



Universitat de Girona

# VARIABILITAT GENÈTICA I ESTRUCTURA POBLACIONAL EN TRES ESPÈCIES DE LA FAMÍLIA SCOMBRIDAE, SARDA SARDA, THUNNUS ALALUNGA I THUNNUS THYNNUS, BASADA EN LA REGIÓ CONTROL DEL DNA MITOCONDRIAL

**Jordi VIÑAS DE PUIG**

**ISBN: 978-84-694-2801-6**

**Dipòsit legal: GI-420-2011**

<http://hdl.handle.net/10803/7645>

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei [TDX](#) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio [TDR](#) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the [TDX](#) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE GIRONA  
Facultat de Ciències  
Laboratori d'Ictiologia Genètica

TESI DOCTORAL

Variabilitat genètica i estructura poblacional en tres  
espècies de la família Scombridae, *Sarda sarda*,  
*Thunnus alalunga* i *Thunnus thynnus*, basada en la  
regió control del DNA mitocondrial

**Jordi Viñas de Puig**

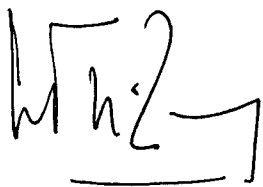
Març de 2001

CARLES PLA ZANUY, PROFESSOR TITULAR DE L'ÀREA DE  
GENÈTICA DEL DEPARTAMENT DE BIOLOGIA DE LA UNIVERSITAT  
DE GIRONA

CERTIFICA,

Que el treball titulat **Variabilitat genètica i estructura poblacional en tres espècies de la família Scombridae, *Sarda sarda*, *Thunnus alalunga* i *Thunnus thynnus***, basada en la regió control del DNA mitocondrial presentat per **Jordi Viñas de Puig** per a obtenir el grau de Doctor, ha estat realitzat sota la seva direcció en el Laboratori d'Ictiologia Genètica de la Universitat de Girona, el considera acabat i autoritza la seva presentació al tribunal qualificador

Girona, març de 2000

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'C. Pla Zanuy', with a horizontal line underneath.

Carles Pla Zanuy

# AGRAÏMENTS

En el moment de plantejar-te els agraïments sempre surten qüestions difícils de resoldre, no et voldries deixar ningú per un simple error de memòria. Així, de forma general, voldria incloure en aquest apartat a tota la gent, que d'una forma o altra, ha contribuït a la realització d'aquesta tesi.

Tot i això, voldria ressaltar el meu sincer agraïment a en Carles, per la seva confiança i suport, i per haver estat qui m'ha sofert durant la direcció d'aquest treball. No em voldria deixar als dos jefecillos de l'àrea, que ja comencen a ser jefasos, pel seu assessorament tant en qüestions de feina com en qualsevol altra.

Vull expressar el meu agraïment al Dr Jaime Alvarado Bremer que, ara ja fa quants anys, va ser qui em va iniciar en el treball del laboratori, i que malgrat la distància sempre hem tingut un contacte molt enriquidor. No em vull deixar a en José Miguel de la Serna, sempre disposat a compartir d'un forma amena els seus immensos coneixements sobre les tonyines.

Agreixo, i molt especialment, a la Núria i a en Martí per les moltíssimes hores compartides. Aquest treball no hagués estat possible sense ells. També a l'altra gent de genètica, la Rosa i en Martí C que ja fa uns anys que treballem junts. No em voldria deixar a tota la gent que ha anat passant per l'àrea de Genètica durant aquests anys.

Finalment vull recordar la meva família, sempre han estat al meu costat. I a la Gloire, que a més també li dedico aquest treball.

# Índex

Índex .....	<i>i</i>
Abreviacions.....	<i>v</i>
<b>PRESENTACIÓ I OBJECTIUS .....</b>	<i>vii</i>

## **1. INTRODUCCIÓ**

<b>1.1. FAMÍLIA SCOMBRIDAE.....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Característiques generals i filogènia .....	3
<b>1.2. GÈNERE SARDA.....</b>	<b>6</b>
1.2.1. Característiques generals i distribució .....	6
1.2.2. El bonítol ( <i>Sarda sarda</i> ), característiques generals i biologia....	7
<b>1.3. GÈNERE THUNNUS.....</b>	<b>9</b>
1.3.1. Característiques generals i filogènia .....	9
1.3.2. La bacora ( <i>Thunus alalunga</i> ) característiques generals, distribució i biologia.....	10
1.3.3. La tonyina ( <i>Thunnus thynnus thynnus</i> ), característiques generals, distribució i biologia .....	13
<b>1.4. IMPORTÀNCIA COMERCIAL I GESTIÓ DE LES PESQUERIES DE LES TRES ESPÈCIES.....</b>	<b>16</b>
1.4.1. El bonítol .....	16
1.4.2. La bacora.....	17
1.4.3. La tonyina .....	18
1.4.4. La gestió de les pesqueries i l'aplicació de les eines genètiques .....	19

1.5. L'EINA GENÈTICA UTILITZADA: LA VARIABILITAT DE SEQÜÈNCIA DE LA REGIÓ CONTROL DEL mtDNA .....	21
1.6. ESTUDIS POBLACIONALS PREVIS.....	24
<b>2. ESTRUCTURA I EVOLUCIÓ DEL D-LOOP</b>	
2.1. INTRODUCCIÓ .....	31
2.1.1. Estructura del D-loop .....	32
2.1.2. Evolució del D-loop .....	33
2.2. MATERIAL I MÈTODES.....	36
2.2.1. Seqüències disponibles .....	36
2.2.2. Anàlisi de les seqüències .....	36
2.3. RESULTATS .....	38
2.3.1. Característiques generals .....	38
2.3.2. Estructura del D-loop .....	39
2.3.2.1. <i>Domini I</i> .....	42
2.3.2.2. <i>Domini II central</i> .....	45
2.3.2.3. <i>Domini III</i> .....	45
2.3.3. Patrons de substitució nucleotídica .....	47
2.4. DISCUSSIÓ.....	53
2.4.1. Característiques generals .....	53
2.4.2. Blocs de seqüència conservada al llarg de la regió control.....	54
2.4.3. Patrons de substitució nucleotídica .....	56
<b>3. MATERIAL I MÈTODES</b>	
3.1. MATERIAL BIOLÒGIC .....	63
3.1.1. Bonitol.....	64
3.1.2. Bacora.....	65
3.1.3. Tonyina.....	67
3.1.4. Preparació dels teixits.....	68
3.2. TREBALL DE LABORATORI .....	70
3.2.1. Extracció del DNA .....	70
3.2.2. Amplificació per PCR de la regió control del mtDNA i primers utilitzats .....	70
3.2.3. Seqüenciació del DNA.....	72

<b>3.3. ANÀLISIS DE LES DADES .....</b>	<b>74</b>
<b>3.3.1. Índexs de diversitat molecular.....</b>	<b>74</b>
<b>3.3.2. Test de neutralitat .....</b>	<b>75</b>
<b>3.3.3. Anàlisi filogenètica .....</b>	<b>76</b>
3.3.3.1. <i>Anàlisi de neighbor-joining .....</i>	<i>77</i>
3.3.3.2. <i>Anàlisi de la màxima parsimònia.....</i>	<i>79</i>
3.3.3.3. <i>Bootstrap.....</i>	<i>80</i>
<b>3.3.4. Anàlisi de l'estructura geogràfica de la variabilitat genètica.....</b>	<b>81</b>
3.3.4.1. <i>Simulació de Monte Carlo.....</i>	<i>81</i>
3.3.4.2. <i>Anàlisi de l'AMOVA.....</i>	<i>81</i>
3.3.4.3. <i>Anàlisi de Holsinger &amp; Mason-Gamer.....</i>	<i>82</i>
<b>3.3.5. Anàlisi de la demografia històrica.....</b>	<b>83</b>
3.3.5.1. <i>Mismatch distribution.....</i>	<i>83</i>
<b>4. RESULTATS</b>	
<b>4.1. BONÍTOL.....</b>	<b>87</b>
4.1.1. <i>Anàlisi descriptiva i índexs de variabilitat molecular.....</i>	<i>87</i>
4.1.2. <i>Anàlisi filogenètica.....</i>	<i>89</i>
4.1.3. <i>Estructura geogràfica de la variabilitat genètica.....</i>	<i>93</i>
4.1.4. <i>Demografia històrica .....</i>	<i>99</i>
<b>4.2. BACORA .....</b>	<b>101</b>
4.2.1. <i>Anàlisi descriptiva i índexs de variabilitat molecular.....</i>	<i>101</i>
4.2.2. <i>Anàlisi filogenètica.....</i>	<i>104</i>
4.2.3. <i>Anàlisi de l'estructura geogràfica de la variabilitat genètica.....</i>	<i>108</i>
4.2.3.1. <i>Anàlisi preliminar.....</i>	<i>108</i>
4.2.3.2. <i>Anàlisi de l'estructura geogràfica de la variabilitat genètica en sis localitats .....</i>	<i>109</i>
4.2.3.3. <i>Anàlisi de l'estructura geogràfica de la variabilitat genètica en tres localitats.....</i>	<i>111</i>
4.2.3.4. <i>Diversitat molecular de l'Atlàntic i el Mediterrani i demografia històrica a cada localitat.....</i>	<i>111</i>
<b>4.3. TONYINA.....</b>	<b>120</b>
4.3.1. <i>Anàlisi descriptiva.....</i>	<i>120</i>
4.3.2. <i>Anàlisi filogenètica.....</i>	<i>123</i>
4.3.2.1. <i>Anàlisi independent de la clada 2 .....</i>	<i>128</i>
4.3.3. <i>Anàlisi de la variabilitat genètica .....</i>	<i>133</i>
4.3.3.1. <i>Estabilitat temporal de la variabilitat genètica dins del Mediterrani.....</i>	<i>134</i>
4.3.3.2. <i>Estructura geogràfica de la variabilitat genètica dins del Mediterrani.....</i>	<i>136</i>
4.3.3.3. <i>Comparació Atlàntic oest i Mediterrani .....</i>	<i>138</i>
4.3.4. <i>Anàlisi de la demografia històrica.....</i>	<i>142</i>

<b>5. DISCUSSIÓ</b>	
5.1. CALIBRATGE DEL RELLOTGE MOLECULAR.....	147
5.2. BONÍTOL.....	148
5.2.1. Estructura geogràfica de la variabilitat genètica.....	148
5.2.2. Filogeografia i formació dels dos llinatges mitocondrials.....	152
5.2.3. Elevada divergència dels dos llinatges mitocondrials.....	159
5.3. BACORA.....	162
5.3.1. Diferenciació genètica entre la bacora de l'Atlàntic i del Mediterrani.....	162
5.3.2. Origen de la diferenciació Atlàntica / Mediterrani i filogeografia de la bacora.....	165
5.3.3. Homogeneïtat genètica dins del mar Mediterrani i dins de l'oceà Atlàntic.....	168
5.4. TONYINA.....	171
5.4.1. Homogeneïtat genètica dins del mar Mediterrani.....	171
5.4.1.1. Estabilitat temporal dins del Mediterrani.....	171
5.4.1.2. Homogeneïtat genètica dins del mar Mediterrani.....	172
5.4.2. Homogeneïtat entre l'Atlàntic oest i el Mediterrani.....	174
5.4.3. Introgressió mitocondrial entre espècies de <i>Thunnus</i> .....	179
<b>6. DISCUSSIÓ GENERAL</b>	
6.1. NIVELLS DE VARIABILITAT I PATRONS D'ESTRUCTURACIÓ GEOGRÀFICA.....	185
6.2. QÜESTIONS PENDENTS.....	190
6.3. GESTIÓ.....	192
6.3.1. Bonítol.....	193
6.3.2. Bacora.....	194
6.3.3. Tonyina.....	194
<b>7. CONCLUSIONS.....</b>	<b>199</b>
<b>8. REFERÈNCIES.....</b>	<b>203</b>
<b>ANNEX.....</b>	<b>219</b>



## **Abreviacions**

$\alpha$	Taxa de mutació transicional
$\beta$	Taxa de mutació transversional
$\pi$	Diversitat nucleotídica
<b>cit <i>b</i></b>	Gen del citocrom <i>b</i>
<b>CSB</b>	Blocs de seqüència conservada ( <i>Conserved Sequence Blocks</i> )
<b>gdl</b>	Graus de llibertat
<b>ETAS</b>	Seqüències ampliades associades a la terminació ( <i>Extented Termination Associated Sequences</i> )
<b><i>h</i></b>	Diversitat haplotípica
<b>HSP</b>	Promotor de la cadena pesada
<b><i>I<sub>c</sub></i></b>	Índex de consistència
<b><i>I<sub>H</sub></i></b>	Índex d'homoplàsia
<b>LSP</b>	Promotor de la cadena lleugera ( <i>Light Strand Promotor</i> )
<b>mtDNA</b>	DNA mitocondrial
<b><i>O<sub>H</sub></i></b>	Origen de la replicació de la cadena pesada
<b>OTU</b>	Unitats taxonòmiques de treball ( <i>Operational Taxonomic Units</i> )
<b>PCR</b>	Reacció en cadena de la polimerasa ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
<b>pb</b>	Parells de bases
<b><i>r</i></b>	Relació transicions / transversions
<b>TAS</b>	Seqüències associades a la terminació ( <i>Termination Associates Sequences</i> )
<b>tRNA<sup>Pro</sup></b>	RNA transferent de la prolina
<b>tRNA<sup>Phe</sup></b>	RNA transferent de la fenilalanina
<b>VNTR</b>	Repeticions en tàndem de nombre variable ( <i>Variable Number Tandem Repeats</i> )

## ***Presentació i objectius***

Aquest treball es centre en el coneixement de l'estructura poblacional de tres espècies piscícoles de la família Scombridae, el bonítol (*Sarda sarda*), la bacora (*Thunnus alalunga*) i la tonyina (*Thunnus thynnus*) en la seva distribució de l'atlàntic i el mediterrani. Les tres espècies es caracteritzen per habitar les aigües pelàgiques i, sobretot en cas de la bacora i la tonyina, per realitzar grans migracions. Les pesqueries de les tres espècies són molt importants tant a nivell econòmic com de captures, el que està portant, en algun cas, a la sobreexplotació del recurs pesquer.

A part de la pròpia importància de saber quina és la possible estructura poblacional de cadascuna de les espècies, el coneixement de l'estructura poblacional pren un valor afegit quan s'estudien espècies amb aquests nivells tant elevats de captures.

A partir de la participació del Laboratori d'Ictiologia Genètica en el projecte europeu MED/91/012 "Characterization of large pelagic stocks (*Thunnus thynnus*, *Thunnus alalunga*, *Sarda sarda*, *Xiphias gladius*) in the Mediterranean" realitzat durant el període 1993-1995 i la col·laboració amb altres investigadors, es van implementar al laboratori les tècniques genètiques per poder estudiar la variabilitat mitocondrial com una eina per elucidar l'estructura poblacional d'aquestes i altres espècies marines.

Posteriorment, el laboratori va participar en un segon projecte europeu 95/010 "Study of fishing and biology of juvenile bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) from 0-1 age class in the Mediterranean and eastern Atlantic" que

es va desenvolupar durant el període 1996-98. Aquest segon projecte es va centrar només en la biologia, la pesca i la distribució del juvenils de tonyina.

La disponibilitat de mostres i el coneixement adquirit amb la participació dels dos projectes ha permès configurar la base d'aquesta tesi.

## **OBJECTIUS**

L'objectiu final d'aquesta tesi ha estat definir els possibles patrons d'estructuració poblacional de les tres espècies mitjançant l'estudi de la variabilitat de seqüència de la regió control del DNA mitocondrial.

Per tal de poder complir aquest objectiu final s'han plantejat una sèrie d'objectiu parcials:

- En primer terme s'ha avaluat quina és l'estructura i quins són els patrons d'evolució de la regió control del DNA mitocondrial, per així poder aplicar els mètodes d'anàlisi més adequats.
- En segon lloc, s'ha utilitzat aquest coneixement per avaluar la diferenciació genètica entre les mostres a cadascuna de les espècies.
- L'últim objectiu ha estat interpretar els resultats en relació a la biologia de les espècies i els coneixements d'estudis previs. Així com també comparar i discutir les hipòtesis proposades amb altres hipòtesis tretes d'estudis relacionats.

En aquest sentit, els resultats i les conclusions a partir del treball realitzat proposades tenen l'objectiu final d'ampliar el coneixement necessari per a aplicar una correcta gestió a les pesqueries d'aquestes espècies.

# *1. Introducció*

# **1. Introducció**

## **1.1. FAMÍLIA SCOMBRIDAE**

### **1.1.1. Característiques generals i filogènia**

La família Scombridae són peixos teleostis marins de vida pelàgica i amb una capacitat extraordinària de natació i migració. Se'ls coneix com túnids, paraula provinent del mot grec "tuna" que significa rapidesa. Aquest nom sorgeix per la gran velocitat que poden assolir quan naden. Això fa que desenvolupin uns múscles molt forts que des de la prehistòria ja eren molt apreciats com a font d'alimentació. A l'actualitat, continuen essent molt apreciats, suportant una de les pesqueries de més importància econòmica mundial.

La família dels escòmbrids comprèn un total de 15 gèneres i 49 espècies totes amb un cos fusiforme i una cua en forma de lluna. Malgrat que les relacions filogenètiques dins de la família no està del tot clara, Carpenter *et al.* (1995) proposa la classificació amb dos subfamílies, Scombrinae i

Gasterochismatinae, i quatre tribus dins de la primera subfamília, Scombrini, Sardini, Thunnini, Scomberomorini com la més adequada per a aquesta família (TAULA 1.1). La distribució geogràfica de la família és molt àmplia, trobant-se entre els 40°N i els 40°S, tot i que poden arribar fins a latituds de 70°N (Collette i Nauen, 1983).

Dins de la família dels escòmbrids i més concretament en els quatre gèneres de la tribu Thunnini es desenvolupa l'endotèrmia (Carey & Lawson, 1973), característica única entre els teleostis. La capacitat d'augmentar la temperatura d'alguns òrgans, que en algun cas pot portar a un augment de la temperatura del múscle fins a 21°C, sobre la temperatura de l'aigua (Carey & Lawson, 1973), té un cost energètic elevat. Malgrat la despesa metabòlica que representa l'endotèrmia, aquestes espècies tenen certes

TAULA 1.1. Classificació de família Scombridae segons Carpenter *et al.* (1995). Els números entre parèntesis indiquen quantes espècies pertanyen al gènere.

Phylum VERTEBRATA		
Superclase Gnathostomata		
Serie Pisces		
Clase Osteichthyes		
Subclase Telostei		
Ordre Perciformes		
Família Scombridae		
Subfamília Scombrinae		
Tribu Scombrini		
<i>Scomber</i>	(3)	
<i>Rastrelliger</i>	(3)	
Tribu Sardini		
<i>Sarda</i>	(4)	
<i>Gymnosarda</i>	(1)	
<i>Cybiosarda</i>	(1)	
<i>Orcynopsis</i>	(1)	
<i>Allothunnus</i>	(1)	
Tribu Thunnini		
<i>Auxis</i>	(2)	
<i>Thunnus</i>	(7)	
<i>Katsuwonus</i>	(1)	
<i>Euthynnus</i>	(3)	
Tribu Scomberomorini		
<i>Grammatorcynnus</i>	(2)	
<i>Acanthocybium</i>	(1)	
<i>Scomberomorus</i>	(18)	
Subfamília Gasterochismatinae		
<i>Gasterochisma</i>	(1)	

avantatges selectives respecte a les espècies ecotèrmiques. Per exemple, poden ampliar el seu nínxol tèrmic i així poder expandir la seva àrea de distribució a aigües més fredes (Block & Finnerty, 1994). A més, l'endotèrmia augmenta el rendiment dels múscles responsable d'impulsar les espècies (Altringham & Block, 1997).

## 1.2. GÈNERE SARDA

### 1.2.1. Característiques generals i distribució

El gènere *Sarda* inclou quatre espècies de distribució al·lopàtrica (FIGURA 1.1): *S. sarda* (Bloch, 1793), *S. chiliensis* (Cuvier, 1831), *S. orientalis* (Temmick i Schlegel, 1844) i *S. australis* (MacLeay, 1880).

Els individus d'aquest gènere es caracteritzen morfològicament per ser peixos relativament petits, generalment no superen els 70cm de longitud furcal, i amb un cos fusiforme. L'àmbit de les espècies és clarament nerític amb una preferència d'aigües de menys de 200 m de profunditat i amb un rang de temperatura de 12°C a 25°C (Yoshida, 1980).

El gènere *Sarda* és un escòmbrid ectoderm amb certa una internalització del múscle vermell, pas evolutiu previ a l'endotèrmia (Block *et al.*, 1993).

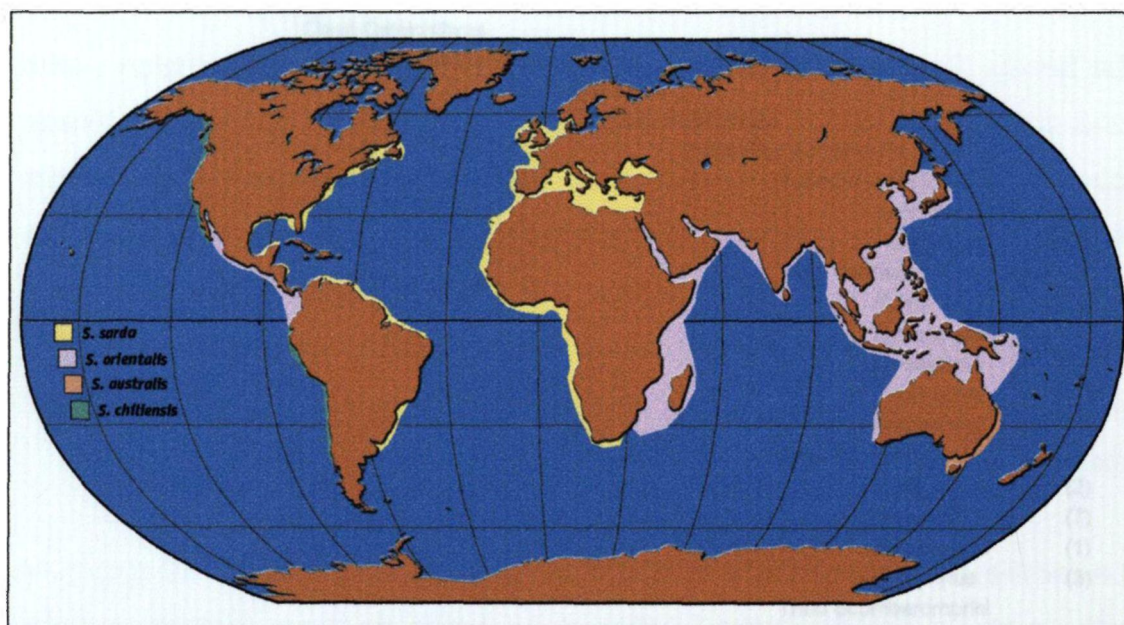


FIGURA 1.1. Distribució mundial de les quatre espècies del gènere *Sarda*



### 1.2.1. El bonítol (*Sarda sarda*), característiques generals i biologia

El bonítol és una espècie amb una coloració de dors blau fosc amb unes bandes longitudinals més fosques i amb un ventre net de taques. El cos de bonítol és de forma fusiforme amb una longitud furcal que sol assolir el 60 cm de longitud i un pes d'uns 2,5 kg (Collette & Chao, 1975, Rey *et al.*, 1984) (FIGURA 1.2).

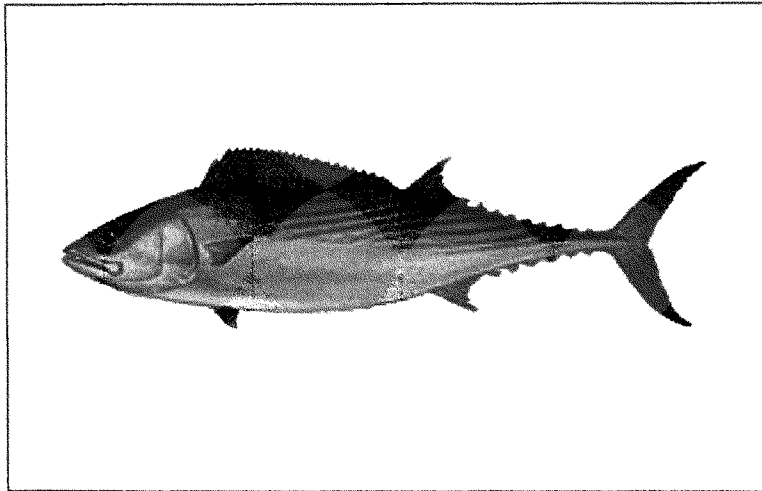


FIGURA 1.2. Bonítol (*Sarda sarda*)

Les dades creixement i l'edat de la maduresa sexual d'aquesta espècie no estan del tot clares. Segons Rey *et al.* (1984) en el Mediterrani i l'Atlàntic est, el bonítol és madur sexualment al primer any de vida amb una talla de 37 cm. En canvi, l'estudi de De Metrio *et al.* (1995) es proposa un creixement més lent, i en conseqüència el peix assoliria la maduresa sexual al segon any de vida amb una talla d'uns 42 cm.

El bonítol es troba sempre associat a la plataforma continental i es distribueix en aigües tropicals i temperades a llarg de les costes de l'oceà Atlàntic, el mar Mediterrani i el mar Negre. A l'Atlàntic oest s'han localitzat bonítols en la franja entre els 35°S i els 45°N al llarg de la costa del continent americà. L'àrea de distribució de l'Atlàntic est és fins i tot una mica més ampla, abraça

des de Sud-Àfrica (aproximadament a 34°S) fins prop d'Oslo (60°N). També es present a les illes Açores (FIGURA 1.1) (Collette & Chao, 1975).

Dins del Mediterrani, zona de mostreig d'aquesta tesi, i al mar Negre la reproducció del bonítol es dona entre la primavera i l'estiu en dues àrees totalment separades: una a la vessant occidental del mar Mediterrani (Yoshida, 1980; Rey *et al.*, 1984) i la segona es localitza dins del mar Negre (Demir, 1963).

El comportament migratori d'aquest espècie està relacionat amb les àrees i les èpoques de reproducció. La migració comença un cop realitzada la fresa, part dels peixos que han realitzat la posta en el Mediterrani occidental surten a l'Atlàntic per alimentar-se, l'altra fracció de la població es queda hivernant dins del Mediterrani. Els bonítols que realitzen la posta al mar Negre, a principis de tardor i després de la reproducció, surten a través del Bòsfor i el mar de Màrmara al mar Egeu per alimentar-se i passar-hi l'hivern. Una part de la població oriental individus romanen dins del mar Negre i el mar de Màrmara durant tot l'any (Demir, 1963; Yoshida, 1980; Rey *et al.*, 1984).

### 1.3. GÈNERE *THUNNUS*

#### 1.3.1. Característiques generals i filogènia

El gènere *Thunnus* està constituït per set espècies amb una distribució circumglobal: la tonyina *T. thynnus* (Linné, 1758); la bacora, *T. alalunga* (Bonnaterre, 1788); la tonyina d'aleta groga *T. albacares* (Bonnaterre, 1788); el *T. atlanticus* (Lesson, 1830); la tonyina d'ulls grossos, *T. obesus* (Lowe, 1839); *T. tonggol* (Bleeker, 1851) i la tonyina del sud *T. maccoyii* (Castelnau, 1872). L'espècie *T. thynnus* comprèn dues subespècies de distribució al·lopàtriques: la tonyina de l'Atlàntic *T. t. thynnus* (Linné, 1758) i la tonyina del Pacífic, *T. t. orientalis* (Temmick i Schlegel, 1844) (Gibbs & Collette, 1967).

En general totes les espècies d'aquest gènere són individus de talla gran, s'han arribat a mesurar tonyines de l'Atlàntic de més de 3 m de talla, (Safina, 1993) amb un cos fusiforme adaptat per a un millor eficiència a la natació (Weihs, 1989). Totes les tonyines tenen una coloració blava fosca a la meitat superior del cos i un color platejat a l'altra meitat (Gibbs & Collette, 1967).

La filogènia del gènere actualment està en una certa controvèrsia (Collette, 1999). Els morfòlegs han separat les tonyines en dos grups segons la seva distribució, el subgènere *Noethunnus* distribuït en aigües calentes del qual són membres la tonyina d'aleta groga (*Thunnus albacares*), el *T. tonggol* i el *T. atlanticus*. La característica comuna d'aquest grup és la presència d'intercanviadors de calor tant en el centre com en el lateral del múscle lent. La segona agrupació, el subgènere *Thunnus*, inclou: la bacora (*T. alalunga*), les dues subespècies de tonyina (*T. thynnus thynnus* i *T. thynnus orientalis*) i la tonyina del sud (*T. maccoyi*). Totes aquestes tonyines tenen preferència per aigües més fredes, i presenten una termoregulació més complexa i eficient (Gibbs & Collette, 1967, Collette, 1978). Una excepció és la tonyina

d'ulls grossos (*T. obesus*), que comparteix pràcticament el mateix nombre de caràcters amb cada grup. Tot i això, aquesta espècie s'ha classificat tradicionalment dins del grup *Thunnus* ja que es considera que els caràcters compartits amb aquest grup són derivats degut a l'adaptació de viure en aigües més fredes (Collette, 1978).

Els estudis moleculars, tant els basats amb al·loenzims com els basats en el mtDNA (DNA mitocondrial), coincideixen en l'origen monofilètic del gènere *Thunnus*. Recentment, Alvarado Bremer *et al.* (1997), analitzant la variabilitat de seqüència de la regió control del mtDNA, descriuen l'origen monofilètic d'aquest gènere i estan d'acord amb els estudis basats en la classificació obtinguda per les dades morfològiques (Gibs & Collete, 1967; Collete, 1979). Una filogènia coincident del gènere també s'ha obtingut mitjançant l'anàlisi d'al·loenzims (Elliot & Ward, 1995), del citocrom *b* del mtDNA (Block *et al.*, 1993; Finnerty & Block, 1995) i també amb l'anàlisi de la seqüència del gen de l'ATPasa mitocondrial (Chow & Kishino, 1995)

Una controvèrsia surt quan es vol definir la relació de les dues subespècies de *T. thynnus*. Mentre que tots els anàlisi mitocondrials suggereixen una llarga història evolutiva d'aquestes dues subespècies (Chow & Kishino, 1995; Alvarado Bremer *et al.*, 1997), les anàlisi basades en gens nuclears, com els al·lozímics (Sharp & Pirages, 1987) o RFLP de la regió nuclear *ITS1* (Chow i Kishino, 1995), mostren que les dues subespècies són molt similars.

### **1.3.2. La bacora (*Thunnus alalunga*) característiques generals, distribució i biologia**

Coincidint amb les característiques generals de la família, la bacora té un cos fusiforme molt hidrodinàmic. Un tret peculiar d'aquesta espècie és la llargària de l'aleta pectoral, la qual pot superar el 30% de la longitud furcal, d'aquí surt nom d'*alalunga* (aleta llarga) per a aquesta espècie (Gibbs &

Collette, 1975). La coloració d'aquesta espècie és similar a la descrita pel gènere amb el dors blau fosc i el ventre platejat (FIGURA 1.3).

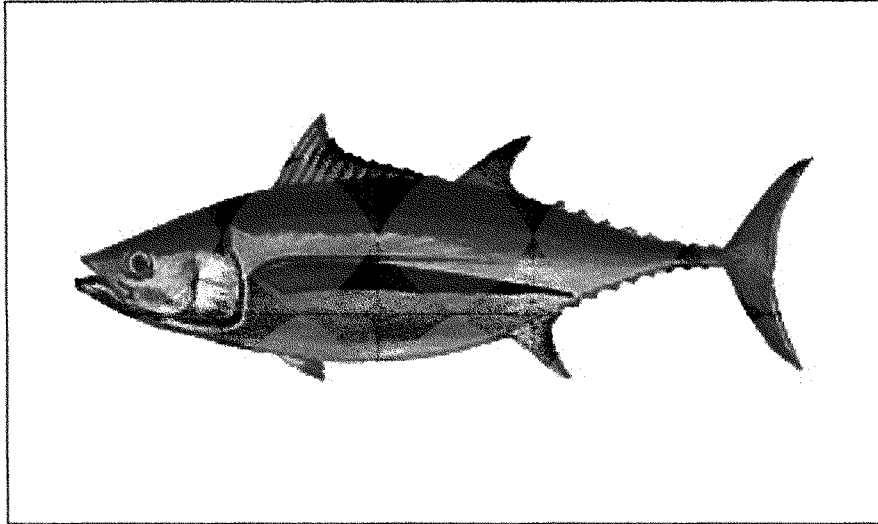


FIGURA 1.3. Bacora (*Thunnus alalunga*)

La bacora és una espècie de mida mitjana no sol passar dels 120 cm de longitud furcal i un pes màxim de 40kg (Santiago, 1993). Recentment, s'han constatat diferències en cert paràmetres biològics entre la bacora de l'Atlàntic i la del Mediterrani (Santiago, 1993; Ortiz de Zárate *et al.*, 1996; Megalonofou, 2000). Per exemple, els individus atlàntics poden arribar a viure fins als 13 anys (Lee & Yeh, 1993) mentre que els del Mediterrani el seu màxim de vida està cap als 9 anys (Megalonofou, 2000). Una altra característica diferent entre els individus mediterranis i atlàntics és la taxa de creixement, partir del primer any de vida, el creixement de la bacora de l'Atlàntic és un 5 cm superior per any que la mitjana de creixement dels individus del Mediterrani (Santiago, 1993; Megalonofou, 2000).

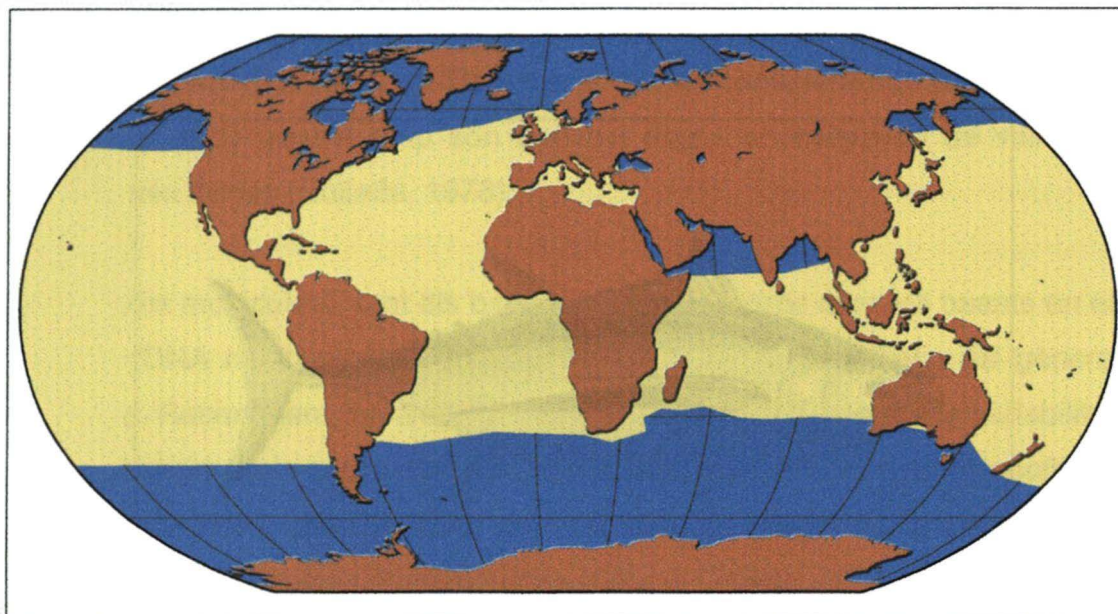


FIGURA 1.4. Distribució mundial de la bacora (*T. alalunga*)

La bacora habita les aigües tropicals i temperades entre els 17°C a 21°C de tots els oceans i el mar Mediterrani. A l'Atlàntic est es distribueix en la franja d'entre els 60°N fins aproximadament els 35°S de la punta de Sud-Àfrica. A l'Atlàntic oest es troba des de sobre als 40°N fins al sud de Brazil a uns 32°S. En l'oceà Índic la franja de distribució és més estreta, entre els 10°N i els 32°S. En canvi, en el Pacífic la distribució de l'espècie es torna eixamplar fins els 45°N a 45°S (FIGURA 1.4) (Gibbs & Collette, 1975).

En l'àrea de l'Atlàntic nord i el Mediterrani es coneixen dues àrees de posta separades geogràficament. Durant l'estiu la reproducció de la bacora de l'Atlàntic oest es dona al mar dels Sargassos (Beardsley, 1969 ; Koto, 1969). A l'Atlàntic est, el Mediterrani és l'única zona de reproducció detectada fins a la data (Ortiz de Zárate & Cort, 1998). La reproducció dins del Mediterrani es concentra a l'estiu (de juliol a agost) a llarg de tot el mar (Piccinetti & Piccinetti-Mafrin, 1993; Piccinetti *et al.*, 1996).

Amb les dades dels estudis de marcatge i les zones de pesca s'ha pogut conèixer a grans trets el règim migratori d'aquesta espècie a l'Atlàntic (Bard, 1981; Ortiz de Zárate & Cort, 1998). A l'hivern la bacora es concentra al voltant de les illes Açores. Abans de l'època de posta, a la primavera, comença el moviment, una part de la població, principalment formada per individus adults migra en sentit oest per a realitzar la posta al mar dels Sargassos. L'altra part de la població, sobretot els individus joves, es dirigeix en sentit est fins a les costes del mar Cantàbric i el Sud d'Irlanda. Malgrat la capacitat de migració d'aquesta espècie, de tots els estudis de marcatge realitzats fins a la data només s'ha detectat un individu atlàntic que hagi entrat al mar Mediterrani a través de l'estret de Gibraltar (Aloncle & Delaporte, 1976).

### 1.3.3. La tonyina (*Thunnus thynnus thynnus*), característiques generals, distribució i biologia

La tonyina és l'espècie més grossa de totes les tonyines, pot arribar a mesurar més de 3 m i pesar 700 kg (Safina, 1993). Té un cos fusiforme molt robust amb una coloració blava fosca a la part dorsal i un ventre gris platejat (FIGURA 1.5).

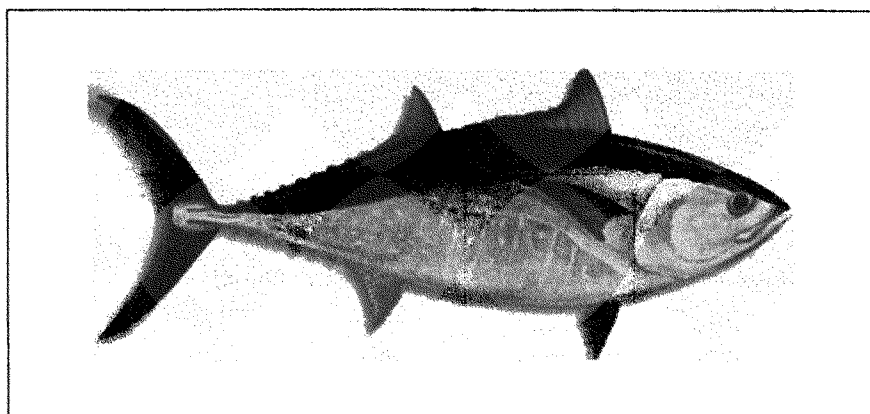


FIGURA 1.5. Tonyina (*Thunnus thynnus thynnus*)

El creixement de la tonyina es dona al llarg de tota seva vida. Al primer any de vida arribem a mesurar de 50 a 60 cm de longitud furcal i un pes aproximat de 2 kg. A partir d'aquest moment es disminueix el ritme de creixement a uns 20 cm anuals a la fase juvenil i a uns 5-10 cm anuals als individus adults. La maduresa sexual s'assoleix entre tercer i el quart any de vida amb una longitud d'entre 100-120cm (Rodríguez-Roda, 1967).

La subespècie de tonyina de l'Atlàntic (*Thunnus thynnus thynnus*), es distribueix a l'oceà Atlàntic, el mar Mediterrani (FIGURA 1.6). A la part est de l'oceà Atlàntic, la seva distribució abrasa la franja de de 68°N (a les illes Lofoten) fins a al sud de les illes Canàries (28°N), passant pel mar Mediterrani i el mar Negre. A l'altra de banda de l'Atlàntic es localitza entre els 50°N de Terranova i el Labrador fins als 10°N de les costes de Veneçuela (Collette & Nauen, 1983).

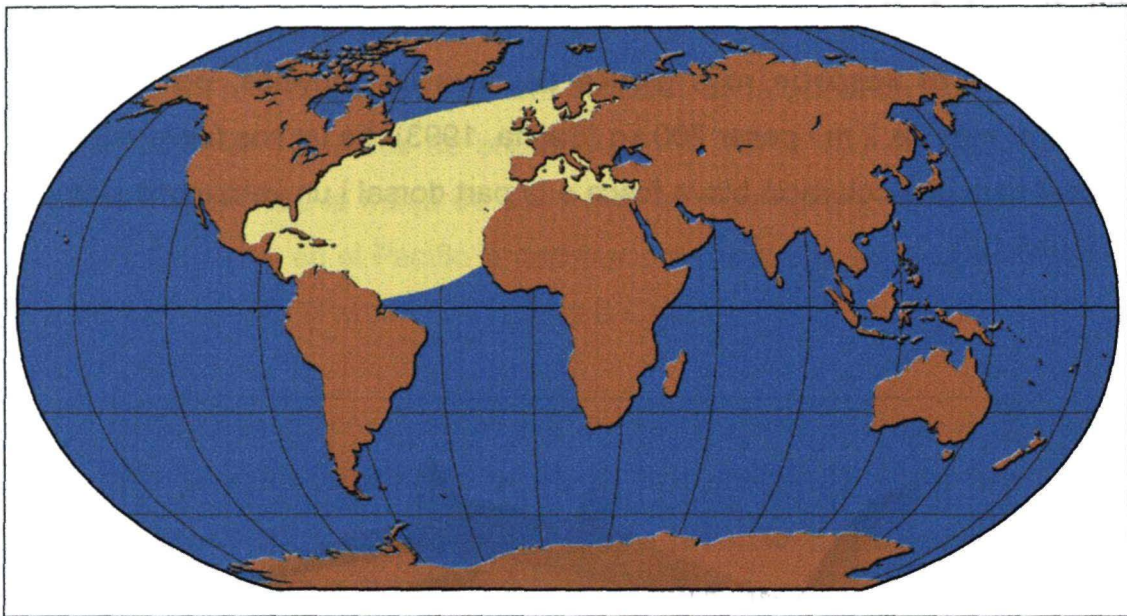


FIGURA 1.6. Distribució mundial de la tonyina (*T. thynnus thynnus*).

Des de mitjans dels anys 50 es coneixen dues úniques àrees de reproducció a l'Atlàntic nord separades unes 4 000 milles nàutiques (Rivas 1954). A l'Atlàntic occidental la posta té lloc al Golf de Mèxic i l'estret de Florida des



d'abril fins a finals de juny (Rivas 1954; Richards, 1976). A l'Atlàntic est la reproducció es dona dins del mar Mediterrani entre mitjans de juny i finals d'agost, principalment localitzada a la conca occidental (Piccinetti & Piccinetti-Mafrin, 1993; Piccinetti *et al.*, 1996).

La tonyina és possiblement l'espècie més migradora de tots els túnids. A la fase juvenil ja és capaç de realitzar desplaçaments des de l'àrea de posta del Mediterrani fins al golf de Biscaia a l'oceà Atlàntic (Cort & Rey, 1984). La migració dels individus adults segueix un cicle anual similar a les dues vessants de l'Atlàntic i lligat a les arrees i èpoques de posta. A l'Atlàntic est durant la primavera, els individus entren al Mediterrani per l'estret de Gibraltar per reproduir-se, un cop realitzada la posta les tonyines surten del Mediterrani i migren en sentit nord cap a les àrees d'alimentació. A part d'aquest moviment, una part de la població d'aquesta banda de l'Atlàntic es queda durant tot l'any dins del Mediterrani. A l'altra banda de l'Atlàntic, i també a la primavera els individus es mouen cap al golf de Mèxic i l'estret de Florida per a realitzar la posta. Quan arriba l'estiu, els individus es mouen en sentit nord fins a Terranova per alimentar-se (Mather *et al.*, 1995; Cort, 1990).

Malgrat la distància entre les dues àrees de posta, s'han observat migracions transoceàniques que indicarien un cert intercanvi d'individus entre les dues àrees. En una revisió dels estudis de marcatge, Turner (1999) proposa un taxa d'intercanvi entre les dues vessants atlàntiques d'aproximadament un 2%, taxa coincident amb l'acceptada per ICCAT (2000) com a base per a la gestió. Ara bé, altres autors assumeixen migracions amb taxes superiors, Cooke & Lankester (1996) estimen unes taxes d'entre el 7,3% i el 9,8% de migració transatlàntiques.

## 1.4. IMPORTÀNCIA COMERCIAL I GESTIÓ DE LES PESQUERIES DE LES TRES ESPÈCIES

Ja s'ha comentat la importància comercial de les pesqueries actuals de la família Scombridae. Per exemple, a l'any 1998 totes aquestes espècies i juntament amb les anomenades similars a túnids van suportar unes pesqueries superiors a 5 milions de tones (FAO, 2001).

A l'Atlàntic, la pesca industrial a gran escala d'aquestes espècies va començar finals dels anys cinquanta, amb una expansió durant els anys 60 molt ràpida de l'àrea de pesca, la capacitat de la flota i les captures. En les etapes inicials les captures van disminuir bruscament, tot i que és un fet relativament normal en les pesqueries acabades de començar, la preocupació sobre la possible sobreexplotació del recurs portar va portar a la creació de l'ICCAT (acrònim de *International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas*) l'any 1966. A partir d'aquest moment, aquest òrgan internacional és el responsable de proposar les mesures de gestió pels túnids i les espècies afins amés de ser responsable de la recollida de dades de pesqueries i científiques.

### 1.4.1. El bonítol

De les tres espècies estudiades el bonítol és el que presenta uns nivells més baixos de captures. Malgrat no ser una espècie important econòmicament a nivell mundial, a nivell local és l'espècie objectiu de la pesqueria.

Les captures del bonítol en tota la seva àrea de distribució van arribar un pic a l'any 1988 amb casi 50 000 tones. A partir d'aquest any les tones desembarcades a l'Atlàntic es va reduït més de la meitat, en canvi en el Mediterrani els nivells de pesca s'han mantingut constants. Actualment, tot i la recuperació de la captura atlàntica, el bonítol del Mediterrani comporta casi

60% del total de les captures mundials, xifrades en unes 31 000 tones. Dins del mar Mediterrani destaca la flota turca que aporta més del 70% de la pesca (ICCAT, 2000). Aquesta flota concentra al seva pesca el sud del mar Negre, al mar de Màrmara i al nord-oest del mar Egeu (Oray & Karakulak, 1997).

ICCAT no proposa cap tipus de regulació pel bonítol en àrea de la seva distribució. Com a única norma de gestió, només proposa una regulació de tipus regional per a totes les tonyines petites, incloent-hi també el bonítol (ICCAT, 2000).

#### **1.4.2. La bacora**

De les tres espècies estudiades, la bacora és la que presenta unes captures més elevades. Durant els darrers trenta anys, a nivell mundial s'han pescat al voltant de 200 000 tones anuals (FAO, 1997). La majoria d'aquestes captures provenen de l'oceà Pacífic, les captures conjuntes de l'Atlàntic i el Mediterrani són només un 30% de les captures mundials amb aproximadament unes 60 000 tones (ICCAT 2000).

Dins de l'oceà Atlàntic, ICCAT proposa la presència de dos estocs separats, un al sud i l'altra al nord, per la línia 5°N. La separació en dos estocs es base en la manca de migradors entre les dues àrees i amb zones de posta diferenciades. Més recentment, i a partir del coneixement d'unes taxes de creixement diferents entre la bacora del Mediterrani i l'Atlàntic nord, ICCAT també accepta el Mediterrani com un tercer estoc (ICCAT, 2000).

Els nivells de pesca de l'Atlàntic nord han tingut una tendència decreixent des de mitjans dels anys 60, fins arribar a unes 25 500 tones a l'any 1998. Pel que fa al Mediterrani, les captures són molt menys important amb només

unes 2 500 tones a l'any 1998, pescades al 50 % entre la flota italiana i la grega.

Pel que fa a les mesures de gestió, ICCAT no proposa cap mesura de regulació específica pel Mediterrani. En canvi, a l'Atlàntic nord ICCAT recomana la reducció de les captures mitjançant una disminució del nombre de baixells, ja que actualment es creu que aquest estoc sembla estar per sobre els nivells màxims d'explotació (ICCAT; 2000).

### 1.4.3. La tonyina

En comparació a altres espècies de *Thunnus*, la tonyina no té un nivell d'explotació tant important. Per exemple, el pic màxim de captures per a tota la seva distribució va ser al 1996 amb unes 46 000 tones, molt inferior al nivell descrit amb anterioritat per a la bacora. La importància comercial d'aquesta radica més en el preu que s'arriba a pagar per quilo que no pas en la quantitats de les captures, per exemple s'han arribat a pagar més de 200 \$ per un quilo de tonyina ben conservada (FAO, 1997) .

Va ser la brusca reducció de les pesqueries de tonyina a l'Atlàntic durant els anys seixanta que va portar a fundar l'ICCAT l'any 1966. Les primeres actuacions de l'ICCAT, l'any 1974, van anar enfocades a regular les talles mínimes dels individus capturats. A partir de 1982, basant-se en el coneixement de les dues àrees de posta i dels patrons migratoris, ICCAT proposa presència de dos estocs separats pel 45°W a Atlàntic nord. Per l'estoc oest, ràpidament es van limitar el les captures a unes 2 500 tones anuals. En canvi, per l'estoc de l'Atlàntic est, el qual també inclou el Mediterrani, no ha estat fins l'any 1994 que es van imposar les primeres mesures de reducció de les captures. Actualment, ICCAT limita les captures per a l'Atlàntic est a 25 000 tones anuals, nivell àmpliament superat per les 44 700 tones (any 1996) realment pescades (ICCAT, 2000).

Malgrat la regulació imposada, les captures de tonyina de l'Atlàntic continuen augmentant. Durant els darrers deu anys (fins 1996, any que es disposen les últimes dades fiables) els desembarcaments s'han anat incrementant amb una mitjana d'un 15% anual. L'increment sobretot es dona a l'estoc de l'Atlàntic est on la regulació és més laxa i per tant permet capturar tonyines per sobre el nivell establert (ICCAT, 2000). Dins de l'Atlàntic est destaca la pesca del Mediterrani amb casi un 85 % de totes les captures mundials.

La sobrepesca de la tonyina ha portat a una reducció molt dràstica de la població. L'avaluació de l'estoc del 1997 a l'Atlàntic oest va indicar que els individus de edat 8 i superiors (individus reproductors) només són un 14 - 17% dels estimats per l'avaluació de l'estoc de l'any 1975 (ICCAT, 2000). Similarment, la població de principis dels anys 90 de l'Atlàntic és un 50 % més petita que l'estimada a mitjans dels anys 70 (Safina, 1993).

#### **1.4.4. La gestió de les pesqueries i l'aplicació de les eines genètiques**

Tal i com s'ha vist a l'apartat anterior l'ICCAT proposa el concepte d'estoc com la unitat de gestió de la pesca d'una espècie determinada. La gestió cap aquest estoc ha d'anar encaminada cap un rendiment sostenible, amb un màxim de producció però al mateix temps procurant el manteniment de la població a llarg del temps (Gulland, 1983; Lannan *et al.*, 1989). La problemàtica sorgeix quan es vol definir quin són els límits d'un estoc i així poder-lo diferenciar per aplicar-li una gestió específica. A més, en les espècies marines els límits geogràfics poc definits i la capacitat dispersiva incrementen la dificultat d'identificació de l'estoc. El problema s'agreuja quan és tenen proves clares d'una sobreexplotació del recurs pesquer sense cap cas a les mesures de gestió proposades o fins i tot sense cap mesura de gestió proposada.

La identificació del estocs de les espècies marines ha estat un dels grans temes en la gestió pesquera. Recentment, s'han publicat nombrosos treballs per intentar definir què és un estoc (Carvalho & Hauser, 1994; Moritz, 1994; Avise, 1998; Grant *et al.*, 1999; Ward, 2000, entre altres). Una de les conclusions comunes que se'n pot treure és que la definició d'estoc en les espècies marines no està del tot clara, però els estudis genètics aporten una molt informació valuosa per definir la possible estructura d'estoc en les espècies marines.

En resum, es pot acceptar com a sinònim d'estoc el concepte de *Management Unit* (MU, unitat de gestió) proposat per Moritz (1994). Els són definits com segments poblacionals d'una espècie diferenciables genèticament amb independència de la tècnica utilitzada i amb un flux gènic mínim o nul.

## 1.5. L'EINA GENÈTICA UTILITZADA: LA VARIABILITAT DE SEQÜÈNCIA DE LA REGIÓ CONTROL DEL mtDNA

Seguint el raonament anterior, els estudis genètics són molt importants per avaluar l'estructura d'estoc. Així doncs, l'elecció del marcador genètic a utilitzar és un pas crucial, i moltes vegades difícil de decidir, per a realitzar l'estudi i s'ha d'adequar als objectius proposats.

Idealment, el marcador genètic ha de presentar suficient variabilitat per poder inferir l'estructura genètica a més a més ha de presentar una herència coneguda. A part, ha de ser selectivament neutre, ja que l'efecte de la selecció podria esbiaixar les anàlisis de la variació intraespecífica i l'estimació de la filogènia (Moritz & Hillis, 1996). Finalment, també ha de permetre analitzar gran quantitat d'individus per poder augmentar el poder de resolució alhora de detectar subestructuracions genètiques de les poblacions (Dizon *et al.*, 1995).

L'estudi de la variabilitat de la seqüència de la regió control del mtDNA compleix aquests requisits:

- La taxa de mutació del mtDNA és, en general, d'un ordre de magnitud més alta que DNA nuclear. Per tant, en poblacions separades fa relativament poc temps poden observar-s'hi diferències a nivell de seqüència (Brown *et al.*, 1983; Wilson *et al.*, 1985).
- És una molècula haploide, només s'hereta a través de la mare (Brown, 1983) i no presenta recombinació (Avice, 1994). Per tant, la grandària poblacional efectiva d'un gen mitocondrial és una quarta part de la d'un gen nuclear, i el fa molt més sensible als efectes de la deriva gènica. Això comporta una fixació ràpida de la diferenciació genètica de dues poblacions reproductivament aïllades (Birky *et al.*, 1989).

- Dins del mtDNA destaca el D-loop o regió control, la zona no codificadora més gran del genoma mitocondrial. Aquest segment està poc sotmès a processos de selecció, per tant les mutacions s'acumulen molt més en aquest segment que en qualsevol altre regió del mtDNA, i s'arriba a una taxa de mutació fins a cinc vegades més gran que en la resta dels gens mitocondrials (Aquadro & Greenberg, 1983) (vegeu capítol 2).
- A partir de la incorporació de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR; *Polymerase Chain Reaction*, Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1985; Saiki *et al.*, 1988) i l'automatització de la reacció de seqüenciació (Sanger *et al.*, 1977), juntament amb el disseny de primers universals (Kocher *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1995) ha permès analitzar mostres de grandària elevada.

D'altra banda, cal destacar l'homoplàsmia del mtDNA, generalment només es troba un sol tipus de mtDNA dins de cada individu. Ara bé, l'heteroplàsmia ha estat observada en diverses espècies (vegeu les revisions de Billington & Herbert, 1991; Meyer, 1993).

Tot i aquestes avantatges, les interpretacions basades en l'estudi del mtDNA s'han amb certes precaucions. L'herència materna d'aquest genoma implica que sense el coneixement del comportament i patró històric de l'espècie pot portar a conclusions errònies, per exemple en el cas d'espècies amb un comportament filopàtric diferent entre els sexes (Grant *et al.*, 1999).

L'estudi de la variabilitat de seqüència de la regió control del mtDNA és una eina que s'ha emprat amb molt d'èxit en una gran nombre d'espècies piscícoles marines, tant dins de la família Scombridae com en espècies de fora de la família. Per exemple, l'estructura poblacional de l'emperador ha estat extensament estudiada al llarg de tota la seva àrea de distribució



mitjançant aquesta tècnica (Alvarado Bremer *et al.*, 1995; Rosel & Block, 1995; Alvarado Bremer *et al.*, 1996; Reeb *et al.*, 2000). Dins la mateixa família, Alvarado Bremer *et al.* (1998) utilitzant el mateix tipus d'aproximació per descriure l'estructura poblacional de la tonyina d'ulls grossos (*Thunnus obesus*) en tota la seva distribució. Fins i tot, la seva utilitat s'ha demostrat en altres espècies marines com la tortuga babaua (*Caretta caretta*; Encalada *et al.*, 1998) i el cetaci, Marsopa comuna (*Phocoena phocoena*; Rosel *et al.*, 1999).

## 1.6. ESTUDIS GENÈTICS POBLACIONALS PREVIS.

Malgrat la seva importància econòmica les estructurares poblacionals aquestes espècies no han estudiades amb molta profunditat. El cas més extrem és el del bonítol amb només el treball de Roberti *et al.* (1993). Pel que fa a les altres dues espècies, tot i no ser molt nombrosos s'han anat publicant diversos estudis des de els anys 60. A nivell més general, com a mínim existeixen fins a tres revisions d'estudis poblacionals en diverses espècies d'aquesta família (Graves, 1995; Ward, 1995; Ward, 2000).

Tal i com ja s'ha comentat, en el bonítol només s'ha publicat un estudi poblacional. Roberti *et al.* (1993) estudien la variabilitat de seqüència de tres-cents pb del gen del citocrom *b* del DNAm<sub>t</sub> per a tres localitats mediterrànies, el mar Jònic (n = 37), el mar Egeu (n = 26) i el mar de Màrmara (n = 31). Les seqüències dels noranta-quatre individus s'agrupen en set haplotipus amb un total de tretze posicions variables. De la comparació dos a dos de totes les tres mostres resulta una gran identitat genètica entre les localitats del Jònic i l'Egeu. En canvi, la mostra turca difereix significativament de les altres dues.

Els primers estudis moleculars de l'estructura poblacional de la bacora es van basar en l'estudi dels grups sanguinis (Suzuki, 1962; Fujino, 1970). Segons aquests estudis les mostres dels oceans Atlàntic, Pacífic i Índic i el mar Mediterrani són genèticament diferents, fins i tot hi ha un inici de diferenciació entre les mostres del nord i el sud del Pacífic.

Graves & Dizon (1989) portaren a terme un estudi preliminar de RFLP de tot el genoma mitocondrial de la bacora. Els autors van comparar els patrons de restricció d'una localitat al sud del pacífic (Califòrnia; n =12) i una segona situada al Atlàntic Sud (Cape Town; n =11) sense trobar diferències significatives. A una escala geogràfica més gran, Chow & Ushima (1995)

analitzen un total de sis cents vint individus de tretze mostres repartides per l'Atlàntic (dues mostres), el Pacífic (deu mostres) i el cap de Bona Esperança entre l'oceà Índic i l'Atlàntic. L'estudi dels patrons de restricció de dos endonucleases en el gen mitocondrial de l'ATPasa mostra altes diferències genètiques entre les mostres de l'Atlàntic i les de Pacífic. En canvi, no s'observen diferències genètiques intraoceàniques, ni dins del Pacífic ni tampoc entre les dues mostres de l'Atlàntic.

Més recentment més; Yeh *et al.* (1997) van analitzar la variabilitat de seqüència del tercer domini de la regió control del mtDNA de cinc individus de Sud Àfrica i cinc de Nova Zelanda. Les dues localitats es diferencien per dues posicions fixes d'un total de només quinze posicions variables. Analitzant el mateix segment de D-loop, Viñas *et al.* (1999) amb un mostratge poc elevat de mostres al llarg de la costa atlàntic i mediterrània observa una manca de diferenciació entre totes les mostres, però amb un nivell de variabilitat fins a deu vegades superior que el descrit per Yeh *et al.* (1997). Dins del Mediterrani, Pla *et al.* (1998), en un estudi al·lozimic de trenta cinc loci, no troben diferenciació genètica entre una mostra del mar Jònic (n = 112) i una mostra del mar Egeu (n = 46).

Els estudis genètics en la tonyina van començar als anys 70 utilitzant l'electroforesis de proteïnes. Edmunds & Sammons (1973) a partir de les dades d'un sol locus polimòrfic, *SOD\**, no van observar diferències significatives entre una mostra de l'Atlàntic est i una altra de l'Atlàntic oest, ambdues de grandària elevada. El mateix locus tampoc no va mostrar heterogeneïtat en els 1056 individus mostrejats al llarg de tot l'Atlàntic nord. Thompson & Contin (1980) tornen a trobar el mateix locus polimòrfic (*SOD\**), d'un total de 23 loci analitzats, amb freqüències no significativament diferent a les dues vessants de l'Atlàntic.

A partir dels anys 90 es publiquen una sèrie de nous estudis genètics sobre l'estructura d'estoc de la tonyina. Tot i no ser un estudi poblacional estricte, Carone *et al.* (1996) analitza la variabilitat de seqüència de tres-cents parells de bases del gen mitocondrial del citocrom *b* de trenta-quatre individus mostrejats en dues localitats de les costes de la illa de Sicília al mar Mediterrani. Els trenta quatre individus diferents s'agrupen en dos haplotipus diferents diferenciats per una sola posició nulceotídica, i amb freqüència per a cadascun del haplotipus trenta-dos i dos individus respectivament. Posteriorment, Broughton & Gold (1997) publiquen l'únic estudi utilitzant microsatel·lits en la tonyina. Aquest també és l'únic treball que s'observa heterogeneïtat entre dues mostres del mar Mediterrani, una al Golf de Taranto (mar Jònic;  $n = 12$ ) i la segona al golf de València ( $n = 8$ ). Aquest resultat, però, s'han de prendre amb precaució ja que l'aïllament entre aquestes dues àrees és molt improbable.

També dins del Mediterrani, Pujolar *et al.* (1998) no troba diferències significatives en les freqüències al·lozimiques entre quatre localitats de la conca occidental de Mediterrani, costa espanyola del Mediterrani ( $n = 98$ ), golf de Lleó ( $n = 49$ ), golf de Gènova ( $n = 57$ ) i golf de Taranto ( $n = 77$ ). En el mateix estudi tampoc s'observen variacions significatives a l'afegir una mostra del mar Cantàbric a l'oceà Atlàntic est ( $n = 49$ ).

Existeixen un parell d'estudis que mostren una certa heterogeneïtat genètica entre la vessant oriental i occidental de l'Atlàntic. Pla *et al.* (1998) observa una inversió de freqüència entre l'Atlàntic oest i l'Atlàntic est (golf de Biscaia i mar Mediterrani) de l'al·lel més comú de dos dels tres loci altament polimòrfics (*SOD-1\** i *G6PDH*). Més recentment, l'estudi preliminar d'Alvarado Bremer *et al.* (1999), en el qual s'estudia la variabilitat de seqüència de la regió control de setanta-tres individus del Mediterrani i seixanta-set del Atlàntic nord-oest, observen una diferenciació genètica entre aquestes dues localitats. Ara bé, Bert Ely (comunicació personal) quan

augmenta la grandària mostral del treball d'Alvarado Bremer *et al.* (1999), passa de cent cinquanta-set individus a dos-cents deu individus, i reanalitza les dades amb els nous individus no observa diferències significatives entre l'Atlàntic est i oest.



## *2. Estructura i evolució del D-loop*





## **2. ESTRUCTURA I EVOLUCIÓ DEL D-LOOP**

El gran èxit obtingut amb els estudis en la regió de control com a marcador genètic, ha deixat una mica de banda l'estudi de les estructures internes i els patrons de variabilitat d'aquest segment del mtDNA. L'objectiu d'aquest capítol és conèixer en profunditat l'estructura i el patró d'evolució de la regió control de les tres espècies que s'analitzen en aquests treball i en general de tota la família Scombridae.

### **2.1. INTRODUCCIÓ**

La presència d'un gran segment no codificador en el mtDNA que, excepte en algunes reorganitzacions gèniques, està situat entre els gens que codifiquen pel tRNA<sup>Pro</sup> i el tRNA<sup>Phe</sup>, és una característica comuna de tots els metazous. En vertebrats, aquest segment se l'anomena indistintament *D-loop* o regió de control degut a la nansa de desplaçament (D-loop) de tres cadenes que es forma al principi de la replicació de la cadena pesada (Brown *et al.*, 1986), i per contenir els promotors de transcripció de les dues cadenes del mtDNA (Clayton, 1982; Chan & Clayton, 1984).

### 2.1.1. Estructura del D-loop

En els mamífers, amb la base dels patrons de variabilitat de seqüència i composició nucleotídica, s'ha dividit la regió de control en tres dominis interns: el domini I o domini esquerre situat just corrent avall del gen tRNA<sup>Pro</sup>, el domini II o domini central i el domini III situat a l'extrem 5, corrent amunt del gen tRNA<sup>Phe</sup>, (Brown *et al.*, 1986; Saccone *et al.*, 1991). El domini central està molt conservat a nivell de seqüència i presenta una alta composició de GC. En canvi, els dos dominis laterals són hipervariables i tenen un alt contingut d'AT. Addicionalment, dins de cadascun d'aquests dominis s'han identificat diversos blocs de seqüències conservats que semblen estar relacionats amb certes funcions del mtDNA.

En el primer domini s'hi observen una o més còpies de seqüències de finalització de la replicació de la cadena pesada (TAS, *Termination Associated Sequences*; Doda *et al.*, 1981). Sovint, aquest primer domini també presenta repeticions en tàndem (VNTR, *Variable Number of Tandem Repeats*; Brown *et al.*, 1986; Fumagalli *et al.*, 1996). El conservat domini central conté, entre altres blocs de seqüència conservada, el bloc D (CSB-D, *Conserved Sequence Block D-loop*; Saccone *et al.*, 1991) que està involucrat en la replicació de la cadena pesada i la formació de la nansa de desplaçament. Finalment, el domini III inclou la seqüència dels promotors de la transcripció de les cadenes lleugera i pesada (LSP, *Light Strand Promotor*; HSP, *Heavy Strand Promotor*; Saccone *et al.*, 1991). Aquest tercer domini també conté l'origen de replicació de la cadena pesada (O<sub>H</sub>) i tres blocs de seqüència conservada, CSB-1, CSB-2 i CSB-3, que es creu que tenen funcions molt específiques en la regulació de la replicació.

En un estudi més recent, Sbisá *et al.* (1997) descriuen l'estructura comparada de la regió de control de 26 espècies de mamífers de 10 ordres diferents. La principal aportació d'aquest treball és la identificació en el

domini I de dues noves seqüències finalitzadores de la replicació (ETAS 1 i ETAS; *Extended Termination Associated Sequences*) que inclouen les estructures TAS. Segons això, aquests autors també proposen una nova nomenclatura pels tres dominis de la regió control: el domini I ETAS, el conservat domini II central i domini III CSB.

Pel que fa als peixos, fins a la data no hi ha cap estudi publicat sobre l'estructura general de la regió de control en tot aquest fílum. Només Lee *et al.* (1995) publiquen l'estructura interna del *D-loop* de vint-i-tres espècies que representen sis famílies de peixos teleostis. D'aquesta revisió conclouen que l'estructura interna d'aquesta regió, si més no en les zones conservades, és comparable a la prèviament descrita pels mamífers. La discordança més important respecte a l'organització consens descrita en els mamífers és la manca de l'origen de replicació ( $O_H$ ) de la cadena pesada en la majoria dels teleostis.

### 2.1.2. Evolució del *D-loop*

Tot i l'existència dels blocs de seqüències conservades al llarg de tota la regió control, en general, es considera que la taxa de mutació és de cinc a deu vegades més gran en aquest fragment que en la resta del mtDNA (Aquadro & Greenberg, 1983). Ara bé, tal i com s'ha descrit, la variació no es presenta de forma homogènia al llarg de tota la seqüència. Així, el domini central s'ha descrit com un dels fragments més conservat del genoma tant en mamífers (Saccone *et al.*, 1991) com en peixos (Lee *et al.*, 1995). La possibilitat que aquest domini central estigui lligat a una certa funcionalitat dintre del metabolisme mitocondrial explicaria la restricció de la variabilitat present en aquest fragment.

Així doncs, és en els dominis laterals on es presenta la majoria de variabilitat (Brown *et al.*, 1986). Tot i que la taxa d'evolució es defineix a partir de les

substitucions nucleotídiques, part de la variabilitat dins d'aquets dominis també ve donada per les repeticions en tàndem (VNTR). Com a norma general i en els peixos en particular, les VNTR es presenten en llocs propers als elements que regulen l'origen i finalització de la replicació de la cadena pesada. Aquesta posició fa suposar que les VNTR es generen a partir d'un aparellament no homòleg de les cadenes durant la replicació (Levinson & Gutman, 1987). Amés, la variabilitat de les VNTR és la causa principal de l'heteroplàsmia intraespecífica (Árnason & Rand, 1992, Fumagalli *et al.*, 1996) i de la variació de la llargària total del mtDNA (Lee *et al.*, 1995; Meyer, 1993).

La variabilitat de seqüència a nivell de substitucions nucleotídiques està clarament esbiaixada cap a una acumulació de transicions sobre les transversions, tal i com van descriure Moritz *et al.* (1987) amb dades empíriques. Segons aquest patró, a mesura que es van acumulant diferències es pot arribar a un punt que les substitucions, i més concretament les transicions, arribin a una saturació i tornin a mutar cap a una base que ja ho havien fet anteriorment (substitucions múltiples). En aquest punt, apareix el fenomen de l'homoplàsia, on la taxa evolutiva, i en conseqüència la informació genètica, està emmascarada per la les substitucions múltiples, agrupant-se seqüències similars però que en realitat no estan relacionades (Givnish & Sytsma, 1997).

Els patrons de substitució més senzills assumeixen que totes les posicions tenen la mateixa probabilitat de mutar seguint una distribució de tipus Poisson. Existeixen, però, diversos estudis que demostren l'heterogeneïtat de les substitucions al llarg de la seqüència de la regió control (Kocher & Wilson, 1991; McMillan & Palumbi, 1997; Wakeley, 1993). Kocher & Wilson (1991) demostren que el nombre de canvis per lloc en tota la regió control del mtDNA de l'home s'ajusta a una distribució binomial negativa. Posteriorment, Wakeley (1993) defineix que si el nombre de canvis s'ajusta

a una distribució binomial negativa la taxa de substitució s'aproxima a una distribució tipus gamma.

Tant el models d'estructura en tres dominis com el patró d'evolució del mtDNA explicat fins ara no ha estat mai definit en cap de les espècies que s'estudien en aquest treball. Així, doncs abans de procedir a una anàlisi de la variabilitat genètica de cadascuna de les espècies, aquest capítol pretén establir les característiques estructurals i evolutives de la regió control.

## 2.2. MATERIAL I MÈTODES

### 2.2.1. Seqüències disponibles

Per a descriure l'estructura interna i els patrons d'evolució del D-loop s'ha comparat les seqüències de les tres espècies estudiades en el present treball: el bonítol, la bacora i la tonyina. La seqüència completa de la regió control de les tres espècies s'ha obtingut mitjançant els mètodes generals (apartat 3.2). Com única variació, alhora d'obtenir la seqüència completa de la regió control, s'ha utilitzat una nova combinació de *primers* a la reacció de PCR: per l'extrem 3' s'ha utilitzat el mateix *primer* L15998 descrit en els materials i mètodes generals, en canvi per l'extrem 5' s'ha utilitzat el *primer Fst* que hibrida a la cadena lleugera del gen que codifica a l'ARNt<sup>Phe</sup>, situat just després de l'extrem 5' de la regió control. El producte de PCR resultant, d'uns 900 pb, s'ha seqüenciat pels dos extrems. Al final, s'han obtingut trenta-sis seqüències diferents de la totalitat de la regió control pel bonítol, cent set seqüències diferents per la bacora i vuitanta cinc seqüències diferents per la tonyina.

Amb el propòsit de definir una estructura i uns patró d'evolució més general, s'ha inclòs dins de l'anàlisi d'aquest capítol la seqüència del *D-loop* de l'*Acanthocybium solandri* (número d'accés al GenBank AF197151), fins a la data l'única seqüència de regió de control completa d'una espècie de la família Scombridae disponible a les bases de dades d'internet.

### 2.2.2. Anàlisi de les seqüències

Les seqüències de totes les espècies utilitzades s'han alineat mitjançant el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) amb una penalització dels indels de 10, corregint per substitucions múltiples amb la distància Kimura 2 paràmetres (Kimura, 1980) i un bootstrap de 100 rèpliques. El fitxer de sortida del Clustal W s'ha modificat a ull utilitzant l'editor de seqüències Bioedit (Hall, 1999). La predicció de possibles estructures secundàries de la

regió control s'ha realitzat amb el programa MFOLD disponible a internet (Zuker, 1996)

Tant la proporció de transicions / transversions ( $r$ ) com la divergència entre les regions controls de les diferents espècies, mesurada per la proporció de canvis respecte el nombre de total de posicions (distància  $p$ ), s'han calculat en el programa MEGA (Kumar *et al.*, 1993). El nivell de variabilitat de les seqüències s'ha estimat mitjançant la diversitat nulceotídica ( $\pi$ ; Nei, 1987), definida com el nombre mitjà de diferències nucleotídiques per lloc en el conjunt de les seqüències.

Un bon sistema per mesurar del nivell de saturació de les seqüències, aprofitant la característica de la ràpida acumulació de transicions sobre les transversions del mtDNA, és representar gràficament l'acumulació de les transicions sobre les transversions en les comparacions dos a dos de totes les seqüències (Kocher & Carleton, 1997). Addicionalment, l'efecte de la saturació dels canvis nucleotídics sobre la filogènia es pot mesurar a partir de l'índex de consistència reescalat ( $I_C$ ) i l'índex d'homoplàsia ( $I_H = 1 - I_C$ ; Farris, 1989). La variació d'aquests dos índexs va de 0 a 1, on un arbre filogenètic amb valor  $I_C$  igual a 1 es considera consistent i per tant no està afectat per l'homoplàsia. El programa PAUP 4b (Swofford, 1996) utilitzant una reconstrucció filogenètica basada en la màxima parsimònia (Kluge & Farris, 1969; Fitch, 1971) amb l'algorisme *branch and bound* permet calcular els índexs de consistència i homoplàsia de l'arbre resultant.

Finalment, s'ha comprovat, utilitzant el programa Dambe (Xia, 2000), si les substitucions segueixen una distribució homogènia al llarg de les seqüències o si per altra banda tenen una heterogeneïtat entre les diferents posicions seguint una distribució tipus binomial negativa.

## 2.3. RESULTATS

L'alineament de la regió control de les quatre espècies, en primer terme s'ha basat en la identificació dels blocs de seqüència conservada que es troben en els dos últims dominis. A partir d'aquí, s'han alineat els segments de seqüència variable. En el primer domini, tot i l'ajuda del programa informàtic Clustal W, l'alineació ha estat més complicada, principalment al voltant de la posició 200 on s'hi observa una gran variabilitat de seqüència. En una primera aproximació l'alineament interespecífic de la regió control permet definir els tres dominis i la llargària de tota la regió en cadascuna de les espècies. Tot i que la divisió en tres dominis no tingui uns límits molt estrictes, facilita la comparació interespecífica de les estructures que es van trobant al llarg de la seqüència (FIGURA 2.1).

### 2.3.1. Característiques generals

La llargària de la regió control en les quatre espècies comprèn des dels 847 pb del bonítol als 889 pb de l'*Acanthocybium solandri*, passant per 859 i 860 pb de la bacora i la tonyina, respectivament. Aquests valors cauen dins del límit inferior del rang (856 – 1500 pb) descrit en peixos telesotís per Lee *et al.* (1995). Un dels factors que influeixen en la longitud del D-loop, i en definitiva de tot el DNA mitocondrial, és la presència o no de repeticions en tàndem en els dominis laterals (Meyer, 1993). En una cerca computacional, en cap de les quatre espècies no s'han trobat les repeticions en tàndem descrites per a mamífers i peixos (Árnason & Rand, 1992; Brown *et al.*, 1996; Faber & Stepien, 1998; Fumagalli *et al.*, 1996). En definitiva i com a característica general es pot considerar que el *D-loop* de la família Scombridae no presenta repeticions en tàndem.



**TAULA 2.1.** Percentatges de bases i de composició GC per a la totalitat de la regió control i per a cadascuna de les espècies en cada domini . Tots els valors estan en tant per cent.

	<i>D-loop</i>					<i>Domini I</i>					<i>Domini II</i>					<i>Domini III</i>				
	A	T	C	G	%GC	A	T	C	G	%GC	A	T	C	G	%GC	A	T	C	G	%GC
<i>A. solandri</i>	31.4	30.4	21.1	17.1	38.8	37.5	31.5	17.7	13.2	30.9	23.9	32.9	21.9	21.3	43.2	32.5	26.2	24.4	17.0	41.4
<i>S. sarda</i>	32.3	31.4	21.8	14.4	36.2	41.1	29.3	19.6	10.0	29.6	24.7	34.3	21.7	19.3	41	31.8	30.3	24.3	13.5	37.8
<i>T. alalunga</i>	31.8	31.0	22.1	15.1	37.6	39.2	30.2	20.8	9.7	30.5	25.5	32.1	21.2	21.2	42.4	30.9	30.5	24.5	14.1	38.6
<i>T. thynnus</i>	31.5	30.7	21.9	15.8	37.7	38.7	31.7	19.2	10.5	29.7	25.2	31.1	21.9	21.9	43.8	31.1	29.3	24.8	14.8	39.6
TOTAL	32.1	31.0	21.7	15.2	36.9	39.6	31.1	19.0	10.3	29.3	25.1	32.4	21.6	20.9	42.5	31.9	29.4	24.6	14.1	38.7

Una de les característiques que permet dividir la regió control en tres dominis és l'heterogeneïtat en la composició de bases (TAULA 2.1). En general, tot el D-Loop presenta una proporció molt alta d'A-T (63,1%) amb una freqüència per a cadascuna de les bases que difereix significativament de la que s'esperaria per l'atzar ( $\chi^2$ ;  $gdl = 3$ ,  $p < 0,01$ ). Quan s'observa cadascun del tres dominis per separat, l'alta proporció d'A-T està molt marcada en el domini I on aproximadament només el 10% de les bases són G. En canvi, el segon domini tot i que la proporció d'A-T encara és superior a les G-C, s'observa un augment de la proporció de G-C fins a arribar en el cas de quasi un 44% a la tonyina vermella. Finalment, en el tercer domini es torna a veure la tendència d'un augment de la proporció d'A-T, en detriment de les G-C, però sense arribar a les freqüències tan extremes descrites pel primer domini.

### 2.3.2. Estructura del D-loop

La comparació de les seqüències de les diferents espècies permet identificar diversos motius de seqüència conservada al llarg de la regió control. En aquesta comparació s'ha continuat en la divisió de la regió control en els tres dominis prèviament descrits.



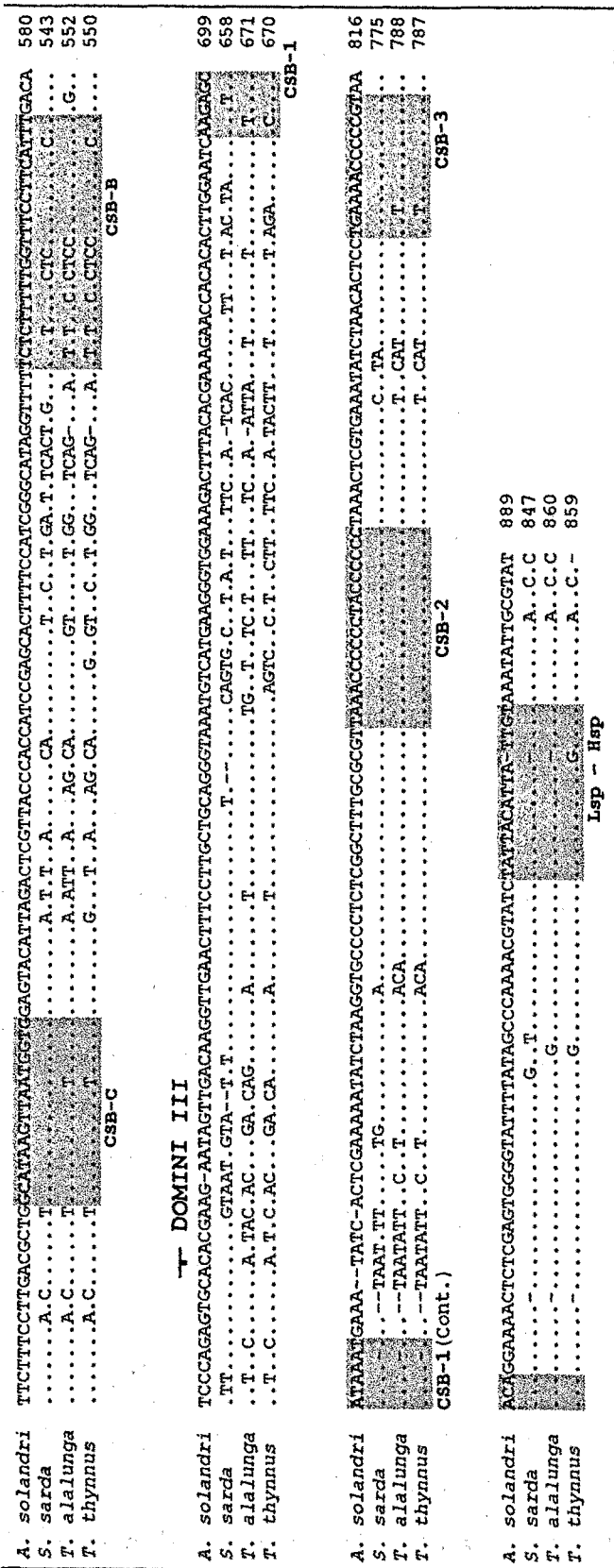


FIGURA 2.1. Ainiació de les seqüències completes de la regió control de les quatre espècies. Els motius de seqüència conservada estan ressaltats en gris.

Una característica comuna dels quatre D-loop és la manca de la seqüència de l'origen de replicació de la cadena pesada ( $O_H$ ). Resultat concordant amb el trobat en altres peixos teleostis (Lee *et al.*, 1995) i amb el gènere *Stizostedion* (Faber & Stepein, 1998). La manca d'un origen de replicació en concret podria suposar diferències en el mecanisme de la replicació en els peixos respecte la resta dels vertebrats.

#### 2.3.2.1. Domini I

Per norma general, en el primer domini s'hi troben les senyals de terminació de la síntesi de la cadena pesada, seqüències TAS formades pel pentanucleòtid 5'-TACAT-3' (Doda *et al.*, 1981). En algunes ocasions, aquesta seqüència de cinc bases està associada, a poques bases de distància, a una seqüència complementària, formant un motiu palindròmic de seqüència 5'-TACAT(N)<sub>n</sub>ATGTA-3' (Saccone *et al.*, 1991; Shedlock *et al.*, 1992). Les seqüències palindròmiques permeten formar estructures secundàries estables que possiblement estiguin associades a la terminació de la replicació (Roa *et al.*, 1985; Saccone *et al.*, 1991).

En aquest estudi, per poder distingir correctament les possibles seqüències tipus TAS s'ha realitzat, a priori, un estudi del plegament dels primers 180 nucleòtids en cadascuna de les espècies. En totes les espècies s'han resolt estructures energèticament favorables amb valors negatius de  $\delta_g$  (FIGURA 2.2.).

A partir de comparació de l'aliniament del D-loop i de les estructures secundàries s'han detectat dos motius tipus TAS compartits per totes les espècies: TAS-1 i TAS-2. El primer element TAS està molt conservat a nivell de seqüència entre les quatre espècies, i presenta una gran similitud amb la seqüència consens TAS descrita anteriorment. El TAS-1 de la bacora és

sensiblement diferent al consens, en aquesta espècie està format per dos elements separats 23 pb de seqüència complementària, de les quals només el primer element forma part del TAS-1 consens. Pel que fa al TAS-2, tot i que la seqüència no està gaire conservada en les diferents espècies i que té certes variacions respecte al TAS consens, en totes és responsable del manteniment d'estructura secundària. Per exemple en l'*A. solandri*, el TAS-2 també està format per dos elements de seqüència complementària separats 9 pb. El TAS-2 del bonítol també està format per elements separats, en aquest cas, per 29 pb.

A part del dos TAS compartits per les quatre espècies i de seqüència més o menys conservada, existeixen altres seqüències que formen estructures secundàries i per tant possibles responsables de la terminació de la replicació. Per exemple, les dues tonyines, la tonyina vermella i la bacora, comparteixen a l'inici del domini I dues seqüències palindròmiques separades de pocs nucleòtids (TAS-0). Cap a la posició 125 de la seqüència del D-loop de les dues tonyines que correspon a la posició 140 de l'*A. solandri*, es forma una nova estructura secundària (TAS-3) però de seqüència molt poc conservada entre les tres espècies. En la tonyina vermella i la bacora, aquest motiu TAS-3 té pràcticament la mateixa seqüència consens del TAS però de forma invertida seqüència. El bonítol també presenta una nova estructura TAS, TAS-3 del bonítol, totalment diferenciada. Finalment, entre el TAS-1 i el TAS-2, el bonítol i la tonyina vermella presenten una nova seqüència que forma estructura secundària.

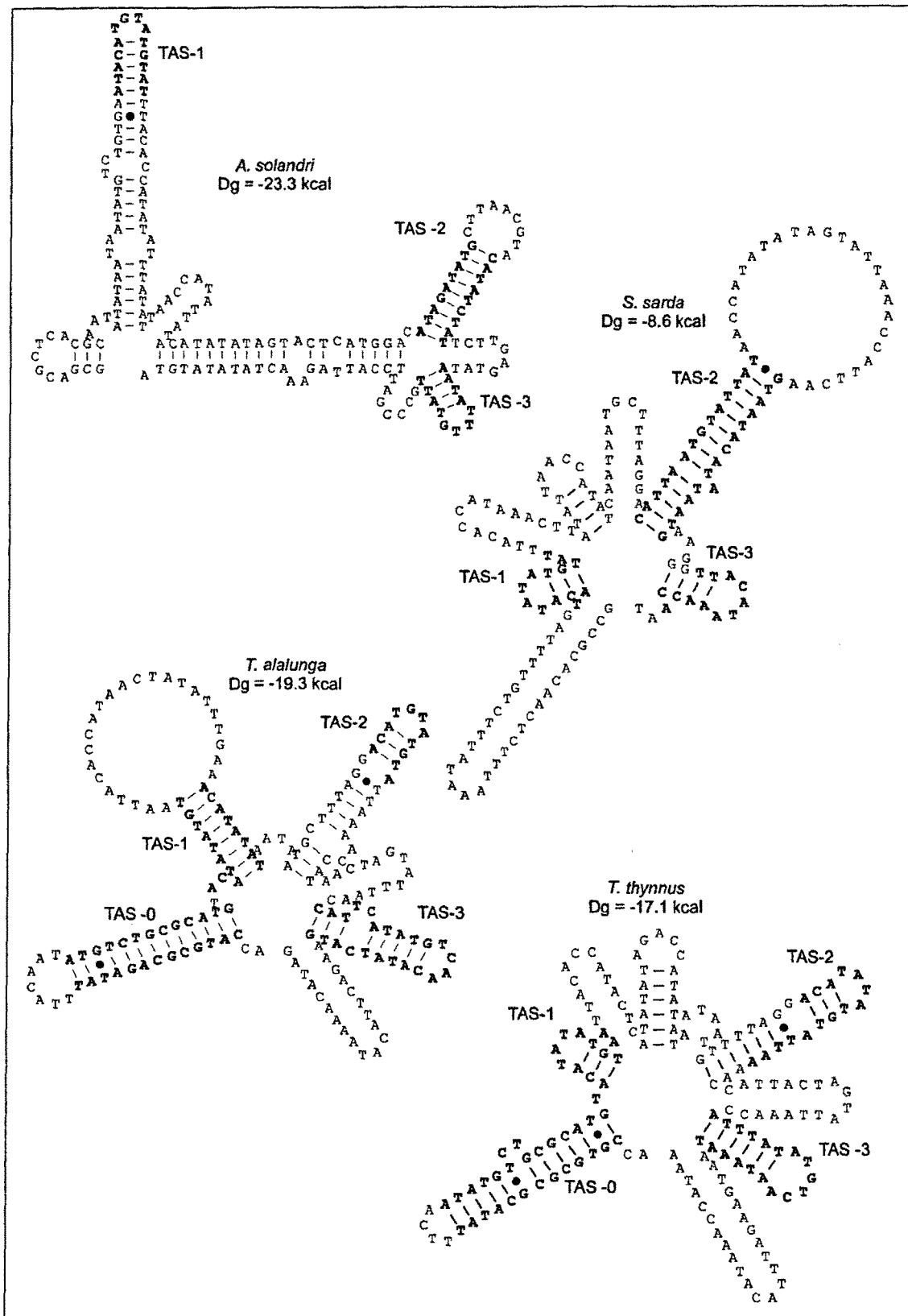


FIGURA 2.2. Estructures secundàries dels primers 180 nucleòtids de les quatre espècies. Les seqüències TAS estan ressaltades amb negra.

### 2.3.2.2. Domini II central

Dins del domini central s'hi poden identificar tres blocs de seqüència conservada similars als descrits en mamífers: CSB-D, CSB-C i CSB-B (Sbisà *et al.*, 1997). A més, just a l'extrem 5' d'aquest domini també s'hi localitza la capsa GTGGG.

Dels tres motius, el CSB-D és el primer que es localitza corrent avall i comprèn uns 27 pb (excepte en *T. thynnus* que té 26 pb). La característica més remarcable d'aquest bloc és la gran homologia de seqüència entre espècies evolutivament molt llunyanes. Pràcticament no s'hi observen canvis quan es comparen les seqüències de les espècies de l'ordre perciformes disponibles fins a la data juntament amb representants dels ocells i mamífers (FIGURA 2.3).

Continuant corrent avall dins del domini II, a uns 37 pb del CSB-D, es troba el bloc CSB-C d'una llargària de 15 pb, uns 10 pb més curt que el descrit pels mamífers. A uns 60 pb més avall es troba el CSB-B, amb una longitud d'uns 25 pb, el qual pràcticament està només compostat per pirimidines.

### 2.3.2.2. Domini III

Al igual que el domini anterior, el domini de l'extrem 3' del D-loop es caracteritza per la presència de diversos blocs de seqüència conservada. El primer bloc és el CSB-1 que en mamífers presenta la seqüència 5'-GACATA-3' (Saccone *et al.*, 1991; Sbisà *et al.*, 1997). Dins del tercer domini de les quatre espècies i aproximadament 75 pb corrent avall de l'origen d'aquest domini s'identifica un patró de seqüència similar al dels mamífers. Alguns autors postulen que en els peixos no es presenta aquest bloc de seqüència conservada (Lee *et al.*, 1995; Faber & Stepien, 1998).

Espècies	CSB-D		CSB-2	
<i>A. solandri</i>	GGCATTGGT	TCCT-ATTTC	AGGTCCAT	TTAAACCCCC C-TACCCCC -
<i>S. sarda</i>	.....C.....	.....C....	...G....	.....
<i>T. alalunga</i>	.....	.....C....	...G....	.....
<i>T. thynnus</i>	.....-	.....C....	...G....	.....
<i>X. gladius</i>	.....	.....C....	...G....	.A.....
<i>Bathybates sp.</i>	.....C.....	.....	.....TA	.A..C..... C
<i>Champsochromis spiliorhynchus</i>	.....C.....	.....	.....TA	.A..C..... C
<i>Cyrtocara moori</i>	.....C.....	.....	.....TA	.A..C..... C
<i>Haplochromis obesus</i>	.....C.....	.....	.....A	.A..C..... C
<i>Lethrinops auritus</i>	.....C.....	.....	.....TA	.A..C..... C
<i>Lobochilotes labiatus</i>	.....C.....	.....	.....A	.A..C..... C
<i>Lutjanus campechanus</i>	.....	.....	...G....	.A.....
<i>Rhinogobius maculafaciatus</i>	.....	.....	...G....	.....
<i>Stenogobius hawaiiensis</i>	.....	.....	...G....	.A.....
<i>Stizostedion lucioperca</i>	.....	.....C....	...G....	.A.....
HOME	.A...C.....	.....C....	...GT...	CC..... - -
<i>Alectoris rufa</i> (ocells)	.C.-.C.....	...CGG-..	...CA...	?????????? ?????????? .

FIGURA 2.3. Alineació del CSB-D i el CSB-2 en els perciformes, mamífers i ocells. En ocells el CSB-2 no hi és present. Punts indiquen similitud amb la primera seqüència i guions insercions o delecions. Números d'accés al Genbank de les seqüències: *Bathybates sp.* U12556; *Champsochromis spiliorhynchus* U12553; *Cyrtocara moori* U12554; *Haplochromis obesus* U12552; *Lethrinops auritus* U12552; *Lobochilotes auritus* U12550; *Lutjanus campechanus* AF23981; *Rhinogobius maculafaciatus* Y12832; *Stenogobius hawaiiensis* AF032789; *Stizostedion lucioperca* U90624; Home NC001807; *Alectoris rufa* AJ222740.

El següent bloc corrent avall és el CSB-2 amb una seqüència molt ben conservada entre les quatre espècies. Aquest motiu està definit per una seqüència 5'-AT-3' envoltada per dos seqüències de poli C, i té exactament el mateix patró de seqüència per a les quatre espècies (vegeu FIGURA 2.3). A més, similarment al CSB-D, l'aliniació d'aquest motiu entre els perciformes i mamífers s'observa que aquest motiu s'ha conservat al llarg de l'evolució, excepte en el ocells on no hi és present (Marshall & Baker, 1997; Randi & Lucchini, 1998).

L'últim bloc de seqüència conservada dins del D-loop és el CSB-3, localitzat entre el CSB-2 i l'extrem 3' del D-loop i situat relativament a la mateixa



posició que en mamífers. L'elevat grau de similitud d'aquest bloc entre les quatre espècies difereix respecta a la poca conservació descrita per Lee *et al.* (1995) en els telesotis, fins i tot Johansen *et al.* (1990) descriuen la manca d'aquest motiu en el bacallà en el bacallà.

Finalment, just a l'extrem 3' del D-loop s'hi localitza un element de seqüència relativament compartida per a les quatre espècies (vegeu FIGURA 2.1). La seqüència central dins d'aquest bloc (5'-ACATTAgTT-3') és similar a la seqüència del promotor de transcripció de *Xenopus* (5'-ACRTTATA-3'; Boenhagen & Yoza, 1986) i pràcticament igual a la descrita en salmònids (5'-ACATTATR-3'; Shedlock *et al.*, 1992). Ambdós treballs coincideixen a situar-lo al final de tot de la regió control. Així doncs, si es té en compte la seva posició i el patró de seqüència es pot considerar que aquest element és el promotor bidireccional de la transcripció de les dues cadenes (Lsp, *Light strand promoter*, Hsp, *Heavy strand promoter*). Addicionalment, Clayton (1982) proposa que malgrat la certa variabilitat de seqüència, la selecció de la regió promotora depèn del factor específic de seqüència mtTF (*mitochondrial Transcriptional Factor*) que reconeix específicament la seqüència central descrita anteriorment.

### 2.3.3. Patrons de substitució nucleotídica

Per a la totalitat de la regió control els valors divergència entre les espècies van des d'un 7,6% entre les dues espècies de *Thunnus* a un 24,2 % l'*A. solandri* i la bacora (TAULA 2.2). Entre totes les espècies les transversions superen en poc a les transicions (proporció transicions/transversions  $r = 0,8$ ; TAULA 2.3).

**TAULA 2.2.** Proporció de transició/transversió i divergència entre les espècies. Els valors per sobre la diagonal corresponen a l'*r* i els de sota la diagonal a la divergència *p*.

	1	2	3	4
<i>A. solandri</i>		0,9	1,1	0,8
<i>S. sarda</i>	0,232		1,1	1,2
<i>T. alalunga</i>	0,242	0,186		2,1
<i>T. thynnus</i>	0,231	0,182	0,076	

En el cas de transicions, casi les dues terceres parts (un 62%) és entre les pirimidines (C↔T), tot i que la freqüència de les dues pirimidines sumades és de casi un 53% (TAULA 2.3 i vegeu TAULA 2.1). Un patró similar cap un esbiaixament d'aquest tipus de transició sense seguir la composició de bases també ha estat observat en cíclids (Parker & Kornfield, 1997). Pel que fa les transversions, les substitucions si que semblen coincidir amb la composició de bases. Els canvis menys freqüents són els que hi està involucrada la guanina, on s'arriba a l'extrem de només sis substitucions transversionals tipus C↔G. Aquest valor està en proporció amb la baixa freqüència de la suma de les dues bases.

Patrons molt similars de la distribució de les transicions i transversions s'observen dins de les tres espècies que es disposa la seqüència entera del D-loop per més d'un individu (TAULA 2.3). En totes es coincideix amb el resultat observat en cíclids (Parker & Kornfield, 1997), on el canvi més freqüent és el T↔C tot i no estar amb coincidència amb la freqüència de les

**TAULA 2.3.** Nombre de transicions i transversions en tot el D-loop en les quatre espècies en conjunt i per a cadascuna de les tres espècies que es disposa de més d'una seqüència de D-loop per separat.

	<i>r</i>	Transicions		Transversions			
		A↔G	T↔C	A↔T	A↔C	T↔G	C↔G
<i>S. sarda</i>	2,7	8	18	4	3	2	1
<i>T. alalunga</i>	12,3	7	12	1	1	0	0
<i>T. thynnus</i>	2,7	7	10	3	2	1	1
Totes	0,8	25	40	44	20	13	6

bases. En les transversions, el més sorprenent és la pràctica inexistència de canvis que afectin la guanina.

Existeix una relació inversa entre el nombre de transicions i la divergència entre les espècies (vegeu TAULA 2.2). Així per exemple, entre les espècies més properes, la tonyina i la bacora, hi ha més del doble de transicions que de transversions, al contrari de la comparació més divergent entre la bacora i l'*A. solandri* on les transversions superen en 1,25 vegades a les transicions. La disminució de l'acumulació de les transicions a mesura que s'augmenta la distància genètica, es deu a la saturació d'aquestes substitucions per substitució múltiple i que porta a l'homoplàsia. En totes les comparacions, excepte la comparació intragenèrica dels *Thunnus*, es supera una divergència del 15%, valor límit on es considera que per sobre aquesta divergència la resolució filogenètica està reduïda per l'homoplàsia (Moritz *et al.*, 1987). En les comparacions intraespecífiques s'observa un clar augment de la proporció transicions/transversions respecte a les comparacions interespecífiques, amb el cas més extrem de la bacora amb una relació 12,3:1 (vegeu TAULA 2.3). Els valors intraespecífics d'*r* són molt similars als observats per diferents espècies de tonyines (17,8 a 0,07; Alvarado Bremer *et al.*, 1997). La gran diferència entre la relació de transicions/transversions a nivell intraespecífic i interespecífic indica una saturació en la substitucions transicionals en aquest fragment mitocondrial en les comparacions entre espècies.

La representació de l'acumulació de les transicions sobre les transversions en la comparació de les quatre espècies es pot interpolar una línia de regressió de segon ordre amb una  $r^2 = 0,9$  (FIGURA 2.4a). La gràfica presenta una clara disminució de l'acumulació de les transicions respecte les transversions, inicialment la proporció transicions/transversions és de com a mínim 10:1. En canvi, en les comparacions més divergents cau fins a una proporció 1:1 confirmant la saturació en l'acumulació de transicions.

Contràriament a aquest resultat, la comprovació de la saturació en l'anàlisi filogenètica basada en parsimònia de les quatre espècies no sembla indicar que hi hagin nivells alts homoplàsia (Índex de consistència,  $I_c = 0,91$ ; Índex d'homoplàsia  $I_H = 0,09$ ; FIGURA 2.4b). L'augment artificial de  $I_c$  quan es treballa en grups de dades petites, de menys de set seqüències (Hauser & Boyajian, 1997), podria explicar la contradicció d'aquests resultats. És a dir, en l'anàlisi filogenètica la poca homoplàsia observada, i com a conseqüència la poca saturació, podria ser un error de l'anàlisi degut a que només s'ha realitzat en quatre espècies i amb una seqüència per a cada espècie. Tot i aquesta clara saturació del D-loop, la topologia de l'arbre resultant concorda clarament amb les relacions filogenètiques entre les quatre espècies descrites tant per dades morfològiques (Collette *et al.*, 1984; Carpenter *et al.*, 1995) com per dades moleculars (Finnerty & Block, 1995).

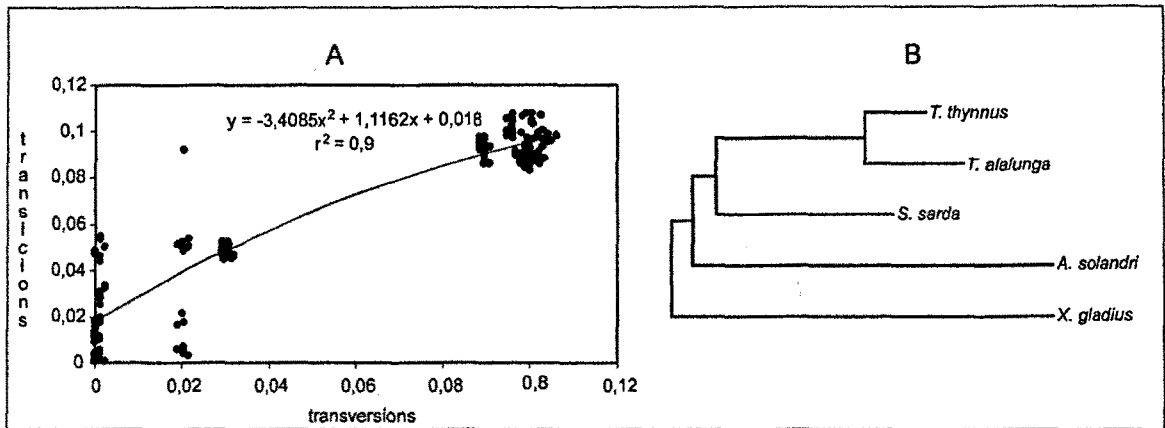
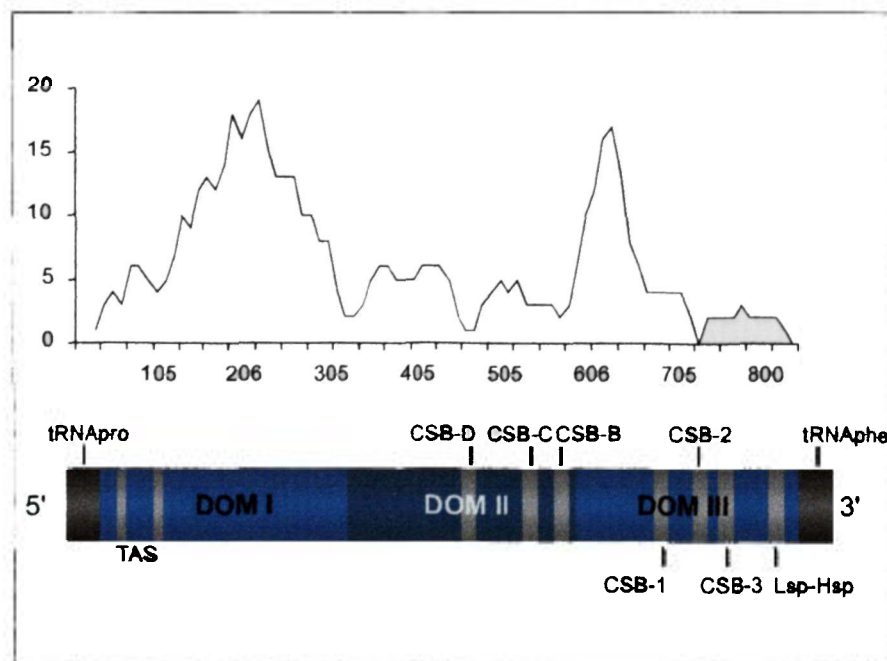


FIGURA 2.4. a) Gràfica de l'acumulació de les transicions sobre les transversions. b) Arbre de la màxima parsimònia de la regió control completa per les quatre espècies.

Tal i com es pot observar quan s'estudia l'estructura del D-loop, aquest segment té la particularitat d'acumular substitucions amb una gran variabilitat entre diferents llocs: existeixen posicions que han mutat diverses vegades, i en canvi n'hi ha d'altres que es mantenen constants en totes les espècies. La distribució de les posicions variables al llarg de la seqüència no segueixen una distribució de Poisson, on totes les posicions tenen la mateixa probabilitat de canviar ( $\chi^2 = 66,32$ , 5 gdl,  $P = 0,000$ ). En canvi, la distribució

observada de les posicions variables sí que s'ajusta a una distribució binomial negativa ( $\chi^2 = 8,92$ , 6 gdl,  $P = 0,178$ ), on la taxa de variació entre les posicions segueix aproximadament una distribució tipus gamma. La distribució gamma es defineix a partir del paràmetre  $\alpha$ , que en aquest estudi s'ha estimat un valor d' $\alpha = 0,5$  per a la totalitat del D-loop i per les quatre espècies en conjunt. El valor extremadament baix del paràmetre  $\alpha$  suggereix una alta taxa de variació entre les diferents posicions (Wakeley, 1993; Gu, Fu & Li, 1995).

Tal i com s'ha comentat anteriorment, una característica que permet delimitar els tres dominis, a part de la variació en la composició de bases, és la diferència de variabilitat entre les regions. La representació gràfica dels llocs polimòrfics a llarg del D-loop corrobora la separació en tres dominis del D-loop observats en l'anàlisi de l'estructura (FIGURA 2.5). En l'alineament interespecífic casi la meitat de les substitucions es troben en el primer domini



**FIGURA 2.5.** Gràfica dels llocs variables al llarg de la regió control. L'esquema de baix representa els principals motius de seqüència conservada que es troben dins de la regió control.

(44%) amb un nivell de variabilitat, descrit mitjançant la diversitat nucleotídica, similar a la de la totalitat del D-loop (TAULA 2.4). La resta de variabilitat està repartida pràcticament en igual proporció en altres dos dominis amb unes proporcions relatives dels tres dominis 2:1:1,2, amb una clara heterogeneïtat de taxa de substitució entre els tres dominis.

En les tres espècies que es disposa el D-loop per més d'un individu, la majoria de variabilitat està en el primer domini, en tots els casos supera el 50%. Els dominis restants, el nivell de variabilitat baixa clarament. Com a patró general es podria dir que el segon domini és molt poc variable amb només un cinquè de tota la variabilitat del D-loop (vegeu TAULA 2.4 i FIGURA 2.5). Aquest resultat concorda amb el resultat de l'anàlisi de l'estructura, ja que és justament en aquest segment a on es troba el CSD-B, descrit com un dels blocs de seqüència més ben conservats al llarg de l'evolució (Lee *et al.*, 1995; Saccone *et al.*, 1991). En el domini III la gran majoria de posicions variables es troben en les primeres 130 bases (vegeu FIGURA 2.1 i 2.5), corrent avall d'aquestes posicions es troben la resta de blocs de seqüència conservada. En el cas de la bacora aquest tercer domini fins i tot és menys variable que el domini central, resultat no gaire consistent amb l'estructura general del D-loop (Brown *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1995), però similar al descrit en alguns mamífers com els carnívors i els cetacis (Sbisà *et al.*, 1997).

TAULA 2.4. Percentatges de posicions variables i variabilitat (diversitat nucleotídica,  $\pi$ ) en cada domini i per a la totalitat del D-loop en les quatre espècies i en les tres espècies que es disposa de tot el D-loop per més d'un individu.

	D-loop		Domini I		Domini II		Domini III	
	Pos. variables	$\pi$	Pos. variables	$\pi$	Pos. variables	$\pi$	Pos. variables	$\pi$
<i>S. sarda</i>	103	0,043±0,001	55/54%	0,069±0,002	21/20%	0,026±0,001	27/26%	0,033±0,001
<i>T. alalunga</i>	121	0,024±0,001	70/58%	0,056±0,002	28/23%	0,015±0,001	23/19%	0,007±0,0008
<i>T. thynnus</i>	129	0,025±0,003	71/55%	0,048±0,007	27/21%	0,013±0,001	31/24%	0,018±0,003
Totes	205	0,114±0,09	103/44%	0,177±0,03	46/22,5%	0,072±0,005	56/27,5	0,092±0,007

## 2.4. DISCUSSIÓ

### 2.4.1. Característiques generals

La llargària de les quatre regions controls és similar, i relativament curta en comparació a la observada en altres peixos. En el gènere *Thunnus* s'ha descrit la capacitat de mantenir una temperatura elevada d'alguns teixits respecte a la temperatura exterior (endotèrmia; Altringham & Block, 1997 i referències a dins). L'endotèrmia comporta una despesa metabòlica alta, i per tant una taxa metabòlica alta en aquestes espècies (Brill, 1996). Així doncs, la no presència de repeticions confirmaria la hipòtesi de Rand (1993) on proposa que les repeticions en tàndem dins del D-loop només es donen en espècies amb una taxa metabòlica baixa. La manca de repeticions en tàndem en el D-loop del bonítol possiblement també estaria relacionat amb un ritme de substitucions alt, però en aquest cas relacionat a un temps de generació més curt que en aquesta espècie, a la grandària més petita i, igualment als dos gèneres *Thunnus*, a la característica clarament migradora (Martin & Palumbi, 1993).

La proporció de les quatre bases en el D-loop està significativament esbiaixat per l'alta proporció d'A-T. Aproximadament el 65 % de les bases són A-T, nivell similar al descrit per altres peixos teleostis (Alvarado Bremer *et al.*, 1997; McMillan & Palumbi, 1997; Parker & Kornifield, 1997; Zhu *et al.*, 1994) però no tan extrem com el observat en la família Scorpanidae amb casi un 75% d'A-T (Rocha-Olivares *et al.*, 1999). La gran diferència en la composició de bases del D-loop indicaria en principi que aquesta regió no està sota els efectes de la selecció i per tant no té cap restricció alhora d'incorporar mutacions.

La tendència cap a una disminució de les G-C està molt més marcada en les guanines, en tot el D-loop només 15% de les bases són guanines. La disminució d'aquesta base encara està més marcada en el primer domini on

s'arriba a l'extrem de menys del 10%. La proporció de guanines, tot i ser baixa, és superior a la observada a les posicions quatre vegades degenerades d'alguns gens mitocondrials de peixos: per exemple, Kocher *et al.* (1995) observen només un 4,5% de guanines en el gen de la ND2 dels cíclids, i Martin (1995) un 2,5% de guanines en el citocrom *b* de taurons. Si es suposa que aquestes posicions degenerades realment no estan sota cap efecte selectiu (Parker & Kornfield, 1997), el relatiu augment de les guanines en el D-loop, i més concretament en el domini central (amb casi un 21%), podria ser explicat per una certa constricció selectiva.

#### **2.4.2. Blocs de seqüència conservats al llarg de la regió control**

Començant pel domini 5', adjacent a l'RNA<sup>Pro</sup>, els primers motius de seqüència més o menys conservada són els elements TAS. Aquest elements semblen estar associats a la terminació de la síntesi de la cadena pesada (Clayton, 1982; Doda *et al.*, 1981; Sbisá *et al.*, 1997). Tal i com s'ha observat en els resultats, les seqüències palindròmiques TAS també estan involucrades en la formació d'estructures secundàries estables, les quals també ajudarien a la funció de terminar la replicació d'aquesta cadena (FIGURA 2.2; Doda *et al.*, 1981; Saccone *et al.*, 1991). La gran variació entre les espècies dels TAS sembla indicar que la terminació de replicació depenent de les estructures TAS és específica per a cada espècie (Madsen *et al.*, 1993).

En els dos dominis restants s'hi observen, com a mínim, fins a sis blocs de seqüència similars als dels vertebrats, que per ordre són: el CSB-D, CSB-C i el CSB-B pel domini central, i els CSB-1, CSB-2 i CSB-3 en el domini III. Tot i que les seves funcions no estan molt clares (Kocher & Wilson, 1991), la seva conservació a llarg de l'evolució indicaria un paper important en el metabolisme mitocondrial.



En el segon domini destaca el CSB-D amb un patró de seqüència altament conservat entre els dels perciformes, ocells i mamífers (vegeu TAULA 2.3) tot i així, es desconeix quina és la seva funció exacta. Lee *et al.* (1995) proposen que aquest element està involucrat en l'ancoratge de proteïnes relacionades amb el metabolisme mitocondrial. Les particularitats, com la gran conservació de seqüència i la situació aproximada al centre del D-loop d'aquest bloc, han fet que sigui un lloc ideal per al disseny de primers (Alvarado Bremer *et al.*, 1995, Shields & Kocher, 1991).

L'últim de bloc situat en el domini central és el CSB-B on pràcticament totes les bases són pirimidines. Aquest bloc és un possible lloc d'ancoratge de la proteïna mtSSB, proteïna amb una alta afinitat cap a les regions pirimidíiques de cadena senzilla. A més, aquesta proteïna sembla estar involucrada en la regulació de la transcripció del DNA mitocondrial (Mignotte *et al.*, 1987).

Totes aquestes funcions descrites per al domini central explicarien una possible actuació de la selecció sobre aquest domini, que a la vegada explicaria l'augment de la proporció de les guanines descrit anteriorment.

Dels tres blocs presents dins del tercer domini el CSB-1 és el de seqüència menys conservada entre les quatre espècies, fins i tot no està present en algunes espècies de peixos com els salmònids i el bacallà (Shedlock *et al.*, 1992). Per altra banda, el CSB-2 té una seqüència altament conservada, tant dins dels escòmbrids com a llarg de tots els vertebrats, a excepció dels ocells que és l'única classe que no hi és present (vegeu TAULA 2.3; Marshall & Baker, 1997). La funció del CSB-2 sembla estar lligada amb el bloc de seqüència menys conservada CSB-3. La presència conjunta dels dos blocs és un possible lloc de reconeixement de la RNAasa MRP, proteïna involucrada en la generació dels primers de RNA necessaris per la replicació del DNA (Clayton, 1982).

L'anàlisi de l'estructura de la regió control de les cinc espècies demostra que tot i la variabilitat de seqüència present en certes regions, s'hi pot identificar clarament els tres dominis i, a excepció de la seqüència de l'origen de replicació, s'han anat detectant els principals elements observats en altres peixos i vertebrats, incloent-hi les seqüències que tenen funció en la iniciació i terminació de la replicació, llocs d'ancoratge de proteïnes i promotors transcripcionals. Anant més lluny, es podria dir que excepte en algun motiu de seqüència conservada que manca en alguna espècie piscícola, l'estructura interna de la regió és exactament igual en tots els peixos i es podria agafar com a estructura consens l'esquema de la FIGURA 2.5. De fet, aquesta estructura no varia gaire de la descrita per a altres vertebrats.

### 2.4.3. Patrons de substitució nucleotídica

La regió control del DNA mitocondrial de les cinc espècies presenta un complex patró de constriccions evolutives, amb un clara acumulació de les transicions sobre les transversions i amb una gran heterogeneïtat en la probabilitat de canvi entre diferents posicions. Com es pot observar, l'acumulació del nombre de transicions ràpidament arriba a un estancament (saturació) en relació al nombre de transversions, i en conseqüència la divergència entre seqüències està emmascarada per les múltiples substitucions. La saturació correspon al patró de substitució d'un acumulament de les transicions sobre les transversions observada en el DNA mitocondrial en general (Moritz *et al.*, 1987) i a la regió control en particular (Brown *et al.*, 1986; Shedlock *et al.*, 1992). A més, totes les distàncies entre les espècies són superiors al 15% que a partir del qual es considera que ni el rellotge molecular ni la resolució filogenètica són fiables (Moritz *et al.*, 1987).

Una possible causa de la major quantitat de transicions és la possible desaminació de les citosines, convertint-les en uracil, durant la replicació

d'una de les cadenes. L'uracil resultant comporta una incorporació d'adenines a la cadena germana i com a conseqüència porta a una transició a la mateixa cadena. Aquest mecanisme també podria explicar l'evolució cap a un DNA mitocondrial ric amb A i T. A més, tot això es veuria afavorit per la manca d'eficiència en la replicació (Meyer, 1993).

La clara saturació de la regió control en les comparacions interespecífiques suggereix que aquest fragment no és un bon marcador genètic per estudis filogenètics entre les cinc espècies estudiades. Aquest resultat concorda amb la manca de resolució d'estudis filogenètics en peixos (Lee *et al.*, 1995) i mamífers (Saccone *et al.*, 1991). Ara bé, sí que s'ha demostrat l'utilitat d'aquest fragment mitocondrial per resoldre relacions filogenètiques dins a una escala evolutiva més baixa. Per exemple entre espècies del gènere *Thunnus* (Alvarado Bremer *et al.*, 1997), en el gènere *Percidae* (Faber & Stepien, 1997), en el subgènere *Sebastomus* (Rocha Olivares *et al.*, 1999) entre altres. Tots aquests estudis coincideixen en estudiar espècies dins d'un mateix gènere i per tant amb una divergència relativament petita que no comporta saturació.

Pel que fa als valors de diversitat intraespecífics de tot la regió D-loop cauen dins del rang descrit en tonyines utilitzant la mateixa metodologia ( $\pi = 0,017-0,072$ ; Alvarado Bremer *et al.*, 1997). Martin & Palumbi (1993) i Rand (1993) coincideixen en establir una relació que les espècies amb taxes metabòliques altes presenten taxes de substitució nucleotídica altes. En aquest sentit, tal i com s'ha explicat anteriorment, les tonyines i el bonítol estan considerades espècies amb una taxa metabòlica alta. En relació en tot això, McMillan & Palumbi (1997) proposen una relació entre els valors de la proporció de transicions/transversions i la taxa de substitució en la regió control dels peixos. En els llinatges amb una taxa de substitució moderada i alta, les proporció de transicions/transversions va des de 10:1 a 28:1. En canvi, en els llinatges on el ritme de substitucions de la regió control és

similar al dels gens que codifiquen proteïnes, la relació transicions/transversions cau fins a nivells similars al 2:1. Segons això, l'alta proporció transicions/transversions intraespecífica observada en aquest estudi corrobora la idea de que espècies amb taxa metabòlica alta tenen taxes de substitució altes.

La superior variabilitat del primer domini respecte als altres dos dominis en totes les espècies fa pensar que aquest fragment és un bon marcador per estudis poblacionals intraespecífics. Coincidentment, Alvarado Bremer *et al.* (1995) descriuen a l'emperador un patró similar de la distribució de variabilitat a llarg tota la regió, on un 60% de totes les posicions variables de la regió control estan dins del primer domini.

Els nivells de diversitat nucleotídica de les tres espècies que es disposa el primer domini per més d'un individu (bonítol, bacora i tonyina vermella) són superiors als descrits per la totalitat del D-loop per a cada espècie (TAULA 2.5). A més, la relació transicions/transversions conjuntament amb el nivell de variabilitat per sota del valor límit del 15% fa pensar que en aquest domini les transicions no estan saturades en cap de les espècies. Finalment, al igual que en la totalitat de la regió control totes les espècies coincideixen tenir les substitucions del primer domini sota una distribució binomial negativa, i no sota una distribució de Poisson, amb una  $\alpha$  extremadament baixa (TAULA 2.5), similar a la calculada per Reeb *et al.* (2000) per l'emperador del pacífic ( $a = 0.201$ ). El valor extremadament baix del paràmetre  $\alpha$  fa suposar una alta heterogeneïtat en la taxa de substitucions entre posicions (Wakeley, 1993; Gu, Fu & Li, 1995). Ara bé, aquesta heterogeneïtat no afecta a l'anàlisi de les dades sempre i quan s'utilitzi un model de substitució que tingui en compte aquest factor (Kocher & Carleton, 1997).

**TAULA 2.5.** Proporció de transicions/transversions ( $r$ ), variabilitat ( $\pi$ ), resultat de l'ajustament a una distribució de tipus Poisson i binomial negativa, i valor d' $a$  per al primer domini del D-loop de cadascuna de les tres espècies de les quals es disposa del domini I del D-loop.

	$r$	$\pi$	Poisson	Binomial negativa	$a$
<i>S. sarda</i>	2,5	0,069±0,001	p = 0,000	p = 0,191	0,28
<i>T. alalunga</i>	9,3	0,056±0,011	p = 0,000	p = 0,123	0,24
<i>T. thynnus</i>	2,4	0,048±0,007	p = 0,004	p = 0,343	0,27

Alhora d'utilitzar un cert fragment de DNA per aquest tipus d'estudis, s'ha de valorar que sigui selectivament neutre. Si el emprat no fos neutre, l'efecte de la selecció podria esbiaixar les anàlisis intraespecífiques i l'estimació de la filogènia (Moritz & Hillis, 1996). Tal i com s'ha anat descrivint, en principi el primer domini de la regió control no hauria d'estar sota els efectes de la selecció ja que, amb excepció de les seqüències TAS, no sembla que tingui una funció important en el metabolisme mitocondrial. En aquest sentit, la neutralitat valorada mitjançant l'anàlisi clàssica de la  $D$  de Tajima (1989) confirma la hipòtesi d'un ajustament a la neutralitat del primer domini en cadascuna de les cinc espècies.

En resum, aquest capítol ha permès definir clarament les estructures conservades dins de la regió control, els límits aproximats dels tres dominis per a cadascuna de les quatre espècies i la corroboració de la idoneïtat de l'utilització d'aquest primer domini de la regió control del DNA mitocondrial com a marcador genètic per estudis de variabilitat intraespecífica.



### ***3. Material i mètodes***





## 3. Material i mètodes

*Nota: Aquest capítol està complementat amb l'annex A, on es descriuen en de forma detallada els protocols de laboratori utilitzats*

### 3.1. MATERIAL BIOLÒGIC

La majoria de les mostres analitzades de les tres espècies provenen de la participació del Laboratori d'Ictiologia Genètica en dos projectes europeus. El primer projecte, *Characterization of large pelagic stocks (Thunnus thynnus, Thunnus alalunga, Sarda sarda, Xiphias gladius) in the Mediterranean* (MED/91/012) realitzat en el període 1993-1995, i el segon projecte enfocat només a juvenils de tonyina vermella *Study of fishing and biology of juvenile bluefin tuna (Thunnus thynnus) from 0-1 age class in the Mediterranean and eastern Atlantic* (MED 95/010) realitzat durant el període 1996-1997.

En el bonítol, absolutament totes les mostres provenen del primer projecte realitzat durant els anys 1993-1995. Pel que fa a la bacora, la majoria de

mostres també provenen del primer projecte, amb alguna ampliació del mostratge gràcies a la col·laboració amb altres laboratoris i investigadors. En la tonyina vermella les mostres provenen de la realització dels dos projectes. Addicionalment, s'ha pogut analitzar dues mostres més gràcies el programa d'ICCAT Bluefin tuna Year Program (BYP).

### 3.1.1. Bonítol

Per al bonítol s'han analitzat un total de quaranta vuit individus del Mediterrani capturats durant les temporades de pesca dels anys 1993 i 1994. Els individus estan repartits en tres localitats: una la conca occidental, al golf de Gènova mar de Ligúria (n = 23), i dues a la conca oriental, golf de Taranto al mar Jònic (n = 9) i costa de illa de Lèsvos al mar Egeu (n = 18) (FIGURA 3.1).

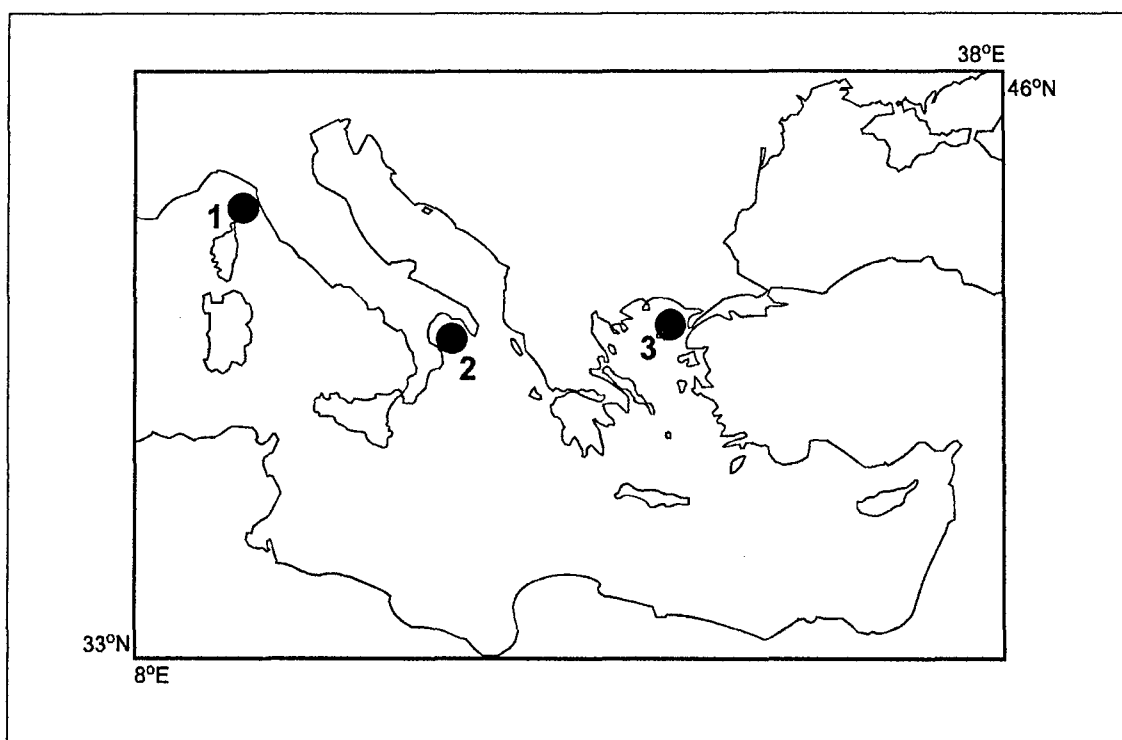


FIGURA 3.1. Localització geogràfica de les mostres de bonítol.

Els individus de Ligúria van ser capturats en diversos mostretjos continus entre finals de 1993 i principis de 1994, i per tant han estat considerat com una única mostra.

A la TAULA 3.1 es resumeix les característiques de les tres mostres de bonítol. Totes les mostres inclouen individus adults i juvenils d'última fase, des d'edat I fins a edat VII.

**TAULA 3.1.** Resum del mostratge del bonítol amb el nom de la mostra, grandària mostral, localització i rang de talla.

<i>Mostra</i>	<i>N</i>	<i>Localització</i>		<i>Període</i>	<i>Talla (cm)</i>	<i>Posició en Fig 4.1.</i>
mar de Ligúria	23	golf de Gènova	44°N, 9°E	13/6/93 - 22/6/94	42-82	1
mar Jònic	9	golf de Taranto	40°N, 17°E	2/2 - 24/10/94	38-73	2
mar Egeu	16	illa de Lesbos	39°N, 26E	1 - 31/10/93	33-71	3

### 3.1.2. Bacora

Per a la bacora s'han analitzat un total de cent vint-i-tres individus capturats en període de 1993 a 1997. El mostratge s'ha realitzat onze mostres distribuïdes en sis localitats: tres en el Mediterrani (n = 57) de les quals dues són de la vessant occidental (mar Jònic i Mediterrani occidental) i la tercera de la conca oriental (mar Egeu); i tres a l'Atlàntic est (n = 66), golf de Biscaia, illes Canàries i illes Açores (FIGURA 3.2).

Els individus de la del Mediterrani occidental, la mostra del golf de Biscaia de l'any 1996, la localitat de les illes Canàries i la mostra de les illes Açores de l'any 1996 han estat cedides per Josu Santiago.

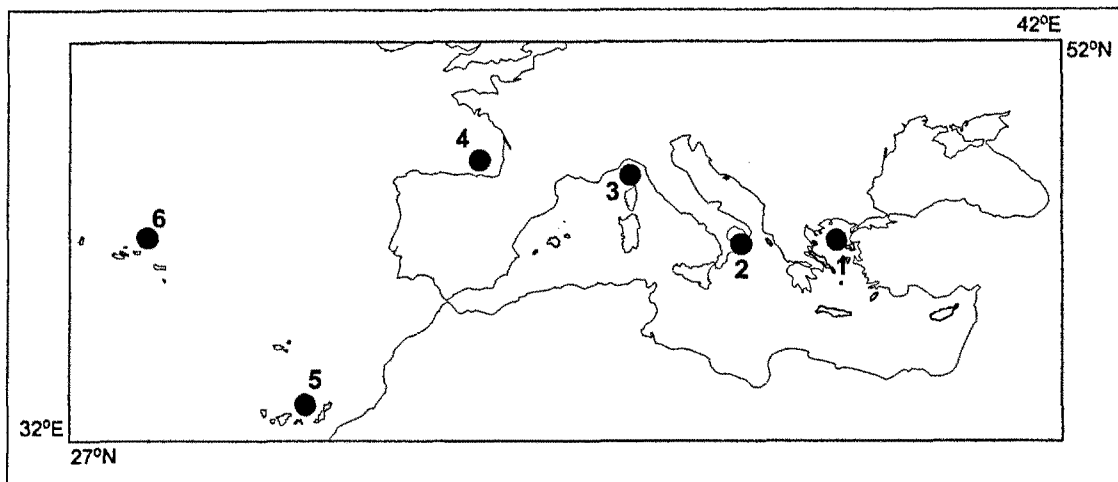


FIGURA 3.2. Localització geogràfica de les mostres de bacora.

A la TAULA 3.2. es resumeixen la localització, grandàries mostrals, el període de captura i el rang de talla de cadascuna de les mostres. Totes les mostres es componen tant d'individus juvenils com adults.

TAULA 3.2. Resum del mostratge de la bacora amb el nom de la mostra, grandària mostral, localització i rang de talla.

Localitat	Localització	mostra	N	Període	Talla (cm)	Posició en Fig 4.2	
mar Egeu	Illes Esporades	38°N, 23°E	Egeu 93	21	1-31/10/93	64-78	1
			Egeu 94	12	10/9-8/10/94	71-81	
mar Jònic	golf de Taranto	40°N, 17°E	Jònic 93	17	12-20/10/93	59-122	2
Mediterrani occidental	golf de València	39°-40°N, 0°-1°E	Med. occ.	7	22/10/96	adults	3
mar Cantàbric	golf de Biscaia	44°N, 2°-4°W	Biscaia 94	22	9-11/94	adults	4
			Biscaia 96	10	18/7/96	adults	
illes Canàries	illes Canàries	29°N-14°-18°W	Canàries 96	4	20/10/96	adults	5
			Canàries 97	4	29/8/97	adults	
			Canàries 98	4	27/4/98	105-114	
illes Açores	illes Açores	39°N-28°	Açores 93	16	9-11/93	adults	6
			Açores 96	6	21/10/96	97-108	

### 3.1.3. Tonyina

Per a la tonyina s'han analitzat un total de tres-cents dinou individus capturats entre els anys 1994-1999. El mostratge total està compost per catorze mostres distribuïdes en set localitats geogràfiques, sis al Mediterrani (n = 269): golf de València, mar de Ligúria, mar Tirrè, mar Jònic, costes de Líbia, i mar Egeu; i una a l'oceà Atlàntic (n = 50) localitzada a la costa atlàntica dels USA (FIGURA 3.3).

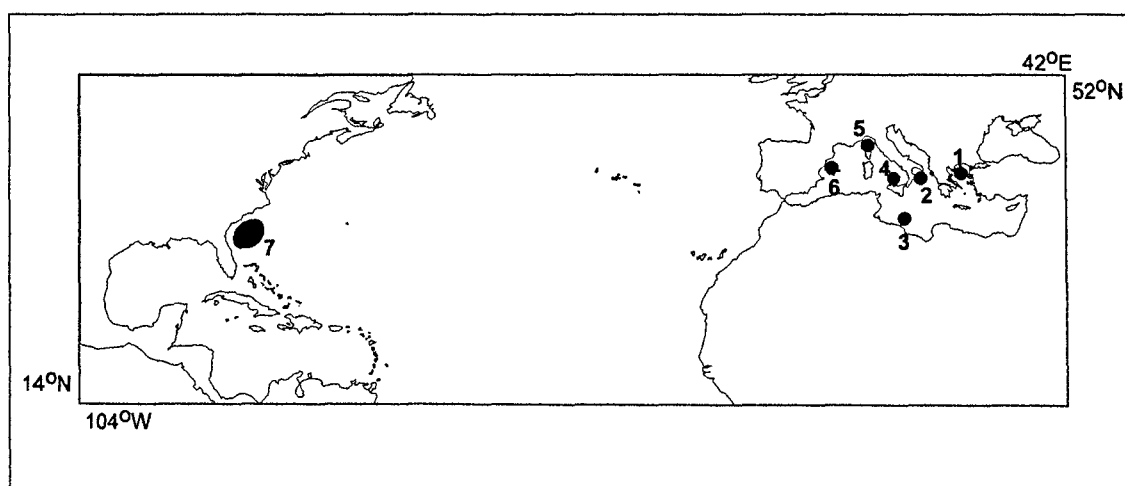


FIGURA 3.3. Localització geogràfica de les mostres de bacora.

La mostra de l'Atlàntic i de Líbia s'ha obtingut a partir del programa d'ICCAT Bluefin tuna Year Program (BYP).

A la TAULA 4.3. es resumeixen característiques de cadascuna de les mostres analitzades. La majoria de les mostres està formada per individus juvenils, excepte la mostra de la costa atlàntica dels USA i la del golf de València de l'any 1994.

**TAULA 3.3.** Resum del mostratge de la tonyina amb el nom de la mostra, grandària mostral, localització i rang de talla.

<i>Localitat</i>	<i>Localització</i>		<i>mostra</i>	<i>n</i>	<i>Període</i>	<i>Talla (cm)</i>	<i>Posició Fig. 4.3.</i>
mar Egeu	Illes Esporades	38°N, 23°E	Egeu 97	22	13/9-3/10/97	30-81	1
mar Jònic	golf de Taranto	40°N, 17°E	Jònic 96	8	12/10-22/12/96	59-122	2
			Jònic 97	19	23/10-27/11/97	43-94	
Líbia	costes de Líbia	31°N-17°E	Líbia 99	11	8/6-19/6/99	111-283	3
mar Tirrè	Costa nord de Sicília	38°N-14°E	Tirrè 96	12	12/10-22/10/96	43-72	4
			Tirrè 97	31	29/8-4/11/97	23-44	
mar Ligúria	golf de Gènova	44°N, 9°E	Ligúria 95	14	17/4-1/11/95	48-110	5
			Ligúria 96	22	19/5-5/10/96	45-111	
			Ligúria 97	36	15/7-9/10/97	52-112	
golf de València	golf de València	39°-40°N, 0°-1°E	València 94	11	28/6-1/12/94	29-52	6
			València 95	2	2/9-14/10/95	21-33	
			València 96	14	17/9-24/10/96	20-67	
			València 97	67	8-23/10/97	27-40	
Atlàntic oest	costa atlàntica USA	35°-44°N, 75°-66°W	Atlàntic 96	29	22-6-2/10/96	130-261	7
			Atlàntic 98	21	9/7- 28/9/98	56-65	

### 3.1.4. Preparació dels teixits

Els laboratoris i organismes participants responsables del coneixement dels paràmetres biològics i de la pesca de les espècies han estat els encarregats de la recollida de mostres en les seves respectives àrees.

Un cop s'han obtingut els individus en els ports, s'han identificat a quina espècie pertanyen, s'han sexat, pesat i mesurat la longitud furcal. Immediatament després, i abans de que comencés el deteriorament del teixit, de cada individu se li ha tret una porció de múscul, part de cor i del fetge. Els teixits identificats amb un codi per a cada individu s'han congelat a -30°C i ha estat enviats al Laboratori d'Ictiologia Genètica mantenint l'estat de congelació.

Abans de començament del treball experimental, s'ha pres una porció de teixit, preferentment muscular, tot i que a vegades no va ser possible, i s'ha disposat amb alcohol al 70-96%, la resta de teixit s'ha mantingut congelat per a anàlisis addicionals.

### 3.2. TREBALL DE LABORATORI

Per tal d'obtenir com a producte final la seqüència de la regió control de cada individu el treball experimental s'ha dividit en tres grans parts:

- i. Extracció del DNA
- ii. Amplificació del fragment mitjançant la reacció de PCR
- iii. Seqüenciació del fragment amplificat

A part d'aquests tres mètodes s'han utilitzat una sèrie de metodologies rutinàries en un laboratori de Genètica molecular que estan descrites en a l'apèndix A.

#### 3.2.1. Extracció del DNA

Per a realitzar l'extracció del DNA s'ha seguit el protocol clàssic d'extracció de DNA total (nuclear i mitocondrial). Tot i que el gen diana és un fragment mitocondrial, gràcies a la particularitat de la PCR, que és capaç d'amplificar un gen a partir de molt poca quantitat de DNA, no es va haver d'utilitzar protocols d'extracció específics pel mtDNA; que d'altra part són molt laboriosos. L'extracció es va fer a partir del protocol tradicional fenol/cloroform descrit per Sambrook *et al.*, (1989) amb algunes modificacions. El producte final de l'extracció s'ha quantificat i s'ha de diluir, si és necessari, per a tenir una concentració de 100ng/ $\mu$ l de DNA.

#### 3.2.2. Amplificació per PCR de la regió control del mtDNA i primers utilitzats

L'optimització de la PCR és possiblement el pas més crític de tot el disseny experimental. L'elecció o disseny d'uns bons *primers*, que hibridin correctament els extrems a la zona per amplificar, és de gran importància.



TAULA 3.4. Seqüència i lloc d'hibridació dels primers utilitzats en aquest estudi

Primer	Seqüència	lloc d'hibridació	font
L15998	5'-TAC CCC AAA CTC CCA AA <sub>g</sub> CTA-3'	cadena pesada del gen tRNA <sup>Pro</sup>	Alvarado Bremer et al. (1995)
P3	5'-AAC TTC CAT CCT CAA CTC CCA Aag-3'	cadena pesada del gen tRNA <sup>Pro</sup>	dissenyat de nou
CSBDH	5'-TgA ATT Agg AAC CAg ATg CCA g-3'	cadena lleugera de la regió CSB	Alvarado Bremer et al. (1995)
Fst	5'-gCT TTA gTT Aag CTA CgC TA-3'	cadena lleugera del gen tRNA <sup>Phe</sup>	dissenyat per Salma trutta

Tal i com s'ha comentat a la discussió del capítol anterior el fragment a analitzar la seqüència és el domini I de la regió control del mtDNA. Addicionalment, també s'ha amplificat la regió control total en cert individus.

Així doncs, per tal d'obtenir tots a aquests productes de PCR s'han necessitat diverses combinacions d'una sèrie de primers (TAULA 3.4 i FIGURA 3.4). Per a totes les espècies, primer domini de la regió control s'ha obtingut utilitzat la combinació de primers: L15998 i CSBDH. El producte resultant d'aquesta reacció és d'un 400 pb. En el moment que s'ha volgut obtindre la totalitat de la regió control la combinació de primers ha estat: L15998 i Fst.



FIGURA 3.4. Llocs d'hibridació dels primers utilitzats en aquest estudi

En alguns individus de bonítol la hibridació del primer L15998 no era del correcta. Així doncs es procedir al disseny d'un nou primer (P3, de prolina 3) amb hibridació a la cadena pesada del gen tRNA<sup>Pro</sup>.

La reacció en sí es s'ha realitzat seguint el protocol estàndard de Saiki *et al.* (1985; 1988) on s'incorpora 1µl de l'extracció (uns 100 ngr) a la reacció de PCR d'un volum final de 25µl. En general s'ha seguit un protocol d'amplificació de trenta-cinc cicles amb temperatura d'hibridació d'entre 50oC-52oC i una concentració final de MgCl<sub>2</sub> 2 a 2,5 mM amb petites variacions segons la combinació de *primers* utilitzada.

Al final, els productes de PCR s'han comprovat en un gel d'agarosa al 1% tenyit amb bromur d'etidi.

### **3.2.3. Seqüenciació del DNA**

Mitjançant la reacció de seqüenciació del DNA s'ha conegut la seqüència del producte de PCR. El mètode seguit ha estat sempre el mètode enzimàtic de Sanger (Sanger *et al.*, 1977), també anomenat mètode del terminador didesoxi.

Per a realitzar la reacció de seqüenciació sempre s'ha utilitzat el mateix *primer* de la PCR. En el cas que el fragment a seqüenciar fos tot el D-loop s'ha realitzar una reacció per a cada extrem. Per a la detecció dels fragments de la reacció de seqüenciació s'han emprat un marcatge de flurocroms per a cadascun del quatre terminadors didesoxi, fet que permet realitzar la reacció en un sol tub. Per a la lectura de les seqüències s'ha emprat el seqüencidor automàtic ABIPRISM310 Genetic Analyzer PE Biosystems seguint el protocol descrit per la casa comercial.

#### **3.2.3.1. Lectura i alineació de les seqüències**

Per a cada espècie s'ha creat un fitxer d'alineació de les seqüències independent utilitzant el programa informàtic SeqEd (PE Biosystems). A mesura que s'ha entrat una seqüència s'han comprovat totes les posicions

comparant cada nucleòtid amb el pic corresponent del cromatograma. Els individus dubtosos s'han reamplificat i reseqüenciat.

L'edició final i l'alineació per a cada espècie s'ha realitzat en els editor de seqüència Xesse (Cabot, 1995) i més recentment en el programa Bioedit (Hall, 1999). Tot i treballar en un fragment hipervariable, el fet d'analitzar seqüències a nivell intraespecífic permet realitzar l'alineació a ull sense massa complicacions. En els casos que s'han comparat seqüència procedents d'espècies diverses s'ha emprat el programa d'alineació múltiple Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) i sempre amb un ajustament final a ull.

### 3.3. ANÀLISI DE LES DADES

L'anàlisi de les dades s'ha seguit un protocol similar a les tres espècies, en els casos que s'hagin utilitzat mètodes diferents aquests s'expliquen a l'apartat corresponent.

El primer preliminar abans de realitzar qualsevol anàlisi i després d'haver recollit i alineat totes les seqüències és calcular el nombre de seqüències diferents existents (haplotipus) i la freqüència de cadascun.

Moltes vegades, i sobretot quan es treballa en uns nivells de variabilitat alts, tai i com és el cas, l'assignació d'haplotipus és pas crucial i de feina força tediosa. En aquest treball s'ha considerat un haplotipus diferent com qualsevol seqüència que difereixi en un sol nucleòtid, les seqüències que difereixen d'una sola inserció o deleció s'han considerat iguals i per tant el mateix haplotipus.

#### 3.3.1. Índexs de diversitat molecular.

Un cop identificats tots els haplotipus el pas següent és avaluar el grau de diversitat per a cadascuna de les espècies en general, per a cadascuna de les localitats es particular i per a cadascuna de les possibles estructures genètiques diferenciades que sortint de l'anàlisi.

La primera mesura de variabilitat genètica és l'anomenada *diversitat haplotípica* ( $h$ ; Nei i Tajima, 1981), anàloga a l'heterogozitat o diversitat gènica dels gens nuclears, es calcula utilitzant la fórmula (1):

$$h = \frac{n}{n-1} \left( 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right) \quad \begin{array}{l} k = \text{Nombre d'haplotipus diferents} \\ p_i = \text{freqüència del haplotipus } i \end{array} \quad (1)$$

La diversitat haplotípica dona una mesura de la quantitat de seqüències diferents presents a la mostra, però no mesura el grau de divergència entre les seqüències o haplotipus.

Una segona mesura de la variabilitat és la *diversitat nucleotídica* ( $\pi$ , Nei, 1987), definida com el número mitjà de diferències nucleotídiques per lloc entre les diferents seqüències i es calcula com:

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{ij} p_i p_j \pi_{ij} \quad \begin{array}{l} \pi_{ij} = \text{proporció de nucleòtids diferents} \\ \text{entre l'haplotipus } i \text{ i } j \\ p_i = \text{freqüència del haplotipus } i \end{array} \quad (2)$$

En aquest estudi la proporció de nucleòtids diferents entre haplotipus s'ha estimat s'ha estimat amb la correcció de la distància *gamma Tamura-Nei* amb el paràmetre *a* calculat per a cada espècie i a partir de les dades en el capítol 2.

Aquestes dues mesures s'han calculat utilitzant el programa *ARLEQUIN* (Schneider *et al.*, 1997).

### 3.3.2. Test de neutralitat

D'una manera general, a nivell molecular; es considera que els canvis mutacionals són selectivament neutres. Si el marcador genètic utilitzat no fos neutral l'efecte de la selecció podria esbiaixar les anàlisis de la variació intraespecífica i l'estimació de la filogènia (Moritz i Hillis, 1996). Tot i haver escollit un marcador (mtDNA) que, en principi, no hauria d'estar sotmès a processos selectius, existeixen en la bibliografia diversos exemples de que el mtDNA pot estar sota l'efecte de la selecció (Ballard & Kreitmann, 1995; Kreitmann & Akashi, 1995).

La comprovació de l'ajust de neutralitat per a les seqüències obtingudes, s'ha fet mitjançant l'anàlisi clàssica de la  $D$  de Tajima (1989) utilitzant el programa *ARLEQUIN* (Schneider *et al*, 1997). La base d'aquest mètode és estimar la variabilitat molecular de les seqüències ( $\theta$ ) on,

$$\theta = 4 N_e \mu \quad \begin{array}{l} N_e = \text{grandària efectiva} \\ \mu = \text{taxa de mutació} \end{array} \quad (3)$$

El càlcul directe d'aquest índex a partir de la fórmula és bastant complicat, per la qual cosa es calcula el polimorfisme indirectament a partir de dos mètodes: i) del nombre de posicions diferents; ii) del nombre mitjà de nucleòtids diferents entre tots els parells de seqüències. En una població, els mutants deletaris acostumen a trobar-se en baixa freqüència. L'estimació del polimorfisme a partir de les posicions diferents estarà afectada per la presència d'aquest mutants, ja que no té en compte la baixa freqüència que es troben a la població. En canvi, el càlcul a partir del nombre mitjà de nucleòtids diferents entre tots els parells de seqüències no estarà tan afectat per aquest mutants, ja que en aquest cas, sí que es té en compte la seva freqüència. A partir d'aquí, Tajima (1989) defineix l'estadístic  $D$  com una mesura de la neutralitat que, a grans trets, no és res més que una resta de les dues mesures de polimorfisme.

### 3.3.3. Anàlisi Filogenètica

L'obtenció d'un arbre filogenètic permet la representació gràfica de la història evolutiva dels diferents OTUs (*Operational Taxonomic Units*), en aquest cas els diferents haplotips. La problemàtica rau en obtenir l'arbre que s'acosti més a la realitat; però la dificultat és que l'arbre "vertader" o "real" normalment no es coneix i molt menys quan es treballa en seqüències de nucleòtids. Amb la impossibilitat de saber quin dels diferents arbres s'acosta més al real, es considera que el millor arbre filogenètic és el que es construeix amb el mínim nombre possible de canvis evolutius.

Actualment existeixen diversos mètodes per obtenir arbres filogenètics, que es poden dividir en dos grans grups segons com es considerin les dades:

- Arbres basats en distàncies; prèviament es calculen distàncies evolutives entre tots els parells d'OTUs i es construeix l'arbre considerant les relacions entre aquestes distàncies.
- Arbres basats en caràcters discrets; en aquest cas cada posició nucleotídica és considerada com un caràcter discret, i es construeix l'arbre considerant les relacions evolutives en cada posició.

Per a cadascun dels dos tipus d'arbres filogenètics existeixen diferents algorismes. És realment difícil escollir quin algorisme dona el millor arbre i quina metodologia és la més apropiada pel tipus de dades utilitzades. Ara bé, si es realitzen dos estudis filogenètics independents, basats cadascun en una de les dues metodologies i com a resultat coincideixen a donar un mateix arbre, està generalment acceptat que aquest arbre obtingut s'acosta bastant al 'real' (Hillis *et al.*, 1996).

### **3.3.3.1. Anàlisi de *neighbor-joining***

Per a l'anàlisi basada en distàncies, s'ha escollit l'algorisme *neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987). La metodologia de construcció d'aquests tipus d'arbres és una mica complicada; en termes generals es podria descriure com anar calculant, quan s'afegeix un nou OTU a l'arbre, una nova matriu de distàncies que reculli l'efecte d'ajustar la llargària de la branca de cada parell de nodes amb la mitjana de la divergència de tots els OTUs restants. Al final d'aquest procediment s'obtenen diferents arbres, i es considera el millor el que té el valor més petit de la suma de llargària de totes les branques. Nei (1991) conclou que "el *neighbor-joining* és un bon mètode per obtenir l'arbre evolutiu mínim sempre i quan s'utilitzi una distància apropiada al tipus de dades". Proposa també, que aquest mètode és fins i tot superior a qualsevol

mètode basat en caràcters discrets, quan la taxa de substitució no és constant al llarg del temps i bastant alta. Així doncs, l'elecció d'una distància que s'ajusti al tipus de dades utilitzades és un altre pas crucial per obtenir una bona filogènia.

Dels diferents mètodes per calcular la divergència entre seqüències, s'ha utilitzat el proposat per Tamura & Nei (1993) per ser un dels que sembla acostar-se bastant a la realitat. La diferència respecte als altres coneguts és que, a més de considerar una taxa de mutació diferent entre transicions ( $\alpha$ ) i transversions ( $\beta$ ), també considera que els canvis transicionals entre purines ( $\alpha_1$ ) i pirimidines ( $\beta_2$ ) tenen taxes diferents (vegeu TAULA 3.4 i FIGURA 3.5).

Aquesta distància, com totes les altres, assumeix una taxa de substitució constant al llarg de tota la seqüència. Des de principis dels anys setanta es coneix que la taxa de substitució aminoacídica en el citocrom C varia entre les diferents posicions  $i$ , a més, segueix una distribució de tipus gamma (Uzzel & Corbin, 1971). Posteriorment, aquest patró de variació també s'ha observat en seqüències de DNA (Tamura & Nei 1993; Wakeley, 1993). Aquesta distribució tipus gamma és especificada pel paràmetre  $a$ .

**TAULA 3.5.** Taxes de substitució segons el model de Tamura-Nei on  $\alpha_1$  és la taxa transicional entre purines i  $\alpha_2$  és la taxa transicional entre pirimidines;  $\beta$  és la taxa de les transversions i  $g_i$  són les freqüències nucleotídiques.

<i>Original</i>	Mutant			
	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>
<b>A</b>	-	$g_T\beta$	$g_C\beta$	$g_G\alpha_1$
<b>T</b>	$g_A\beta$	-	$g_T\alpha_2$	$g_C\beta$
<b>C</b>	$g_A\beta$	$g_T\alpha_2$	-	$g_C\beta$
<b>G</b>	$g_A\alpha_1$	$g_T\beta$	$g_C\beta$	-



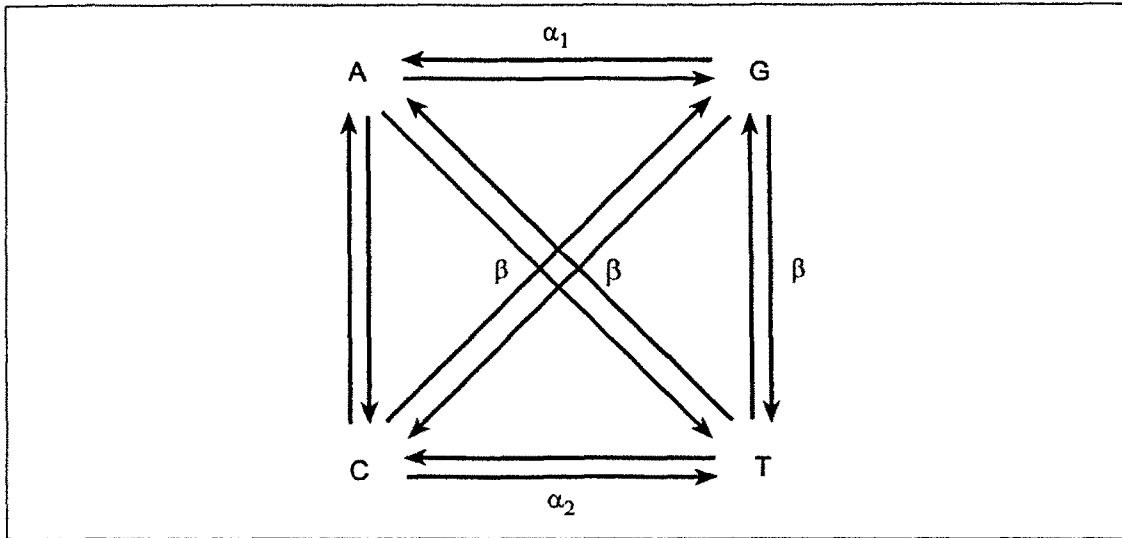


FIGURA 3.5. Model Tamura Nei de substitució nucleotídica

Seguint aquestes premisses i la discussió del capítol 2 s'ha utilitzat la distància gamma *Tamura Nei* amb un valor del paràmetre específic per a cada espècie per calcular les distàncies genètiques entre tots el parells de seqüències. Aquestes distàncies evolutives entre seqüències s'han representat en un arbre filogenètic seguint l'algorisme del *NJ*. Per a realitzar l'anàlisi filogenètica s'ha utilitzat el programa *MEGA* (Kumar *et al.*, 1993).

### 3.3.3.2. Anàlisi de la màxima parsimònia

Per a l'anàlisi filogenètica basada en caràcters discrets s'ha utilitzat el mètode la *màxima parsimònia* en el que l'arbre més parsimoniós és el que necessita el nombre més petits de canvis evolutius. En aquesta anàlisi, cada posició nucleotídica és considera un caràcter i aquests caràcters es consideren desordenats; és a dir, qualsevol canvi d'una base per una altra té la mateixa probabilitat. A més, aquest algorisme considera les posicions on hi ha un *indel* (contracció per indicar inserció/delació) com un canvi.

Actualment existeixen diversos mètodes per calcular aquest arbre. En aquest estudi s'ha utilitzat l'anomenat *parsimònia Wagner* (Kluge i Farris, 1969;

Farris 1970), implementat al programa *DNApars* del paquet informàtic *PHYLIP* (Felsenstein, 1993). Les premisses que utilitza aquest tipus de parsimònia són:

- Cada lloc evoluciona independentment.
- Cada llinatge evoluciona independentment.
- La probabilitat d'una substitució en una base és petita en relació al temps necessari per formar una branca de la filogènia.
- La quantitat de canvis esperats en branques diferents no varia tant, com per esperar que la probabilitat de dos canvis en una branca d'alta taxa de mutació sigui més alta que la probabilitat d'un sol canvi en un branca de baixa taxa de mutació.
- La quantitat de canvis esperats no varia prou perquè un canvi en un sol lloc sigui menys probable que dos canvis en un altre.

### 3.3.3.3. *Bootstrap*

El grau de confiança dels dos arbres obtinguts (*neighbor-joining* i *màxima parsimònia*) s'ha comprovat amb un test de *bootstrap* (Felsenstein, 1985). Tot i que segons el programa utilitzat l'algorisme del *bootstrap* té petites variacions, el principi sempre és el mateix: realitzar diferents remostratges a l'atzar i amb reemplaçament del conjunt de dades original. Així s'obtenen diferents conjunts, tots amb el mateix nombre de posicions, i de cadascun se'n realitza una nova reconstrucció filogenètica. Al final del procés s'obté un arbre consens, en el qual s'assigna a cada node el número de vegades que s'ha trobat el mateix grup de seqüències. El node que té un valor de *bootstrap* més alt és el considerat més robust o amb més confiança. Els programes utilitzats -*MEGA* i *PHYLIP*- permeten realitzar aquest tipus d'anàlisi; encara que el número de remostratges no ha estat el mateix. En l'anàlisi basada en matriu de distàncies s'ha realitzat un total de 1000 remostratges. En canvi, en el de la *màxima parsimònia* només se n'han

realitzat 100 degut a que les necessitats computacionals en aquesta anàlisi són molt més grans.

#### **3.3.4. Anàlisi de l'estructura geogràfica de la variabilitat genètica**

Un dels objectius d'aquest treball és tractar d'esbrinar si existeix cap tipus d'estructuració geogràfica de les espècies al llarg de l'àrea de mostratge en el Mediterrani. Amb aquesta finalitat s'han realitzat fins a tres anàlisis diferents.

##### **3.3.4.1. Simulació de Monte Carlo**

La primera anàlisi ha estat comprovar el grau d'heterogeneïtat geogràfica de la distribució de les freqüències dels diferents haplotipus mitjançant una simulació de Monte Carlo (Roff i Bentzen, 1987), i utilitzant el programa *MONTE* dins del paquet informàtic *REAP* (McElroy *et al.*, 1992). Aquest procediment està dissenyat per minimitzar l'efecte del gran nombre de cel·les buides en la validesa del test de la  $\chi^2$ . El grau d'heterogeneïtat de la matriu original, calculat a partir d'una anàlisi simple de la  $\chi^2$ , es compara amb el que s'estima de diverses randomitzacions de la matriu original. Amb les repetides randomitzacions es pot calcular el valor mitjà de la  $\chi^2$  basat només en l'atzar; així es pot determinar la probabilitat de trobar un valor de la  $\chi^2$  igual o més gran que el calculat per la matriu original.

##### **3.3.4.2. Anàlisi de l'AMOVA**

El segon estudi ha estat una anàlisi jeràrquica de la variància molecular utilitzant el programa *AMOVA* (Excoffier *et al.*, 1992). En aquesta anàlisi es comprova si hi ha una correspondència entre l'estructuració de la variància molecular i l'estructuració geogràfica. L'estructuració geogràfica es divideix en tres nivell jeràrquics: les poblacions; les regions que agrupen diferents

poblacions i la totalitat de la mostra com un únic grup. La flexibilitat de l'AMOVA de combinar les poblacions dins de les diferents regions ha permès comprovar diferents hipòtesis de l'estructuració poblacional d'aquesta espècie. Per a aquest estudi de l'estructuració, a més de calcular la quantitat de varianza molecular corresponent a cadascun dels diferents nivells jeràrquics, també es defineixen els estadístics  $\Phi$ , anàlegs als estadístics F de Wright:

- $\Phi_{ST}$  representa la correlació entre dos haplotipus extrets a l'atzar de la mateixa població respecte de dos haplotipus extrets a l'atzar de tot el conjunt de dades.
- $\Phi_{CT}$  representa la correlació entre dos haplotipus extrets a l'atzar de dins d'un grup respecte de dos haplotipus extrets a l'atzar de tot el conjunt de dades.
- $\Phi_{SC}$  representa la correlació de la diversitat molecular de dos haplotipus extrets a l'atzar a dins de les poblacions respecte de parells d'haplotipus extrets a l'atzar de la regió.

Tot i que el fitxer d'entrada ha de ser una matriu de distàncies quadràtiques, aquí s'ha utilitzat la distància gamma *Tamura Nei* amb el paràmetre *a* corresponent per a cada espècie ja que no s'espera que alteri la interpretació dels resultats (Laurent Excoffier, comunicació personal). D'altra banda, el nivell de significació, tant dels components de la variància com dels estadístics  $\Phi$ , s'ha comprovat mitjançant procediments permutacionals implementats en el programa.

#### **3.3.4.3. Anàlisi de Holsinger & Mason-Gamer**

L'últim mètode utilitzat per estudiar l'estructuració geogràfica ha estat l'anàlisi jeràrquica de Holsinger & Mason-Gamer (1996) utilitzant el programa *Nucleodiv*. Aquest procediment es basa en el càlcul de *gst* entre tots els parells de localitats. Aquesta *gst* és una correcció de la *Gst* de Nei (1982),

apropiada per a dades haplotípiques. La filosofia d'aquesta metodologia és bastant semblant a la de l'AMOVA, amb l'avantatge que l'estructura geogràfica no ha estat imposada abans de l'anàlisi sinó que, si existeix una jerarquia, ja surt directament de l'algorisme. Els resultats que s'obtenen permeten reconstruir un dendrograma, en el qual el temps mitjà de coalescència dels haplotipus extrets del mateix node és sempre més petit que el temps mitjà de coalescència dels haplotipus trets de localitats pertanyent a diferents nodes. La significació d'aquests valors ha estat provada mitjançant 1000 randomitzacions.

### **3.3.5. Anàlisi de la demografia històrica**

#### **3.3.5.1. Mismatch distribution**

Per estudiar l'evolució de la demografia s'ha utilitzat l'anàlisi de les diferències de tots els parells de seqüències, o distribució dels aparellaments discordants - *mismatch distribution*- a dins de cada localitat diferenciada genèticament (Rogers & Harpending, 1992; Rogers, 1995). L'evolució que tenen les poblacions deixen empremtes característiques a la *mismatch distribution* del DNA mitocondrial. Per tant, l'estudi d'aquestes distribucions pot donar informació sobre la història dels canvis en la grandària poblacional.

Existeixen dos models de *mismatch distribution* segons el comportament de la població. En una població que ha crescut o que creix exponencialment, "*sudden expansion model*", s'observa que la filogènia dels diferents haplotipus té una forma d'estrella (Rogers, 1995). Això és causat perquè l'eliminació de llinatges per processos estocàstics és molt petita en poblacions de creixement ràpid. Slatkin & Hudson (1992) troben, que en aquest cas, la *mismatch distribution* segueix una distribució de tipus Poisson, ja que molts dels al·lels difereixen entre ells de pocs canvis i provenen d'un o de pocs

ancestres. Per altra banda, Rogers & Harpending (1992) proposen que la representació dels aparells discordants segueix una altre tipus de distribució. De fet, la representació gràfica de les dues distribucions pràcticament no varia. Si la *mismatch distribution* de la població que s'estudia no difereix significativament d'alguns dels dos tipus citats, es pot estimar la grandària poblacional abans i després de l'explosió i també el temps que ha durat aquesta explosió demogràfica.

El segon model de comportament és quan la població està estable o fins i tot existeix una certa declinació en la grandària poblacional *-equilibrium model-*. En aquest cas, la filogènia que s'obté és molt més estructurada; l'evolució ha conduït a la formació de diferents llinatges i dona una *mismatch distribution* de forma multimodal, en la qual cada pic correspon a un dels diferents llinatges.

## ***4. Resultats***





## **4. Resultats**

### **4.1. BONÍTOL**

#### **4.1.1. Anàlisi descriptiva i índexs de variabilitat molecular**

Dels quaranta-vuit bonítols analitzats s'ha obtingut la seqüència completa de tota la regió control. Ara bé, seguint la discussió del capítol 2 per a realitzar l'anàlisi només s'han utilitzat els 361 pb corresponents al primer domini.

En la comparació dos a dos de totes les seqüències del primer domini s'observen un total de seixanta-nou llocs variables, contant transicions, transversions i indels. Els seixanta-nou posicions variables es reparteixen en quaranta-nou llocs parsimoniosos i disset llocs únics, amb un relació transició / transversió d' $r = 2,5$  (FIGURA 4.1). Cap d'aquestes posicions afecten als primers dos elements de seqüència conservada descrits en aquest domini en el capítol 2 (TAS-1 i TAS-2). Pel que fa al TAS-3 s'hi observen dues posicions polimòrfiques (posicions 161 i 164) ambdues amb un sol canvi. Tot i això, els dos haplotipus que presenten el canvi mantenen la capacitat de formar estructures secundàries estables.

#### 4.1. Bonítol

				111111	1111111111	1111111122	2222222222	2222222222	222333		
				1255	6888023333	3444666778	8889999900	0012222333	3345567777	889145	
	LG	JN	EG	2345680679	6036481346	8235145273	6891346812	5875678123	4522420127	013280	
1	1		1	CCGCAACGAC	TACTTTATAT	CTATCATCCT	GTTCCGATGAA	ATGACCTTAC	AGCACTTCTC	GAGCAC	
2	1		1	-----TACT	...A..G...	T..C...TT.	AACT.G.CGG	...CATCATG	.AT...CT.T	T..T.T	
3	1		1	-----ACT	..TA..G...	T.GCG.CTT.	AACT.G.CGG	G...ATCATG	.AT.....T	T.ATGT	
4	1		1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
5	1	1	1	3	..GCAACGAC	...T..A...	C..T...CC.	GTTC.A.GAA	...ACCTTAC	..C...TC.C	G..C.C
6	1		1	2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
7	1		1	1	-----ACT	..GTA.....	T..C...CTTC	AA.T.G.CGG	...CATCATG	.AT...TCT	T..T.T
8	2		4	6	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
9	1		1	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
10	1		1	1	-----ACT	..TA..G...	T..C...CTT.	AACT...CGG	..A.GTCATG	.AT...C.T.T	T.AT.T
11			4	4	T..T.....	.....GC..	.....G.....	.....	.....	.....	
12			1	1	-----ACT	..TA..G.G.	T..C...CTT.	AACT...CGG	...GTCATG	.AT...T.T	T.ATGT
13			4	4	-----ATT	..TA.....	T..C...CTTC	AA.T.G.CGG	...CATCATG	.AT...TCT	T.AT.T
14			1	1	.....C.T.	..T..A...	.....C..C	..T.....	.....T.C.	..A...	
15		1	1	1	-----TACT	...G..G...	T..C...TT.	AACT.G.CGG	...CATCATG	.AT...CT.T	T..T.T
16		1	1	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
17	1	1	1	2	-----ACT	..TA.....	T..C...CTTC	AA.T.G.CGG	...CATCATG	.AT...TCT	T.AT.T
18	1	1	1	2	.....	.....C	.....GC...	.....G.....	.....	.....	
19		1	1	1	??????ACT	..TA.....	T..C...CTTC	AA.T.G.CGG	...TATCATG	.AT...TCT	T.AT.T
20		1	1	1	??????ACT	..TA.C...	T..C...CTTC	AA.T.G.CGG	...CATCACG	.AT...TCT	T..T.T
21		1	1	1	.....	C...C..C.	.....C.T.	A.....A..	..C.....C..	.....	AG....
22		1	1	1	??????ACT	..TA..G...	T..C...CTTC	AA.TAG.CGG	...CATCATG	.AT...TCT	T.AT.T
23	1		1	1	??????ACT	..TA.....	T..C...CTTC	AA.T.G.CGG	...CATCATG	GAT...TCT	T.AT.T
24	1		1	1	-----ACT	..TA..G...	TC..C...CTT.	AACT.G.CGG	G...ATCATG	.AT...T.T	T.ATGT
25	1		1	1	???????	...G.....	.....	.....	.....	.....	
26	1		1	1	.....	.....	.....	.....G.....	.....G.....	.....	
27	1		1	1	-----ACT	..TA.....	T..C...CTTC	AA.T.G.CGG	...CATCATG	.AT...CTCT	T.AT.T
28	1		1	1	.....	.....	.....	.....	.....C..T.....	.....	
29	1		1	1	TTTGC.ACT	..TA.....	T..C...CTTC	AA.T.G.CGG	...CATCATG	.ATG...TCT	T.AT.T
30	1		1	1	??????ACT	..TA.C...	T..C...CTTC	AA.T.G.CGG	...CATCATG	.AT...TCT	T.AT.T
31	1		1	1	..A.....	.....	.....	.....	.....	.....	
32	1		1	1	TTTGC.ACT	..TA.....	T..C...CTTC	AA.T.G.CGG	...CATCATG	.AT...TCT	T.AT.T
23	9	16	48								

**FIGURA 4.1.** Posicions variables dels trenta-dos haplotipus diferents en els 362 nucleòtids del primer domini en el bonítol i distribució dels haplotipus en les tres localitats. LG, Ligúria; JN, Jònic; EG, Egeu.

Els quaranta-vuit individus s'agrupen en trenta-dos haplotipus diferents. Dels trenta-dos haplotipus set són compartits per més d'un individu, amb una freqüència màxima de l'haplotipus 8 amb sis individus repartits en les tres localitats (FIGURA 4.1). Els haplotipus 11 i 13, ambdós amb freqüència quatre, només estan presents en la localitat del mar Egeu. A conseqüència dels pocs haplotipus amb freqüència elevada, la diversitat haplotípica pren valors propers al màxim  $u$ , amb un rang que comprèn des de  $0,085 \pm 0,053$  per a la localitat de l'Egeu a  $1,000 \pm 0,002$  per a la localitat del mar Jònic i amb una mitjana per a totes les mostres d' $h = 0,948 \pm 0,002$ . Pel que fa als valors de diversitat nucleotídica, la localitat del mar Egeu presenta un valor sensiblement inferior ( $\pi = 0,035 \pm 0,018$ ) quan es compara als observats a

les localitats del mar de Ligúria ( $\pi = 0,079 \pm 0,041$ ), del Jònic ( $\pi = 0,087 \pm 0,051$ ) i per totes les mostres en conjunt ( $\pi = 0,069 \pm 0,002$ ) (TAULA 4.1).

**TAULA 4.1.** Grandària de les mostres, nombre d'haplotipus i resum dels índexs de diversitat molecular per a cadascuna de les localitats i pe les dues clades.

Localitat	n	Nombre d'haplotipus	Índexs de diversitat molecular	
			haplotípica (h)	nucleotídica ( $\pi$ )
Ligúria	23	22	0,996 $\pm$ 0,014	0,079 $\pm$ 0,041
Jònic	9	9	1,000 $\pm$ 0,002	0,087 $\pm$ 0,048
Egeu	16	7	0,850 $\pm$ 0,053	0,035 $\pm$ 0,018
Clada 1	18	17	0,993 $\pm$ 0,021	0,064 $\pm$ 0,034
Clada 2	30	15	0,919 $\pm$ 0,026	0,040 $\pm$ 0,020
TOTAL	48	32	0,948 $\pm$ 0,002	0,069 $\pm$ 0,002

#### 4.1.2. Anàlisi filogenètica

La distància genètica, calculada mitjançant la distància gamma *Tamura-Nei* ( $a = 0,28$ ), entre els trenta-dos haplotipus comprèn entre un 22,4% a un 0,3%, amb un màxim de quaranta canvis entre els dos haplotipus més divergents, un mínim d'un sol canvi, i una mitjana de vint-i-un canvis. La reconstrucció filogenètica del *neighbor-joining* basada en la distància gamma *Tamura-Nei* presenta dos llinatges clarament diferenciats (FIGURA 4.3), anomenats a partir d'aquí clada 1 i clada 2, amb una robustesa màxima pel que fa al valor de *bootstrap* (100%). L'elevada divergència entre les dues agrupacions està definida per vint-i-tres diferències fixes repartides en tres indels, dotze transicions i vuit transversions (FIGURA 4.4). Totes les seqüències de la clada 2 comparteixen la presència de la inserció 5' – GCA – 3', exclusiva d'aquest llinatge. El nombre mitjà de substitucions per posició entre els dos llinatges ( $D_{xy}$ ) és de 10,8% ( $\pm 0,94$ ) i amb la correcció per la divergència dins de llinatges ( $D_a$ ) pren el valor de 9,1 ( $\pm 0,96$ ).

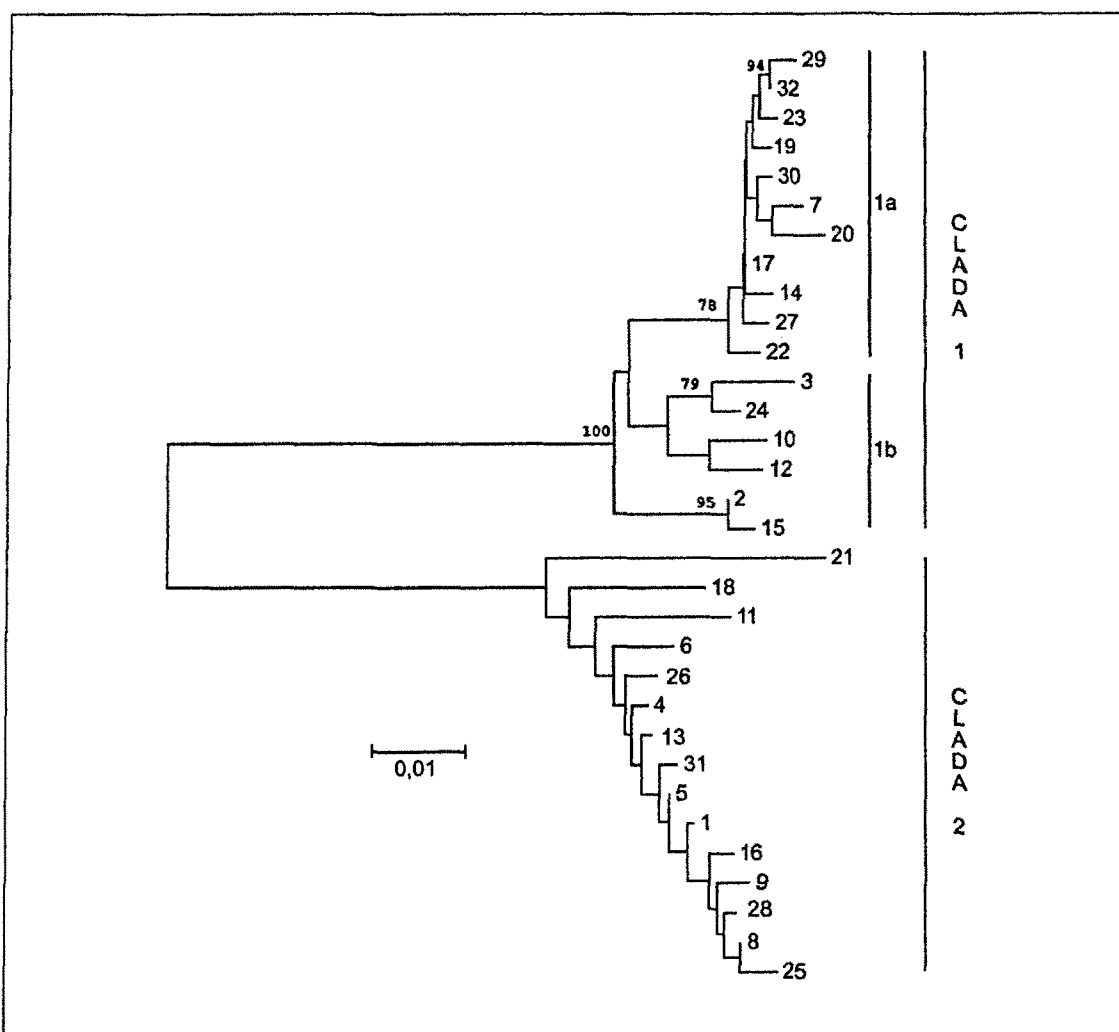


FIGURA 4.3. Arbre *neighbor-joining* amb la distància gamma *Tamura-Nei* ( $a = 0,28$ ) dels trenta-dos haplotipus diferents de bonítol. Només els valors de *bootstrap* superiors al 75% estan representats.

El primer llinatge agrupa disset haplotipus diferents que representen un total de divuit individus. Dins d'aquesta agrupació s'observen dues estructuracions internes, clada1a i clada1b, clarament diferenciades per tres transicions a les posicions 183, 189 i 272 i suportades per un valor de *bootstrap* del 78% (FIGURA 4.3 i 4.4). Quan es realitza una genealogia només amb els haplotipus del clada 1 el node que separa les dues agrupacions internes pren un valor de *bootstrap* més elevat (83%).

Una altre manera de veure la relació entre els haplotipus és construïnt un *minimum spanning tree (mst)* on els haplotipus són utilitzats com a nodes de l'arbre i no com a terminacions. Possiblement la topologia d'aquest segon tipus de reconstrucció reflexa millor les relacions entre els diferents haplotipus (Excoffier *et al.*, 1992). L'arbre resultant del *minimum spanning*

	LG	JN	EG	2345680679	6036481346	8235145273	6891346812	5875678123	4522420127	013280		
				111111	1111111111	1111111122	2222222222	2222222222	222333			
				1255	6888023333	3444666778	8889999900	0012222333	3345567777	889145		
2	1			CC----	TACT	TACATTGTAT	TTACCATTTT	AACTGGTCGG	ATGCATCATG	AATACTCTTT	TAGTAT	C
3	1			.....C...	..T.....	..G.G.C...	.....	G..A.....	.....TC..	..A.G.		L
10	1			.....C...	..T.....	.....C...	.....A....	..AAG.....	.....CT...	..A...		A
12		1		.....C...	..T.....G.	.....C...	.....A....	..AG.....	.....T...	..A.G.		D
15		1		.....G.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....		A
24	1			.....C...	..T.....	..C...C...	.....	G..A.....	.....T...	..A.G.		1b
7	1			.....C...	..GT...A...	.....C..C	..T.....	.....	.....T.C.	.....		
14		1		.....C.T.	..T...A...	.....C..C	..T.....	.....	.....T.C.	..A...		
17	1	1		.....C...	..T...A...	.....C..C	..T.....	.....	.....T.C.	..A...		C
19		1		??????C...	..T...A...	.....C..C	..T.....	..T.....	.....T.C.	..A...		L
20		1		?????AC...	..T...CA...	.....C..C	..T.....	.....C.	.....T.C.	.....		A
22		1		??????C...	..T.....	.....C..C	..T.A.....	.....	.....T.C.	..A...		D
23	1			???????	..T...A...	.....C..C	..T.....	.....G.....	.....T.C.	..A...		A
27	1			.....C...	..T...A...	.....C..C	..T.....	.....	.....C.	..A...		
29	1			..TTTGCC...	..T...A...	.....C..C	..T.....	.....	..G..T.C.	..A...		1a
30	1			???????	..T...CA...	.....C..C	..T.....	.....	.....T.C.	..A...		
32	1			..TTTGCC...	..T...A...	.....C..C	..T.....	.....	.....T.C.	..A...		
1	1			..GCAACGAC	..T...A...	C..T...CC.	GTTC.A.GAA	..ACCTTAC	..GC...TC.C	G..C.C		
4	1			..GCAACGAC	..T...A...	C..T...CC.	GTTC.A.GAA	..ACCTTA.	..C...TC.C	G..C.C		
5	1	1	1	..GCAACGAC	..T...A...	C..T...CC.	GTTC.A.GAA	..ACCTTAC	..C...TC.C	G..C.C		
6	1		1	..GCAACGAC	..TT...A...	A..T...CC.	GTTC.A.GAA	..ACCTTAC	..GC...TC.C	G..C.C		
8	2		4	..GCAACGAC	..T...A...	C..T...CC.	GTTC.A.GAA	..ACCTTAC	..GC.T.TC.C	G..C.C		C
9	1			..GCAACGAC	..T...A...	C..T...CC.	GTTC.ACGAA	..ACCTTAC	..C.T.TC.C	G..C.C		L
11			4	T.GTAACGAC	..T...C...	C..T...CC.	GTTC.A.GA.	..ACCTTAC	..C...TC.C	G..C.C		A
13			4	..GCAACGAC	..T...A...	C..T...CC.	GTTC...GAA	..ACCTTAC	..C...TC.C	G..C.C		D
16	1			..GCAACGAC	..T...A...	C..T...CC.	GTTC.A.GAA	..ACCTTAC	..GC.T.TCC	G..C.C		A
18	1	1		..GCAACGAC	..T...A..C	C..T..GCC.	GTTC...GAA	..ACCTTAC	..C.T.TC.C	G..C..C		
21		1		..GCAACGAC	C..TC.AC..	C..T..CC..	..TTC.A.AAA	..C.ACCTCAC	..GC...TC.C	AG.C.C		2
25	1			??????GAC	..G.T...A...	C..T...CC.	GTTC.A.GAA	..ACCTTAC	..GC.T.TC.C	G..C.C		
26	1			..GCAACGAC	..T...A...	C..T...CC.	GTTC...GAA	..ACCTTA.	..GC...TC.C	G..C.C		
28	1			..GCAACGAC	..T...A...	C..T...CC.	GTTC.A.GAA	..ACCTTAC	..CC.T.TC.C	G..C.C		
31	1			..ACAACGAC	..T...A...	C..T...CC.	GTTC.A.GAA	..ACCTTAC	..C...TC.C	G..C.C		

FIGURA 4.4. Posicions variables dels trenta-dos haplotipus agrupats segons els llinatges i distribució de les tres localitats en aquests llinatges.

*tree* (FIGURA 4.5) està en congruència amb l'observat pel *neighbor-joining* amb la clara distinció dels dos llinatges i les subagrupacions descrites anteriorment.

Quan s'observa la topologia del *mst*, dins de la clada 1 ressalta la forma d'estrella del llinatge 1a amb l'haplotipus 17 situat al centre. Aquest haplotipus, amb freqüència dos, és l'únic compartit per més d'una seqüència i està situat al centre ja que a partir d'aquest és el que es necessiten el menor nombre de canvis per produir totes les altres seqüències. Per altra banda, la clada 1b només agrupa sis haplotipus únics i de seqüència bastant divergent entre ells, tal i com ho demostra la seva diversitat nucleotídica  $\pi = 0,020 \pm 0,003$  superior en una magnitud a l'observada pel llinatge 1a,  $\pi = 0,006 \pm 0,001$ .

El segon llinatge, clada 2, no presenta cap agrupació interna significativa, no hi ha cap branca amb valors de *bootstrap* elevats. La topologia d'aquest

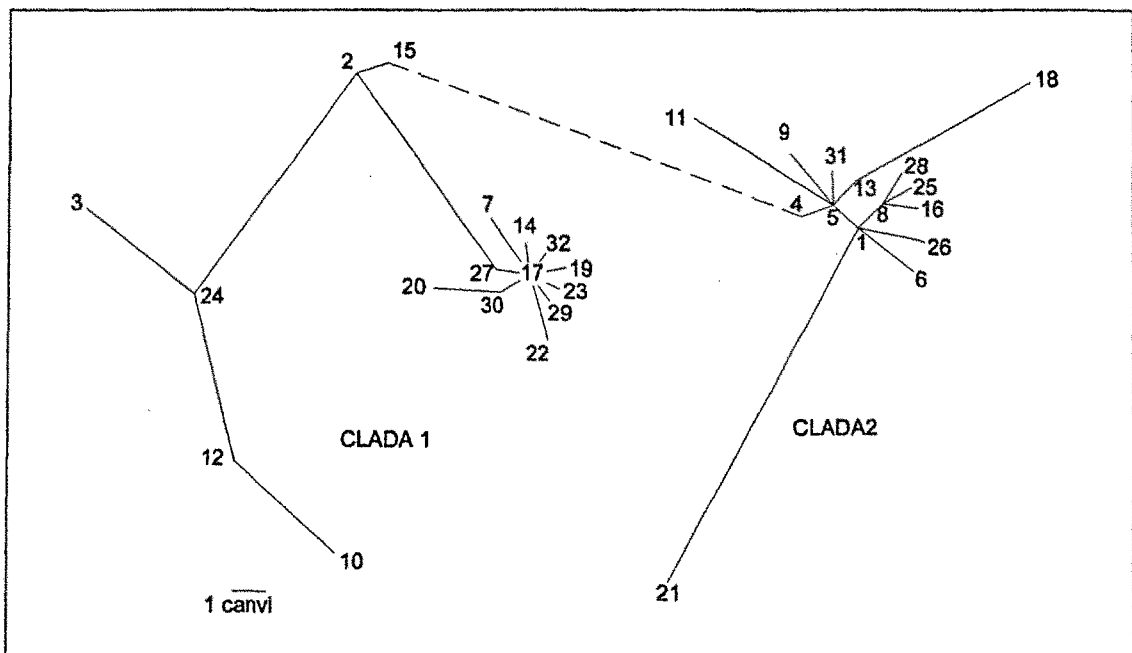


FIGURA 4.5. *Minimum spanning tree* dels trenta-dos haplotipus. Les relacions entre els haplotipus estan definides pel nombre de canvis. La línia discontinua no està a escala i indica un total de trenta-tres canvis.

l'linatge pren una certa forma tipus estrella amb relativament pocs canvis entre els diferents haplotipus. L'arbre *mst* situa prop del centre els haplotipus 1, 5 i 8 que difereixen entre ells d'un sol canvi. Amb excepció dels haplotipus 18 i 21 tots els altres es poden generar amb poques substitucions a partir de les tres seqüències centrals. Els quinze haplotipus localitzats dins d'aquest llinatge representen trenta individus, amb una màxima freqüència per l'haplotipus 8 amb sis individus, quatre dels quals es localitzen a l'Egeu, un a Ligúria i l'últim al Jònic. Conseqüentment, la diversitat haplotípica dins d'aquest llinatge ( $h = 0,919 \pm 0,026$ ) es veu reduïda en comparació a l'obtinguda de la clada 1, on pràcticament cada haplotipus és únic. Similarment, els nivells de diversitat nucleotídica també són més baixos en aquest llinatge ( $\pi = 0,040 \pm 0,020$ ), suggerint una major similitud entre les diferents seqüències (vegeu TAULA 4.1).

#### 4.1.3. Estructura geogràfica de la variabilitat genètica

Una primera aproximació a la possible estructuració de la variabilitat genètica és estudiar la distribució dels diferents haplotipus en les tres localitats. Segons això, dins la localitat del mar Egeu s'hi localitzen set haplotipus diferents, tres dels quals (8, 11 i 13) tenen freqüència quatre. A més, els haplotipus 11 i 13 són exclusius d'aquesta localitat. Per altra banda, les dues localitats restants, Ligúria i Jònic, només a Ligúria s'hi observa un haplotipus amb freqüència superior a u, l'haplotipus 8 amb freqüència dos. Tot i això, l'anàlisi de *Monte Carlo* de la distribució dels trenta-dos haplotipus en les tres localitats no dona diferències significatives ( $P = 0,056 \pm 0,007$ ). A les comparacions dos a dos de la distribució dels trenta-dos haplotipus en les tres localitats (TAULA 4.2), només s'observen diferències significatives en la distribució dels haplotipus en la comparació entre les localitats del Jònic i l'Egeu. Dels quinze haplotipus presents en aquesta darrera comparació només l'haplotipus 5 és compartit per les dues localitats.

Una segona aproximació a l'estructura poblacional és analitzar la distribució de les tres localitats en els dos llinatges descrits a l'anàlisi filogenètica. Dins d'aquesta anàlisi s'observa una clara heterogeneïtat en la distribució de les tres localitats en dos llinatges (TAULA 4.3). Tot i que les dues agrupacions estan presents en totes tres localitats, la distribució dels individus que pertanyen a l'Egeu està esbiaixada cap la clada 2. Dels setze individus d'aquesta localitat, catorze (87,5%) es troben dins de la clada 2 formant gairebé la meitat (46%) dels individus d'aquest segon llinatge. En canvi, les localitats del mar de Ligúria i del mar Jònic estan repartides pràcticament al 50% en les dues clades. Evidentment, l'anàlisi de *Monte Carlo* d'aquesta distribució dels individus de les tres localitats en els dos llinatges corrobora l'heterogeneïtat de la distribució de les clades en les localitats ( $P = 0,046 \pm 0,006$ ) (TAULA 4.2). Curiosament, cap de les comparacions dos a dos de la distribució dels dos llinatges mostra diferències significatives. Només quan es compara la distribució de les clades agrupant les freqüències de Ligúria i Jònic ( $n = 32$ ) contra la localitat del mar Egeu mostra diferències significatives ( $P = 0,007 \pm 0,002$ ). Aquesta discrepància de les probabilitats es deu segurament a grandàries mostrals baixes dins de cada localitat. Així, segons la distribució de les dues clades en les tres localitats, es podria dir que la mostra del mar d'Egeu difereix significativament de les altres dues en conjunt.

**TAULA 4.2.** Resultats de l'anàlisi de Monte Carlo, expressats en valors de  $P$ , de la distribució dels trenta-dos haplotipus i de les dues clades en diverses comparacions entre les localitats.

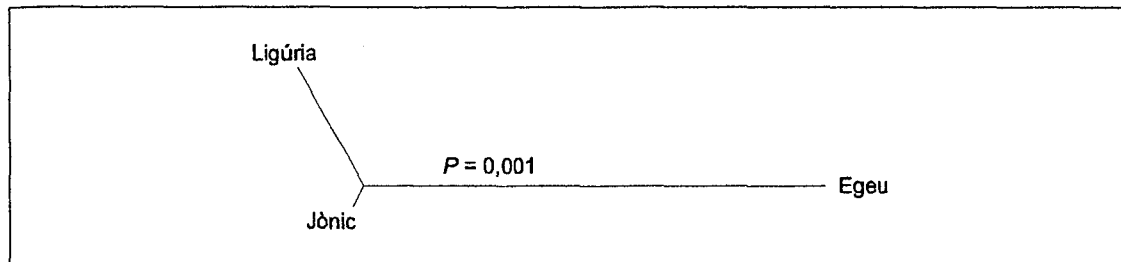
<i>Comparació</i>	<i>distribució dels haplotipus</i>	<i>distribució de les clades</i>
Ligúria / Jònic	0,804 $\pm$ 0,126	0,436 $\pm$ 0,015
Ligúria / Egeu	0,124 $\pm$ 0,014	0,017 $\pm$ 0,004
Jònic / Egeu	0,002 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	0,019 $\pm$ 0,004
Ligúria / Jònic / Egeu	0,056 $\pm$ 0,007	0,046 $\pm$ 0,006
Ligúria i Jònic / Egeu	0,070 $\pm$ 0,008	0,007 $\pm$ 0,006

<sup>a</sup> Probabilitat significativa després de la correcció de Bonferroni



TAULA 4.3. Distribució de les dues clades en les tres localitats.

	clada 1	clada 2	total
Ligúria	11 (47,8%)	12 (52,2%)	23
Jònic	5 (55,5%)	4 (44,5%)	9
Egeu	2 (12,5%)	14 (87,5%)	16
	18	30	48

FIGURA 4.6. Arbre neighbor-joining de la distància  $D_a$  entre parells de localitats. El nivell de significació ve donat per l'anàlisi de Holsinger & Mason Gamer (1996).

Un nou enfocament per a analitzar la possible estructuració de la variabilitat genètica és comprovar si la variància molecular respon a una certa estructuració geogràfica. L'anàlisi basat en l'estudi de Holsinger & Mason-Gamer (1996) confirma de nou la clara separació de la localitat de l'Egeu respecte les dues altres localitats (FIGURA 4.6). L'únic node del dendrograma resultant amb diferències significatives és la que suporta la localitat del mar Egeu ( $P = 0,001$ ).

Una anàlisi similar es pot realitzar calculant la distància entre localitats corregida pels polimorfismes dins de cada localitat ( $D_a$ ). La localitat de l'Egeu és molt divergent respecte qualsevol de les altres dues. En canvi, la distància negativa entre les localitats de Ligúria i Jònic ( $D_a = -1,567$ ) suggereix una gran similitud genètica entre aquestes localitats. Els nivells de significació, calculats mitjançant el programa *Arlequin* després de 1000 rèpliques, mostra novament que les distàncies entre la localitat de l'Egeu i qualsevol de les altres dues no és significativa (TAULA 4.4). Les dues

**TAULA 4.4.** Distància  $D_a$  entre els parells de localitats (sota la diagonal). Nivell de significació de la distància  $D_a$  (sobra la diagonal).

	<i>Ligúria</i>	<i>Jònic</i>	<i>Egeu</i>
Ligúria	--	0,072	0,024
Jònic	-1,567	--	0,023
Egeu	4,559	6,782	--

localitats més occidentals semblen ser molt properes genèticament i diferents de la localitat de l'Egeu. L'arbre *neighbor-joining* amb la distància  $D_a$  entre localitats té exactament la mateixa estructura que el de l'anàlisi Holsinger & Mason-Gamer (FIGURA 4.6).

L'última metodologia per a analitzar la possible estructura geogràfica de la variabilitat molecular s'ha utilitzat l'anàlisi de la variància molecular (AMOVA). Els resultats de l'AMOVA (TAULA 4.5) per a la distribució de la variabilitat en les tres mostres agrupades en sol grup, presenta una elevada diferenciació genètica ( $\Phi_{ST} = 1,126$ ) amb una probabilitat significativa ( $P = 0,044$ ). La quantitat de variabilitat que s'explica per la diferència entre les tres localitats (18,99%) confirma l'estructuració de la distribució de la variància molecular. Per altra banda, la gran quantitat de variància trobada dins de les localitats (81,01%) segurament es deu al utilitzar un marcador genètic amb alt ritme de substitució.

**TAULA 4.5.** Anàlisi de la variància utilitzant la distància gamma Tamura-Nei ( $\alpha = 0,28$ ) agrupant les tres localitats del bonítol en un sol grup.

	gdl	Suma de quadrats	Components de la variància	Percentatge de variació	Índex de fixació	$P^*$
Entre localitats	2	96,094	2,192	12,61	$\Phi_{ST}$ 0,126	0,044
Dins de localitats	45	684,119	15,202	87,39		

\* Probabilitat d'obtenir un valor més extrem del component de la variància i l'índex  $\Phi_{ST}$  que els observats per atzar després de 1000 randomitzacions.

#### 4.1. Bonítol

**TAULA 4.6.** Matriu de la diferenciació genètica de la comparació dos a dos entre les tres localitats del bonítol. Per sota la diagonal estan representats el valors  $\Phi_{ST}$  i per sobre els valors de  $P$  després de 1000 permutacions.

	<i>Ligúria</i>	<i>Jònic</i>	<i>Egeu</i>
Ligúria	--	0,650	0,027
Jònic	-0,054	--	0,008 <sup>a</sup>
Egeu	0,167	0,271	--

<sup>a</sup> valors no significatius després de la correcció de Bonferroni

En la comparació dos a dos (TAULA 4.6), l'única probabilitat significativa surt de la comparació entre Jònic i Egeu ( $\Phi_{ST} = 0,27$ ;  $P = 0,008$ ). Malgrat això, la gran homologia entre Ligúria i Jònic permet ( $\Phi_{ST} = -0,054$ ;  $P = 0,650$ ) agrupar aquestes dues localitats i comparar-les contra la localitat de l'Egeu. En aquesta nova anàlisi de l'AMOVA (TAULA 4.7) s'observa el mateix patró d'estructuració de la variància molecular observat anteriorment: alta diferenciació genètica i certa quantitat de variància molecular entre localitats. Però en aquest cas els nivells són superiors i per tant indiquen una gran heterogeneïtat genètica entre el complex Ligúria / Jònic i l'Egeu.

**TAULA 4.7.** Anàlisi de la variància utilitzant la distància gamma Tamura-Nei ( $\alpha = 0,28$ ) entre Ligúria / Jònic i Egeu.

	gdl	Suma de quadrats	Components de la variància	Percentatge de variació	Índexs de fixació	$P^*$
Entre localitats	2	96,094	2,192	12,61	$\Phi_{ST}$ 0,126	0,044
Dins de localitats	45	684,119	15,202	87,39		

\* Probabilitat d'obtenir un valor més extrem del component de la variància i l'índex  $\Phi_{ST}$  que els observats per atzar després de 1000 randomitzacions.

**TAULA 4.8.** Anàlisi de l'AMOVA posició per posició. Només estan representades les posicions amb un valor de  $P$  estadísticament significatiu. Amb negreta estan ressaltades les posicions que diferències el dos llinatges filogenètics

Posició	entre localitats				dins de localitats				$\Phi_{ST}$	$P$
	suma de quadrats	gdl	$\sigma_a^2$	% variació	suma de quadrats	gdl	$\sigma_b^2$	% variació		
2	0.619	1	0.027	26.803	3.000	40	0.075	73.196	0.268	0.008
26*	1.500	1	0.060	22.170	9.750	46	0.211	77.829	0.221	0.024
57*	1.791	1	0.073	25.751	9.812	46	0.213	74.248	0.257	0.000
59*	1.500	1	0.060	22.170	9.750	46	0.211	77.829	0.221	0.027
86*	1.385	1	0.054	19.708	10.215	46	0.222	80.291	0.197	0.011
138*	1.385	1	0.053	18.295	11.031	46	0.239	81.704	0.182	0.011
145*	1.500	1	0.060	22.170	9.750	46	0.211	77.829	0.221	0.022
165	1.760	1	0.072	25.578	9.718	46	0.211	74.421	0.255	0.006
172*	1.500	1	0.060	22.170	9.750	46	0.211	77.829	0.221	0.022
177	1.760	1	0.072	25.578	9.718	46	0.211	74.421	0.255	0.008
183	0.843	1	0.031	14.979	8.156	46	0.177	85.020	0.149	0.063
186	1.760	1	0.072	25.578	9.718	46	0.211	74.421	0.255	0.004
188*	1.500	1	0.060	22.170	9.750	46	0.211	77.829	0.221	0.026
191*	1.500	1	0.060	22.170	9.750	46	0.211	77.829	0.221	0.024
198*	1.635	1	0.066	22.971	10.218	46	0.222	77.028	0.229	0.006
201*	1.500	1	0.060	22.170	9.750	46	0.211	77.829	0.221	0.026
225	1.156	1	0.045	18.645	9.031	46	0.196	81.354	0.186	0.025
226*	1.635	1	0.066	22.846	10.281	46	0.223	77.153	0.228	0.006
227*	1.500	1	0.060	22.170	9.750	46	0.211	77.829	0.221	0.024
228*	1.500	1	0.060	22.170	9.750	46	0.211	77.829	0.221	0.018
231*	1.635	1	0.066	22.971	10.218	46	0.222	77.028	0.229	0.007
232*	1.385	1	0.054	19.708	10.218	46	0.222	80.291	0.197	0.007
233	2.041	1	0.085	29.103	9.625	46	0.209	70.896	0.291	0.001
242*	1.500	1	0.060	22.170	9.750	46	0.211	77.829	0.221	0.020
271*	1.260	1	0.049	18.881	9.718	46	0.211	81.118	0.188	0.018
272	1.041	1	0.040	17.987	8.437	46	0.183	82.012	0.179	0.020
277*	1.500	1	0.060	22.170	9.750	46	0.211	77.829	0.221	0.016
280*	1.635	1	0.066	22.971	10.215	46	0.222	77.028	0.229	0.006
292	0.666	1	0.021	9.790	9.250	46	0.201	90.209	0.097	0.051
312*	1.500	1	0.060	22.170	9.750	46	0.211	77.829	0.221	0.029
350	2.041	1	0.085	29.103	9.625	46	0.209	70.896	0.291	0.002

Finalment, l'anàlisi de l'AMOVA posició per posició permet estudiar quines són les posicions que provoquen les diferències significatives (TAULA 4.8). El resultat mostra una coincidència pràcticament absoluta entre les posicions que marquen amb un canvi fix la divergència entre els dos llinatges filogenètics i les que presenten diferències significatives. De les setanta posicions variables del primer domini del bonítol, trenta-una presenten un valor de  $P$  significatiu, d'aquestes posicions, vint (sense contar els indels) són les que defineixen els llinatges.

#### 4.1.4. Demografia històrica

Tal i com s'ha comentat en els mètodes generals, els episodis de creixement i decreixement de la demografia de la població modelen la distribució dels aparellaments discordants. La separació en dos llinatges clarament diferenciats i amb una possible assignació dels llinatges a una certa àrea geogràfica (vegeu discussió) permet estudiar la *mismatch distribution* a cadascun per separat.

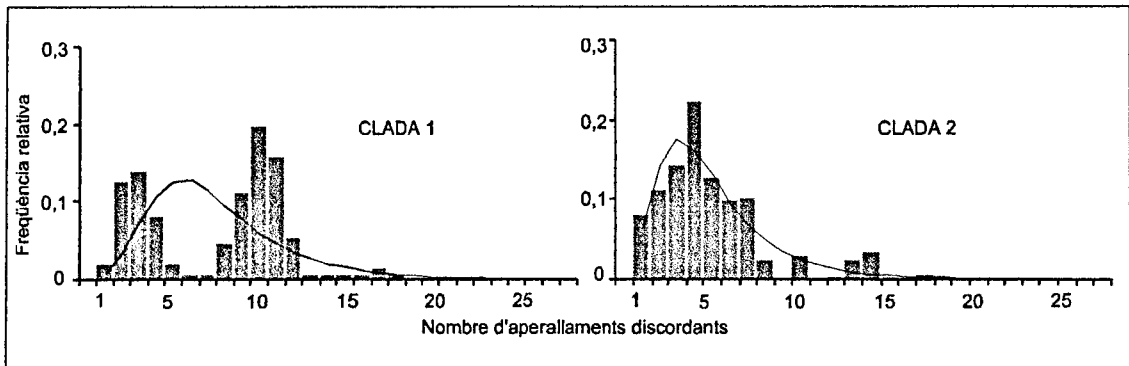
La clada 1 té una topologia de la filogènia amb una certa estructura interna amb dues agrupacions internes ben suportades estadísticament, conseqüentment la *mismatch distribution* pren una forma bimodal, on cada pic es pot assignar a cadascuna de les agrupacions (TAULA 4.11 i FIGURA

**TAULA 4.9.** Paràmetres de la distribució dels aparellaments discordants dels dos llinatges descrits en la filogènia.  $P$  indica la bondat d'ajustament de la distribució observada a l'esperada segons Rogers (1995).

	<i>clada 1</i>	<i>clada 2</i>
n	18	30
Paràmetres		
$\theta_0$	19,759	1,159
$\theta_1$	19,770	13,096
$\tau$	6,461	2,602
$P$	0,09	0,13

4.7). Tal i com es pot observar a la FIGURA 4.7, la distribució difereix clarament de la que s'obté pel model de l'expansió sobtada, suggerint que aquest llinatge s'ha mantingut en un equilibri demogràfic durant bastant de temps. Tot i així, el test de bondat d'ajustament no dona diferències amb un nivell gaire elevat de significació ( $P = 0,09$ ).

Per altra banda, la forma de la distribució dels aparellaments discordants del segon llinatge (FIGURA 4.7), clada 2, s'ajusta a la proposada per Rogers (1995) per un model d'expansió sobtada ( $P = 0,13$ ) amb un pic als tres canvis i una mitjana d'onze canvis. Aquest resultat, juntament amb la topologia de la genealogia en forma d'estrella d'aquest primer llinatge fa suposar que la població ha patit en la seva història demogràfica recent un possible procés de expansió sobtada.



**FIGURA 4.7.** Distribució dels aparellaments discordants de les dues clades. El gràfic en línia indica la distribució segons els *sudden expansion model*.

## 4.2. BACORA

### 4.2.1. Anàlisi descriptiva i índexs de variabilitat molecular

De les cent vint-i-tres bacoques analitzades s'ha obtingut la seqüència completa de tota la regió control de cent setze individus, els set individus restants només s'han seqüenciat els 373 pb del primer domini. Segons això i seguint la discussió del capítol 2 per a realitzar l'anàlisi només s'han utilitzat els 373 pb del primer domini de la regió control del mtDNA.

La comparació dos a dos de les cent vint-i-tres seqüències del primer domini presenta un total de cent nou llocs polimòrfics, dels quals vuitanta-un són parsimoniosos i vint-i-vuit només varien en un sol nucleòtid en una sola seqüència (FIGURA 4.8). El valor d' $r = 9,3$  mostra de nou la clara acumulació de les transicions sobre les transversions típica del mtDNA.

En el cas de la bacora, els motius TAS presenten una certa variabilitat intraespecífica. El TAS-1 situat entre les posicions 36 i 48 està totalment conservat. La variació es presenta en el TAS-2 (situat entre les posicions 93 i 107) amb tres transicions: la posició 96 només varia en l'haplotipus 96 en un canvi  $T \leftrightarrow C$ , la posició 97 varia fins en onze haplotipus tots amb el canvi  $A \leftrightarrow G$  i la posició 98 varia en setze seqüències amb la transició  $T \leftrightarrow C$ . Tot i aquesta variació, el TAS-2 manté la capacitat de formar estructures secundàries estables.

Les seqüències del primer domini dels cent vint-i-tres individus s'agrupen en cent tres haplotipus diferents. Només sis tenen freqüència superior a un, els noranta-set restants són únics. Cal destacar l'haplotipus 1 amb la màxima freqüència d'onze individus (TAULA 4.10). La poca presència d'haplotipus compartits per més d'un individu implica que la diversitat haplotípica per a la totalitat de la mostra prengui un valor proper al màxim  $u$ ,  $h = 0,989 \pm 0,004$ .

4.2. Bacora

FREQ	11	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	3333333333	
1	11	1133466666	7779999911	2233445555	5566667777	7777888888	8899999999	0000000011	1222233334	4556666677	7888888899	0111556677
2	6	1204901689	1260167856	3519270456	7935691234	5689012345	8901234590	1234567814	6567923565	7252346712	5125689023	40789262
3	3	GATTCTTCSA	ACTAGTATAA	TTTTATTGAC	TAAATACAA	CCTCTCCCAA	CTTTATTAT	CACGTAATGG	GCCTATAACT	TCTTCCCTCT	ATAAAGTTTG	GCTCTACGA
4	2											
5	1											
6	1											
7	2											
8	2											
9	1											
11	1											
12	1											
13	1											
14	1											
15	1											
16	1											
17	1											
18	1											
19	1											
21	1											
22	1											
23	1											
24	1											
25	1											
26	1											
27	1											
28	1											
29	1											
31	1											
32	1											
33	1											
34	1											
35	1											
36	1											
37	1											
38	1											
39	1											
41	1											
42	1											
43	1											
44	1											
45	1											
46	1											
47	1											
48	1											
49	1											
51	1											
52	1											
53	1											
54	1											
55	1											
56	1											
57	1											
58	1											
59	1											
61	1											
62	1											
63	1											
64	1											
65	1											
66	1											
67	1											
68	1											
69	1											
71	1											
72	1											
73	1											
74	1											
75	1											
76	1											
77	1											
78	1											
79	1											
81	1											
82	1											
83	1											
84	1											
85	1											
86	1											
87	1											
88	1											
89	1											
91	1											
92	1											
93	1											
94	1											
95	1											
96	1											
97	1											
98	2											
99	1											
111	1											
111	1											
112	1											
113	1											

FIGURA 4.8. Freqüència i posicions variables dels cent tres haplotipus diferents en els 373 nucleòtids del primer domini de la bacora.



TAULA 4.9. Freqüència dels cent tres haplotipus i distribució en les sis localitats.

Haplotipus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35		
Egeu	6	2		1	1										1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Jònic	3	3	1	1		1		2	1	1	1	1	1	1																							
Med Occ			1	2																																	
Biscaia	1																																				
Vic/Can		1					2																														
Açores																																					
Freqüència	11	6	3	2	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Haplotipus	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70		
Egeu	1	1																																			
Jònic																																					
Med Occ																																					
Biscaia			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Vic/Can																																					
Açores																																					
Freqüència	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Haplotipus	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	Total			
Egeu																																				33	
Jònic																																				17	
Med Occ																																				7	
Biscaia												1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	32		
Vic/Can																																				12	
Açores	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22		
Freqüència	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	123		

Els valors de diversitat moleculars dins de les localitats s'han calculat tenint en compte l'anàlisi preliminar descrit a l'apartat 4.2.3.1 (pàg.), on s'agrupen les diferents mostres en sis localitats diferents. Pel que fa a la diversitat haplotípica, els casos amb un índex més elevat són per dues de les tres localitats atlàntiques amb una  $h = 1,000 \pm 0,013$  per a la de Açores i  $1,000 \pm 0,007$  per a la de Biscaia, tots els haplotipus d'aquestes dues localitats són únics (vegeu la TAULA 4.10). En la resta de localitats, la diversitat haplotípica és sensiblement inferior degut a que com a mínim hi ha un haplotipus que comparteix més d'un individu. Els valors de diversitat nucleotídica estan compresos entre el màxim  $\pi = 0,062 \pm 0,035$  observat per a la del Mediterrani occidental i el mínim  $\pi = 0,038 \pm 0,020$  de la localitat del Jònic, i amb una diversitat nucleotídica per a la totalitat de les mostres en conjunt de  $\pi = 0,054 \pm 0,027$ .

#### 4.2.2. Anàlisi filogenètica

L'anàlisi filogenètica s'ha basat en la distància gamma *Tamura-Nei* amb el paràmetre  $a = 0,24$ , el qual s'ha estimat en l'anàlisi realitzada en la discussió

**TAULA 4.11.** Grandària de les mostres, nombre d'haplotipus i resum dels índexs de diversitat molecular per a cadascuna de les mostres i per a les dues clades.

Localitat	<i>n</i>	Nombre d'haplotipus	Índexs de diversitat molecular	
			haplotípica ( <i>h</i> )	nucleotídica ( $\pi$ )
Egeu	33	27	$0,969 \pm 0,022$	$0,060 \pm 0,030$
Jònic	17	12	$0,948 \pm 0,036$	$0,038 \pm 0,020$
Mediterrani occ.	7	6	$0,952 \pm 0,095$	$0,062 \pm 0,035$
Biscaia	32	32	$1,000 \pm 0,007$	$0,050 \pm 0,029$
Canàries	12	11	$0,984 \pm 0,040$	$0,056 \pm 0,030$
Açores	22	22	$1,000 \pm 0,013$	$0,050 \pm 0,026$
Clada 1	103	84	$0,985 \pm 0,006$	$0,035 \pm 0,017$
Clada 2	20	19	$0,995 \pm 0,017$	$0,060 \pm 0,031$
TOTAL	123	103	$0,989 \pm 0,004$	$0,054 \pm 0,027$

del capítol 2. La distància mitjana entre els cent vint haplotipus és d'un 4,8% amb un màxim entre els dos haplotipus més divergents del 13,6% .

La reconstrucció filogenètica utilitzant l'algorisme del *neighbor-joining* basada amb la distància gamma *Tamura-Nei* i amb un *bootstrap* de cinc-centes rèpliques presenta dues agrupacions, anomenades a partir d'aquí clada 1 i clada 2 (FIGURA 4.8). Els valor de *bootstrap* del 65% del node que diferencia els dos llinatges és relativament poc elevat, en general es consideren branques robustes les que tenen valor superior al 95%. La poca robustesa es deu que els dos llinatges només es diferencien per un sol canvi fix. El nombre mitjà de substitucions entre els dos llinatges amb la correcció per la variació intralínia és de  $D_a =$  del 3,3% ( $\pm 0,003$ ).

Dins del primer llinatge gairebé tots els canvis són no informatius i estan situats a l'extrem de les branques (apomorfies). La majoria dels nodes estan suportats per un sol canvi compartit (sinapomorfies), els únics nodes que comparteixen més d'una sinapomorfia són el que presenten un valor de *bootstrap* superior al 65%. En canvi, l'estructura del segon llinatge difereix de l'observada per a la primera agrupació, tot i que a l'extrem de les branques també s'hi troben una certa quantitat d'apomorfies, la genealogia està més estructurada amb varis nodes amb valor de *bootstrap* elevat i definits per més d'una posició compartida.

La clada 1 agrupa vuitanta-quatre haplotipus diferents que representen un total de cent tres individus. Els valors de diversitat d'aquest llinatge són  $h = 0,985 \pm 0,006$  i  $\pi = 0,035 \pm 0,017$ . El segon llinatge és molt menys nombrós, només agrupa dinou haplotipus diferents tots únics excepte l'haplotipus 8 amb freqüència dos, amb una ( $h = 0,995 \pm 0,017$ ). El valor de la diversitat nucleotídica ( $\pi = 0,060 \pm 0,031$ ) més alta que la del primera agrupació suggereix que tot i haver-hi menys quantitat de seqüències en aquesta segon llinatge, aquestes són més diferents entre elles.

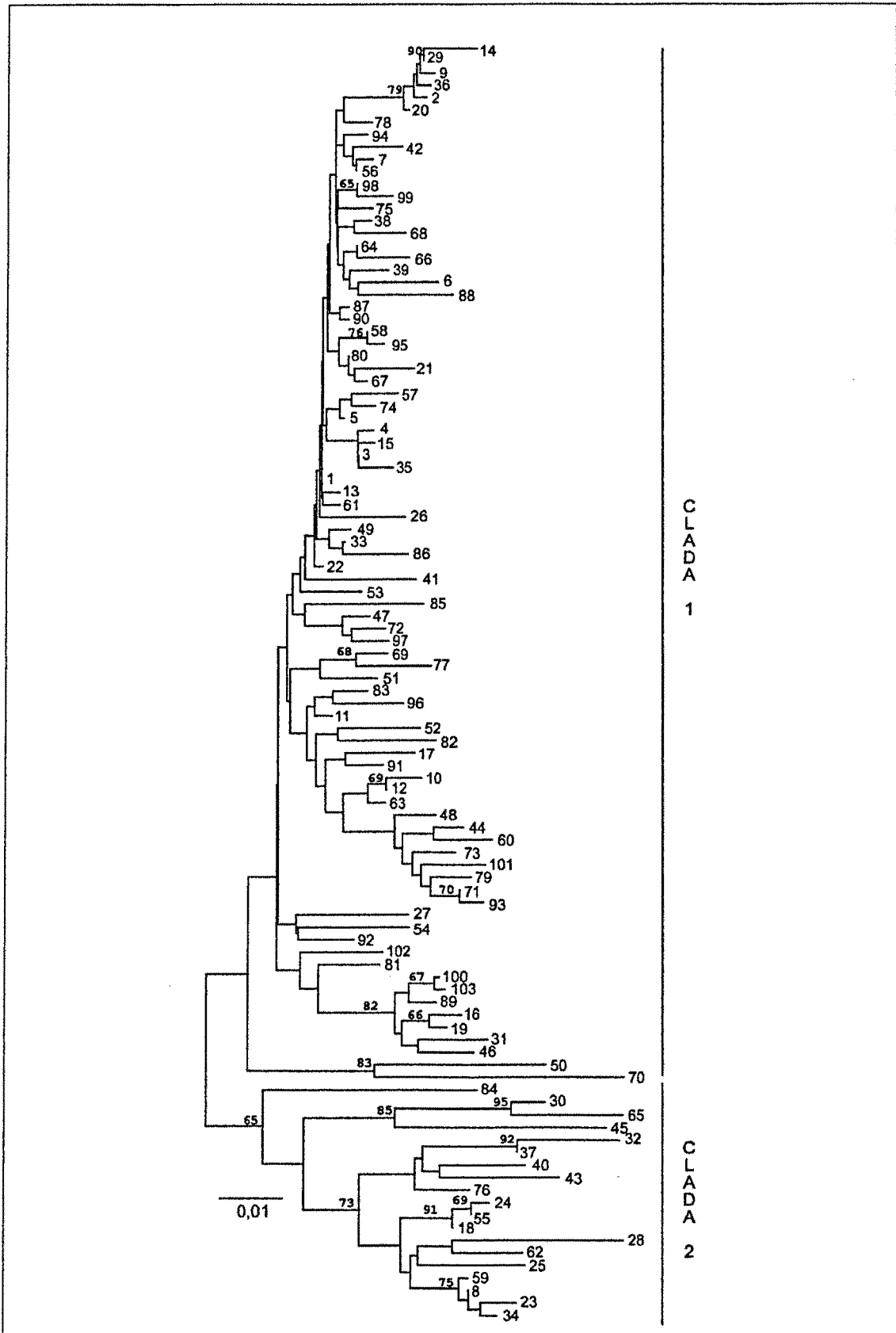


FIGURA 4.9. Arbre *neighbor-joining* amb la distància gamma *Tamura-Nei* ( $\alpha = 0,24$ ). Els números en els nodes indiquen valors de *bootstrap* superiors al 65% després de 500 rèpliques.

La representació de la reconstrucció filogenètica basada en amb l'algorisme del *mst* s'ha separat en els dos llinatges a fi d'obtenir una visualització més clara de les relacions entre les seqüències. La FIGURA 4.10A mostra la representació *mst* pe la clada 1. En el primer llinatge l'haplotipus 1, amb la

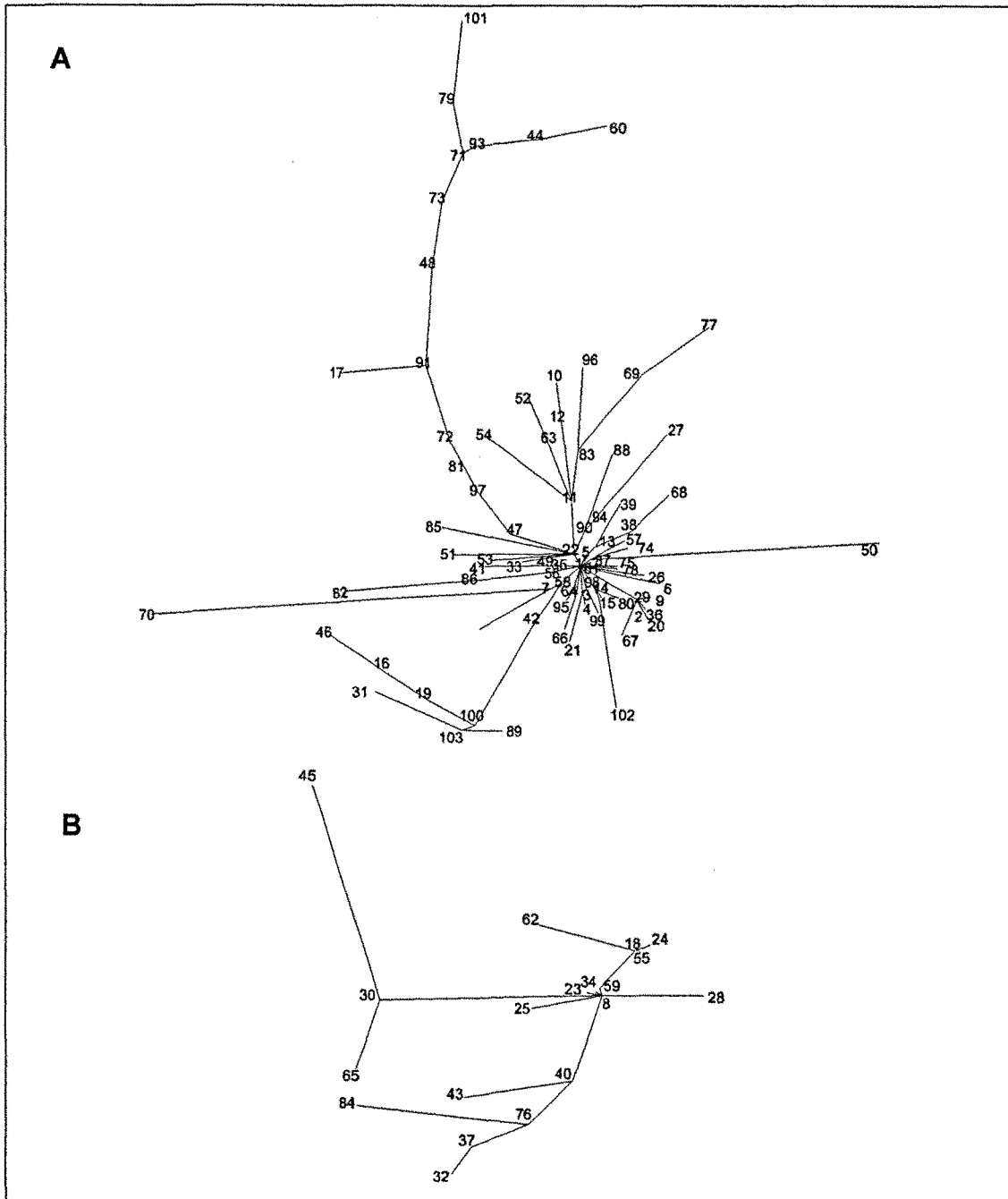


FIGURA 4.10. Representació *mst* separat per clades. A: Clada 1; B: Clada 2.

màxima freqüència d'onze individus, es situa al centre. A partir d'aquest haplotipus només es generen amb un sola substitució set haplotipus (5, 13, 22, 58, 61, 70 i 104). Els setanta-set haplotipus restants divergeixen del haplotipus central de dos a vint canvis amb una mitjana de 6,8. La relació dels diferents haplotipus en la clada 2 observada mitjançant la reconstrucció *mst* (FIGURA 4.10B) mostra una superior divergència entre les seqüències respecte a les de la primera agrupació, tal i com indiquen els índexs de diversitat molecular (vegeu TAULA 4.11). En aquesta agrupació es situa en una posició aproximadament central l'haplotipus 8, l'únic d'aquest llinatge amb freqüència superior a 1. A partir d'aquí, la genealogia difereix clarament de la forma d'estrella, només els haplotipus 34 i 59 difereixen del central en un sol canvi. Els disset haplotipus restants difereixen de l'haplotipus 8 en una mitjana de 9,5 canvis.

#### **4.2.3. Anàlisi de l'estructura geogràfica de la variabilitat genètica**

##### **4.2.3.1. Anàlisi preliminar**

A fi de poder treballar amb grandàries mostrals més elevades s'han agrupat totes les mostres en sis localitats: Egeu, Jònic, Mediterrani occidental, Biscaia, Canàries i Açores. Abans de procedir a una comparació de les sis mostres resultants (TAULA 4.12) s'ha analitzat preliminarment l'heterogeneïtat de la variabilitat genètica dins de les localitats on es disposa de més d'una mostra.

En aquesta anàlisi s'han comprovat dues possibles estructuracions de la variabilitat genètica. En una primera aproximació s'ha estimat l'heterogeneïtat de la distribució dels cent tres haplotipus està heterogèniament repartida mitjançant l'anàlisi de *Monte Carlo*. Addicionalment també s'ha comprovat si la variància molecular està homogèniament repartida mitjançant l'anàlisi de *l'AMOVA*.

**TAULA 4.12.** Grandàries mostrals de les sis localitats resultats després de l'anàlisi preliminar. Les dues últimes columnes resumeixen l'anàlisi preliminar de *Monte Carlo* i AMOVA de les quatre localitats de que es disposa de més d'una mostra.

Localitat	Mostra	n	n total	Monte Carlo	AMOVA*
Egeu	Egeu 93	21	33	$P = 0,186 \pm 0,012$	$P = 0,410 \pm 0,015$
	Egeu 94	12			
Jònic	Jònic 93	17	17		
Med. occ.	Med. occ. 96	7	7		
Biscaia	Biscaia 94	22	32	$P = 0,149 \pm 0,008$	$P = 0,073 \pm 0,005$
	Biscaia 96	10			
Canàries	Canàries 96	4	12	$P = 0,207 \pm 0,004$	$P = 0,207 \pm 0,012$
	Canàries 97	4			
	Canàries 98	4			
Açores	Açores 93	16	22	$P = 0,098 \pm 0,004$	$P = 0,995 \pm 0,002$
	Açores 96	6			
TOTAL			123		

\* Probabilitat d'obtenir un valor més extrem del component de la variància i l'índex  $\Phi_{ST}$  que els observats per atzar després de 1000 randomitzacions.

Tal i com s'observa en la TAULA 4.12 cap de les dues anàlisis mostren diferències significatives en cap de les quatre localitats. Aquest resultat permeten agrupar les diferents mostres de cadascuna de les quatre localitats. Així doncs, per a l'anàlisi de l'estructura geogràfica de la variabilitat molecular en la bacora s'ha utilitzat les sis mostres descrites a la TAULA 4.12.

#### 4.2.3.2. Anàlisi de l'estructura geogràfica de la variabilitat genètica en sis localitats.

A la TAULA 4.9 es representen l'assignació definitiva dels cent tres haplotipus observats repartits en les sis localitats resultants després de l'anàlisi anterior. L'anàlisi basada en *Monte Carlo* de la distribució dels haplotipus en les sis localitats no dona diferències significatives ( $P = 0,258 \pm 0,013$ ). Similarment, els dos llinatges observats en el dendrograma no estan heterogèniament repartits en les sis localitats ( $P = 0,483 \pm 0,015$ ).

**TAULA 4.13.** Anàlisi de la variància utilitzant la distància gamma Tamura-Nei ( $\alpha = 0,24$ ) agrupant les sis localitats en un sol grup.

	<i>gdl</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>Components de la variància</i>	<i>Percentatge de variació</i>	<i>Índex de fixació</i>	<i>P*</i>
Entre localitats	5	68,780	0,188	1,84	$\Phi_{ST}$ 0,018	0,071
Dins de localitats	117	1176,780	10,057	98,16		

\* Probabilitat d'obtenir un valor més extrem del component de la variància i l'índex  $\Phi_{ST}$  que els observats per atzar després de 1000 randomitzacions.

L'anàlisi de la possible estructura geogràfica de la variància molecular, anàlisi de l'AMOVA, s'han agrupant les sis localitats en un sol grup (TAULA 4.13). Quasi tota la variància genètica (96,16%) es distribueix dins de les localitats i per tant només el 1,84% restant està entre les sis localitats. Aquest resultat suggereix una homogeneïtzació de la variabilitat genètica tal i com ho indica la baixa  $\Phi_{ST}$  i la probabilitat no significativa d'aquest índex de fixació.

L'estimació de la  $\Phi_{ST}$  i del nivell de significació de les comparacions dos a dos de totes sis localitats corrobora de nou la manca d'estructuració de la variabilitat genètica (TAULA 4.14). L'únic valor estadísticament significatiu és el que compara la localitat de l'Egeu contra la localitat del Biscaia ( $P = 0,045 \pm 0,007$ ); aquest valor de  $P$  és no significatiu després de la correcció de bonferroni.

**TAULA 4.14.** Matriu de la diferenciació genètica de la comparació dos a dos de les sis localitats. Per sota la diagonal estan representats els valors de  $\Phi_{ST}$  i per sobre els valors  $P$  després de 1000 permutacions.

	<i>Egeu</i>	<i>Jònic</i>	<i>Med. occ.</i>	<i>Biscaia</i>	<i>Canàries</i>	<i>Açores</i>
Egeu	--	0,328 $\pm$ 0,016	0,265 $\pm$ 0,016	0,045 $\pm$ 0,007 <sup>a</sup>	0,320 $\pm$ 0,014	0,055 $\pm$ 0,006
Jònic	0,008	--	0,725 $\pm$ 0,012	0,063 $\pm$ 0,007	0,204 $\pm$ 0,013	0,074 $\pm$ 0,007
Med. occ.	-0,020	-0,042	--	0,155 $\pm$ 0,013	0,778 $\pm$ 0,015	0,424 $\pm$ 0,014
Biscaia	0,035	0,036	0,029	--	0,351 $\pm$ 0,014	0,385 $\pm$ 0,018
Canàries	0,006	0,024	-0,036	0,027	--	0,386 $\pm$ 0,014
Açores	0,039	0,038	-0,003	0,025	0,002	--

<sup>a</sup> valors no significatius després de la correcció de Bonferroni



**TAULA 4.15.** Matriu de la distància  $D_a$  entre les sis localitats. Per sota la diagonal estan representats els valors de  $D_a$  i per sobre els valors  $P$  estimats després de 1000 permutacions.

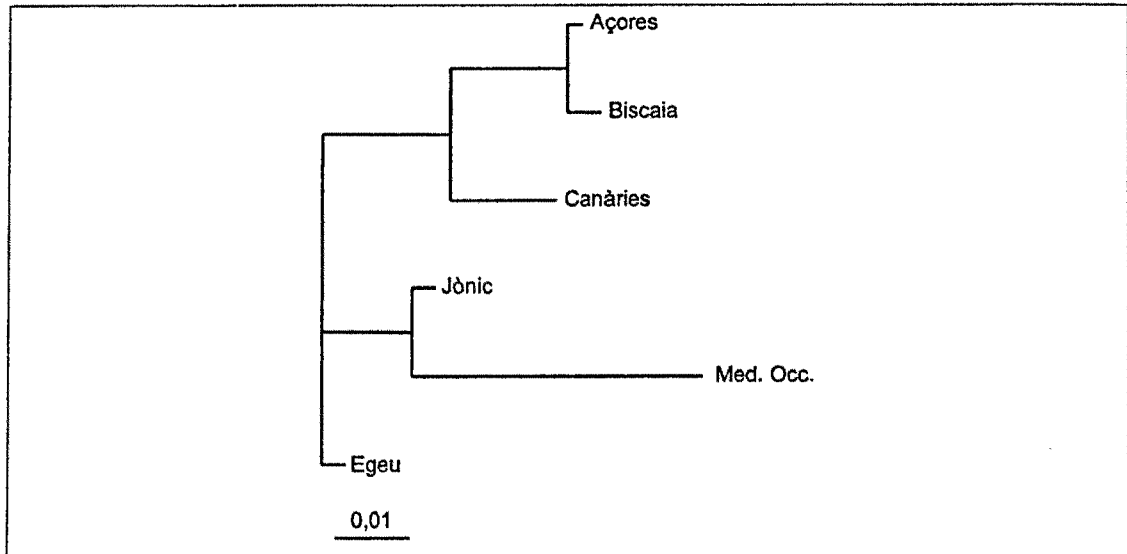
	<i>Egeu</i>	<i>Jònic</i>	<i>Med. occ.</i>	<i>Biscaia</i>	<i>Canàries</i>	<i>Açores</i>
Egeu	--	0,201	0,560	0,042 <sup>a</sup>	0,283	0,060
Jònic	0,290	--	0,888	0,044 <sup>a</sup>	0,232	0,069
Med. occ.	-0,498	-1,077	--	0,203	0,830	0,613
Biscaia	0,785	0,799	0,501	--	0,360	0,357
Canàries	0,180	0,336	-0,851	0,058	--	0,424
Açores	0,886	0,704	-0,306	0,064	0,007	--

<sup>a</sup> valors no significatius després de la correcció de Bonferroni.

El primer indicatiu d'una certa estructuració de la variabilitat genètica surt del dendrograma *neighbor-joining* (FIGURA 4.11) a partir de la distància  $D_a$  (TAULA 4.15) entre les sis localitats. L'estructura del dendrograma agrupa les localitats seguint un patró geogràfic, per una banda agrupa totes les localitats de l'oceà Atlàntic (Biscaia, Canàries i Açores), per una altra banda les localitats dins del mar Mediterrani (Jònic i Mediterrani occidental) excepte la localitat de l'Egeu, la qual queda en un tercer grup. Tot i això, cap de les localitats difereix significativament de les altres, tal i com s'observa en nivell de significació de la distància  $D_a$  (TAULA 4.15).

#### **4.2.3.3. Anàlisi de l'estructura geogràfica de la variabilitat genètica en tres localitats: Atlàntic (Biscaia, Canàries i Açores), Mediterrani (Med. occ. i Jònic) i Egeu**

De l'estructura del dendrograma de la FIGURA 4.11 sorgeix una possible agrupació de les mostres en tres regions geogràfiques. Per una banda s'agrupen totes les localitats que pertanyen a l'oceà Atlàntic (Biscaia, Canàries i Açores), una segon grup són dues de les tres mediterrànies (Mediterrani occidental i Jònic) i finalment hi ha localitat del mar Egeu.



**FIGURA 4.11.** Dendrograma *neighbor-joining* amb la distància  $D_a$  entre les sis localitats.

Seguint la mateixa estructura anàlisi de l'anàlisi preliminar, abans de procedir a fer una comparació d'aquestes tres localitats s'ha analitzat si la variabilitat genètica està homogèniament repartida dins de cada nova localitat. Evidentment, aquest nou estudi de l'homogeneïtat genètica només s'ha comparat dins de les dues localitats que es disposa de més d'una mostra, la localitat atlàntica amb tres mostres: Biscaia Canàries i Açores; i la localitat anomenada del Mediterrani amb dues mostres: Mediterrani occidental i Jònic. Per a la comparació intralocalitats s'ha seguit el mateix criteri anterior, per una banda s'ha analitzat la distribució dels cent tres haplotipus dins de cada una de les dues noves localitats mitjançant l'aproximació de *Monte Carlo*. Per l'altra banda, s'ha realitzat l'AMOVA dins de cada localitat agrupant les mostres de cada localitat en un sol grup.

Els resultats de les dues anàlisis coincideixen en les dues localitats en trobar una manca d'heterogeneïtat de la variabilitat genètica (TAULA 4.16). Així doncs, les sis mostres es poden agrupar en tres localitats diferents: Atlàntic amb seixanta-sis individus (Biscaia, Canàries i Açores,), Mediterrani amb vint-i-quatre individus (Jònic i Mediterrani Occidental) i Egeu amb trenta-tres individus.

**TAULA 4.16.** Resum de les grandàries mostrals de les tres localitats resultants i de les anàlisis de l'agrupació de les dues localitats amb més d'una mostra: Mediterrani (Jònic i Mediterrani occidental) i Atlàntic (Biscaia, Canàries i Açores).

Localitat	<i>n</i>	<i>n total</i>	Monte Carlo	AMOVA*
Egeu		33		
Mediterrani Jònic	17	24	$P = 0,791 \pm 0,0129$	$P = 0,725 \pm 0,012$
Mediterrani occidental	7			
Atlàntic Açores	22			
Canàries	12	66	$P = 0,780 \pm 0,013$	$P = 0,385 \pm 0,017$
Biscaia	32			

\* Probabilitat d'obtenir un valor més extrem del component de la variància i l'índex  $\Phi_{ST}$  que els observats per atzar després de 1000 randomitzacions.

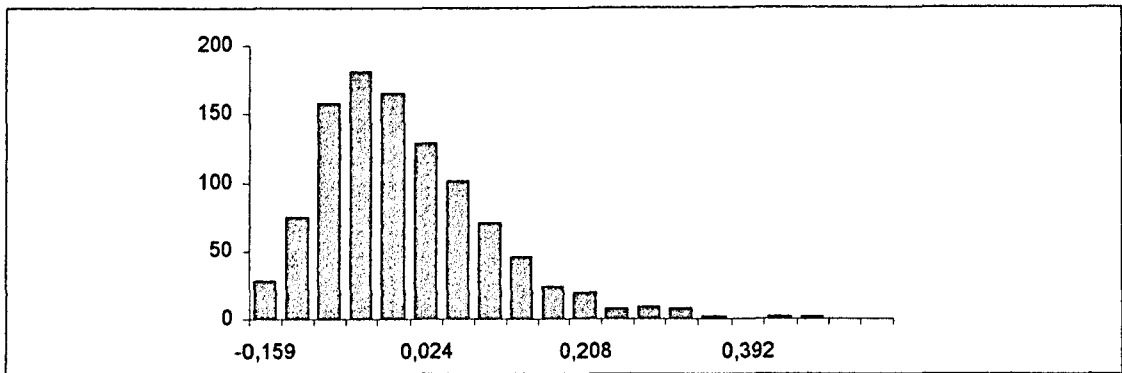
Amb aquesta nova agrupació amb tres localitats diferents es pot repetir tota l'anàlisi de la distribució de la variabilitat genètica. La distribució dels cent tres haplotipus i els dos llinatges en les tres localitats s'ha analitzat altra vegada mitjançant l'anàlisi de *Monte Carlo*. Ambdós resultats coincideixen amb la manca de diferències significatives en la distribució dels cent tres haplotipus ( $P = 0,130 \pm 0,016$ ) i dels dos llinatges ( $P = 0,134 \pm 0,010$ ).

Contràriament a aquests resultats, l'anàlisi de la possible estructuració de la variància molecular (AMOVA) en les tres localitats agrupades en un sol grup mostra un clar nivell de significació (TAULA 4.17). De nou, casi tota la variabilitat s'explica dins de les localitats (97,06%) i un percentatge molt petit es dona entre les tres localitats (2,94%). Ara bé, tot i la gran quantitat de variància dins de les localitats aquesta no està homogèniament repartida, tal

**TAULA 4.17.** Anàlisi de la variància utilitzant la distància gamma Tamura-Nei ( $a = 0,24$ ) agrupant les tres localitats en un sol grup.

	<i>gdl</i>	Suma de quadrats	Components de la variància	Percentatge de variació	Índexs de fixació	$P^*$
Entre localitats	2	42,391	0,302	2,94	$\Phi_{ST}$ 0,029	0,009
Dins de localitats	120	1197,03	9,982	97,06		

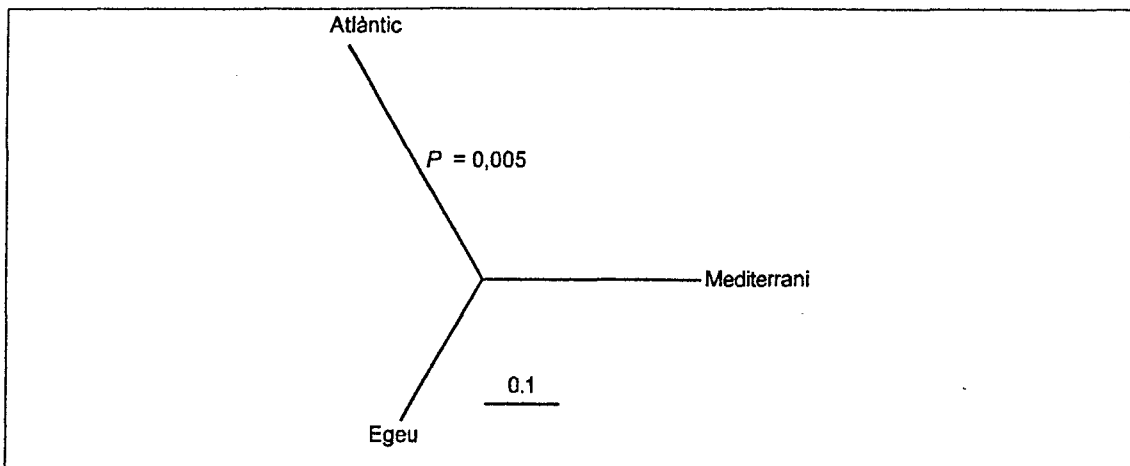
\* Probabilitat d'obtenir un valor més extrem del component de la variància i l'índex  $\Phi_{ST}$  que els observats per atzar després de 1000 randomitzacions.



**FIGURA 4.12.** Distribució nul·la de component de la variància molecular obtinguda després de mil permutacions a l'atzar.

i com indica la probabilitat altament significativa ( $P = 0,009$ ) i la distribució nul·la del component de la variància on s'observa que pràcticament tots els valors de variància obtinguts després de les permutacions són inferiors a l'observat (FIGURA 4.12).

La Taula 4.18 resumeix els valors de  $\Phi_{ST}$  i  $Da$  i el seu nivell de significació en la comparació dos a dos de les tres localitats. La localitat de l'Atlàntic és sempre significativament diferent de les dues localitats Mediterrànies. En canvi, entre les localitats del Mediterrani no s'observen diferències significatives. Addicionalment, el dendrograma resultant de l'anàlisi



**FIGURA 4.13.** Dendrograma neighbor-joining amb la distància  $Da$  entre les tres localitats. El valor de  $P$  s'ha obtingut després de 1000 permutacions a l'atzar en l'anàlisi de Holsinger & Mason Gamer (1996).

**TAULA 4.18.** Valors de  $\Phi_{ST}$  i  $Da$  per sota la diagonal en la comparació dos a dos de les tres localitats. Per sobre la diagonal estan representats la probabilitat de  $\Phi_{ST}$  i  $Da$  respectivament.

	$\Phi_{ST}$			$Da$		
	<i>Egeu</i>	<i>Mediterrani</i>	<i>Atlàntic</i>	<i>Egeu</i>	<i>Mediterrani</i>	<i>Atlàntic</i>
Egeu	--	0,189	0,012 <sup>a</sup>	--	0,181	0,002 <sup>a</sup>
Mediterrani	0,012	--	0,002 <sup>a</sup>	0,780	--	0,007 <sup>a</sup>
Atlàntic	0,032	0,032	--	0,145	0,656	--

<sup>a</sup> probabilitat significativa després de la correcció de Bonferroni.

jeràrquica de la variància molecular de Holsinger & Mason Gamer (1996) coincideix amb el que s'obté a partir de la distància  $Da$  (FIGURA 4.13) El valor de  $P$  obtingut a partir de l'aproximació de Holsinger & Mason Gamer (1996) separa amb una probabilitat significativa ( $P = 0,005$ ) les dues localitats mediterrànies de l'atlàntica.

La discordança entre els resultats de l'anàlisi de Monte Carlo i els basats en la variància molecular es pot deure a que el segon tipus d'aproximació a l'estudi de la variabilitat genètica és més poderós, ja que a més de la freqüència també valora la distància genètica entre cada haplotipus.

**TAULA 4.19.** Grandària mostral i mostres pertanyents a les dues gran localitats.

<i>Localitat</i>		<i>n</i>	<i>n total</i>
Mediterrani	Egeu	33	57
	Jònic	17	
	Mediterrani occidental	7	
Atlàntic	Açores	22	66
	Canàries	12	
	Biscaia	32	

#### 4.2.3.3. Anàlisi de l'estructura geogràfica de la variabilitat genètica en dos localitats: oceà Atlàntic i mar Mediterrani.

Segons tot això, es pot realitzar una darrera agrupació de totes les mostres en dues grans localitats: la localitat del mar Mediterrani amb cinquanta-set individus i la localitat Atlàntica amb seixanta-vuit individus (TAULA 4.19).

Els cent tres haplotipus estan heterogèniament distribuïts en les dues localitats tal i com ho indica el valor altament significatiu de  $P = 0,001 \pm 0,001$  obtingut a partir de l'anàlisi de *Monte Carlo*. Pel que fa a la distribució dels dos llinatges en les dues localitats, s'observa una presència superior de la clada 2 dins del Mediterrani, el 21,1% (dotze dels quaranta-cinc) dels individus pertanyen a aquest segon llinatge, en contra de només un 12,2% (vuit de seixanta-sis) dels individus atlàntics. Tot i això, l'anàlisi de la distribució dels dos llinatges en les dues localitats dona diferències no significatives ( $P = 0,137 \pm 0,014$ ).

Els resultats basats en l'AMOVA (TAULA 4.20) presenta una clara heterogeneïtat de la distribució de la variància molecular. Altra vegada, la majoria de la variància molecular (97%) està dins de les localitats, però en aquest cas no està homogèniament repartida tal i com ho demostra l'elevat nivell de significació ( $P = 0,009$ ). A partir del valor de  $\Phi_{ST}$  es pot estimar un flux gènic d'aproximadament 16 femelles migrants per generació

**TAULA 4.20.** Anàlisi de la variància utilitzant la distància gamma Tamura-Nei ( $a = 0,24$ ) agrupant les tres localitats en un sol grup.

	<i>gdl</i>	Suma de quadrats	Components de la variància	Percentatge de variació	Índexs de fixació	$P^*$
Entre localitats	1	28,941	0,309	3,00	$\Phi_{ST}$ 0,029	0.009
Dins de localitats	121	1211,342	10,011	97,00		

\* Probabilitat d'obtenir un valor més extrem del component de la variància i l'índex  $\Phi_{ST}$  que els observats per atzar després de 1000 randomitzacions.

En resum, l'anàlisi de l'estructura geogràfica de la variabilitat genètica suggereix una diferenciació genètica entre la bacora del Mediterrani i la de l'Atlàntic. Per a la realització d'aquesta anàlisi s'ha seguit una jerarquia en tres passos. En un pas preliminar, s'han agrupat totes les mostres disponibles en sis localitats seguint un criteri d'agrupació tant de proximitat geogràfica com temporal (TAULA 4.11). El resultat de l'anàlisi de les sis localitats ha suggerit una nova agrupació de les mostres en tres localitats: Atlàntic, Mediterrani i Egeu (TAULA 4.16). De nou, l'anàlisi de les tres localitats porta a una última agrupació en dos localitats definides per les dues conques oceàniques (mar Mediterrani i oceà Atlàntic). L'anàlisi definitiu d'aquestes dues localitats presenta diferències significatives en la distribució de la variabilitat molecular. Tot i que les diferències són clares, es poden considerar que no són molt incipients tal i com ho demostra una  $\Phi_{ST}$  bastant baixa i una manca de diferenciació en la distribució dels dos llinatges.

#### 4.2.3.4. Diversitat molecular de l'Atlàntic i el Mediterrani i demografia història a cada localitat.

Acceptant que els resultats donen una diferenciació genètica entre la bacora del Mediterrani i la del l'Atlàntic es pot descriure la variabilitat genètica dins de cada localitat per separat (TAULA 4.21). En la localitat atlàntica pràcticament cada haplotipus és únic, només els haplotipus 1 i 3 tenen freqüència superior a u (freqüència dos), els seixanta-dos haplotipus restants

**TAULA 4.21.** Grandària de les dues mostres, nombre d'haplotipus i resum dels índexs de diversitat molecular per a cadascuna de les dues mostres.

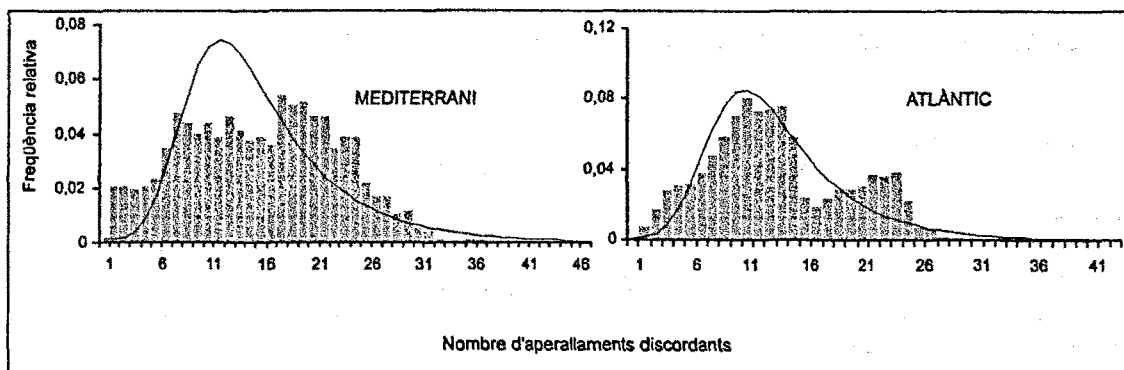
Localitat	n	Nombre d'haplotipus	Índexs de diversitat molecular	
			haplotípica (h)	nucleotídica ( $\pi$ )
Mediterrani	57	40	0.964 ± 0.015	0.053 ± 0.026
Atlàntic	66	64	0.999 ± 0.002	0.055 ± 0.027
TOTAL	123	103	0,989 ± 0,004	0,054 ± 0,027

**TAULA 4.22.** Paràmetres de la distribució dels aparellaments discordants de les dues localitats.  $P$  indica la bondat d'ajustament de la distribució observada a l'esperada segons Rogers (1995).

	<i>Mediterrani</i>	<i>Atlàntic</i>
n	57	66
Paràmetres		
$\theta_0$	0,031	8,127
$\theta_1$	20,635	81,680
$\tau$	26,172	7,979
$P$	0,004	0,003

són únics. Segons això, el valor de diversitat haplotípica és sensiblement superior en aquesta localitat ( $h = 0,999 \pm 0,002$ ) que l'observat de la bacora del Mediterrani ( $h = 0,964 \pm 0,015$ ), on les cinquanta-set seqüències s'agrupen en quaranta haplotipus. Els valors de diversitat nucleotídica similars en les dues localitats indiquen que les seqüències en les dues localitats varien en un mateix grau tot i havent-hi més seqüències en la localitat de l'Atlàntic.

Per últim, la distribució dels aparellaments discordants en cadascuna de les localitats s'observa que cap de les localitats s'ajusta a la distribució esperada segons els *sudden expansion model* (FIGURA 4.14 i TAULA 4.22). La



**FIGURA 4.14.** Distribució dels aparellaments discordants en les dues localitats. El gràfic en línia indica la distribució esperada segons el *sudden expansion model*.



representació de la distribució, les dues localitats presenten distribucions multimodals que divergeixen clarament de l'esperada. A més, el resultat de la bondat d'ajustament confirma el desajustament de la distribució observada sobre la distribució esperada. Aquest resultat suggereixen que les dues localitats s'han mantingut en un equilibri demogràfic durant molt de temps.

### 4.3. TONYINA

#### 4.3.1 Anàlisi descriptiva

S'han analitzat un total de tres-cents dinou tonyines vermelles de les que en 221 s'han seqüenciat els 372 pb corresponents al domini I del D-loop. De les noranta-vuit restants s'ha obtingut la seqüència completa de tota la regió control. Tot i així i seguint la discussió del capítol 2, per a realitzar l'anàlisi d'aquesta espècie només s'han utilitzat els 372 pb del primer domini.

La comparació de totes les seqüències presenta cent trenta-un llocs variables repartits en noranta-dos parsimoniosos i trenta-nou únics. Igualment a l'observat a les altres dues espècies, existeix una superior acumulació de les transicions sobre les transversions, tal i com indica el valor d' $r = 2,4$ .

Les estructures TAS del primer domini de la tonyina presenten una certa quantitat de variació. El TAS-1, situat entre les posicions 34 i 43, varia en el lloc 34 amb una transició  $T \leftrightarrow C$  en dues seqüències, la posició 35 amb una transversió  $T \leftrightarrow A$  en dues seqüències, i finalment la posició 41, varia en una transició  $A \leftrightarrow G$  en dues seqüències. En el TAS-2 situat entre les posicions 93 i 107 s'hi observen dues posicions variables però amb un nivell més alt de variabilitat. La posició 97 varia en vuit seqüències que comparteixen la transició  $A \leftrightarrow G$  i la posició 98 varia en quaranta-dues seqüències amb el canvi  $T \leftrightarrow C$ . Malgrat tota aquesta variació, els dos elements TAS conserven la capacitat de formar estructures secundàries estables.

### 4.3. Tonyina

1	111123334	455666667	777888899	990111222	233444444	455666677	777888899	888999999	990000000	112222222	222222222	222222222	222222222	333333333	3
2	4014870461	3390156891	3568068901	7873457023	4028124567	8245899012	3457890124	7890123456	8912456789	0724812456	325603456	9136781234	678901450	1	
3	GCA-CCCTA	TATCTAAC	AATYATTA	ATATATAT	ATCTATAA	AAATAC-A	AATACCTC	TTCCTTGA	TGAGSATTA	ATGCATATY	CTTCTGACA	TCTACTAG	TCTANTYA	A	
4															
5															
6															
7															
8															
9															
10															
11															
12															
13															
14															
15															
16															
17															
18															
19															
20															
21															
22															
23															
24															
25															
26															
27															
28															
29															
30															
31															
32															
33															
34	AAG.A.T...	ACT.TGAA													
35															
36															
37															
38															
39															
40	AAG.A.T...	ACT.TGAA													
41															
42															
43	AAG.A.T...	ACT.TGAA													
44															
45															
46															
47															
48															
49															
50															
51															
52															
53															
54															
55															
56															
57															
58	AAG.A.T...	ACT.TAA													
59	TAG.A.T...	ACT.TGAA													
60															
61															
62															
63															
64															
65															
66															
67															
68															
69															
70															
71															
72															
73															
74															
75															
76															
77															
78	AAG.A.T...	ACT.TGAA													
79															
80															
81															
82															
83															
84	AAG.A.T...	ACT.TAA													
85															
86															
87															
88															
89															
90															
91															
92															
93															
94	AAG.A.T...	ACT.TGAA													
95															
96															
97															
98															
99															
100															
101															
102	AAG.A.T...	ACT.TAA													
103															
104															
105															
106															
107															
108															
109															
110															
111	AAG.A.T...	ACT.TAA													
112															
113															

FIGURA 4.15. Continua

4.3. Tonyina

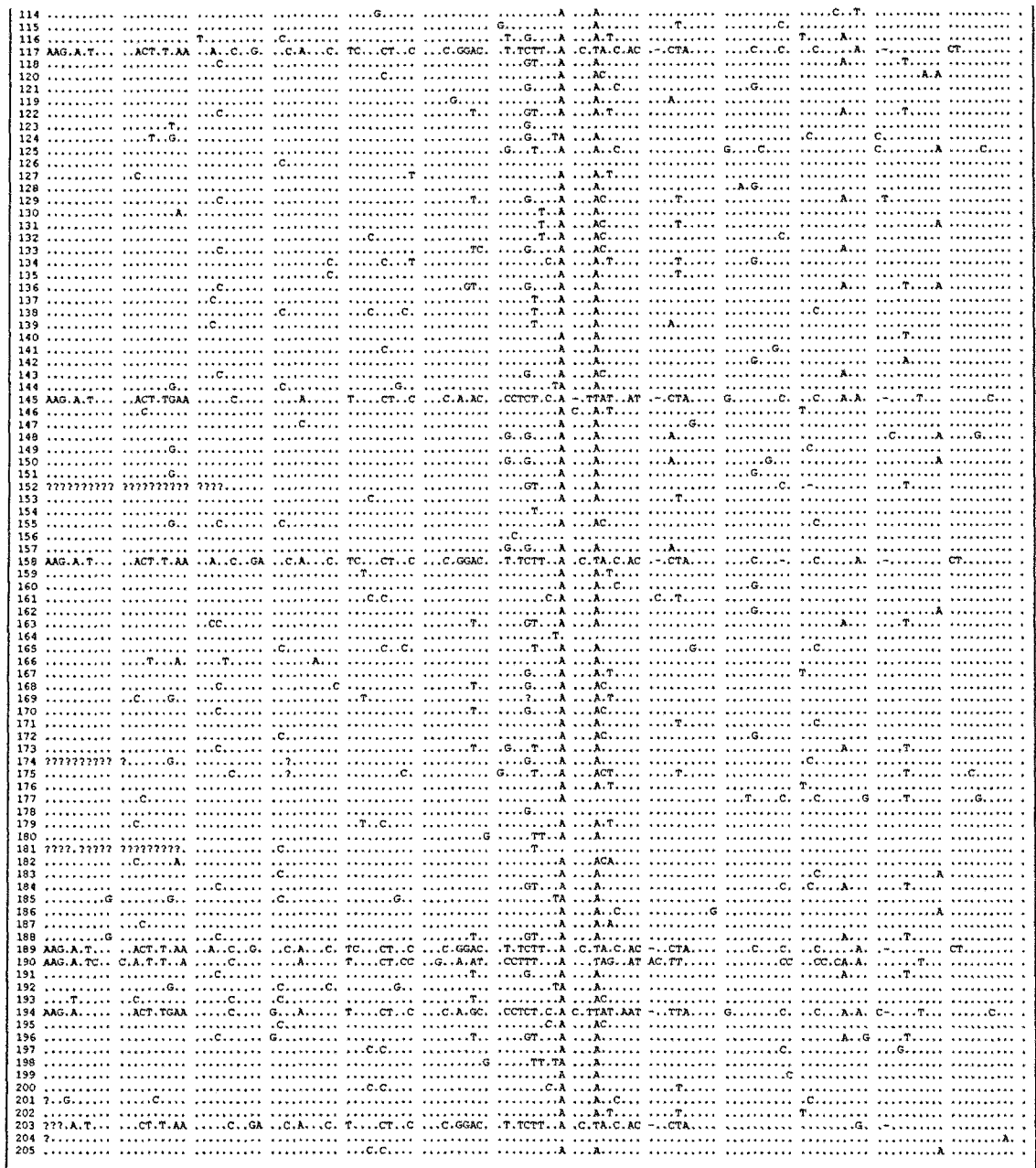


FIGURA 4.15. Posicions variables dels dos-cent cinc haplotipus diferents en els 372 pb de bases del primer domini del D-loop de la tonyina.

Les tres-centes dinou seqüències de tres 372 pb de llargària s'agrupen en dos-cents cinc haplotipus de seqüència diferent. Quaranta haplotipus són compartits per més d'una seqüència, amb un freqüència màxima freqüència de divuit individus per l'haplotipus 1. Els cent seixanta-cinc haplotipus restants són únics. Conseqüentment, el valor de diversitat haplotípica per a

tot el conjunt de dades és proper al màxim  $u$ ,  $h = 0,990 \pm 0,001$ . La diversitat nucleotídica per a totes les seqüències en la tonyina pren el valor de  $\pi = 0,044 \pm 0,021$ .

### 4.3.2 Anàlisi filogenètica

L'anàlisi filogenètica basada en distància s'ha utilitzat la distància gamma Tamura-Nei, el paràmetre  $a = 0,27$  s'ha estimat a partir de les dades en el

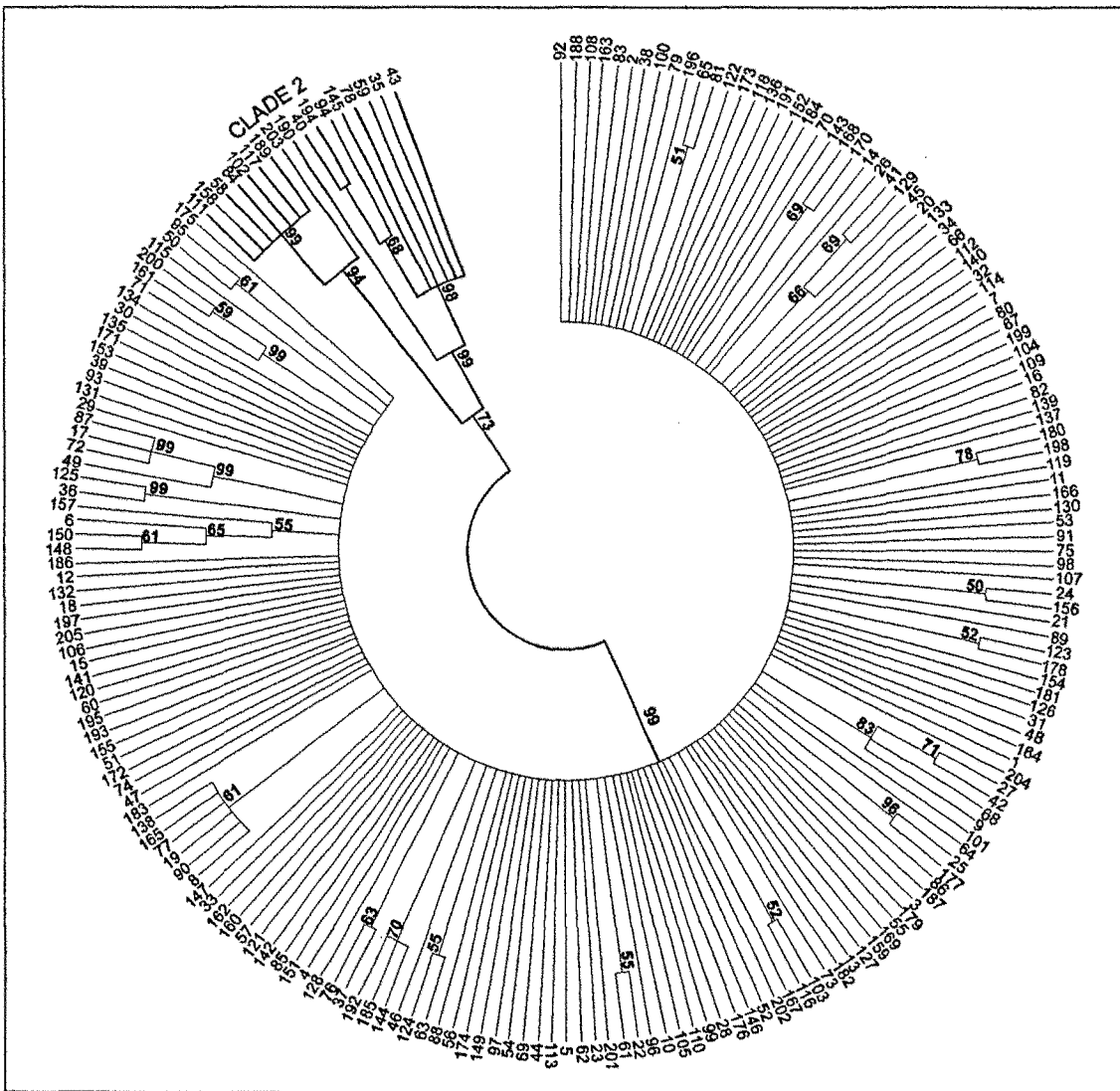


FIGURA 4.16. Arbre *neighbor-joining* amb la distància gamma Tamura-Nei ( $a = 0,27$ ) dels dos cents cinc haplotipus de la tonyina. Només estan representats els nodes amb valor de *bootstrap* superior al 50%.

capítol 2. La comparació dos a dos de tots els haplotipus presenta una distància màxima del 29,8% entre els dos haplotipus més divergents, una distància mínima del 0,3% i una mitjana del 4,2%.

	113344556	6666777889	9990112223	3344444555	667777777	8888889999	9999900000	0012233456	6777778901	1567
	4010419390	1689168690	1787340240	2812467245	5901345789	0147890123	4568912456	7904615632	5035697136	7811
1	GGCCTATATT	CAAGCTTTTA	GATATTTTAT	CTATATAAAT	CAC-AATAAC	CTGTTCGTCT	TGATTAGCGA	TAACATTTTT	TTGCATCAGT	CATA
3	.....C.	.....	T.....	.....	.....	..A..A.T.	.....	.....	.....	.....
4	.....	.....	.....	.....	.....	..A..A..	.....	.....G.....	.....	.....
5	.....	.....C.....	.....C.....	.....	.....	..A..A..	.....A.....	.....C.....	.....	.....
6	.....	.....	.....	.....	.....G.G.	..A..A..	.....A.....	.....	.....A.....	.....
7	.....	.....	.....	.....	.....	..A..A..	.....	.....	.....	.....
8	.....	.....C.....	.....C.C.C.....	.....T.....	.....	..A..A..	.....	.....C.....	.....	.....
9	.....	.....C.....	.....	.....	.....	..A..A.T.	.....	.....G..C.....	.....	.....G.....
10	.....	.....	.....	.....	.....G.....	..A..AC..	.....	.....	.....	.....
11	.....T.A.....	.....	.....	.....	.....	T.A..A..	.....	.....	.....	.....
12	.....	.....	.....	.....	.....	..A..A..	.....	.....	.....A.....	.....
13	.....C.....	.....	.....	.....	.....	..A..A.A.	.....	.....	.....	.....
15	.....	.....	.....C.....	.....	.....	..A..A..	.....	.....	.....A.....	.....
16	.....	.....	.....	.....	.....	..A..A..	.....	.....	.....	.....
17	.....C.....	.....	.....	.....	.....G.G.	..A..A.TC	.....	.....	.....A.....	.....G
18	.....	.....	.....C.....	.....	.....	..A..ACT.	.....	.....C.....	.....	.....
19	.....G.....	.....C.....	.....C.C.C.....	.....T.....	.....	..A..A..	.....	.....C.....	.....	.....
21	.....	.....A.....	.....	.....	.....	..A..A..C	.....	.....C.C.....	.....	.....G.....
22	.....	.....	.....	.....	.....	..A..A..	.....	.....	.....C.....	.....
23	.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....	.....	..A..A..	.....A.....	.....	.....C.....	.....
24	.....	.....	.....	.....	.....C.....	..A..A..	.....	.....	.....	.....
25	.....C.....	.....	.....	.....	.....	..A..A..	.....	.....T..C..C	.....G.T.....	.....G.....
27	.....	.....	.....C.....	.....	.....	..A..A.T.	.....	.....G..C.....	.....C.....	.....G.....
28	.....	.....AA.....	.....	.....	.....	..A..A..	.....	.....	.....	.....
29	.....	.....	.....	.....	.....	..A..A..	.....T.....	.....	.....	.....A.....
30	.....	.....	.....C.....	.....	.....	..A..A..	.....T.....	.....	.....	.....
31	.....	.....	.....	.....	.....	..A..A..	.....	.....	.....	.....
32	.....	.....	.....	.....G.....	.....G.G.	..A..A..	.....G.....	.....	.....	.....
33	?	.....	.....	.....	.....	..A..A..	.....G.....	.....	.....	.....
36	.....	.....	.....	.....	.....G..T	..A..A..C	.....	.....G..C.....	.....C.A.....	.....
37	.....	.....	.....C.....	.....	.....	..A..A..	.....	.....G.....	.....	.....
39	.....	.....	.....	.....	.....	..A..A..	.....T.....	.....	.....	.....
2	.....	.....C.....	.....	.....	.....T..GT	..A..A..	.....	.....	.....A..T.....	.....
14	.....	.....C.....	.....	.....	.....T.....	..A..AC..	.....	.....	.....	.....
20	.....	.....C.....	.....	.....	.....T..G.	..A..AC..	.....	.....	.....	.....
26	.....	.....C.....	.....A.....	.....	.....T..G.	..A..AC..	.....	.....	.....	.....
34	.....	.....C.....	.....	.....	.....T..G.	T.A..AC..	.....	.....	.....	.....
38	.....	.....C.....	.....A.....	.....	.....T..GT	..A..AC..	.....	.....	.....	.....A..T.....
188	.....G.....	.....C.....	.....	.....	.....T..GT	..A..A..	.....	.....	.....	.....A..T.....
191	.....	.....C.....	.....	.....	.....T..G.	..A..A..	.....	.....	.....	.....A..T.....
196	.....	.....C.....	.....G.....	.....	.....T..GT	..A..A..	.....	.....	.....	.....A.G.T.....
35	AAGT....AC	TTGAA..C.	.....A..T.	...CT.C.C	A.AC.CCTCT	.CAC.TTAT.	.AT.-.CTA.	C.G...C.C	..AA..T..	..C.
40	AAG....AC	TTGAA..C.	.....G..A..T.	...CT.C.C	A.GC.CCTCT	.CAC.TTAT.	AAT.-.TTA.	..G...C.C	..AA.C.T..	..C.
43	AAGT....AC	TTGAA..C.	.....C..A..T.	...CT.C.C	A.AC.CCTCT	.CAC.TTAT.	.AT.-.CTA.	..G...C.C	..AA..T..	..C.
58	AAGT...CAC	TT.AAA.C.G	A...C.AACT.	...CT.CG.C	GGAC.T.TCT	T.A.C.TA.C	.AC.-.CTA.	...C.C.C	..A...C.T..	..C.
59	2AGT....AC	TTGAA..C.	.....A..T.	...CT.C.C	A.AC.CCTCT	.CAC.TTAT.	.AT.-.CTA.	..G...C.C	..AA..T..	..C.
78	AAGT....AC	TTGAA..C.	.....A..T.	...CT.C.C	A.GC.CCCCT	.CAC.TTAT.	.AT.-.CTA.	..G..CC..C	..AA..T..	..C.
84	AAGT....AC	TT.AAA.C.G	A...C.A.CT.	...CT.C.C	GGAC.T.TCT	T.A.C.TA.C	.AC.-.CTA.	...C.C.C	..AA.C.T..	..C.
94	AAG....AC	TTGAA..C.	.....G..AA..T.	...CT.C.C	A.AC.CCTCT	.CAC.TTAT.	AAT.-.ATA.	..G...C.C	..AA.C.T..	..C.
102	AAGT....AC	TT.AAA.C.G	A...C.A.CTC	...CT.C.C	GGAC.T.TCT	T.A.C.TA.C	.AC.-.CTA.	...C.C.C	..A...C.T..	..C.
111	AAGT....AC	TT.AAA.C.G	A...CAA.CTC	...CT.C.C	GGAC.T.TCT	T.A.C.TA.C	.AC.-.CTA.	...C.C.C	..A.C.C.T..	..C.
117	AAGT....AC	TT.AAA.C.G	A...C.A.CTC	...CT.C.C	GGAC.T.TCT	T.A.C.TA.C	.AC.-.CTA.	...C.C.C	..A...C.T..	..C.
145	AAGT....AC	TTGAA..C.	.....A..T.	...CT.C.C	A.AC.CCTCT	.CA-.TTAT.	.AT.-.CTA.	..G...C.C	..AA..T..	..C.
158	AAGT....AC	TT.AAA.C.G	A...C.A.CTC	...CT.C.C	GGAC.T.TCT	T.A.C.TA.C	.AC.-.CTA.	...C.-.C	..A...C.T..	..C.
189	AAGT....AC	TT.AAA.C.G	A...C.A.CTC	...CT.C.C	GGAC.T.TCT	T.A.C.TA.C	.AC.-.CTA.	...C.C.C	..A...C.T..	..C.
190	AAGTC.C.A	TT..A..C..	.....A..T.	...CTCC.G	A.AT.CCTTT	..A..TAG.	.ATAC.TT..	...CC.C	CCAA..T..	..C.
194	AAG....AC	TTGAA..C.	.....G..A..T.	...CT.C.C	A.GC.CCTCT	.CAC.TTAT.	AAT.-.TTA.	..G...C.C	..AA.C.T..	..C.
203	??T.....C	TT.AA..C.G	A...C.A.CT.	...CT.C.C	GGAC.T.TCT	T.A.C.TA.C	.AC.-.CTA.	.....	.....G.....	.....

FIGURA 4.17. Posicions variables que definenx els dos llinatges de la tonyina. Per la clada 1 només estan representats els haplotipus amb freqüència superior a 1.

La reconstrucció filogenètica amb l'algorisme del *neighbor-joining* basat amb la distància gamma *Tamura-Nei* ( $a = 0,27$ ) i amb un *bootstrap* de cinc-centes rèpliques construeix una genealogia amb dos llinatges clarament

diferenciats, clada 1 i clada 2 (FIGURA 4.16). El node que separa els dos llinatges té una robustesa molt elevada amb un valor de *bootstrap* del 99%. La consistència de la separació dels dues agrupacions ve definida per tretze canvis fixes, vuit dels quals són transversions, dues delecions, dues insercions i una transició (FIGURA 4.17). El nombre mitjà de substitucions entre les dues clades amb la correcció intrallinatge és de  $Da = 0,087 \pm 0,004$ .

La gran quantitat de transversions que separa els dos llinatges sembla no està en concordança amb el patró de substitució de l'ADNmt amb moltes més transicions que transversions. Aquest fet, segurament indica una separació molt clara dels dos llinatges. A més les substitucions múltiples que afecten a les transicions podria haver portat a l'homoplàsia d'alguna posició. La clada 1 agrupa cent vuitanta-vuit haplotipus que representen 299 individus Els valors de diversitat estimats per aquest llinatge són  $h = 0,989 \pm 0,002$  i  $\pi = 0,021 \pm 0,011$  (TAULA 4.23). La majoria de la variació nucleotídica, un 69%, es situa als extrems de l'arbre amb canvis no informatius (apomorfies). El 31% restant dels canvis són compartits (sinapomorfies) i es situen a la base de l'arbre. Només els nodes que comparteixen més d'un canvi presenten valor de *bootstrap* superior al 50%.

**TAULA 4.23.** Nombre d'individus, nombre d'haplotipus i resum dels índexs de diversitat molecular per a les dues clades i per a la totalitat de les mostres en la tonyina .

Llinatge	n	Nombre d'haplotipus	Índexs de diversitat molecular	
			haplotípica (h)	nucleotídica ( $\pi$ )
Clada 1	299	188	$0,989 \pm 0,002$	$0,021 \pm 0,011$
Clada 2	51	33	$0,978 \pm 0,024$	$0,070 \pm 0,039$
Total	319	205	$0,990 \pm 0,001$	$0,044 \pm 0,021$

### 4.3. Tonyina

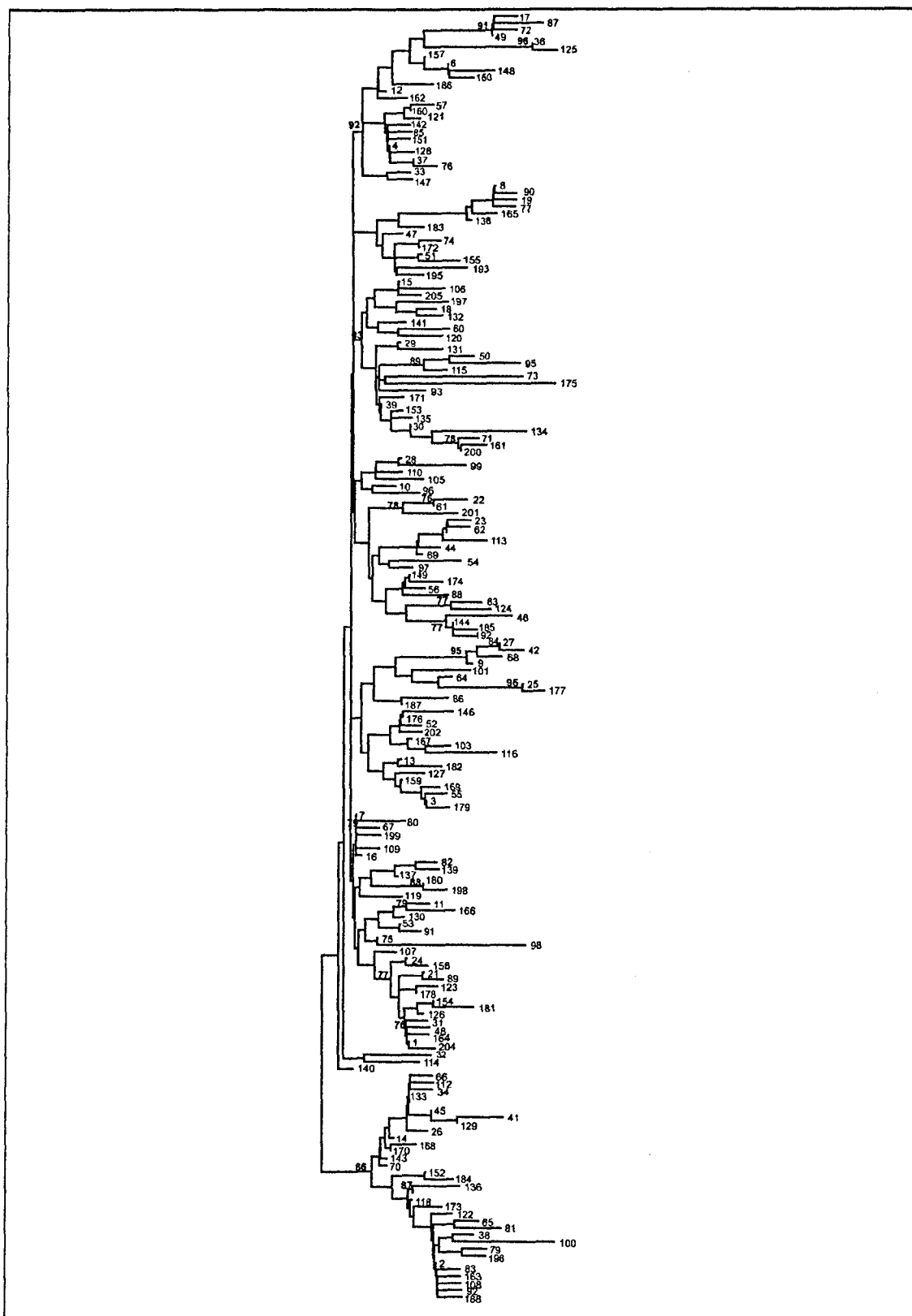


FIGURA 4.18. Filogènia *neighbor-joining* amb distància *gamma Tamura-Nei* ( $a = 0,27$ ) dels cent vuitanta-vuit haplotipus del primer llinatge. Els números en els nodes indiquen valors de *confidence probability* superiors al 75% després de 500 rèpliques.



L'anàlisi filogenètica independent dels cent vuitanta-vuit haplotipus del primer llinatge mostra una certa estructuració interna de la genealogia (FIGURA 4.18). Tot i que no hi ha cap node a la base de l'arbre amb un valor de *bootstrap* elevat, sí que s'observa una agrupació monofilètica de trenta-tres haplotipus. El node que separa aquest grup monofilètic pren una relativa robustesa quan es realitza un test de llargària de les branques interiors, *confidence probability CP* = 86.

La presència dins de la clada 1 del grup monofilètic s'observa clarament en l'arbre *mst* (FIGURA 4.19) tot i que per a una millor visualització de l'arbre *mst* del primer llinatge només s'hagin emprat els haplotipus amb freqüència superior a u. La topologia de l'arbre és relativament similar a la d'una estrella

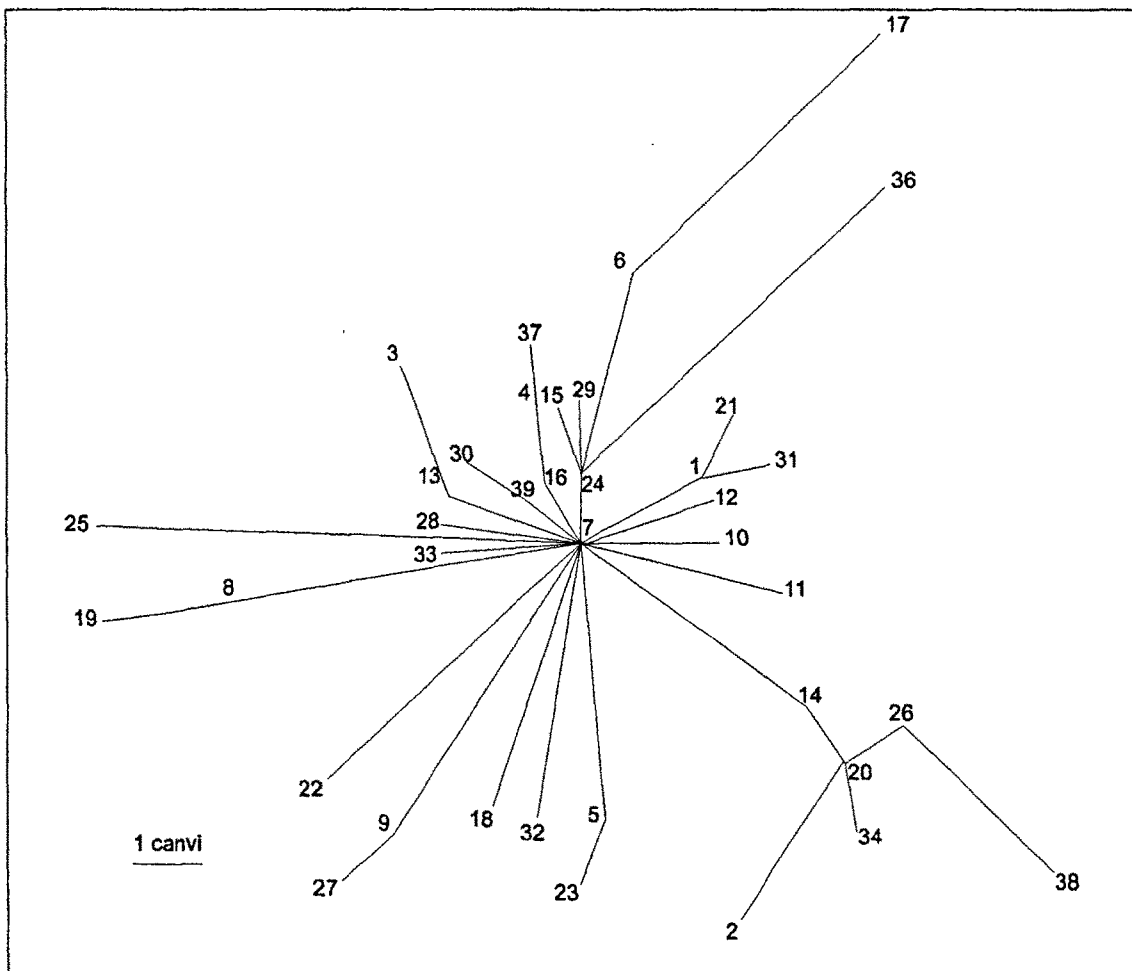


FIGURA 4.19. Arbre *mst* dels haplotipus de la clada 1 amb freqüència superior a u.

amb només una branca divergent, la qual correspon a del grup monofilètic de trenta-tres haplotipus. Curiosament, al centre de tot el llinatge no s'hi situa l'haplotipus amb més freqüència, haplotipus 1 amb freqüència divuit, sinó hi ha situat l'haplotipus 7 amb una freqüència de cinc individus. D'aquest haplotipus central deu seqüències de les cent vuitanta-vuit divergeixen en un sol canvi (haplotipus 4, 12, 16, 39, 67, 75, 104, 109, 140 i 199), la resta de seqüències divergeixen en una mitjana de 6,67 canvis amb un màxim de d'onze canvis. El grup monofilètic tampoc posiciona al centre l'haplotipus amb més freqüència, haplotipus 2 freqüència 13, sinó que s'hi situa l'haplotipus 20 amb freqüència 2.

#### 4.3.2.1. Anàlisi independent de la clada 2 de la tonyina

La filogènia del segon llinatge està molt més estructurada amb diversos nodes interns amb valor de *bootstrap* elevat. De la genealogia destaca la presència de dos llinatges interns, clada 2a i clada 2b, suportats amb un valor de *bootstrap* del 94% i 95% respectivament (vegeu FIGURA 4.20). La representació *mst* confirma la presència dels dos llinatges interns (FIGURA

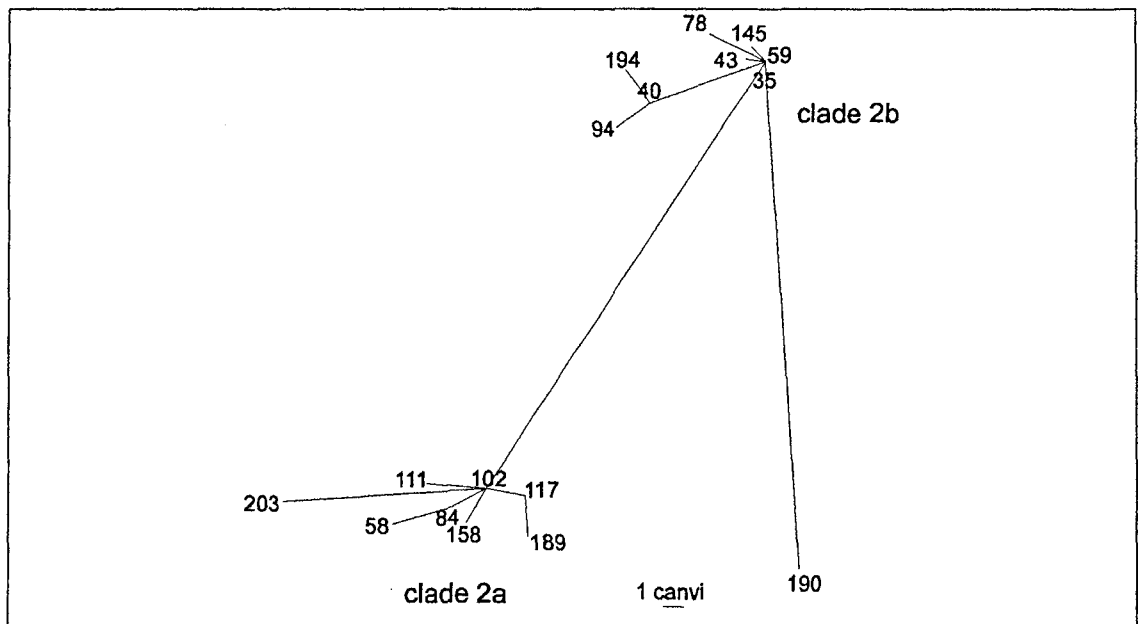


FIGURA 4.20. Representació *mst* de la clada 2.

4.19). La variació nucleotídica, més del doble que la del primer llinatge ( $\pi = 0,077 \pm 0,039$ ) i que difereix significativament d'aquesta ( $t$  d'*student*,  $P = 0,037$ ), està repartida pràcticament al 50% entre sinapomorfies i apomorfies. Pel que fa al valor estimat de diversitat haplotípica ( $h = 0,978 \pm 0,024$ ) no és significativament diferent a la del primer llinatge ( $t$  d'*student*,  $P = 0,238$ ) i a la estimada per a la totalitat del conjunt de dades ( $t$  d'*student*,  $P = 0,230$ ). En aquest llinatge s'agrupen disset haplotipus que representen vint individus, només els haplotipus 35 i 40 tenen freqüència superior a u, amb dos i tres individus respectivament.

La gran divergència de les seqüències dels haplotipus que pertanyen a la clada 2 respecte a les de la clada 1 ja es va observar preliminarment en el moment d'entrar les seqüències a l'editor. A més, una comparació inicial va suggerir una gran homologia de part d'aquestes seqüències amb les seqüències de la bacora. Segons això, l'anàlisi del segon llinatge s'ha realitzat conjuntament amb les seqüències del primer domini de la regió control d'altres espècies de *Thunnus*. Per a realitzar aquest anàlisi s'han utilitzat les seqüències de cinc espècies addicionals del gènere *Thunnus* (*T. tonggol*, *T. albacares*, *T. maccoyii*, *T. obesus* i *T. alalunga*) i una subespècie (*T. thynnus orientalis*). Les seqüències de les espècies *T. tonggol*, *T.*

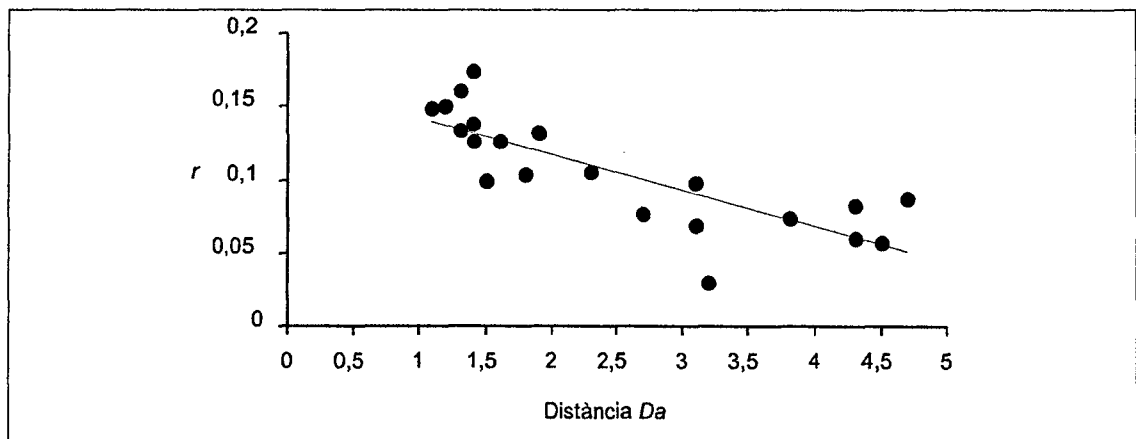
**TAULA 4.24.** Proporció de transicions / transversions ( $r$ ) i divergència nucleotídica entre les espècies de *Thunnus*. Els valors per sobre la diagonal indiquen  $r$  entre parell d'espècies. Valors a la diagonal  $r$  dins de cada espècie. Valors per sota la diagonal indiquen divergència nucleotídica,  $Da$ , estimada amb la distància gamma Tamura-Nei ( $a = 0,27$ ) entre parells d'espècies.

	<i>n</i>	<i>T. alalunga</i>	<i>T. t. orientalis</i>	<i>T. maccoyii</i>	<i>T. t. thynnus</i>	<i>T. albacares</i>	<i>T. obesus</i>	<i>T. atlanticus</i>
<i>T. alalunga</i>	4	9,3	3,8	1,9	1,5	1,4	1,4	1,2
<i>T. t. orientalis</i>	6	0,074	1,9	1,6	1,4	1,3	1,3	1,1
<i>T. maccoyii</i>	3	0,128	0,126	--*	4,3	4,7	4,3	3,1
<i>T. t. thynnus</i>	9	0,132	0,138	0,082	28,5	2,3	2,7	1,8
<i>T. albacares</i>	5	0,174	0,161	0,087	0,105	17,8	4,5	3,2
<i>T. obesus</i>	4	0,127	0,134	0,060	0,076	0,057	5	3,1
<i>T. atlanticus</i>	5	0,151	0,149	0,097	0,104	0,030	0,069	5

\* valor d' $r$  no estimat ja que no es presenta cap transversió intraespecífica.

*albacares*, *T. maccoyi*, i *T. obesus* i la possible subespècie *T. thynnus orientalis* les ha cedit el Doctor J. R. Alvarado Bremer i estan publicades a Alvarado Bremer *et al.* (1997). Pel que fa a la bacora s'han utilitzat els quatre primers haplotipus d'aquesta espècie, anomenats per a aquesta anàlisi TA1, TA2, TA3 i TA4. Addicionalment, també s'han emprat nou haplotipus del primer llinatge de la tonyina (1, 2, 3, 4, 5, 6, 14, 20 i 38), quatre dels quals pertanyen al grup monofilètic descrit anteriorment (2, 14, 20 i 38). Com a seqüències de referència s'han emprat els dos primers haplotipus del bonítol, SS1 i SS2. La Taula 4.24 resumeix el nombre d'individus utilitzats per a cada espècie.

En el moment que es volen analitzar seqüències d'espècies varies l'anàlisi filogenètica pot estar afectada per la saturació i per tant l'homoplàsia. El valor d' $r = 1,5$  estimat quan s'analitzen totes les seqüències de totes les espècies en conjunt és inferior al qualsevol estimat intraespecíficament. Aquest fet és un indicatiu de la possible saturació de les transicions típica de l'ADNmt. La confirmació de la saturació ve donada per la FIGURA 4.21 (treta a partir de les dades de la Taula 4.24), a mesura que es comparen espècies més divergents la relació transicions / transversions decreix degut que les transicions pateixen substitucions múltiples i queden emmascarades, en



**FIGURA 4.21.** Relació de la distància  $D_a$  i la proporció transicions / transversions ( $r$ ) entre totes les seqüències de *Thunnus*.

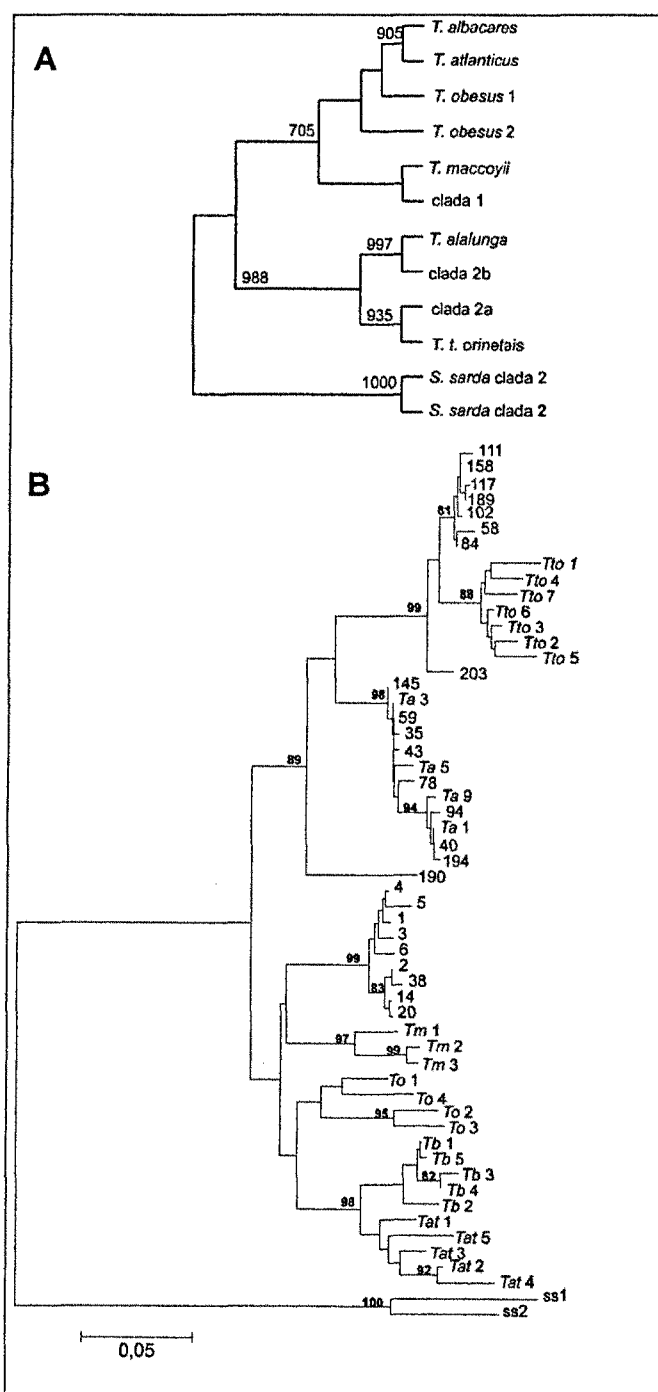
canvi les transversions continuen acumulant-se. Així per exemple, la proporció transicions / transversions s'acosta a la unitat a les comparacions entre les espècies més divergents.

L'anàlisi filogenètica de la clada 2 juntament amb les seqüències de totes les espècies de *Thunnus* s'ha emprat la parsimònia *EOR* que disminueix l'efecte de la saturació i l'homoplàsia sobre la reconstrucció de l'arbre. Per a realitzar aquest tipus d'anàlisi es necessari calcular el pes de cada canvi respecte la relació entre el nombre de canvis observats i el nombre de canvis esperats per a cadascuna de les categories. A la TAULA 4.25 es presenten el valors esperats i observats de les mitjanes dels sis possibles canvis i el seu pes corresponent a introduir a la *step matrix* de la parsimònia *EOR*. El patró de la sobreacumulació de les transicions sobre les transversions es torna a observar en aquesta taula; en les dues classes de transicions el nombre de canvis observats supera al nombre esperat, al contrari de les transversions on en cap cas el valor observat supera a l'esperat. Per a realitzar l'arbre de la parsimònia *EOR* s'han calculat les seqüències consens de cada espècie i de les dues clades (clada 2a i 2b), i amb un test de bootstrap de mil rèpliques s'ha estimat la robustesa de les branques. Addicionalment, també s'ha realitzat una anàlisi filogenètica de distància (*neighbor-joining* amb distància gamma *Tamura-Nei*,  $a = 0,27$ ) sense cap tipus de pes per a cap canvi i utilitzant totes les seqüències disponibles de totes les espècies.

**TAULA 4.25.** Esbiaixament de les transicions i transversions en el primer domini de la regió control de les cinc espècies de *Thunnus* i de la subespècie de *T. t. orientalis*.

	Transicions		Transversions			
	A↔G	T↔C	A↔T	A↔C	T↔G	C↔G
Observat	8	15	8	5	1	1
Esperat	6,77	6,05	8,2	7,04	5,8	4,6
EOR	0,8	0,4	1	1,4	5,8	4,6
Pes	2	1	1	1,4	5,8	4,6

Tot i que el resultat de les dues diferents anàlisis filogenètiques donen un arbre que expliquen una possible relació entre les espècies de *Thunnus* no és l'objectiu d'aquest apartat, una explicació detallada de les relacions entre el *Thunnus* es troba a la referència Alvarado Bremer *et al.* (1997).



**FIGURA 4.21.** Arbres filogenètics entre les sis espècies de *Thunnus*, les dues subespècies de *T. t. thynnus* i la clada 2. A) Arbre de la parsimònia *EOR* entre les seqüències consens. B) Arbre neighbor-joining amb la distància gamma Tamura-Nei ( $\alpha = 0,27$ ). El valor en els nodes representen percentatges de *bootstrap* superiors al 75%.

L'arbre *neighbor-joining* i el de la parsimònia *EOR* coincideixen en separar les dues agrupacions internes dins del segon llinatge prèviament descrites (clada 2a i clade 2b). La clada 2a amb vuit haplotipus (58, 84, 102, 111, 117, 158, 189 i 203) forma un llinatge germà amb el *T. t. orientalis* amb un elevat grau de consistència per a qualsevol de les dues anàlisis (percentatge de *bootstrap* 99% per a l'anàlisi basat en distància i 93,5% per a la parsimònia *EOR*). Similarment, l'altre llinatge amb els nou haplotipus restants (35, 40, 43, 59, 78, 94, 145, 190 i 194) forma un node compartit amb les seqüències de la bacora. Fins i tot l'haplotipus 40 de tonyina comparteix exactament la mateixa seqüència que l'haplotipus TA1 de la bacora.

La parsimònia *EOR* de les 12 seqüències consens es resol amb un sol arbre màxim parsimònic d'elevada consistència ( $I_c = 0,74$ ;  $I_h = 0,26$ ). La consistència ve donada pel fet d'analitzar seqüències consens, i per tant es disminueix la possible homoplàsia per les substitucions intraespecífiques, i per donar pes diferent segons el tipus de substitucions.

Coincidint amb els resultats d'Alvarado Bremer *et al.* (1997), els grups de la bacora i el *T. t. orientalis*, i en aquest cas juntament amb les seqüències de la clada 2, tenen un origen monofilètic separat de la resta de seqüències de *T. t. thynnus*. Per altra banda, la posició de les seqüències del primer llinatge s'ajusta perfectament a la filogènia explicada per Alvarado Bremer *et al.* (1997). La clada 1 forma un grup germà amb el *T. maccoyii* separat de les tonyines del subgènere *Neothunnus*.

#### 4.3.3. Anàlisi de la variabilitat genètica

Per a realitzar totes les anàlisis de l'estructura de variabilitat genètica en la tonyina no s'ha tingut en compte les seqüències de la clada 2. L'eliminació d'aquest llinatge es deu a la gran divergència respecte al primer llinatge i la seva similitud a seqüències d'altres espècies.

## 4.3.3.1. Estabilitat temporal de la variabilitat genètica dins del Mediterrani

La disponibilitat de mostres capturades dins de la mateixa àrea geogràfica al llarg de diferents anys permet avaluar l'estabilitat temporal de la variabilitat genètica dins de cadascuna d'aquestes localitats. Evidentment, per a realitzar aquesta anàlisi només s'han utilitzat les localitats de les que es disposa de mostres capturades en diferents anys (TAULA 4.26). De totes aquestes, l'única mostra que no s'ha utilitzat és la corresponent al golf de València de l'any 95 ja que la seva grandària mostral és de només dos individus.

L'anàlisi d'aquest apartat s'ha realitzat per a cada localitat per separat. En primer lloc s'ha avaluat l'estabilitat de la variabilitat al llarg del temps comparant els índexs de variabilitat molecular estimats per a cada mostra amb una *t* d'*student*. Seguidament, també s'ha comprovat l'heterogeneïtat genètica mitjançant una anàlisi de l'AMOVA agrupant totes les mostres de cada localitat en un sol grup.

TAULA 4.26. Grandàries mostrals i índexs de diversitat molecular de cadascun de les mostres utilitzades per l'anàlisi temporal.

Localitat	ANYS				total
	94	95	96	97	
golf de València	11 $h = 0,981 \pm 0,043$ $\pi = 0,019 \pm 0,011$	2*	14 $h = 0,984 \pm 0,040$ $\pi = 0,025 \pm 0,014$	67 $h = 0,991 \pm 0,005$ $\pi = 0,021 \pm 0,011$	92
Ligúria		14 $h = 1,000 \pm 0,030$ $\pi = 0,025 \pm 0,013$	22 $h = 0,976 \pm 0,024$ $\pi = 0,018 \pm 0,001$	36 $h = 0,991 \pm 0,010$ $\pi = 0,020 \pm 0,010$	72
Tirre			12 $h = 0,981 \pm 0,046$ $\pi = 0,018 \pm 0,010$	31 $h = 0,987 \pm 0,012$ $\pi = 0,020 \pm 0,011$	43
Jònic			22 $h = 1,000 \pm 0,076$ $\pi = 0,025 \pm 0,015$	19 $h = 0,988 \pm 0,021$ $\pi = 0,024 \pm 0,013$	41

\* mostra no utilitzada per l'anàlisi d'estabilitat temporal.



### 4.3. Tonyina

**TAULA 4.27.** Comparació dos a dos dels índexs de diversitat molecular dels diferents anys i resultat de l'anàlisi de l'AMOVA per a cada localitat.

	<i>h</i>		$\pi$		AMOVA*
	94	96	94	96	
golf de València					
	96	0,112		0,228	0.889 ± 0.008
	97	0,345	0,381	0,276 0,073	
Ligúria					
	96	0,100		0,062	0.556 ± 0.013
	97	0,258	0,102	0,210 0,368	
Tirrà					
	96			96	
	97	0,394		0,078	0.584 ± 0.018
Jònic					
	96			96	
	97	0,370		0,238	0.213 ± 0.011

\*Probabilitat d'obtenir un valor més extrem del component de la variància i l'índex  $\Phi_{ST}$  que els observats per atzar després de 1000 randomitzacions.

Totes les anàlisis en tots els anys i en totes les localitats coincideixen amb el resultat d'una diferència no significativa (TAULA 4.27). La manca de diferenciació dels índexs de diversitat molecular en els diferents anys dins de cada localitat indica que la variabilitat genètica s'ha mantingut al mateix nivell al llarg del temps. Similarment, la diferències no significatives de l'AMOVA

**TAULA 4.28.** Grandària mostral, nombre d'haplotipus i índexs de diversitat molecular per a les sis mostres després de l'anàlisi temporals.

Localitat	<i>n</i>	Nombre d'haplotipus	Índexs de diversitat molecular	
			haplotípica ( <i>h</i> )	nucleotídica ( $\pi$ )
Egeu 97*	21	19	0,990 ± 0,017	0,019 ± 0,010
Jònic	26	22	0,987 ± 0,013	0,025 ± 0,013
Líbia 99*	10	10	1,000 ± 0,044	0,020 ± 0,011
Tirrà	42	34	0,998 ± 0,008	0,020 ± 0,010
Ligúria	66	53	0,998 ± 0,008	0,022 ± 0,012
València	87	67	0,991 ± 0,003	0,021 ± 0,011
TOTAL	299	188	0,998 ± 0,002	0,021 ± 0,011

\* mostres no utilitzades a l'anàlisi de l'estabilitat temporal

confirmen la no heterogeneïtat de les mostres de diferents anys dins de cadascuna de les localitats.

L'estabilitat temporal trobada dins de cada localitat permet agrupar totes les mostres anuals d'una mateixa localitat, i així poder treballar en grandàries mostrals més elevades. Pel que fa a la localitat del golf de València, la mostra de l'any 95 amb una grandària mostral de dos individus s'ha agrupat amb la resta de les mostres d'aquesta localitat. La TAULA 4.28 presenta la grandària, nombre d'haplotipus i índexs de diversitat de totes les localitats després de l'agrupació. També es presenten les dades de les dues localitats de les quals només es disposava d'una sola mostra (Egeu 97 i Líbia 99) i per tant no havien estat incloses dins de l'anàlisi de l'estabilitat temporal.

#### 4.3.3.2. Estructura geogràfica de la variabilitat genètica dins del Mediterrani

Seguint amb el patró de les sis localitats dins del mediterrani s'ha analitzat la possible estructuració de la variabilitat dins d'aquest mar. Cal recordar que només s'utilitzen les cent vuitanta-vuit haplotipus de la clada 1.

La distribució de la freqüència dels haplotipus no és significativament diferent entre les sis localitats ( $P = 0,998 \pm 0,001$ ). Similarment, la distribució de les dues agrupacions de la clada 1 tampoc està heterogèniament repartida entre les sis localitats mediterrànies ( $P = 0,985 \pm 0,009$ ).

**TAULA 4.29.** Anàlisi de la variància molecular utilitzant la distància gamma Tamura-Nei ( $a = 0,27$ ) agrupant les sis localitats de la tonyina del Mediterrani en un sol grup.

	<i>gdl</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>Components de la variància</i>	<i>Percentatge de variació</i>	<i>Índexs de fixació</i>	<i>P*</i>
Entre localitats	5	24,711	0,023	0,63	$\Phi_{ST}$ 0,006	0,097
Dins de localitats	246	975,504	3,965	98,37		

\* Probabilitat d'obtenir un valor més extrem del component de la variància i l'índex  $\Phi_{ST}$  que els observats per atzar després de 1000 randomitzacions.

### 4.3. Tonyina

**TAULA 4.30.** Matriu de la diferenciació genètica de la comparació dos a dos de les sis localitats del Mediterrani de la tonyina . Per sota la diagonal estan representats els valors de  $\Phi_{ST}$  i per sobre els valors  $P$  després de 1000 permutacions.

	<i>Egeu</i>	<i>Jònic</i>	<i>Libia</i>	<i>Tirre</i>	<i>Ligúria</i>	<i>València</i>
Egeu	--	0,900 ± 0,027	0,548 ± 0,051	0,684 ± 0,057	0,702 ± 0,048	0,387 ± 0,045
Jònic	0,021	--	0,432 ± 0,052	0,063 ± 0,019	0,018 ± 0,012 <sup>a</sup>	0,055 ± 0,024
Libia	-0,005	0,001	--	0,855 ± 0,041	0,812 ± 0,039	0,495 ± 0,049
Tirre	-0,007	0,022	-0,02	--	0,936 ± 0,020	0,261 ± 0,031
Ligúria	-0,009	0,029	-0,018	-0,009	--	0,036 ± 0,018 <sup>a</sup>
València	-0,001	0,018	-0,009	0,004	0,013	--

<sup>a</sup> valors no significatius després de la correcció de Bonferroni

L'anàlisi de l'AMOVA de les sis localitats agrupades en un sol grup mostra una diferència no significativa entre les sis localitats ( $P = 0,097$ ; TAULA 4.29). La distribució dels components de la variància segueix un patró similar a les altres dues espècies, la majoria de variància es troba dins de les localitats (98,37%) tal i com s'espera al utilitzar un marcador amb una gran variabilitat. En aquesta espècie la variabilitat no està heterogèniament repartida tal com ho demostra un valor de  $\Phi_{ST}$  molt baix i la seva probabilitat no significativa.

La comparació dos a dos de les sis localitats mostra que cap localitat difereix significativament de les altres (TAULA 4.30). Els valors negatius tant en els components de la variància com a la distància  $D_a$  (TAULA 4.31) suggereixen

**TAULA 4.31.** Matriu de la distància  $D_a$  entre les sis localitats. Per sota la diagonal estan representats els valors de  $D_a$  i per sobre els valors de  $P$  estimats després de 1000 permutacions.

	<i>Egeu</i>	<i>Jònic</i>	<i>Libia</i>	<i>Tirre</i>	<i>Ligúria</i>	<i>València</i>
Egeu	--	0,077	0,547	0,635	0,750	0,309
Jònic	0,195	--	0,340	0,050 <sup>a</sup>	0,014 <sup>a</sup>	0,059
Libia	-0,047	0,053	--	0,826	0,785	0,502
Tirre	-0,049	0,174	-0,017	--	0,955	0,179
Ligúria	-0,057	0,224	-0,133	-0,070	--	0,018 <sup>a</sup>
València	0,016	0,137	-0,046	0,039	0,106	--

<sup>a</sup> valors no significatius després de la correcció de Bonferroni

una major presència de la variabilitat genètica dins de les localitats que no entre les localitats. L'estimació de les femelles migradores a partir de la  $\Phi_{ST}$  indica un gran flux gènic; així per exemple, les localitats amb un flux menys elevat tenen fins a unes disset femelles migradores per generació.

El dendrograma *neighbor-joining* amb la distància  $D_a$  entre parells de localitats no segueix cap patró geogràfic (FIGURA 4.23). A més, cap de les distàncies calculades entre les localitats presenten diferències significatives.

Segons tot això, es pot concloure que la tonyina del Mediterrani comparteix un patrimoni genètic comú amb una gran nivell d'homogeneïtat genètica.

#### 4.3.3.3. Comparació Atlàntic oest i Mediterrani

Abans de procedir a fer una comparació de la variabilitat genètica entre les localitats de l'Atlàntic Oest i el Mediterrani s'ha comprovat l'estabilitat genètica de les dues mostres de l'Atlàntic Oest.

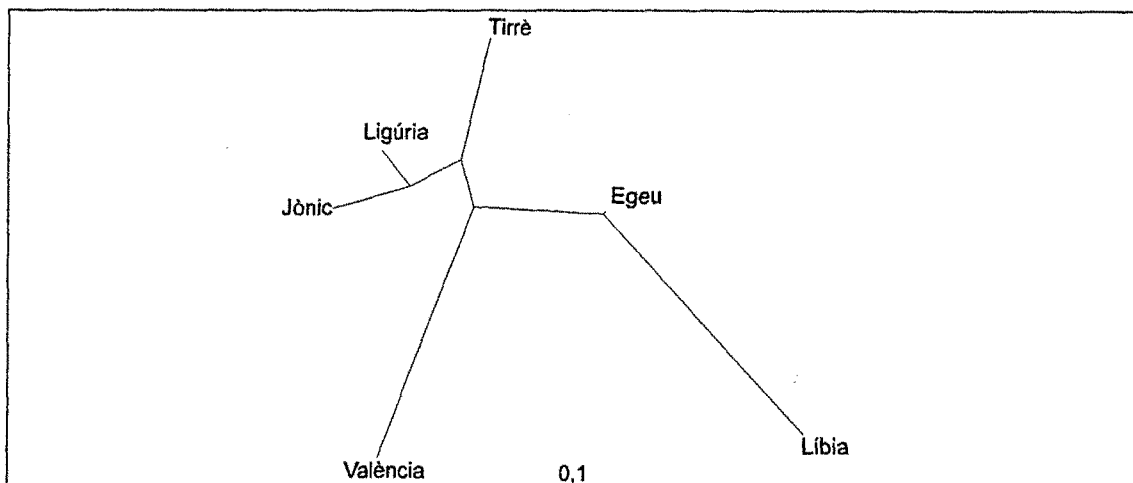


FIGURA 4.23. Arbre *neighbor-joining* amb la distància  $D_a$  entre les sis localitats mediterrànies de la tonyina

**TAULA 4.32.** Grandària de les mostres, nombre d'haplotipus i resum dels índexs de diversitat molecular per a les dues mostres atlàntiques i la localitat atlàntica en conjunt.

Localitat	n	Nombre d'haplotipus	Índexs de diversitat molecular	
			haplotípica (h)	nucleotídica ( $\pi$ )
Atlàntic 96	28	22	0,976 $\pm$ 0,018	0,026 $\pm$ 0,014
Atlàntic 98	19	17	0,988 $\pm$ 0,021	0,020 $\pm$ 0,011
Atlàntic (tot)	47	36	0,976 $\pm$ 0,011	0,026 $\pm$ 0,013

Les dues mostres atlàntiques presenten nivells de variabilitat similars (TAULA 4.31) tal i com indica la manca de diferències significatives en la comparació de la diversitat haplotípica (*t* d'*student*;  $P = 0,181$ ) i la diversitat nucleotídica (*t* d'*student*;  $P = 0,062$ ). La distribució variabilitat genètica tampoc mostra diferències significatives entre les dues localitats, tant quan es s'analitza la distribució de la freqüència dels quaranta-set haplotipus ( $P = 0,262$ ) com quan es realitza l'AMOVA ( $P = 0,375$ ).

La manca de diferenciació trobada dins de la localitat de l'Atlàntic oest permet analitzar les dues mostres atlàntiques com una sola localitat i comparar-la amb les localitats del Mediterrani.

Quan es comparen les sis localitats del Mediterrani per separat contra la localitat de l'Atlàntic, les dues anàlisis basades en l'aproximació de *Monte Carlo*, distribució de les freqüències dels haplotipus en les localitats i distribució dels dos llinatges filogenètics, coincideixen en donar diferències no significatives amb valors de  $P = 0,973$  i  $P = 0,950$ , respectivament.

**TAULA 4.33.** Anàlisi de la variància molecular utilitzant la distància gamma Tamura-Nei ( $\alpha = 0,27$ ) agrupant les set localitats (sis mediterrànies i una atlàntica) de la tonyina.

	gdl	Suma de quadrats	Components de la variància	Percentatge de variació	Índexs de fixació	$P^*$
Entre localitats	6	29,376	0,022	0,56	$\phi_{ST}$ 0,005	0,073
Dins de localitats	292	1165,115	3,990	98,44		

\* Probabilitat d'obtenir un valor més extrem del component de la variància i l'índex  $\phi_{ST}$  que els observats per atzar després de 1000 randomitzacions.

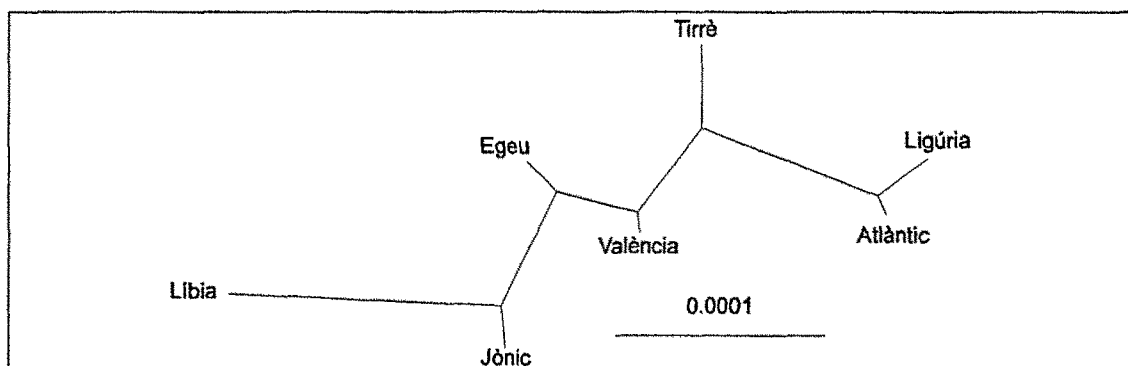
**TAULA 4.34.** Matriu de la diferenciació genètica de la comparació dos a dos de les sis localitats del Mediterrani i la localitat atlàntica de la tonyina . Per sota la diagonal estan representats els valors de  $\Phi_{ST}$  i per sobre els valors  $P$  després de 1000 permutacions.

	Egeu	Jònic	Líbia	Tirre	Ligúria	València	Atlàntic
Egeu	--	0,900	0,548	0,684	0,702	0,387	0,522
Jònic	0,021	--	0,432	0,063	0,018 <sup>a</sup>	0,055	0,234
Líbia	-0,005	0,001	--	0,855	0,812	0,495	0,900
Tirre	-0,007	0,022	-0,02	--	0,936	0,261	0,243
Ligúria	-0,009	0,029	-0,018	-0,009	--	0,036 <sup>a</sup>	0,341
València	-0,001	0,018	-0,009	0,004	0,013	--	0,045 <sup>a</sup>
Atlàntic	-0,001	0,005	-0,026	0,038	0,001	0,010	--

<sup>a</sup> valors no significatius després de la correcció de Bonferroni

Similarment, l'anàlisi de l'AMOVA agrupant les set localitats (sis mediterrànies i una atlàntica) en un sol grup presenta una manca d'heterogeneïtat en la distribució de la variància molecular (TAULA 4.33). Com és habitual, gairebé tota la variabilitat es troba dins de les localitats; a més no està heterogèniament repartida tal i com indica el valor baix de  $\Phi_{ST}$  i la seva probabilitat associada no significativa.

La matriu de comparació dels valors de  $\Phi_{ST}$  amb la probabilitat associada entre tots el parells de les set localitats torna a presentar una manca d'heterogeneïtat (TAULA 4.34). És a dir, cap de les localitats mediterrànies



**FIGURA 4.24.** Dendrograma *neighbor-joining* amb la distància  $D_a$  entre les set localitats de tonyina .

**TAULA 4.34.** Anàlisi de la variància molecular utilitzant la distància gamma Tamura-Nei ( $\alpha = 0,27$ ) de tot les localitats mediterrànies contra la localitat atlàntiques.

	<i>gdl</i>	Suma de quadrats	Components de la variància	Percentatge de variació	$\Phi_{ST}$	Índexs de fixació	$P^*$
Entre localitats	1	4,557	0,008	0,21	0,002	0,002	0,245
Dins de localitats	297	1189,827	4,005	98,79			

\* Probabilitat d'obtenir un valor més extrem del component de la variància i l'índex  $\Phi_{ST}$  que els observats per atzar després de 1000 randomitzacions.

difereix de l'atlàntica. Coincidint amb aquest resultat del dendrograma *neighbor-joining* amb la distància  $D_a$  entre tots el parells de localitats no segueix cap estructura geogràfica (FIGURA 4.24).

La no diferenciació genètica entre la tonyina atlàntica i mediterrània es veu ratificada per la manca de diferències significatives genètiques entre l'atlàntic i tot el mediterrani en conjunt. De les tres anàlisis per a comparar l'Atlàntic i el Mediterrani (distribució de la freqüència dels haplotipus, distribució dels dos llinatges i anàlisi de l'AMOVA), només la distribució de la freqüència dels cent vuitanta-vuit presenta diferències significatives ( $P = 0,015$ ). En canvi, la distribució dels dos llinatges ( $P = 0,886$ ) i l'AMOVA (TAULA 4.34) presenten una probabilitat no significativa. La probabilitat significativa de la distribució de la freqüència dels haplotipus ve donada per la gran quantitat d'haplotipus exclusius de cada localitat, dels cent vuitanta-vuit haplotipus només onze són compartits per les dues conques. Ara bé, tot i la presència d'haplotipus exclusius per cada localitat, la manca de diferències de l'AMOVA indica una gran homologia de seqüència entre els haplotipus de l'Atlàntic i el Mediterrani. Addicionalment, el baix valor de  $\Phi_{ST}$  indica un gran flux genètic entre les dues localitats estimat en unes dues centes quaranta femelles reproductores per generació.

En resum, no es pot establir una heterogeneïtat de l'estructuració geogràfica de la variabilitat genètica de la tonyina . Els resultats indiquen en primer

**TAULA 4.35.** Paràmetres de la distribució dels aparellaments discordants dels cent vuitanta-vuit haplotipus de la clada 1 de la tonyina .  $P$  indica la bondat d'ajustament de la distribució observada a l'esperada segons Rogers (1995).

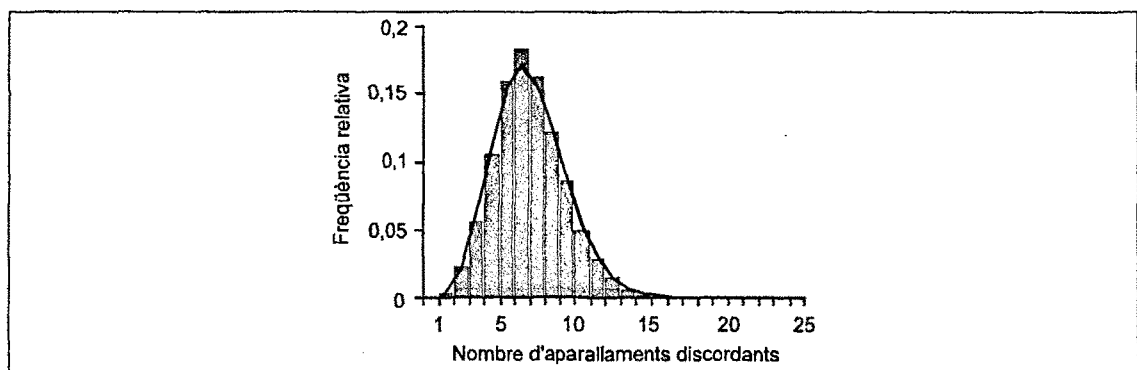
		Atlàntic / Mediterrani
n		299
Paràmetres		
	$\theta_b$	0,235
	$\theta_t$	74,727
	$r$	7,118
$P$		0,959

terme una gran homogenització genètica de la tonyina dins del Mediterrani i també entre l'Atlàntic i el Mediterrani.

#### 4.3.4. Anàlisi de la demografia històrica

El resultat d'una manca d'heterogeneïtat genètica entre les localitats atlàntiques i mediterrànies de la tonyina permet fer una anàlisi de la demografia històrica per a totes les dades en conjunt.

La distribució dels aparellaments discordants pren una forma unimodal amb un pic als cinc canvis i una mitjana de 6,9 canvis (FIGURA 4.22). La mostra de la distribució no difereix significativament a la distribució esperada segons el *sudden expansion model* (TAULA 4.35). Segons això, la població de tonyina



**FIGURA 4.22.** Distribució dels aparellaments discordants dels cent vuitanta-vuit haplotipus de la clada 1 de la tonyina . El gràfic en línia indica la distribució esperada segons el *sudden expansion model*.



de l'Atlàntic i el Mediterrani ha sofert un procés de coll d'ampolla del qual s'està recuperant.

## ***5. Discussió***



## **5. Discussió**

### **5.1. CALIBRATGE DEL RELLOTGE MOLECULAR EN EL BONÍTOL, LA BACORA I LA TONYINA VERMELLA.**

L'aplicació del rellotge molecular per datar les filogènies i els processos demogràfics està ple de controvèrsies. Les molècules, i amb un grau major les que evolucionen a una ritme elevat, no són un rellotge perfecte per estimar els temps dels processos biològics (Saccone *et al.*, 1993). Ara bé, no es pot deixar de banda l'aplicació del rellotge molecular ja que moltes vegades és l'única font d'informació temporal disponible (Avice, 1994; pàg 108).

Fins a la data, no existeix cap calibratge del rellotge molecular pel domini I de la regió control de la família Scombridae. L'única aproximació en una espècie similar i en el mateix segment s'ha realitzat en l'emperador (*Xiphias gladius*) per Alvarado Bremer *et al.* (1995). Els autors proposen una taxa del

**TAULA 5.1.** Valors de divergència del D-loop i el citocrom b en la comparació dos a dos de les tres espècies.

Comparació	D-loop	cit b	Proporció
Bonítol / Bacora	0,180	0,020	9
Bacora / Tonyina	0,060	0,011	5,45
Tonyina / Bonítol	0,171	0,026	6,5
		mitjana	6,9 $\cong$ 7

12% per milió d'anys pel domini I d'aquesta espècie després de relativitzar el ritme d'evolució d'aquest fragment respecte a la totalitat del genoma mitocondrial.

Amb una aproximació similar a la d'Alvarado Bremer *et al.* (1995), es pot estimar a grans trets el ritme d'evolució del domini I en les tres espècies. La disponibilitat de les seqüències del gen mitocondrial del citocrom b (cit b) en les tres espècies<sup>1</sup> i el coneixement de la taxa d'evolució en peixos (1-2%, Kocher & Carleton, 1997) permet calibrar, mitjançant una comparació, el ritme d'evolució del D-loop per a aquestes espècies.

En primer lloc s'ha estimat la divergència dos a dos de les espècies pels dos fragments mitocondrials amb la distància Kimura 2-paramteres (Kimura, 1980). Per evitar l'efecte de la saturació la distància genètica només tenint en compte les transversions (TAULA 5.1.). Segons aquest resultat, el D-loop presenta un ritme de substitució unes set vegades més elevat que el del cit b. Així, amb la base d'un ritme de substitució d'1-2% per milió d'anys del cyt b en peixos (Kocher & Carleton, 1997) es pot estimar que el ritme de substitució del D-loop per a aquestes espècies és entre 7-14% per milió d'anys.

<sup>1</sup> Accession numbers al GeneBank de les seqüències de citocrom b: bonítol, L15549; bacora, D63491, L11556; tonyina vermella, D63494, L11560, X81563.

La relació 7:1 entre D-loop i cit *b* és superior a la relació 5:1 generalment acceptada en peixos (Meyer, 1993). El ritme relativament baix d'evolució del cit *b* descrit pel bonítol i la tonyina vermella, entre altres perciformes, explicaria l'augment de la relació (Cantatore *et al.*, 1994).

Tot i que el ritme d'evolució de 7 a 14% per milió d'anys és superior a l'estimat per Donaldson & Wilson (1999) per l'espècie perciforme *Centropomus*, s'han descrit taxes similars a altres espècies de peixos. A banda del ritme d'evolució citat anteriorment per l'emperador (12% per milió d'anys; Alvarado Bremer *et al.*, 1995), Brown *et al.* (1993) proposa una taxa de substitució d'11-13 % per l'esturió (*Acipenser transmontanus*). D'altra banda en mamífers s'han descrit taxes d'evolució similars pel mateix segment mitocondrial, en l'home Vigilant *et al.* (1991) estima una taxa de 11,5.17,3% per milió d'anys i Stewart & Baker (1994) descriu una taxa de 15-20% per milió d'anys pels rosegadors.

## 5.2. BONÍTOL

### 5.2.1. Estructura geogràfica de la variabilitat genètica

El primer indici de l'estructuració genètica per al bonítol entre les tres localitats estudiades apareix en la distribució desigual dels dos llinatges filogenètics. Ambdós llinatges presenten una certa ubiqüitat, tots dos presenten individus de les tres localitats. Ara bé, la clada 1 està format quasi exclusivament per individus de fora de l'Egeu, pràcticament un 90% (quinze de disset) dels individus d'aquest llinatge són de les localitats de Ligúria i del Jònic. Per altra banda, la majoria dels individus de l'Egeu, catorze de setze, es troben dins de la clada 2 (FIGURA 5.1).

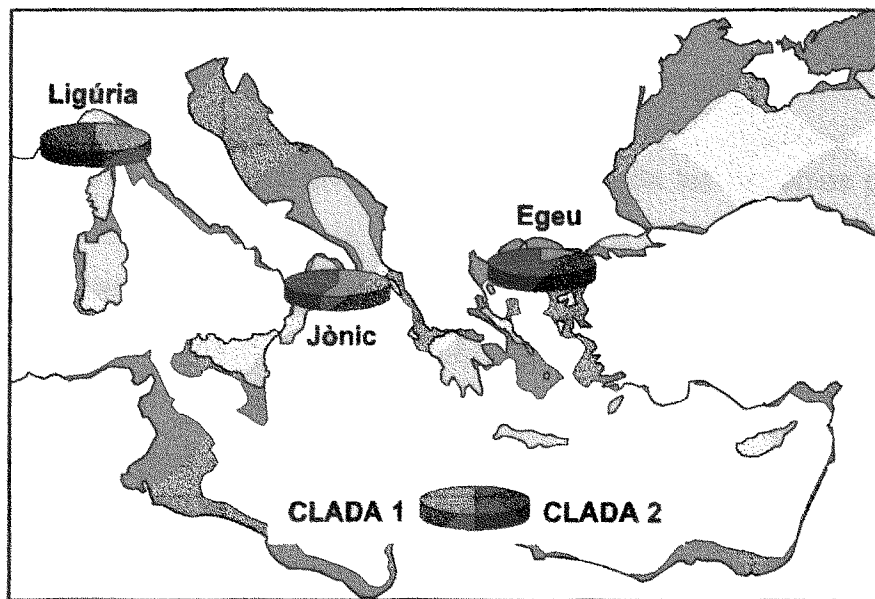


FIGURA 5.1. Freqüència de les dues clades en les tres localitats del bonítol. L'àrea en gris indica la línia batimètrica de 200 m.

Les anàlisis basades en la variabilitat de seqüència, Holsigner & Mason-Gamer (1996), distància  $D_a$  i AMOVA, a part de considerar l'heterogeneïtat de la distribució dels llinatges també ponderen la gran divergència entre les

clades. En principi quan s'analitzen les tres localitats per separat no s'observa una clara estructuració de la variabilitat genètica. L'únic resultat confirmat per totes les anàlisis és una gran homologia genètica entre Ligúria i Jònic. Amb aquesta base, la comparació d'aquestes dues localitats, agrupades com una sola, contra la localitat de l'Egeu sí que s'observa un nivell de diferenciació genètica bastant elevat.

Segons aquests resultats no es pot acceptar la hipòtesi d'un sol patrimoni genètic del bonítol entre les tres localitats estudiades. Així doncs, el bonítol presenta una clara heterogeneïtat de la variabilitat. La variabilitat genètica s'estructura en dues localitats: una a l'Egeu i una altra les localitats de Ligúria i Jònic conjuntament. L'alt nivell d'estructuració genètica entre aquestes localitats es deu a la distribució clarament heterogènia dels dos llinatges filogenètics i a la gran divergència de seqüència entre aquestes dues clades.

Coincidint amb aquest resultat, un estudi recent d'isoenzims de les mateixes mostres, però amb una grandària mostral més elevada, confirma la separació del mar Egeu respecte del grup Ligúria / Jònic (Pujolar comunicació personal). Per a la localitat de l'Egeu es descriuen diversos loci amb freqüències clarament diferenciades a les trobades en les localitats de Ligúria i del Jònic. Per al conjunt de les mostres no es compleix l'equilibri de Hardy-Weinberg i per tant no es pot acceptar que totes les localitats pertanyen a la mateixa població panmítica. A més, el grau d'estructuració està clarament marcat per una *F<sub>st</sub>* significativa tant quan es comparen qualsevol de les localitats del Ligúria i Jònic contra la localitat de l'Egeu, com quan es comparen les localitats de Ligúria i Jònic agrupades contra la de l'Egeu.

La presència de dos estocs genètics del bonítol dins de l'àrea estudiada té una concordança amb la informació biològica coneguda d'aquesta espècie



dins del Mediterrani. Basant-se en les àrees de reproducció i els patrons de migració Rey *et al.* (1984) diferencien dues subpoblacions al·lopàtriques del bonítol dins el Mediterrani. La primera subpoblació estaria confinada al Mediterrani occidental amb com a mínim tres llocs de posta: al voltant de Sicília, les Illes Balears i la costa d'Algèria. La segona subpoblació es trobaria entre el mar Egeu i el mar Negre, amb l'àrea de reproducció dins del mar Negre (Demir, 1963).

La subpoblació del Mediterrani occidental realitza la posta entre la primavera i l'estiu (Yoshida, 1980; Rey *et al.*, 1984). Un cop realitzada la posta, el bonítol del Mediterrani occidental sembla tenir un patró migratori diferencial segons l'àrea de reproducció. Els individus amb l'àrea de posta entre Algèria i les illes Balears migrarien a finals de l'estiu i a principis de tardor cap a l'Atlàntic est per alimentar-se (Rey *et al.*, 1984). Per altra banda, la pesca del bonítol a les costes de Sicília i el mar Jònic al llarg de tot l'any (De Metrio *et al.*, 1995) indicaria que la part de la subpoblació amb l'àrea de posta a Sicília romandria dins del Mediterrani durant tot l'any.

Segons això, les mostres de les localitats de Ligúria i Jònic pertanyerien a la subpoblació del Mediterrani occidental, la qual realitza la posta prop de Sicília. El contacte entre el mar de Ligúria i el Jònic sembla bastant factible, la batimetria d'aquesta zona i el comportament nerític de l'espècie no seria una barrera per l'intercanvi d'individus entre aquestes dues localitats. En canvi, una migració en aigües poc profundes fins l'àrea de posta d'Algèria i les Balears, i en conseqüència fins l'oceà Atlàntic, sembla poc probable. Així, l'homogeneïtat genètica entre Ligúria i Jònic podria ser conseqüència d'una compartició de l'àrea de reproducció, o d'un intercanvi d'individus o les dues causes en conjunt.

La localitat del l'Egeu correspondria a la subpoblació del Mediterrani oriental descrita per Rey *et al.* (1984). Aquesta població es reproduïx entre Maig i

Juny en el mar Negre i el mar de Màrmara (Mayorava & Tkacheva, 1959), i cap a la tardor surt a l'Egeu a alimentar-se (Demir, 1963). En aquest cas, els individus analitzats de l'Egeu correspondrien a la població d'individus adults que han sortit del mar Negre per alimentar-se.

Amb la coincidència dels dos estudis genètics, juntament amb la biologia de l'espècie, es pot concloure que el bonítol del Mediterrani i el mar Negre està estructurat com a mínim en dues subpoblacions al·lopàtriques. L'elevada diferenciació dels dos grups suggereix un flux gènic pràcticament nul entre les dues subpoblacions. De fet, el flux genètic entre el complex Ligúria / Jònic i l'Egeu, estimat a partir del valor  $\Phi_{ST}$ , és de només unes dues femelles migradores per generació.

L'arxipèlag de les illes gregues i la profunditat batimètrica del Jònic podrien representar una barrera geogràfica per a la migració del bonítol (vegeu FIGURA 5.1.). Contràriament a aquesta conclusió, Roberti *et al.* (1993) no assignen les illes gregues com una barrera geogràfica per la migració del bonítol. Els autors analitzen la variabilitat de seqüència d'un fragment del gen del citocrom *b* de l'ADNmt en individus del mar Jònic, mar Egeu i mar de Marmàra. De la comparació dos a dos de totes les tres mostres resulta una gran identitat genètica entre les localitats del Jònic i l'Egeu. En canvi, la mostra turca difereix significativament de les altres dues. Per tant, els autors conclouen que les illes gregues no són una barrera geogràfica que impedeixi la migració del bonítol.

La discrepància entre l'estudi de Roberti *et al.* (1993) i la resta d'estudis suggereixen que el patró d'estructuració del bonítol en aquesta àrea no està del tot clar. Així doncs, per tal de esbrinar amb exactitud quina estructura poblacional presenta el bonítol en el Mediterrani i el mar Negre, els estudis posteriors haurien d'emprar metodologies genètiques basades amb marcadors mitocondrials i nuclears, conjuntament amb un coneixement més

exhaustiu de la biologia de l'espècie. Per a una bona resolució de l'estructura poblacional s'haurien d'incloure mostretjos més amplis i de grandària més elevada tant de l'oceà Atlàntic prop de l'estret de Gibraltar com a dins del Mediterrani i el mar Negre amb especial èmfasi a les àrees de reproducció.

### 5.2.2. Filogeografia i formació dels dos llinatges mitocondrials

Tot i la necessitat d'un estudi en profunditat, la majoria de proves porten a acceptar com a certa l'estructura de com a mínim dues subpoblacions dins del Mediterrani i el mar Negre. De fet, el treball de Roberti *et al.* (1993) no contradiu aquesta estructura poblacional, sinó situa en un punt diferent el límit entre les dues subpoblacions.

La presència de dos llinatges mitocondrials amb una distribució geogràfica heterogènia és un patró que s'ha anat repetint en diferents espècies de peixos pelàgics. A gran escala geogràfica es troben pautes filogeogràfiques similars en diversos peixos pelàgics. Un dels primers exemples el van descriure Finnerty & Block (1992) per l'agulla negra (*Makaira nigricans*). En aquest peix s'hi han descrit dos llinatges del citocrom *b*, ambdós presents en peixos de l'oceà Atlàntic i Pacífic, però amb una distribució molt heterogènia. Posteriorment, Graves & MacDowell (1995) confirma la distribució heterogènia dels dos llinatges, detectats en aquest cas per RFLP de tot l'ADNmt. En el mateix treball, Graves & MacDowell (1995) afegeixen un nou exemple amb el peix vela (*Istiophorus sp.*), on també hi detecten la distribució diferencial de dos llinatges mitocondrials entre l'Atlàntic, el Pacífic i l'Índic. Dins de la mateixa família del bonítol, a la tonyina d'ulls grossos (*Thunnus obesus*) també s'hi han observat dos llinatges del D-loop amb una heterogeneïtat de distribució de les freqüències entre l'oceà Atlàntic i els oceans Pacífic i Índic (Alvarado Bremer *et al.*, 1998). En una àrea geogràfica més propera, l'emperador (*Xiphias gladius*) també presenta una distribució heterogènia de les clades de la regió D-loop entre les localitats de l'Atlàntic

Oest i el Mediterrani (Alvarado Bremer *et al.*, 1995). Finalment, entre el mar Mediterrani i el mar Negre (Magoulas *et al.*, 1996) descriu dos llinatges detectats per RFLP de tot l'ADNmt de l'anxova (*Engraulis encrasicolus*) amb una clara heterogeneïtat de freqüència entre aquest dos mars. Malgrat la gran divergència d'espècies i per tant de diferents biologies, tots els autors coincideixen a relacionar la formació dels dos llinatges a un procés vicariant.

En el clàssic estudi d'Avise *et al.* (1987) es descriuen cinc categories filogeogràfiques en base en la divergència molecular dels haplotipus mitocondrials i la seva distribució geogràfica. El model descrit anteriorment, de dos llinatges amb una distribució heterogènia, cau dins de la categoria 2. Aquesta categoria es caracteritza per la coexistència de diversos llinatges divergents en diverses zones geogràfiques i una heterogeneïtat genètica entre les diferents localitats. Segons els autors, la formació d'aquest patró filogeogràfic implica, primer una separació al·lopàtrica que permeti la formació dels dos llinatges i, posteriorment un contacte secundari entre les diferents àrees.

La distribució actual de les clades, la biologia de l'espècie i l'evolució geològica del mar Negre i el mar Mediterrani sembla indicar que la clada 2 té un origen en el mar Negre i la clada un correspondria a la resta de localitats mediterrànies. El fet que pràcticament tots els individus de l'Egeu es troben dins de la clada 2 portaria a assignar aquesta clada per a la localitat de l'Egeu. A més, el resultat de l'AMOVA posició per posició amb una coincidència pràcticament absoluta entre les posicions que presenten diferències significatives entre el grup Ligúria / Jònic i el mar Egeu, amb les posicions que defineixen els dos llinatges confirma l'assignació geogràfica de cadascun de les clades. En un pas més enllà, el patró migratori i de reproducció de l'espècie en els mars Egeu i Negre porta a situar l'origen de la clada 2 al mar Negre.

La història de les glaciacions del mar Mediterrani i el Negre en el Plistocè, explicaria la formació dels dos llinatges filogenètics. En el Quaternari hi ha hagut diversos processos glacials que han anat connectant i desconnectant els dos mars (Sara, 1985). Un dels processos més dramàtics hauria estat fa un 400 000 anys durant la glaciació Mindel, en la qual el nivell eustàtic va baixar entre cent quinze i cent vint metres (Nilsson, 1982), i per tant va separar els dos mars. Processos similars s'han anat repetint al llarg del Plistocè fins al darrer procés glacial, fa uns vint-i-cinc mil anys, amb una baixada del nivell marí d'entre vuitanta i cent vint metres. Després d'aquest darrer procés de glaciació, els dos mars es van tornar a connectar fa uns 7150 anys (Uchupi & Ross, 2000).

Utilitzant el ritme de substitució del 14% per milió d'anys es pot estimar que els dos llinatges van divergir fa uns 650 000 anys, uns 200 000 mil anys abans de la glaciació Mindel. Tot i els grans errors associats amb el rellotge molecular, sembla clar que la separació al·lopàtrica dels dos mars va portar a formar la clada 2 dins del mar Negre, quan va quedar aïllat per les regressions marines del Plistocè. El nivell de diversitat haplotípica inferior de la clada 2 respecte a la clada 1 corroboraria l'origen més modern d'aquest llinatge. El contacte secundari s'ha donat a partir de l'obertura del Bòsfor amb un intercanvi d'individus entre els dos mars. Una migració asimètrica, amb una major sortida d'individus del mar Negre cap al mar Mediterrani, explicaria la presència del segon llinatge dins del Mediterrani.

Durant les màximes glacials, la població del mar Negre hauria sofert reduccions de la grandària poblacional. La forma d'estrella de la filogènia de la clada 2 juntament amb la forma unimodal de la distribució dels aparellaments discordants suggereix que la població del mar Negre ha sofert recentment un coll d'ampolla del qual s'està recuperant (Slatkin & Hudson, 1991; Rogers & Harpending, 1992). Si la població s'ajusta al model de creixement sobtat, tal com és per la clada 2, amb el paràmetre  $\tau$  es pot

estimar el temps des de l'últim coll d'ampolla. Si es donen aquestes condicions Harpending *et al.* (1993) proposa la fórmula  $\tau = 2\mu lt$  (on  $\mu$  és el ritme de substitució per posició,  $l$  la llargària de la seqüència i  $t$  el temps que va començar l'explosió demogràfica). Utilitzant un ritme d'evolució de 0,14 substitucions per posició per milió d'anys, i amb una  $\tau$  calculada de 2,602 s'ha estimat que l'expansió de la població de l'Egeu va començar fa uns 25740 anys, coincidint amb el pic de l'última glaciació.

La correspondència del temporal del coll d'ampolla amb la data de l'última glaciació fa pensar que la població del bonítol del mar Negre, no només ha sofert un sol episodi de reducció de la grandària. Segurament, des del primer aïllament dins del mar Negre la població ha anat patint successives reduccions de la població relacionades amb les diverses glaciacions. De fet, només el darrer coll d'ampolla deixa una empremta en la distribució dels aparellaments discordants i en la topologia de la filogènia (Slatkin & Hudson, 1991; Roger & Harpending, 1992).

En conclusió, l'evolució filogeogràfica del bonítol es pot resumir en tres grans episodis biogeogràfics:

1. Durant les primeres glaciacions del Plistocè, la separació del mar Negre respecte el mar Mediterrani va portar a un aïllament de la població del mar Negre i en conseqüència a la formació de la clada 2 dins d'aquest mar. La coincidència del darrer coll d'ampolla amb l'última glaciació suggereix que la població del mar Negre ha anat patint diferents reduccions de la grandària poblacional relacionades amb les successives connexions i desconexions dels dos mars.
2. La connexió definitiva entre el mar Negre i el mar Mediterrani a finals de l'Holocè permet un intercanvi d'individus entre els dos mars. La distribució actual dels llinatges es pot atribuir a una migració

asimètrica del bonítol, amb una major sortida d'individus cap al mar Mediterrani que una entrada d'individus cap al mar Negre.

3. Actualment hi ha una interrupció del flux gènic entre el mar Egeu i la resta del Mediterrani. La barrera geogràfica possiblement es situa entre el mar Jònic i l'arxipèlag de les illes gregues.

Coincidint amb la història poblacional del bonítol, Magoulas *et al.* (1996) descriuen una evolució molt similar per a les poblacions de l'anxova del mar Mediterrani i el mar Negre. Els autors també relacionen la formació de dos llinatges mitocondrials amb l'aïllament del mar Negre durant les glaciacions del Plistocè. El posterior contacte entre aquest dos mars, amb una major sortida d'individus del mar Negre, explica la presència dels dos llinatges a ambdós mars. Per últim, l'estructura poblacional actual de l'anxova també és molt similar a la que presenta actualment el bonítol.

La coincidència de resultats de dos estudis independents en dos espècies sense cap relació evolutiva confirma les conclusions en cadascun dels estudis (Avice, 1994; pàg. 247-248). A més, la biologia similar de les dues espècies (mateixa distribució, caràcter nerític, llocs de posta similars...) pot establir aquesta història filogeogràfica coincident com un patró d'evolució poblacional d'aquest tipus d'espècies en aquesta àrea.

Finalment, la concordança de datació de cadascun dels episodis biogeogràfics del bonítol (formació dels dos llinatges i temps des de l'últim coll d'ampolla) amb els diferents episodis geològics ben datats confirma el calibratge del rellotge molecular. Si més no, per al domini I de la regió control de l'ADNmt del bonítol, el ritme d'evolució de 0,14 substitucions per posició per milió d'anys no sembla del tot incorrecte.

### 5.2.3. Elevada divergència dels dos llinatges mitocondrials

A l'apartat anterior ja s'avançava que la presència de dos llinatges intraespecífics és una genealogia mitocondrial que es va repetint en algunes espècies de peixos pelàgics. Tot i això, a la literatura no existeixen gaires estudis en pelàgics que analitzin la variabilitat de seqüència del D-loop i que a més presentin dos llinatges ben diferenciats. Fins a la data, només s'han descrit sis casos amb una genealogia amb dues clades intraespecífics dins de la regió control (TAULA 5.2).

Tal i com es pot observar a la taula, el bonítol és l'espècie que presenta un nivell de divergència entre llinatges més elevat. Les úniques espècies amb una divergència similar són la bacoreta i la tonyina vermella. En el cas de la bacoreta, els dos llinatges tenen una associació filogeogràfica completa, una clada es troba exclusivament en les mostres de les illes Bermudes de l'Atlàntic est i l'altre llinatge només es troba a les costes africanes de l'oceà atlàntic. Pel que fa al valor de la tonyina vermella, la divergència dels dos llinatges està a nivell interespecífic, les seqüències de la clada 2 de la tonyina vermella coincideixen totalment amb les seqüències de la bacora.

TAULA 5.2. Espècies pelàgiques amb dos llinatges intraespecífics de la regió control.

Espècie	Da interllinatge	Referència
Agulla negra ( <i>Makaira nigricans</i> )	??*	Finnerty & Block, 1992
Emperador ( <i>Xiphias gladius</i> )	2,7%	Alvarado Bremer <i>et al.</i> , 1995
Tonyina d'ulls grossos ( <i>Thunnus obesus</i> )	4,9%	Alvarado Bremer <i>et al.</i> , 1998
Bacoreta ( <i>Euthynnus alleteratus</i> )	8,6%	Alvarado Bremer <i>et al.</i> , 1999
Bacora ( <i>T. alalunga</i> )	3,3%	aquest treball
Tonyina vermella ( <i>T. thynnus thynnus</i> )	8,7%	aquest treball
Bonítol ( <i>Sarda sarda</i> )	9,1%	aquest treball

\* valor de Da no descrit pels autors



Amb la base del valor de *Da* de les comparacions interespecífiques de les espècies de túnids de la Taula 4.24 s'observa que el nivell de divergència interclades del bonítol supera el valor de diferents comparacions interespecífiques. Excepte la comparació entre la tonyina d'ulls grossos (*T. obesus*) i el *T. atlanticus*, la resta de comparacions interespecífiques dins dels dos grups descrits en la filogènia de les tonyines, són sempre inferiors als valors de *Da* entre els llinatges del bonítol.

Segons això, el valor de *Da* entre els llinatges del bonítol, i per similitud el de la bacoreta, sembla estar al límit del valor de divergència que defineix espècie. Ara bé, la introducció del concepte concordança genealògica en la definició d'espècie per Avise & Ball (1990), implica que les relacions filogenètiques d'una espècie realitzada amb loci independents ha de ser coincident. Seguint aquest principi, si realment els dos llinatges mitocondrials definissin dues espècies o subespècies diferents, en l'anàlisi d'isoenzims realitzat en el bonítol també s'esperaria obtenir una divergència molt marcada. Tal i com s'ha comentat anteriorment, tot i que l'anàlisi d'isoenzims coincideix en definir l'estructura poblacional del bonítol, la divergència entre les dues poblacions no és gaire elevada. A més, amb una anàlisi molt preliminar del desequilibri citonuclear entre les dades al·lozímiques i les del D-loop no s'observa una correlació entre la variabilitat nuclear i la variabilitat mitocondrial.

Diverses causes podrien explicar l'elevada divergència entre els llinatges mitocondrials i la baixa dissimilitud observada en els marcadors nuclears. L'asimetria dispersiva dels dos sexes pot mostrar patrons d'estructura geogràfica diferents en els gens de transmissió biparental (al·loenzims) i en els gens que es transmeten a través d'un sol sexe (ADNmt) (Avise, 1994; pàg. 227). Així, un possible comportament migratori diferencial de les femelles respecte els mascles podria afectar a l'augment de la divergència entre llinatges mitocondrials. Si en aquest comportament les femelles

tinguessin la tendència de quedar-se dins del mar Negre, el genoma mitocondrial hauria sofert amb més incidència els diferents episodis biogeogràfics. Addicionalment, a causa de les característiques de l'ADNmt els coll d'ampolla de les poblacions i la deriva genètica tenen un efecte molt més accentuat en aquesta molècula que no pas al genoma nuclear (Birky *et al.*, 1989).

Tot i així, l'elevada divergència entre els dos llinatges mitocondrials posa un dubte raonable sobre si s'està observant un procés d'especiació al·lopàtrica entre el bonítol del mar Negre i el del mar Mediterrani.

### 5.3. BACORA

#### 5.3.1. Diferenciació genètica entre la bacora de l'Atlàntic i del Mediterrani.

El resultat més destacat d'aquesta anàlisi és la identificació de com a mínim dos estocs genètics de la bacora a l'àrea estudiada, un situat a l'Atlàntic est i l'altre al Mediterrani. La diferenciació genètica entre les dues conques oceàniques no és molt pronunciada ( $\Phi_{st} = 0,029$ ), però amb la probabilitat associada al valor de  $\Phi_{st}$  ( $P = 0,009$ ) no permet acceptar la hipòtesi d'un sol estoc genètic. L'estimació de setze femelles migradores per generació a partir del valor de  $\Phi_{st}$  indica que hi ha un cert contacte entre les dues localitats.

El nivell de diferenciació entre les localitats de l'oceà Atlàntic i les localitats del mar Mediterrani és relativament baix quan es compara a l'observat per altres espècies de peixos pelàgiques entre conques oceàniques (TAULA 5.2). La baixa diferenciació genètica condiona els resultats de tal manera que només s'observa la diferenciació fins que s'agrupen totes les localitats d'un mateix mar, i per tant s'augmenta la grandària mostral, i es comparen en conjunt contra totes les localitats de l'altra conca oceànica

**TAULA 5.3.** Diferenciació genètica d'espècies pelàgiques entre conques oceàniques utilitzant la regió control de l'ADNmt com a marcador genètic.

<i>Espècie</i>	$\Phi_{st}$	<i>àrea</i>	<i>referència</i>
Bonítol ( <i>Sarda sarda</i> )	0,126	Mediterrani / Negre	Aquest estudi
Emperador ( <i>Xiphias gladius</i> )	0,157	Med. / Atl. / Pac.	Rosel & Block, 1996
Emperador ( <i>Xiphias gladius</i> )	0,144	Med. / Atl / Pac.	Alvarado Bremer <i>et al.</i> , 1996
Bacora ( <i>Thunnus alalunga</i> )	0,029	Atlàntic / Mediterrani	Aquest estudi

En el cas de la bacora, l'estructura genètica no segueix el patró de diferenciació d'una distribució geogràfica heterogènia de dos llinatges filogenètics, tal i com s'ha descrit anteriorment pel bonítol i per altres peixos pelàgics. Tot i que la filogènia de la bacora també presenta dos llinatges amb un cert grau de divergència, la diferenciació no ve donada per la seva distribució desigual entre els dos mars. En canvi, sí que s'observa una heterogeneïtat en la distribució entre l'Atlàntic i el Mediterrani de la freqüència dels cent tres haplotipus.

A part, cal destacar que la distribució dels aparellaments discordants difereixen significativament del que s'esperaria segons el model d'expansió sobtada (Rogers & Harpending, 1992; Rogers, 1995). Segons això, cap de les dues localitats diferenciades genèticament ha sofert un procés de coll d'ampolla recentment.

L'heterogeneïtat genètica entre la bacora atlàntica i la mediterrània coincideix amb les diferències trobades per Megalofonou (2000) en estudiar certs paràmetres biològics. Per exemple, els individus atlàntics poden arribar a viure fins a 13 anys (Lee & Yeh, 1993), mentre que l'edat màxima dels individus mediterranis és de només 9 anys (Megalofonou, 2000). A més, la taxa de creixement és inferior en la bacora del Mediterrani respecte a la de l'Atlàntic; a partir del primer any de vida els individus atlàntics tenen una mitjana de creixement anual uns 5 cm superior que la mitjana de creixement dels individus mediterranis (Santiago, 1993; Ortiz de Zárate *et al.*, 1996; Megalofonou, 2000). En el mateix treball, Megalofonou (2000) també descriu diferències en la relació pes / llargària, així en una llargària determinada la bacora del Atlàntic és molt més pesant que la del Mediterrani.

Malgrat la coincidència de resultats en l'estudi de la biologia i el present treball, en un estudi molt recent d'alloenzims (Pujolar, comunicació personal) no s'observa diferenciació genètica entre la bacora Atlàntic i la

mediterrània. La major eficiència de l'ADNmt per detectar estructuració genètica poblacional explicaria que l'anàlisi basada en aquesta molècula permeti observar un grau de diferenciació que amb el poder de resolució dels al·loenzims no és possible descobrir. A causa de la naturalesa haploide i l'herència materna, la grandària poblacional efectiva de l'ADN mitocondrial és només un quart de la grandària poblacional dels al·loenzims (Birky *et al.*, 1989) fent-lo molt més susceptible a la deriva genètica i als processos de diferenciació poblacional. A més, el ritme d'evolució de tres a quatre vegades més elevat del genoma mitocondrial que el nuclear (Brown *et al.*, 1979) també el fa més capaç de detectar canvis poblacionals relativament recents en el temps.

Coincidint amb els resultat al·lozímics, Viñas *et al.* (1999), en un estudi molt preliminar, analitzant la variabilitat de seqüència de la regió D-loop de l'ADNmt tampoc troba diferenciació entre l'Atlàntic i el Mediterrani. Tot i que part de les mostres analitzades coincideixen amb les d'aquesta tesi, l'estudi està realitzat amb una grandària mostral molt baixa i per tant no té la capacitat de resoldre l'estructuració genètica amb una diferenciació tant baixa.

La discrepància trobada principalment entre l'estudi d'al·loenzims i l'estudi de l'ADNmt es pot explicar segons el que s'ha comentat anteriorment. Ara bé, per resoldre correctament l'estructura poblacional s'haurien d'analitzar mostres més amples de cadascuna de les zones estudiades. Mostres de la zona de posta de l'Atlàntic nord, el mar de Sargassos, serviria per confirmar la possible homogeneïtat de tot l'Atlàntic nord. Similarment també s'haurien d'incloure mostres a ambdós costats de l'estret de Gibraltar per tal d'esbrinar quin és realment el límit geogràfic de la diferenciació genètica si és que existeix.

### 5.3.2. Origen de la diferenciació Atlàntica / Mediterrània i filogeografia de la bacora

Malgrat ser considerat un dels grans pelàgics amb un gran caràcter migratori, Chow & Ushima (1995) observen la capacitat de formar estructures genèticament diferenciades entre la bacora de l'Atlàntic i la del Pacífic. Els autors, estudiant amb PCR-RFLP del gen mitocondrial ATPasa, postulen que l'estructuració genètica entre els dos oceans es deu a una manca de migradors producte d'un aïllament per distància.

Evidentment, la diferenciació entre l'Atlàntic i el Mediterrani també està relacionada amb un flux gènic restringit entre les dues localitats. Ara bé, quina és realment la causa de la diferenciació entre l'Atlàntic i el Mediterrani? A part de l'aïllament per distància suggerit per Chow & Ushima (1995), en la mateixa àrea geogràfica, diversos autors han suggerit que en espècies marines pelàgiques les condicions hidrogeogràfiques de l'estret de Gibraltar i el mar d'Alboran juguen un paper molt important alhora de restringir el flux gènic entre els dos mars. En el lluç (*Merluccius merluccius*), espècie amb una fase larvària pelàgica, Roldan *et al.* (1998) proposen que el règim tant particular de les corrents marines al mar d'Alborán impedeix el flux gènic entre l'Atlàntic i el Mediterrani. Més concretament, els autors assignen la barrera migratoria al front Oran – Almeria que es forma just a l'entrada del mar Mediterrani. Més recentment, Naciri *et al.* (1999) proposa el mateix mecanisme de diferenciació entre les poblacions atlàntiques i mediterrànies del llobarro (*Dicentrarchus labrax*).

En una revisió de tots els estudis de marcatge i recaptura realitzats a l'Atlàntic nord des dels anys trenta fins l'actualitat (Ortiz de Zárate & Cort 1998), només hi ha citat un sol individu marcat a l'Atlàntic i recuperat al Mediterrani d'Anocle & Delaporte (1977). Així doncs, el flux gènic entre

aquests dos mars semblaria estar limitat per una barrera geogràfica com l'estret Gibraltar o el front Oran – Almeria.

Existeixen, però, altres causes de diferenciació en espècies marines. Palumbi (1994) descriu el comportament com un altre factor que afavoreix la subdivisió poblacional. En aquest sentit, el comportament filopàtric cap a l'àrea de posta s'ha proposat com un mecanisme que provoca la formació de diferenciació genètica de diversos peixos marins (Sinclair & Illes, 1988), fins i tot dins d'un mateix oceà sense cap barrera geogràfica clara (Alvarado Bremer *et al.*, 1996; Graves, 1998). Alvarado Bremer *et al.* (1996) proposa aquest comportament com la causa d'estructuració de l'emperador (*Xiphias gladius*) dins de l'oceà Atlàntic. Similarment, Graves (1998) descriu aquest comportament com uns dels factors que provoquen l'estructuració de l'agulla llistada (*Tetrapturus audax*) dins de l'oceà Pacífic. Així doncs, un comportament similar de la bacora amb fidelitat al lloc de posta també explicaria la diferenciació genètica entre la bacora de l'Atlàntic i la del Mediterrani.

Evidentment, una de les premisses que s'han de complir per poder explicar el comportament filopàtric cap a l'àrea de posta és la presència de com a mínim dues àrees de posta separades geogràficament. La presència de larves de bacora a llarg de tot el Mediterrani (Piccinetti *et al.* 1996) indicaria que aquesta mar és una de les àrees de reproducció. Pel que fa a l'Atlàntic nord fins a la data només s'ha descrit una àrea de posta al mar dels Sargassos a l'Atlàntic oest (Beardsley, 1969; Koto, 1969). Malgrat la llunyania de l'àrea de reproducció atlàntica, la migració transatlàntica cap a aquesta àrea de és molt superior a l'intercanvi d'individus entre l'oceà Atlàntic i el mar Mediterrani (Ortiz de Zárate & Cort, 1998).

En resum, per ara no es pot descartar cap de les possibles causes de diferenciació entre la bacora atlàntica i mediterrània. De fet, segurament la

diferenciació no és només a conseqüència d'una sola causa, sinó possiblement es deu a una combinació de les diferents causes.

A part del comportament actual de bacora, la diferenciació podria tenir un origen més remot en el temps. L'aïllament del Mediterrani de l'Atlàntic durant les glaciacions del Plistocè ha estat proposat com un mecanisme de separació poblacional de diverses espècies marines. En el lluç (*Merluccius merluccius*), Roldán *et al.* (1998) relacionen la formació de la divergència entre les poblacions de l'Atlàntic i del Mediterrani al tancament de l'estret durant les glaciacions del Plistocè. En l'anxova (*Engraulis encrasicolus*), també s'ha proposat el mateix origen biogeogràfic per explicar la gran diferenciació al·lozímica entre les poblacions atlàntiques i mediterrànies (Pla *et al.*, 1998).

En principi, la baixa diferenciació actual de la bacora no sembla correlacionar-se amb l'aïllament del Mediterrani en el Quaternari. Per exemple, en el bonítol l'efecte de les glaciacions del Plistocè porta a una diferenciació genètica molt més profunda. Ara bé, el tancament de l'estret de Gibraltar durant el Plistocè sí que sembla haver deixat una empremta a la filogènia de la bacora; segurament la formació dels dos llinatges filogenètics es poden atribuir a aquest fet. En aquest sentit i acceptant un rellotge molecular del 14% per milió d'anys, es pot deduir que els dos llinatges van divergir fa uns 250 000 anys, coincidint amb la regressió marina de Rissian que va portar al tancament de l'estret de Gibraltar (Bianco, 1990). La posterior connexió entre l'Atlàntic i el Mediterrani va portar a un intercanvi d'individus que explicaria la presència dels dos llinatges als dos mars, però amb un cert contacte entre les localitats tal i com indica el valor de setze femelles migradores per generació.

En resum, la diferenciació actual és una barreja de diversos processos biogeogràfics que la bacora ha anat patint en la seva història recent. Així, per



ordre cronològic, la separació del mar Mediterrani de l'oceà Atlàntic durant les glaciacions del Plistocè va portar a una profunda diferenciació genètica de la bacora i, en conseqüència a una formació dels dos llinatges mitocondrials. A partir del restabliment de la connexió entre l'Atlàntic i el Mediterrani, i el contacte secundari de les dues poblacions porta a una suavització de la diferenciació i el repartiment dels dos llinatges en els dos mars. Tot i així, el comportament filopàtric i migratori actual de la bacora manté el grau d'estructuració actual entre les poblacions de la bacora de l'Atlàntic i del Mediterrani.

### **5.3.3. Homogeneïtat genètica dins del mar Mediterrani i dins de l'oceà Atlàntic.**

Com a segon resultat, s'observa una gran homogeneïtat genètica a dins de cadascuna de les dues conques oceàniques (Atlàntic i Mediterrani). A més, tal i com s'ha comprovat a l'anàlisi preliminar (apartat 4.2.3.1. i TAULA 4.12) cap de les comparacions entre les mostres de diferents anys en una mateixa localitat presenta diferències significatives. Així, es pot concloure que tant la bacora del Mediterrani com la de l'Atlàntic no ha sofert fluctuacions genètiques significatives en els diferents anys.

L'homogeneïtat genètica dins de cadascun dels dos mars concorda perfectament amb la teoria generalment acceptada que les espècies marines amb gran capacitat de migració i amb un hàbitat continuat tenen dificultat per subdividir-se en poblacions separades (Palumbi, 1994).

Dins del Mediterrani, l'homogeneïtat genètica es pot relacionar que la bacora es reproduïx en pràcticament tot el Mediterrani (Piccinetti *et al.*, 1996). Tal i com s'ha comentat amb anterioritat, s'observen larves de bacora en una extensa àrea del Mediterrani, fet que portaria a una fresa conjunta de tota la bacora del Mediterrani i en conseqüència a una barreja de tota la població.

L'homogeneïtat genètica dins del mar Mediterrani concorda perfectament amb els resultats de l'estudi d'isoenzims realitzat només en mostres de l'Egeu i del Jònic (Pujolar). Les dues localitats no presenten diferències significatives quan es comparen les freqüències al·lèliques, per tant les dues localitats compleixen l'equilibri de Hardy-Weiberg tant separadament com en conjunt. Finalment, la diferenciació genètica entre les mostres ha estat nul·la amb un valor de  $F_{st}$  no significatiu.

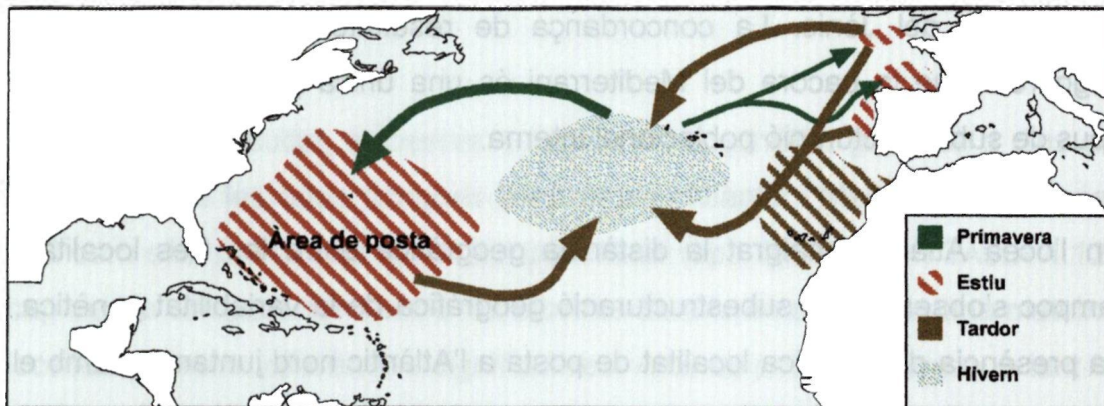
Similarment, Megalofonou (2000) tampoc troba diferències significatives quan compara les llargàries mitjaneres en els diferents anys entre la bacora de l'Egeu i la del Jònic. La concordança de resultats de tots els treballs suggereix que la bacora del Mediterrani és una única població sense cap tipus de subestructuració poblacional interna.

En l'oceà Atlàntic, malgrat la distància geogràfica entre les tres localitats tampoc s'observa una subestructuració geogràfica de la variabilitat genètica. La presència d'una única localitat de posta a l'Atlàntic nord juntament amb el règim migratori de la bacora en aquesta part de l'Atlàntic explicaria la manca de diferenciació entre les tres localitats.

Basant-se en estudis de marcatge i recaptura, i àrees i èpoques de pesca, Bard (1981) proposa un patró migratori de la bacora de l'Atlàntic nord que posteriorment ha estat corroborat per Ortiz de Zárate & Cort (1998). Segons aquests estudis el règim migratori explicaria el contacte entre les tres localitats i la zona de posta situada al mar dels Sargassos (FIGURA 5.2.). A grans trets, la bacora de l'Atlàntic nord presenta dos grans moviments migratoris. A finals d'hivern els individus es concentren al voltant de les Açores fins a finals de Maig. A partir d'aquest moment una part de la població es mou en sentit est cap al sud-oest d'Irlanda ("ruta Açores") i cap al golf de Biscaia ("ruta clàssica"). Simultàniament, l'altra part de la població,

formada principalment per individus adults, es mou de les Açores cap a l'oest fins el mar dels Sargassos on realitzen la posta. A principis de tardor, els peixos del golf de Biscaia es mouen cap al sud-oest i s'ajunten amb les procedents del sud-oest d'Irlanda i tornen cap a les Açores paral·lelament a la costa de la península Ibèrica, passant per les Canàries. Per altra banda, els adults que han fet la fresa al mar dels Sargassos, a la tardor també tornen cap a les Açores per passar l'hivern.

Aquest règim migratori, explicat de forma molt general, explica el contacte entre les tres localitats analitzades i la zona de posta.



**FIGURA 5.2.** Règim migratori de la bacora a l'Atlàntic nord.

## 5.4 TONYINA

### 5.4.1. Homogeneïtat genètica dins del mar Mediterrani

L'anàlisi de totes les mostres de tonyina dins del mar Mediterrani no presenta una heterogeneïtat temporal com tampoc la variabilitat genètica està estructurada geogràficament. Cal recordar que considerant la característiques especials de les seqüències de la clada 2 i la seva baixa freqüència, aquests haplotipus s'han descartat per a realitzar les anàlisis d'estructura de la variabilitat genètica.

#### 5.4.1.1. Estabilitat temporal dins del Mediterrani

Evidentment, l'estabilitat temporal només s'ha comprovat en les quatre localitats de les que es disposa més d'una mostra anual: golf de València, mar de Ligúria, mar Tirrè i mar Jònic (vegeu TAULA 4.26).

L'anàlisi més extensiva s'ha realitzat en la localitat del golf de València on s'han comparat les mostres anuals dels anys 94, 96 i 97. La variabilitat molecular, mesurada amb  $h$  i la  $\pi$ , no ha sofert canvis significatius al llarg dels quatre anys. D'una manera similar, la variància molecular (AMOVA) no és distribueix heterogèniament en els diferents anys. La comparació de les tres mostres anuals de la localitat de Ligúria, anys 95, 96 i 97, coincideix a mostrar una gran estabilitat genètica. Pel que fa a les altres dues localitats (Tirrè i Jònic), les mateixes anàlisis donen resultats similars (vegeu la TAULA 4.27).

Aquesta inalterabilitat genètica de la tonyina del Mediterrani s'ha de prendre amb una certa precaució, sobretot en les localitats del Tirrè i del Jònic on només es disposa de dues mostres anuals. A més, la franja de temps estudiat, amb un màxim de quatre anys en el golf de València, és molt petita

des del punt de vista evolutiu, només els canvis poblacionals molt bruscs i recents podrien ser detectats mitjançant l'anàlisi realitzada.

En definitiva, l'anàlisi de l'estabilitat temporal al llarg de com a màxim els darrers quatre anys porta a concloure que les localitats no han sofert fluctuacions a la variabilitat genètica. A més, el resultat d'aquesta anàlisi permet una agrupació, sense restriccions, de les diverses mostres dins d'una mateixa localitat a fi a afecte de poder treballar amb grandàries mostrals més elevades.

#### 5.4.1.2. Homogeneïtat genètica dins del mar Mediterrani.

Tal i com s'ha comentat a l'apartat anterior, unes de les conseqüències del resultat de l'estabilitat temporal és que permet agrupar les tretze mostres en sis localitats diferenciades: mar Egeu (n = 22), mar Jònic (n = 27), costa de Líbia (n = 11), mar Tirrè (n =43), mar de Ligúria (n =72) i golf de València (n =94)(vegeu TAULA 4.28).

Totes les anàlisis de les sis mostres (269 individus) de tonyina coincideixen a mostrar una manca de subestructuració en l'àrea estudiada. Ni els cent vuitanta-vuit haplotipus ( $P = 0,998$ ) ni les dues agrupacions de la clada 1 ( $P = 0,985$ ) es distribueixen heterogèniament en les sis localitats. L'AMOVA agrupant les sis localitats en un sol grup tampoc dona diferències significatives ( $P = 0,097$ ). La clara manca de diferenciació està reafirmada pels valors de extremadament baixos en la comparació dos a dos de les sis localitats (TAULA 4.30). La presència de valors negatius de  $\Phi_{st}$  i  $D_a$  (TAULES 4.30 i 4.11) en la comparació entre els parells de localitats, indiquen una variabilitat superior dins de les localitats que no pas entre localitats.

L'homogeneïtat genètica dins del Mediterrani també s'ha comprovat en una sèrie d'estudis genètics recents. Pujolar *et al.* (1998) en un estudi al·lozímic

de quatre localitats mediterrànies (costa espanyola del mar Mediterrani, Golf de Lleó, Golf de Gènova i Golf de Taranto) tampoc troba subestructuració dins d'aquest mar. Més recentment, Alvarado Bremer *et al.* (1999) estudiant la variabilitat de seqüència de la regió D-loop de mostres del mar Mediterrani, oceà Atlàntic i oceà Pacífic, no troba diferències significatives en la distribució dels haplotipus entre les dues localitats del Mediterrani, el mar Jònic i les costes de Turquia. En canvi, l'anàlisi de microsatèl·lits de Broughton & Gold (1997) és l'únic treball que s'observa heterogeneïtat entre dues mostres del mar Mediterrani, una al Golf de Taranto (mar Jònic) i la segona al golf de València. Aquest resultat, però, s'han de prendre amb precaució ja que en el mateix treball, els autors no troben diferències significatives entre mostres del mar Mediterrani i l'oceà Pacífic.

La concordança de tots els estudis permet concloure que la tonyina del Mediterrani comparteix el mateix patrimoni genètic i que per tant no està subestructurada en diverses poblacions dins d'aquest mar.

La manca d'estructuració dins d'un mateix mar és un fet habitual en els túnids. Per exemple, la bacora presenta un patró d'estructuració semblant al de la tonyina en la mateixa zona de distribució (aquesta zona). També en la bacora, Chow & Inoue (1995) no troben heterogeneïtat genètica entre les localitats de l'Atlàntic nord i l'Atlàntic sud. La tonyina d'ulls grossos (*Thunus obesus*) tampoc presenta subestructuració genètica entre l'Atlàntic nord i l'Atlàntic sud (Alvarado Bremer *et al.*, 1998) ni tampoc entre les dues mostres situades dins de l'oceà Pacífic (Alvarado Bremer *et al.*, 1998; Grewe & Hampton, 1998). El cas més extrem de tots els túnids, és el de la tonyina del sud (*Thunnus maccoyii*) en què fins ara no s'ha detectat cap tipus de subestructuració genètica en tota la seva àrea de distribució, la qual abraça des de les costes de Sud Àfrica fins a Tasmània (Grewe *et al.*, 1997).

L'homogeneïtat dins d'un mateix mar concorda amb la teoria generalment acceptada que les espècies marines amb una gran mobilitat i amb grandàries poblacionals elevades tenen molta dificultat de formar subestructuracions poblacionals (Plaumbi, 1994). A més, el fet que la tonyina realitzi la posta en una gran àrea del Mediterrani (Piccinetti *et al.* 1997), i no en àrees discretes, facilita la barreja d'individus i per tant l'homogeneïtzació de la variabilitat genètica.

#### 5.4.2. Homogeneïtat entre l'Atlàntic oest i el Mediterrani

L'ampliació de l'anàlisi afegint la localitat de l'Atlàntic oest mostra de nou la manca de diferències significatives. Preliminarment, abans de comparar la localitat atlàntica amb la localitat mediterrani, s'ha comprovat que les mostres de l'Atlàntic oest dels anys 96 i 98 presenten una estabilitat temporal. L'homogeneïtat temporal resultant d'aquesta anàlisi, manca d'heterogeneïtat en la distribució dels haplotipus ( $P = 0,262$ ) i l'AMOVA ( $P = 0,375$ ) permet agrupar aquestes dues mostres en una sola i així poder treballar amb grandàries mostrals més elevades ( $n = 50$ ).

La comparació de les set localitats (sis mediterrànies i una atlàntica) per separat presenta una gran homogeneïtat genètica entre totes elles. Cap de les localitats mediterrànies difereix significativament de la localitat de l'atlàntic oest (TAULA 4.21, pàgina). Fins i tot, la comparació de les dues localitats més allunyades geogràficament presenta valors de  $\Phi_{st}$  negatius, suggerint una alta homologia genètica. El dendrograma de la distància  $D_a$  situa la localitat de l'Atlàntic oest enmig de les localitats mediterrànies i confirma la manca d'estructuració geogràfica de la variabilitat genètica.

L'anàlisi de l'AMOVA agrupant totes les localitats del Mediterrani com un gran grup contra la localitat de l'Atlàntic tampoc presenta diferències significatives cap tipus d'estructuració geogràfica ( $P = 0,245$ ).

La manca d'estructuració entre la tonyina del Mediterrani i la de l'Atlàntic oest, en principi no sembla correlacionar-se amb els diferents estudis genètics realitzats per a aquesta espècie en la mateixa àrea geogràfica. En l'estudi de Pla *et al.* (1998) s'observa una inversió de freqüència entre l'Atlàntic oest i l'Atlàntic est (golf de Biscaia i mar Mediterrani) de l'al·lel més comú de dos dels tres loci altament polimòrfics (*SOD-1\** i *G6PDH\**; vegeu FIGURA 10.5.5. en Pla *et al.* 1998). Més recentment, l'estudi preliminar d'Alvarado Bremer *et al.* (1999), en el qual s'estudia la variabilitat de seqüència de la regió control de setanta-tres individus del Mediterrani i seixanta-set del Atlàntic nord-oest, observen una diferenciació genètica entre aquestes dues localitats detectada mitjançant l'anàlisi jeràrquica de la diversitat nucleotídica (Holsinger & Mason-Gamer, 1996).

Tots els autors relacionen la formació de la diferenciació genètica entre l'Atlàntic oest i el Mediterrani a la situació actual de les àrees de posta i el patró migratori de la tonyina a l'Atlàntic Nord. Està perfectament documentat l'existència de dues úniques àrees de posta totalment separades l'Atlàntic: a l'Atlàntic oest la tonyina es reproduïx al golf de Mèxic i a l'estret de Florida entre Abril i Juny; mentre que, a l'Atlàntic est, la reproducció es dona dins del Mediterrani de Juny a Agost (Rivas, 1954; Richards, 1976). La migració dels individus adults de la tonyina segueix un cicle anual similar a les dues vessants de l'Atlàntic (FIGURA 5.3). Cap a la primavera i abans de l'època de posta, la tonyina es mou cap a les dues àrees de reproducció. Un cop realitzada la posta, els individus es migren en busca d'aigües més fredes per alimentar-se. Així, a l'Atlàntic oest, les tonyines es mouen en sentit nord seguint la plataforma continental fins golf de Sant Llorenç i Terranova. Cap a la tardor, la tonyina es mou sentit sud i lluny de la costa cap als llocs



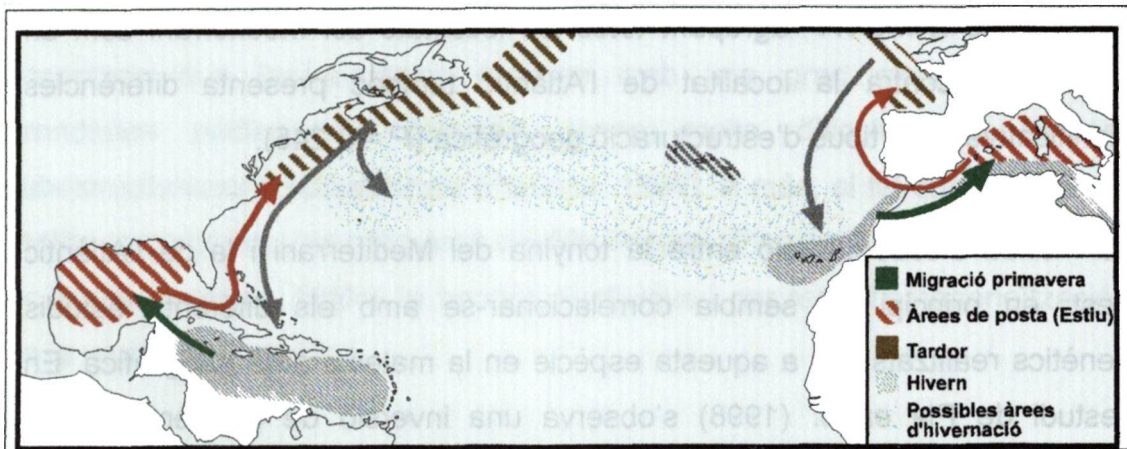


FIGURA 5.3. Règim migratori de la tonyina a l'Atlàntic nord i la Mediterrani

d'hivernada situats en el Carib. Simultàniament a tot aquest moviment, a l'altra banda de l'Atlàntic, després de realitzar la posta, part de la tonyina surt del Mediterrani i migra sentit nord per alimentar-se a l'oceà Atlàntic. Cap a la tardor els individus es mouen cap al sud a la zona d'hivernació situada a les Canàries (Mather *et al.*, 1995; Rey & Cort, 1986; Cort, 1990).

Malgrat la correspondència entre la diferenciació i la biologia de l'espècie existeixen altres proves que corroboren la manca de diferenciació genètica entre la tonyina de l'Atlàntic oest i de l'Atlàntic est trobada en aquesta tesi. Edmund & Sammons (1973), analitzant mil cinquanta sis individus, no observen diferències significatives en les freqüències al·lèliques del locus *SOD-1\** quan comparen les mostres de l'Atlàntic oest i est. Posteriorment Thompson & Contin (1980) tampoc troben diferències significatives en les freqüències al·lèliques del mateix locus per les dues vessants de l'Atlàntic. Bert Ely (comunicació personal) quan augmenta la grandària mostral del treball d'Alvarado Bremer *et al.* (1999), passa de cent cinquanta-set individus a dos-cents deu individus, i reanalitza les dades amb els nous individus tampoc observa diferències significatives entre l'Atlàntic est i oest.

La manca de diferenciació entre la tonyina de l'est i l'oest contrasta amb la clara subdivisió detectada al·lozímicament. Ja s'ha comentat que en teoria

l'ADNmt és una eina més poderosa que l'anàlisi al·lozímica per resoldre estructures poblacionals. Així doncs, com es pot explicar que els loci al·lozímics mostrin una diferenciació que no s'observa en l'anàlisi de l'ADNmt?

Ward *et al.* (1994; 1997) proposa la selecció cap als loci al·lozímics que mostren la diferenciació com una de les causes per explicar uns resultats similars en la tonyina d'aleta groga (*Thunnus albacares*). Els autors troben diferenciació al·lozímica significativa per un locus (*GPI-A\**) entre l'oceà Pacífic est (Califòrnia i Mèxic) i les localitats del centre i oest de l'oceà Pacífic (Filipines, Hawaii, i el mar de Coral). Mentre que analitzant les mateixes mostres mitjançant RFLP de tot l'ADNmt no observen diferències significatives.

Una altra resposta a la pregunta podria atribuir-se a unes grandàries mostrals més petites en el treball de l'ADNmt i per tant no hi hauria prou poder de resolució per trobar la diferenciació. Tot i que aquesta és una possible causa, no sembla la resposta correcta. Una anàlisi preliminar amb cent vuitanta nou individus (divuit dels quals pertanyien a la localitat de l'Atlàntic oest) va mostrar diferenciació entre l'Atlàntic oest i el Mediterrani, però l'anàlisi definitiu (aquesta resi) amb un augment aproximadament del doble de grandària mostral no presenta la diferenciació. Un patró similar ha succeït en la reanàlisi de les mostres d'Alvarado Bremer *et al.* (1999) per Ely.

Acceptant de nou la particularitat que l'elevat ritme d'evolució de l'ADNmt el fa més sensible als canvis recents. L'evolució fins a l'actualitat de les àrees de posta de la tonyina a l'Atlàntic nord podria explicar la discordança entre els resultats al·lozímics i mitocondrials. Segons Cury *et al.* (1998), les àrees de posta actuals de la tonyina provenen de la situació de l'Atlàntic nord durant les glaciacions del Plistocè. En aquesta època, les úniques localitats adequades per a la reproducció de la tonyina serien la conca est del mar

Mediterrani i el golf de Mèxic. A més, durant aquest temps la distribució de la tonyina hauria estat molt més restringida sense cap tipus de flux gènic entre les dues vessants atlàntiques. Segons això, la diferenciació al·lozímica podria reflectir aquesta situació ancestral. En canvi, la situació actual podria ser una homogeneïtat genètica amb un cert intercanvi d'individus.

Tot i que es creu que la tonyina té una cert comportament filopàtric cap a l'àrea de posta (Cury *et al.* 1998; Nemerson *et al.*, 2000), la manca de diferenciació observada per l'ADNmt podria reflectir una situació més recent que la proposada anteriorment. La possible ampliació de les àrees de posta cap al centre de l'oceà Atlàntic (entre les illes Bermudes i les Açores; Lutcavage *et al.*, 1999), l'intercanvi d'individus, que oscil·la entre un 1 i un 10%, entre les dues vessants de l'Atlàntic afavorit per la gran capacitat migratòria de l'espècie (Nemerson *et al.*, 2000) i la possible zona d'hivernació compartida al voltant de les illes Açores (Mather *et al.*, 1995) podria portar a l'actualitat un flux gènic suficient per homogeneïtzar genèticament la tonyina a l'Atlàntic nord.

Els resultats de l'anàlisi de la demografia històrica juntament amb una filogènia en forma d'estrella corroboraria el possible escenari per la tonyina a l'Atlàntic nord i el Mediterrani. Seguint el protocol descrit per les altres dues espècies, a partir del paràmetre  $\tau = 7.118$  es pot calcular el temps que porta la població recuperant-se des de el darrer coll d'ampolla. Aplicant, de nou, el ritme de substitució de 14% per milió d'anys es pot estimar que la població va partir una forta reducció demogràfica fa uns 60 000 anys. Tot i l'error associat a aquest tipus de càlculs, la data estimada precedeix a l'última glaciació, just quant la població va patir una reducció de la grandària degut a la reducció de l'hàbitat (Cury *et al.*, 1998).

En resum, l'estructura de la variabilitat genètica de la tonyina no està del tot clara. Segurament l'anàlisi mitocondrial reflecteix una situació més actual

que els resultats al·lozímics. La problemàtica de l'estructuració poblacional a l'Atlàntic Nord ja va ser pronosticada per Mather *et al.* (1995) on conclou "un nombre infinit de combinacions entre estocs, i graus de connexió entre ells, teòricament poden existir en l'Atlàntic i els seus mars adjacents". Així, per resoldre correctament l'estructura poblacional dins de l'oceà Atlàntic segurament s'hauria d'enfocar el problema amb una anàlisi exhaustiva amb diferents marcadors genètics. El mostreig hauria de ser molt intensiu, sobretot focalitzat a les àrees de posta i amb especial èmfasi a l'estudi de les larves.

#### 5.4.3. Introgressió mitocondrial entre espècies de *Thunnus*

A partir de l'anàlisi filogenètica de la clada 2 conjuntament amb les seqüències del D-loop d'altres espècies de *Thunnus* (FIGURA 4.21) s'observa que aproximadament un 6% (20 de 319) de les tonyines vermelles tenen una seqüència de D-loop molt similar a la d'altres espècies de túnids.

Dels vint individus que pertanyen a aquesta clada, vuit formen un llinatge germà amb les seqüències de la tonyina del Pacífic (*Thunnus thynnus orientalis*), els dotze restants són extremadament similars a les de la bacora.

En principi, seria fàcil atribuir aquest resultat a un error a la identificació de les espècies. A més, el fet que la majoria d'individus siguin joves complicaria l'assignació a quina espècie pertany cada individu (Gibbs & Collette, 1967). Ara bé, aquest error només es podria haver donat a les seqüències de tipus bacora, ja que la distribució geogràfica d'aquesta espècies és l'única que es solapa amb la de la tonyina .

La disponibilitat de les lectures dels loci al·lozímics de tots els individus descarta la possibilitat d'un error a la identificació de les espècies. La comprovació dels fenotips d'isoenzims ha permès comprovar que aquests

individus presenten, per a tots els loci, les lectures típiques de la tonyina i diferents de les lectures de la bacora. No s'ha pogut comprovar els individus amb seqüència similar a la tonyina del pacífic ja que no es disposen de lectures d'isoenzims per a aquesta espècie.

Una possible explicació a la presència de seqüències de tipus bacora i de tipus tonyina del pacífic en el genoma de la tonyina, seria una transferència interespecífica de l'ADNmt entre aquestes tres espècies. Segons això, la introgressió de l'ADNmt s'hauria produït per una hibridació entre les espècies i un reemplaçament de part de genoma mitocondrial de la tonyina per l'ADNmt de les altres dues espècies.

L'intercanvi de material genètic entre espècies de *Thunnus* ja ha estat observat prèviament per Chow i Kishino (1995). Aquests autors observen una gran homologia del gen nuclear *ITS1* entre la bacora i la tonyina de pacífic (*Thunnus thynnus orientalis*), però en canvi aquestes espècies són molt divergents a nivell mitocondrial. Addicionalment, en el mateix estudi també observen un individu de tonyina del pacífic amb una seqüència d'ADNmt molt similar a la tonyina. Per explicar aquest resultat, els autors proposen la introgressió de l'ADNmt de la bacora dins de la tonyina del pacífic i un reemplaçament de gairebé la totalitat dels llinatges originals en la població pacífica de la tonyina del pacífic.

Tenint en compte els resultats de Chow i Kishino (1995) i els d'aquesta tesi en conjunt, es pot deduir que de les tres espècies involucrades en la introgressió (tonyina, tonyina del pacífic i bacora), la bacora és l'única espècie que no ha rebut cap introgressió. Cap dels individus de bacora seqüenciats pel D-loop en aquesta tesi de les presenta seqüència similar a qualsevol altre espècie.

La distribució solapada de la bacora i de la tonyina del pacífic en el Pacífic, i de la bacora i de la tonyina en l'Atlàntic no impediria el pas de material genètic de la bacora cap a les altres dues espècies. La introgressió d'ADNmt tipus bacora en aquestes dues espècies s'hauria produït amb diversos esdeveniments d'hibridació amb poques femelles de bacora i mascles de les altres dues espècies. Posteriorment, la introgressió s'hauria mantingut amb retrocreuaments entre els híbrids i els individus purs en cadascuna de les dues espècies de tonyina per separat. La situació nuclear dels gens que contribueixen a l'aïllament reproductiu hauria provocat una tendència més elevada de l'ADNmt a introduir-se (Benton & Jones, 1983).

Tenint en compte els valors de divergència entre els grups de seqüència, representats en l'arbre (FIGURA 4.21), es pot inferir una seqüència cronològica de les hibridacions en com a mínim tres esdeveniments d'hibridació. A més, amb l'aplicació del rellotge molecular (14% per milió d'anys) es pot estimar a grans trets els temps des de que es van produir les hibridacions:

1. Fa uns 500 000 anys es va introduir de l'ADNmt de la bacora cap a la tonyina del pacífic. Durant aquest lapse de temps s'ha format la divergència entre aquests dos grups de seqüències.
2. Més recentment, un possible contacte entre les dues espècies de tonyina va portar un intercanvi bidireccional de material genètic. La presència d'ADNmt de la tonyina a la tonyina del pacífic està documentat per Chow i Kishino (1995).
3. La gran homologia de seqüència entre alguns haplotipus de la clada 2 i la bacora indica una hibridació molt recent en el temps o fins i tot la que aquest individus siguin híbrids de mare bacora i pare tonyina .

Tot i que la introgressió sembla bastant comuna en peixos (Smith, 1992, Politov *et al.*, 2000) fins a la data el *Thunnus* es l'únic gènere d'una espècie

pelàgica marina amb una prova molecular clara d'una hibridació in introgressió de l'ADNmt.

La clara evidència d'introgressió d'ADNmt entre les espècies de túnids fa prendre amb una certa precaució els resultats dels estudis filogenètics d'aquest gènere basats en l'ADNmt. Idealment, al moment d'intentar resoldre la filogènia d'aquest gènere i les espècies afins s'hauria d'enfocar utilitzant com a mínim dos marcadors genètics, un mitocondrial i un altre nuclear.

## ***6. Discussió general***





## 6. Discussió general

### 6.1. NIVELLS DE VARIABILITAT I PATRONS D'ESTRUCTURACIÓ GEOGRÀFICA

Tots els nivells de diversitat haplotípica i nucleotídica mitocondrial estimats per a cadascuna de les espècies (TAULA 6.1) són superiors a la mitjana calculada a partir dels valors de trenta-set espècies de teleostis marins ( $h = 0,65$  i  $\pi = 0,52\%$ ) (Rocha-Olivares *et al.*, 2000). Cal tenir en compte que aquesta mitjana ha estat calculada a partir d'estudis molt diversos, inclosos tècniques de RFLP, les quals no tenen tanta capacitat de detectar la

TAULA 6.1. Nivells de diversitat molecular en les tres espècies estudiades

Espècie	n	nombre d'haplotipus	Índexs de diversitat molecular	
			haplotípica (h)	nucleotídica % ( $\pi$ )
Bonítol	48	32	0,948	6,9
Bacora	123	103	0,989	5,4
Tonyina	319	205	0,990	4,4

TAULA 6.2. Nivells de variabilitat de la regió control del mtDNA en peixos marins

Espècie	<i>h</i>	$\pi$ (%)	Referència
<i>Scianops ocellatus</i>	0,95-1,00	2,5-3,7	Seyoum <i>et al.</i> , 2000
<i>Mugil cephalus</i>	1,00	1,1-3,1	Rocha-Olivares <i>et al.</i> , 2000
<i>Sebastes sp</i>	0,95-0,87	1,59-2,1	Rocha-Olivares <i>et al.</i> , 1999
<i>Ophioblennius atlanticus</i>	1,00	1,09	Shulman & Bermingham, 1995
<i>Microstomus pacificus</i>	0,99	1,38	Stepien, 1999
<i>Sardinops sp</i>	0,96-1	1-3	Grant & Bowen, 1998
<i>Acipenser transmontanus</i>	0,93-0,97	0,75-1,20	Brown <i>et al.</i> , 1993
<i>Xiphias gladius</i>	0,94-0,98	0,046	Alvarado Bremer <i>et al.</i> , 1996
<i>Xiphias gladius</i>	0,832-0,994	0,034	Rosel & Block, 1996
<i>Thunnus thynnus thynnus</i>		0,017	Alvarado Bremer <i>et al.</i> , 1997
<i>T. thynnus orientalis</i>		0,032	
<i>T. alalunga</i>		0,038	
<i>T. obesus</i>		0,072	
<i>T. maccoyii</i>		0,034	
<i>T. atlanticus</i>		0,041	
<i>T. tonggol</i>		0,060	
<i>T. albacares</i>		0,018	
<i>T. obesus</i>	0,72		Alvarado Bremer <i>et al.</i> , 1998

variabilitat. En canvi, quan es comparen amb els estimats a la regió control de l'ADNmt per altres espècies marines (TAULA 6.2). els valors de diversitat de les tres espècies sí que s'ajusten

Una comparació més detallada dels valors de diversitat amb els de la TAULA 6.2, s'observa que el nivell de diversitat haplotípica de les tres espècies es situa aproximadament en un terme mig. Per altra banda, els valors de diversitat nucleotídica es situen en a la part alta rang proposat, els casos més extrems són el bonítol i la bacora amb un nivell de diversitat només superat per la tonyina d'ulls grossos (*Thunnus obesus*) i el *Thunnus tonggol*.

La comparació del nivell de diversitat entre les tres espècies pot donar una millor referència de la magnitud de variabilitat de les espècies. Així, el bonítol presenta el valor de diversitat haplotípica menor, al contrari de la diversitat nucleotídica què és la més elevada de les tres espècies. Els dos valors de diversitat de la bacora es poden considerar elevats, la diversitat haplotípica és molt similar al valor màxim de la tonyina; el valor de diversitat nucleotídica de la bacora també és relativament elevat sobretot si es compara amb l'obtingut per la tonyina . Finalment, el nivell de diversitat haplotípica de la tonyina és el més elevat, però en canvi, la diversitat nucleotídica és la més baixa de les tres espècies.

**TAULA 6.3.** Classificació dels peixos marins per Grant & Bowen (1998) segons els nivells de diversitat i el grau de subestructuració poblacional

		<i>h</i>	
		<i>baixa</i>	<i>alta</i>
<i>π</i>	<i>baixa</i>	1. Coll d'ampolla poblacional recent o un efecte fundador amb pocs llinatges mitocondrials	2. Coll d'ampolla poblacional seguit per una expansió de la població i acumulació de mutacions
	<i>alta</i>	3. Divergència entre poblacions subdividides geogràficament.	4. Grans poblacions estables a una història evolutiva llarga i contacte secundari entre llinatges diferents.

Segons els nivells de diversitat haplotípica i nucleotídica mitocondrial i el grau de subestructuració poblacional, Grant & Bowen (1998) han classificat els peixos marins en quatre categories (TAULA 6.3). Amb la base d'aquesta classificació es poden assignar les categories a cadascuna de les espècies.

Segons això, el nivell relativament baix de diversitat haplotípica juntament amb l'elevada diversitat nucleotídica del bonítol s'ajusta a la categoria 3. Aquesta categoria es caracteritza pel contacte secundari entre poblacions prèviament aïllades, escenari que consistent amb la hipòtesis biogeogràfica proposada per a aquesta espècie. Tot i que segons els autors, aquesta categoria correspondria més a peixos d'aigües continentals que no pas

peixos marins, recentment també s'ha observat un patró d'estructuració geogràfica i de diversitat similar en altres peixos marins com la bacoreta (*Euthynnus alleteratus*, Alvarado Bremer & Ely, 1999).

Els elevats valors de diversitat, tant haplotípica com nucleotídica, de la bacora correspondrien a la categoria 4. La bacora compleix amb la condició descrita per a aquesta categoria d'un contacte secundari entre dos llinatges diferenciats anteriorment per un aïllament al·lopàtric. En canvi, no compleix amb la condició d'una homogeneïtat genètica. Similarment a la bacora, l'espècie piscícola pelàgica, *Sciaenopus ocellatus*, presenta també uns nivells de diversitat haplotípica i nucleotídica elevats (vegeu TAULA 6.2) i una estructuració poblacional entre les localitats del Golf de Mèxic i la costa atlàntica americana (Seyoum *et al.*, 2000).

Els nivells de diversitat de la tonyina, diversitat haplotípica elevada i diversitat nucleotídica baixa, corresponen a la segona categoria. Aquest nivells donats són conseqüència d'una expansió després d'un període de grandària poblacional efectiva baixa. Durant la ràpida recuperació de la grandària poblacional es poden retenir noves mutacions que formaran nous haplotipus ( $h$  elevada) però poc divergents entre ells ( $\pi$  baixa) (Slatkin & Hudson, 1991; Rogers, 1995). Aquest escenari coincideix perfectament amb el descrit en aquesta tesi per la tonyina.

En conclusió, malgrat que les tres espècies pertanyen a la mateixa família i semblin tenir una biologia similar, cada espècies presenta una història d'estructuració geogràfica de la variabilitat genètica particular. En general, l'estructura poblacional sembla estar lligada als patrons migratoris de cadascuna de les espècies. Així, el caràcter clarament nerític del bonítol i seva relativa capacitat migratòria porta a formar una subestructuració poblacional molt diferenciada, segurament lligada a esdeveniments biogeogràfics del passat. En canvi, la bacora amb una capacitat migratòria

més elevada no es subestructura dins del mar Mediterrani. Però, aquesta capacitat de migració no és suficient per homogeneïtzar genèticament les localitats de l'Atlàntic nord-est i el mar Mediterrani. La fidelitat cap al lloc de posta ajudaria a diferenciar genèticament la bacora del Mediterrani i la del l'Atlàntic. Finalment, l'elevada capacitat migratòria de la tonyina, és l'espècie que realitza les migracions més elevades de tots els túnids, juntament amb les possibles àrees de posta noves al centre de l'Atlàntic homogeneïtzaria genèticament localitats tant allunyades geogràficament com la del mar Egeu i la de la costa Atlàntica americana.

En definitiva, sembla clara la relació inversa entre la capacitat migratòria i la possibilitat d'estructurar-se genèticament, quant més migradora és una espècie menys possibilitat d'estructurar-se té. La capacitat migratòria i per tant la natació d'aquestes espècies està estretament lligada a l'endotèrmia (Block & Finnerty, 1995). El gènere *Thunnus* presenta l'habilitat de poder elevar la temperatura del múscle locomotor, vísceres, cervell i ulls per sobre la temperatura de l'aigua. L'endotèrmia permet a aquestes espècies tenir un millor rendiment natatori (Altringham & Block, 1997) i suportar aigües més fredes (Block & Finnerty, 1995) i per tant realitzar migracions a llarga distància. En canvi, el caràcter ectotèrmic del gènere *Sarda* no li permet moure's d'aigües relativament temperades i per tant la seva capacitat migratòria és molt més restringida.

## 6.2. QÜESTIONS PENDENTS

Al llarg de la discussió d'aquesta tesi han quedat algunes qüestions pendents. Tot i que durant la discussió ja s'ha anat realitzant propostes per intentar solucionar els dubtes plantejats, en una visió més general del treball surten nous dubtes pendents de resoldre.

En un resum comparatiu de l'estructuració de les espècies detectada segons l'estudi de variabilitat de seqüència del D-loop (aquesta tesi) i la variabilitat genètica segons al·loenzims (TAULA 6.4) s'observen certes discrepàncies que no estan resoltes.

El bonítol és l'única espècie, de les tres estudiades, que no presenta discrepàncies en l'estructuració genètica segons la metodologia utilitzada. En aquesta espècie, l'anàlisi de la variabilitat de seqüència de la regió control i l'estudi al·lozímic coincideixen en diferenciar genèticament la localitat de l'Egeu de les altres dues localitats (Ligúria / Jònic). A més, el comportament migratori del bonítol explica perfectament aquesta diferenciació.

**TAULA 6.4.** Nivells d'estructuració en l'àrea estudiada de les tres espècies segons la tècnica utilitzada.

<i>Espècie</i>	<i>Àrea geogràfica</i>	<i>Resultats estructuració</i>	
		<i>ADNmt</i>	<i>al·loenzims</i>
Bonítol	Mediterrani	diferenciació	diferenciació
Bacora	Mediterrani	no diferenciació	no diferenciació
	Atl. est / Med.	diferenciació	no diferenciació
Tonyina	mediterrani	no diferenciació	no diferenciació
	Atl. oest / Med.	no diferenciació	diferenciació

Per altra banda, les dues espècies del gènere *Thunnus* (tonyina i bacora) presenten resultats similars dins d'un mateix mar. Les dues espècies són genèticament homogènies dins del Mediterrani.

Un dels principals dubtes sorgeix quan es comparen els resultats de la bacora i la tonyina en una àrea geogràfica més ampla. L'anàlisi de l'ADNmt presenta un patró d'estructuració diferent per a les dues espècies diferents que l'observat per l'estudi dels al·loenzims. Per exemple, segons l'ADNmt la bacora de l'Atlàntic est és genèticament diferent de la del Mediterrani; en canvi, els resultats al·lozímics presenten una homogeneïtat genètica entre aquestes dues localitats. Pel que fa a la tonyina, l'estudi mitocondrial no diferencia la localitat del Mediterrani de la de l'Atlàntic oest; per altra banda, la diferenciació entre aquestes dues localitats sí que és detectada mitjançant l'estudi al·lozímic.

Malgrat que a la discussió per separat de cada espècie es presenten hipòtesis que puguin explicar aquesta discordança de resultats, en general no està clar quins són realment els patrons d'estructuració genètica d'aquestes espècies. Segurament l'anàlisi de l'ADNmt reflecteix un escenari d'estructuració molt més recent que observat per els al·loenzims.



### 6.3. GESTIÓ

Tal i com s'ha comentat a la Introducció les eines genètiques han de representar un paper molt important a la gestió dels recursos pesquers. Però, quina és la base genètica que s'ha de prendre alhora de gestionar la pesqueria d'una espècie si els resultats genètics de diferents metodologies no són concordants?

En aquest sentit, Mortiz (1994) va formalitzar dos conceptes en relació a la profunditat de la diferenciació poblacional dins d'una espècie. L'autor va definir els conceptes d'ESU "unitats evolutivament significatives" (de l'anglès *Evolutionarily Significant Units*) com subdivisions poblacionals amb una història relativament profunda, i el va distingir del terme MU "unitats de gestió" (de l'anglès *Management Units*) que representen segments poblacionals poc diferenciats, però distingibles, connectats per un flux gènic molt tènue o nul. Posteriorment, Avise (1998) proposa quatre pautes, basades en la concordança genealògica (Avise & Ball, 1990), per poder classificar les estructures genètiques definides com a ESU:

- i. Concordança de molt caràcters dins d'un mateix segment d'ADN no recombinant.
- ii. Concordança entre diversos loci independents.
- iii. Concordança d'estructures genètiques similars amb espècies distribuïdes en la mateixa àrea geogràfica
- iv. Concordança entre les subpoblacions genètiques i les proves biogeogràfiques.

Tal i com es pot observar, els ESUs són una estructura genètica molt restrictiva. En canvi, els MUs són subestructures poblacionals molt més laxes amb només una divergència genètica significativa a nivell nuclear o a nivell mitocondrial. Segons Mortiz (1994) la base de la gestió a curt termini

s'ha d'enfocar sobre els MUs. Per altra banda, els ESUs han de gestionar-se cap a una conservació més a llarg termini.

Els resultats de l'estructuració geogràfica de la variabilitat genètica de les tres espècies estudiades és un marc perfecte d'aplicació d'aquestes conceptes de gestió.

### 6.3.1. Bonítol

Els dos subestructuracions clarament diferenciades genèticament del bonítol : el mar Egeu i el grup del mar de Ligúria amb el mar Jònic, són un exemple molt clar de dos ESUs independents. L'assignació geogràfica dels dos llinatges mitocondrial amb una clara diferenciació dels llinatges per vint-i-tres posicions fixes (premissa i), juntament amb una concordança de resultats al-lozímics (ii), una explicació poblacional similar a l'anxova (iii) i uns processos biogeogràfics que expliquen la diferenciació (iv) suposa que les dues unitats poblacionals del bonítol corresponen a dos ESUs.

Tal i com s'ha comentat anteriorment cadascun dels ESUs, mar Egeu i Ligúria / Jònic, s'han de gestionar com unitats totalment diferenciades amb un conservació específica a llarg termini. La gestió s'ha de centralitzar sobretot en l'ESU del mar Egeu, en aquesta àrea és on actuen més la flota Turca (Oray *et al.*, 1997), amb les captures més importants del món malgrat la relativa importància de la pesca del bonítol dins del Mediterrani (un 60% de les captures mundials provenen de la flota turca, ICCAT, 2000). Tot i això, l'ICCAT no proposa cap de gestió específica per a aquesta espècie, ni molt menys proposa una gestió diferenciada per a cadascuna de les dues unitats. L'única mesura de recomanació de la gestió, generalitzada per a totes les espècies de petits túnids, és que han de ser gestionats de manera regional (ICCAT, 2000).

### 6.3.2. Bacora

Cadascuna de les dues subestructures diferenciades de la bacora, Mediterrani i Atlàntic nord-est, compleixen tres de les quatre premisses que defineixen un ESU. La discordança entre els resultats d'estructura genètica de l'ADNmt i els al·loenzims compleix està amb desacord amb la segona condició per definir ESU. Segons això, i tenint en compte que la tènue diferenciació genètica entre aquestes dues localitats, es pot assignar que cadascuna de les àrees com és una MU independent. Així, tot i la manca de diferenciació genètica observada pels al·loenzims, la bacora del Mediterrani i la de l'Atlàntic s'haurien de gestionar separatament.

Aquesta recomanació concorda amb la gestió proposada per l'ICCAT per la bacora del Mediterrani i l'Atlàntic nord. Des de 1990, l'ICCAT, basant-se en estudis de paràmetres morfomètrics i merístics, proposa una gestió diferenciada per la bacora del Mediterrani i l'Atlàntic nord.

Tal i com s'ha dit a la introducció a l'Atlàntic nord es capturen unes 60 000 tones anuals. Aquest nivell tant important de pesca a l'Atlàntic nord ha portat a ICCAT a recomanar la baixa de captures d'aquest estoc, els nivells actuals de pesca estant portant a una explotació completa de l'estoc. Pel que fa al Mediterrani, amb unes captures molt menys importants, l'ICCAT no recomana cap tipus de gestió específica per a aquest estoc (ICCAT 2000).

### 6.3.3. Tonyina

Similarment a la bacora, els dos estudis genètics de la tonyina (ADNmt i al·loenzims) no presenten resultats coincidents. En aquest cas, però, la diferenciació entre l'Atlàntic oest i el Mediterrani és observada per els al·loenzims; en canvi, l'estudi de la regió control de l'ADNmt no presenta diferenciació. Segons això, les poblacions del Mediterrani – Atlàntic est i la

del Atlàntic oest són dos MUs independents i per tant han de ser gestionades independentment.

Basant-se en el coneixement de les àrees de posta i els patrons migratoris de l'espècie l'ICCAT, des de 1982, ja va definir la presència de dos estocs a l'Atlàntic amb una límit teòric situat al meridià 45<sup>0</sup>W. Tot i que la situació geogràfica de la barrera no sembla ajustar-se massa a la biologia de l'espècie, la gestió en dos estocs diferenciats sí que està en coincidència amb la mesura proposada en aquesta tesi (ICCAT, 2000).

En resum, cap dels objectius d'aquesta tesi ha estat proposar les mesures específiques de gestió per a les pequeries de les tres espècies. Només s'ha intentat identificar quins són els estocs (o com a mínim MUs) a gestionar diferencialment per a cadascuna de les tres espècies. Per a la identificació d'aquestes unitats a gestionar separatament s'ha agafat el criteri menys restrictiu i per tant més conservatiu. A la mínima que s'observi diferenciació, independentment de la tècnica, i sempre i quan els resultats siguin consistents s'ha de considerar la formació d'estocs (o MU) diferenciats. Curiosament, l'ICCAT proposa mesures de gestió coincidents amb els proposats en aquesta tesi en les dues espècies que la diferenciació no està molt clara (bacora i tonyina). En canvi, en el bonítol amb una diferenciació entre localitats molt profunda l'ICCAT no proposa cap gestió diferenciada pels dos ESUs.



## ***7. Conclusions***



## **7. Conclusions**

1. La regió control de les tres espècies estudiades i en general de la família Scombridae segueix els patrons d'estructura i evolució descrit per a altres espècies de peixos i mamífers. Dels tres domini mitocondrials el Domini I és el que presenta una variabilitat més elevada, amb poques restriccions selectives. Per tant aquest segment mitocondrial és un marcador genètic idoni per inferir l'estructura poblacional d'aquestes espècies.
2. S'ha calibrat el rellotge molecular per al primer domini de la regió control d'aquestes espècies en 7-14% substitucions per milió d'anys.
3. De les tres espècies estudiades, el bonítol és l'única que presenta una subestructuració dins del mar Mediterrani. La presència de dos llinatges mitocondrials heterogèniament repartits i la elevada divergència entre ells reflexa la història evolutiva d'aquesta espècie en aquesta regió durant les glaciacions del Plistocè.



4. La bacora presenta una diferenciació genètica molt tènue, però clara, entre el Mediterrani i l'Atlàntic. Aquesta diferenciació concorda amb els estudis de les dades morfomètriques i merístiques. Per altra banda, la manca de diferenciació observada entre les tres localitats atlàntiques s'explica perfectament pel règim migratori d'aquesta espècie.
5. La tonyina no presenta un heterogeneïtat genètica entre la localitat de l'Atlàntic oest i el Mediterrani. Malgrat la distància geogràfica entre les dues àrees de mostreig, la migració transatlàntica de la tonyina podria suposar un flux gènic suficient per homogeneïtzar genèticament les dues localitats.
6. Aproximadament el 4% dels individus de tonyina presenten un mtDNA similar al de la bacora i un 2,5% presenten un mtDNA similar al de la tonyina del pacífic. La presència d'aquests dos llinatges mitocondrials dins de la tonyina s'explica per diversos episodis d'hibridació i introgressió durant els darrers 500 000 anys.
7. Els nivells de variabilitat molecular de les tres espècies cauen dins de la part superior de rang observat per altres espècies marines utilitzant el mateix marcador genètic. La comparació dels nivells de variabilitat i les estructures poblacionals expliquen una història biogeogràfica particular per a cadascuna de les tres espècies, tot i pertànyer a la mateixa família. La capacitat d'estructuració en relació directa amb la capacitat de migració.
8. La comparació entre els resultats d'aquest estudi amb els obtinguts a partir de l'anàlisi al·loenzims per aproximadament les mateixes mostres mostren diferents nivells d'estructuració en la bacora i la tonyina. El mtDNA possiblement explica una situació poblacional més actual; en canvi, els al·loenzims explicarien una situació relativament ancestral.
9. Es proposa que la gestió de les pesqueries d'aquestes espècies es basi amb les unitats de gestió (MU). Es considera una unitat de gestió totes les subestructuracions poblacionals detectades amb independència de la tècnica utilitzada.

## **8. *Referències***



## 8. Referències

- Aloncle, H. & F. Delaporte, 1977. Les operations de marquage de germons à l'ISTPM depuis août 1968. *ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap.*, **6** (2): 195-201.
- Altringham, J. D. & Block, B. A., 1997. Why do tuna maintain elevated muscle temperatures? power output of muscle isolated from endothermic and ectothermic fish. *J. Exp. Biol.* **200**, 2617-2627.
- Alvarado-Bremer, J.R. & Ely, B., 1999. Pronounced levels of genetic differentiation between two trans-atlantic samples of little tunny (*Euthynnus alletteratus*). *ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap.*, **49** (4): 236-242.
- Alvarado Bremer J.R., A.J. Baker & J. Mejuto, 1995. Mitochondrial DNA control region sequences indicate extensive mixing of swordfish (*Xiphias gladius*) populations in the Atlantic Ocean. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **52**:1720-1732.
- Alvarado Bremer J.R., J. Mejuto, T.W. Greig & B. Ely, 1996. Global population structure of the swordfish (*Xiphias gladius* L.) as revealed by analysis of the mitochondrial DNA control region. *J. exp. Mar. Biol. Ecol.* **197**:295-310.
- Alvarado Bremer J.R., I. Naseri & B. Ely, 1997. Orthodox and unorthodox phylogenetic relationships among tunas revealed by nucleotide sequence analysis of the mitochondrial DNA control region. *J. Fish Biol.* **50**:540-554.
- Alvarado-Bremer, J.R., B. Stequert, N.W. Robertsoni & B. Ely, 1998. Genetic evidence for inter-oceanic subdivision of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) populations. *Mar. Biol.*, **132**: 547-557.
- Alvarado-Bremer, J.R. , I. Naseri & B. Ely, 1999. A provisional study of northern bluefin tuna populations. *ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap.*, **49** (1): 127-129.

- Aquadro, C.F. & D.B. Greenberg, 1983. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics* **103**: 287-312.
- Árnason, E. & D.M. Rand, 1992. Heteroplasmy of short tandem repeats in mitochondrial DNA of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Genetics* **132**: 211-220.
- Avise, J.S., 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York
- Avise, J.C., 1998. Conservation genetics in the marine realm. *J. Heredity* **89**: 377-382
- Avise, J.C. & R.M. Ball Jr, 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Evol. Biol.* **7**:45-67.
- Avise J.S, J. Arnold, R. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb & N.C. Saunders, 1987. Intraespecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. rev. Ecol. Syst.* **18**: 489-522.
- Ballard, J.W.O. & M. Kreitmann, 1995. Is the mitochondrial DNA a strictly neutral marker?. *Trends Ecol. Evol.* **10**: 485-488
- Bard, F.X., 1981. Le thon germon (*Thunnus alalunga*) de l'Océan Atlantique. De la dynamique de population à la stratégie démographique. Tesi doctoral, Universitat Pierre et Marie Curie, Paris.
- Beardsley, G.L., 1969. Proposed migrations of albacore (*Thunnus alalunga*) in the Atlantic Ocean. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **98** (4): 589-598.
- Bianco, P.G., 1990. Potential role of the paleohistory of the Mediterranean and Parathethys basins on the early dispersal of Euro-Mediterranean freshwater fishes. *Ichthyol. Explor. Freshwaters* **1**(2): 167-184.
- Billington, N. & P.D.N. Herbert, 1991. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **48** (supl. 1): 80-94
- Birky, C.W., P. Fuerst & T. Maruyama, 1989. Organelle gene diversity under migration, mutation and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects to heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics* **121**: 613-623.
- Block, B.A., J.R. Finnerty, A.F.R. Stewart & J. Kidd, 1993. Evolution of endothermy in fish: mapping physiological traits on a molecular phylogeny. *Science*, **260**: 210-214.
- Block, B.A. & J.R. Finnerty, 1994. Endothermy in fishes: a phylogenetic analysis of constraints, predispositions and selection pressures. *Env. Biol. Fish.* **40**: 283-302.
- Bogenhagen, D.F. & B.K. Yoza, 1986. Accurate in vitro transcription of *Xenopus laevis* mitochondrial DNA from two bidirectional promoters. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 2543-2550.
- Brill, R.W., 1987. On the standard metabolic rate of tropical tunas, including the effect of body size and acute temperature change. *Fishery Bull. Fish. Wildl. Serv. U.S.* **85**: 25-35.
- Brill, R.W., 1996. Selective advantages conferred by the high performance physiology of tunas, billfishes and dolphin fish. *Com. Biochem. Physiol.* **113A**: 3-15.

- Broughton, R.E. & J.R. Gold, 1997. Microsatellite development and survey of variation in northern bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, **6** (4): 308-314.
- Brown, W.M., 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. A: Evolution of Genes and Proteins (M. Nei & R.K. Kohn eds.), pp 62-89. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Brown, J.R., A.T. Beckenbach & M.J., 1993. Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of the white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Mol. Biol. Evol.* **10**:326-341
- Brown, W.M., M. George & A.C. Wilson, 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:1976-1971.
- Brown, G.G., G. Gadaleta, G. Pepe, C. Saccone & E. Sbisá, 1986. Structural conservation and variation in D-loop containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **192**: 503-511.
- Brown, J.R., K. Beckenbach, A.T. Beckenbach & M.J. Smith, 1996. Length variation, heteroplasmy and sequence divergence in the mitochondrial DNA of four species of sturgeon (*Acipenser*). *Genetics* **142**: 525-535.
- Carey, F.G. & K.D. Lawson, 1973. Temperature regulation in free-swimming bluefin tuna. *Comp. Biochem. Physiol.* **44A**: 375-393
- Carey, F.G., 1990. Further observations on the biology of the swordfish. A Planning the future of Billfishes (R.H. Stroud, ed.) pp.103-122. Savannah: Nat. Coal. Mar. Cons.
- Carone, A., P. Cantatore, M. Roberti, A. Curatolo, D. Levi & Gadaleta, M. N., 1996. Analisi delle sequenze di un gene mitocondriale in campioni di tonno rosso (*Thunnus thynnus*). *Biol. Mar. Medit.*, **3** (1): 381-382.
- Cabot, E., 1995. Xesse: Eyeball SEquence Editor.
- Carpenter, K.E., B.B., Collette & J.L. Russo, 1995. Unstable and stable classification of scombroid fishes. *Bull. Mar. Sci.* **56**(2): 379-405.
- Carvalho G.R. i L. Hauser, 1995. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. A: Molecular Genetics in Fisheries (G.R. Carvalho i T.J.Pitcher eds.), pp 55-81. Cahpman & Hall, London.
- Chang, D.D. & D.A. Clayton, 1984. Precise identification of individual promoters of transcription of each strand of human mitochondrial DNA. *Cell* **36**: 635-643.
- Chow, S. & H. Kishino, 1995. Phylogenetic relationships between tuna species of genus *Thunnus* (Scombridae : Teleostei): Inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genome. *J. Mol. Evol.* **41**: 741-748.
- Chow, S. & H. Ushiana, 1995. Global population structure of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) inferred by RFLP analysis of the mitochondrial ATPase gene. *Mar. Biol.*, **123**: 39-45.
- Clayton, D.A., 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* **28**: 639-705.

- Collette, B.B. & L. N. Chao, 1975. Systematics and morphology of the bonitos (*Sarda*) and their relatives (Scombridae, Sardini). *Fish. Bull.*, **73** (3): 516-625.
- Collette, B.B. i C.E. Nauen, 1983. Scombrids of the world. An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos and related species known to date. *FAO Fish. Synopsis*, **125** (2): 137 p.
- Collette, B.B., T. Potthoff, W.J. Richards, S. Ueyanagi, J.L. Russo & Y. Nishikawa, 1984. Scombroidei: development and relationships. A H.G. Moser *et al* (eds), *Onotgeny and systematics of fishes*. Allen Press, Lawrence, KS, p. 591-620.
- Cooke, J.G. & K. Lancaster, 1996. Examination of alternative stock distribution models for the interpretation of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) tagging recovery data. *ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap.*, **35** (2): 223-230.
- Cort, J.L. & J.C. Rey, 1984. Distribución geográfica de atún rojo (*Thunnus thynnus*) juvenil del Atlántico este, Mediterráneo occidental y Adriático. *ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap.*, **20** (2): 298-318.
- Cort, J.L., 1990. Biología y pesca del atún rojo, *Thunnus thynnus*, del Mar Cantábrico. Publicaciones especiales, *Inst. Esp. Oceanogr.*, **4**: 272 p.
- Cury, P., Anneville, O., Bard, F.X., Fonteneau, A. & Roy, C., 1998. Obstinate North Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*): an evolutionary perspective to consider spawning migration. *ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap.*, **50** (1): 239-247.
- Dizon, A.E., B.L. Taylor & G.M. O'Corry-Crowe, 1995. Why statistical power is necessary to link analyses of molecular variation to decisions about population structure. *Am. Fish. Soc. Symp.* **17**: 288-294
- Doda J.N., C.T. Wright & D.A. Clayton, 1981. Elongation of displacement strands-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**(10): 6116-6120.
- Donaldson K.A. & R.R. Wilson Jr, 1999. Amphipanamic Geminates of Snook (Percoidae: Centropomidae) provide calibration of the divergence rate in the mitochondrial DNA control of fishes. *Mol. Phyl. Evol.* **13**(1): 208-213.
- Edmunds, P.H. & J. I. Sammons, 1973. Similarity of genic polymorphism of tetrazolium oxidase in bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) from the Atlantic coast of France and the western North Atlantic. *J. Fish. Res. Board Can.*, **30**: 1031-1032.
- Encalada, S.E., K.A. Bjorndal, A.B. Bolten, J.C. Zurita, B. Schoroeder, E. Possardt, C.J. Sears & B.W. Bowen, 1998. Population structure of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nesting colonies in the Atlantic and Mediterranean as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. *Mar. Biol.* **130**: 567-575.
- Elliott, N.G. & R.D. Ward, 1995. Genetic relationships of eight species of Pacific tunas (Teleostei: Scombridae) inferred from allozyme analysis. *Mar. Freshw. Res.*, **46**: 1021-1032.
- Faber, J.E. & C. Stepien, 1997. The utility of mitochondrial DNA control region sequences for analyzing phylogenetic relationships among populations, species, and genera of the Percidae. *A Molecular systematics of fishes* pp 129-145 (T.D Kocher & C.A. Stepien eds). Academic Press, San Diego

- Faber, J.E. & C. Stepien, 1998. Tandemly repeated sequences in the mitochondrial DNA control region and phylogeography of the Pike-Perches, *Stizostedion*. *Mol. Phy. Evol.* **10**(3): 310-322.
- FAO, 1997. Review of the state of world fisheries resources: marine fisheries. FAO Fisheries Circular n°920.
- Farris, J.S., 1989. The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics* **5**: 417-419.
- Finnerty, J.R. & B. Block, 1995. Evolution of cytochrome *b* in the Scombroidei (Teleostei): molecular insights into billfish (Istiophoridae and Xiphidae) relationships. *Fish. Bull.* **93**: 78-96.
- Fitch, W.M., 1971. Towards defining the course of evolution: minimal change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* **20**: 406-416.
- Fujino, K., 1970. Immunological and biochemical genetics of tunas. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **99** (1): 152-178.
- Fumagalli, L., P. Taberlet, L. Favre & J. Hausser, 1996. Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial control region of shrews. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 31-46.
- Gibbs, R.H. Jr. & Collette, B.B., 1967. Comparative anatomy and systematics of the tunas, genus *Thunnus*. *Fish. Bull.*, **66** (1): 65-130.
- Givnish, T.J. & K.J. Sytsma, 1997. Consistency, character, and the likelihood of correct phylogenetic inference. *Mol. Phy. Evol.* **7**(3): 320-330.
- Grant, W.S., J.L. García-Marín, & F.M. Utter, 1999. Defining population boundaries for fishery management. A: *Genetics in sustainable fisheries management* (Mustafa, S., editor). p. 27-72. Fishing News Books, Blackwell Science, Oxford.
- Graves J.E., 1995 Conservation genetics of fishes in the pelagic realm. A: *Conservation genetics. Case histories from nature* (J.C. Avise & J.L. Hamrick).
- Graves, J.E., 1998. Molecular Insights into the population structures of cosmopolitan fishes. *J. Hered.* **89**: 427-437
- Graves, J.E. & A.E. Dizon, 1989. Mitochondrial sequence similarity of Atlantic and Pacific albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **46**: 870-873.
- Grewe, P.M. & J. Hampton 1998. An assessment of bigeye (*Thunnus obesus*) population structure in the Pacific ocean, based on mitochondrial DNA and DNA microsatellite analysis. Informe Final del Forum Fisheries Agency and Pelagic Fisheries Research Program, 29 p.
- Grewe, P.M., N.G. Elliot, B.H. Innes & R.D. Ward, 1997. Genetic population structure of southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*). *Mar. Biol.* **127**: 555-561.
- Gu, X., Y.X. Fu & W.H. Li, 1995. Maximum likelihood estimation of the heterogeneity of substitution rate among sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **12**: 546-557
- Gulland, J.A., 1983. Fish Stock Assessment: a manual of Basic Methods. Chichester: FAO/Wiley, 223 pp.



## 8. Referències

---

- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**:95-98.
- Hauser D.L. & G. Boyajian, 1997. Proportional change and patterns of homoplasy: Sanderson and Donoghue revisited. *Cladistics* **13**: 97-100.
- Hillis, D.M., B.K. Mable & C. Moritz, 1996. Applications of Molecular systematics. A: Molecular Systematics 2<sup>nd</sup> ed. (D.M. Hillis, C. Moritz i B.K. Mable eds.), pp 515-545. Sinauer Associate Press, Inc., Sunderland, Massachussets.
- Holsinger, K.E. & R.J. Mason-Gamer, 1996. Hierarchical analysis of nucleotide diversity in geographically structured populations. *Genetics* **142**: 629-639.
- ICCAT, 2000. International Commission for Conservation of Atlantic Tuna. Report for the biennial period 1998-99. Part II.
- Excoffier, L., P.E. Smouse i J.M. Quattro, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479-491.
- Farris, J.S., 1970. Methods for computing Wagner trees. *Syst. Zool.* **34**: 21-24.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783-791.
- Felsenstein, J., 1993. PHYLIP (Phylogeny Interface Package), versió 3.5c. Department of Genetics. University of Washington, Seattle.
- Finnerty J.R. & B. Block, 1992. Direct sequencing of mitochondrial DNA detects highly divergent haplotypes in the blue marlin (*Makaira nigricans*). *Molec. Mar. Biol. Biotechnol.* **1**:206-214.
- Graves, J.E. & J.R. McDowell, 1995. Inter-ocean genetic divergence of Istiophorid billfishes. *Mar. Biol.* **122**:198-203.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of molecular sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 11-120.
- Kluge, A.G. & J.S. Farris, 1969. Quantitative phyletics and the evolution of animals. *Syst. Zool.* **18**: 1-32.
- Kocher, T.D., W.K. Thomas, A. Meyer, S.V. Edwards, S. Pääbo, F.X. Villablanca & A.C. Wilson, 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 6196-6200.
- Kocher, T.D. & A.C. Wilson, 1991. Sequence evolution of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees: Control region and a protein-coding region. A "Evolution of Life" (S. Osawa & T. Honjo, eds.), pp. 391-413. Springer-Verlag, New York.
- Kocher, T.D., J.A. Conroy, K.R. McKaye, J.R. Stauffer & S.F. Lockwood, 1995. Evolution of NADH dehydrogenase subunit 2 in East African cichlid fish. *Mol. Phyl. Evol.* **4**: 420-432.
- Kocher, T.D. & K.L. Carleton, 1997. Base substitution in fish mitochondrial DNA: patterns and rates. A Molecular systematics of fishes pp 13-25 (T.D Kocher & C.A. Stepien eds). Academic Press, San Diego

- Koto, T., 1969. Distribution and movement of the albacore in the Indian and Atlantic oceans based on the catch statistics of Japanese tuna long-line fishery. *Far Seas Fish. Res. Lab. Bull.*, 1: 115-129.
- Kreitmann M. i H. Akashi, 1995. Molecular evidence for natural selection. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 26: 403-422
- Kumar, S., K. Tamura & M. Nei, 1993. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, versió 1.01. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802.
- Lannan, J.E., G.A.E. Gall, J.E. Thorpe, C.E. Nash & B.E. Ballachey, 1989. Genetic resource management of fish. *Genome* 31: 789-804.
- Lee, W-J., J. Conroy, W. Huntting Howell & T.D. Kocher, 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control region. *J. Mol. Evol.* 41:54-66.
- Lee, L. K. & S.Y. Yeh, 1993. Studies on the age and growth of South Atlantic albacore specimens collected from Taiwanese longliners. *ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap.*, 40 (2): 354-360.
- Levinson, G. & G.A. Gutman, 1987. Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 4: 203-221.
- Lutcavage M.E., R.W. Brill, G.B. Skomal, B. C.Chase & P. W. Howey, 1999. Results of pop-up satellite tagging of spawning size class fish in the gulf of Maine: do north Atlantic bluefin tuna spawn in the mid-Atlantic? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56: 173-177.
- Madsen, C.S.; S.C. Ghivizzani & W.W. Hauswirth, 1993. Protein binding to a single termination-associated sequence in the mitochondrial DNA d-loop region. *Mol. Cell Biol.* 13: 2162-2171.
- Magoulas, A., N. Tsimenides & E. Zouros, 1996. Mitochondrial DNA phylogeny and the reconstruction of the population history of a species: the case of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Mol. Biol. Evol.*, 13: 178-190.
- Martin, A., 1995. Mitochondrial DNA sequence evolution in sharks: rates, patterns, and phylogenetic inferences. *Mol. Biol. Evol.* 12: 1114-1123.
- Marshall, H.D. & A.J. Baker, 1997. Structural conservation and variation in the Mitochondrial control region of Fringilline (*Fringilla* spp.) and Greenfinch (*Carduelis chloris*). *Mol. Biol. Evol.* 14(2): 173-184.
- Mather, F.J. III, Mason, J.M. i Jones, A.C., 1995. Historical document: life history and fisheries of Atlantic bluefin tuna. *NOAA Tech. Memorandum*, 370.
- Mayorova, A.A. & K.S. Tracheva, 1959. Distribution and conditions of reproduction of pelamid (*Sarda sarda*) in the Black Sea according to data for the period 1956-57. *FAO Proc. Tech. Pap. Gen. Fish-Connc. Medit.*, 5.
- McElroy, D., P. Moran, E. Bermingham i I. Kornfield, 1992. REAP: The restriction analysis package, versió 4.0. *J. Hered.* 83: 157-158.
- McMillan, W.O. & S.R. Palumbi, 1997. Rapid rate of control region evolution in Pacific Butterflyfishes (*Chaetodontidae*). *J. Mol. Evol.* 43: 473-484.

- Megalofonou, P., 2000. Age and growth of Mediterranean albacore. *J. Fish. Biol.*, **57**: 700-715.
- Meyer, A., 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. A: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes (P.W. Hochachka i T.P. Mommsen eds.), vol. 2. pp: 1-38. Elsevier, Amsterdam.
- Mignotte, B., D. Dunon-Bluteau, C. Reiss & J.C. Monuolou, 1987. Sequence deduced physical properties in the D-loop control region common to five vertebrate mitochondrial DNA. *J. Theor. Biol.* **124**: 57-59.
- Moritz, C., 1994. Defining "evolutionary significant units" for conservation. *Trends. Ecol. Evol.* **9**: 373-375
- Moritz, C., T.E. Dowling & W.M. Brown., 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Sys.* **18**: 269-292.
- Moritz, C. i D. Hillis, 1996. Molecular systematics: context and controversies. A: Molecular Systematics, 2<sup>nd</sup> ed. (D.M. Hillis, C. Moritz i B.K. Mable, eds.), pp 1-17. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts. USA.
- Mullis, K., F. Falona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn & H. Elrich, 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- Naciri M., C. Lemaire, P. Borsa & F Bonhomme, 1999. Genetic study of the Atlantic / Mediterranean transition in the sea Bass (*Dicentharus labrax*). *J. Hered.* **90**: 591-596.
- Nei, M., 1982. Evolution of human races at the gene level. A: Human Genetics, Part A: The Unfolding Gene, Proceedings of the sixth International Congress of Human genetics (B.Bommé-Tamin, T. Cohen & R. M. Goodman eds.), pp: 167-181. Alan r. Liss, Inc., New York.
- Nei, M, 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York.
- Nei, M., 1991. Relative efficiencies of different tree making methods for molecular data. A: Phylogenetic Analysis of DNA Sequences (M. M. Miyamoto i J. L. Cracraft eds), pp: 90-128. Oxford University Press, Oxford.
- Nei, M. & F. Tajima, 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* **97**: 145-162.
- Nemerson, D., S. Berkeley & C. Safina, 2000. Spawning site fidelity in Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus*: the use of six-frequency analysis to test for the presence of migrant east Atlantic bluefin tuna on Gulf of Mexico spawning grounds. *Fish. Bull.* **98**:118-126.
- Nilsson, T., 1982. The Pleistocene: geology and life in the quaternary ice age. D. Ridel Publishing Co., Dordrecht, Holland.
- Oray, I. K. & F.S. Karakulak, 1997. Some remarks on the bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) fishery in turkish waters in 1993, 1994, 1995. *ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap.*, **46** (2): 357-362.

- Ortiz de Zárate, V., P. Megalofonou, G. De Metrio & C. Rodríguez-Cabello, 1996. Preliminary age validation results from tagged-recaptured fluorochrome label albacore in northeast Atlantic. *ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap.*, **43**: 331-338.
- Ortiz de Zárate & J.L. Cort, 1998. Albacore (*Thunnus alalunga*, Bonaterre) stock structure in the atlantic ocean, as inferred from distribution and migration patterns. *ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap.* **50(1)**: 251-261.
- Palumbi S.R., 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annu. Rev. Syst.* **25**: 547-572.
- Parker, A. & I. Kornfield. Evolution of the mitochondrial DNA control region in the *mbuna* (*Cichlidae*) species flock of Lake Malawi, East Africa. *J. Mol. Evol.* **45**: 70-83.
- Piccinetti, C. i G. Piccinetti-Manfrin, 1993. Distribution des larves de thonides en Mediterranee. *ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap.*, **40**: 164-172.
- Piccinetti, C., G. Piccinetti-Manfrin & S. Soro, 1996. Larve di tunnidi in Mediterraneo. *Biol. Mar. Medit.*, **3** (1): 303-309.
- Pla, C., J.M. Pujolar & J. Viñas, 1998. Population genetics and stock structure of large pelagic fish species (*Thunnus thynnus*, *Thunnus alalunga*, *Xiphias gladius*, *Sarda sarda*) in the Mediterranean. *ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap.* **50(1)**: 209-213.
- Pla, C., J.M. De la Serna, G. De Metrio, P. Megalofonou, & L. Orsi-Relini, 1998b. Study of fishing and biology of juvenile bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) from 0-1 age class in the Mediterranean and eastern Atlantic. Informe Final. Projecte 95/010. Brussel.les.
- Politov D.V., N. Y. Gordon, K.I. Afanasiev, Y.P. Altukhov & J.W. Bickman, 2000. Identification of palearctic coregonid fish species using mtDNA and allozyme genetic marker. *J. Fish Biol.* **57**: 51-71.
- Pujolar, J.M., J. Viñas, J.a. Levy & C. Pla, 1998. Molecular study of bluefint tuna (*Thunnus thynnus*) from the Mediterranean using protein electrophoresis and RFLP. *ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap.* **50(1)**: 213-224.
- Rand, D.M., 1993. Endotherms, ectotherms, and mitochondrial genome-size variation. *J. Mol. Evol.* **37**: 281-295.
- Randi, E. & V. Lucchini, 1998. Organization and evolution of mitochondrial DNA control region in the avian genus *Alectoris*. *J. Mol. Evol.*
- Reeb C.A., L. Arcangeli & B.A. Block, 2000. Structure and migrations in Pacific populations of the swordfish *Xiphias gladius*, as inferred through analyses of mitochondrial DNA. *Mar. Biol.* **136**: 1123-1131
- Rey, J.C. & Cort, J.L., 1986. The tagging of the bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the Mediterranean: history and analysis. CIESM, 2 p.
- Rey, J.C., E. Alot, & A. Ramos, 1984. Sinópsis biológica del bonito (*Sarda sarda*) del Mediterráneo y Atlántico este. *ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap.*, **20**: 469-502.
- Rivas, L.R., 1954. A preliminary report on the spawning of the western North Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the Straits of Florida. *Bull. Mar. Sci. Gulf Caribb.*, **4** (4): 302-322.

- Richards, W. J., 1976. Spawning of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the Atlantic Ocean and adjacent waters. *ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap.*, **5**: 267-278.
- Roberti, M., C., Yannopoulos, G. De Metrio, A. Ludovico, F. Milella, A. Carone, P. Megalofonou, F. Bingel, U. Unluata, P. Cantatore & M.N. Gadaleta, 1993. Polimorfismo del DNA mitocondriale in stock di palamita, *Sarda sarda*, del Mar Mediterraneo. *Biol. Mar., suppl. Notiz. SIBM.*, **1**: 349-353.
- Rocha-Olivares, A., R.H. Rosenblatt & R.D. Vetter, 1999. Molecular evolution, systematics and zoogeography of the Rockfish subgenus *Sebastomus* (*Sebastes*, Scorpaenidae) based on mitochondrial Cytochrome *b* and control region sequences. *Mol. Phyl. Evol.* **11**(3): 441-458.
- Rochas-Olivares, A., N.M. Garber & K.C. Stuck, 2000. High genetic diversity, large inter-oceanic divergence and historical demography of the striped mullet. *J. Fish. Biol.* **57**: 1134-1149.
- Rodríguez-Roda, J., 1967. Fecundidad del atún rojo (*Thunnus thynnus*) de la costa sudatlántica de España. *Inv. Pesq.*, **31** (1): 33-52
- Roff, D.A. i P. Bentzen, 1989. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphism:  $\chi^2$  and the problem of small sample sizes. *Mol. Biol. Evol.* **6**:539-545.
- Rogers, A.R., 1995. Genetic evidence for a pleistocene explosion. *Evolution* **49**: 608-615.
- Rogers, A.R. & H. Harpending, 1992. Population growth make waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 552-569.
- Roldán, M. I., J.L. García-Marín, F.M. Utter, & C. Pla, 1998. Population genetic structure of European hake (*Merluccius merluccius*). *Heredity*, **81**: 327-334.
- Rosel P.E. & B. Block, 1996. Mitochondrial control region variability and global population structure in the swordfish, *Xiphias gladius*. *Mar. Biol.* **125**:11-22.
- Rosel, P.E. R. Tiedemann & M. Walton, 1999. Genetic evidence for limited trans-Atlantic movements of the harbor porpoise *Phocoena phocoena*. **133**: 583-591
- Safina, C., 1993. Bluefin tuna in the West Atlantic. negligent management and the making of an endangered species. *Cons. Biol.* **7**: 229-234.
- Saccone, C. Lavane & G. Pesole, 1993. Time and biosequences. *J. Mol. Evol.* **37**:154-159.
- Saccone, C., G. Pesole & E. Sbisá, 1991. The main regulatory region of mitochondrial DNA: Structure-function and Evolutionary pattern. *J. Mol. Evol.* **33**: 83-91.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich & N. Arnheim, 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis & H.A. Erlich, 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Saitou, N. & M. Nei, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.

- Sambrook, J., E.J. Fritsch & T. Maniatis, 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor, Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen & A.R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **74**: 5463-5467.
- Santiago, J., 1993. A new length-weight relationship for the North Atlantic albacore. *ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap.*, **40** (2): 316-319.
- Sara, M. 1985. Ecological factors and their biogeographic consequences in the Mediterranean. A: *Mediterranean marine ecosystems* (M. Moraitou-Apostolopoulou & V. Kiortsis, eds.)
- Sbisá E., F. Tanzariello, A. Reyes. G. Pesole & C. Saccone, 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolution implications. *Gene* **205**: 125-140.
- Schneider, S., J.M. Kueffer, D. Roessli & L. Excoffier, 1997. Arlequin: a software for population genetic data analysis, versió 1.1. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Seyoum, S., M.D. Tringali, T.M. Bert, D. McElroy & R. Stokes, 2000. An analysis of genetic population structure in red drum, *Sciaenops ocellatus*, based on mtDNA control region sequence. *Fish. Bull.* **98**:127-138
- Sharp, G.D. & S.W. Pirages, 1978. Distribution of red and white swimming muscles, their biochemistry, and biochemical phylogeny of selected scombrid fishes. A: *The physiological ecology of tunas*. (Sharp, G.D. & Dizon, A.E. editors). pp. 41-78. Academic Press, Nova York.
- Shedlock, A.M., J.D. Parker, D.A. Crispin, T.W. Pietsch & G.C. Burmer, 1992. Evolution of the salmonid mitochondrial control region. *Mol. Phyl. Evol.* **1**(3): 179-192
- Shields, G.S. & T.D. Kocher, 1991. Phylogenetic relationships of North American ursids based on mitochondrial DNA. *Evolution* **45**: 218-221.
- Shulman M.J. & E. Bermingham, 1995. Early life histories, ocean currents, and the population genetics of the Caribbean reef fishes. *Evolution* **49**: 887-910.
- Slatkin, M. & R. Hudson, 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* **129**: 555-562.
- Smith, G.R., (1992). Introgression in fishes: significance for paleontology, cladistics, and evolutionary rates. *Syst. biol.* **41**: 41-57.
- Stewart, D.T. & A.J. Baker, 1994. Patterns of sequence variation in the mitochondrial D-loop region of shrews. *Mol. Biol. Evol.* **11**: 9-21.
- Stepien, C.A., 1999. Phylogeographic structure of the Dover sole *Microstomus pacificus*: the larval retention hypothesis and genetic divergence along the deep continental slope of the northeastern Pacific Ocean. *Mol. Ecol.* **8**: 923-939.
- Suzuki, A., 1962. Serological studies of the races of tuna VI. *Rep. Nankai Reg. Fish. Res. Lab.*, **16**: 67-70.

Swofford, D.L., 1996. "PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony", versió 4.0. Illinois Natural Survey, Champaign, IL:

Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**:585-595.

Tamura, K. & M. Nei, 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**:512-526.

Thompson, H.C. Jr. & R.F., Contin 1980. Electrophoretic study of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) from the eastern and western North Atlantic Ocean. *Bull. Mar. Sci.*, **30** (3): 727-731.

Thompson, J.D., D.G. Higgins & T.J.Gibson, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.

Turner, S., 1999. Review of bluefin tuna release and recapture information from the ICCAT tagging data base. ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap., **49** (2): 360-362.

Uchupi E., D.A. Ross, 2000. Early Holocene marine flooding of the Black Sea, 2000. *Quat. Res.* **54**: 68-71.

Uzzel, T. i K.W. Corbin, 1971. Fitting discrete probability distribution to evolutionary exents. *Science* **172**:1089-1096.

Vigilant, L., M. Stoneking, H. Harpending, K. Hawkes & A.C. Wilson, 1991. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science* **253**: 1503-1507.

Viñas, J., J. Santiago & C. Pla, 1999. Genetic characterization and Atlantic-Mediterranean stock structure of albacore, *Thunnus alalunga*. ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap., **49** (4): 188-191.

Wakeley, J., 1993. Substituon rate variation among sites in hypervariable region I of human mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **37**:613-623.

Ward, R.D., 1995. Population genetics of tunas. *J. Fish Biol.* **47(supplement A)**: 259-280.

Ward, R.D., 2000. Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia* **420**: 191-200.

Ward, R.D., Elliott, N.G., Grewe, P.M. & Smolenski, A.J., 1994. Allozyme and mitochondrial variation in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) from the Pacific Ocean. *Mar. Biol.*, **118**: 531-539.

Ward, R.D., Elliott, N.G., Ines, B.H., Smolenski, A.J. & Grewe, P.M., 1997. Global population structure of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, inferred from allozyme and mitochondrial DNA variation. *Fish. Bull.*, **95**: 566-575.

Wakeley, J., 1993. Substitution rate variation among sites in Hypervariable region 1 of the human mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **37**:613-623.

Wilson, A.C., R.L. Cann, S. Carr, M.J. George, U.B. Gyllenstein, K.M. Helm-Bychowsky, R.G. Huguchi, S.R. Palumbi, E.M. Prager, R.D. Sage & M. Stoneking, 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* **26**: 375-400.

Xia, X., 2000. Data analysis in molecular biology and evolution. Kluwier Academic Publishers. Boston/ Dordrech/ London.

Yeh, S.Y., T.D. Treng, C.F. Hui & A. Penney, 1997. Mitochondrial sequence analysis on albacore, *Thunnus alalunga*, meat samples collected from the waters off western South Africa and eastern Indian Ocean. *ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap.*, **46** (3): 152-160.

Yoshida, H.O., 1980. Synopsis of biological data on Bonito of the Genus *Sarda*. FAO Fish. Synp. n118.

Zhu, D., B.G.M. Jamieson, A. Hugall & C. Moritz, 1994. Sequence evolution and phylogenetic signal in control-region and cytochrome *b* in rainbow fishes (*Melanotaeniidae*). *Mol. Biol. Evol.* **11**: 672-683.

Zuker, M., 1996. MFOLD versió 3.2 online. <http://www.ibc.wustl.edu/~zuker/dna>.





*Annex*



## PROTOCOLS

### QUADRE 1. Protocol d'extracció de DNA genòmic

- |  |   |
|--|---|
| 1.- Homogenitzar amb un bisturi un tros petit de teixit (uns 5mm <sup>3</sup> ). Col·locar-l'ho en un tub de microcentrifuga (tub <i>ependorf</i> ). | 7.- Centrifugar 4 minuts a temperatura ambient.                               |
| 2.- Afegir 600µl de tampó TENS* i 80µl de proteinasa K (10mgr/ml).   | 8.- Sobrenedant més 2 volums d'etanol absolut fred (-20°C).                   |
| 3.- Incubar amb agitació a 37°C tota la nit.   | 9.- Centrifugar 12 minuts a temperatura ambient.                              |
| 4.- Afegir 650µl de Phenol (saturat amb Tris) al lisat.  | 10.- Decantar l'etanol.   |
| 5.- Centrifugar 4 minuts a temperatura ambient.  | 11.- Afegir al pelet 500µl d'etanol 70% fred (-20°C).                         |
| 6.- En un <i>ependorf</i> nou, recuperar la fase superior (aproximadament un 450µl) afegir-hi 325µl de phenol i 325µl de cloroform isoamílic (24:1). | 12.- Centrifugar 12 minuts a temperatura ambient.                             |
|  | 13.- Decantar l'etanol i deixar secar tota la nit.                            |
|  | 14.- Resuspendre el pelet amb 100µl d'aigua Mili-Q estèril i guardar a -20°C. |

\*Tampó TENS: Tris pH8 0,05M, EDTA 0,1M, NaCl 5M i SDS 5M.  
Nota: totes les centrifugacions es fan 12.000g.

QUADRE 2. Reacció de PCR

	Volum ( $\mu$ l)	Concentració a la reacció
Tampó 10X*	2,5	1X
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0,75	1,5mM
Primer A	1	1mM
Primer B	1	1mM
dNTP (5mM)	2	0,4 mM
Taq polimersa*	0,25	1,25u.
H <sub>2</sub> O	16,5	--
ADN	1	100 ngr

Volum final de la reacció 25 $\mu$ l. La reacció de PCR consta de 35 cicles, amb un pas previ de 4 minuts a 94°C (desnaturalització) i un extensió final del producte de 5' a 72°C. Tots els cicles comprenen un pas de desnaturalització (94°C) durant 45 segons, hibridació a 55°C durant 45 segons i extensió a 72°C durant 1 minut.

\*Amplitaq DNA polymerase, Perkin Elmer, N808-0101.

QUADRE 3. Protocol de neteja del producte de PCR

- 1.- Realitzar la reacció de PCR i comprovar el resultat en un gel d'agarosa.
- 2.- Extreure les proteïnes via phenol/cloroform (Opcional).
- 3.- Transferir el volum de la reacció a la columna de filtració, evitant d'agafar l'oli.
- 4.- Afegir 300 $\mu$ l d'aigua Mili-Q a la columna.
- 5.- Centrifugar a 2000g durant 5 minuts a temperatura ambient.
- 6.- Decantar el volum d'elució de la cambra inferior.
- 7.- Afegir 250 $\mu$ l d'aigua Mili-Q a la columna.
- 8.- Centrifugar a 2000g durant 5 minuts a temperatura ambient. Ha de restar un volum d'entre 1 i 5 $\mu$ l.
- 9.- Repetir passos 7 i 8.
- 10.- Afegir 25 $\mu$ l\* d'aigua Mili-Q, pipetejar diverses vegades i transferir tot el volum a un tub nou.
- 11.- Congelar el producte a -20°C.

Kit de neteja: Ultra free-MC filter units, Millipore, UFC3 LTK25.

## QUADRE 4. Protocol de la Reacció de Seqüenciació

A) Reacció *d'annealing*:

- 1.- Afegir 1µl del primer als 7µl de la reacció de PCR.
- 2.- Bullir durant 5-10 minuts.
- 3.- Centrifugar breument i posar en gel sec i alcohol durant 5 minuts.
- 4.- Descongelar i afegir 2µl del Tampó de reacció\*.
- 5.- Incubar en gel durant 5 minuts i deixar-ho a temperatura ambient durant 2 min.

## C) Reacció de terminació:

- 1.- En un placa NUNC posar 2,5µl de ddNTP, un pou per cada terminador.
- 2.- Preescalfar la placa a 45°C durant 5minuts.
- 3.- Afegir a cada pou 3µl de la reacció de marcatge a cadascun dels 4 pous.
- 4.- Incubar 5 minuts a 45°C.

## E) Gel de seqüenciació:

- 1.- Preparar el gel de seqüenciació d'acrilamida al 6% i urea 7M.
- 2.- Desnaturalitzar la mostra durant 5 minuts a 90°C.
- 3.- Carregar 2,5 µl de cadascuna de les quatre reaccions en pous diferents.
- 4.- Realitzar l'electroforesi a 65W i 1500 V d'1,5 h per corregudes curtes i 3 h per llargues.
- 5.- Autoradiografiar el gel tota la nit en una pel·lícula Kodak XAR-5-X ray film.

## B) Reacció de marcatge:

<i>Label Mix*</i>	2µl
Tampó de dilució de la <i>Sequenase*</i>	1,75µl
0,1M DTT*	1µl
35S-dATP	0,5µl
<i>Sequenase* enzyme</i>	0,25µl (3u.)

- Afegir 5,5µl de la reacció de lligament, posar en gel durant 8 minuts, incubar a temperatura ambient durant 2 minuts.

## D) Parada de la reacció:

- 1.- Afegir 4µl de formamida/blau de bromofenol a cada pou.
- 2.- Carregar la mostra en un gel de seqüenciació o congelar a -20°C.

\* *Sequenase* version 2 DNA Polymerase, Amersham, US 70775).