

TRABAJO FIN DE GRADO

BIOLOGÍA

Caracterización Genética de las Poblaciones de Merluzas Negras mediante Herramientas Moleculares



Jorge Rodríguez Roche

Dpto. de Biología Funcional

Febrero/2023



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA



Resumen

El principal objetivo de este proyecto busca llevar a cabo la caracterización genética de dos especies pisciformes marinas pertenecientes al género *Merluccius* (*Merluccius polli* y *Merluccius senegalensis*), las cuales son objeto de explotación comercial para el consumo humano.

Estas dos especies comúnmente conocidas como “merluzas negras”, aunque aún muy desconocidas, son explotadas como un solo *stock* y sin tener en cuenta el estado de vulnerabilidad de *M. senegalensis* según datos de la IUCN. Su análisis molecular entorno a la costa noroeste africana, donde ambas especies solapan su rango de distribución, arrojaría luz sobre la estructuración genética inter- e intraespecífica que presentan, pudiendo determinar si existen o no varias unidades evolutivamente significativas (UES) y/o unidades de manejo (UMAs) independientes, y cómo los errores de etiquetado y la pesca no regulada están afectando a estos animales. Por otra parte, ya han sido reportados casos de hibridación entre especies del género, abriendo la posibilidad de que ocurra también entre las dos especies estudiadas y siendo otro de los objetivos la detección de estos fenómenos si se diesen.

Para la consecución de los objetivos se desarrolló un marcador genético mitocondrial especie-específico que permitiese la identificación de los individuos de forma sencilla y fácilmente reproducible (pudiendo ser implementado para la detección de errores de etiquetado o fraude alimentario). Una vez clasificadas por especies y poblaciones se efectuó su análisis genético-poblacional mediante el estudio y caracterización de un gran número de marcadores moleculares SNP empleando herramientas bioinformáticas. Estos podrían ser de utilidad en futuros trabajos, tanto relacionados con estas dos especies como con otras del género. Además, las muestras analizadas pertenecen tanto a individuos capturados en la actualidad como hace dos décadas dentro del área de muestreo, lo cual permitirá analizar su evolución a lo largo del primer cuarto del siglo XXI a nivel espacio-temporal.

Abstract

The main goal of the following project aims to perform the genetic characterization of two fish-like marine species belonging to *Merluccius* genus (*Merluccius polli* and *Merluccius senegalensis*), which are object of commercial exploitation for human consumption.

This species commonly known as “black hakes” (although they are still mainly unknown) are being exploited as only one stock, not taking in account the vulnerability conservation status of *M. senegalensis* based on IUCN data. A molecular analysis of this species over the northwestern African coasts (where their distribution overlaps) would bring light to their inter- and intraspecific genetic structure, determining the existence or non-existence of more than one evolutionary significant unit (ESU) and/or independent management units (MUs), and how mislabeling and unregulated fishing are affecting these animals. On the other hand, hybridization cases between species from this genus have been already reported, giving the chance to this phenomenon taking place on the studied species and being their detection (if they took place) one of the goals of this project.

In order to achieve the established goals a highly reproducible mitochondrial species-specific molecular marker that allowed an easy identification of the individuals of the two species was developed (may being implemented for detection of mislabeling and food fraud). Once classified by species and populations we proceeded to their genetic analysis by the study and characterization of a high number of SNP molecular markers by using bioinformatic tools. These could be useful in future works, both related with this species or any other from their genus. In addition, all analyzed samples belong to individuals captured inside the sampling area in the present and two decades ago, which will allow the analysis of their evolution in space and time over the first quarter of the 21st century.

Declaración de Originalidad

Como autor del presente informe, yo, Jorge Rodríguez Roche, declaro que este ha sido elaborado de forma lícita utilizando para ello los recursos obtenidos durante el desarrollo del proyecto, así como diferentes fuentes bibliográficas que aparecen citadas a lo largo del documento y recogidas en su conjunto en la sección de referencias.

Esta obra constituye por tanto un documento original, asociado al proyecto de investigación realizado en el departamento de Genética y Biología Funcional de la Universidad de Oviedo.

Edo.: Jorge Rodríguez Roche

a 6 de febrero del 2023

Acrónimos y Abreviaturas

- A: Adenina
- ADN: Ácido Desoxirribonucleico
- ADNg: ADN genómico
- ADNmt: ADN mitocondrial
- BAM: *Binary Alignment Map*
- BWA: *Burrows-Wheeler Alignment*
- C: Citosina
- DE: Desviación Estándar
- ddRADseq: *double digested Restriction site Associated DNA sequencing*
- UES: Unidades Evolutivamente Significativas
- FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
- G: Guanina
- HW: Equilibrio de Hardy-Weinberg
- INDNR: pesca ilegal, No Declarada y No Regulada
- MAF: *Minimum Allele Frequency*
- MEGA: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*
- MUSCLE: *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*
- MSC: *Marine Stewardship Council*
- NGS: *Next Generation Sequencing*
- PCR: *Polymerase Chain Reaction*
- PM: Peso Molecular
- RC: Región Control
- RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*
- SAM: *Sequence Alignment Map*
- SNP: *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo a nivel de Nucleótido Simple)
- mtSNP: SNP mitocondrial
- T: Timina
- IUCN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN)
- UMA: Unidad de Manejo

Índice

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS	6
MATERIALES Y MÉTODOS	6
MUESTREO	7
DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR ESPECIE-ESPECÍFICA: PCR-RFLP	8
<i>Análisis in silico de la Región Control Mitocondrial entre Ambas Especies.....</i>	<i>8</i>
<i>Reproducción in vitro del Análisis Computacional de la Región Control Mitocondrial</i>	<i>9</i>
ANÁLISIS DEL PATRÓN DE DIFERENCIACIÓN GENÉTICO-POBLACIONAL INTRA- E INTERESPECÍFICO: DDRADSEQ	10
<i>Extracción, Visualización y Cuantificación del ADN genómico.....</i>	<i>10</i>
<i>Preparación de la Librería Genómica.....</i>	<i>11</i>
<i>Enriquecimiento, Visualización y Limpieza de los fragmentos ddRAD.....</i>	<i>12</i>
<i>Secuenciación NGS.....</i>	<i>13</i>
<i>Análisis de los Resultados</i>	<i>13</i>
RESULTADOS.....	15
DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR ESPECIE-ESPECÍFICA: PCR-RFLP	15
<i>Análisis in silico de la Región Control Mitocondrial entre Ambas Especies.....</i>	<i>15</i>
<i>Reproducción in vitro del Análisis Computacional de la Región Control Mitocondrial</i>	<i>16</i>
ANÁLISIS DEL PATRÓN DE DIFERENCIACIÓN GENÉTICO-POBLACIONAL INTRA E INTERESPECÍFICO: DDRADSEQ.....	16
<i>Análisis de los Resultados</i>	<i>16</i>
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	23
REFERENCIAS	23
ANEXO	I

Introducción

Desde sus inicios muchas sociedades han llevado a cabo un uso indiscriminado de los recursos naturales presentes en el planeta, en su mayoría de carácter no renovable o con tasas muy bajas (Janssen & Scheffer, 2004). La persistencia de dicha situación sumada al constante incremento de la población mundial ha conducido al colapso de la mayor parte de los ecosistemas al ser múltiples los casos en los que la explotación de recursos se realiza muy por encima de valores sostenibles (McNeill, 2003; Shakouri et al., 2010), imposibilitando su recuperación y degradando el medio natural a menudo de forma irreversible (Tsur & Zemel, 1995). La sobreexplotación no solo afecta al entorno, también ejerce una influencia directa sobre el ser humano. Es uno de los factores clave que en el pasado condujeron a la desaparición de numerosas civilizaciones (Janssen & Scheffer, 2004) y tras miles de años continúa siendo una de las principales causas del declive de las sociedades modernas (Lampert, 2019), ya que en mayor o menor medida dependemos del medio para subsistir (alimentación, calidad ambiental, fuentes de energía...) (Barbier, 2005; Thellbro, 2006). Uno de los entornos que más afectado se ve por las perturbaciones antrópicas es el medio marino, encontrándose entre los ecosistemas más deteriorados del planeta. Si bien la contaminación es una de las más dañinas (Fleeger et al., 2003; Hylland, 2006), es la sobreexplotación la que mayor impacto genera (Jackson et al., 2001; Scheffer et al., 2005). Y es que diversas son las regiones que históricamente han basado su crecimiento económico en la extracción descontrolada de recursos marinos (Srinivasan et al., 2010; Zhong, 2019), sin tener a menudo en cuenta los impactos generados durante el proceso. Solo desde la década de los 50 el consumo global de pescado salvaje ha llegado casi a cuadruplicar sus cifras, experimentando un crecimiento ininterrumpido (FAO, 2021). Actualmente alimenta a cerca de 3,3 billones de personas (Steadman et al., 2021) requiriendo para ello de ingentes cantidades de animales.

Con el fin de suministrar el volumen necesario en cada momento de la historia, el arte de la pesca ha requerido de nuevas técnicas adaptadas a los requerimientos de cada situación, hasta llegar a las que buscan extraer la mayor cantidad de individuos posible empleando tiempo y esfuerzo mínimos. Una de las que más éxito ha tenido en este fin es la pesca de arrastre (Sahrhage & Lundbeck, 1992), cuya industrialización tuvo lugar a finales del siglo XIX. Ya en la época no pasaron desapercibidas ni su destructividad hacia los fondos oceánicos (Maínez, 2021) ni la indiscriminación de las especies capturadas (fenómeno conocido como *bycatch*), lo que provoca a menudo un aumento en la mortalidad de diferentes grupos amenazados asociado a la pesca de especies de interés comercial (Moore et al., 2013) (trascendiendo más allá de la mera regulación del sector). El uso irracional de esta técnica surte efectos devastadores en los ecosistemas, ya que al reducir drásticamente el número de individuos de una especie se desencadenan efectos globales a un ritmo que no permite la adaptación de otras especies animales y vegetales a los cambios generados, llegando a peligrar su propia conservación (Coleman & Williams, 2002; Kappel, 2005). Sin embargo, la regulación de las tasas y una educación adecuada pueden marcar la diferencia y lograr pesquerías de arrastre sostenibles, como han demostrado las pesquerías sudafricanas de merluzas del cabo (*Merluccius capensis*) certificadas con la etiqueta azul (MSC, 2016).

La pesca de arrastre es actualmente responsable del 26% de las capturas globales (SADSTIA, 2017; Steadman et al., 2021), lo que se traduce en cerca de 19 millones de toneladas (t) de peces e invertebrados marinos comercializados cada año (Amoroso et al., 2018). Un problema habitual de esta técnica se da cuando la especie objetivo comparte rango de distribución con otras fenotípicamente similares a ella, lo que provoca su explotación conjunta por pesquerías mixtas (Alheit & Pitcher, 1995). Sin embargo, existe un problema aún mayor que afecta globalmente al sector y a diversos grupos de organismos, los errores de etiquetado o *mislabeling* (Luque & Donlan, 2019). El acto de identificar erróneamente una especie objeto de consumo como otra distinta tiene graves consecuencias sobre el medio marino, como la de enmascarar la pesca ilegal, no declarada y no regulada (pesca INDNR) que se extiende muchas veces hacia especies amenazadas introducidas bajo el comercio de otras especies, creando una falsa sensación de sostenibilidad (Stawitz et al., 2017) y repercutiendo a su vez sobre otros niveles de la red trófica (Coll et al., 2008). Ya se trate de casos accidentales que pueden llegar a suponer pérdidas millonarias (Ardura et al., 2010) o deliberados para obtener un beneficio ilícito a costa de defraudar al consumidor (Barbuto et al., 2010; Blanco-Fernandez et al., 2021a; Hu et al., 2018), los estudios indican que el *mislabeling* es más que habitual en el comercio de especies marinas (Blanco-Fernandez et al., 2021b; Buck, 2010), dándose a todos los niveles de su cadena de producción (Fox et al., 2018) y llegando en ocasiones a superar el 30% del comercio mundial (Barendse et al., 2019). Queda por tanto patente cómo el desarrollo de políticas y leyes que regulen el manejo de especies a todos los niveles es imprescindible para el control de su situación y la protección de sus poblaciones tanto nacional como internacionalmente (Beslier, 2009).

Nuestro estudio se centra en dos especies de teleósteos marinos, *Merluccius. polli* (“Merluza de Benguela”) y *Merluccius senegalensis* (“Merluza del Senegal”), que comparten género con otras 10 especies distribuidas a lo largo de los océanos Atlántico y Pacífico (**Fig. 1**) y conforman además el grupo comúnmente conocido como “merluzas negras” (por el oscuro color de su mucosa oral). Los integrantes del género *Merluccius* surgieron con la aparición de la cuenca oceánica atlántica (hace entre 40 y 30 m.a.), un proceso de especiación alopátrida por vicarianza, generándose un clado americano y otro eurasiático (Campo et al., 2007; Quinteiro et al., 2000). Las 12 especies habitan capas de agua comprendidas entre la superficie y el límite inferior de la zona mesopelágica (≈ 1.000 m), considerándose peces demersales aunque la mayor parte del tiempo frecuenten profundidades de entre 100-650 m a lo largo de la plataforma y talud continentales (Alheit & Pitcher, 1995; Lloris et al., 2005). Debido a su ecología estos animales son explotados mediante arrastre (MAgrAMA, 2016), pasando sus capturas de las apenas $3,75 \times 10^5$ t anuales en los años 50 a cerca de 2,2 millones en tan solo dos décadas, y rondando los 1,2 millones anuales a finales de los 90 (Lloris et al., 2005). El grupo que engloba a las merluzas (Gadiformes) es uno de los más explotados del mundo, y sustenta por tanto gran parte de la alimentación humana (en 2013-2019 las capturas reportadas rondaron de media 6,75 millones de t anuales, aproximadamente 8.388 millones de dólares, frente a las apenas 1.500 t del sector acuícola) (FAO, 2021). A ello se suma el hecho de que es además el que mayor tasa de error de etiquetado presenta, encontrándose la familia *Merluccidae* entre las

cinco más defraudadas (Luque & Donlan, 2019) dada la semejanza fenotípica entre especies y su habitual venta como filetes y otros procesados (Machado-Schiaffino et al., 2008).

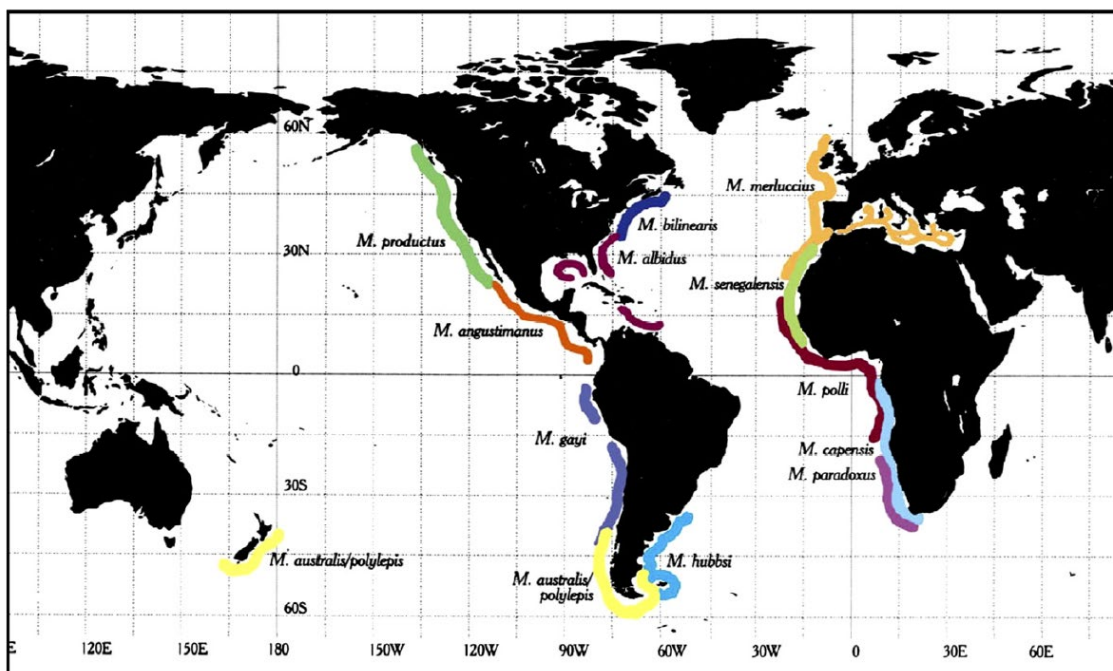


Figura 1. Mapa de la distribución geográfica de las 12 especies conocidas del género *Merluccius* (obtenida de Campo et al. (2007)).

Cerca de dos tercios de la explotación mundial de merluzas tiene lugar en el Atlántico, donde en 2012-2014 se registró un 64% de las capturas (MAgrAMA, 2016), y la UE es con diferencia la región con mayor tasa de importación pesquera de países del Noroeste africano siendo el destino de alrededor del 60% de sus exportaciones y del 39% del resto de países de la zona occidental del continente (FAO, 2021). Estas naciones situadas en el rango de distribución de *M. polli* y *M. senegalensis* las explotan activamente (Ba, 2019), lo que sumado a lo anterior involucra directamente a la UE en el estudio de las especies explotadas y la regulación de su comercio, y a España en particular al ser el principal país consumidor de merluzas a nivel europeo con el 59% del total y un 51% de las importaciones en 2018 (Ratheb & Mansilla, 2019). Además, dada la estacionalidad de la merluza europea *M. merluccius* (principal especie consumida en nuestro país) parte de la explotación la constituyen otras 8 especies, algunas procedentes de la costa noroeste-africana (Fernández-Peralta et al., 2017; MAgrAMA, 2016) y ya se han detectado casos de error de etiquetado (*mislabeling*) por introducción fraudulenta de las mismas en España y en otros mercados europeos (García-Vázquez et al., 2011).

Un factor que potencia este problema es que los rangos de distribución geográfica de las especies de este género habitualmente solapan en sus extremos (Campo et al., 2007), lo que provoca su explotación en dichas zonas como un solo *stock* a manos de pesquerías mixtas (MAgrAMA, 2016). *Merluccius polli* y *M. senegalensis* comparten parte importante de su rango, concretamente 1.400 km de costa comprendida entre el Sáhara Occidental y Guinea-Bissau (10°-22° N; zonas FAO 1.3 y 3.1), y no solo lo hacen latitudinalmente, también solapan verticalmente a profundidades de entre 80 y 700 m (Fernández-Peralta

et al., 2017; Lloris et al., 2005). Por ello, y dada su semejanza fenotípica, estas dos especies son habitualmente confundidas por los pescadores más habituados a faenarlas hasta en un 31,5% de las veces (Blanco-Fernandez et al., 2022). No debemos olvidar que mientras *M. polli* goza de un estado de preocupación menor (LC), *M. senegalensis* es una especie clasificada como amenazada (EN) según datos de la IUCN (Iwamoto, 2015) y que requiere de una regulación mayor que la actual. Un estudio realizado por Stawitz et al. (2017) determinó una correlación inversa entre el volumen de explotación de diferentes especies y su tasa de *mislabeing*. Por lo tanto, y teniendo en cuenta las reducidas tasas de extracción de las dos especies objeto de estudio con respecto a otras del género (Ba, 2019), su error de etiquetado podría ser mayor que en el caso de otras especies más explotadas (y por tanto controladas), lo que sumado a su pesca conjunta estaría acrecentando la gravedad de la situación al camuflar las capturas de merluzas negras entre sí y entre las de otras especies altamente comercializadas.

Por otra parte, la urgencia de implementar un mayor control sobre la extracción y etiquetado de estos animales se apoya en la existencia de casos en los que se han detectado evidencias de hibridación entre varias especies del género en regiones solapantes de sus rangos de distribución. Concretamente en la costa atlántica norteamericana (*M. albidus* y *M. bilinearis*) (Machado-Schiaffino et al., 2010) y las costas de Namibia y Sudáfrica (*M. capensis* y *M. paradoxus*) (Henriques et al., 2016; Miralles et al., 2014), fenómeno que ocurre entre especies que, a diferencia de lo que cabría esperar, no son filogenéticamente hablando las más cercanas (Campo et al., 2007)). Este hecho abre la posibilidad a que dicha situación se esté dando también entre las dos especies analizadas, en las cuales la existencia de híbridos aún no ha sido reportada. Tanto las diferencias que muestran en sus estados de conservación, lo que propicia su explotación diferencial, como el posible impacto que el *mislabeing* genera sobre ellas hacen que estos animales se enfrenten a un cambio global de sus condiciones de vida a nivel climático y sociológico. En respuesta a dichos cambios sus distribuciones podrían verse alteradas, desplazándose hacia latitudes más altas por las temperaturas e incrementando así el contacto secundario entre especies cercanas que potencialmente pueden ver aumentadas sus tasas de hibridación. Si así fuese, dichos individuos podrían llegar a suponer una fuente adicional de variación genética que contribuyese en su adaptación a las cambiantes condiciones de nuestro planeta (Seehausen, 2004) y en la recuperación de las poblaciones de *M. senegalensis*. Aunque, por otra parte, este fenómeno podría desembocar en el colapso de *M. senegalensis* (la más amenazada) dentro de *M. polli*, la aparición de una tercera especie híbrida en su zona de contacto o incluso en la fusión de ambas especies dentro de una tercera (Gilman & Behm, 2011).

Para proteger estos recursos y garantizar la sostenibilidad del sector pesquero es necesario el diseño de planes y programas basados en el conocimiento de la especie, lo cual requiere del análisis previo de su biología y de la estructura y estado de sus poblaciones. Dicha tarea se hace especialmente difícil en lo referido a los ecosistemas marinos, ya que tanto la ecología de sus especies como la propia naturaleza del hábitat que ocupan dificultan el estudio directo de sus organismos (Lundy et al., 2000). Los avances científico-técnicos logrados a lo largo de la historia han permitido que en la actualidad dispongamos de una mayor comprensión de las bases moleculares de la vida y de sus procesos. Una de las herramientas más

importantes en Genética de poblaciones son los marcadores moleculares basados en ácidos nucleicos (Dejean, 2018; Grover & Sharma, 2016) ya que posibilitan el estudio de la variabilidad y diversidad de las especies a nivel genético, permitiendo obtener mejores estimas del estado de conservación de sus poblaciones que el basado simplemente en el número de individuos que las componen. Estos representan diferencias genéticas que van acumulándose en el genoma de los seres vivos y que permiten desde la identificación de individuos (Kowalczyk et al., 2018) hasta la caracterización de especies (Oliveira et al., 2021), grupos de organismos (Mishra et al., 2014) e incluso patrones de enfermedad (Nair et al., 2018). Dada como ya se vio la dificultad de estudiar los ecosistemas oceánicos, los marcadores moleculares constituyen una herramienta especialmente clave en el estudio de los organismos marinos (Burton, 2009; Wangensteen et al., 2018). Por dicho motivo se han empleado en este proyecto algunos de ellos para el análisis de la estructuración genético-poblacional de dos especies de merluzas para las cuales se desconoce su patrón de estructuración, y que aun así son objeto de explotación comercial. En concreto, se seleccionaron los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs) con el fin de identificar los individuos de ambas especies en el laboratorio a un coste reducido, y los polimorfismos a nivel de nucleótidos simples (SNPs) a lo largo del genoma para el posterior análisis de la estructuración genética y estado de sus poblaciones.

Los RFLPs son fragmentos resultantes de digerir un fragmento de ADN con enzimas de restricción, de forma que en función de las dianas de corte presentes para dichas enzimas en la secuencia se obtienen fragmentos de diversos tamaños (Dejean, 2018). Dado que a medida que divergen las especies las diferencias moleculares a nivel de secuencia presentes entre ellas aumentan, es probable que los patrones de corte resultantes de digerir algunas de sus secuencias sean diferenciales para *M. polli* y *M. senegalensis*. Dada la gran importancia de los genes mitocondriales por su regulación y mantenimiento del metabolismo oxidativo, la región control (RC) no codificante será la que permita acumular la suficiente variación como para discernir entre especies tras su digestión mediante endonucleasas de restricción de tipo II y posterior visualización de los patrones resultantes. Si bien recientemente se ha cuestionado la sensibilidad de los marcadores de la RC por no reflejar completamente la variación intra- poblacional (debido precisamente a que el número real de haplotipos queda enmascarado por la hipermutabilidad de la secuencia) (Verma et al., 2016), su finalidad en este caso será únicamente la identificación de los individuos ("*DNA barcoding*") habiendo sido ya demostrada la eficacia de la técnica PCR-RFLP en el estudio de diferentes especies del género *Merluccius* (Quinteiro et al., 2001). Si esta técnica se perfeccionase y adaptase al uso de campo podría no solo permitir la correcta identificación a bordo de los ejemplares extraídos, sino también la obtención de material genético con el que llevar a cabo nuevos estudios sobre el estado de conservación de estos animales y de sus poblaciones.

Los SNPs son cambios en la secuencia a nivel de un solo nucleótido, siendo altamente utilizados en la actualidad por el gran número de combinaciones posibles entre los mismos, la elevada cobertura del genoma que permiten, la posibilidad de encontrarlos a lo largo de toda su extensión e incluso ligados a determinados genes (Dejean, 2018). Por ello, serán los principales marcadores utilizados para el análisis

genético de estas especies, del estado de sus poblaciones y de la posible existencia de híbridos en áreas de solapamiento de sus rangos de distribución. La metodología RAD (*Restriction site Associated DNA*) diseñada por Miller et al. (2007), que se basa en el estudio de SNPs ligados a dianas de restricción enzimáticas, garantiza una distribución ubicua de estos marcadores a lo largo de los diferentes cromosomas (nucleares y mitocondriales), permitiendo su detección y análisis incluso en especies con un bajo grado de caracterización. La metodología RAD puede entonces combinarse con técnicas NGS (RADseq) para secuenciar marcadores próximos a estas dianas. Concretamente se utilizó la variante ddRADseq (*double-digest Restriction site Associated DNA sequencing*), diseñada por Peterson et al. (2012) y ampliamente utilizada en estudios genético-poblacionales (Rancilhac et al., 2019; Recknagel et al., 2018), detectándose en algunos de ellos casos de hibridación (Grant et al., 2022). Y es que, si bien la técnica RADseq reduce enormemente la complejidad del genoma, será la doble digestión (ddRADseq) la que aporte el grado de reducción suficiente como para permitir el manejo de tales cantidades de información manteniendo el máximo grado de resolución posible (siendo necesarios del orden de miles de marcadores dado el efecto homogeneizador producido sobre sus frecuencias alélicas en especies con elevada amplitud de movimiento como las del medio marino). Esta simplificación de los datos es un factor clave en cualquier estudio de genética de poblaciones ya que ayudará a establecer el estado genético de estas dos especies (así como la existencia o no de diferentes unidades de manejo (UMAs) o *stocks* que deban ser tratados de forma independiente) con una inversión racional de tiempo y recursos, y que permitirá además centrar un mayor esfuerzo en aquellos datos y fenómenos realmente relevantes.

Objetivos

El principal objetivo de este estudio es el análisis y caracterización genética de las dos especies de merluza negra, *M. polli* y *M. senegalensis*, que habitan el litoral atlántico del noroeste africano. Para la consecución de los objetivos del proyecto fue necesaria la implementación de diversas técnicas, comprendiendo el conjunto de los mismos:

- 1) Desarrollo de una técnica de identificación especie-específica rápida y fiable (con posibilidad de adaptación a la identificación de campo, o incluso a bordo).
- 2) Análisis espaciotemporal del patrón de estructuración genética de las merluzas negras en la costa noroeste africana a lo largo de las dos primeras décadas del siglo XXI.
- 3) Detección de posibles fenómenos de hibridación en regiones solapantes de sus rangos de distribución.

Materiales y Métodos

Se emplearon diferentes metodologías y técnicas analíticas, tanto moleculares como computacionales, seleccionadas en base a los objetivos de cada fase del estudio con el fin de obtener un óptimo rendimiento en cada una de ellas.

Muestreo

Para la realización de este proyecto se escogió una región en la cual se produjese el solapamiento del área de distribución geográfica de las dos especies objeto de estudio, zona en la cual se llevase a cabo la explotación conjunta de las mismas por pesquerías mixtas. Por ello, se seleccionó la franja costera comprendida entre Cabo Blanco (Mauritania) y la península de Cabo Verde (Dakar, Senegal) (**Fig. 2**), la cual engloba el límite Norte de la distribución de *M. polli*. Se analizaron un total de 78 individuos (45 *M. polli* y 33 *M. senegalensis*) de la zona pesquera FAO 34, correspondiente al área centro-oriental del océano Atlántico. Los ejemplares de ambas especies pueden clasificarse según su temporalidad en dos grupos definidos, 2019-2021 y 2000-2001.

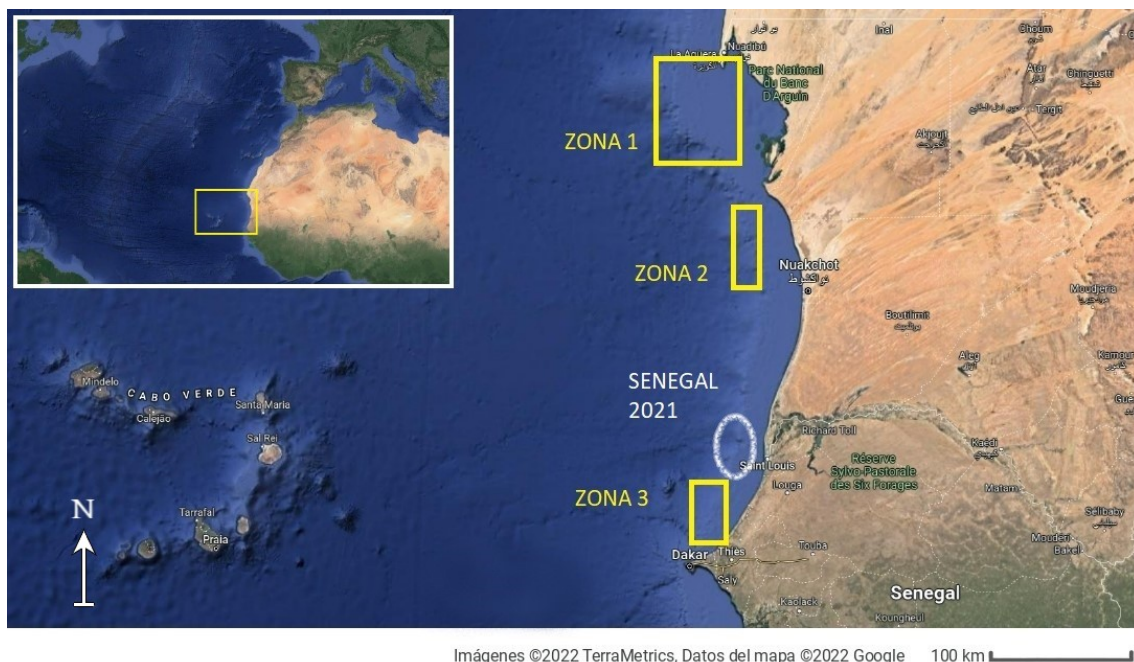


Figura 2. Zonas de pesca en las cuales fueron extraídos los individuos correspondientes al muestreo 2019-2021 de las costas de Mauritania y Senegal (amarillo) y de las proximidades de la desembocadura del río Senegal (blanco).

El primero de ellos lo constituye un conjunto de 58 muestras pertenecientes a individuos capturados entre el 2019 y el 2021 en cuatro áreas de muestreo (**Fig. 2**) repartidas entre las costas de Mauritania y Senegal. 47 de ellas (23 *M. polli* y 24 *M. senegalensis*) pertenecen a la colección de un estudio realizado por Blanco-Fernandez et al. (2022) (“estación Norte” o Zona 1, “estación Media” o Zona 2 y “estación Sur” o Zona 3. Los datos referentes a la localización geográfica de las tres estaciones de muestreo se encuentran recogidos en el **Anexo I**), mientras que las 11 muestras restantes (todas pertenecientes a *M. polli*) fueron faenadas mediante arrastre por una pesquería española el 25-10-2021 en la costa de Senegal próxima a la desembocadura del río homónimo (“Senegal 2021”).

El segundo grupo lo conforman un conjunto 20 muestras “históricas” conservadas en etanol absoluto (11 pertenecientes a la especie *M. polli* y 9 a *M. senegalensis*), procedentes de un muestreo realizado entre los años 2000-2001 en la costa senegalesa para el proyecto de la comisión europea MARINEGGS, coordinado por la Universidad de Oviedo (2000-2003).

La nomenclatura utilizada para la clasificación de los diferentes individuos que conforman el estudio se compone de tres parámetros: Especie (MP/MS), grupo de muestras (01-03, 0C, 0V), identificador numérico (01-83) (el grupo 0C equivale en *M. polli* al grupo 03 de *M. senegalensis*). (e.g. MP-01-04).

Desarrollo de una Técnica de Identificación Molecular Especie-Específica: PCR-RFLP

Las muestras de los ejemplares correspondientes a muestreos realizados en el 2021 requirieron de su identificación taxonómica previa al proceso de secuenciación con el fin de seleccionar el número adecuado de individuos de cada especie, lo cual supone un considerable ahorro en tiempo y recursos. Para ello se desarrolló un marcador molecular especie-específico fácilmente reproducible en el laboratorio, cuyo diseño se basó en aprovechar la divergencia genética a nivel de secuencia presente en la RC del ADN mitocondrial (ADNmt) de ambas especies de merluza negra. Por ello, se seleccionó una secuencia parcial de la RC en base a la elevada tasa de mutación que esta presenta frente al resto del genoma mitocondrial, habiendo sido ampliamente utilizada tanto en estudios genético-poblacionales (Sun et al., 2022; Zarei et al., 2023) como en la identificación de especies (Quinteiro et al., 2001) dada la acumulación de diferencias genéticas que permite y que son transmitidas a través de la línea materna (Boore, 1999; Ingman et al., 2000).

Una vez llevado a cabo el análisis de las diferencias a nivel de secuencias entre las RC de su ADNmt mediante herramientas bioinformáticas, este se combinó con la metodología PCR-RFLP extensamente utilizada en la identificación de diversos grupos de organismos (Cashner & Bart, 2010; Madeira et al., 2018), simulando virtualmente la digestión enzimática de una secuencia de cada especie con múltiples endonucleasas de restricción de tipo II. De esta forma, se seleccionó uno de los enzimas cuya diana de corte resultaba afectada para una de las especies con respecto a la otra por la aparición de un polimorfismo puntual diferencial, permitiendo por tanto discriminar entre ambas a nivel molecular.

Análisis *in silico* de la Región Control Mitocondrial entre Ambas Especies

El primer paso fue el análisis bioinformático de las RC de ambas especies con el fin de estudiar sus polimorfismos nucleotídicos mitocondriales (mtSNPs), para lo cual se partió de datos de secuenciación procedentes de un estudio previo realizado por Blanco-Fernandez et al. (2022). Se analizaron un total de 93 secuencias parciales de 275-450 pares de bases (pb) correspondientes al asa-D (“D-loop”) de la RC mitocondrial (60 pertenecientes a individuos *M. polli* y 33 a *M. senegalensis*, con representantes de distintas zonas geográficas en ambos casos). Estas 93 secuencias constituyen el conjunto de los distintos haplotipos identificados en dicho estudio de entre el total de 806 individuos analizados, siendo por tanto una buena representación de la variación potencialmente presente en el conjunto de individuos de las dos especies. Además, constituyen prácticamente la totalidad de secuencias RC disponibles para ambas en el repositorio de datos genéticos GenBank (*Accession numbers*: MZ703314-703406).

Para su análisis se empleó el software de alineamiento múltiple MUSCLE, a través del programa informático MEGA v11 (Tamura et al., 2021), mediante el cual se realizó el alineamiento de las secuencias y posterior recorte de sus extremos hasta alcanzar una longitud equivalente entre las mismas (304 pb). Los

datos obtenidos fueron exportados en formato FASTA para el análisis de sus polimorfismos mediante el software DNASP v6.12.03 (Rozas et al., 2017). Una vez identificados todos los puntos variables diferenciales a nivel de especies, se seleccionó un haplotipo representante de cada una (MZ703347 por *M. polli* y MZ703404 por *M. senegalensis*) para examinar la eficacia discriminatoria de los patrones RFLP resultantes de la digestión enzimática de sus secuencias. Su comprobación se realizó mediante un análisis *in silico* con diversas endonucleasas de restricción de tipo II empleando la herramienta bioinformática en base web *NEB CUTTER* v3.0 (Vincze et al., 2003). A partir de los resultados arrojados se seleccionó un enzima de entre aquellos cuya diana de corte resultaba afectada por algún mtSNP para una sola de las especies. Partiendo de este punto se inició la verificación experimental (*in vitro*) del análisis bioinformático mediante la digestión, con el enzima seleccionado, de una colección de muestras conocidas pertenecientes a representantes del género que habitan la costa este del Atlántico y que permitirá establecer un patrón RFLP de referencia para cada una de ellas.

Reproducción *in vitro* del Análisis Computacional de la Región Control Mitocondrial

- Extracción del ADN:

Se seleccionaron muestras conocidas de las tres especies del género cuyo rango de distribución comprende la zona geográfica de muestreo (*M. merluccius*, *M. polli* y *M. senegalensis*) y de una de las dos especies restantes que habitan el Este del Atlántico (e.g. *M. paradoxus*).

Dado que no se requería una gran integridad del ADN extraído se escogió la técnica de extracción directa Chelex® 100 (basada en el uso de resinas de intercambio catiónico), empleando para su procedimiento el protocolo diseñado por Estoup et al. (1996). Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de 500 µL de Chelex® 100 por tubo y muestra, a cada uno de los cuales se adicionaron el tejido correspondiente y 4,5 µL de la enzima proteinasa K (20 mg/ml, EURx®) para su incubación a 56°C durante al menos 1h (hasta considerar la adecuada disgregación tisular de las mismas, momento en el cual se ha de proceder a la desactivación de la enzima mediante un baño de 5' a 90°C).

- Amplificación y Visualización de la Región Control Mitocondrial:

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron mediante un termociclador modelo ABI 2720 Thermal Cycler, empleando para ello la pareja de oligonucleótidos *Mmer* HK 01 (F o *forward*) (5'-GGGGGGCCGACAGAGTTATA-3') y *Mmer* HK 02 (R o *reverse*) (5'-CCCGCTAGACTTGCTTACTAA-3'). Aunque estos oligonucleótidos anillan dentro de la RC mitocondrial, son aplicables al conjunto de representantes de este género dado el suficiente grado de conservación que la secuencia mantiene entre especies filogenéticamente relacionadas (García-Vázquez et al., 2012; Lundy et al., 2000). Cada reacción contenía 2 µL de ADN; 2 µL desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (2,5 µM, EURx®); 1 µL de cada cebador (F y R) a una concentración de 10 µM; 0,15 µL de DNApol GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (5 U/µL); 4 µL de 5x Green GoTaq® G2 Flexi Buffer; 1,2 µL de MgCl₂ (25 mM, Promega); y agua bidestilada (ddH₂O)

hasta un volumen final de 20 µL. Las condiciones de reacción establecidas fueron de 5' a 95°C para la fase inicial de desnaturalización; 35 ciclos de PCR de 1'30" (30" a 95°C para la fase de desnaturalización, 30" a una Tª de 55° para el anillamiento de los cebadores y 30" a 72° para la fase de elongación); y de 15' a 72° para la fase de elongación final.

Los productos de amplificación por PCR de cada muestra fueron cargados en geles de agarosa al 2% (TBE 1x) con el correspondiente volumen del agente intercalante SimplySafe™ (20.000x) para el marcaje de las bandas. Las condiciones de electroforesis fueron de 20' a 120 V. Los geles fueron visualizados bajo luz UV empleando un transiluminador Syngene modelo NuGenius (**Anexo II (a)**).

- Digestión Enzimática y Visualización de RFLPs:

El producto de PCR se empleó para la digestión enzimática de sus secuencias RC con la endonucleasa de restricción de tipo II seleccionada durante el análisis *in silico* (*BseGI*). Para ello, se tomaron 10 µL de producto de amplificación por muestra, a cada uno de los cuales se añadieron 20 µL de una mezcla de digestión compuesta por 2 µL de enzima *BseGI* (*BtsCI*) (10 U/ µL); 3 µL de tampón de digestión Thermo Scientific™ 10x Buffer Tango (*Thermo Fischer Scientific*); y 15 µL de ddH₂O. La incubación de las muestras se realizó durante 3h a 55°C empleando para ello un termociclador ABI 2720 Thermal Cycler.

Una vez finalizada la digestión, sus productos fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2% (TBE 1x) utilizando el correspondiente volumen de SimplySafe™ (20.000x) como agente intercalante para el revelado de las bandas. Se dispusieron además dos controles positivos para comprobar la correcta amplificación del ADN extraído (uno por especie, con ADN procedente de muestras conocidas para cada una de ellas). Las condiciones de electroforesis fueron de 30' a 120 V. Para su visualización se sometió el gel a una fuente de luz UV en un transiluminador Syngene modelo NuGenius (**Anexo II (b)**)

Análisis del Patrón de Diferenciación Genético-Poblacional Intra- e Interespecífico:

ddRADseq

El objetivo principal de este estudio es el análisis genético comparativo de ambas especies y de sus poblaciones. Por tanto, se empleó para su realización una técnica de reducción de la complejidad genómica que disminuye la cantidad de información producida, manteniendo un elevado grado de representación y resolución del mismo. Para ello se llevó a cabo la secuenciación y genotipado de un elevado número de SNPs distribuidos a lo largo del genoma de ambas especies empleando métodos de secuenciación masiva NGS. Una vez secuenciados, los fragmentos serán mapeados frente al genoma de referencia (*M. polli*) y sometidos a análisis bioinformáticos para el estudio de diferencias genéticas presentes a nivel de especies y de sus poblaciones.

Extracción, Visualización y Cuantificación del ADN genómico

Se seleccionó en este caso una técnica de extracción orgánica por precipitación mediante fenol-cloroformo (protocolo en **Anexo III**) para extraer material genético de alto peso molecular (PM).

Dada la importancia de obtener ADN genómico (ADNg) de alto PM fue necesario comprobar la integridad del mismo una vez extraído. Para ello, los productos de extracción fueron sometidos a electroforesis esperando obtener una banda de alto peso molecular si el ADN no se encontraba degradado. Los productos de extracción fueron cargados en geles de agarosa al 1,5% (TBE 1x) con 2,5 µL de agente intercalante SimplySafe™ (20.000x, EURx®), en los cuales se cargó además 4 µL del marcador de tamaños Perfect™ 100-1000 bp DNA Ladder (EURx®) en el primer pocillo de cada hilera. Las condiciones de electroforesis fueron de 20' a un voltaje de 120 V. Para su visualización se sometieron los geles a luz UV empleando un transiluminador Syngene NuGenius (**Anexo II (c)**). La cantidad de ADN presente en cada extracción se cuantificó utilizando un fluorómetro Qubit™ 4 (Invitrogen™).

Preparación de la Librería Genómica

Con el fin de preparar las diferentes muestras de ambas especies de merluza negra para su análisis y caracterización genética utilizando una plataforma NGS de Illumina se elaboró una librería genómica, compuesta por diferentes fragmentos distribuidos a lo largo de su genoma nuclear. Esta se llevó a cabo siguiendo un protocolo ddRADseq para secuenciadores Illumina modificado a partir de los protocolos descritos por Peterson et al. (2012) y Recknagel et al. (2015)(protocolo en el **Anexo IV**). De entre los fragmentos obtenidos se seleccionarán y secuenciarán aquellos de la longitud deseada empleando herramientas bioinformáticas y técnicas computacionales.

- Doble Digestión del ADN genómico, Purificación y Cuantificación:

El primer paso fue la digestión enzimática del ADNg de cada muestra (750 ng) con endonucleasas de restricción de tipo II. Para ello se utilizaron dos enzimas, uno de corte frecuente (*MspI*, que corta en secuencias 5'-C/CGG-3') y otro de corte infrecuente (*PstI*, que corta en secuencias 5'-CTGCA/G-3'). Tras ésta, se procedió a la purificación de los fragmentos resultantes mediante el kit comercial de extracción directa basada en la tecnología de columnas de sílice NucleoSpin® *Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel). Por último y dada la necesidad de añadir la misma cantidad de ADN para cada muestra se utilizó el fluorómetro Qubit™ 4 para cuantificar la concentración de cada una de ellas tras su purificación, ya que en esta suele perderse una cantidad importante del material genético, estableciendo un umbral de 10 ng/µL.

- Asignación y Ligación de Adaptadores: ddRAD-Tag

El siguiente paso fue la ligación de una serie de oligonucleótidos complementarios a los extremos cohesivos de los fragmentos de ADNg generados por ambas endonucleasas de tipo II. Cada uno de estos adaptadores (específicos de la plataforma NGS utilizada) contiene una secuencia identificadora, etiqueta o *barcode*, por lo que su combinación permite el tratamiento conjunto (multiplexado) de las muestras. Se partió de un conjunto de 22 adaptadores (16 del tipo P1 (≈40 pb) y 6 del tipo P2 (≈50-60 pb)) cuya asociación permite establecer un máximo de 96 posibles combinaciones, cada una de ellas asignada a un único individuo.

- Selección de Tamaños, Recuperación y Purificación de los fragmentos ddRAD:

El cálculo de la cobertura (*coverage*) de las diferentes secuencias para determinar la longitud de fragmentos a seleccionar más adecuada en base a los criterios deseados se realizó mediante un análisis bioinformático en el entorno de programación R v4.1.3 (R Core Team, 2022), empleando el paquete de software SIMRAD v0.96 (Lepais & Weir, 2014). Este simula una digestión *in silico* con los enzimas de restricción escogidos sobre el genoma de referencia de la especie seleccionada. De este modo, se estima la distribución por tamaño de los fragmentos generados al utilizar dichos enzimas permitiendo acotar su número en cada intervalo, dato que junto al número total de lecturas (*reads*) generadas por la plataforma de secuenciación permite calcular la cobertura de cada rango de tamaño de los fragmentos. En este caso se utilizó el genoma de *M. polli* para ambas especies ya que no hay un genoma disponible para *M. senegalensis*. Se seleccionó el rango de 200-400 pb, permitiendo una profundidad de secuenciación media para cada loci de 30x. Para la separación de los fragmentos en base a su tamaño se utilizó la electroforesis en gel de agarosa al 1% (TAE 1x) con SimplySafe™ (20.000x) como agente intercalante para el revelado de las bandas, y una vez finalizada se procedió a su visualización mediante luz UV empleando un transiluminador LKB Bromma 2011 Macrovue sobre el cual se recuperaron con un escalpelo aquellas bandas de interés (**Anexo II (d)**). A continuación, se procedió a purificar los fragmentos recuperados empleando el kit comercial de extracción directa basado en la tecnología de columnas de sílice GeneMATRIX Agarose Gel-Out DNA Purification Kit (EURx®). Con el fin de controlar las cantidades de ADN presentes en este punto y asegurar la recuperación de la cantidad necesaria de material genético, se llevó a cabo la cuantificación del mismo mediante el uso de un fluorómetro Qubit™ 4.

Enriquecimiento, Visualización y Limpieza de los fragmentos ddRAD

Fue necesario realizar un enriquecimiento con el máximo número de reacciones PCR en paralelo posibles de un volumen total de 10 µL empleando una ADN polimerasa (ADNpol) de alta especificidad. A diferencia de otros tipos de PCR, la de enriquecimiento ha de realizarse a un bajo número de ciclos de corta duración (en nuestro caso 15) con el fin de minimizar los errores generados por la ADNpol. De forma complementaria, se realizó una reacción adicional de 40 ciclos de PCR de 1 µL de ADN utilizando la misma mezcla de reactivos y condiciones de reacción que en las anteriores con el fin de comprobar la correcta amplificación de los fragmentos RAD de cara a la amplificación en puente que se realizará durante su secuenciación en la plataforma NGS Illumina. Para visualizar la correcta amplificación por PCR se realizó la electroforesis del conjunto de reacciones PCR en cadena y de la PCR de comprobación en un gel de agarosa al 1% (TAE 1x) con SimplySafe™ (20.000x) como agente intercalante. Una vez finalizada se compararon los diferentes amplicones bajo luz UV en un transiluminador Syngene NuGenius (**Anexo II (e)**).

Con el fin de eliminar cualquier contaminante presente en el resto del templado que constituirá la librería se procedió a su separación por electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (TAE 1x) con SimplySafe™ (20.000x) como agente intercalante, y al finalizar se procedió a recuperar los fragmentos de nuevo sobre

un transiluminador LKB Bromma 2011 Macrovue (**Anexo II (f)**) empleando un escalpelo y el kit comercial de extracción GeneMATRIX Agarose Gel-Out DNA Purification Kit (EURx®).

Secuenciación NGS

Las muestras fueron enviadas a la empresa biotecnológica Macrogen (Seúl) para su secuenciación, la cual se realizó utilizando un secuenciador de nueva generación Illumina modelo HiSeqX™ mediante la tecnología *Paired-End*, que permite la secuenciación en ambas direcciones. Para cada fragmento se secuenciaron 150 pb desde cada adaptador hacia el interior de la secuencia.

Análisis de los Resultados

Los resultados fueron recibidos como un archivo en formato FASTQ emitido por la plataforma de secuenciación Illumina (una versión del formato FASTA que incorpora además datos referentes a la calidad de medida de cada una de las bases (*basequality*) secuenciadas durante el proceso de detección (*basecalling*)). Esta información será necesaria para poder interpretar la fiabilidad de las lecturas resultantes ya que no todas se generarán con la misma exactitud, pudiendo aparecer errores inherentes al proceso de secuenciación que sean confundidos con una variable alélica o polimorfismo. Las lecturas de calidad adecuada serán analizadas empleando herramientas de software bioinformático para el estudio de los datos obtenidos.

- Demultiplexado, Filtrado por Calidad y Recorte de las Lecturas:

De forma previa al análisis de sus características fue necesario el demultiplexado o individualización del conjunto de secuencias contenidas en el fichero FASTQ según el identificador de sus adaptadores (en nuestro caso las muestras de los 78 individuos analizados), así como el descarte de lecturas de calidad de *basecalling* insuficiente para no comprometer los resultados del análisis (calculada mediante la *Phred score*, que establece para cada una de las bases la probabilidad de que haya sido secuenciada erróneamente). Para ello se empleó el programa PROCESS_RADTAGS de la *pipeline* de software en base Unix STACKS v2.62 (Catchen et al., 2013). Las lecturas se recortaron a un tamaño final de 130 pb. Posteriormente fueron filtradas según su calidad mediante barridos del 15% de su longitud ($w=0,15$), aproximadamente 20 pb ($s=20$), siendo descartadas aquellas secuencias cuya longitud media fuese inferior a dicho porcentaje.

- Mapeo de las Lecturas y Filtrado por Calidad de Mapeo:

El mapeo de las lecturas frente al genoma de referencia se realizó utilizando el software BWA v.0.7.1 (*Burrows-Wheeler Aligner*) (Li & Durbin, 2010). De esta forma, al comparar los fragmentos frente al mismo se adquiere la identidad de cada loci al conocerse para cada uno de ellos la posición exacta en el genoma.

Una vez alineadas las secuencias se procedió al filtrado de los archivos SAM (*Sequence Alignment Map*) obtenidos del alineamiento para cada secuencia, con el fin de retener solo aquellas completamente alineadas eliminando alineamientos parciales y/o múltiples (que podrían representar una posible secuencia

paróloga). Se filtraron aquellos alineamientos que no cumplían los requisitos (tamaño mínimo de 130 pb y calidad superior a 25, excluyendo alineamientos secundarios). Los archivos SAM fueron convertidos al formato BAM (*Binary Alignment Map*) ya que presenta un menor tamaño y facilita su procesado.

- Filtrado de los Marcadores Genéticos:

Se utilizó el programa REF_MAP.PL de la *pipeline* de software STACKS v2.62 (Catchen et al., 2013) para alinear de forma conjunta los archivos BAM de todas las secuencias frente al genoma de referencia, pero esta vez se crea un catálogo de referencia comparándolas también entre sí mismas para cada posición. Posteriormente se eliminaron mediante el programa POPULATIONS aquellos loci que no estuvieran representados en un número mínimo de individuos para cada población (75%), así como aquellos puntos *singleton* o no polimórficos al no resultar informativos (Frecuencia Alélica Mínima (MAF)=0,05).

- Análisis Genético:

Las estadísticas poblacionales correspondientes a los archivos de datos generados se analizaron a través del programa POPULATIONS de STACKS v2.62 en un sistema operativo Unix (criterios: $r=0,7$, $p=6$, $MAF=0,05$). Para cada uno de los loci se analizaron su índice de fijación F_{ST} y F_{IS} . Aquellos loci fuera del equilibrio Hardy-Weinberg (HW) fueron filtrados y se seleccionó al azar un solo SNP en caso de presentar más de uno por fragmento. Los datos fueron exportados en los formatos *genepop*, *phylip*, *structure* y *tsv*.

Se utilizó el programa STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard et al., 2000) para el análisis de las diferencias genéticas tanto a nivel interespecífico como interpoblacional. Se establecieron unos parámetros de longitud del *Burn-in* de 30.000 y 300.000 repeticiones de la Cadena de Markov de Monte Carlo (MCMC). Una vez finalizado el análisis, se utilizó el programa STRUCTURE HARVESTER v0.6.94 (Earl & vonHoldt, 2012) para determinar el número más probable de *clusters* genéticos (K valor).

Por otra parte, las relaciones entre los datos obtenidos de POPULATIONS fueron analizadas a través del entorno de software para computación estadística y graficado R v4.1.3 (R Core Team, 2022) mediante análisis de tipo AMOVA, PCA y de la frecuencia de los alelos en las poblaciones (índices F_{ST} , F_{IS} , H_e , H_o), para los cuales se utilizaron respectivamente los paquetes POPPR v2.9.3 (Kamvar et al., 2015), ADEGENET v2.1.8 (Jombart & Ahmed, 2011) y HIERFSTAT v0.5-11 (de Meeûs & Goudet, 2007). En la determinación del grado de diferenciación interpoblacional mediante AMOVA se utilizó el algoritmo *farthest neighbor* que calcula la distancia genética entre *clusters* durante su clasificación jerárquica, descartándose aquellos loci con más de un 5% de ausencia de datos (*cutoff* = 0,05) para evitar que esta generase valores erróneos en los análisis (la falta de datos podría ser interpretada como una falsa diferenciación genética entre poblaciones). En cuanto al análisis PCA, el graficado de los resultados se realizó utilizando el propio paquete ADEGENET para su representación bidimensional.

Para determinar la presencia de posibles fenómenos de hibridación se empleó el software NEW HYBRIDS v1.1 Beta3 (Anderson & Thompson, 2002), que analiza las frecuencias alélicas en busca de individuos en los que combinen loci característicos de ambas especies, estableciendo la probabilidad de

que estos correspondan a un híbrido F1, F2 o al retrocruzamiento (*backcross*) de los mismos. La conversión de los datos del formato *genepop* al formato *newhybrids* se realizó mediante el programa PGDSPIDER v2.1.1.5 (Lischer & Excoffier, 2012). NEW HYBRIDS v1.1 Beta3 soporta cantidades relativamente bajas de SNPs, por lo que se generaron subgrupos aleatorizados de 500 loci utilizando el paquete DARTR v2.7.2 (Mijangos et al., 2022) de R v4.1.3. Se introdujeron como referencia datos de individuos catalogados por este último como pertenecientes en un 100% a cada una de las especies parentales. Las condiciones de simulación establecidas fueron de 500.000 repeticiones MCMC con un 10% de *Burn-In Period* (50.000). Para representar los datos se utilizó el paquete HYBRIDDETECTIVE v0.1.0.9000 (Wringe et al., 2017) también del entorno de programación R v4.1.3.

Resultados

Desarrollo de una Técnica de Identificación Molecular Especie-Específica: PCR-RFLP

Análisis *in silico* de la Región Control Mitocondrial entre Ambas Especies

Tras su alineamiento con MUSCLE mediante el método UPGMA, la longitud máxima de secuencia seleccionada fue 304 pb. Tras el recorte de las mismas se escogió la secuencia representante de *M. senegalensis* (*Accession number*: MZ703404) como referencia del alineamiento al ser la que menor extensión presentaba en su extremo 5'. El análisis del mismo mediante DNASP v6.12.03 reveló un total de 41 polimorfismos para el conjunto de haplotipos, de entre los cuales 39 eran SNPs (14 *singleton* y 25 informativos en parsimonia). De los 24 puntos informativos en parsimonia con dos variantes se comprobó cuáles eran compartidos por al menos un 95% de los individuos de cada especie, seleccionándose 8 loci que cumplían dichas características (**Anexo V**). La digestión *in silico* de los haplotipos representantes de cada especie (MZ703347 para *M. polli* y MZ703404 para *M. senegalensis*) realizada con NEB CUTTER v3.0 reveló que el SNP presente en la posición 277 generaba un patrón de corte diferencial entre las mismas, ya que la diana de corte de la endonucleasa de tipo II *BseGI* (5'-GGATG-3') quedaba inhabilitada en *M. polli* un 96,8% de las veces por la transversión G-T (5'-TGATG-3') presentando solo un 1,6% de los haplotipos un patrón de corte propio de *M. senegalensis* (este haplotipo se vio representado tan solo por un individuo de entre el total de 806 analizados en el estudio realizado por Blanco-Fernandez et al., (2022), por lo que el porcentaje de error en la identificación de las especies es mínimo ($1,24 \times 10^{-3}\%$). El haplotipo restante, el otro 1,6%, presentaba ausencia de datos para esta posición.

Dada la presencia de otra diana de restricción 5'-GGATG-3' para la enzima en la posición 130 de ambas especies, el patrón RFLP resultante *in silico* para cada especie fue de dos fragmentos para la especie *M. polli* (126 y 178 pb) y de tres para *M. senegalensis* (126, 160 y 18 pb)(**Anexo VI**).

Reproducción *in vitro* del Análisis Computacional de la Región Control Mitochondrial

Se empleó la enzima *BseGI* (*BtsCI*) de *Thermo Fisher Scientific*, que corta en secuencias GGATG (2/0)[^] a una temperatura óptima de 55°C. La digestión enzimática *in vitro* se corroboró el patrón obtenido para cada especie en la simulación *in silico*. Tanto para *M. polli* como para *M. senegalensis* puede observarse una banda comprendida entre los 200-300 pb, resultado del corte en la primera diana 5'-GGATG-3' localizada en la posición 130 (**Fig. 3**). Esta banda presenta mayor intensidad en la especie *M. polli* al verse realmente representada por dos fragmentos de longitudes similares situadas en sendos lados de la diana. En cambio, la banda equivalente en *M. senegalensis* presenta una menor intensidad (representa solo un fragmento), ya que el fragmento restante fue digerido en dos bandas de entre 100-200 pb dejadas por la presencia de una segunda diana de restricción en la posición 277, surgida por la aparición de una guanina.

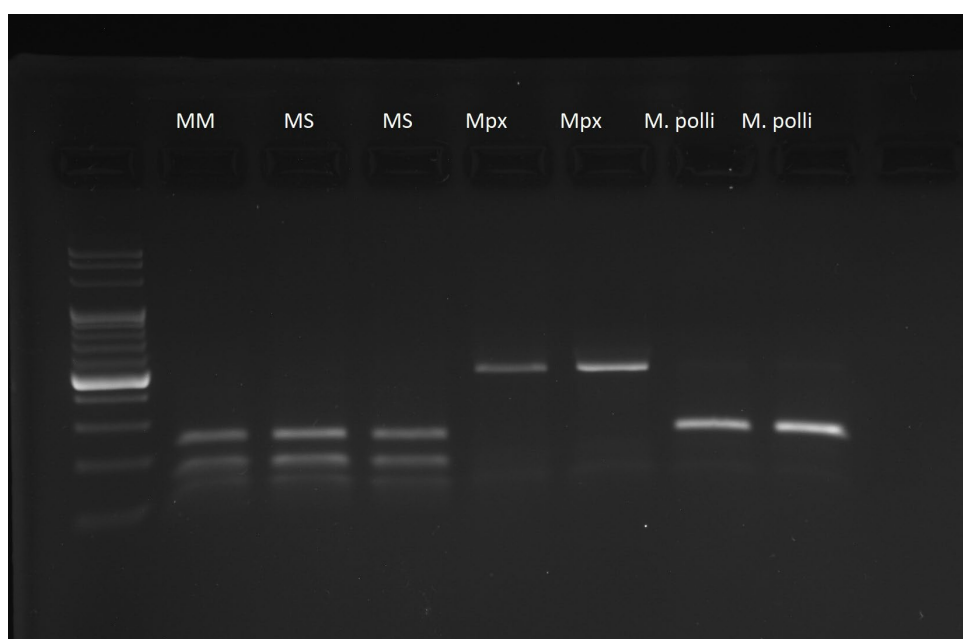


Figura 3. Patrones RFLP resultantes de digerir las secuencias parciales de la RC mitocondrial de las 4 especies seleccionadas con la enzima de restricción *BseGI* (MM=*Merluccius merluccius*, MS=*Merluccius senegalensis*, Mpx=*Merluccius paradoxus*, M.polli=*Merluccius polli*). Puede observarse como el patrón de dos bandas de *M. polli* se diferencia claramente del de tres bandas de *M. senegalensis*.

Análisis del Patrón de Diferenciación Genético-Poblacional Intra e Interespecífico: ddRADseq

Análisis de los Resultados

- Procesado, Mapeo y Filtrado de las Lecturas. Filtrado de Marcadores genéticos y Análisis Genético:

De la plataforma de secuenciación NGS se obtuvo un solo fichero FASTQ con un total de 691.658.092 lecturas (*reads*), de las cuales se retuvo un 90,5% (625.628.357) siendo descartado el 9,5% restante en base a criterios como: *barcode* no encontrado (25.873.700), calidad reducida ($Q < 20$) (33.130.768) y/o diana de corte RAD no encontrada (7.025.267). Se detectaron un total de 198.342 loci con una cobertura media

de 30,1x (DE=12,7x; mín.=5,5x; máx.=56,1x). Finalmente, de entre ellos se retuvieron 4.450 sitios variables tras el filtrado ($r=0,75$; $p=6$; $MAF=0,05$ y en equilibrio HW).

A nivel de especie el análisis genético con el paquete HIERFSTAT v0.5-11 de R v4.1.3. (resultados disponibles en **Anexo VII**) detectó valores de H_E y H_O que confirman un equilibrio de HW en los diferentes alelos del conjunto de loci analizados (**Tabla 3b y 3c**), seleccionados previamente en base a dicho criterio. Los valores del índice de fijación alélica F_{ST} (medida de la diferenciación entre grupos en base a su estructuración genética) indican una escasa divergencia entre individuos dentro de cada especie dada su elevada dispersión y el efecto homogeneizador de esta, mientras que el F_{IS} denota una buena diversidad genética para la especie *M. polli* con una muy baja tasa de consanguinidad (**Tabla 3b**) pero valores de endogamia de un orden de magnitud superior para los individuos de *M. senegalensis* (**Tabla 3c**). A nivel de poblaciones de ambas especies el índice F_{ST} observado denotó un elevado grado de diferenciación interespecífica, en comparación al escaso grado de diferenciación genética mostrado entre los grupos dentro de cada una de las especies (**Tabla 4a**). A nivel intraespecífico, los valores F_{ST} observados entre poblaciones fueron reducidos en ambos casos, aunque generalmente mayores para *M. polli* (**Tabla 4b**) que para *M. senegalensis* (**Tabla 4c**) denotando una muy leve estructuración poblacional entre los grupos de la primera suavizada por la dispersión de sus individuos (en *M. senegalensis* se observa una menor diferenciación genética, probablemente debida a la superior tasa de consanguinidad que presenta). Los valores intraespecíficos del coeficiente de consanguinidad (F_{IS}) entre poblaciones fueron bajos para *M. polli* siendo mayores en MP-0C (**Tabla 5a**), región en la cual parece que su coeficiente F_{IS} ha aumentado en tan solo unas pocas generaciones si lo comparamos con sus muestras históricas (MP-0V). La especie *M. senegalensis* presentó valores actuales de F_{IS} significativamente superiores a los de *M. polli*, sin embargo, la mayor consanguinidad mostrada en el grupo MS-0V (que duplica al resto) indica que en este caso la consanguinidad se ha visto reducida en unas pocas generaciones con respecto a la presente hace 20 años (**Tabla 5b**). Esta menor diferenciación genética entre los grupos de *M. senegalensis* analizados (con F_{ST} inferiores) podría guardar relación con la superior tasa de consanguinidad F_{IS} que presentan sus individuos, dado su estado de conservación y su rango de distribución geográfica más reducido.

En lo referente a la diferenciación espaciotemporal, no se observaron mayores diferencias a nivel genético entre muestras históricas y poblaciones actuales que las que pueden observarse hoy en día entre las mismas (**Tabla 4b y 4c**), reflejando el efecto homogeneizador de su dispersión que ha mantenido estable el flujo genético por lo menos durante las últimas 5 generaciones (20 años).

El análisis de tipo AMOVA combinado para ambas especies reveló una mayor diferenciación genética entre grupos de muestreo ($\approx 82\%$, $\phi=0,821$), mientras que la variación entre las poblaciones de cada especie no resultó significativamente distinta de cero. Para el conjunto de las 78 muestras estudiadas la variación entre individuos sí resultó significativa ($\approx 18\%$, $\phi=0,819$), pero baja en relación a la variación total. Los análisis intraespecíficos denotaron que a nivel de especies prácticamente toda la variación genética se encontraba entre el conjunto de muestras de individuos de cada una, siendo del 95,20% ($\phi=0,047$) para *M. senegalensis* y prácticamente del total para *M. polli*, frente a la mínima variación

mostrada entre sus poblaciones (del 0,16% ($\varphi=0,001$) para *M. polli* y 0,04% ($\varphi=0,047$) para *M. senegalensis*). El porcentaje de variación a nivel interno de cada población no fue significativamente distinta a cero para *M. polli*, mientras que para *M. senegalensis* fue del 4,76%.

Tabla 3b y 3c. Valores de heterocigosidad esperada y observada (H_E y H_o) e índices de fijación (F_{ST} y F_{IS}) para el conjunto de loci estudiados para la especie *M. polli* (MP) y para la especie *M. senegalensis* (MS).

MP	H_o	H_E	F_{ST}	F_{IS}
	0,2487	0,2472	0,0017	-0,0062

MS	H_o	H_E	F_{ST}	F_{IS}
	0,2341	0,2515	0,0018	0,0691

Tabla 4b y 4c. Valores F_{ST} entre poblaciones de *M. polli* (MP) y entre poblaciones de *M. senegalensis* (MS) respectivamente.

F_{ST}	MP-01	MP-02	MP-0C	MP-0V
MP-01		0,0006	0,0055	-0,0004
MP-02			0,0021	0,0034
MP-0C				0,0021

F_{ST}	MS-01	MS-02	MS-03	MS-0V
MS-01		-0,0002	0,0038	-0,0004
MS-02			-0,0005	-0,0029
MS-03				0,0015

Tabla 5a y 5b. Valores F_{IS} entre poblaciones de *M. polli* (MP) y entre poblaciones de *M. senegalensis* (MS).

F_{IS}	MP-01	MP-02	MP-0C	MP-0V
	-0,0416	-0,0503	0,0288	0,0198

F_{IS}	MS-01	MS-02	MS-03	MS-0V
	0,0571	0,0561	0,0574	0,1089

El análisis de componentes principales (PCA) realizado en R para el conjunto de individuos agrupado en *clusters* cercanos a aquellos pertenecientes a las poblaciones de cada especie, viéndose representada la gran mayoría de la variación en un solo eje (eje X) (**Fig. 4**). Si bien el eje Y parece mostrar cierta distancia entre los valores de muestras históricas con respecto a las actuales (como pudo observarse al analizar su F_{IS}), los *eigenvalues* revelan que esta variación no es significativa con respecto al eje X. Sin embargo, pueden observarse tres muestras situadas fuera de los *clusters* de los grupos MP-01 y MP-02 de *M. polli* (muestras comprendidas dentro del triángulo) que podrían corresponder a individuos descendientes de híbridos F_1 en introgresión hacia poblaciones de *M. polli* por retrocruzamiento. Para estas tres muestras se observa que su posición es cercana a los *clusters* de dicha especie, pero que se encuentran desplazados en dirección al punto medio entre *M. polli* y *M. senegalensis*.

Los datos arrojados por los análisis llevados a cabo en STRUCTURE v2.3.4 fueron procesados mediante STRUCTURE HARVESTER v0.6.94, el cual determinó para el conjunto de ambas especies (los 78 individuos) un valor óptimo de dos *clusters* genéticos ($K=2$, Delta $K = 15.100$) diferenciando claramente entre ambas, como era de esperar. En el caso del análisis genético-poblacional individualizado por especies el programa determinó un valor más probable de tres *clusters* genéticos ($K= 3$, Delta $K =38,49$) para poblaciones *M. polli* y de dos *clusters* genéticos ($K=2$, Delta $K = 3,4$) para *M. senegalensis* (**Anexo VIII**), los cuales podrían atribuirse a subgrupos de individuos de cada especie que muestran introgresión de la otra frente a aquellos considerados como haplotipos característicos de cada una de ellas. Se comprobó en

STRUCTURE la representación gráfica de los *clusters* genéticos seleccionados como más probables, tanto para el conjunto de ambas especies como para cada una de ellas por separado (**Anexo IX**), observándose niveles de introgresión de hasta el 20% en algunos individuos de *M. polli* como puede observarse en la **Figura 5**. Esta introgresión es principalmente unidireccional por parte de *M. senegalensis*, indicando un retrocruzamiento de híbridos F₁ hacia poblaciones de *M. polli*.

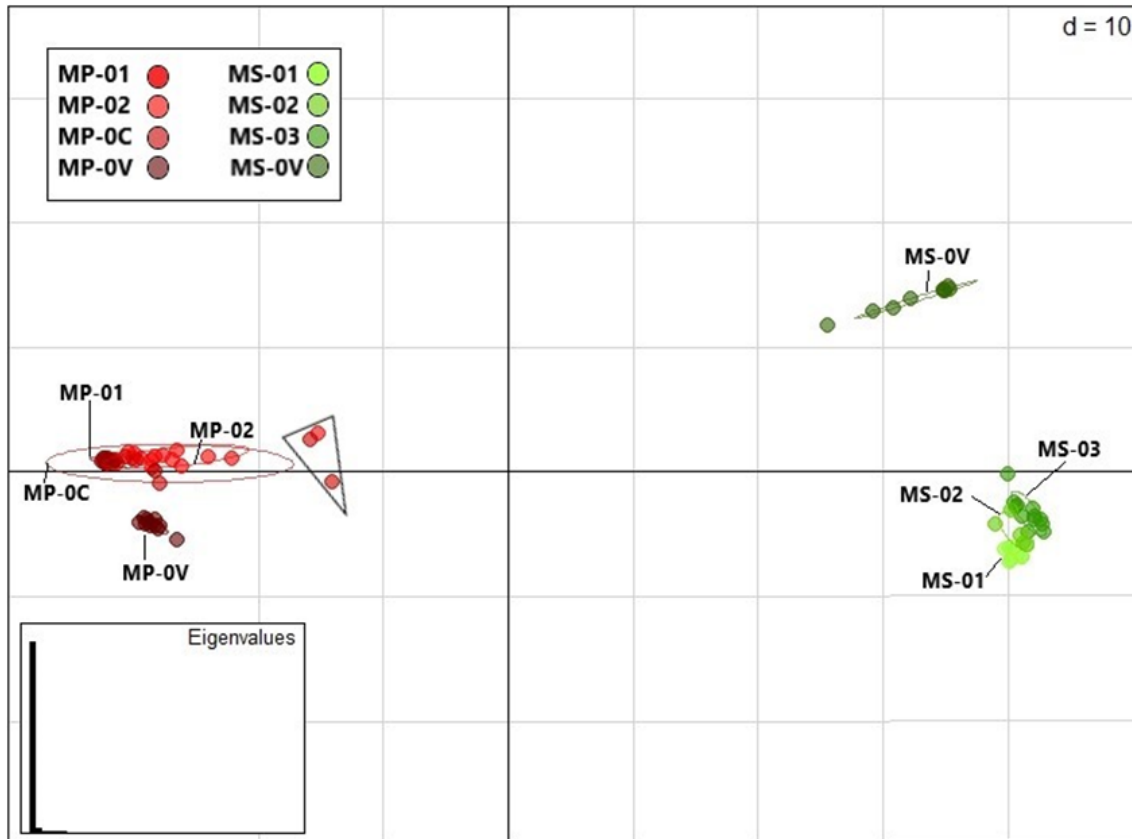


Figura 4. Análisis PCA de las 78 muestras estudiadas. Puede observarse la clara diferenciación entre *M. polli* (rojo) y *M. senegalensis* (verde), mientras que entre sus grupos (diferentes tonalidades de cada color) la diferenciación es muy reducida y se ve representada en su mayoría por el eje X (como denotan los *eigenvalues*). Puede apreciarse la presencia de híbridos genéticamente más cercanos a *M. polli*, los cuales se encuentran situados en el interior del triángulo próximo a las poblaciones de esta especie.

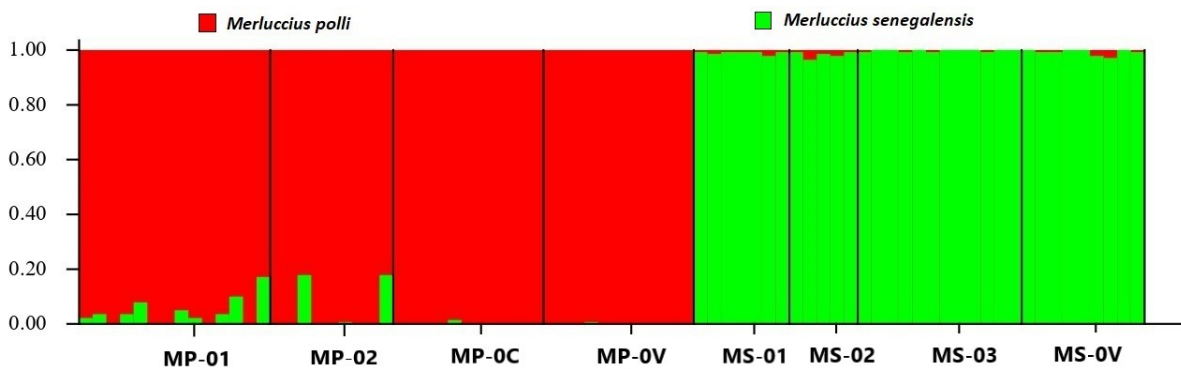


Figura 5a. Asignación individual a distintos *clusters* genéticos (K=2) generado por STRUCTURE v2.3.4 en la que se muestra la agrupación por *clusters* entre *M. polli* (rojo) y *M. senegalensis* (verde) en base a su similitud genética.

Un análisis más profundo de los fenómenos de hibridación detectados se llevó a cabo mediante el software NEW HYBRIDS v1.1 Beta3, a través del tratamiento de grupos aleatorizados de 500 loci polimórficos. Si bien este no detectó la presencia directa de híbridos F₁, sí fueron detectados fenómenos de hibridación por retrocruzamiento de primer orden (entre un híbrido F₁ y poblaciones de sus especies de origen) de *M. senegalensis* hacia *M. polli* en individuos situados en las zonas de muestreo 1 y 2 (**Fig. 6**).

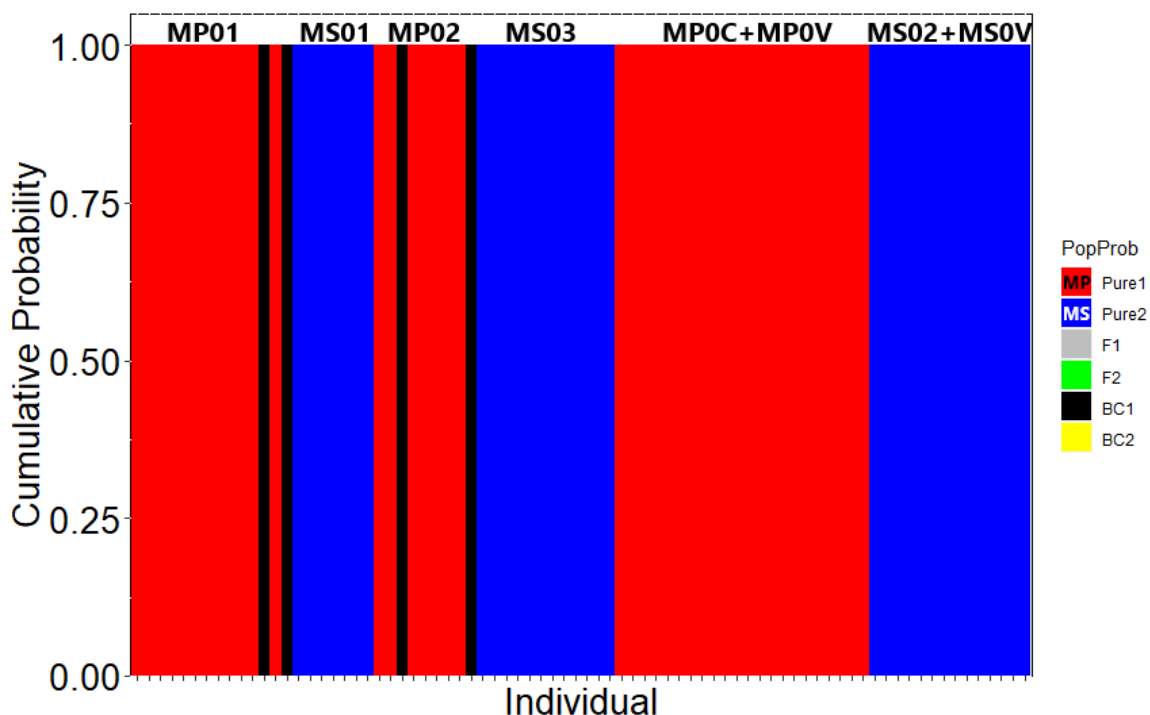


Figura 6. Probabilidad acumulada de pertenencia a distintos *cluster* obtenida en R a partir de los datos generados por NEW HYBRIDS v1.1 Beta3. Pueden verse los individuos descendientes de híbridos (negro) por retrocruzamiento de *M. senegalensis* (azul) hacia *M. polli* (rojo) en las zonas de muestreo Norte (1) y Media (2).

Discusión

En este estudio genético se ha desarrollado y validado la puesta a punto de un marcador molecular PCR-RFLP que permite la detección rápida, sencilla y económica de las dos especies de merluza negra estudiadas, *M. polli* y *M. senegalensis*, de las cuales se desconoce su patrón de estructuración genético y son aun así sometidas a explotación conjunta como una sola. Además, representa el primer análisis a nivel molecular realizado sobre estas dos especies del cual se tiene constancia, constituyendo por tanto un primer paso en el camino para elucidar la estructuración genético-poblacional de las mismas. Dicho análisis ha sido efectuado utilizando 4.550 marcadores SNPs, y por tanto con un grado de resolución mucho más elevado en comparación al que ofrecen los marcadores STR (ni tan presentes, ni tan repartidos en el genoma (Dejean, 2018)) empleados en estudios previos realizados sobre el género. Esta resolución ha permitido determinar el grado de diferenciación genética inter- e intrapoblacional para estas dos especies de merluza negra, así como detectar por primera vez la presencia de híbridos entre las mismas.

Como era de esperar el análisis de los estadísticos F_{ST} y F_{IS} demostró que la mayor diferenciación genética se observa a nivel interespecífico, en comparación a la presente a nivel individual del conjunto de muestras analizadas para cada especie. No obstante, y aun teniendo en cuenta el limitado número de muestras utilizadas, se observaron a nivel intraespecífico bajas tasas de consanguinidad y el mantenimiento del equilibrio HW por el elevado flujo génico entre sus poblaciones, ajustándose al perfil dispersivo de estos animales y a los cardúmenes de elevada magnitud que conforman. Los índices de fijación alélica (F_{ST}) denotan además una ligera pero mayor diferenciación genética de las muestras de poblaciones de la zona Sur con respecto a las de las zonas Norte y media (**Tabla 4b y 4c**), más cercanas a las regiones de cría de *M. senegalensis* durante los periodos de Octubre-Marzo en el Norte de su distribución (a diferencia de *M. polli* que cría en el Golfo de Guinea durante los primeros meses del año) (Alheit & Pitcher, 1995; Lloris et al., 2005). A nivel histórico los valores de ambos estadísticos indican que no existen grandes diferencias entre muestras a escala temporal, más allá de la superior consanguinidad mostrada en el pasado por las muestras de *M. senegalensis* con respecto a la de sus poblaciones contemporáneas (**Tabla 5b**), lo cual sugiere que las frecuencias alélicas poblacionales se han mantenido más o menos estables en este periodo.

El análisis de la varianza molecular (AMOVA) del conjunto de datos poblacionales combinado para ambas especies remarcó la clara diferenciación esperada entre las mismas con un porcentaje de variación entre grupos de muestreo cercano al 82%, mientras que este fue de aproximadamente un 18% a nivel global de las 78 muestras del estudio y significativamente indistinto de cero a nivel intrapoblacional.

Del conjunto de resultados anteriores puede inferirse una cierta pero escasa estructuración poblacional intraespecífica que desbanca la idea previamente establecida de un único *stock* panmítico. Sin embargo, la clara diferenciación entre *M. polli* y *M. senegalensis* no ha supuesto una barrera infranqueable para la reproducción entre algunos de sus individuos. Aunque no se detectó presencia directa de híbridos *M. polli*-*M. senegalensis* de primera generación (F_1), los resultados obtenidos a partir del análisis de sus datos genéticos mediante STRUCTURE v2.3.4 y NEW HYBRIDS v1.1 Beta3 ponen de manifiesto la presencia de hibridación con introgresión unidireccional de la especie *M. senegalensis* hacia *M. polli* hasta en un 5-6% de los individuos estudiados, resultado del retrocruzamiento de híbridos con poblaciones de *M. polli* de las zonas Norte (MP-01) y Media (MP-02) (**Fig. 5 y 6**) (zonas de cría de *M. senegalensis* (Lloris et al., 2005) y que podrían tener por tanto un papel en la asimetría de este flujo genético interespecífico al menos para las muestras analizadas). Dado que este área corresponde al límite Norte de la distribución de *M. polli*, el desplazamiento de sus individuos hacia latitudes más elevadas en respuesta a cambios ambientales podría propiciar la introgresión de la especie local (*M. senegalensis*) hacia la especie colonizadora (*M. polli*) con una mayor probabilidad de aparearse los híbridos resultantes por retrocruzamiento con esta última (Petit & Excoffier, 2009), aunque el mayor flujo génico intraespecífico mostrado por *M. polli* tendría un efecto diluyente sobre la deriva genética limitando la frecuencia de los alelos recibidos por introgresión.

La relativamente baja diferenciación genética observada dentro de cada una de estas dos especies de elevada dispersión podría explicar por tanto la presencia de este flujo génico interespecífico en latitudes

superiores y medias del Golfo de Cabo Verde (Senegal), apoyando hallazgos que apuntan a la importante función de estas zonas como áreas de refugio para estos y otros organismos marinos (Machado-Schiaffino et al., 2011). Sin embargo, cabe señalar que la zona de estudio es reducida y sería necesario contrastar estos hallazgos con otras regiones que corroborasen la ubicuidad espacial de dicho fenómeno. Si bien el análisis de un mayor número de individuos induciría a que estas cifras fluctuasen, también podría permitir la detección directa de híbridos F_2 , o incluso F_1 , lo cual representaría una señal inequívoca de que este flujo genético interespecífico es reciente. La hibridación con introgresión puede en algunos casos facilitar la adaptación de los seres vivos a los cambios en las condiciones medioambientales de su entorno o en la colonización de nuevos territorios como respuesta a dichos cambios (Seehausen, 2004) (e.g. Temperatura, salinidad, $[O_2]$, etc.). De este modo, la introgresión adaptativa puede resultar vital para la supervivencia de los recursos biológicos sujetos a grandes cambios en el ambiente. Sin embargo, otros posibles desenlaces de la hibridación podrían no ser tan beneficiosos para la conservación de estas especies, pudiendo producirse desde el colapso de la especie de menor abundancia dentro de la más abundante hasta la aparición de una tercera especie híbrida resultante de dicho flujo génico, pudiendo esta coexistir con sus dos especies de origen dentro de una zona híbrida o llegar incluso a reemplazarlas (Gilman & Behm, 2011).

Estas primeras evidencias de hibridación entre las dos especies de merluza negra estudiadas han sido obtenidas mediante el análisis de tan solo 78 muestras y con una resolución bastante mayor que en los estudios previos de este tipo realizados sobre el género *Merluccius* (Machado-Schiaffino et al., 2010; Miralles et al., 2014), lo cual pone de manifiesto que, si bien *M. polli* y *M. senegalensis* divergieron hace 3-4 m.a., las barreras reproductivas entre ambas especies no son completas. De nuevo estos fenómenos de hibridación tienen lugar entre dos linajes que filogenéticamente no son los más cercanos, ya que dentro del clado euroafricano ambas constituyen grupo polifilético (Campo et al., 2007), por lo que parece haber una elevada recurrencia de fenómenos de hibridación entre parientes lejanos de este género como demostraron los otros dos estudios realizados sobre especies del mismo género (Machado-Schiaffino et al., 2010; Miralles et al., 2014). Todo ello apunta a que, con una elevada probabilidad, otras especies del género que comparten áreas de su distribución geográfica hayan presentado, presenten o lo hagan en un futuro, resultados de este fenómeno, independientemente de su cercanía filogenética.

Por último, el hecho de que *M. polli* y *M. senegalensis* hibriden en la región Norte-Media de la zona de estudio podría explicar también el porqué de la tan común captura conjunta de las mismas durante su explotación por pesquerías mixtas, las cuales han demostrado una problemática clara a la hora de clasificarlas a bordo en base a sus características fenotípicas (Blanco-Fernandez et al., 2022). La técnica de identificación especie-específica por marcadores mitocondriales desarrollada para la consecución de este estudio podría ser de gran utilidad a la hora de poner a disposición de los órganos de gobierno y de la industria alimentaria herramientas para su transición hacia la explotación sostenible de los recursos vegetales y animales, más allá de este caso particular y de las especies analizadas en él. Si bien la identificación a bordo no pretende el descarte de los individuos, dada su elevada mortalidad (Gurbet et al., 2013) y el tiempo necesario para efectuar las reacciones, sí que permitirá esclarecer de forma relativamente

sencilla y con alta reproducibilidad la realidad de la explotación y conservación de los valiosos recursos biológicos, recalcando la necesidad de llevar a cabo un uso sostenible de los mismos (e. g. adecuado manejo de sus *stocks*, minimizar los impactos de sus pesquerías, etc.) y evitar el significativo fraude alimentario que desde hace tiempo viene afectando tanto a los derechos del consumidor como de las especies consumidas (García-Vázquez et al., 2011; Luque & Donlan, 2019; Stawitz et al., 2017).

Conclusiones

En el transcurso de este proyecto se ha desarrollado un marcador molecular RFLP especie-específico fácilmente reproducible que permite la identificación rápida y fiable de individuos pertenecientes a las especies *M. polli* y *M. senegalensis*. Si bien este ha sido llevado a cabo únicamente con la finalidad de clasificar las muestras en el laboratorio, existe la posibilidad de adaptar la metodología PCR-RFLP a la identificación de campo o incluso a bordo, pudiendo suponer una herramienta efectiva para la regulación no solo de las pesquerías de merluza negra sino del sector pesquero en su conjunto.

El análisis genómico de ambas especies reveló que, si bien existen claras diferencias entre ellas, la diferenciación poblacional dentro de cada una de las especies es baja, siendo menor para *M. senegalensis*. En cambio, *M. polli* parece presentar una muy leve estructuración genético-poblacional al detectarse una ligera diferenciación genética en forma de gradiente entre sus zonas de muestreo. La tasa de consanguinidad es en ambos casos reducida, aunque superior para la especie *M. senegalensis*, lo cual podría explicar la menor diferenciación entre sus poblaciones. El análisis espaciotemporal no detectó diferencias con las poblaciones actuales mayores que las presentes entre las mismas, aunque en el pasado *M. senegalensis* parecía presentar también una mayor consanguinidad que *M. polli*.

Por último, se detectaron evidencias de introgresión unidireccional por retrocruzamiento de la especie *M. senegalensis* hacia poblaciones de la especie *M. polli*, indicando por primera vez la existencia de fenómenos de hibridación entre las mismas.

Referencias

- Alheit, J., & Pitcher, T. J. (1995). *Hake: Biology. Fisheries and markets* (1st ed., Vol. 15). Springer Science+Business Media Dordrecht. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-1300-7_4
- Amoroso, R. O. et al., (2018). Bottom trawl fishing footprints on the world's continental shelves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(43). <https://doi.org/10.1073/pnas.1802379115>
- Anderson, E. C., & Thompson, E. A. (2002). A Model-Based Method for Identifying Species Hybrids Using Multilocus Genetic Data. *Genetics*, 160(3), 1217-1229. <https://doi.org/10.1093/genetics/160.3.1217>
- Ardura, A. et al., (2010). Application of barcoding to Amazonian commercial fish labelling. *Food Research International*, 43(5), 1549-1552. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.016>

- Ba, K. (2019). *Assessing the North-West African Stock of Black Hakes (Merluccius polli and Merluccius senegalensis) using Catch-MSY and Length-Based Spawning Potential Ratio Models* [GRO Fisheries Training Programme UNESCO, Centre de Recherches Océanographiques de Dakar-Thiaroye (CRODT)]. <http://rgdoi.net/10.13140/RG.2.2.32228.71047>
- Barbier, E. B. (2005). *Natural Resources and Economic Development* (1.^a ed.). Cambridge University Press. www.cambridge.org/9780521823135
- Barbuto, M. et al., (2010). DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo” (*Mustelus* spp.). *Food Research International*, 43(1), 376-381. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.009>
- Barendse, J. et al., (2019). DNA barcoding validates species labelling of certified seafood. *Current Biology*, 29(6), R198-R199. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.02.014>
- Beslier, S. (2009). The Protection and Sustainable Exploitation of Genetic Resources of the High Seas from the European Union’s Perspective. *The International Journal of Marine and Coastal Law*, 24(2), 333-341. <https://doi.org/10.1163/157180809X421725>
- Blanco-Fernandez, C. et al., (2021a). Fraud in highly appreciated fish detected from DNA in Europe may undermine the Development Goal of sustainable fishing in Africa. *Scientific Reports*, 11(1), 11423. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91020-w>
- Blanco-Fernandez, C. et al., (2022). Two Fish in a Pod. Mislabelling on Board Threatens Sustainability in Mixed Fisheries. *Frontiers in Marine Science*, 9, 10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.841667>
- Blanco-Fernandez, C. et al., (2021b). Seventeen years analysing mislabelling from DNA barcodes: Towards hake sustainability. *Food Control*, 123, 107723. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107723>
- Boore, J. L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(8), 1767-1780. <https://doi.org/10.1093/nar/27.8.1767>
- Buck, E. H. (2010). *Seafood Marketing: Combating Fraud and Deception* (pp. 1-15) [Natural Resources Policy]. Congressional Research Service. www.crs.gov
- Burton, R. S. (2009). Molecular Markers, Natural History, and Conservation of Marine Animals. *BioScience*, 59(10), 831-840. <https://doi.org/10.1525/bio.2009.59.10.5>
- Campo, D. et al., (2007). Phylogeny of the genus *Merluccius* based on mitochondrial and nuclear genes. *Gene*, 406(1-2), 171-179. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.09.008>
- Cashner, M. F., & Bart, H. L. (2010). Reproductive Ecology of Nest Associates: Use of RFLPs to Identify Cyprinid Eggs. *Copeia*, 2010(4), 554-557. <https://doi.org/10.1643/CG-09-191>
- Catchen, J. et al., (2013). Stacks: An analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*, 22(11), 3124-3140. <https://doi.org/10.1111/mec.12354>
- Coleman, F. C., & Williams, S. L. (2002). Overexploiting marine ecosystem engineers: Potential consequences for biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(1), 40-44. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02330-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02330-8)

- Coll, M. et al., (2008). Ecosystem Overfishing in the Ocean. *PLoS ONE*, 3(12), 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003881>
- de Meeûs, T., & Goudet, J. (2007). A step-by-step tutorial to use HierFstat to analyse populations hierarchically structured at multiple levels. *Infection, Genetics and Evolution*, 7(6), 731-735. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.07.005>
- Dejean, C. B. (2018). Genetic markers (SNPs/Satellites/STRs/RFLPs). En W. Trevathan, M. Cartmill, D. Dufour, C. Larsen, D. O'Rourke, K. Rosenberg, & K. Strier (Eds.), *The International Encyclopedia of Biological Anthropology* (pp. 1-4). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118584538.ieba0201>
- Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359-361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Estoup, A. et al., (1996). Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5(4), 295-298. https://www.researchgate.net/publication/235733942_Rapid_one_tube_DNA_extraction_for_reliable_PCR_detection_of_fish_polymorphic_markers_and_transgenes
- FAO. (2021). *FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2019/FAO annuaire. Statistiques des pêches et de l'aquaculture 2019/FAO anuario. Estadísticas de pesca y acuicultura 2019*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cb7874t>
- Fernández-Peralta, L. et al., (2017). Overlapping Distribution of Two Sympatric Species: The Case of Black Hakes, *Merluccius polli* Cadenat 1960 and *Merluccius senegalensis* Cadenat 1960, Off Mauritania. En A. Ramos, F. Ramil, & J. L. Sanz (Eds.), *Deep-Sea Ecosystems Off Mauritania: Research of Marine Biodiversity and Habitats in the Northwest African Margin* (1st ed., Vol. 1, pp. 241-275). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1023-5_6
- Fleeger, J. W. et al., (2003). Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of The Total Environment*, 317(1-3), 207-233. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00141-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00141-4)
- Fox, M. et al., (2018). The seafood supply chain from a fraudulent perspective. *Food Security*, 10(4), 939-963. <https://doi.org/10.1007/s12571-018-0826-z>
- García-Vázquez, E. et al., (2012). Species misidentification in mixed hake fisheries may lead to overexploitation and population bottlenecks. *Fisheries Research*, 114, 52-55. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2011.05.012>
- García-Vázquez, E. et al., (2011). High Level of Mislabeling in Spanish and Greek Hake Markets Suggests the Fraudulent Introduction of African Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(2), 475-480. <https://doi.org/10.1021/jf103754r>
- Gilman, R. T., & Behm, J. E. (2011). HYBRIDIZATION, SPECIES COLLAPSE, AND SPECIES REEMERGENCE AFTER DISTURBANCE TO PREMATING MECHANISMS OF

- REPRODUCTIVE ISOLATION: HYBRIDIZATION, SPECIES COLLAPSE, AND SPECIES REEMERGENCE. *Evolution*, 65(9), 2592-2605. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01320.x>
- Grant, E. H. C. et al., (2022). Speciation with gene flow in a narrow endemic West Virginia cave salamander (*Gyrinophilus subterraneus*). *Conservation Genetics*, 23(4), 727-744. <https://doi.org/10.1007/s10592-022-01445-7>
- Grover, A., & Sharma, P. C. (2016). Development and use of molecular markers: Past and present. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 290-302. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.959891>
- Gurbet, R. et al., (2013). Exploitation and mortality rates of European hake (*Merluccius merluccius*) in the Aegean Sea (Izmir Bay, Turkey). *Journal of Applied Ichthyology*, 29(3), 569-572. <https://doi.org/10.1111/jai.12082>
- Henriques, R. et al., (2016). When homoplasmy mimics hybridization: A case study of Cape hakes (*Merluccius capensis* and *M. paradoxus*). *PeerJ*, 4, e1827. <https://doi.org/10.7717/peerj.1827>
- Hu, Y. et al., (2018). Study of fish products in Metro Vancouver using DNA barcoding methods reveals fraudulent labeling. *Food Control*, 94, 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.06.023>
- Hylland, K. (2006). Biological effects in the management of chemicals in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 53(10-12), 614-619. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.08.010>
- Ingman, M. et al., (2000). Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature*, 408, 708-713.
- Iwamoto, T. (2015). *Merluccius senegalensis*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2015: E.T15522229A15603615*. (p. 10). IUCN. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T15522229A15603615.en>
- Jackson, J. B. C. et al., (2001). Historical Overfishing and the Recent Collapse of Coastal Ecosystems. *Science*, 293(5530), 629-637. <https://doi.org/10.1126/science.1059199>
- Janssen, M. A., & Scheffer, M. (2004). Overexploitation of Renewable Resources by Ancient Societies and the Role of Sunk-Cost Effects. *Ecology and Society*, 9(1), 34. <https://doi.org/10.5751/ES-00620-090106>
- Jombart, T., & Ahmed, I. (2011). adegenet 1.3-1: New tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, 27(21), 3070-3071. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr521>
- Kamvar, Z. N. et al., (2015). Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. *Frontiers in Genetics*, 6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00208>
- Kappel, C. V. (2005). Losing pieces of the puzzle: Threats to marine, estuarine, and diadromous species. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 3(5), 275-282. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2005\)003\[0275:LPOPTJ\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2005)003[0275:LPOPTJ]2.0.CO;2)
- Kowalczyk, M. et al., (2018). Molecular markers used in forensic genetics. *Medicine, Science and the Law*, 58(4), 201-209. <https://doi.org/10.1177/0025802418803852>

- Lampert, A. (2019). Over-exploitation of natural resources is followed by inevitable declines in economic growth and discount rate. *Nature Communications*, 10(1), 1419. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09246-2>
- Lepais, O., & Weir, J. T. (2014). SimRAD: an R package for simulation-based prediction of the number of loci expected in RADseq and similar genotyping by sequencing approaches. *Molecular Ecology Resources*, 14(6), 1314-1321. <https://doi.org/doi:10.1111/1755-0998.12273>
- Li, H., & Durbin, R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 26(5), 589-595. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp698>
- Lischer, H. E. L., & Excoffier, L. (2012). PGDSpider: An automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics*, 28(2), 298-299. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr642>
- Lloris, D. et al., (2005). *Hakes of the world (family Merlucciidae): An annotated and illustrated catalogue of hake species known to date*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. https://www.researchgate.net/publication/256844852_Hakes_of_the_world_Family_Merlucciidae_An_annotated_and_illustrated_catalogue_of_hake_species_known_to_date
- Lundy, C. J. et al., (2000). Temporal and spatial genetic variation in spawning grounds of European hake (*Merluccius merluccius*) in the Bay of Biscay. *Molecular Ecology*, 9(12), 2067-2079. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2000.01120.x>
- Luque, G. M., & Donlan, C. J. (2019). The characterization of seafood mislabeling: A global meta-analysis. *Biological Conservation*, 236, 556-570. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.04.006>
- Machado-Schiaffino, G. et al., (2010). Introgressive hybridization in North American hakes after secondary contact. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(2), 552-558. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.01.034>
- Machado-Schiaffino, G. et al., (2011). Identifying unique populations in long-dispersal marine species: Gulfs as priority conservation areas. *Biological Conservation*, 144(1), 330-338. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.09.010>
- Machado-Schiaffino, G. et al., (2008). Detection of Mislabeling in Hake Seafood Employing mtSNPs-Based Methodology with Identification of Eleven Hake Species of the Genus *Merluccius*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13), 5091-5095. <https://doi.org/10.1021/jf800207t>
- Madeira, P. et al., (2018). Non-destructive tissue sampling and the use of PCR-RFLPs in two edible sea cucumbers from the north-eastern Atlantic, *Holothuria mammata* Grube, 1840 and *H. sanctori* Delle Chiaje, 1823 (Echinodermata: Holothuroidea). *The European Zoological Journal*, 85(1), 88-93. <https://doi.org/10.1080/24750263.2018.1438529>
- MAgrAMA. (2016). *El mercado de la Merluza en España* (p. 44). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. https://www.mapa.gob.es/es/pesca/temas/mercados-economia-pesquera/informemerluzaabril2016_tcm30-291641.pdf

- Maínez, L. M. (2021, diciembre 27). Del Siglo XVIII a nuestros días: La pesca de arrastre y sus consecuencias [Institucional]. *red 2030: acción, sostenibilidad, compromiso*. <https://red2030.com/del-siglo-xviii-a-nuestros-dias-la-pesca-de-arrastre-y-sus-consecuencias/>
- McNeill, J. R. (2003). Resource Exploitation and Over-Exploitation: A Look at the 20th Century. En *Exploitation and Overexploitation in Societies Past and Present* (1.ª ed., p. (51-59) 378). LIT Verlag Münster. <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=EpxXUIzRI9kC&oi=fnd&pg=PA51&dq=historical+over-exploitation+natural+resources&ots=0b-9qdfs-a&sig=ncicMxtyFTT0ZQbCI7RI9TTnQZU#v=onepage&q&f=false>
- Mijangos, J. L. et al., (2022). DARTR v2: An accessible genetic analysis platform for conservation, ecology and agriculture. *Methods in Ecology and Evolution*, 13(10), 2150-2158. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13918>
- Miller, M. R. et al., (2007). Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. *Genome Research*, 17(2), 240-248. <https://doi.org/10.1101/gr.5681207>
- Miralles, L. et al., (2014). Genetic markers reveal a gradient of hybridization between cape hakes (*Merluccius capensis* and *Merluccius paradoxus*) in their sympatric geographic distribution. *Journal of Sea Research*, 86, 69-75. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2013.11.009>
- Mishra, K. K. et al., (2014). Potential and application of molecular markers techniques for plant genome analysis. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 2(1), 169-188. https://www.researchgate.net/profile/Afra-Roughani/post/SSR_or_ISSR/attachment/5a842e1a4cde266d588b1e17/AS%3A593915900092422%401518611993889/download/markers.pdf
- Moore, J. E. et al., (2013). Evaluating sustainability of fisheries bycatch mortality for marine megafauna: A review of conservation reference points for data-limited populations. *Environmental Conservation*, 40(4), 329-344. <https://doi.org/10.1017/S037689291300012X>
- MSC. (2016, febrero). *Fishing for a future. How a sustainable hake fishery in South Africa is supporting livelihoods and communities*. Marine Stewardship Council. <http://south-african-hake-stories.msc.org/>
- Nair, M. et al., (2018). Cancer molecular markers: A guide to cancer detection and management. *Seminars in Cancer Biology*, 52(1), 39-55. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.02.002>
- Oliveira de Oliveira, L. et al., (2021). Molecular markers in *Carya illinoensis* (*Juglandaceae*): From genetic characterization to molecular breeding. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 96(5), 560-569. <https://doi.org/10.1080/14620316.2021.1892534>
- Peterson, B. K. et al., (2012). Double Digest RADseq: An Inexpensive Method for De Novo SNP Discovery and Genotyping in Model and Non-Model Species. *PLoS ONE*, 7(5), e37135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>

- Petit, R. J., & Excoffier, L. (2009). Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(7), 386-393. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.02.011>
- Pritchard, J. K. et al., (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155(2), 945-959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Quinteiro, J. et al., (2001). Identification of Hake Species («Merluccius» Genus) Using Sequencing and PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA Control Region Sequences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5108-5114. <https://doi.org/10.1021/jf010421f>
- Quinteiro, J. et al., (2000). Phylogeny and biogeographic history of hake (genus Merluccius), inferred from mitochondrial DNA control-region sequences. *Marine Biology*, 136(1), 163-174. <https://doi.org/10.1007/s002270050019>
- R Core Team. (2022). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Rancilhac, L. et al., (2019). Phylogeny and species delimitation of near Eastern Neurergus newts (Salamandridae) based on genome-wide RADseq data analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 133, 189-197. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.01.003>
- Ratheb, F., & Mansilla, M. (2019). *Hakes Around the World*. *Groundfish Forum 2019*. International Groundfish Forum 2019, Berlin. <https://groundfishforum.com/wp-content/uploads/2019/10/All-Hakes-Mansilla-Ratheb.pdf>
- Recknagel, H. et al., (2015). Double-digest RAD sequencing using Ion Proton semiconductor platform (ddRADseq-ion) with nonmodel organisms. *Molecular Ecology Resources*, 15(6), 1316-1329. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12406>
- Recknagel, H. et al., (2018). Common lizards break Dollo's law of irreversibility: Genome-wide phylogenomics support a single origin of viviparity and re-evolution of oviparity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 127, 579-588. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.05.029>
- Rozas, J. et al., (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299-3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- SADSTIA. (2017, agosto 14). *International study measures impact trawling seabed*. South African Deep-Sea Trawling Industry Association. <https://www.sadstia.co.za/news/international-study-measures-impact-trawling-seabed/>
- Sahrhage, D., & Lundbeck, J. (1992). Mechanization of Fishing. En *A History of Fishing* (1st ed., p. 347). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-77411-9>
- Scheffer, M. et al., (2005). Cascading effects of overfishing marine systems. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(11), 579-581. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.08.018>
- Seehausen, O. (2004). Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(4), 198-207. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.01.003>
- Shakouri, B. et al., (2010). *Overfishing*. 229-234. <https://doi.org/10.1109/icbee.2010.5649533>

- Srinivasan, U. T. et al., (2010). Food security implications of global marine catch losses due to overfishing. *Journal of Bioeconomics*, 12(3), 183-200. <https://doi.org/10.1007/s10818-010-9090-9>
- Stawitz, C. C. et al., (2017). Financial and Ecological Implications of Global Seafood Mislabeling. *Conservation Letters*, 10(6), 681-689. <https://doi.org/10.1111/conl.12328>
- Steadman, D. et al., (2021). *New perspectives on an old fishing practice: Scale, context and impacts of bottom trawling* (p. 43) [Cientifico]. Fauna & Flora International (UK); CEA Consulting (USA); Sea Around Us (CAN); Blue Ventures (UK). https://www.researchgate.net/publication/359281130_New_perspectives_on_an_old_fishing_practice_Scale_context_and_impacts_of_bottom_trawling
- Sun, C. et al., (2022). Genetic population structure and demographic history of the endemic fish *Paralichthys olivaceus* of the Northwest Pacific Ocean. *Ecology and Evolution*, 12(11). <https://doi.org/10.1002/ece3.9506>
- Tamura, K. et al., (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Thellbro, C. (2006). *Local Natural Resource Dependency in a Swedish Boreal Municipality Context* [Licentiate dissertation, Swedish University of Agricultural Sciences]. <https://pub.epsilon.slu.se/1158/1/CTfin0.pdf>
- Tsur, Y., & Zemel, A. (1995). Uncertainty and Irreversibility in Groundwater Resource Management. *Journal of Environmental Economics and Management*, 29, 149-161. <https://doi.org/10.1006/jeem.1995.1037>
- Verma, R. et al., (2016). Unraveling the Limits of Mitochondrial Control Region to Estimate the Fine Scale Population Genetic Differentiation in Anadromous Fish *Tenualosa ilisha*. *Scientifica*, 2016, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2016/2035240>
- Vincze, T. et al., (2003). NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3688-3691. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg526>
- Wangensteen, O. S. et al., (2018). DNA metabarcoding of littoral hard-bottom communities: High diversity and database gaps revealed by two molecular markers. *PeerJ*, 6, e4705. <https://doi.org/10.7717/peerj.4705>
- Wringe, B. F. et al., (2017). HYBRIDDETECTIVE: A workflow and package to facilitate the detection of hybridization using genomic data in R. *Molecular Ecology Resources*, 17(6), e275-e284. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12704>
- Zarei, F. et al., (2023). Phylogeography and population structure of *Ponticola gorlap* (Teleostei: Gobiidae) in an evolutionary distinctive and ecologically threatened Caspian Sea sub-basin. *Aquatic Sciences*, 85(1), 15. <https://doi.org/10.1007/s00027-022-00913-z>
- Zhong, H. (2019). Exploitation and utilization of marine resources and protection of marine ecology. *2019 International Conference on Environment and Ocean Engineering*, 369(1), 012009. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/369/1/012009>

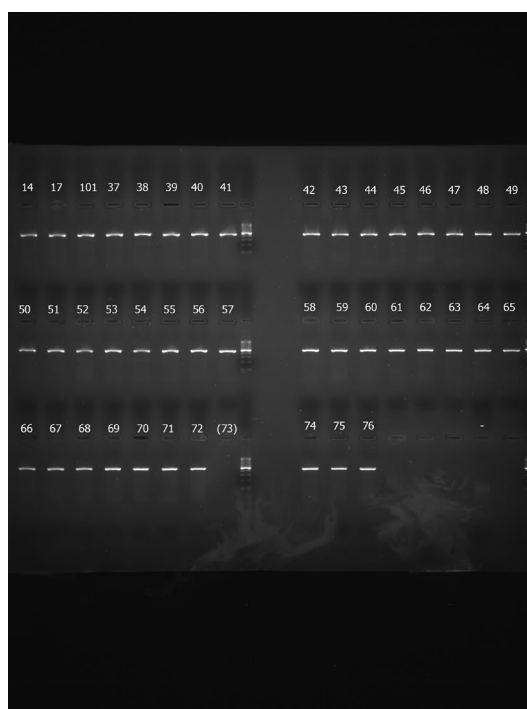
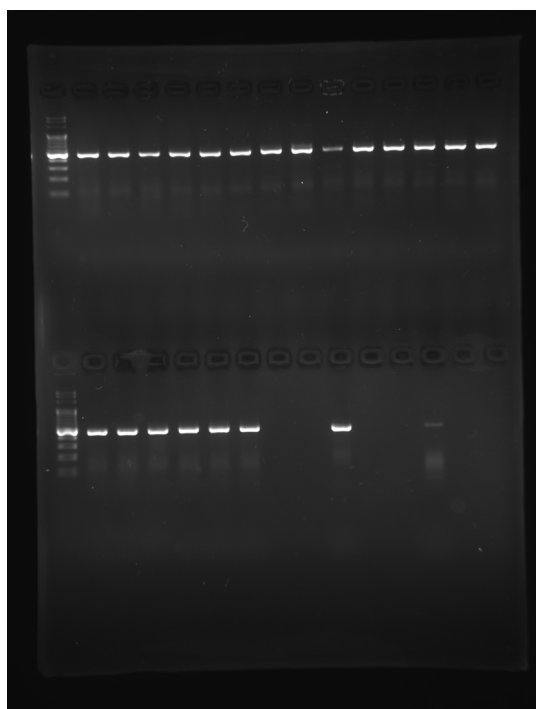
Anexo

- I. **Tabla 1.** Coordenadas geográficas (en grados) de las zonas de pesca de las cuales fueron extraídos los individuos correspondientes al muestreo 2019-2020 de las costas de Mauritania y Senegal (ref figura cuadros amarillos):

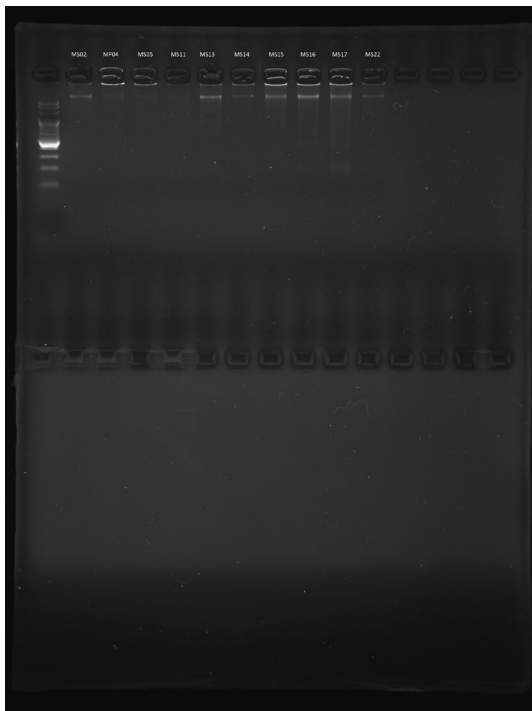
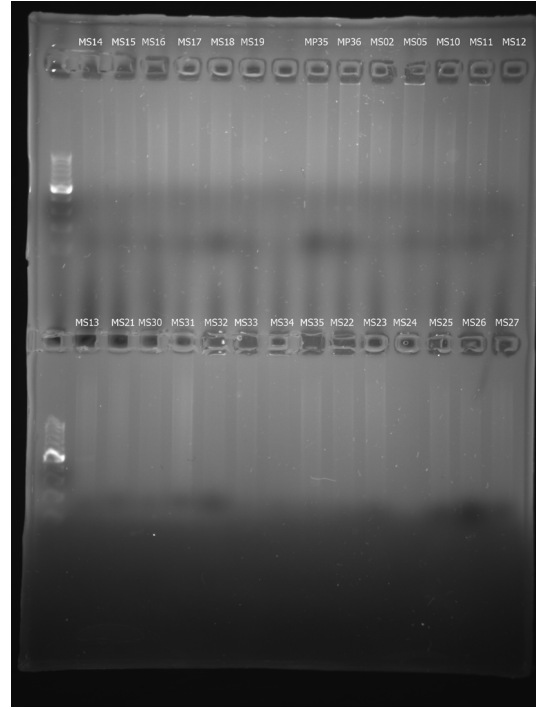
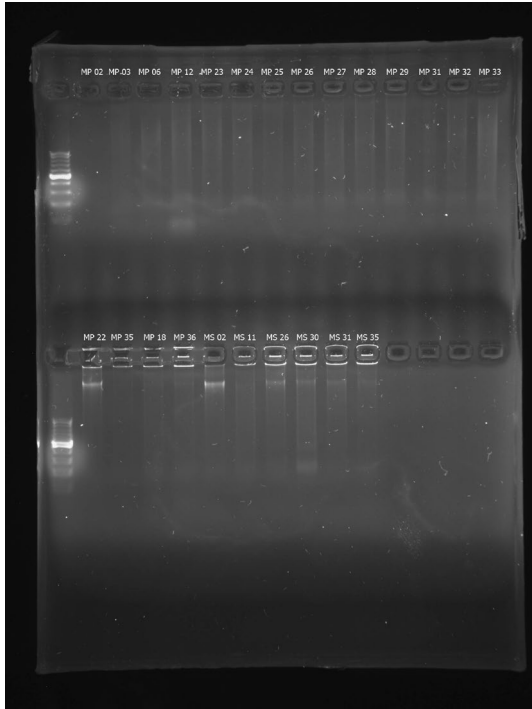
Zonas	Latitud máx.	Latitud mín.	Longitud máx.	Longitud mín.
Zona 1	20.76258333	19.59611667	-16.80378333	-17.92573333
Zona 2	19.06108333	17.98333333	-16.58333333	-16.90441667
Zona 3	15.87166667	14.95525	-16.945	-17.37596667

- II. **Electroforesis en gel de agarosa realizadas durante las diferentes fases del estudio, que fueron visualizadas mediante los transiluminadores Syngene NuGenius⁽¹⁾ (blanco y negro) y LKB Bromma 2011 Macrovue⁽²⁾ (a color):**

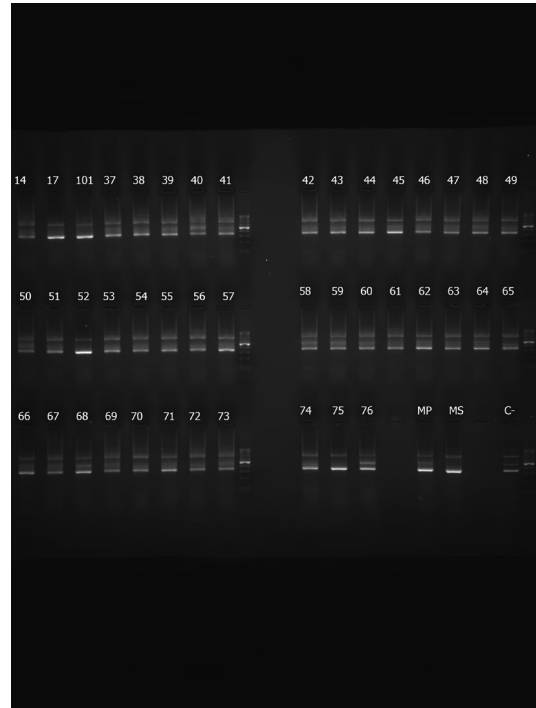
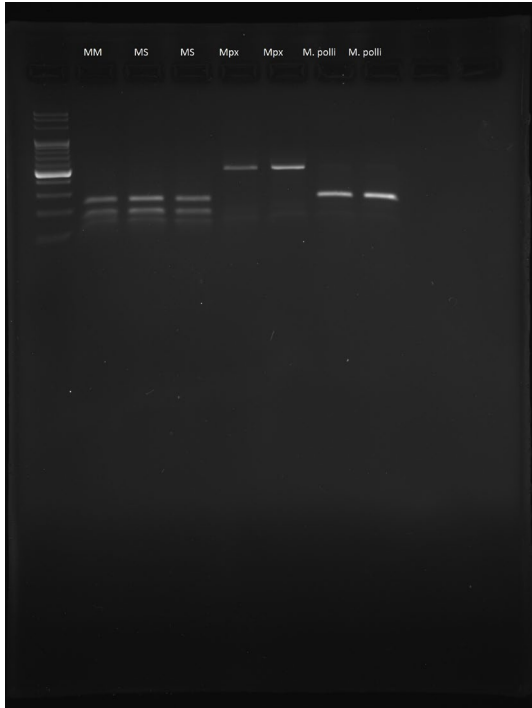
- (a) Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la visualización⁽¹⁾ de las secuencias RC mitocondriales amplificadas por PCR:



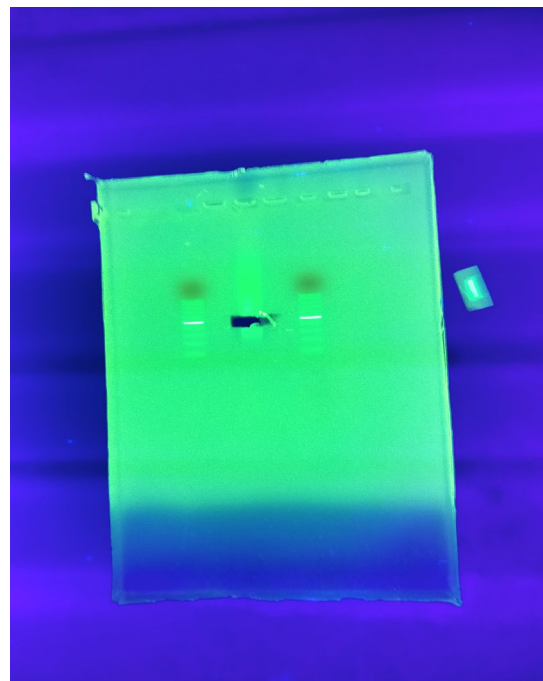
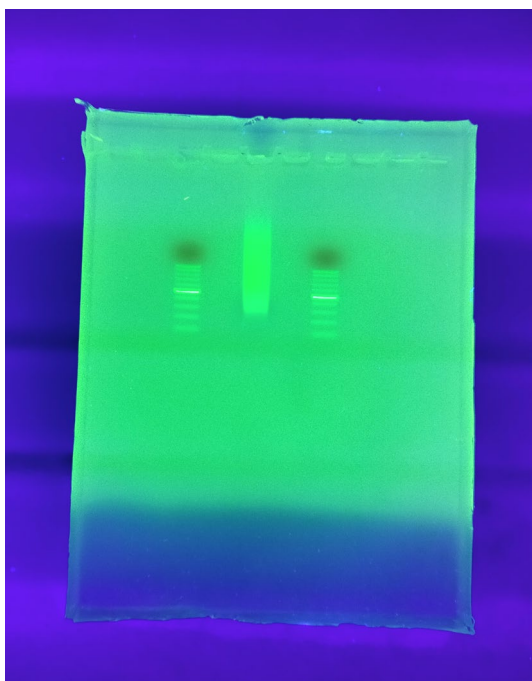
(b) Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para la visualización⁽¹⁾ del ADNg extraído mediante la técnica del fenol-cloroformo del conjunto de muestras de la zona de estudio (muestreros del 2019-2021 y del 2000-2001):



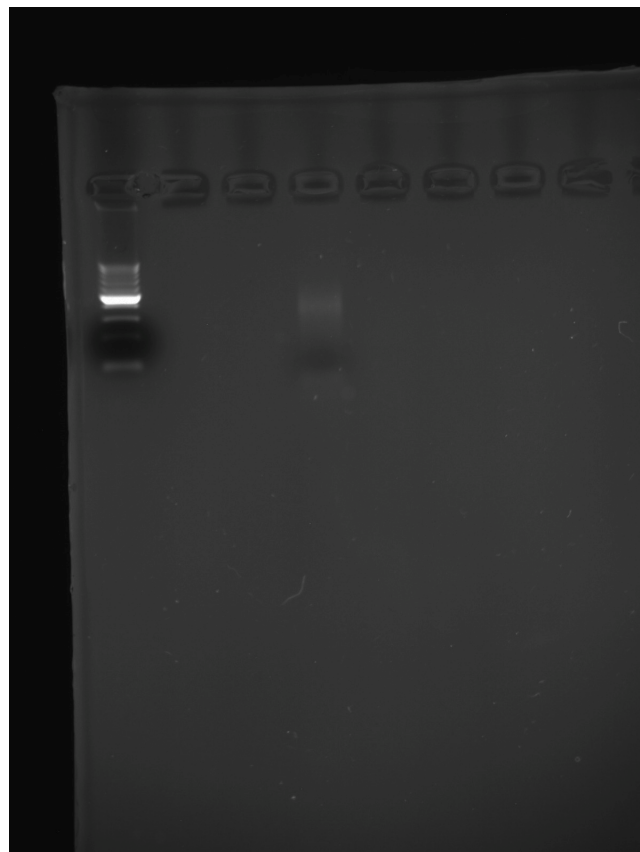
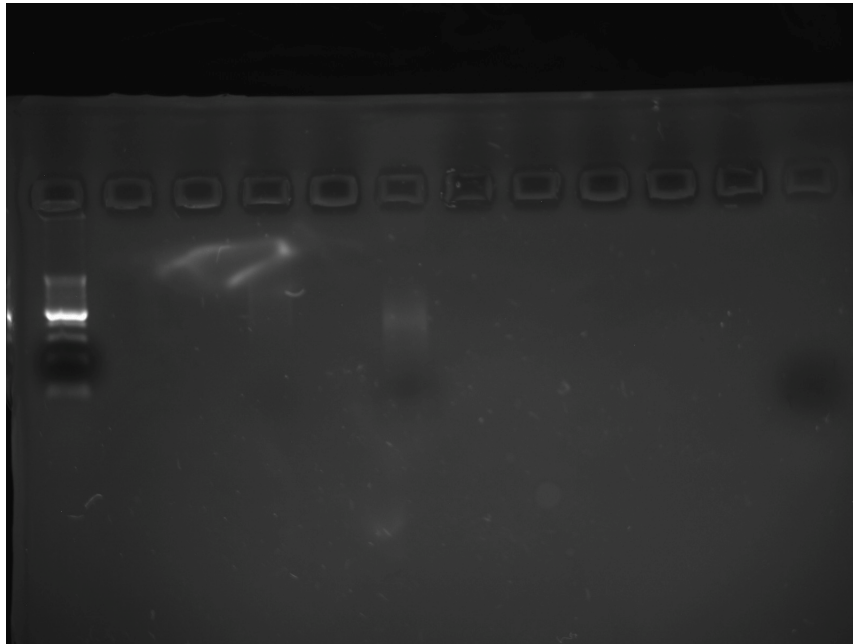
- (c) Electroforesis en gel de agarosa al 2% para visualizar⁽¹⁾ el patrón de corte RFLP resultante de la digestión de la RC mitocondrial de varias especies conocidas del género *Merluccius* (MM=*M. merluccius*; MS=*M. senegalensis*; Mpx=*M. paradoxus*) y de varias de las muestras problema (junto a controles positivos de cada especie y negativos para detectar eventos de contaminación):



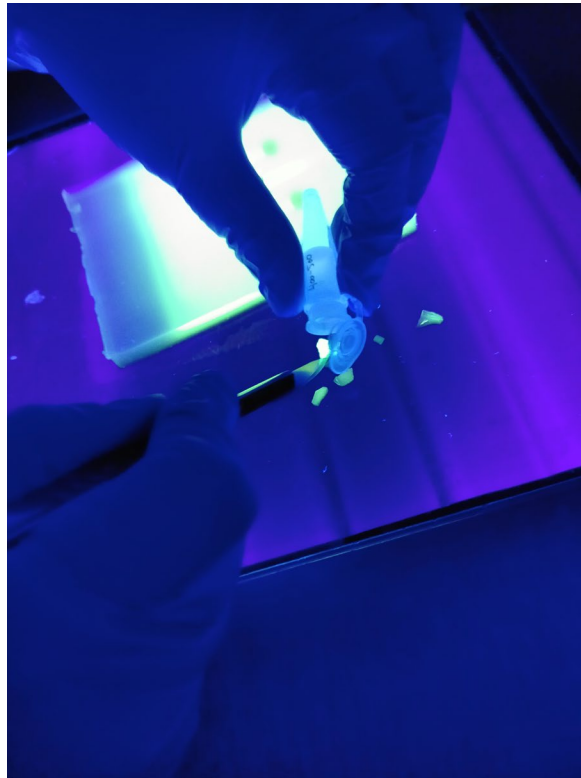
- (d) Electroforesis en gel de agarosa al 1% para la visualización⁽²⁾ y selección de los fragmentos de la longitud deseada (200-400 pb) tras la ligación de los adaptadores ddRAD:



- (e) Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para la visualización⁽¹⁾ de los fragmentos ddRAD ligados a adaptadores enriquecidos mediante PCR (pueden observarse de izquierda a derecha el marcador de tamaños DNA Ladder, un control negativo y la columna con el conjunto de muestras ligadas a su combinación de adaptadores):



- (f) Gel de agarosa al 1,5% empleado para la purificación, visualización⁽²⁾ y recuperación de los fragmentos ddRAD ligados a sus adaptadores correspondientes:



III. **Protocolo correspondiente a la extracción orgánica de ADN mediante la técnica del fenol-cloroformo:**

Extracción con Fenol-Cloroformo:

1. Re- suspender tejido en 300 μ L de tampón de extracción (0.1M NaCl, 0.1M Tris-HCl pH:8.4). A continuación, añadir otros 300 μ L de una mezcla de tampón de extracción, proteinasa K (90 μ g/ml) y SDS (3%). Incubar a 56°C durante 3 h.
2. Extraer con Fenol-CIA: pasar la muestra a tubos de extracción de 2 ml con Phase Lock Gel™ de Eppendorf, añadir 1 volumen de Fenol-CIA, agitar manualmente al menos 2 min, y centrifugar durante 3 min. Recuperar la fase acuosa (superior) pasándola a un tubo Eppendorf.
3. Incubar con la cantidad de RNasa A que le corresponda a la muestra (30 μ g/ml) con agua estéril hasta un volumen de 40 μ L. Añadir este volumen a la muestra e incubar a 37°C, 15 minutos.
4. Extraer con CIA tal y como se ha descrito en el paso 2 para Fenol-CIA.
5. Precipitar con acetato sódico 3M (0.1 vol.) y etanol absoluto (1vol.) frío. Mezclar suavemente. Centrifugar durante 5 min y tirar el sobrenadante. (Se debería de ver un pellet del DNA precipitado).

6. Lavar el DNA en etanol al 70% (100 μ L), centrifugar 3 min. Dejar que seque y disolver en TE (Buffer de Elución) a 40 μ L.

IV. Protocolo correspondiente a RADseq, modificado en el 2022 a partir del diseñado por Peterson et al. (2012):

Protocolo RADseq – Illumina:

Modificado de Peterson et al. 2012 PLoS ONE &
Ver también Recknagel et al. 2015 Mol. Ecol. Res
Protocolo modificado del escrito por A Jacobs and H. Recknagel (in-house)

1) **Extracción del ADN:**

1. Comprobar cantidad e integridad del ADN utilizando 2 μ L en un gel de agarosa al 1.5%. Correr 20 min a 120V.
2. Cuantificar el ADN utilizando un fluorómetro Qubit® 3.0 (Invitrogen):
La cantidad total necesaria es de **1 μ g**. El valor de la concentración de ADN debería ser \geq **25 ng/ μ L**.

2) **Digestión doble con enzimas de restricción:**

1. Digerir 1 μ g de ADN con dos enzimas de restricción:
 - 5 μ L de 10x New England Biolabs CutSmart® Buffer
 - 1 μ L de PstI-HF® (20kU/ml)
 - 0,25 μ L de MspI (20kU/ml)
 - 1 μ g de ADN
 - Rellenar con ddH₂O hasta completar un volumen de 50 μ LMáximo volumen de ADN: 43,75 μ L
→ incubar a 37°C durante 3 horas
2. Dejar enfriar la reacción hasta la temperatura ambiente (si se va a utilizar el día siguiente, conservar la reacción a 4°C) y proceder a la limpieza con el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), eluir hasta **18 μ L x2 (38 μ L)** y determinar concentraciones con el fluorómetro Qubit® 3.0.

3) **Ligación de Adaptadores:**

1. Preparar alícuotas de los oligonucleótidos adaptadores de cadena simple (stock de 100 μ M stock en 1X Elution Buffer EB: 10mM Tris-Cl, pH 8.5). Para la solución de trabajo combinar los adaptadores a un stock de 10 μ M en 1X AB (10X AB: 500 mM NaCl, 100 mM Tris-Cl, pH 7,5-8,0; 1 μ L P1_forward + 1 μ L P1_reverse + 8 μ L 1xAB). Poner los adaptadores combinados en un termociclador e incubar a 97.5°C durante 2:30 min, enfriar a un ritmo de 3°C/minute hasta los 21°C. Almacenar a 4°C.
2. Asignar una combinación de *barcodes* a cada individuo y anotarlas. Nota: Asegura esta información en una foto u hoja de cálculo de excel.
Aleatorizar las combinaciones para evitar sesgos (adaptadores no funcionales, etc.).

3. Preparar en tubos individuales de PCR:
- 0,5 μ l T4 ligasa (400 U/ μ l)
 - 4 μ l 10x tampón de ligación T4
 - 0,5 μ l Adaptador P1 correspondiente (10 μ M)
 - 0,5 μ l Adaptador P2 correspondiente (10 μ M)
 - hasta 20 μ l de ADN muestra
 - ddH₂O hasta completar un volumen total de 40.0 μ l

Nota: utilizar la muestra con la menor concentración de ADN como base (multiplicar la concentración por 20 μ l, el volumen total) y utilizar entonces la misma cantidad de ADN para todas las muestras (e.g. si la concentración mínima es de 30ng/ μ l, entonces la muestra contiene 600ng en 20 μ l. Ajustar el volume del resto de las muestras para que contengan la misma cantidad de ADN, e.g. si la concentración es de 50ng/ μ l utilizar entonces 12 μ l) La concentración más baja debería ser \geq 15ng/ μ L. Repetir las muestras de concentración menor.

Ligar durante 30 min a 25°C, seguido por 10 min de inactivación a 65°C, y enfriar lentamente hasta la temperatura ambiente en un termociclador (2°C cada 90 seg). Tras la ligación, todas las muestras individuales pueden juntarse. Para comprobar la ligación del conjunto de adaptadores se realiza una PCR utilizando cebadores rad (preferiblemente todas las combinaciones posibles de adaptadores P1 y P2 por librería). Una vez multiplexadas, las muestras son reconcentradas utilizando bolas magnéticas (en un volumen de 0.8x el de las muestras) por lo que se obtiene un volumen que puede ser utilizado conjuntamente (Elución en 40 μ L).

Tras una primera purificación mediante bolas magnética, todas las muestras pueden ser movilizadas conjuntamente. Para asegurar una representación conjunta de todas las muestras, cuantificar conjuntos separados de muestras empleando 1 μ L de ADN. Ajustar el volumen de todas las muestras para contener la misma cantidad de ADN que aquella de menor concentración. Combinar todas las muestras y purificar de nuevo con bolas magnéticas para obtener un volumen compatible con un gel de agarosa (Elución en 40 μ L).

Reservar 3 μ L para futuras cuantificaciones y/o Bionalyzer.

4) **Selección de tamaños:**

El rango de tamaños debe ser seleccionado mediante una prueba *in silico*. Para la selección, el rango elegido le serán añadidos 100 pb representados por los adaptadores. Nuestra elección para esta librería es de 250 pb hasta 400 pb.

La selección de tamaños se realiza en un gel de agarosa al 1% (<1.25% agarosa) con bajo TAE (70 ml) y extraído utilizando un kit para la recuperación de ADN de geles de agarosa (e.g. EURX GEL OUT) y centrifugado a 5000 x g durante 10 min. Correr 35 min a 110V.

Pesar un máximo de (<100 mg o 100 µL). En caso de superar este límite dividir en dos columnas (cortar a la mitad verticalmente).

Cuantificar la elución de ADN resultante con un fluorómetro HS Qubit utilizando 2µL.

5) **Enriquecimiento de RAD tag:**

1. Realizar el máximo número de reacciones PCR posible de 10µL. **15 ciclos:**

- 0,8 µl DNTPs
- 2,0 µl Buffer (MyTaq)
- 0,5 µl High Fidelity MyTaq
- 0,5 µl del cebador RAD F (10µM)
- 0,5 µl del cebador RAD R (10µM)
- 4 ng del templado de la librería RAD (máx. 4µl).
- Completar hasta 10 µl con ddH₂O.
- Realizar de una vez el máximo número de PCR posible.

Hacer una adicional con la misma mezcla de reactivos y condiciones, pero de 40 ciclos para comprobar la amplificación. Usar 1 µl ADN + X agua.

Comprobar la PCR de 40 ciclos en un gel de agarosa ~12 min (120V). Cargar todo el volumen y comparar con un volumen de ADN pre-PCR igual al añadido a la PCR (en este caso 1.0 µl)

2. Correr en un gel para limpiar los contaminantes:

- Cargar toda la muestra en un gel de agarosa al 1,25%, 1X TBE y correr **45min** a 100V con 10 µl 100bp DNA Ladder como referencia de tamaños.
Para evitar pasos extra (como purificación con bolas magnéticas) en los cuales el ADN podría perderse, utilizar un volumen de 70 ml para el gel y combinar dos pocillos para que el volumen encaje (en este caso estamos trabajando con 90 µl).
- Tomar una foto del gel. Extraer el ADN utilizando un kit de columnas Gel-out EurX
- Realizar perfil en BioAnalyzer
- Realizar qPCR para comprobar si la amplificación es suficiente (con cebadores RAD)

6) **Secuenciación**

Enviar librería para su secuenciación en una plataforma Illumina. Reservar 10 µl en el laboratorio como referencia para futuros tamaños de librerías

VII. Valores F_{ST}, F_{IS}, H_E y H_O generados por el paquete HIERFSTAT v0.5-11 de R v4.1.3:

Tabla 3a. Valores de heterocigosidades esperada y observada (H_E y H_O) e índices de fijación (F_{ST} y F_{IS}) para el conjunto de los loci estudiados a nivel global de los individuos del estudio, **Tabla 3b.** valores individuales para los loci estudiados en la especie *M. polli*, y **Tabla 3c.** valores individuales para los loci estudiados en la especie *M. senegalensis*.

<i>M. polli</i> + <i>M. senegalensis</i>	H _O	H _E	F _{ST}	F _{IS}
	0,0864	0,0904	0,7753	0,0437

<i>M. polli</i>	H _O	H _E	F _{ST}	F _{IS}
	0,2487	0,2472	0,0017	-0,0062

<i>M. senegalensis</i>	H _O	H _E	F _{ST}	F _{IS}
	0,2341	0,2515	0,0018	0,0691

Tabla 4a. Valores F_{IS} entre poblaciones de *M. polli*, **Tabla 4b.** Valores F_{IS} entre poblaciones de *M. senegalensis* y **Tabla 4c.** Valores de F_{IS} totales para el conjunto de poblaciones muestreadas de ambas especies.

F _{IS}	MP-01	MP-02	MP-0C	MP-0V
	-0,0416	-0,0503	0,0288	0,0198

F _{IS}	MS-01	MS-02	MS-03	MS-0V
	0,0571	0,0561	0,0574	0,1089

F _{IS}	Total
	0,0325

Tabla 5a. Distancia por pares de valores F_{ST} entre el conjunto total de poblaciones muestreadas para ambas especies.

F _{ST}	MP-01	MS-01	MP-02	MS-02	MP-0C	MS-03	MP-0V	MS-0V
MP-01		0,8540	-0,0230	0,8455	0,0035	0,8674	-0,0086	0,8672
MS-01			0,8541	-0,0279	0,8955	-0,0378	0,8937	-0,1074
MP-02				0,8454	0,0004	0,8672	-0,0107	0,8663
MS-02					0,8877	-0,0302	0,8857	-0,0831
MP-0C						0,9077	-0,0064	0,9077
MS-03							0,9061	-0,0327
MP-0V								0,9060
MS-0V								

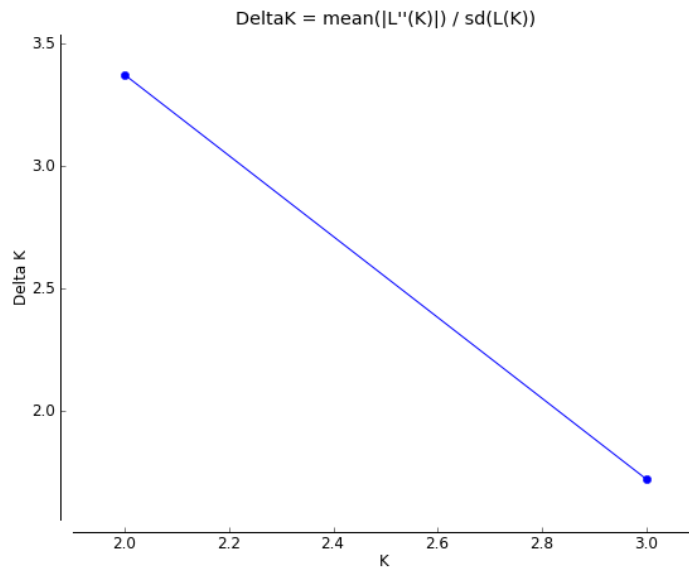
Tabla 5b. Valores F_{ST} entre poblaciones de *M. polli*, y **Tabla 5c.** Valores F_{ST} entre poblaciones de *M. senegalensis*.

F _{ST}	MP-01	MP-02	MP-0C	MP-0V
MP-01		0,0006	0,0055	-0,0004
MP-02			0,0021	0,0034
MP-0C				0,0021

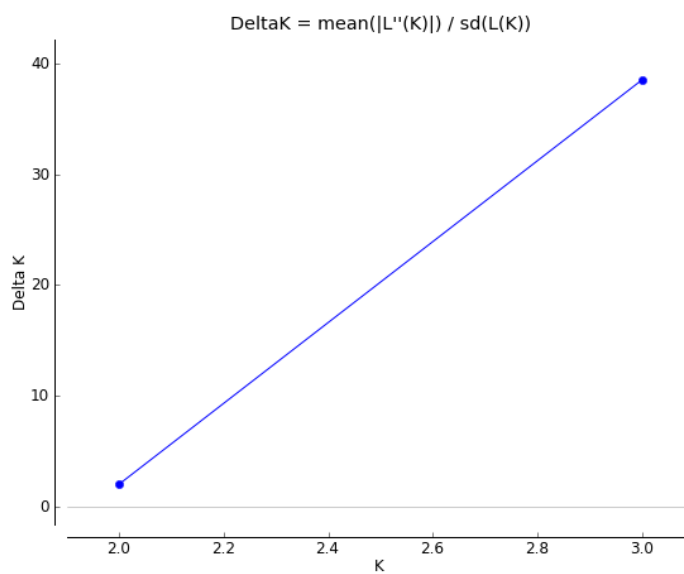
F _{ST}	MS-01	MS-02	MS-03	MS-0V
MS-01		-0,0002	0,0038	-0,0004
MS-02			-0,0005	-0,0029
MS-03				0,0015

VIII. Resultados del análisis de datos arrojados por STRUCTURE v2.3.4 a través del software STRUCTURE HARVESTER v0.6.94 en el cual se determina el número de *clusters* (K) más probable para cada conjunto de datos (valor más alto de Delta K):

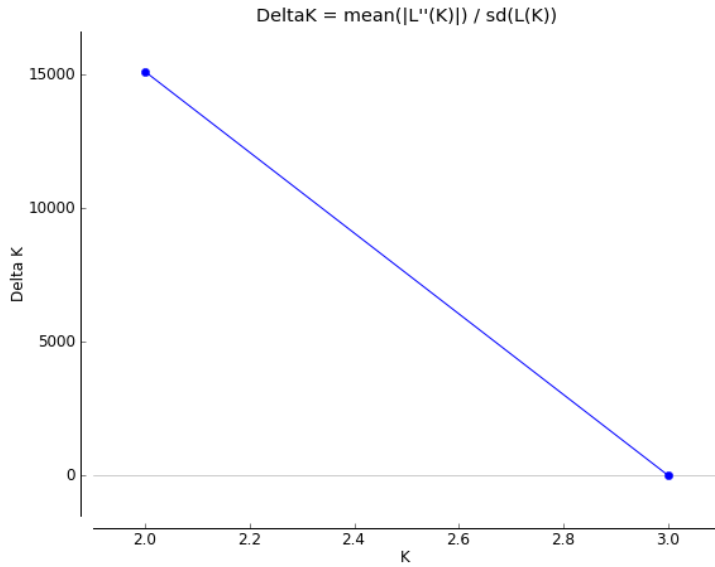
M. senegalensis:



M. polli:



***M. senegalensis* + *M. polli*:**



IX. Resultados del análisis de datos arrojados por STRUCTURE v2.3.4 del número de *clusters* (K) más probable para cada conjunto de datos:

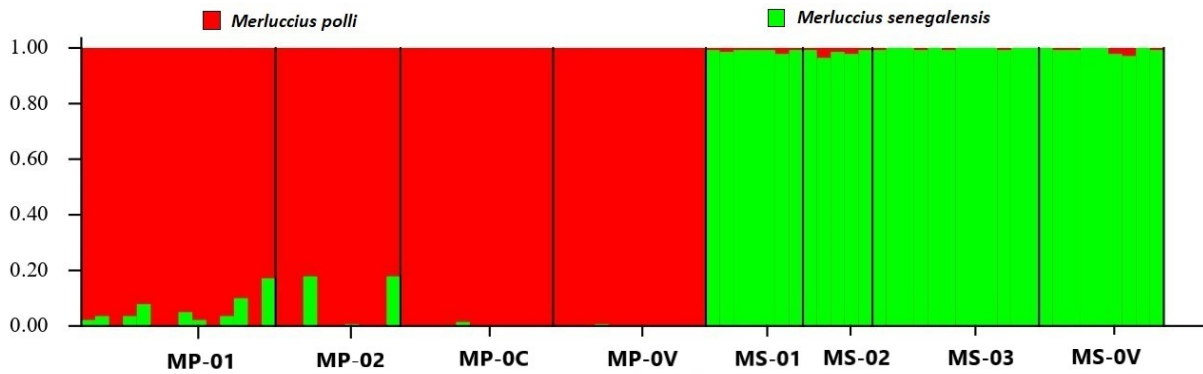


Figura 5a. Asignación individual a distintos *clusters* genéticos (K=2) generado por STRUCTURE v2.3.4 en el que se muestra la agrupación por *clusters* entre *M. polli* (rojo) y *M. senegalensis* (verde) en base a su similitud genética.

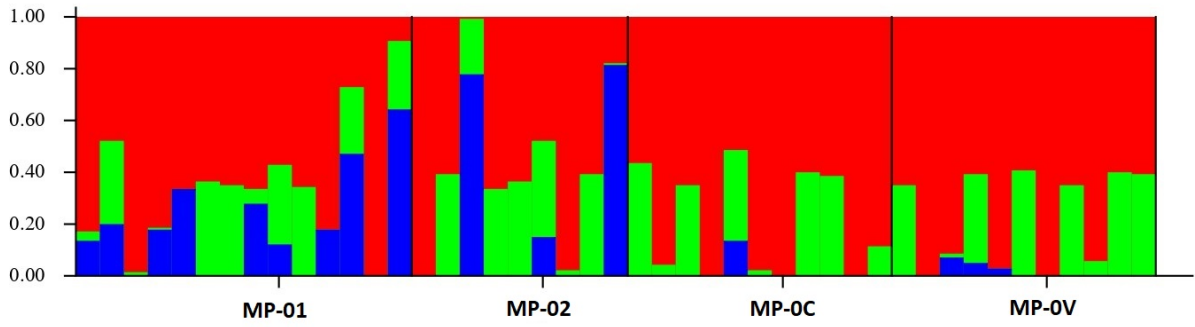


Figura 5b. Asignación individual a distintos *clusters* genéticos (K=3) generado por STRUCTURE v2.3.4 en el que se muestra la agrupación por *clusters* de individuos de la especie *M. polli* en base a su similitud genética.

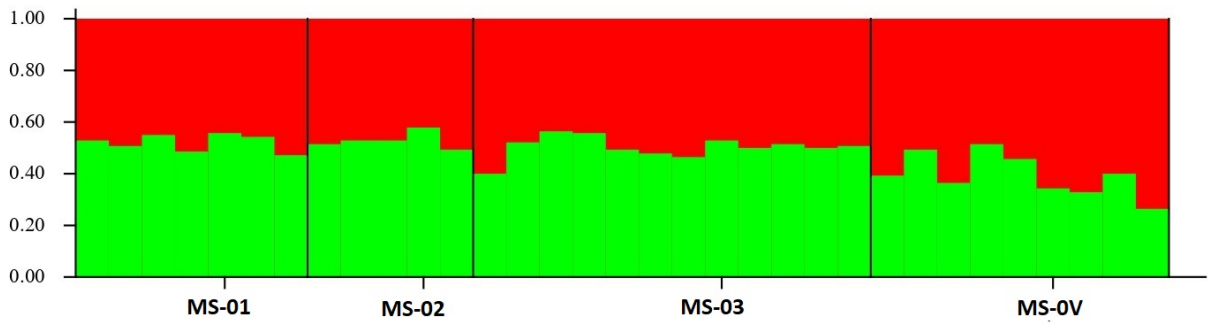


Figura 5c. Asignación individual a distintos *clusters* genéticos (K=2) generado por STRUCTURE v2.3.4 en el que se muestra la agrupación por *clusters* de individuos de la especie *M. senegalensis* en base a su similitud genética.