayo 2022. Disponible en: <https://www.programapleamar.es/proyectos/tipoart-tipologias-de-artes-de-pesca-como-medida-de-gestion-desarrollo-de-un-arte-tipo-y>.
- Torres A.P., 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* 77: 149–160.
- Tudela S., Sardà F., Maynou F., Demestre M. (2003) Influence of submarine canyons on the distribution of the deep-water shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) in the NW Mediterranean. *Crustaceana*, 76: 217–225.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. (2004) Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535–538.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407–4414.
- Walther B.D., Munguia P., Fuiman L.A. (2015) Frontiers in marine movement ecology: mechanisms and consequences of migration and dispersal in marine habitats. *Biology Letters*, 11: 20150146.
- Waples R.S. (1989) Temporal variation in allele frequencies: testing the right hypothesis. *Evolution*, 43: 1236–1251.

- Waples R.S., Naish K.A. (2009) Genetic and evolutionary considerations in fishery management research needs for the future. En: Beamish R.J., Rothschild B.J. (Eds.), *The future of Fisheries in North America*. Fish & Fisheries Series: Springer, Netherlands, No. 31: 427–451.
- Waples R.S. (2015) Testing for Hardy-Weinberg proportions: Have we lost the plot? *Journal of Heredity*, 106: 1–19.
- Watson J.D., Crick F.H.C. (1953) Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171: 737–738.
- Weersing K., Toonen R.J. (2009) Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Marine Ecology Progress Series*, 393: 1–12.
- Weinberg W. (1908) Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. *Jahreshefte des Vereins für vaterländische Naturkunde in Württemberg*, 64: 369–382.
- Weir B.S., Cockerham C.C. (1984) Estimating F -statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370.
- Welsh J., McClelland M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18: 7213–7218.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531–6535.
- Wright S. (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16: 97–159.
- Wright S. (1932) The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding and selection in evolution. *Proceedings of the sixth International Congress of Genetics*, 1: 356–366.
- Wright S. (1943) Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114–138.

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. The University of Chicago Press, Chicago, USA.

Wright S. (1978) Evolution and the genetics of populations. Volume IV: Variability within and among natural populations. The University of Chicago Press, Chicago, USA.

Zeder M.A., Hess B. (2000) The initial domestication of goats (*Capra hircus*) in the Zagros mountains 10,000 years ago. *Science*, 287: 2254–2257.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Artículo 1

Genetic analyses reveal temporal stability and connectivity pattern in blue and red shrimp *Aristeus antennatus* populations.

Agulló M., Planella L., Vera M., Heras S., García-Marín J. L., Roldán M. I. (2020) *Scientific Reports*, 10: 21505. doi.org/10.1038/s41598-020-78634-2.

Supplementary information for

**Genetic analyses reveal temporal stability and connectivity pattern in blue and red shrimp
Aristeus antennatus populations.**

Melania Agulló¹, Sandra Heras^{1*}, José-Luis García-Marín¹, Manuel Vera², Laia Planella¹, and María Inés Roldán¹

¹Laboratori d'Ictiologia Genètica, Universitat de Girona, c/ M^{re} Aurèlia Capmany 40, E-17003 Girona, Spain.

²Departamento de Zooloxía, Xenética e Antropoloxía Física, Campus Lugo, Universidade de Santiago de Compostela, E-27002 Lugo, Spain.

*Corresponding author: sandra.heras@udg.edu

This pdf file includes:

Supplementary Figure S1

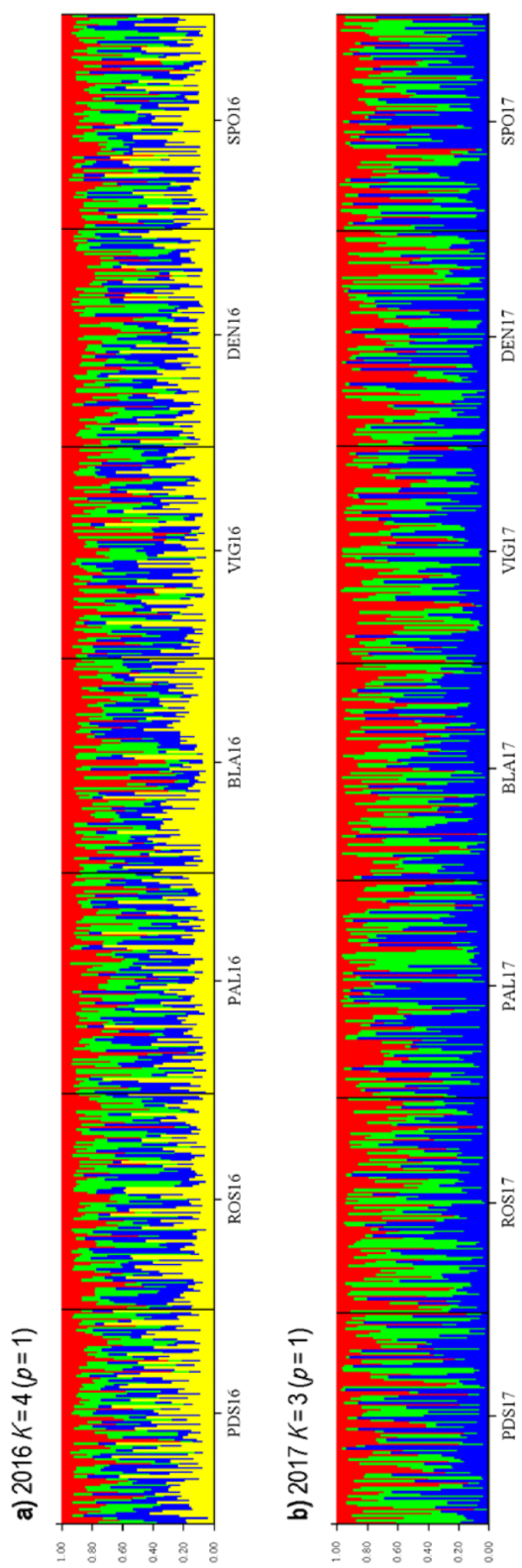
Supplementary Figure S2

Supplementary Table S1

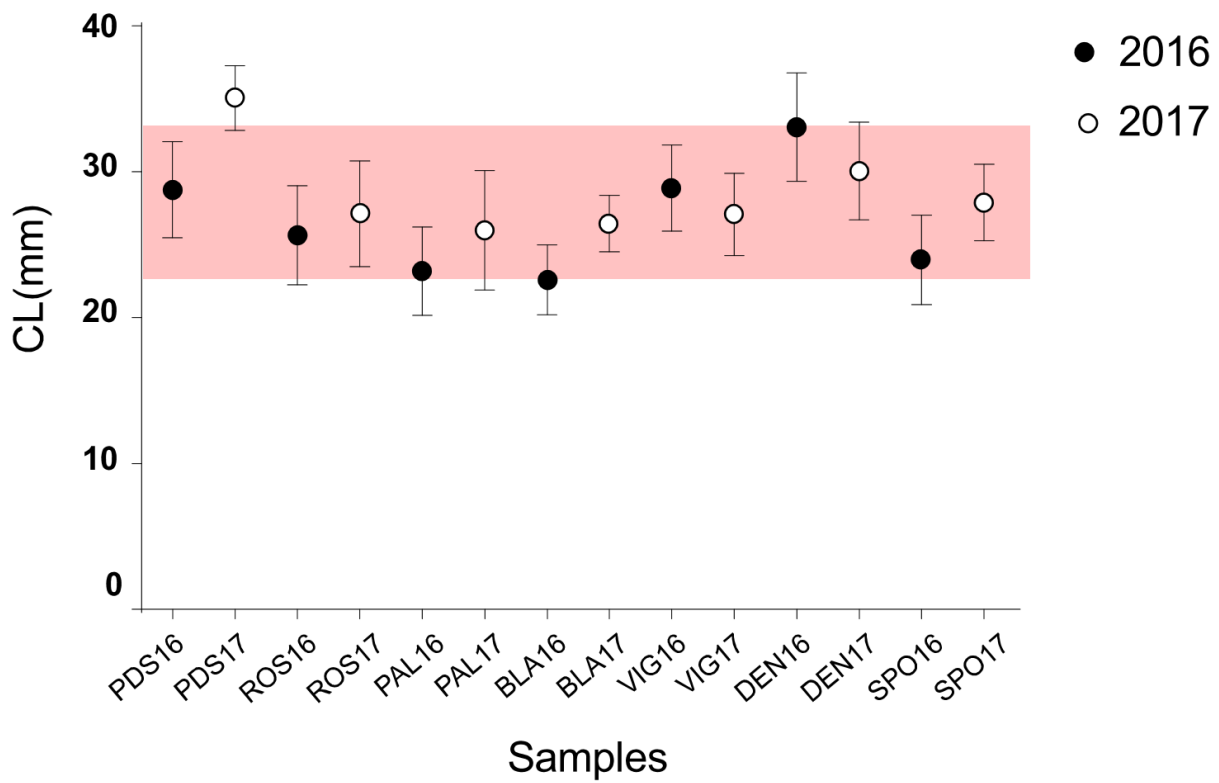
Supplementary Table S2

Supplementary Table S3

Supplementary Table S4



Supplementary Figure S1. Bayesian analyses of population structure. Each vertical bar represents an individual and its associated probability of belonging to each of the clusters detected (represented by colours). K is the most likely number of genetic clusters following the Evanno's method. Sample codes as in Table 1.



Supplementary Figure S2. Mean cephalothorax length (CL) per sample, with standard deviation. In colour, size's range for the 2nd age class (see text for details). Sample codes as in Table 1.

Supplementary Table S1. Summary statistics of genetic diversity for each of twelve microsatellite loci and fourteen samples.

Number of genotyped individuals (n); number of alleles detected per locus (N_A); observed heterozygosity (H_o); expected heterozygosity (H_e); inbreeding coefficient (F_{is}) (* Significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium after Bonferroni correction ($\alpha/168$, $p < 0.0003$)); Null allele frequency (Nu).

Sample	Aa123	Aa1255	Aa138	Aa1444	Aa496b	Aa667	Aa681	Aa751	Aa956	Aa1061	Aa1195	Aa818	Mean
PDS16	n	98	95	94	96	94	97	86	96	95	95	94	
	N_A	6	13	11	2	7	19	3	6	7	5	6	8.8
	H_o	0.439	0.516	0.786	0.500	0.436	0.546	0.058	0.469	0.474	0.579	0.340	0.445
	H_e	0.626	0.791	0.903	0.813	0.154	0.787	0.287	0.594	0.706	0.612	0.653	0.638
	F_{is}	0.299*	0.348*	0.130	0.385*	0.051	0.305*	0.797*	0.211*	0.330*	0.054	0.478*	
	Nu	0.114	0.136	0.055	0.158		0.129	0.161	0.086	0.131		0.211	
PDS17	n	97	93	94	97	94	96	91	96	97	97	96	
	N_A	5	16	22	13	9	20	3	6	8	4	6	9.5
	H_o	0.485	0.462	0.884	0.489	0.489	0.573	0.165	0.552	0.567	0.557	0.354	0.476
	H_e	0.613	0.779	0.910	0.778	0.716	0.758	0.350	0.627	0.721	0.584	0.630	0.632
	F_{is}	0.209*	0.406*	0.029	0.371*	-0.061	0.244	0.529*	0.119	0.214*	0.045	0.438*	
	Nu	0.070	0.170		0.162	0.125	0.103	0.154	0.054	0.084		0.159	
ROS16	n	99	92	99	96	98	99	92	93	99	99	99	
	N_A	5	14	21	10	7	19	3	5	8	5	5	8.7
	H_o	0.434	0.478	0.788	0.500	0.459	0.546	0.163	0.613	0.444	0.717	0.414	0.477
	H_e	0.608	0.752	0.899	0.724	0.685	0.789	0.316	0.681	0.678	0.608	0.667	0.630
	F_{is}	0.286*	0.364*	0.124*	0.310*	-0.073	0.330*	0.484*	0.100	0.345*	-0.180	0.379*	
	Nu	0.116	0.131	0.053	0.128	0.121	0.128	0.100	0.107			0.140	

Sample		Aa123	Aa1255	Aa138	Aa1444	Aa496b	Aa667	Aa681	Aa751	Aa956	Aa1061	Aa1195	Aa818	Mean
ROS17	n	99	93	99	93	97	99	99	92	99	99	99	99	
	Na	5	16	22	11	2	6	21	2	6	8	6	5	9.2
	Ho	0.414	0.495	0.889	0.602	0.155	0.535	0.576	0.174	0.566	0.475	0.667	0.364	0.494
	He	0.584	0.783	0.914	0.779	0.143	0.675	0.787	0.275	0.662	0.714	0.613	0.621	0.631
	Fis	0.291	0.368*	0.027	0.227	-0.079	0.207	0.269*	0.368	0.145	0.335*	-0.089	0.415*	
	Nu	0.113	0.154		0.097		0.113	0.115	0.087		0.121		0.160	
PAL16	n	101	100	101	99	97	96	101	94	101	100	100	100	
	Na	6	15	19	10	2	7	21	3	6	8	4	6	8.9
	Ho	0.485	0.390	0.861	0.515	0.289	0.469	0.584	0.181	0.604	0.450	0.630	0.340	0.486
	He	0.621	0.747	0.898	0.759	0.248	0.721	0.838	0.251	0.624	0.712	0.611	0.609	0.639
	Fis	0.219	0.478*	0.041	0.321*	-0.164	0.350*	0.303*	0.278	0.032	0.368*	-0.031	0.442*	
	Nu	0.091	0.215		0.148		0.144	0.141	0.080		0.134		0.170	
PAL17	n	100	93	100	95	100	97	99	96	100	100	100	99	
	Na	6	14	21	14	2	8	20	3	6	9	5	6	9.5
	Ho	0.510	0.376	0.800	0.526	0.140	0.516	0.515	0.094	0.580	0.510	0.510	0.343	0.453
	He	0.642	0.811	0.895	0.758	0.197	0.691	0.854	0.251	0.677	0.702	0.558	0.683	0.643
	Fis	0.205	0.536*	0.106	0.305*	0.290	0.254*	0.397*	0.627*	0.143	0.274*	0.085	0.497*	
	Nu	0.075	0.266	0.061	0.120		0.103	0.189	0.139	0.065	0.087		0.203	
BLA16	n	98	96	96	93	96	94	97	94	94	98	98	98	
	Na	5	16	23	11	2	8	18	3	6	8	3	6	9.1
	Ho	0.408	0.438	0.750	0.538	0.104	0.521	0.650	0.138	0.543	0.500	0.684	0.408	0.474
	He	0.619	0.765	0.912	0.808	0.099	0.697	0.796	0.239	0.669	0.713	0.607	0.675	0.634
	Fis	0.341*	0.428*	0.178	0.335*	-0.050	0.252	0.184	0.421*	0.189	0.299*	-0.127	0.400*	
	Nu	0.134	0.168	0.067	0.140		0.098	0.074	0.073	0.068	0.106		0.152	

Sample	Aa123	Aa1255	Aa138	Aa1444	Aa496b	Aa667	Aa681	Aa751	Aa956	Aa1061	Aa1195	Aa818	Mean	
BLA17	n	100	92	100	100	98	100	93	100	100	100	100		
	NA	6	13	20	14	9	18	3	6	8	5	6	9.2	
	Ho	0.410	0.337	0.800	0.650	0.130	0.510	0.129	0.530	0.510	0.630	0.410	0.473	
	HE	0.585	0.731	0.919	0.818	0.122	0.713	0.798	0.229	0.642	0.716	0.621	0.698	0.634
	Fis	0.299*	0.539*	0.129	0.206*	-0.065	0.284*	0.248*	0.437*	0.175	0.288*	-0.015	0.413*	
	Nu	0.096	0.208	0.064	0.089	0.110	0.104	0.074	0.065	0.134	0.134	0.168	0.168	
VIG16	n	95	88	93	96	88	96	90	91	96	97	95		
	NA	6	13	21	10	7	20	3	6	7	6	6	8.9	
	Ho	0.390	0.580	0.850	0.384	0.443	0.563	0.089	0.560	0.396	0.598	0.337	0.440	
	HE	0.619	0.764	0.914	0.713	0.696	0.851	0.258	0.696	0.680	0.617	0.654	0.631	
	Fis	0.371*	0.241*	0.070	0.460*	0.137	0.364*	0.339*	0.656*	0.195	0.418*	0.030	0.485*	
	Nu	0.154	0.121	0.179	0.179	0.135	0.181	0.162	0.089	0.187	0.187	0.182	0.182	
VIG17	n	100	85	100	98	96	100	96	100	99	99	99		
	NA	4	15	21	11	7	23	3	6	8	4	6	9.2	
	Ho	0.500	0.435	0.890	0.561	0.170	0.604	0.630	0.104	0.520	0.495	0.647	0.498	
	HE	0.592	0.739	0.906	0.753	0.156	0.692	0.839	0.189	0.628	0.719	0.586	0.655	0.620
	Fis	0.155	0.411*	0.018	0.254*	-0.088	0.127	0.249*	0.449	0.171	0.311*	-0.104	0.383*	
	Nu	0.065	0.150	0.099	0.099	0.067	0.096	0.072	0.082	0.141	0.141	0.153	0.153	
DEN16	n	100	99	100	97	100	99	98	100	100	100	100		
	NA	6	16	20	10	2	8	21	3	7	4	5	9.0	
	Ho	0.370	0.384	0.800	0.412	0.110	0.580	0.566	0.184	0.610	0.400	0.620	0.447	
	HE	0.592	0.784	0.903	0.756	0.104	0.699	0.847	0.292	0.644	0.697	0.606	0.630	0.629
	Fis	0.375*	0.510*	0.114	0.454*	-0.053	0.170	0.333*	0.371	0.052	0.426*	-0.023	0.492*	
	Nu	0.129	0.234	0.047	0.201	0.062	0.148	0.084	0.170	0.170	0.170	0.183	0.183	

Sample	Aa123	Aa1255	Aa138	Aa1444	Aa496b	Aa667	Aa681	Aa751	Aa956	Aa1061	Aa1195	Aa818	Mean
DEN17	n	99	93	96	99	98	98	87	99	99	99	99	
	Na	4	14	12	2	8	19	3	6	7	5	5	8.9
	Ho	0.384	0.387	0.808	0.490	0.449	0.571	0.138	0.495	0.455	0.525	0.333	0.431
	HE	0.584	0.830	0.918	0.772	0.096	0.744	0.336	0.626	0.714	0.583	0.644	0.629
	Fis	0.343*	0.534*	0.120	0.366*	-0.048	0.345*	0.589*	0.210	0.363*	0.099	0.482*	
	Nu	0.144	0.231	0.048	0.147		0.131	0.097	0.090	0.152	0.051	0.190	
SPO16	n	98	92	97	98	97	97	94	98	98	98	98	
	Na	5	16	21	2	8	19	3	6	8	4	6	9.2
	Ho	0.439	0.435	0.857	0.454	0.516	0.567	0.106	0.592	0.459	0.663	0.459	0.476
	HE	0.603	0.790	0.915	0.788	0.682	0.827	0.251	0.692	0.705	0.591	0.692	0.639
	Fis	0.272	0.450*	0.063	0.424*	0.244*	0.314*	0.576*	0.145	0.349*	-0.122	0.336*	
	Nu	0.091	0.192		0.169	0.120	0.148	0.108		0.148		0.158	
SPO17	n	100	94	100	100	98	100	97	100	99	100	100	
	Na	5	14	22	2	9	20	3	6	8	4	5	9.3
	Ho	0.460	0.457	0.800	0.573	0.500	0.530	0.175	0.670	0.495	0.650	0.400	0.483
	HE	0.616	0.760	0.898	0.772	0.744	0.785	0.324	0.630	0.717	0.581	0.687	0.632
	Fis	0.253	0.398*	0.109	0.258*	0.328*	0.325*	0.458*	-0.063	0.310*	-0.119	0.418*	
	Nu	0.079	0.168	0.057	0.098	0.121	0.143	0.118		0.138		0.164	

Supplementary Table S2. Pairwise F_{ST} and p values between temporal collections for the seven locations. Significance indicated in bold ($p < 0.05$).

2016 vs 2017	Port de la Selva	Roses	Palamós	Bianes	Vilanova I la Geltrú	Dénia	Santa Pola
F_{ST} value	0.0000	0.0007	0.0037	0.0048	0.0021	0.0034	0.0001
p	0.958	0.574	0.065	0.020	0.260	0.122	0.767

Supplementary Table S3. Unpaired two-sided Student's t -test results performed to compare the individuals' cephalothorax length (CL) between temporal collections for the seven locations. In bold, significant p values at 0.05 level. Degree of freedom (df). Analysis performed in GraphPad Prism version 8.4.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

2016 vs 2017	Port de la Selva	Roses	Palamós	Bianes	Vilanova I la Geltrú	Dénia	Santa Pola
p	<0.000	0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
t	15.64	2.97	5.55	12.55	4.46	6.00	9.71
df	194	198	201	198	198	200	198

Supplementary Table S4. Raw data set.

Ah1387	2	429	431	139	141	207	219	182	182	412	412	250	250	236	236	266	230	230	230	213	213	207	207	191	191	195	195	190	190
Ah1388	2	431	431	125	139	201	231	182	182	412	412	241	250	236	260	260	230	235	230	209	209	207	207	191	191	195	195	190	190
Ah1389	2	429	431	125	137	201	211	182	182	412	412	250	256	238	238	235	235	230	209	209	207	207	191	191	195	195	190	190	
Ah1390	2	429	431	125	137	201	219	182	182	412	412	256	256	238	264	264	235	235	209	209	207	207	191	191	195	195	190	190	
Ah1391	2	427	429	125	125	201	217	182	186	412	412	256	256	238	238	235	235	230	209	209	207	207	191	191	195	195	190	190	
Ah1392	2	431	431	125	137	201	221	182	184	412	412	256	256	232	322	322	230	235	205	205	205	205	191	191	195	195	190	190	
Ah1393	2	431	431	125	137	201	213	182	184	412	412	256	256	236	238	238	230	230	205	205	205	205	191	191	195	195	190	190	
Ah1394	2	431	431	125	137	201	213	182	184	412	412	256	256	236	238	238	230	230	205	205	205	205	191	191	195	195	190	190	
Ah1395	2	429	431	137	137	201	213	182	184	412	412	256	256	236	238	238	230	230	205	205	205	205	191	191	195	195	190	190	
Ah1396	2	431	433	125	125	187	229	182	182	412	412	256	256	236	236	260	230	230	201	201	201	207	207	191	191	195	195	190	190
Ah1397	2	427	433	135	139	217	217	184	194	412	412	256	256	236	260	260	230	230	201	201	201	207	207	191	191	195	195	190	190
Ah1398	2	431	431	135	135	195	213	182	198	412	412	256	256	236	260	260	230	230	201	201	201	207	207	191	191	195	195	190	190
Ah1399	2	431	431	137	139	199	219	184	192	412	412	256	256	236	260	260	230	235	209	209	209	209	191	191	195	195	190	190	
Ah1400	2	429	431	125	125	203	231	182	182	412	412	256	256	236	322	322	230	235	205	205	205	205	191	191	195	195	190	190	
Ah1401	2	431	431	135	155	213	213	182	182	412	412	253	256	228	236	236	230	230	213	213	213	213	191	191	195	195	190	190	
Ah1402	2	431	431	137	137	205	223	182	182	412	412	256	256	238	264	264	230	230	209	209	209	209	191	191	195	195	190	190	
Ah1403	2	431	431	137	137	205	223	182	182	412	412	256	256	238	264	264	230	230	209	209	209	209	191	191	195	195	190	190	
Ah1404	2	431	431	137	137	205	223	182	182	412	412	256	256	238	264	264	230	230	209	209	209	209	191	191	195	195	190	190	
Ah1405	2	431	431	133	137	213	217	184	184	412	412	253	253	238	260	260	230	230	209	209	209	209	191	191	195	195	190	190	
Ah1406	2	431	431	133	137	199	213	184	194	412	412	256	256	238	322	322	230	230	205	205	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1407	2	427	429	137	169	213	213	182	194	412	412	250	244	244	264	264	230	230	201	201	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1408	2	427	431	125	125	195	213	182	194	412	412	244	250	236	236	236	230	230	201	201	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1409	2	429	431	137	139	197	201	194	194	412	412	250	250	260	260	260	230	230	205	205	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1410	2	429	431	139	139	201	213	194	206	412	412	250	250	242	258	238	230	230	205	205	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1411	2	427	431	137	139	205	207	182	182	412	412	250	253	236	236	236	230	230	205	205	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1412	2	427	431	137	137	213	213	182	182	412	412	253	253	238	238	238	230	230	213	213	213	213	205	205	191	195	190	190	
Ah1413	2	427	427	157	159	211	215	188	194	412	412	256	256	260	264	264	230	230	201	201	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1414	2	427	431	137	137	203	213	182	184	412	412	256	256	236	248	248	235	235	209	209	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1415	2	431	431	137	137	217	217	192	192	412	412	256	256	236	260	260	230	230	205	205	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1416	2	429	429	137	137	205	215	182	182	412	412	256	256	236	260	260	230	230	205	205	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1417	2	427	429	143	143	201	217	192	194	412	412	253	256	236	236	236	230	230	205	205	205	205	207	207	195	195	190	190	
Ah1418	2	431	431	125	139	201	217	182	184	412	412	250	256	236	264	264	230	230	209	209	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1419	2	429	431	125	135	135	213	184	184	412	412	250	253	236	236	238	230	230	201	201	201	201	191	191	195	195	190	190	
Ah1420	2	431	431	139	139	201	221	182	184	412	412	241	250	236	236	236	230	230	205	205	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1421	2	431	431	135	135	201	215	182	206	412	412	244	244	244	268	268	230	230	213	213	213	213	191	191	195	195	190	190	
Ah1422	2	431	431	125	137	213	231	192	194	412	412	250	256	228	236	236	230	230	205	205	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1423	2	431	431	137	137	201	205	186	192	412	412	253	256	236	236	236	230	230	205	205	205	205	191	191	195	195	190	190	
Ah1424	2	427	431	135	137	213	231	182	184	412	412	244	244	244	248	248	230	230	213	213	213	213	191	191	195	195	190	190	
Ah1425	2	427	431	137	137	199	223	182	184	412	412	256	256	236	240	240	230	230	213	213	213	213	191	191	195	195	190	190	
Ah1426	2	431	431	133	133	201	209	182	206	412	412	253	256	236	240	240	230	230	205	205	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1427	2	429	429	125	137	205	217	182	186	412	412	241	241	241	260	260	230	230	205	205	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1428	2	429	429	125	137	205	217	182	186	412	412	241	241	241	260	260	230	230	205	205	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1429	2	427	431	137	137	201	231	182	206	412	412	253	253	230	238	238	230	230	205	205	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1430	3	427	431	137	137	201	231	182	206	412	412	253	253	230	238	238	230	230	205	205	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1431	3	431	431	137	137	201	231	182	184	412	412	253	253	236	236	236	230	230	205	205	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1432	3	427	427	135	135	215	215	182	184	412	412	250	250	236	236	236	230	230	205	205	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1433	3	427	427	135	135	215	215	182	184	412	412	250	250	236	236	236	230	230	205	205	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1434	3	427	429	125	125	213	213	182	184	412	412	250	250	230	322	322	230	230	205	205	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1435	3	427	429	125	125	213	213	182	184	412	412	250	250	230	322	322	230	230	205	205	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1436	3	427	429	125	125	213	213	182	184	412	412	250	250	230	322	322	230	230	205	205	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1437	3	427	429	125	125	213	213	182	184	412	412	250	250	230	322	322	230	230	205	205	213	213	207	207	195	195	190	190	
Ah1438	3	427	429	125	125	213	213	182	184	412	412	250	250	230	322	322	230	230	205	205	213								

4	A11563	4	427	431	125	137	229	229	186	192	412	412	256	256	240	240	230	230	201	209	191	207	195	201	170	190
4	A11564	4	429	433	137	137	201	217	192	198	412	418	250	256	236	264	225	225	201	213	189	207	195	201	170	190
4	A11565	4	427	431	125	139	205	217	170	170	412	412	250	256	236	236	230	230	213	213	191	207	198	201	170	170
4	A11566	4	431	431	137	137	205	205	184	184	412	418	253	253	236	238	230	230	209	209	189	207	198	201	175	175
4	A11567	4	429	431	137	139	217	231	182	182	412	412	256	256	236	236	230	230	205	213	189	207	195	198	170	190
4	A11568	4	427	431	125	137	221	221	184	202	412	412	256	256	236	238	230	230	201	213	191	207	195	198	170	190
4	A11569	4	431	431	125	137	221	221	192	192	412	412	253	253	236	236	230	230	205	213	195	207	195	198	170	175
4	A11570	4	429	431	125	137	197	217	182	182	412	412	241	241	236	236	230	230	209	209	181	207	198	201	185	185
4	A11571	4	429	431	137	137	205	217	184	186	412	412	253	253	236	238	230	230	209	213	197	197	195	195	170	170
4	A11572	4	429	431	137	137	203	217	182	182	412	412	256	256	236	236	230	230	209	213	191	191	195	198	170	170
4	A11573	4	425	431	141	155	217	217	182	194	412	412	250	250	236	248	230	230	205	213	191	191	198	201	165	165
4	A11574	4	425	431	133	157	199	217	182	202	412	412	250	256	236	240	230	230	205	213	207	207	195	198	170	180
4	A11575	4	427	427	133	137	205	231	194	202	412	412	250	256	236	320	230	230	213	213	191	191	195	198	190	190
4	A11576	4	427	429	137	137	199	207	184	184	412	412	250	256	236	264	230	230	201	213	191	191	195	201	175	175
4	A11577	4	429	429	137	137	201	221	194	194	412	412	250	256	236	264	230	230	209	213	195	197	195	198	165	165
4	A11578	4	431	431	137	137	213	213	182	182	412	412	253	253	236	264	230	230	209	213	191	191	195	198	170	175
4	A11579	4	429	431	125	125	207	211	184	194	412	412	244	253	236	264	230	230	213	213	191	197	195	201	165	170
4	A11580	4	431	431	125	137	221	221	192	192	412	412	256	256	236	264	230	230	213	213	207	207	195	195	170	175
4	A11581	4	431	431	125	137	201	211	188	188	412	412	250	256	236	264	230	230	209	213	191	191	195	198	170	175
4	A11582	4	427	427	137	137	201	211	182	182	412	412	250	256	236	264	230	230	209	213	191	191	195	198	170	175
4	A11583	4	427	427	137	137	201	211	182	182	412	412	250	256	236	264	230	230	209	213	191	191	195	198	170	175
4	A11584	4	427	427	165	165	217	221	194	202	412	412	253	256	236	236	230	230	201	213	207	207	195	198	170	185
4	A11585	4	427	429	137	137	213	231	182	182	412	412	253	256	236	240	230	230	213	213	191	191	195	201	170	170
4	A11586	4	431	431	133	133	201	205	182	194	412	412	253	256	236	240	230	230	201	213	191	191	195	201	165	170
4	A11587	4	427	431	153	153	201	231	192	192	412	412	250	256	236	264	230	230	201	213	191	197	195	198	170	175
4	A11588	4	429	431	137	141	213	223	182	182	412	412	256	274	236	268	230	230	201	213	191	207	195	198	190	190
4	A11589	4	429	431	135	135	187	201	192	192	412	418	250	253	240	258	230	230	209	209	191	191	195	195	190	190
4	A11590	4	429	429	125	137	201	217	184	198	412	412	253	256	260	264	230	230	209	213	207	207	195	195	175	175
4	A11591	4	425	431	125	155	201	203	194	194	412	412	253	253	240	240	230	230	209	209	207	207	195	198	175	175
4	A11592	4	427	427	125	165	195	211	192	192	412	412	253	253	226	240	230	230	209	209	213	213	191	195	201	170
4	A11593	4	427	427	137	137	231	231	206	206	412	412	250	250	236	236	230	230	205	213	207	207	195	195	170	170
4	A11594	4	427	427	137	137	201	205	192	206	412	412	241	256	236	236	230	230	205	213	207	207	195	195	170	190
4	A11595	4	427	431	155	155	201	205	192	206	412	412	241	256	236	236	230	230	205	213	207	207	195	195	170	190
4	A11596	4	427	431	155	155	201	205	192	206	412	412	241	256	236	236	230	230	205	213	207	207	195	195	170	190
4	A11597	4	425	431	125	137	203	203	182	182	412	412	253	253	240	240	230	230	209	209	191	191	195	198	175	175
4	A11598	4	429	431	133	133	203	221	192	192	412	412	253	256	236	264	230	230	209	213	191	191	195	198	175	175
4	A11599	4	431	431	125	139	221	221	182	184	412	412	253	256	236	264	230	230	209	213	207	207	195	195	170	170
4	A11600	4	431	431	155	167	215	221	192	194	412	412	253	256	236	264	230	230	213	213	207	207	195	195	190	190
4	A11601	4	427	429	137	153	207	207	194	198	412	412	250	259	240	260	230	230	205	209	191	207	195	198	170	190
4	A11602	4	427	427	125	125	205	207	194	194	412	412	250	253	240	240	230	230	205	213	191	207	195	198	170	175
4	A11603	4	427	427	137	137	217	217	184	184	412	412	250	256	236	236	230	230	201	201	191	207	195	198	170	175
4	A11604	4	429	431	141	153	213	231	182	186	412	412	256	256	236	236	230	230	201	213	191	207	195	198	170	175
4	A11605	4	431	431	141	141	213	231	182	184	412	412	256	256	236	236	230	230	209	213	191	191	195	198	165	165
4	A11606	4	431	431	135	135	205	221	194	194	412	412	256	256	236	260	230	230	209	213	191	191	195	198	190	190
4	A11607	4	431	431	137	139	211	219	182	192	412	412	250	250	236	270	230	230	201	201	195	195	195	195	170	170
4	A11608	4	431	431	137	139	211	219	182	192	412	412	250	250	236	322	230	230	213	213	193	193	195	195	170	170
4	A11609	4	431	431	137	139	211	219	182	192	412	412	250	250	236	322	230	230	213	213	193	193	195	195	170	170
4	A11610	4	431	431	125	125	217	217	192	192	412	412	250	256	236	268	230	230	209	209	191	207	195	195	170	175
4	A11611	4	427	431	137	137	205	213	192	192	412	412	250	256	236	268	230	230	205	213	191	207	195	195	170	170
4	A11612	4	427	427	137	155	195	219	194	194	412	412	250	250	236	270	230	230	205	213	191	191	195	198	170	170
4	A11613	4	427	427	137	137	217	219	182	182	412	412	250	256	236	264	230	230	201	213	191	207	195	198	170	170
4	A11614	4	429	429	133	133	217	217	192	206	412	412	250	256	236	264	230	230	201	213	191	207	195	198	170	170
4	A11615	4	431	431	133	137	205	205	182	182	412	412	250	250	236	238	230	230	213	213	205	205	195	198	170	175
4	A11616	4	431	431	133	133	205	205	182	182	412	412	250	256	236	238	230	230	205	213	205	205	195	198	170	175
4	A11617	4	427	427	125	137	213	213	192	182	412	412	256	256	236	236	230	230	205	213	197	197	195	198	165	165
4	A11618	4	427	427	137	137	201	217	182	182	412	412	256	256	240	258	230	230	209	213	191	191	195	195	170	170
4	A11619	4	427	431																						

Aa1731	5	429	429	125	137	201	205	192	194	412	412	253	256	240	240	240	240	230	230	235	209	213	207	207	195	198	188	170	170	
Aa1733	5	429	431	133	137	221	229	182	184	412	412	256	256	236	236	236	236	230	230	235	205	213	195	195	195	198	188	170	170	
Aa1734	5	429	429	125	137	201	203	182	182	412	412	256	256	236	236	236	236	230	230	235	209	209	197	197	195	198	188	170	170	
Aa1735	5	431	431	135	135	211	231	194	194	412	412	256	256	260	264	264	264	230	230	230	209	213	191	191	195	195	201	170	175	
Aa1736	5	427	429	135	135	205	221	192	198	412	412	256	256	236	236	236	236	230	230	230	205	213	207	209	195	198	170	170	175	
Aa1737	5	431	431	135	135	197	201	184	184	412	412	256	256	228	228	228	228	230	230	230	213	213	195	195	195	195	195	170	170	
Aa1738	5	427	429	135	135	207	217	182	188	412	412	256	271	236	320	320	320	230	230	230	193	193	191	191	195	198	188	175	190	
Aa1739	5	427	429	135	135	207	217	182	188	412	412	256	256	260	260	260	260	230	230	230	209	209	195	195	195	195	195	170	170	
Aa1740	5	427	429	135	135	199	205	182	188	412	412	256	256	236	236	236	236	230	230	230	205	209	207	207	195	198	188	170	170	
Aa1741	5	429	429	135	135	199	205	182	188	412	412	256	256	236	236	236	236	230	230	230	205	209	207	207	195	198	188	170	170	
Aa1742	5	431	437	141	141	207	211	192	206	412	412	256	256	260	260	260	260	230	230	230	205	213	191	191	195	195	201	180	190	
Aa1743	5	429	431	141	141	187	201	194	194	412	412	244	253	240	240	240	240	230	230	230	205	213	191	191	195	195	201	165	190	
Aa1744	5	429	431	137	167	205	213	182	182	412	412	250	250	238	238	238	238	230	230	230	201	205	207	207	195	198	170	170	170	
Aa1745	5	431	431	137	137	203	217	194	194	412	412	236	236	264	264	264	264	230	230	230	201	201	207	207	195	198	170	170	170	
Aa1746	5	427	429	137	145	213	213	194	194	412	412	236	236	236	236	236	236	230	230	230	213	213	191	191	195	195	170	170	170	
Aa1747	5	427	431	133	133	215	217	182	182	412	412	228	228	236	236	236	236	230	230	230	201	213	207	207	195	195	170	170	170	
Aa1748	5	427	429	133	133	205	215	182	182	412	412	238	238	238	238	238	238	230	230	230	201	205	207	207	195	198	165	170	170	
Aa1749	5	427	429	135	157	187	207	184	184	412	412	253	256	264	264	264	264	230	230	230	213	213	191	191	195	195	201	165	175	
Aa1750	5	429	431	137	139	201	203	182	182	412	412	253	256	264	264	264	264	230	230	230	209	209	195	195	195	195	195	170	170	170
Aa1751	5	431	431	137	137	213	213	182	182	412	412	250	256	260	260	260	260	230	230	230	209	209	195	195	195	195	165	165	165	
Aa1752	5	431	431	137	137	213	213	182	182	412	412	250	256	260	260	260	260	230	230	230	209	209	195	195	195	195	165	165	165	
Aa1753	5	431	431	137	137	213	213	182	182	412	412	250	256	260	260	260	260	230	230	230	209	209	195	195	195	195	165	165	165	
Aa1754	5	431	431	137	137	213	213	182	182	412	412	250	256	260	260	260	260	230	230	230	209	209	195	195	195	195	165	165	165	
Aa1755	5	427	431	125	132	201	201	184	184	412	412	256	256	236	236	236	236	230	230	230	205	213	207	207	198	201	175	175	175	
Aa1756	5	427	427	125	137	205	213	184	184	412	412	256	256	236	236	236	236	230	230	230	205	213	207	207	198	201	175	175	175	
Aa1757	5	431	431	137	141	199	203	194	194	412	412	250	256	236	236	236	236	230	230	230	201	201	191	191	198	201	175	175	175	
Aa1758	5	427	431	137	141	199	203	194	194	412	412	250	256	236	236	236	236	230	230	230	201	201	191	191	198	201	175	175	175	
Aa1759	5	427	431	137	141	199	203	194	194	412	412	250	256	236	236	236	236	230	230	230	201	201	191	191	198	201	175	175	175	
Aa1760	6	429	431	137	165	203	213	182	182	412	412	253	256	232	322	322	322	230	230	230	205	213	207	207	195	198	170	170	170	
Aa1770	6	429	431	141	141	191	207	182	182	412	412	250	250	264	264	264	264	230	230	230	209	213	191	191	195	198	175	175	175	
Aa1771	6	429	431	125	137	205	231	192	192	412	412	256	256	236	236	236	236	230	230	230	205	213	191	191	195	198	170	170	170	
Aa1772	6	431	431	125	137	201	201	194	198	412	412	250	250	250	250	250	250	230	230	230	205	213	189	209	195	198	175	175	175	
Aa1773	6	431	431	143	143	201	211	184	198	412	412	241	250	250	250	250	250	230	230	230	209	213	191	191	195	195	190	190	190	
Aa1774	6	431	431	137	137	201	223	182	188	412	412	250	256	236	236	236	236	230	230	230	209	213	189	209	195	195	190	190	190	
Aa1775	6	431	431	125	125	207	207	182	182	412	412	250	256	236	236	236	236	230	230	230	209	213	189	209	195	195	190	190	190	
Aa1776	6	431	431	125	125	207	207	182	182	412	412	250	256	236	236	236	236	230	230	230	209	213	189	209	195	195	190	190	190	
Aa1777	6	431	431	125	125	207	207	182	182	412	412	250	256	236	236	236	236	230	230	230	209	213	189	209	195	195	190	190	190	
Aa1778	6	431	431	125	125	207	207	182	182	412	412	250	256	236	236	236	236	230	230	230	209	213	189	209	195	195	190	190	190	
Aa1779	6	427	431	141	141	201	211	192	194	412	412	250	256	236	236	236	236	230	230	230	209	213	207	207	198	201	170	170	170	
Aa1780	6	431	431	151	151	201	213	184	184	412	412	250	256	236	236	236	236	230	230	230	209	213	207	207	198	201	170	170	170	
Aa1781	6	427	431	137	137	187	205	182	206	412	412	250	256	236	236	236	236	230	230	230	209	213	207	207	198	201	170	170	170	
Aa1782	6	427	427	141	165	205	207	182	194	412	412	250	256	236	236	236	236	230	230	230	205	213	191	191	195	195	165	165	165	
Aa1783	6	429	431	135	137	201	213	184	184	412	412	241	253	238	242	242	242	230	230	230	205	213	191	191	195	195	165	165	165	
Aa1784	6	425	431	125	141	201	213	182	182	412	412	244	253	236	248	248	248	230	230	230	209	213	191	191	195	195	165	165	165	
Aa1785	6	427	431	125	139	217	217	194	194	412	412	244	253	236	236	236	236	230	230	230	209	213	195	195	195	195	165	165	165	
Aa1786	6	431	431	125	125	201	227	182	194	412	412	256	256	236	236	236	236	230	230	230	213	213	195	195	195	201	170	190	190	
Aa1787	6	427	429	125	137	191	201	182	194	412	412	253	256	238	248	248	248	230	230	230	205	213	195	195	195	195	170	170	175	
Aa1788	6	427	429	137	155	201	221	192	192	412	412	253	256	238	248	248	248	230	230	230	205	213	195	195	195	195	198	170	175	
Aa1789	6	429	429	125	133	201	215	206	206	412	412	250	253	230	230	230	230	230	230	230	201	201	197	197	195	195	170	170	170	
Aa1790	6	429	429	125	137	205	215	182	182	412	412	253	256	236	236	236	236	230	230	230	205	213	195	195	195	195	170	170	170	
Aa1791	6	427	427	125	137</																									

Aa1822	6	431	165	167	187	205	198	198	412	412	256	256	240	280	230	230	230	201	205	195	207	195	198	190	190	
Aa1823	6	431	137	137	203	217	198	198	412	412	256	256	240	280	230	230	230	201	205	195	207	195	198	190	190	
Aa1824	6	431	125	187	187	205	182	194	412	412	253	253	238	258	230	230	230	205	209	191	191	195	198	185	185	
Aa1825	6	427	431	137	205	213	182	194	412	412	250	250	238	264	230	230	230	205	213	207	209	198	198	170	170	
Aa1826	6	431	125	125	213	221	182	182	412	412	250	259	240	240	230	230	230	201	213	207	209	198	198	165	165	
Aa1827	6	431	125	125	213	221	182	182	412	412	250	259	240	240	230	230	230	201	213	207	209	198	198	170	170	
Aa1828	6	431	125	125	213	221	182	182	412	412	250	259	240	240	230	230	230	201	213	207	209	198	198	170	170	
Aa1829	6	427	429	137	211	219	182	182	412	412	256	256	236	248	230	230	230	205	213	207	207	195	198	170	170	
Aa1830	6	431	143	143	201	213	182	194	412	412	256	256	236	268	230	230	230	205	213	207	197	197	198	165	165	
Aa1831	6	429	431	139	205	213	182	194	412	412	256	256	236	268	230	230	230	205	213	207	197	197	198	175	175	
Aa1832	6	431	125	137	217	231	182	194	412	412	256	256	236	268	230	230	230	205	213	207	197	197	198	170	170	
Aa1833	6	431	125	125	201	217	182	182	412	412	256	256	236	260	230	230	230	205	213	207	207	195	198	170	170	
Aa1834	6	431	139	139	213	213	182	182	412	412	253	256	248	268	230	230	230	209	213	213	191	191	195	175	175	
Aa1835	6	431	137	137	217	219	182	182	412	412	250	253	238	322	230	230	230	213	213	207	207	195	195	170	170	
Aa1836	6	431	137	137	217	219	182	182	412	412	250	256	238	322	230	230	230	213	213	207	207	195	195	170	170	
Aa1837	6	429	429	139	205	205	186	194	412	412	250	256	236	236	230	230	230	205	213	195	207	195	198	170	170	
Aa1838	6	425	425	137	205	215	184	192	412	412	250	253	238	238	230	230	230	205	205	213	195	207	195	175	175	
Aa1839	6	431	137	169	201	213	182	194	412	412	256	256	232	314	230	230	230	213	213	207	207	195	201	165	175	
Aa1840	6	429	431	133	167	211	182	192	412	412	253	236	314	314	225	230	230	213	213	207	207	198	198	170	170	
Aa1841	6	427	427	137	195	219	182	182	412	412	256	256	236	264	230	230	230	205	205	213	207	207	198	170	170	
Aa1842	6	431	137	137	206	211	182	182	412	412	253	256	248	314	230	230	230	213	213	207	207	195	198	170	170	
Aa1843	6	431	137	137	206	211	182	182	412	412	253	256	248	314	230	230	230	213	213	207	207	195	198	170	170	
Aa1844	6	431	133	133	217	225	182	182	412	412	256	256	260	260	230	230	230	205	213	207	207	198	198	180	180	
Aa1845	6	427	429	137	215	231	182	182	412	412	253	253	238	228	230	230	230	213	213	207	207	198	198	170	170	
Aa1846	6	429	429	137	157	205	213	194	412	412	253	256	236	264	230	230	230	213	213	191	191	195	195	185	175	
Aa1847	6	431	143	143	205	229	194	194	412	412	256	256	240	258	230	230	230	209	213	189	207	195	198	190	190	
Aa1848	6	431	125	137	201	229	194	194	412	412	253	253	228	236	230	230	230	209	213	189	207	195	195	170	175	
Aa1849	6	429	431	125	139	187	211	184	412	412	250	250	236	236	230	230	230	209	209	195	192	201	198	175	175	
Aa1850	6	431	141	159	201	215	192	192	412	412	250	250	238	238	230	230	230	209	209	195	192	201	198	175	175	
Aa1851	6	427	431	137	207	217	192	192	412	412	253	256	224	224	235	235	235	205	213	195	195	195	198	175	175	
Aa1852	6	429	431	125	125	207	231	186	196	412	412	256	236	236	230	230	230	209	213	191	209	195	195	185	185	
Aa1853	6	427	427	137	195	219	182	182	412	412	253	256	264	322	230	230	230	213	213	205	207	198	198	170	170	
Aa1854	6	427	427	137	195	219	182	182	412	412	253	256	264	322	230	230	230	213	213	205	207	198	198	170	170	
Aa1855	6	431	137	137	211	213	194	194	412	412	250	250	248	280	230	230	230	205	205	191	191	195	195	170	175	
Aa1856	6	431	137	137	211	213	194	194	412	412	250	250	248	280	230	230	230	205	205	191	191	195	195	170	175	
Aa1857	6	427	433	125	137	217	221	182	182	412	412	256	260	264	230	230	230	213	213	207	209	195	195	170	170	
Aa1858	6	431	139	139	217	221	182	182	412	412	256	256	260	264	230	230	230	209	213	191	191	195	195	170	175	
Aa1859	6	431	139	139	217	221	182	182	412	412	256	256	260	264	230	230	230	209	213	191	191	195	195	170	175	
Aa1860	6	431	139	139	217	221	182	182	412	412	256	256	260	264	230	230	230	209	213	191	191	195	195	170	175	
Aa1861	6	431	139	141	191	213	194	194	412	412	253	253	240	240	230	230	230	209	213	191	191	195	195	170	170	
Aa1862	6	429	429	137	137	207	217	182	206	412	412	256	248	248	230	230	230	213	213	191	191	195	195	170	170	
Aa1863	6	429	431	137	137	217	182	194	412	412	250	256	230	264	230	230	230	209	209	191	195	195	198	165	170	
Aa1864	6	431	143	143	211	213	192	194	412	412	253	256	236	236	230	230	230	213	213	195	205	198	198	170	170	
Aa1865	6	431	157	157	201	201	182	182	412	412	250	258	258	258	230	230	230	205	209	197	197	195	198	170	170	
Aa1866	6	429	431	133	139	201	182	184	412	412	256	256	236	236	230	230	230	213	213	191	191	198	201	170	170	
Aa1867	6	427	427	137	195	219	182	182	412	412	253	256	264	322	230	230	230	213	213	205	207	198	198	170	170	
Aa1868	6	431	137	147	211	211	194	194	412	412	250	250	236	236	230	230	230	205	205	191	191	195	195	170	170	
Aa1869	6	431	125	147	211	211	194	194	412	412	250	250	236	236	230	230	230	205	205	191	191	195	195	170	170	
Aa1870	6	431	125	137	201	205	184	194	412	412	250	256	264	264	230	230	230	205	205	197	197	195	195	170	170	
Aa1871	7	427	427	139	139	201	182	184	194	412	412	250	256	264	264	230	230	230	205	205	197	197	195	195	170	170
Aa1872	7	427	429	139	139	201	182	184	194	412	412	250	256	264	264	230	230	230	205	205	197	197	195	195	170	170
Aa1873	7	429	431	133	137	203	182	182	412	412	250	256	236	248	230	230	230	213	213	191	191	195	198	175	175	
Aa1874	7	427	429	139	139	211	182	184	412	412	256	256	236	238	230	230	230	209	213	191	191	195	198	170	170	
Aa1875	7	429	429	137	165	207	217	194	204	412	412	253	256	236	236	230	230	213	213	207	207	195	195	170	170	
Aa1876	7	431	135	135	203	223	206	206	412	412	250	256	236	248	230	230	230	201	213	191	191	195	198	170	170	
Aa1877	7	429	431	135	135	203	206	206	412	412	250	256	236	248	230	230	230	209	213	191	191	195	198	170	170	
Aa1878	7	427	431	139	143	211	182	198	412	412	253	256	264	264	230	230	230	213	213	195	209	195	198	175	190	
Aa1879	7	431	133	143	201	217	194	194	412	412	253	253	260	260	235	235	235	213	213	207	207	195	201	175	190	

Aa1909	7	429	429	133	137	201	221	194	204	412	412	250	250	236	264	230	230	213	217	207	207	195	195	180
Aa1910	7	427	431	125	165	197	197	194	194	412	412	250	256	264	264	230	230	209	213	207	207	195	198	190
Aa1911	7	427	431	137	137	203	203	186	202	412	412	256	256	236	264	230	230	205	205	205	205	195	198	165
Aa1912	7	431	431	133	137	203	205	182	192	412	412	250	250	240	280	230	230	205	209	195	195	195	198	175
Aa1913	7	427	427	125	125	195	231	184	194	412	412	250	250	236	236	230	230	201	213	195	207	198	188	170
Aa1914	7	431	431	137	137	201	205	182	182	412	412	250	250	238	264	230	235	201	213	195	207	198	188	175
Aa1915	7	427	429	135	135	221	231	186	186	412	412	256	248	270	270	230	230	205	205	195	195	198	198	170
Aa1916	7	427	431	137	137	201	201	186	204	412	412	250	256	248	248	230	230	213	213	191	207	185	201	175
Aa1917	7	427	431	133	137	201	201	186	204	412	412	250	256	248	248	230	230	213	213	191	207	185	201	175
Aa1918	7	429	431	137	137	205	213	192	192	412	412	250	250	238	322	230	230	205	209	191	207	185	201	190
Aa1919	7	431	431	137	137	219	221	194	194	412	412	250	250	230	322	230	230	213	213	191	191	195	195	170
Aa1920	7	429	431	137	137	201	217	182	184	412	412	250	250	236	264	230	230	213	213	191	195	195	198	165
Aa1921	7	427	429	125	143	199	219	182	184	412	412	250	256	238	236	230	230	201	205	191	207	195	195	165
Aa1922	7	431	431	137	137	205	221	194	194	412	412	256	256	238	238	230	230	205	213	191	195	195	198	170
Aa1923	7	431	431	139	139	219	237	182	182	412	412	256	256	260	260	230	230	201	213	191	207	195	198	175
Aa1924	7	431	431	149	149	201	219	194	194	412	412	250	250	238	238	230	230	205	213	189	207	198	201	170
Aa1925	7	431	431	125	137	191	217	186	186	412	412	256	256	238	238	230	230	209	213	207	207	195	195	165
Aa1926	7	427	429	137	137	195	227	182	194	412	412	250	253	236	264	230	230	201	201	207	207	198	201	175
Aa1927	7	431	431	137	137	201	203	182	182	412	412	244	244	230	264	230	230	205	213	197	197	195	195	165
Aa1928	7	431	431	139	139	207	215	194	194	412	412	250	256	236	236	230	230	209	209	191	207	195	195	180
Aa1929	7	431	431	137	137	201	201	182	182	412	412	250	250	236	236	230	230	205	213	197	197	195	195	165
Aa1930	7	431	431	125	125	195	223	182	182	412	412	256	256	236	236	230	230	213	213	191	191	195	198	170
Aa1931	7	431	431	143	169	207	213	180	180	412	412	256	256	232	322	230	230	205	209	191	191	198	188	170
Aa1932	7	427	429	137	137	205	205	194	206	412	412	250	256	236	236	230	230	213	213	195	195	195	198	170
Aa1933	7	431	433	137	137	205	213	182	182	412	412	253	256	236	260	230	230	209	213	191	191	195	201	175
Aa1934	7	429	431	125	153	211	217	182	182	412	412	250	250	236	236	230	230	209	213	207	207	195	195	170
Aa1935	7	427	431	125	137	205	217	184	194	412	412	250	250	236	236	230	230	205	213	191	191	195	198	170
Aa1936	7	427	431	137	137	207	217	182	182	412	412	250	250	238	238	230	230	209	213	207	207	195	198	170
Aa1937	7	427	431	165	167	211	217	182	182	412	412	250	250	260	260	230	230	205	213	195	207	195	195	170
Aa1938	7	429	431	137	137	221	231	182	182	412	412	256	271	238	264	235	235	213	213	207	209	195	201	170
Aa1939	7	431	431	135	167	213	231	184	184	412	412	250	256	236	236	230	230	213	213	207	207	195	198	190
Aa1940	7	431	431	135	137	183	213	192	192	412	412	250	253	280	314	230	230	205	205	193	197	195	198	190
Aa1941	7	431	431	135	137	183	213	192	192	412	412	250	253	280	314	230	230	205	205	193	197	195	198	190
Aa1942	7	431	431	135	137	183	213	192	192	412	412	250	253	280	314	230	230	205	205	193	197	195	198	190
Aa1943	7	427	431	137	165	195	211	184	202	412	412	250	256	236	236	230	230	213	213	191	191	195	198	170
Aa1944	7	431	431	125	125	217	217	182	182	412	412	250	253	236	236	230	230	213	213	191	195	195	198	175
Aa1945	7	427	431	133	155	201	201	186	194	412	412	250	256	240	240	230	230	213	213	191	195	201	201	170
Aa1946	7	431	431	125	137	217	217	182	182	412	412	253	256	236	264	230	230	213	213	191	191	198	201	165
Aa1947	7	431	431	125	143	217	217	182	182	412	412	250	256	236	266	230	230	213	213	191	191	195	198	165
Aa1948	7	431	431	137	137	199	201	182	182	412	412	250	256	236	236	230	230	213	213	191	191	195	198	170
Aa1949	7	427	431	125	125	201	213	182	182	412	412	256	256	240	248	230	230	205	213	191	207	195	201	170
Aa1950	7	429	429	137	137	203	213	194	194	412	412	250	256	236	236	230	230	213	217	207	207	195	198	170
Aa1951	7	427	431	155	155	197	211	192	194	412	412	244	244	250	264	230	230	213	213	195	207	195	198	170
Aa1952	7	431	431	137	165	205	227	182	192	412	412	250	256	236	236	230	230	213	213	195	207	195	198	190
Aa1953	7	429	431	137	165	191	191	182	182	412	412	250	256	238	236	230	230	213	213	191	205	195	198	190
Aa1954	7	427	431	137	165	191	191	182	182	412	412	250	256	238	236	230	230	213	213	191	205	195	198	190
Aa1955	7	427	431	137	165	191	191	182	182	412	412	250	256	238	236	230	230	213	213	191	205	195	198	190
Aa1956	7	429	429	137	137	211	221	182	182	412	412	250	256	240	240	230	230	209	209	191	207	195	198	190
Aa1957	7	429	431	125	125	217	217	182	182	412	412	253	256	236	236	230	230	201	213	191	207	195	198	170
Aa1958	7	427	431	141	141	217	231	194	202	412	412	256	256	230	236	230	230	205	205	191	191	195	201	165
Aa1959	7	431	431	133	133	227	231	182	182	412	412	253	256	236	264	230	230	201	209	191	209	195	195	175
Aa1960	7	427	429	137	137	217	221	182	182	412	412	256	256	238	266	230	230	209	213	207	207	195	198	170
Aa1961	7	431	431	125	125	197	221	182	182	412	412	256	256	236	236	230	230	209	213	195	207	195	198	170
Aa1962	7	425	427	137	167	201	219	182	182	412	412	253	256	236	236	230	230	209	213	191	209	195	198	170
Aa1963	7	427	429	137	167	201	219	182	182	412	412	253	256	236	236	230	230	205	213	195	207	195	201	190
Aa1964	7	431	431	137	137	195	231	182	182	412	412	250	253	236	236	230	230	205	213	195	197	195	201	165
Aa1965	7	427	431	125	139	201	217	182	194	412	412	253	253	238	238	230	230	213	213	197	197	195	201	165
Aa1966	7	431	431	125	146	213	217	186	208	412	412	253	256	248	260	230	230	205	213	197	197	195	201	170
Aa1967	7	431	431	139	141	211	211	182	182	412	412	253	256	248	260	230	230	205	213	197	197	195	201	170
Aa1968	7	431	431	141	141	211	211	182	182	412	412	253	256	248	260	230	230	205	213	197	197	195	201	170
Aa1																								

Aa3824	8	429	431	139	167	195	213	182	194	412	412	256	256	236	264	230	235	213	217	207	207	207	195	195	198	188	170	170	175	
Aa3825	8	429	431	133	139	211	221	182	182	412	412	256	256	224	264	230	230	213	213	213	213	213	195	195	195	195	195	190	190	
Aa3826	8	427	431	135	135	197	217	182	206	412	412	250	250	236	236	230	230	201	209	209	209	207	207	195	195	198	170	170	175	
Aa3827	8	429	431	137	137	205	217	192	192	412	412	253	274	236	236	230	230	209	213	213	213	207	207	195	198	170	170	175	175	
Aa3828	8	431	431	137	137	201	231	194	194	412	412	241	271	248	248	230	230	205	213	213	213	207	207	195	198	165	190	190	190	
Aa3829	8	431	431	137	137	205	221	186	194	412	412	250	256	232	264	230	230	205	213	213	213	207	207	195	198	201	190	190	190	
Aa3830	8	431	431	133	137	223	223	182	182	412	412	250	250	236	236	230	230	213	213	213	213	207	207	195	198	201	190	190	190	
Aa3831	8	431	431	135	137	217	217	182	182	412	412	250	250	236	236	230	230	205	213	213	213	207	207	195	198	201	190	190	190	
Aa3832	8	427	427	137	137	197	197	182	182	412	412	253	256	238	264	230	230	205	213	213	213	207	207	195	198	201	190	190	190	
Aa3833	8	427	429	137	137	217	217	182	182	412	412	253	256	238	264	230	230	205	213	213	213	207	207	195	198	201	190	190	190	
Aa3834	9	431	431	137	137	197	211	182	206	412	412	256	256	236	236	230	230	205	213	213	213	207	207	195	198	188	170	170	170	
Aa3835	9	427	427	139	139	207	217	182	184	412	412	256	256	236	236	230	230	205	213	213	213	207	207	195	198	188	170	170	170	
Aa3836	9	431	431	137	137	187	187	182	184	412	412	250	256	236	236	230	230	205	213	213	213	207	207	195	195	165	175	175	175	
Aa3837	9	429	431	137	137	201	205	184	184	412	412	250	253	264	320	230	230	213	213	213	213	207	207	195	198	165	170	170	170	
Aa3838	9	427	431	133	133	199	201	184	194	412	412	241	274	248	248	230	230	213	213	213	213	207	207	195	198	175	175	175	175	
Aa3839	9	431	431	137	139	197	201	182	194	412	412	241	250	236	236	230	230	213	213	213	213	207	207	195	198	170	170	170	170	
Aa3840	9	427	431	137	137	205	219	194	204	412	412	250	250	240	240	230	230	205	213	213	213	207	207	195	198	201	190	190	190	
Aa3841	9	427	429	137	137	197	197	182	182	412	412	256	256	236	236	230	230	205	213	213	213	207	207	195	198	201	190	190	190	
Aa3842	9	429	431	137	137	217	217	182	184	412	412	256	256	264	320	230	230	213	213	213	213	207	207	195	198	165	170	170	170	
Aa3843	9	431	431	139	139	201	205	184	194	412	412	241	250	264	320	230	230	213	213	213	213	207	207	192	195	170	170	170	170	
Aa3844	9	427	431	133	133	199	211	182	194	412	412	253	256	236	236	230	230	205	213	213	213	207	207	195	198	175	175	175	175	
Aa3845	9	427	431	133	133	199	211	182	184	412	412	250	274	248	248	230	230	213	213	213	213	207	207	195	198	175	175	175	175	
Aa3846	9	431	431	137	139	201	205	184	184	412	412	241	250	236	236	230	230	213	213	213	213	207	207	195	198	170	170	170	170	
Aa3847	9	427	431	137	139	197	201	182	194	412	412	241	250	236	236	230	230	213	213	213	213	207	207	195	198	170	170	170	170	
Aa3848	9	427	431	137	139	205	219	194	204	412	412	250	250	240	240	230	230	205	213	213	213	207	207	195	198	201	190	190	190	
Aa3849	9	427	429	137	137	197	197	182	184	412	412	256	256	236	236	230	230	205	213	213	213	207	207	195	198	201	190	190	190	
Aa3850	9	427	427	135	135	187	187	182	182	412	412	256	256	236	236	230	230	205	213	213	213	207	207	195	198	188	170	170	170	
Aa3851	9	431	431	135	135	195	201	182	194	412	412	250	256	228	238	230	230	205	213	213	213	207	207	195	198	188	170	170	170	
Aa3852	9	427	431	135	139	195	201	182	194	412	412	250	253	266	266	230	230	205	213	213	213	207	207	195	195	170	170	170	170	
Aa3853	9	431	431	137	137	213	227	182	204	412	412	250	253	236	236	230	230	213	213	213	213	207	207	195	198	170	170	170	170	
Aa3854	9	427	427	125	167	201	201	194	194	412	412	256	256	238	238	230	230	205	213	213	213	207	207	195	198	170	170	170	170	
Aa3855	9	429	429	125	125	211	219	182	182	412	412	253	253	224	238	230	230	201	213	213	213	207	207	195	198	165	175	175	175	
Aa3856	9	429	431	165	165	195	201	182	194	412	412	250	250	236	236	230	230	205	213	213	213	207	207	195	198	201	170	170	175	175
Aa3857	9	427	427	125	137	187	187	182	194	412	412	253	253	236	236	230	230	201	213	213	213	207	207	195	198	201	170	170	175	175
Aa3858	9	427	431	125	165	217	235	186	192	412	412	250	256	236	236	230	230	213	213	213	213	207	207	195	195	190	190	190	190	
Aa3859	9	427	429	137	137	217	217	182	206	412	412	253	256	238	264	230	230	209	213	213	213	207	207	195	195	198	170	170	170	170
Aa3860	9	429	431	137	137	217	217	182	204	412	412	250	256	264	264	230	230	213	213	213	213	207	207	198	201	165	165	165	165	
Aa3861	9	431	431	123	139	213	231	194	204	412	412	256	256	236	322	230	230	213	213	213	213	207	207	195	195	195	170	170	170	170
Aa3862	9	427	429	137	137	197	197	182	182	412	412	256	256	236	236	230	230	205	213	213	213	207	207	195	195	195	170	170	170	170
Aa3863	9	427	429	137	137	205	217	182	182	412	412	256	256	236	236	230	230	205	213	213	213	207	207	195	195	195	170	170	170	170
Aa3864	9	429	429	137	137	217	217	182	182	412	412	256	256	236	236	230	230	205	213	213	213	207	207	195	195	195	170	170	170	170
Aa3865	9	429	429	139	139	199	205	182	182	412	412	256	256	236	236	230	230	201	213	213	213	207	207	198	204	165	165	165	165	
Aa3866	9	429	431	125	153	217	219	194	194	412	412	274	274	232	322	230	230	213	213	213	213	207	207	195	198	170	170	170	170	
Aa3867	9	427	431	135	157	231	231	194	198	412	412	250	256	236	236	230	230	213	213	213	213	207	207	195	198	165	190	190	190	
Aa3868	9	431	431	133	133	217	223	182	182	412	412	253	253	236	236	230	230	205	213	213	213	207	207	195	198	201	170	170	170	170
Aa3869	9	431	431	125	159	201	205	182	206	412	412	250	250	236	236	230	230	205	213	213	213	207	207	195	198	201	170	170	170	170
Aa3870	9	429	429	125	125	203	217	182	182	412	412	250	250	236	236	230	230	205	213	213	213	207	207	195	198	170	170	170	170	170
Aa3871	9	431	431	137	137	201	217	194	194	412	412	256	256	238	238	230	230	213	213	213	213	207	207	195	198	201	170	170	170	170
Aa3872	9	429	431	137	137	201	221	192	192	412	412	253	253	260	260	230	230	205	213	213	213	207	207	195	198	170	170	170	170	170
Aa3873	9	427	431	137	137	205	221	184	202	412	412	250	256	238	238	230	230	209	213	213	213	207	207	195	1					

A3306	9	427	431	125	137	213	221	182	184	412	412	253	256	236	238	230	230	230	201	213	191	207	195	201	170	175		
A3307	9	427	431	137	137	201	213	182	204	412	412	250	253	264	264	230	230	230	209	213	191	191	207	195	201	170	175	
A3308	9	429	431	125	125	207	231	186	204	412	412	253	256	236	236	230	230	230	213	213	191	191	207	195	201	170	170	
A3309	9	429	431	137	143	213	243	182	194	412	418	250	256	236	236	230	230	230	205	209	191	191	207	195	201	170	170	
A3310	9	429	429	137	143	213	243	182	194	412	418	250	256	236	236	230	230	230	205	209	191	191	207	195	201	170	170	
A3311	9	427	431	125	137	206	213	182	194	412	418	253	256	236	236	230	230	230	209	213	191	191	207	195	201	170	170	
A3312	9	427	429	135	135	213	213	194	194	412	412	250	253	236	236	230	230	230	205	205	191	191	207	195	201	170	170	
A3313	9	427	429	135	135	213	213	194	194	412	412	250	253	236	236	230	230	230	205	205	191	191	207	195	201	170	170	
A3314	9	427	429	135	135	201	217	182	192	412	412	250	256	236	236	230	230	230	201	209	207	207	207	195	195	201	170	170
A3315	9	427	431	139	141	199	217	182	182	412	418	253	253	236	236	230	230	230	205	205	191	191	207	195	201	170	170	
A3316	9	427	427	139	139	187	213	182	182	412	412	250	256	236	236	230	230	230	213	213	191	191	207	195	201	170	170	
A3317	9	429	431	137	167	201	201	182	192	412	412	250	256	236	236	230	230	230	213	213	191	191	207	195	201	170	170	
A3318	9	429	431	125	137	211	221	194	194	412	412	250	256	236	236	230	230	230	213	213	191	191	207	195	201	170	170	
A3319	9	427	433	137	139	211	231	182	194	412	412	250	256	236	236	230	230	230	205	209	189	189	207	195	201	170	170	
A3320	9	427	431	125	137	201	201	194	194	412	412	250	256	236	236	230	230	230	205	205	191	191	207	195	201	170	170	
A3321	9	431	431	137	137	201	243	186	206	412	412	250	256	236	236	230	230	230	213	213	191	191	207	195	201	170	170	
A3322	9	427	431	137	137	213	219	182	194	412	412	250	256	236	236	230	230	230	205	205	191	191	207	195	201	170	170	
A3323	9	427	431	137	137	201	201	182	194	412	412	250	256	236	236	230	230	230	205	205	191	191	207	195	201	170	170	
A3324	9	431	431	137	165	213	217	182	182	412	412	250	256	236	236	230	230	230	213	213	191	191	207	195	201	170	170	
A3325	9	431	431	137	165	213	217	182	182	412	412	250	256	236	236	230	230	230	213	213	191	191	207	195	201	170	170	
A3326	9	431	431	137	137	217	217	182	182	412	412	250	256	236	236	230	230	230	213	213	191	191	207	195	201	170	170	
A3327	9	431	431	137	137	217	217	182	182	412	412	250	256	236	236	230	230	230	213	213	191	191	207	195	201	170	170	
A3328	9	431	431	137	137	201	211	206	206	412	418	250	256	236	236	230	230	230	205	205	191	191	207	195	201	170	170	
A3329	9	427	429	137	137	201	221	182	202	412	412	250	256	236	236	230	230	230	213	213	191	191	207	195	201	170	170	
A3330	9	427	431	137	137	201	203	182	182	412	412	250	256	236	236	230	230	230	213	213	191	191	207	195	201	170	170	
A3331	9	427	431	125	125	217	217	184	202	412	412	250	256	236	236	230	230	230	213	213	191	191	207	195	201	170	170	
A3332	9	427	431	125	125	217	221	194	206	412	412	250	256	236	236	230	230	230	201	201	191	191	207	195	201	170	170	
A3333	9	429	429	137	155	201	201	194	204	412	412	250	256	236	236	230	230	230	213	213	191	191	207	195	201	170	170	
A3334	9	429	429	137	137	199	201	182	182	412	418	253	256	236	236	230	230	230	217	217	191	191	207	195	201	170	170	
A3335	9	427	427	137	137	201	201	182	182	412	418	250	256	236	236	230	230	230	205	205	191	191	207	195	201	170	170	
A3336	9	429	429	137	137	201	201	182	182	412	418	250	256	236	236	230	230	230	205	205	191	191	207	195	201	170	170	
A3337	9	429	429	137	137	201	201	182	182	412	418	250	256	236	236	230	230	230	205	205	191	191	207	195	201	170	170	
A3338	9	429	429	137	137	201	201	182	182	412	418	250	256	236	236	230	230	230	205	205	191	191	207	195	201	170	170	
A3339	10	431	431	125	137	217	233	184	192	412	412	250	256	236	236	230	230	230	205	205	191	191	207	195	201	170	170	
A3340	10	427	431	133	135	205	205	194	194	412	412	250	256	236	236	230	230	230	201	201	191	191	207	195	201	170	170	
A3341	10	431	431	125	125	217	221	182	182	412	418	250	256	236	236	230	230	230	205	205	191	191	207	195	201	170	170	
A3342	10	429	431	141	141	221	221	194	194	412	418	250	256	236	236	230	230	230	201	201	191	191	207	195	201	170	170	
A3343	10	431	431	125	125	201	201	182	186	412	412	250	256	236	236	230	230	230	205	205	191	191	207	195	201	170	170	
A3344	10	431	431	135	137	205	213	186	206	412	412	250	256	236	236	230	230	230	201	201	191	191	207	195	201	170	170	
A3345	10	431	431	155	167	217	221	186	206	412	412	250	256	236	236	230	230	230	213	213	191	191	207	195	201	170	170	
A3346	10	427	429	125	125	201	211	194	194	412	418	250	256	236	236	230	230	230	213	213	191	191	207	195	201	170	170	
A3347	10	425	431	135	135	189	217	184	184	412	418	250	256	236	236	230	230	230	213	213	191	191	207	195	201	170	170	
A3348	10	427	431	133	139	191	213	182	186	412	412	250	256	236	236	230	230	230	209	209	191	191	207	195	201	170	170	
A3349	10	427	431	133	139	191	213	182	186	412	412	250	256	236	236	230	230	230	209	209	191	191	207	195	201	170	170	
A3350	10	425	431	133	139	191	213	182	186	412	412	250	256	236	236	230	230	230	209	209	191	191	207	195	201	170	170	
A3351	10	427	431	133	139	206	213	182	186	412	412	250	256	236	236	230	230	230	201	201	191	191	207	195	201	170	170	
A3352	10	431	431	125	137	217	233	182	182	412	412	250	256	236	236	230	230	230	205	205	191	191	207	195	201	170	170	
A3353	10	427	431	125	137	199	217	182	182	412	412	250	256	236	236	230	230	230	205	205	191	191	207	195	201	170	170	
A3354	10	427	429	143	143	201	231	182	182	412	412	250	256	236	236	230	230	230	201	201	191	191	207	195	201	170	170	
A3355	10	427	427	125	137	213	219	184	192	412	412	250	256	236	236	230	230	230	205	205	191	191	207	195	201	170	170	
A3356	10	427	429	137	137	217	221	182	184	412	412	250	256	236	236	230	230	230	201	201	191	191	207	195	201	170	170	
A3357	10	429	429	125	151	211	219	194	202	412	412	262	262	236	236	230	230	230	209	209	191	191	207	198	201	170	170	
A3358	10	429	431	137	137	203	205	182	194	412	418	250	256	236	236	230	230	230	213	213	191	191	207	198	201	170	170	
A3359	10	427	427	133	137	201	213	194	194	412	418	250	256	236	236	230	230	230	209	209	191	191	207	198	201	170	170	
A3360	10	427	431																									

10	Aa4387	10	427	431	137	137	201	223	194	194	412	412	412	412	256	256	230	322	225	225	213	213	213	207	207	198	198	170	175		
10	Aa4388	10	425	431	137	141	217	231	182	182	412	412	412	412	256	256	236	264	230	230	230	209	213	195	195	207	195	195	170	170	
10	Aa4389	10	431	431	139	139	217	217	192	194	412	412	412	412	256	256	238	242	230	230	201	213	191	191	207	195	195	190	190	190	
10	Aa4654	10	427	431	137	137	231	231	192	194	412	412	412	412	256	256	240	260	230	230	209	213	191	191	207	195	195	170	170	175	
10	Aa4655	10	431	431	137	137	227	227	182	184	412	412	412	412	256	256	230	230	230	230	209	213	191	191	209	198	198	170	170	170	
10	Aa4656	10	431	431	137	137	227	227	182	184	412	412	412	412	256	256	230	230	230	230	209	213	191	191	209	198	198	170	170	170	
10	Aa4657	10	431	431	133	133	225	225	182	184	412	412	412	412	256	256	236	236	230	230	213	217	195	195	207	195	195	165	165	170	
10	Aa4658	10	429	431	139	141	211	215	194	194	418	418	418	418	241	250	230	230	205	213	209	213	197	197	207	195	195	165	165	170	
10	Aa4659	10	431	431	139	141	211	215	186	186	412	412	418	418	244	256	236	236	230	230	205	213	191	191	207	195	195	170	170	170	
10	Aa4660	10	427	431	125	141	195	213	194	194	418	418	418	418	250	256	260	264	225	225	193	213	195	195	207	195	195	175	190	190	
10	Aa4661	10	431	431	137	137	201	201	194	194	412	412	412	412	256	256	236	260	230	230	205	209	191	191	207	195	195	170	185	170	
10	Aa4662	10	431	431	155	155	201	201	182	196	412	412	412	412	256	256	240	270	230	230	209	209	207	207	207	198	198	165	170	170	
10	Aa4663	10	431	435	143	143	223	223	182	192	412	412	412	412	250	250	230	230	230	230	209	209	207	207	207	198	198	165	170	170	
10	Aa4664	10	429	431	155	155	205	205	186	186	418	418	418	418	250	250	238	238	230	230	205	209	191	191	207	195	195	180	180	180	
10	Aa4665	10	431	431	137	137	205	207	182	182	412	412	412	412	256	256	264	264	230	230	209	213	191	191	207	195	195	165	190	190	
10	Aa4666	10	431	431	165	169	201	211	182	182	412	412	412	412	253	256	236	236	230	230	213	213	207	207	207	195	195	175	175	175	
10	Aa4667	10	427	427	137	137	217	217	182	182	412	412	412	412	256	256	238	238	230	230	205	209	191	191	207	195	195	170	170	170	
10	Aa4668	10	427	427	137	137	217	217	182	182	412	412	412	412	256	256	238	238	230	230	205	209	191	191	207	195	195	170	170	170	
10	Aa4669	10	427	431	125	125	201	211	182	182	412	412	412	412	253	253	264	322	230	230	213	213	191	191	207	195	195	180	190	190	
10	Aa4670	10	427	431	125	125	207	217	182	182	418	418	418	418	253	256	236	260	230	230	213	213	191	191	207	195	195	180	170	175	175
10	Aa4671	10	427	431	125	125	195	219	188	206	412	412	412	412	250	256	236	236	230	230	213	213	205	205	205	198	198	170	170	170	
10	Aa4672	10	429	431	125	125	191	217	182	182	412	412	412	412	256	256	236	236	230	230	213	213	207	207	207	195	198	170	170	170	
10	Aa4673	10	429	431	125	125	205	217	182	192	412	412	412	412	244	250	238	238	230	230	205	209	191	191	207	195	198	170	170	170	
10	Aa4674	10	427	431	125	125	201	219	182	194	412	412	412	412	256	256	240	322	230	230	209	209	207	207	207	195	198	170	175	175	
10	Aa4675	10	431	431	137	137	201	231	194	194	412	412	412	412	244	253	238	238	230	230	213	213	191	191	207	195	195	170	170	170	
10	Aa4676	10	427	431	137	151	201	217	182	182	412	412	412	412	244	253	238	238	230	230	213	213	191	191	207	195	195	170	170	170	
10	Aa4677	10	425	431	125	137	217	217	182	182	412	412	412	412	250	256	240	240	225	230	213	213	191	191	207	195	195	170	170	170	
10	Aa4678	10	431	431	135	137	217	217	180	182	412	412	412	412	250	256	238	266	230	230	201	201	191	191	207	195	195	170	190	190	
10	Aa4679	10	431	431	137	139	213	213	180	182	412	412	412	412	241	250	238	266	230	230	205	209	191	191	207	195	195	170	190	190	
10	Aa4680	10	427	427	137	139	213	213	180	182	412	412	412	412	241	250	238	266	230	230	205	209	191	191	207	195	195	170	190	190	
10	Aa4681	10	427	431	137	139	201	217	182	182	412	412	412	412	256	256	230	236	230	230	205	205	213	191	207	195	195	170	170	170	
10	Aa4682	10	427	431	133	133	201	201	184	184	412	412	412	412	250	256	236	236	230	230	213	213	191	191	207	195	195	165	165	190	190
10	Aa4683	10	429	431	155	155	217	219	182	182	412	412	412	412	250	256	230	238	230	230	213	213	207	207	207	195	195	180	180	190	190
10	Aa4684	10	429	431	137	139	221	223	194	194	412	412	412	412	250	256	230	238	230	230	213	213	207	207	207	195	198	170	170	170	
10	Aa4685	10	431	431	125	125	201	227	182	192	412	412	412	412	256	256	240	282	230	230	213	213	191	191	207	195	198	170	170	170	
10	Aa4686	10	431	431	137	137	199	199	184	184	412	412	412	412	253	253	248	248	230	230	213	213	191	191	207	195	198	175	190	190	
10	Aa4687	10	429	431	125	133	187	187	199	199	412	412	412	412	253	253	248	248	230	230	213	213	191	191	207	195	198	165	175	190	190
10	Aa4688	10	427	427	155	155	201	219	182	194	412	412	412	412	244	253	230	238	230	230	213	213	191	191	197	195	198	165	165	165	165
10	Aa4689	10	427	427	125	125	201	213	170	182	412	412	412	412	244	253	230	238	230	230	205	213	191	191	197	195	198	170	170	170	170
10	Aa4690	10	427	427	125	125	217	217	182	182	412	412	412	412	253	256	236	236	230	230	201	209	191	191	207	195	198	170	170	170	170
10	Aa4691	10	431	431	137	137	201	201	182	186	412	412	412	412	250	256	238	322	230	230	213	213	191	191	207	195	198	175	175	175	175
10	Aa4692	10	429	431	139	139	205	205	184	184	412	412	412	412	250	256	238	322	230	230	213	213	191	191	207	195	198	170	170	170	170
10	Aa4693	10	429	431	139	139	205	205	184	184	412	412	412	412	250	256	238	322	230	230	213	213	191	191	207	195	198	170	170	170	170
10	Aa4694	10	429	429	151	165	207	213	182	202	412	412	412	412	241	250	238	238	230	230	205	205	213	207	207	195	195	165	165	165	165
10	Aa4695	10	427	429	105	137	219	221	186	194	412	412	412	412	250	256	240	240	230	230	213	213	207	207	207	195	195	180	180	190	190
10	Aa4696	10	427	427	137	137	213	221	182	194	412	412	412	412	253	253	236	236	230	230	205	213	191	191	207	195	195	185	190	190	190
10	Aa4697	10	429	431	137	137	213	213	182	194	412	412	412	412	256	256	236	236	230	230	205	213	191	191	207	195	195	175	175	175	175
10	Aa4698	10	427	429	151	151	201	201	182	198	412	412	412	412	253	253	260	260	230	230	213	213	191	191	207	195	195	170	170	170	170
10	Aa4699	10	427	427	137																										

Am067	11	427	431	133	221	231	182	192	412	418	244	250	264	264	230	230	209	209	209	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am068	11	427	429	125	137	205	182	192	412	418	250	256	236	236	230	230	205	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am069	11	431	431	125	187	207	182	184	412	412	253	253	260	264	230	230	209	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am070	11	427	431	125	217	227	182	194	412	418	256	256	236	236	230	230	209	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am071	11	429	431	137	191	201	184	194	412	418	244	250	236	236	230	230	209	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am072	11	427	431	139	191	201	184	194	412	418	244	250	236	236	230	230	209	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am073	11	427	431	139	205	223	184	192	412	418	256	256	236	236	230	230	209	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am074	11	429	431	137	191	201	184	194	412	418	244	250	236	236	230	230	209	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am075	11	429	431	137	217	227	184	194	412	418	256	256	236	236	230	230	209	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am076	11	427	427	125	217	217	184	206	412	412	250	256	236	236	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am077	11	427	431	139	139	203	184	192	412	412	250	256	236	236	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am078	11	431	431	139	157	217	184	194	412	412	253	271	238	238	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am079	11	429	429	125	137	201	186	186	412	412	244	244	236	236	230	230	209	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am080	11	431	431	143	143	205	207	182	412	412	256	236	236	236	230	230	209	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am081	11	431	431	137	137	213	182	206	412	412	253	262	248	264	230	230	205	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am082	11	431	431	139	139	219	198	198	412	412	256	256	236	236	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am083	11	431	431	137	137	213	182	194	412	412	253	256	236	236	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am084	11	431	431	125	135	213	184	206	412	412	250	256	236	236	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am085	11	429	431	137	137	201	182	182	412	412	250	250	236	240	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am086	11	431	433	165	165	221	182	198	412	412	250	238	230	230	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am087	11	429	429	137	137	201	182	182	412	412	250	256	236	236	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am088	11	431	431	143	143	201	182	206	412	412	250	256	236	236	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am089	11	431	431	143	143	201	182	206	412	412	250	256	236	236	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am090	11	431	431	139	139	211	182	204	412	412	250	253	236	236	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am091	11	427	429	145	167	201	182	208	412	418	256	256	236	264	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am092	11	427	431	125	125	213	182	184	412	412	253	256	236	314	230	230	193	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am093	11	425	427	125	213	213	192	194	412	412	253	256	236	264	230	230	193	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am094	11	431	431	137	137	199	182	182	412	412	250	250	236	236	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am095	11	429	429	137	137	201	182	184	412	412	253	256	236	264	230	230	205	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am096	11	429	429	143	143	201	182	194	412	412	250	256	236	322	230	230	209	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am097	11	431	431	143	143	201	182	188	412	412	250	250	236	240	230	230	209	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am098	11	429	431	137	167	203	182	206	412	412	253	253	236	264	230	230	201	205	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am099	11	429	431	145	145	203	184	192	412	412	250	262	240	240	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am100	11	429	431	145	145	203	184	192	412	412	250	262	240	240	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am101	11	429	431	145	145	203	184	192	412	412	250	262	240	240	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am102	11	429	429	125	125	187	182	182	412	412	250	253	260	264	230	230	205	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am103	11	431	431	125	125	217	194	194	412	412	250	256	258	258	230	230	205	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am104	11	431	431	125	125	217	194	194	412	412	250	256	258	258	230	230	205	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am105	11	427	427	125	125	213	180	184	412	412	253	262	236	264	230	230	205	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am106	11	427	431	135	135	203	182	182	412	412	250	250	236	240	230	230	205	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am107	11	429	431	125	137	195	184	194	412	412	256	256	236	238	230	230	209	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am108	11	431	431	125	137	207	184	186	412	412	250	256	224	224	230	230	205	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am109	11	427	427	125	125	223	182	182	412	412	250	259	260	260	230	230	205	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am110	11	427	429	125	125	217	182	182	412	412	250	256	236	236	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am111	11	427	429	125	125	217	182	182	412	412	250	256	236	236	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am112	11	427	429	125	125	205	182	188	412	412	253	236	236	236	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am113	11	427	429	125	125	205	182	188	412	412	253	236	236	236	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am114	11	427	429	125	125	205	182	188	412	412	253	236	236	236	230	230	213	213	213	213	191	191	191	191	195	198	198	165	190	175
Am115	11	429	431	125	125	225	182	192	412	412	250	253	264	264	230	230	205	213	213	213	191	191	191	191	195	198</				

Ah147	12	427	431	137	137	199	199	199	192	192	412	412	250	256	236	248	230	230	209	213	191	207	195	195	195	170	170
Ah148	12	425	431	137	137	205	213	182	204	412	412	250	250	236	264	235	235	230	213	213	207	207	195	195	195	170	170
Ah149	12	427	431	137	143	205	211	188	198	412	418	250	250	271	264	230	230	230	213	213	191	207	195	195	195	170	170
Ah150	12	427	431	125	137	201	213	182	182	412	418	241	250	236	240	230	230	230	205	213	191	209	198	198	198	170	170
Ah151	12	427	431	137	137	199	205	182	182	412	412	256	256	240	248	230	230	230	209	209	193	193	195	195	195	170	170
Ah152	12	427	431	137	137	199	205	182	182	412	412	256	256	240	248	230	230	230	209	209	193	193	195	195	195	170	170
Ah153	12	427	431	137	137	199	205	182	182	412	412	256	256	240	248	230	230	230	209	209	193	193	195	195	195	170	170
Ah154	12	427	431	137	137	199	205	182	182	412	412	256	256	240	248	230	230	230	209	209	193	193	195	195	195	170	170
Ah155	12	427	431	137	137	199	205	182	182	412	412	256	256	240	248	230	230	230	209	209	193	193	195	195	195	170	170
Ah156	12	429	429	141	141	217	217	182	194	412	412	250	256	232	238	230	230	230	201	205	207	207	195	198	198	170	170
Ah157	12	429	431	137	165	217	231	182	204	412	418	250	256	236	240	230	230	230	213	213	207	207	195	195	195	175	175
Ah158	12	427	429	125	137	199	213	182	182	412	412	256	256	224	238	230	230	230	209	209	213	213	198	198	198	170	170
Ah159	12	427	431	137	137	207	213	182	182	412	412	241	256	232	236	235	235	230	201	213	197	197	195	198	198	170	170
Ah160	12	431	431	139	139	191	231	182	182	412	412	250	253	236	314	230	230	230	193	213	205	205	198	198	165	165	165
Ah161	12	431	431	137	139	201	231	182	182	412	412	250	256	258	258	230	230	230	213	213	189	209	195	195	195	170	170
Ah162	12	427	429	137	139	201	205	182	206	412	412	250	253	232	232	230	230	230	213	213	207	207	195	198	198	170	170
Ah163	12	431	431	139	139	203	211	182	186	412	412	250	256	238	238	230	230	230	213	213	207	207	195	198	198	170	170
Ah164	12	431	431	137	137	201	211	182	184	412	412	250	256	228	238	230	230	230	213	213	207	207	195	198	198	170	170
Ah165	12	427	431	137	137	199	205	182	184	412	412	250	256	236	264	230	230	230	209	209	193	193	195	198	198	170	170
Ah166	12	429	431	137	137	211	221	182	184	412	412	250	256	236	264	230	230	230	209	209	193	193	195	198	198	170	170
Ah167	12	427	429	133	137	199	217	194	194	412	412	250	256	236	270	230	230	230	201	213	191	191	195	198	198	170	170
Ah168	12	431	431	137	137	205	219	182	194	412	412	253	256	236	236	230	230	230	213	213	193	193	195	198	198	170	170
Ah169	12	431	431	137	137	213	217	182	194	412	412	256	256	236	314	230	230	230	213	213	191	191	195	198	198	170	170
Ah170	12	427	431	137	137	187	213	194	194	412	412	250	256	236	314	230	230	230	213	213	191	191	195	198	198	170	170
Ah171	12	427	429	137	137	201	221	184	192	412	412	250	256	236	236	230	230	230	201	213	207	207	195	198	198	170	170
Ah172	12	427	429	137	137	201	221	184	192	412	412	250	256	236	236	230	230	230	201	213	207	207	195	198	198	170	170
Ah173	12	431	431	137	137	199	201	182	192	412	412	250	256	270	280	230	230	230	205	217	191	191	195	195	175	175	175
Ah174	12	431	431	137	137	203	207	182	182	412	412	241	256	258	264	230	230	230	213	213	195	207	195	198	198	170	170
Ah175	12	429	431	125	139	221	223	182	208	412	418	250	262	236	264	230	230	230	209	213	191	191	195	195	195	170	170
Ah176	12	429	431	169	169	231	231	182	186	412	412	250	260	240	260	230	230	230	205	205	213	197	197	195	198	170	170
Ah177	12	431	431	125	125	195	211	182	182	412	412	250	256	240	260	230	230	230	205	205	213	197	197	195	198	170	170
Ah178	12	429	431	137	137	199	205	182	182	412	412	250	256	236	264	230	230	230	209	209	193	193	195	198	198	170	170
Ah179	12	431	431	133	133	213	217	194	194	412	412	250	256	238	238	230	230	230	213	213	193	193	195	195	170	170	170
Ah180	12	429	431	125	125	213	221	194	194	412	412	250	256	238	238	230	230	230	213	213	193	193	195	195	170	170	170
Ah181	12	427	431	125	125	195	217	182	194	412	412	256	262	238	264	230	230	230	201	205	207	207	195	198	198	170	170
Ah182	12	429	431	137	137	201	205	184	192	412	412	256	256	236	236	230	230	230	209	217	207	207	198	198	198	170	170
Ah183	12	429	431	137	137	215	217	182	182	412	412	256	256	236	270	230	230	230	209	213	191	191	195	198	198	170	170
Ah184	12	429	429	125	125	201	205	186	192	412	418	256	256	240	264	230	230	230	213	213	195	195	195	198	198	170	170
Ah185	12	427	427	137	137	201	217	194	206	412	412	250	271	236	276	230	230	230	201	213	191	191	195	198	198	170	170
Ah186	12	431	431	137	137	205	231	182	192	412	412	253	253	236	236	230	230	230	213	213	195	207	195	198	198	170	170
Ah187	12	427	431	137	137	205	213	192	206	412	412	250	256	236	236	230	230	230	213	213	195	195	195	195	195	190	190
Ah188	12	431	431	139	139	205	229	184	184	412	412	250	262	264	322	230	230	230	201	213	191	191	195	195	175	175	175
Ah189	12	431	431	137	137	207	207	184	194	412	412	256	256	240	286	230	230	230	201	213	191	191	195	195	165	165	165
Ah190	12	429	431	137	137	199	205	182	182	412	412	250	256	236	286	230	230	230	209	209	193	193	195	198	198	170	170
Ah191	12	429	431	137	137	199	205	182	182	412	412	250	256	236	286	230	230	230	209	209	193	193	195	198	198	170	170
Ah192	12	427	431	125	137	217	217	182	184	412	412	250	256	238	238	230	230	230	213	213	197	197	195	195	165	165	165
Ah193	12	427	431	125	137	217	217	182	184	412	412	250	256	238	238	230	230	230	213	213	197	197	195	195	165	165	165
Ah194	12	429	431	137	137	205	205	182	192	412	412	253	256	232	316	230	230	230	213	213	189	207	195	198	198	190	190
Ah195	12	429	431	137	137	205	205	182	192	412	412	253	256	232	316	230	230	230	213	213	189	207	195	198	198	190	190
Ah196	12	427	429	125	125	203	217	182	184	412	412	250	250	258	274	230	230	230	209	213	191	191	195	198	198	170	170
Ah197	12	427	431	125	125	199	213	182	184	412	412	250	262	264	274	230	230	230	213	213	191	191	195	198	198	190	190
Ah198	12	425	431	125	125	211	213	182	194	412	412	247	250	230	230	230	230	230	201	209	191	207	195	198	198	170	170
Ah199	12	429	431	125	125	201	217	182	194	412	412	253	256	230	266	230	230	230	205	213	191	207	198	198	165	165	165
Ah200	12	431	431	125	125	201	221	182	194	412	412	256	256	236	236	230	230	230	213	213							

Aa4386	14	429	431	137	137	201	217	182	412	250	253	238	240	225	230	213	213	191	191	195	195	198	190	170	175
Aa4387	14	429	431	137	137	219	223	182	412	256	256	236	264	225	225	205	213	195	207	207	195	198	190	170	175
Aa4388	14	429	431	139	139	221	221	184	412	256	256	232	238	230	230	205	213	191	207	207	195	195	165	170	175
Aa4389	14	431	431	125	125	195	231	206	412	256	256	232	244	230	230	205	205	207	207	195	195	195	170	175	190
Aa4390	14	431	431	137	137	187	223	194	412	253	228	228	228	225	230	213	213	191	207	207	195	198	165	170	175
Aa4391	14	431	431	125	137	213	213	182	412	250	256	238	238	230	230	213	213	191	207	207	195	198	165	170	175
Aa4392	14	429	429	137	137	187	213	182	412	250	256	238	238	230	230	213	213	191	207	207	195	198	165	170	175
Aa4393	14	429	429	137	137	213	217	182	412	250	250	236	236	230	235	209	213	197	207	209	195	198	165	170	175
Aa4394	14	429	429	137	165	187	199	184	412	256	256	236	246	230	235	209	213	197	207	209	195	198	165	170	175
Aa4395	14	427	431	137	137	205	221	182	412	253	256	236	240	230	230	209	213	197	209	195	195	198	170	170	170
Aa4396	14	427	431	139	139	201	213	182	412	253	271	264	264	230	230	201	205	207	207	195	198	170	170	170	175
Aa4397	14	431	431	137	137	213	231	182	412	253	253	260	260	225	205	213	195	201	207	195	195	198	165	170	175
Aa4398	14	431	431	135	135	201	205	182	412	253	256	236	236	230	235	205	213	197	197	197	195	198	165	170	175
Aa4399	14	431	431	137	137	201	219	182	412	253	256	236	236	230	205	209	197	197	197	195	195	195	165	170	175
Aa4400	14	431	431	125	125	201	205	182	412	244	250	248	248	235	235	213	213	207	207	195	195	195	165	170	175
Aa4401	14	429	431	137	137	197	217	188	412	250	250	230	264	230	230	209	213	191	191	201	201	198	170	170	175
Aa4402	14	431	431	125	125	201	231	182	412	253	236	236	236	235	201	213	207	207	195	198	198	170	170	170	175
Aa4403	14	429	429	155	165	165	213	182	412	250	256	238	238	230	205	213	207	209	209	195	198	198	170	170	175
Aa4404	14	429	429	137	137	185	211	184	412	250	256	238	238	230	230	205	213	207	207	195	198	198	170	170	175
Aa4405	14	429	429	137	137	205	205	182	412	250	256	238	238	230	235	205	213	207	207	195	198	165	165	170	175
Aa4406	14	431	431	137	137	213	217	192	412	256	271	236	236	230	230	205	213	191	191	191	195	198	170	170	175
Aa4407	14	429	429	137	141	201	213	188	412	241	250	236	280	235	235	201	213	197	207	195	195	198	170	170	175
Aa4408	14	427	431	165	165	201	211	188	412	250	256	236	236	230	235	209	213	191	191	191	195	195	195	170	170
Aa4409	14	431	431	125	157	201	211	182	412	253	256	240	264	230	230	213	213	197	207	195	195	195	165	170	170
Aa4410	14	427	427	137	143	219	231	182	412	253	256	238	238	230	230	213	213	197	197	197	195	198	165	170	175
Aa4411	14	427	431	125	125	213	215	184	412	256	256	236	320	230	230	205	213	207	207	195	195	195	165	165	165
Aa4412	14	427	429	143	143	201	217	182	412	253	256	236	236	230	230	205	209	195	207	198	201	165	175	175	
Aa4413	14	431	431	137	137	201	201	192	412	250	250	236	248	230	230	213	213	191	197	195	198	185	185	185	
Aa4414	14	427	431	135	165	201	211	184	412	253	238	238	238	230	213	213	207	207	195	198	195	198	175	175	
Aa4415	14	427	431	133	133	223	231	182	412	259	259	236	240	230	201	213	191	209	209	195	198	198	170	175	
Aa4416	14	429	431	137	137	213	215	184	412	250	256	238	238	230	230	205	213	191	207	198	198	198	190	190	
Aa4417	14	431	431	137	137	182	211	182	412	250	256	238	238	230	230	205	213	191	207	198	198	198	190	190	
Aa4418	14	431	431	125	137	205	205	182	412	250	256	238	238	230	230	205	213	191	207	198	198	198	190	190	
Aa4419	14	429	431	137	137	217	223	186	412	250	256	236	238	230	230	213	213	191	191	195	195	195	190	190	
Aa4420	14	431	431	125	125	205	241	186	412	250	256	236	238	230	230	213	213	195	195	195	195	195	165	165	165
Aa4421	14	429	431	125	125	205	241	186	412	250	256	236	238	230	230	213	213	195	195	195	195	195	165	165	165
Aa4422	14	431	431	137	137	207	221	192	412	250	256	236	248	230	230	193	209	191	191	191	195	198	170	170	175
Aa4423	14	431	431	137	137	207	221	192	412	250	256	236	248	230	230	193	209	191	191	191	195	198	170	170	175
Aa4424	14	427	427	139	139	191	221	182	412	253	248	258	258	230	235	209	213	191	207	207	195	198	165	165	165
Aa4425	14	427	429	139	139	213	217	182	412	244	256	268	268	230	235	201	213	197	197	195	195	201	165	165	165
Aa4426	14	429	431	137	167	221	231	186	412	250	253	228	236	230	235	213	213	207	209	195	195	195	170	170	175
Aa4427	14	429	431	137	167	221	231	186	412	250	253	228	236	230	235	213	213	207	209	195	195	195	170	170	175
Aa4428	14	431	431	137	141	205	205	198	412	256	256	236	264	235	235	209	213	191	191	191	195	198	170	175	175
Aa4429	14	431	431	137	165	231	231	192	412	256	256	236	264	235	235	209	213	191	191	191	195	198	170	175	175
Aa4430	14	431	431	137	137	213	231	182	412	250	271	230	230	230	205	209	213	207	207	198	198	198	190	190	190
Aa4431	14	431	431	137	137	213	231	182	412	250	271	230	230	230	205	209	213	207	207	198	198	198	190	190	190
Aa4432	14	427	427	137	141	217	221	182	412	250	250	236	242	230	230	205	213	197	207	207	195	198	170	175	175
Aa4433	14	429	431	125	165	201	217	182	412	250	250	236	242	230	230	205	213	197	207	207	195	198	170	175	175
Aa4434	14	431	431	137	137	201	205	192	412	250	253	260	322	230	230	213	213	207	207	198	198	198	170	170	170
Aa4435	14	429	431	137	137	205	243	194	412	250	256	230	260	230	230	209	213	191	207	207	195	201	165	165	165
Aa4436	14	427	429	143	167	201	213	182	412	253	256	244	316	235	235	205	213	207	207	195	195	201	165	165	165
Aa4437	14	425	429	137	139	201	205	194	412	250	250	236	240	230	230	205	213	207	209	195	195	195	165	165	165
Aa4438	14	431	431	125	139	207	217	182	412	253	236	236	238	230	230	213	213	205	207	195	201	165	165	165	
Aa4439	14	429	431	133	139	213	217	192	412	256	256	236	238	230	230	205	213	191	191	191	195	204	175	185	185
Aa4440	14	427	429	169	169	211	211	186	412	250	253	264	264	230	230	201	209	207	207	195	195	195	165	165	165
Aa4441	14	427	427	125	125	201	213	182	412	253	256	240	248	230	230	205	213	191	193	193	195	195	165	165	165
Aa4442	14	427	431	153	153	201	211	192	412	256	256	236	248	230	230	205	213	191	193	193	195	195	165	165	165
Aa4443	14	429	431	137	137	183	187	182	412	250	256	238	238	230	230	205	213	207	209	195	198	198	170	170	175
Aa4444	14	427	4																						

Artículo 3

An evaluation of the genetic connectivity and temporal stability of the blue and red shrimp *Aristeus antennatus*: a case study of spawning female's grounds in the Western Mediterranean Sea.

Agulló M., Heras S., García-Marín J. L., Vera M., Abras A., Planella L., Roldán M. I. (2022) *Hydrobiologia*, 849: 2043–2055. doi.org/10.1007/s10750-022-04847-3.

An evaluation of the genetic connectivity and temporal stability of the blue and red shrimp *Aristeus antennatus*: a case study of spawning females' grounds in the Western Mediterranean Sea.

Hydrobiologia

Melania Agulló¹, Sandra Heras^{1*}, José-Luis García-Marín¹, Manuel Vera², Alba Abras¹, Laia Planella¹, María Inés Roldán¹

¹Laboratori d'Ictiologia Genètica, Universitat de Girona, Campus Montilivi, E-17003 Girona, Spain.

²Departamento de Zooloxía, Xenética e Antropoloxía Física, Campus Lugo, Universidade de Santiago de Compostela, E-27002 Lugo, Spain.

*Corresponding author: sandra.heras@udg.edu

This pdf file includes:

Supplementary Table S1

Supplementary Table S2

Supplementary Table S3

Supplementary Table S1 *P* value results for Tukey's multiple comparisons test comparing the cephalothorax length (CL) among the fourteen samples. In bold, significant *P* values at 0.05 level.

Sample code	PDS16	ROS16	PAL16	BLA16	VIG16	DEN16	SPO16	PDS17	ROS17	PAL17	BLA17	VIG17	DEN17
ROS16	< 0.0001												
PAL16	< 0.0001	< 0.0001											
BLA16	< 0.0001	< 0.0001	0.0002										
VIG16	0.0016	0.0009	< 0.0001	< 0.0001									
DEN16	< 0.0001	0.0178	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001								
SPO16	< 0.0001	< 0.0001	0.1674	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001							
PDS17	< 0.0001	0.9999	< 0.0001	< 0.0001	0.0002	0.0574	< 0.0001						
ROS17	< 0.0001	0.4012	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.9969	< 0.0001	0.6625					
PAL17	0.1550	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.9893	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001				
BLA17	0.5962	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0048	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001			
VIG17	< 0.0001	0.1093	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.9999	< 0.0001	0.2593	0.9999	< 0.0001	< 0.0001		
DEN17	0.3375	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.9251	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.9999	< 0.0001	< 0.0001	
SPO17	0.0986	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.9972	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.9999	< 0.0001	< 0.0001	0.9999

Supplementary Table S2 Genetic variability for 12 microsatellite loci in all samples.
 Number of genotyped individuals (n); number of alleles detected per locus (N_A); observed heterozygosity (H_o); expected heterozygosity (H_e); inbreeding coefficient (F_{is}) (* Significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium after Bonferroni correction); Null allele frequency (Nu).

Sample code	Aa123	Aa1255	Aa138	Aa1444	Aa496b	Aa667	Aa681	Aa751	Aa956	Aa1061	Aa1195	Aa818	Mean
PDS16	n	81	73	86	85	80	82	84	79	84	89	89	8.8
	N_A	5	13	19	12	2	8	17	3	9	5	6	0.465
	H_o	0.494	0.507	0.884	0.565	0.138	0.451	0.571	0.139	0.429	0.375	0.584	0.603
	H_e	0.574	0.724	0.911	0.750	0.129	0.689	0.736	0.237	0.665	0.670	0.624	0.613
	F_{is}	0.139	0.300*	0.030	0.247*	-0.068	0.345*	0.224	0.412	0.356*	0.440*	0.064	0.329*
PDS17	Nu	0.095	0.145	0.102	0.102	0.083	0.111	0.086	0.113	0.180	0.102	0.102	0.241*
	n	98	95	100	94	100	99	100	95	99	100	100	100
	N_A	5	16	20	12	2	6	19	2	6	8	4	6
	H_o	0.480	0.463	0.840	0.489	0.210	0.434	0.580	0.147	0.606	0.450	0.550	0.300
	H_e	0.621	0.797	0.914	0.779	0.189	0.683	0.791	0.222	0.637	0.682	0.586	0.674
ROS16	F_{is}	0.228	0.419*	0.080	0.372*	-0.112	0.364*	0.267*	0.337	0.340*	0.062	0.555*	0.266*
	Nu	0.077	0.174	0.150	0.150	0.166	0.110	0.056	0.127	0.127	0.221	0.221	0.221
	n	86	93	96	94	92	88	96	85	93	94	92	92
	N_A	5	13	17	9	2	8	18	3	6	3	6	6
	H_o	0.442	0.462	0.740	0.340	0.185	0.511	0.573	0.118	0.538	0.398	0.543	0.239
ROS16	H_e	0.622	0.733	0.903	0.755	0.169	0.697	0.807	0.235	0.656	0.733	0.603	0.635
	F_{is}	0.290	0.369*	0.181	0.549*	-0.096	0.267*	0.290*	0.499*	0.457*	0.100	0.635*	0.327*
	Nu	0.081	0.152	0.115	0.183	0.089	0.103	0.021	0.180	0.166	0.26	0.26	0.26

Sample code	Aa123	Aa1255	Aa138	Aa1444	Aa496b	Aa667	Aa681	Aa751	Aa956	Aa1061	Aa1195	Aa818	Mean	
ROS17	n	99	100	97	99	98	100	98	100	99	100	98		
	Na	6	12	12	2	6	18	3	6	9	5	6	8.8	
	H ₆	0.485	0.415	0.840	0.546	0.152	0.480	0.520	0.082	0.630	0.505	0.630	0.398	0.475
	H _e	0.638	0.768	0.913	0.733	0.141	0.697	0.840	0.170	0.671	0.687	0.590	0.688	0.628
	F _{is}	0.240*	0.460*	0.080	0.255*	-0.077	0.311*	0.381*	0.519*	0.062	0.265*	-0.069	0.421*	0.244*
PAL16	Nu	0.100	0.187	0.042	0.101	0.106	0.151	0.071		0.111		0.164		
	n	99	90	98	95	97	98	97	98	99	99	98		
	Na	4	16	20	12	2	8	20	3	6	7	5	6	9.1
	H ₆	0.434	0.500	0.847	0.505	0.155	0.453	0.694	0.134	0.531	0.414	0.657	0.347	0.473
	H _e	0.597	0.806	0.908	0.777	0.143	0.699	0.815	0.197	0.619	0.713	0.597	0.618	0.623
PAL17	F _{is}	0.273	0.380*	0.067	0.350*	0.353*	0.149	0.321	0.143	0.419*	-0.101	0.438*	0.241*	
	Nu	0.094	0.167	0.035	0.152	0.154	0.051		0.068	0.172		0.135		
	n	98	95	99	98	96	99	96	99	99	99	99	99	
	Na	5	17	21	10	2	6	17	2	6	7	3	5	8.4
	H ₆	0.510	0.411	0.899	0.439	0.184	0.469	0.636	0.135	0.626	0.505	0.556	0.364	0.479
BLA16	H _e	0.625	0.789	0.909	0.753	0.699	0.788	0.212	0.658	0.706	0.564	0.644	0.628	
	F _{is}	0.184	0.480*	0.011	0.417*	0.329*	0.192*	0.362	0.048	0.285*	0.015	0.435*	0.237*	
	Nu	0.068	0.207		0.166	0.133	0.082	0.054		0.122		0.144		
	n	96	89	96	90	95	94	91	96	89	86	85	85	
	Na	6	15	23	12	2	9	21	3	6	6	5	5	9.7
BLA16	H ₆	0.406	0.472	0.865	0.700	0.211	0.660	0.121	0.552	0.371	0.756	0.212	0.491	
	H _e	0.529	0.760	0.905	0.822	0.189	0.7586	0.271	0.654	0.677	0.638	0.553	0.623	
	F _{is}	0.231	0.379*	0.045	0.148	-0.112	0.235	0.130*	0.553*	0.156	-0.185	0.617*	0.211*	
	Nu	0.095	0.130		0.086	0.077	0.059	0.131		0.065		0.233		

Sample code	Aa123	Aa1255	Aa138	Aa1444	Aa496b	Aa667	Aa681	Aa751	Aa956	Aa1061	Aa1195	Aa818	Mean	
BLA17	n	97	100	97	99	100	100	99	100	100	100	100		
	Na	5	16	22	13	8	23	3	6	8	6	5	9.8	
	H ₀	0.525	0.464	0.810	0.598	0.141	0.440	0.630	0.172	0.520	0.460	0.660	0.330	0.479
	H _e	0.624	0.774	0.909	0.789	0.149	0.678	0.795	0.303	0.652	0.692	0.625	0.610	0.633
	F _{is}	0.159	0.401*	0.109	0.242*	0.053	0.351*	0.208*	0.434*	0.202	0.335*	-0.055	0.459*	0.243*
	Nu	0.072	0.175	0.050	0.108	0.149	0.149	0.095	0.109	0.075	0.130		0.174	
		60	76	75	72	72	66	77	69	74	75	77	74	
VIG16	n	4	14	18	13	6	19	3	6	8	3	6	8.5	
	Na	0.500	0.447	0.827	0.472	0.167	0.455	0.623	0.116	0.392	0.400	0.571	0.203	0.434
	H ₀	0.619	0.767	0.919	0.761	0.154	0.750	0.817	0.224	0.681	0.670	0.594	0.714	0.643
	H _e	0.193	0.416*	0.100	0.379*	-0.084	0.394*	0.237	0.482*	0.424*	0.403*	0.038	0.716*	0.325*
	F _{is}	0.077	0.214		0.135	0.141	0.141	0.103	0.089	0.139	0.170		0.306	
	Nu	100	95	100	98	100	99	100	98	100	100	100	98	
		4	15	24	14	2	8	22	3	6	7	6	6	9.8
VIG17	n	0.460	0.411	0.850	0.571	0.190	0.535	0.600	0.174	0.510	0.580	0.398	0.489	
	Na	0.606	0.776	0.901	0.763	0.205	0.716	0.815	0.347	0.677	0.606	0.661	0.644	
	H ₀	0.241	0.471*	0.056	0.252*	0.072	0.252	0.264*	0.501*	0.111	0.247*	0.043	0.398*	0.240*
	H _e	0.108	0.195		0.105	0.118	0.118	0.122	0.115	0.055	0.103		0.154	
	F _{is}	89	92	93	88	91	90	91	87	93	93	93	92	
	Nu	4	14	22	11	2	7	16	3	6	6	5	5	8.4
		0.405	0.424	0.828	0.477	0.110	0.478	0.495	0.126	0.602	0.387	0.667	0.337	0.447
DEN16	n	0.567	0.734	0.909	0.757	0.104	0.732	0.791	0.282	0.689	0.720	0.621	0.648	
	Na	0.287	0.422*	0.089	0.370*	-0.053	0.347*	0.375*	0.552*	0.126	0.463*	-0.074	0.480*	0.292*
	H ₀	0.117	0.167		0.152	0.136	0.136	0.139	0.108	0.198			0.163	
	H _e													
	F _{is}													
	Nu													

Sample code	Aa123	Aa1255	Aa138	Aa1444	Aa496b	Aa667	Aa681	Aa751	Aa956	Aa1061	Aa1195	Aa818	Mean	
DEN17	n	91	82	92	94	87	93	90	93	94	94	92		
	N _A	4	12	21	11	7	23	3	6	8	4	6	8.9	
	H _o	0.473	0.402	0.870	0.587	0.202	0.552	0.581	0.189	0.559	0.426	0.628	0.424	0.492
	H _e	0.623	0.756	0.900	0.785	0.200	0.687	0.779	0.324	0.663	0.722	0.607	0.671	0.642
	F _{is}	0.241	0.468*	0.034	0.253*	-0.013	0.197	0.255*	0.416*	0.157*	0.411*	-0.034	0.368*	0.234*
	N _u	0.075	0.194		0.103		0.070	0.095	0.112		0.171		0.160	
SPO16	n	99	99	100	98	99	100	95	100	100	100	99		
	N _A	4	13	22	12	8	21	3	6	7	5	5	9.0	
	H _o	0.485	0.485	0.880	0.561	0.110	0.525	0.690	0.074	0.560	0.460	0.590	0.404	0.487
	H _e	0.580	0.753	0.904	0.791	0.104	0.716	0.816	0.248	0.656	0.712	0.581	0.668	0.629
	F _{is}	0.165	0.356*	0.027	0.291*	-0.053	0.267*	0.154*	0.702*	0.147	0.354*	-0.015	0.395*	0.225*
	N _u		0.158		0.139		0.097	0.059	0.132	0.060	0.147		0.166	
SPO17	n	100	95	100	96	100	100	99	100	100	100	99		
	N _A	5	15	21	13	2	10	20	3	6	4	6	9.3	
	H _o	0.460	0.358	0.810	0.521	0.162	0.530	0.610	0.172	0.610	0.460	0.690	0.333	0.477
	H _e	0.627	0.721	0.899	0.810	0.183	0.723	0.809	0.244	0.676	0.719	0.591	0.642	0.637
	F _{is}	0.266	0.504*	0.099	0.357*	0.115	0.267*	0.246*	0.297	0.098	0.360*	-0.168	0.481*	0.251*
	N _u	0.101	0.206	0.038	0.149		0.109	0.111	0.046		0.145		0.175	

Supplementary Table S3 Pairwise F_{ST} and P values between summer collections for the seven locations.

2016 vs 2017	Port de la Selva	Roses	Palamós	Bianes	Vilanova i la Geltrú	Dénia	Santa Pola
F_{ST} value	-0.0013	0.0004	-0.0006	-0.0001	-0.0039	-0.0013	-0.0007
P	0.941	0.671	0.862	0.728	0.999	0.954	0.903

